ความชุก ยีนดื้อยา และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ขยายการดื้อยากลุ่ม beta-lactams สายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและสุกร ในภาคตะวันตกของประเทศไทย ปี 2559-2561

วนารัตน์ บารมีรังสิกุล [1*] เสาวลักษณ์ พาด้วง [2] สายุทธิ บุญสังข์ [2]

[1] สำนักงานปศุสัตว์เขต 7 32 ถนนมาลัยแมน ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม 73000
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ตู้ ปณ. 18 อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี 70150
[*] ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทร. 0 3225 0982 e-mail: certify_rg07@dld.go.th

บทคัดย่อ

Escherichia coli เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทั่วไปในลำไส้คนและสัตว์ เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) ที่มีฤทธิ์ทำลายโครงสร้างของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactams ทำให้เกิดเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุก ยีนดื้อยา และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ขยายการดื้อยากลุ่ม beta-lactams สายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและสุกรในภาคตะวันตกของประเทศไทย ปี 2559 ถึง 2561 ดำเนินการโดยเก็บตัวอย่างซีกัมไก่เนื้อ 694 ตัวอย่าง และซีกัมสุกร 410 ตัวอย่าง จากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันตก นำมาเพาะแยกเชื้อ *E. coli* ทำการทดสอบหาการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase โดยวิธี broth dilution ตรวจหายีนดื้อยา CTX-M, SHV และ TEM โดยวิธี polymerase chain reaction และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase (ESBL *E. coli*) โดยวิธี broth dilution ผลการศึกษาแยกเชื้อ *E. coli* จากซีกัมไก่เนื้อได้ 604 ตัวอย่าง และจากซีกัมสุกร 351 ตัวอย่าง ความชุกของเชื้อ ESBL *E. coli* พบในเชื้อที่แยกได้จากซีกัมไก่เนื้อ 5.1% (31/604) สัดส่วนเชื้อที่พบมีแนวโน้มลดลงจาก 11.4% (24/211) ในปี 2559 เป็น 1.4% (3/214) และ 2.2% (4/179) ในปี 2560 และ 2561 ส่วนเชื้อจากซีกัมสุกรพบ ESBL *E. coli* 29.9% (105/351) แนวโน้มการพบเชื้อในปี 2559, 2560 และ 2561 ลดลงจาก 41.4% (46/111) เป็น 27.5% (22/80) และ 23.1% (37/160) การตรวจสอบยีนดื้อยาพบ CTX-M และ TEM 100% (31/31) ในเชื้อที่แยกได้จากซีกัมไก่เนื้อ ส่วนเชื้อจากซีกัมสุกรพบยีน CTX-M 96.2% (101/105) และ TEM 97.1% (102/105) ในขณะที่ยีน SHV ไม่พบในเชื้อ ESBL *E. coli* ที่ทดสอบทั้งหมด ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพพบเชื้อจากซีกัมไก่เนื้อมีความไวสูงต่อยา colistin และ meropenem 96.8% (30/31) ส่วนเชื้อจากซีกัมสุกรมีความไวสูงต่อยา colistin 98.1% (103/105) และ meropenem 100% (105/105) เชื้อที่ทดสอบทั้งหมดพบรูปแบบการดื้อยาหลายขนานต่อยาตั้งแต่ 4-8 กลุ่ม สรุปผลจากการศึกษานี้พบเชื้อ ESBL *E. coli* ที่เพาะแยกได้จากซีกัมไก่เนื้อมีความชุกต่ำกว่าเชื้อจากซีกัมสุกร สัดส่วนการปรากฏของยีนดื้อยาชนิด CTX-M และ TEM สูง ผลทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพพบว่ายา colistin และ meropenem ซึ่งเป็นยาที่มีความสำคัญสำหรับใช้รักษาโรคในคนยังคงมีประสิทธิผลสูง แต่ยาต้านจุลชีพชนิดอื่นที่ใช้ในทางสัตวแพทย์ส่วนใหญ่พบอัตราการดื้อยาสูงและมีรูปแบบการดื้อยาหลายขนาน การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นที่จะต้องมีมาตรการในการควบคุมการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อบริโภคให้เข้มงวดมากขึ้น ส่งเสริมให้ความรู้กับเกษตรกรให้ตระหนักถึงการใช้ยาต้านจุลชีพในกระบวนการเลี้ยงสัตว์อย่างรอบคอบ เพื่อควบคุมและป้องกันการเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในปศุสัตว์

คำสำคัญ: ความชุก ยีนดื้อยา ความไวต่อยาต้านจุลชีพ ESBL *E. coli* ภาคตะวันตกของประเทศไทย

Prevalence, resistance genes and antimicrobial susceptibility of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers and swine in western Thailand, 2016-2018

Wanarat Barameerungsikul [1*] Saowaluck Paduang [2] Sayut Boonsung [2]

[1] Livestock Office District 7 32 Malaiman Rd., Phra Pathom Chedi, Mueang Nakhon Pathom, Nakhon Pathom province 73000
[2] Veterinary Research and Development Center (western region), PO. Box 18 Chombueng, Ratchaburi province 70150
* Corresponding author: Tel. 0 3225 0982 e-mail: certify_rg07@dld.go.th

Abstract

Escherichia coli, commensal gram negative bacteria in human and animals, it produces extended spectrum beta-lactamases (ESBL) that can break beta-lactam ring of beta-lactam antibiotics, leads to antimicrobial resistance and become as a major public health problem. This study aims to determine of prevalence, resistance genes and antimicrobial susceptibility of extended spectrum beta-lactamases producing *E. coli* strains isolated from broilers and swine in western Thailand, 2016-2018. In this study, a total of 694 and 410 caecal samples of broilers and swine were collected from slaughterhouses in western Thailand for *E. coli* isolation. Screening for ESBL production was done by broth dilution while the presence of resistance genes CTX-M, SHV and TEM was conducted using polymerase chain reaction and antimicrobial susceptibility testing of all ESBL *E. coli* was performed by broth dilution. The results showed that a total of 604 and 351 *E. coli* strains were isolated from broilers and swine. Prevalence of ESBL *E. coli* isolated from broilers was found 5.1% (31/604), the tendency of them was decreasing from 11.4% (24/211) in 2016 to 1.4% (3/214) and 2.2% (4/179) in 2017 and 2018. While ESBL *E. coli* isolated from swine was observed 29.9% (105/351), prevalence trend in 2016, 2017 and 2018 was lower from 41.4% (46/111) to 27.5% (22/80) and 23.1% (37/160). Resistant gene in strains isolated from broilers found CTX-M and TEM 100% (31/31), from swine showed CTX-M 96.2% (101/105) and TEM 97.1% (102/105) while none of the SHV gene from all ESBL *E. coli*. Antimicrobial susceptibility test in strains isolated from broilers presented high susceptible to colistin and meropenem 96.8% (30/31) while the isolates from swine was susceptible to colistin 98.1% (103/105) and meropenem 100% (105/105). Four to eight class of multi-drug resistant pattern was observed in all ESBL *E. coli*. Conclusion, the prevalence of ESBL *E. coli* isolated from broilers is lower than swine. High proportion of CTX-M and TEM gene was presented. All the strains tested were also showed high effectiveness to colistin and meropenem that important in the therapy of human diseases but the most of antimicrobial agents used in veterinary medicine were found highly resistance rate and presence the multi-drug resistant pattern. This study suggest that more stringent measures for regulating antimicrobial use in food animals is needed, encourage farmers to be aware of the prudent use of antimicrobials in animal husbandry to control and prevent the emergence and spread of antimicrobial resistant in livestock.

Keywords: prevalence, resistance gene, antimicrobial susceptibility, ESBL *E. coli*, western Thailand

บทนำ

การดื้อยาต้านจุลชีพที่มีสาเหตุจากการใช้ยาอย่างไม่สมเหตุสมผล เป็นปัญหาสำคัญทางด้านการแพทย์ที่นับวันจะยิ่งทวีความรุนแรงมากขึ้นและยังไม่มีแนวโน้มจะลดลง ในขณะที่ด้านสัตวแพทย์ก็พบอัตราการดื้อยาในสัตว์สูงขึ้นเช่นกันจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคที่มีการขยายตัวเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศและการส่งออก ซึ่งในภาคตะวันตกของประเทศไทยนั้นเป็นแหล่งผลิตปศุสัตว์ที่สำคัญ โดยมีกำลังการผลิตสุกรสูงเป็นอันดับ 1 มีปริมาณการเลี้ยง 2,858,015 ตัวต่อปี คิดเป็นร้อยละ 27 ของปริมาณการเลี้ยงทั้งประเทศ และมีกำลังการผลิตไก่สูงเป็นอันดับ 3 มีปริมาณการเลี้ยง 72,450,548 ตัวต่อปี คิดเป็นร้อยละ 16 ของปริมาณการเลี้ยงทั้งประเทศ (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561 ก) อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ขนาดใหญ่มักมีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมากทั้งเพื่อการรักษา ควบคุม และป้องกันโรค จากข้อมูลในปีงบประมาณ 2560 ของสำนักงานปศุสัตว์เขต 7 พบว่าฟาร์มปศุสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันตกมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันโรคสูงร้อยละ 44 การรักษาร้อยละ 31 และการควบคุมโรคร้อยละ 9 ยาที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นยาในกลุ่ม penicillins, macrolides และ tetracyclines อย่างไรก็ตามการใช้ยาที่มากเกินความจำเป็นหรือใช้อย่างไม่ถูกต้องเหมาะสมเป็นระยะเวลานานจะส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ให้กลายเป็นเชื้อดื้อยาได้

Escherichia coli เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทั่วไปในลำไส้คนและสัตว์ เชื้อสามารถสร้าง extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ทำลายโครงสร้าง beta-lactam ring ของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactams เช่นยากลุ่ม penicillin และ cephalosporin รุ่นที่ 3 ทำให้เกิดเชื้อดื้อยาที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคนและเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก ข้อมูลทางด้านการแพทย์ระหว่างปี 2543-2561 จากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติประเทศไทย (NARST, 2019) พบว่าเชื้อ *E. coli* มีแนวโน้มของอัตราการดื้อยา ampicillin สูงขึ้น อีกทั้งพบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase (ESBL *E. coli*) มีอัตราการดื้อยากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 เช่น cefotaxime และ ceftazidime สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และจากการศึกษาในคน อาหาร สัตว์ และสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย โดย Boonyasiri et al. (2014) พบเชื้อ ESBL *E. coli* ทั้งจากคนงานที่ทำงานในฟาร์มเลี้ยงสุกรและที่ทำงานในโรงงานผลิตอาหาร อุจจาระจากสุกรและไก่เนื้อสุขภาพดีที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค เนื้อสุกรและเนื้อไก่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ รวมถึงตัวอย่างน้ำในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ น้ำจากลำคลอง น้ำนิ่งจากฟาร์มปศุสัตว์ บ่อเลี้ยงกุ้ง และบ่อเลี้ยงปลา โดยเชื้อที่พบจากแหล่งต่างๆ เหล่านี้มีอัตราการดื้อยาที่แตกต่างกันอย่างกว้างขวาง ในขณะที่ผลการศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ ESBL *E. coli* ในเชื้อที่แยกได้จากฟาร์มไก่ไข่และสุกรในประเทศไทย โดย Nuangmek et al. (2018) พบเชื้อมีอัตราการดื้อยาสูงต่อ ampicillin, erythromycin และ ceftriaxone ทั้งยังมีรูปแบบการดื้อยาหลายชนิดร่วมกัน อย่างไรก็ตามการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ ESBL *E. coli* สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์ แต่ลักษณะที่ปรากฏออกมาอาจเป็นผลจากการที่เชื้อมียีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพร่วมด้วย ซึ่งยีนที่ควบคุมการดื้อยาของเชื้อ ESBL *E. coli* ที่พบบ่อย ได้แก่ beta-lactamase class A ประกอบด้วยยีนกลุ่ม CTX-M, SHV และ TEM ที่พบได้บนพลาสมิด (Skuja et al., 2016) โดยยีนที่อยู่บนพลาสมิดนี้สามารถส่งผ่านไปยังเชื้อชนิดเดียวกันหรือเชื้อต่างสายพันธุ์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันทำให้เกิดเชื้อดื้อยาแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อ ESBL *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรจากฟาร์มในอำเภอเมืองพะเยาโดย Nuanmuang et al. (2018) พบรูปแบบเชื้อดื้อยาหลายชนิดร่วมกัน ที่พบบ่อยได้แก่ การดื้อต่อยา ampicillin, cefotaxime, ceftriaxone และ cefpodoxime โดยลักษณะการแสดงออกทางจีโนไทป์ที่พบได้แก่ยีนในกลุ่ม CTX-M และ TEM ข้อมูลจากการศึกษาต่างๆ เหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการ

แพร่กระจายอย่างกว้างขวางของเชื้อดังกล่าวในห่วงโซ่การผลิตอาหารของมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุก ยีนดื้อยา และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ขยายการดื้อยากลุ่ม beta-lactams สายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและสุกรในภาคตะวันตกของประเทศไทย ปี 2559 ถึง 2561 เป็นข้อมูลเผยแพร่ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ได้ทราบและเกิดความตระหนักถึงปัญหาเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ และสำหรับหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้องใช้เป็นข้อมูลประกอบมาตรการในการกำกับดูแลการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างรับผิดชอบ เพื่อช่วยลด ชะลอ หรือควบคุมการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในปศุสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีกัมไก่เนื้อและสุกร

เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันตก 8 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ราชบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี ระหว่างปี 2559 ถึง 2561 จำแนกเป็นซีกัมไก่เนื้อ 694 ตัวอย่าง จาก 230 ฟาร์ม และซีกัมสุกร 410 ตัวอย่าง จาก 206 ฟาร์ม

การเพาะแยกเชื้อ *E. coli* และการทดสอบการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase

ทำการเพาะแยกเชื้อ *E. coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Oxoid, England) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 18-22 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีลักษณะสีชมพูทึบแสงมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ IMViC test เชื้อ *E. coli* จะมีคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้ indole (+), methyl red (+), voges-proskaver (-) และ citrate (-) จากนั้นเก็บรวบรวมเชื้อทั้งหมดใน skim milk ที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนนำมาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hasman et al. (2017) ตามขั้นตอนโดยย่อดังนี้ ดูดเชื้อ *E. coli* จาก skim milk ปริมาณ 30 µl ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ buffered peptone water (Oxoid, England) บ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C นาน 18-22 ชั่วโมง จากนั้นใช้เชื้อปริมาณ 10 µl เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่มีส่วนผสมของยา cefotaxime 1 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 44±0.5°C นาน 18-22 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่มีส่วนผสมของยา cefotaxime 1 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C นาน 18-22 ชั่วโมง และเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* เขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่ไม่มีส่วนผสมของยา cefotaxime บ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C นาน 18-22 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ตามหัวข้อการทดสอบของ commission implementing decision 2013/652/EU โดยใช้วิธี broth microdilution เก็บรวบรวมเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็น ESBL *E. coli* ใน skim milk ที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหายีน CTX-M, SHV และ TEM โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เตรียม DNA template

นำเชื้อ ESBL *E. coli* จากที่เก็บรวบรวมไว้ที่ -80°C เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya agar (Oxoid, England) บ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C นาน 18-22 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อตัวอย่างละ 3-5 โคโลนี ละลายในหลอดที่บรรจุ 0.85% normal saline solution (NSS) 1 ml ปั่นที่ 12,000 rpm 5 นาที ทิ้งน้ำส่วนใสและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นชนิดสเตอร์ไรด์ 0.1 ml นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็นทันทีก่อนนำไปปั่นที่ 12,000 rpm 5 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนซึ่งเป็น DNA template ที่อุณหภูมิ -20°C

การทำ Polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ ESBL *E. coli* ด้วยการใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับยีน CTX-M, และ SHV อ้างอิงตาม Reich et al. (2013) ดังนี้ CTX-M_F $^{5'}$-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-$^{3'}$, CTX-M_R $^{5'}$-ACCAGAAYVAGCGGBGC-$^{3'}$ PCR product 585 bp; SHV_F $^{5'}$-GGGTTATTCTTATTTGTCGC-$^{3'}$, SHV_R $^{5'}$-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-$^{3'}$ PCR product 930 bp ส่วนยีน TEM อ้างอิงตาม Ma et al. (2007) ดังนี้

TEM_F $^{5'}$-CAGCGGTAAGATCCTTGAGA-$^{3'}$, TEM_R-$^{5'}$-ACTCCCCGTCGTGTAGATAA-$^{3'}$ PCR product 643 bp โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบ HotStartaq DNA polymerase (QIAGEN, USA) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 25 µl ประกอบด้วย 10x PCR buffer 2.5 µl, dNTP mix (10 mM of each) 0.5 µl, HotStartaq DNA polymerase 0.125 µl, primer F (10 pM/µl) 1.0 µl, primer R (10 pM/µl) 1.0 µl, DNA 2.5 µl และน้ำกลั่น 17.38 µl ใช้ DNA ควบคุมบวกสำหรับยีน CTX-M, SHV และ TEM จากที่ได้รับความอนุเคราะห์โดยกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ เตรียมส่วนผสมทั้งหมดในหลอดทดสอบนำเข้าเครื่อง T100 Thermal cycler (BIO-RAD, USA) และตั้งสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาดังนี้ initial activation 95°C 15 นาที ตั้งการทำงานแบบต่อเนื่อง 35 รอบ ของปฏิกิริยา denaturation 94°C 1 นาที annealing 58°C 1 นาที และ extension 72°C 1 นาที ตามด้วย final extension 72°C 10 นาที จากนั้นนำ PCR product มาตรวจสอบโดยแยกแถบ DNA บน 1.5% agarose gel ที่มีส่วนผสมของสีย้อม nancy-520 (Sigma, Switzerland) ด้วยเครื่อง gel electrophoresis ที่มีกระแสไฟฟ้า 100 volt ใช้เวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง transilluminator gel documentation (Syngene G:BOX, USA) แปลผลตามขนาด PCR product โดยการเทียบแถบสี DNA ที่พบกับแถบสีของ 100 bp DNA ladders (Invitrogen, USA) และ PCR product ของยีน CTX-M, SHV และ TEM ที่เป็นตัวควบคุมบวก

การทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (minimal inhibitory concentrations; MICs) ด้วยวิธี broth dilution ตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) โดยใช้ยาต้านจุลชีพทั้งหมด 9 กลุ่ม จำนวน 13 ชนิด ได้แก่ aminoglycosides (gentamicin: GEN, streptomycin: STR), cephalosporins (ceftazidime: CAZ, cefotaxime: CEF), carbapenems (meropenem: MEM), folate pathway inhibitors (sulfamethoxazole: SUL, trimethoprim: TRI), polymyxins (colistin: COL), penicillins (ampicillin: AMP), phenicols (chloramphenicol: CHL), fluoroquinolones (ciprofloxacin: CIP, nalidixic acid: NAL) และ tetracyclines (tetracycline: TET) ควบคุมคุณภาพผลการทดสอบโดยใช้เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 แปลผลการทดสอบโดยใช้ค่า breakpoints ตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2016) และ National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS, 2010)

สถิติที่ใช้ทดสอบ

ใช้สถิติเชิงพรรณนา และคำนวณค่า 95% confidence intervals (CI) ของ %R ตามวิธี Clopper-Pearson exact

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ของเชื้อ *E. coli* ที่เพาะแยกได้จากซีกัมไก่เนื้อ จำนวน 604 ไอโซเลท จากทั้งหมด 223 ฟาร์ม พบเป็นเชื้อ ESBL *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 5.1% (31/604) จากตัวอย่างซึ่งมาจากฟาร์มทั้งหมด 25 ฟาร์ม โดยในปี 2559, 2560 และ 2561 พบ ESBL *E. coli* 11.4% (24/211), 1.4% (3/214) และ 2.2% (4/179) จากตัวอย่างที่มาจาก 18, 3 และ 4 ฟาร์ม ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างซีกัมสุกร 351 ไอโซเลท ที่มาจาก 190 ฟาร์ม ภาพรวมพบเชื้อ ESBL *E. coli* 29.9%

(105/351) จากทั้งหมด 59 ฟาร์ม โดยเป็นเชื้อที่แยกได้ในปี 2559, 2560 และ 2561 คิดเป็น 41.4% (46/111), 27.5% (22/80) และ 23.1% (37/160) จากตัวอย่างที่มาจาก 24, 8 และ 27 ฟาร์ม ตามลำดับ (Table 1)

Table 1. Proportion of ESBL *E. coli* isolated from caecum of broilers and swine isolated from caecum of broilers and swine in western Thailand, 2016-2018

Animal	Year	Total number collected		*E. coli* detected (%)		ESBL *E. coli* (%)	
		Farms	Samples	Farms	Isolates	Farms	Isolates
broilers	2016	93	234	90/93 (96.8)	211/234 (90.2)	18/90 (20.0)	24/211 (11.4)
	2017	56	265	55/56 (98.2)	214/265 (80.8)	3/55 (5.5)	3/214 (1.4)
	2018	81	195	78/81 (96.3)	179/195 (91.8)	4/78 (5.1)	4/179 (2.2)
	Total	**230**	**694**	**223/230 (97.0)**	**604/694 (87.0)**	**25/223 (11.2)**	**31/604 (5.1)**
swine	2016	63	127	59/63 (93.7)	111/127 (87.4)	24/59 (40.7)	46/111 (41.4)
	2017	43	90	41/43 (95.3)	80/90 (88.9)	8/41 (19.5)	22/80 (27.5)
	2018	100	193	90/100 (90.0)	160/193 (82.9)	27/90 (30.0)	37/160 (23.1)
	Total	**206**	**410**	**190/206 (92.2)**	**351/410 (85.6)**	**59/190 (31.1)**	**105/351 (29.9)**

ผลการตรวจหายีนดื้อยาที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase จากเชื้อ ESBL *E. coli* ที่แยกได้จากซีกัมไก่เนื้อ 31 ไอโซเลท พบยีน CTX-M และ TEM 100% (31/31) ในขณะที่เชื้อซึ่งแยกได้จากซีกัมสุกร 105 ไอโซเลท พบยีน CTX-M 96.2% (101/105) และ TEM 97.1% (102/105) ส่วนยีน SHV ตรวจไม่พบทั้งในเชื้อที่แยกได้จากซีกัมไก่เนื้อและสุกร (Table 2)

Table 2. Proportion of beta-lactamase genes detected of ESBL *E. coli* isolated from caecum of broilers and swine in western Thailand, 2016-2018

Animal	Year	ESBL *E. coli*		Beta-lactamase genes detected (%)		
		Farms	Isolates	CTX-M	SHV	TEM
broilers	2016	18	24	24/24 (100)	0/24 (0)	24/24 (100)
	2017	3	3	3/3 (100)	0/3 (0)	3/3 (100)
	2018	4	4	4/4 (100)	0/4 (0)	4/4 (100)
	Total	**25**	**31**	**31/31 (100)**	**0/31 (0)**	**31/31 (100)**
swine	2016	24	46	42/46 (91.3)	0/46 (0)	43/46 (93.5)
	2017	8	22	22/22 (100)	0/22 (0)	22/22 (100)
	2018	27	37	37/37 (100)	0/37 (0)	37/37 (100)
	Total	**59**	**105**	**101/105 (96.2)**	**0/105 (0)**	**102/105 (97.1)**

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ ESBL *E. coli* ที่แยกได้จากซีกัมไก่เนื้อ 31 ไอโซเลท พบเชื้อมีความไวสูงต่อยา colistin และ meropenem 96.8% (30/31) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration: MIC) ที่ 50% (MIC_{50}) และ 90% (MIC_{90}) ของยา colistin เท่ากับ 0.25 และ 1 µg/ml ส่วนยา meropenem ≤0.125 µg/ml โดยเชื้อมีอัตราการดื้อยา ampicillin, cefotaxime, gentamicin, sulfamethoxazole และ tetracycline 100% ในขณะที่เชื้อซึ่งแยกได้จากซีกัมสุกร 105 ไอโซเลท พบมีความไวสูงต่อยา colistin 98.1% (103/105) และ meropenem 100% (105/105) ค่า MIC_{50} และ MIC_{90} ของยา colistin เท่ากับ 0.25 และ 2 µg/ml ส่วนยา meropenem ≤0.125 µg/ml โดยเชื้อมีอัตราการดื้อยา 100% ต่อ ampicillin, cefotaxime และ sulfamethoxazole (Table 3)

Table 3. Minimal inhibitory concentrations (MICs) distribution of ESBL *E. coli* isolated from broilers (n=31) and swine (n=105) in western Thailand, 2016-2018

Antimicrobial agents MIC breakpoint [1]	Animal	Percentage of isolates				Distribution (%) of MICs (µg/ml)														MIC_{50} (µg/ml)	MIC_{90} (µg/ml)
		%S [2]	%I [3]	%R [4]	95% CI [5]	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	>1,024		
ampicillin	broilers	0.0	0.0	100.0	88.8-100.0													100.0		>256	>256
≤8 16 ≥32	swine	0.0	0.0	100.0	96.6-100.0													100.0		>256	>256
ceftazidime	broilers	9.7	0.0	90.3	74.3-98.0				6.5	3.2			9.7	41.9	22.5	6.5	3.2	6.5		32	128
≤4 8 ≥16	swine	14.3	4.8	80.9	72.1-88.0				3.8	2.9	7.6	4.8	10.5	28.6	29.5	6.7	2.9	2.9		32	128
cefotaxime	broilers	0.0	0.0	100.0	88.8-100.0													100.0		>256	>256
≤1 2 ≥4	swine	0.0	0.0	100.0	96.6-100.0							1.0				1.0		98.1		>256	>256
chloramphenicol	broilers	29.0	3.2	67.8	48.6-83.3						22.6	6.5	3.2	6.5	6.5	35.5	16.1	3.2		128	256
≤8 16 ≥32	swine	5.7	6.7	87.6	79.8-93.2					1.0	1.0	3.8	6.7	7.6	9.5	19.0	32.4	19.0		256	>256
ciprofloxacin	broilers	32.2	6.5	61.3	42.2-78.2	12.9	12.9	6.5		6.5	6.5	16.1	3.2	12.9	22.6					8	64
≤1 2 ≥4	swine	57.1	4.8	38.1	28.8-48.1	18.1	21.9	4.8	12.4	4.8	4.8	11.4	13.3	6.7	1.9					1	16
nalidixic acid	broilers	12.9	N/A	87.1	70.2-96.4						3.2	6.5	3.2	6.5			6.5	74.2		>256	>256
≤16 ≥32	swine	15.2	N/A	84.8	76.4-91.0				1.0		1.9	7.6	4.8	11.4	5.7	4.8	6.7	56.2		>256	>256
colistin	broilers	96.8	N/A	3.2	0.0-16.7	41.9	38.7		6.5	9.7						3.2				0.25	1
≤2 ≥4	swine	98.1	N/A	1.9	0.2-6.7	40.9	39.0	1.0	8.6	8.6	1.0		1.0							0.25	2
gentamicin	broilers	0.0	0.0	100.0	88.8-100.0								6.5	32.3	38.7	12.9	9.7			64	256
≤4 8 ≥16	swine	5.7	2.9	91.4	84.4-96.0			2.9	1.9		1.0	2.9	3.8	9.5	40.9	21.9	14.3	1.0		64	256
streptomycin	broilers	58.1	N/A	41.9	24.6-60.9					3.2	6.5	25.8	16.1	6.5	6.5	16.1	9.7	9.7		16	256
≤32 ≥64	swine	25.7	N/A	74.3	64.8-82.3					1.0	3.8	3.8	5.7	11.4	14.3	19.0	21.9	19.0		128	>256
meropenem	broilers	96.8	3.2	0.0	0.0-11.2	96.8				3.2										≤0.125	≤0.125
≤1 2 ≥4	swine	100.0	0.0	0.0	0.0-3.5	100.0														≤0.125	≤0.125
sulfamethoxazole	broilers	0.0	N/A	100.0	88.8-100.0														100.0	>1,024	>1,024
≤256 ≥512	swine	0.0	N/A	100.0	96.6-100.0														100.0	>1,024	>1,024
tetracycline	broilers	0.0	0.0	100.0	88.8-100.0									6.5	29.0	32.3	22.6	9.7		128	256
≤4 8 ≥16	swine	3.8	0.0	96.2	90.5-99.0				3.8				1.0	1.0	8.6	17.1	30.5	38.1		256	>256
trimethoprim	broilers	45.2	N/A	54.8	36.0-72.8			3.2	3.2	25.8	9.7	3.2						54.8		>256	>256
≤8 ≥16	swine	19.0	N/A	81.0	72.1-88.0		1.0		10.5	6.7	1.0		1.0				1.0	79.0		>256	>256

Susceptible	Intermediate	Resistant

[1] Breakpoints: base on CLSI, 2017 except for streptomycin was adopted from NARMS, 2010 and colistin used in EUCAST, 2016; [2] S: susceptible; [3] I: intermediate; [4] R: resistant; [5] 95% confidence intervals (CI) for percent resistant (%R) were calculated using the Clopper-Pearson exact method

N/A: no MIC range of intermediate susceptibility exists; MIC areas unshaded indicate the dilution range was not used to test isolates

MIC_{50}: MIC which inhibits the growth of 50% of the isolates; MIC_{90}: MIC which inhibits the growth of 90% of the isolates

เชื้อ ESBL *E. coli* ที่ทดสอบทั้งหมดพบรูปแบบการดื้อยาหลายขนานจำนวน 44 รูปแบบ โดยพบเชื้อดื้อยา 4-8 กลุ่ม รูปแบบการดื้อยาที่พบบ่อยในเชื้อที่แยกได้จากซีกัมไก่เนื้อ ได้แก่ AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-SUL-TET-TRI 19.4% (6/31), AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI 16.1% (5/31) และ AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-SUL-TET 12.9% (4/31) ส่วนเชื้อจากสุกรพบรูปแบบการดื้อยา AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI 23.8% (25/105), AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI 15.2% (16/105) และ AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-NAL-SUL-TET-TRI 11.4% (12/105) (Table 4)

Table 4. Multi-drug resistance patterns of ESBL *E. coli* isolated from broilers (n=31) and swine (n=105) in western Thailand, 2016-2018

No.	Resistance patterns	No. antibiotic class	No. of isolates (%)	
			broilers	swine
1	AMP-CAZ-CEF-SUL-TET	4		1 (0.9)
2	AMP-CAZ-CEF-SUL-TET-TRI	4		1 (0.9)
3	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-STR-SUL	5		1 (0.9)
4	AMP-CAZ-CEF-GEN-NAL-STR-SUL-TRI	5		1 (0.9)
5	AMP-CAZ-CEF-GEN-NAL-SUL	5		1 (0.9)
6	AMP-CAZ-CEF-GEN-STR-SUL-TET	5		1 (0.9)
7	AMP-CAZ-CEF-GEN-SUL-TET	5	1 (3.2)	
8	AMP-CEF-CHL-SUL-TET-TRI	5		1 (0.9)
9	AMP-CEF-GEN-SUL-TET-TRI	5		1 (0.9)
10	AMP-CEF-STR-SUL-TET	5		1 (0.9)
11	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-NAL-STR-SUL	6		1 (0.9)
12	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-STR-SUL-TET	6		1 (0.9)
13	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-STR-SUL-TET-TRI	6	1 (3.2)	3 (2.8)
14	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-SUL-TET-TRI	6		2 (1.9)
15	AMP-CAZ-CEF-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET	6	2 (6.4)	
16	AMP-CAZ-CEF-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	6		3 (2.8)
17	AMP-CAZ-CEF-CIP-GEN-NAL-SUL-TET	6	2 (6.4)	
18	AMP-CAZ-CEF-GEN-NAL-STR-SUL-TET	6	2 (6.4)	
19	AMP-CAZ-CEF-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	6	1 (3.2)	1 (0.9)
20	AMP-CAZ-CEF-GEN-NAL-SUL-TET	6	1 (3.2)	
21	AMP-CEF-CHL-GEN-STR-SUL-TET-TRI	6	2 (6.4)	1 (0.9)
22	AMP-CEF-CHL-GEN-SUL-TET	6		1 (0.9)
23	AMP-CEF-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	6		2 (1.9)
24	AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET	7		2 (1.9)
25	AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	7	5 (16.1)	25 (23.8)
26	AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-SUL-TET	7	4 (12.9)	1 (0.9)
27	AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-SUL-TET-TRI	7	6 (19.4)	1 (0.9)
28	AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-GEN-STR-SUL-TET-TRI	7		1 (0.9)
29	AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-NAL-STR-SUL-TET-TRI	7		1 (0.9)
30	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-NAL-SUL-TET	7	1 (3.2)	1 (0.9)
31	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET	7		3 (2.9)
32	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	7		16 (15.2)
33	AMP-CAZ-CEF-CHL-GEN-NAL-SUL-TET-TRI	7	1 (3.2)	12 (11.4)
34	AMP-CAZ-CEF-CHL-NAL-STR-SUL-TET	7		1 (0.9)
35	AMP-CAZ-CEF-CHL-NAL-STR-SUL-TET-TRI	7		2 (1.9)
36	AMP-CAZ-CEF-GEN-NAL-SUL-TET-TRI	7	1 (3.2)	
37	AMP-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	7		3 (2.9)
38	AMP-CEF-CHL-CIP-GEN-NAL-SUL-TET-TRI	7		1 (0.9)
39	AMP-CEF-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET	7		2 (1.9)
40	AMP-CEF-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	7		5 (4.8)
41	AMP-CEF-CHL-GEN-NAL-SUL-TET	7	1 (3.2)	1 (0.9)
42	AMP-CEF-CHL-GEN-NAL-SUL-TET-TRI	7		1 (0.9)
43	AMP-CAZ-CEF-CHL-CIP-COL-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TRI	8		1 (0.9)
44	AMP-CAZ-CEF-CHL-COL-NAL-STR-SUL-TET	8		1 (0.9)

AMP: ampicillin, CAZ: ceftazidime, CEF: cefotaxime, CHL: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacin, COL: colistin, GEN: gentamicin, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, SUL: sulfamethoxazole, TET: tetracycline, TRI: trimethoprim

วิจารณ์

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* ที่พบจากซีกัมไก่เนื้อและสุกรที่เข้าฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันตก ปี 2559-2561 มีความชุกของสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase (ESBL *E. coli*) แตกต่างกัน สัดส่วนการพบเชื้อ ESBL *E. coli* โดยรวมพบในไก่เนื้อ (5.1%) ต่ำกว่าในสุกร (29.9%) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Boonyasiri et al. (2014) ที่ตรวจเชื้อ *E. coli* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างป้ายทวารหนักไก่เนื้อและสุกรสุขภาพดีที่เข้าฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดทางภาคเหนือและภาคตะวันออกของประเทศไทย พบให้ผลบวกต่อเชื้อ ESBL *E. coli* ในไก่เนื้อ (40.0%) ต่ำกว่าในสุกร (76.6%) และการศึกษาของ Nuangmek et al. (2018) ที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และชลบุรี พบเชื้อ ESBL *E. coli* ในตัวอย่างซึ่งป้ายจากทวารหนักไก่ไข่ (6.7%) ต่ำกว่าในสุกร (74.8%) เช่นกัน อัตราการพบเชื้อ ESBL *E. coli* จากไก่เนื้อในปี 2559 (11.4%) พบสูงกว่าในปี 2560 (1.4%) และปี 2561 (2.2%) เช่นเดียวกับในสุกรที่ตรวจพบเชื้อ ESBL *E. coli* สูงในปี 2559 (41.4%) อัตราการพบเชื้อลดลงในปี 2560 (27.5%) และปี 2561 (23.1%) แนวโน้มการพบเชื้อดื้อยาที่ลดลงนี้น่าจะเกิดจากการดำเนินงานของกิจกรรมการควบคุม ป้องกันและแก้ไขปัญหาเชื้อดื้อยาในสัตว์ที่กรมปศุสัตว์เริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี 2559 ตามแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ.2560-2564 ทำให้ปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ลดลง ส่งผลให้การเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพลดลงก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามความชุกของเชื้อ ESBL *E. coli* ที่พบต่างกันในไก่เนื้อและสุกร อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความรู้ ทัศนคติ และพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะของเกษตรกร รวมทั้งรูปแบบและระยะเวลาในการเลี้ยงสัตว์

การตรวจหายีนกลุ่ม CTX-M, TEM และ SHV จากเชื้อ ESBL *E. coli* ทั้งหมด พบเฉพาะยีน CTX-M และ TEM ในสัดส่วนที่สูง เชื้อจากซีกัมไก่เนื้อพบยีน CTX-M และ TEM 100% แตกต่างจากผลการศึกษาของ Gundran et al. (2019) พบความชุกและการแพร่กระจายของยีนทั้งสามกลุ่มนี้ในเชื้อ ESBL *E. coli* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างซึ่งเก็บด้วยวิธีใช้บู๊ทสวอบและป้ายจากทวารหนักไก่เนื้อจากฟาร์มในประเทศฟิลิปปินส์ โดยยีนเด่นที่พบจำแนกเป็น $bla_{\text{CTX-M-1}}$ 72.46%, bla_{TEM} 57.97% และ bla_{SHV} 27.54% ส่วนเชื้อจากซีกัมสุกรในการศึกษาครั้งนี้พบยีน CTX-M 96.2% และ TEM 97.1% สอดคล้องกับผลการศึกษาเชื้อ ESBL *E. coli* ที่เพาะแยกได้จากอุจจาระสุกรในอำเภอเมืองพะเยาของ Nuanmuang et al. (2018) พบยีน CTX-M กลุ่มย่อยชนิด $bla_{\text{CTX-M-1}}$ 53.2%, $bla_{\text{CTX-M-9}}$ 100% และยีนในกลุ่ม bla_{TEM} 44.7% โดยเชื้อที่ทดสอบทั้งหมดตรวจไม่พบยีน SHV เช่นเดียวกัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ ESBL *E. coli* ส่วนใหญ่ตรวจพบการปรากฏของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase แต่เอนไซม์สำคัญที่เชื้อสามารถผลิตและทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม beta-lactams ยังมีกลุ่มใหญ่อีกหลายกลุ่มซึ่งตรวจสอบได้ในลักษณะของยีนต่างๆ เช่น OXA, CMY, VEB, PER, GES, KPC, SME, IMP, VIM และ IND ซึ่งแต่ละกลุ่มมีการจำแนกเป็นกลุ่มย่อยต่างๆ ตามความสามารถในการยับยั้งการทำงานของยาที่แตกต่างกัน (Bush and Jacoby, 2010) ดังนั้นการตรวจไม่พบยีน CTX-M, TEM หรือ SHV ในเชื้อ ESBL *E. coli* ที่ทดสอบอาจเนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase โดยยีนกลุ่มอื่นๆ ก็เป็นได้

ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพพบว่ายา colistin และ meropenem ยังคงมีประสิทธิภาพสูงต่อการยับยั้งเชื้อ ESBL *E. coli* ที่แยกได้ทั้งจากซีกัมไก่เนื้อและสุกร สอดคล้องกับการศึกษาของ Nuangmek et al. (2018) ที่พบว่ายาทั้งสองชนิดดังกล่าวมีความไวต่อเชื้อที่ทดสอบ 100% การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อจากซีกัมไก่เนื้อดื้อยา colistin 3.2% ส่วนในสุกรพบ 1.9% อัตราการพบเชื้อดื้อยาในระดับต่ำน่าจะเป็นผลจากการที่กรมปศุสัตว์มีมาตรการในการควบคุมการใช้ยา colistin ในฟาร์มตั้งแต่ปี 2560 โดยระบุว่าสัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์มจะต้องไม่ใช้ยาผสมน้ำหรืออาหารให้สัตว์กินเพื่อป้องกันโรค จะใช้ยาต่อเมื่อไม่

มียาปฏิชีวนะชนิดใดใช้แล้ว เมื่อมีการใช้ยาให้รายงานให้สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดทราบ และให้คัดกรองและเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงสัตว์ส่งตรวจพิสูจน์ทางห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ในปัจจุบันการใช้ยาในกลุ่ม polymyxins ถูกห้ามนำมาใช้ผสมรวมในอาหารสัตว์ในวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรค (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561ข) ส่วนยา meropenem เป็นยาในกลุ่ม carbapenem ที่มีความสำคัญสำหรับการใช้รักษาโรคในคน ซึ่งข้อมูลจากการสอบถามผู้แทนจำหน่ายยาสัตว์พบว่ายังไม่มีการสั่งซื้อยาดังกล่าวมาใช้กับปศุสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันตก การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ ESBL *E. coli* ที่ทดสอบส่วนใหญ่มีลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์ต่อการดื้อยา ampicillin, ceftazidime และ cefotaxime สัมพันธ์กับอัตราการตรวจพบยีน TEM และ CTX-M ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ทำลายโครงสร้างของยากลุ่ม penicillins และ cephalosporins (Bush and Jacoby, 2010) ยาที่ใช้ในสัตว์ เช่น ampicillin และ tetracycline มีอัตราการดื้อยาสูงสอดคล้องกับข้อมูลการใช้ยาปฏิชีวนะในปศุสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันตก จากการสำรวจการใช้ยาของเกษตรกรในปี 2560 โดยสำนักงานปศุสัตว์เขต 7 พบว่ามีการใช้ยาในกลุ่ม penicillins และ tetracyclines อย่างแพร่หลายเป็นระยะเวลานานซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการดื้อยาดังกล่าวได้ การดื้อยาหลายขนานพบในเชื้อ ESBL *E. coli* ที่ทดสอบทั้งหมด โดยรูปแบบการดื้อยาที่พบบ่อยที่สุดในเชื้อที่แยกได้จากซีกัมไก่เนื้อคือ ampicilin-ceftazidime-cefotaxime-chloramphenicol-ciprofloxacin-gentamicin-nalidixic acid-sulfamethoxazole-tetracycline-trimethoprim ส่วนเชื้อจากสุกรพบรูปแบบการดื้อยา ampicilin-ceftazidime-cefotaxime-chloramphenicol-ciprofloxacin-gentamicin-nalidixic acid-streptomycin-sulfamethoxazole-tetracycline-trimethoprim ต่างจากการศึกษาของ Nuangmek et al. (2018) ที่พบการดื้อยาหลายขนานบ่อยที่สุดในรูปแบบ ampicillin-ceftriaxone-erythromycin-tetracycline-chloramphenicol-trimethoprim/sulfamethoxazole-gentamicin จากเชื้อ ESBL *E. coli* ที่ตรวจพบในสัตว์ คน และสิ่งแวดล้อม ซึ่งลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์ต่อการดื้อยาที่ต่างกันในแต่ละพื้นที่อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงสัตว์และยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้แตกต่างกันก็เป็นได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

ความชุกของเชื้อ ESBL *E. coli* ที่เพาะแยกได้จากซีกัมไก่เนื้อและสุกรในพื้นที่ภาคตะวันตก ระหว่างปี 2559-2561 อยู่ในระดับไม่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในพื้นที่อื่น โดยเชื้อส่วนใหญ่ตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ในกลุ่ม CTX-M และ TEM เชื้อมีความไวสูงต่อยาสองชนิด ได้แก่ colistin และ meropenem แต่พบอัตราการดื้อยาสูงต่อยาในกลุ่ม cephalosporins ทั้งยา ceftazidime และ cefotaxime รวมถึงยาที่ใช้อย่างแพร่หลายในสัตว์ เช่น ampicillin, gentamicin, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline และ trimethoprim โดยเชื้อทั้งหมดที่ทดสอบพบรูปแบบการดื้อยาหลายขนาน ซึ่งสาเหตุสำคัญของการเกิดเชื้อดื้อยาน่าจะมาจากพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์อย่างไม่สมเหตุสมผล การใช้ยาอย่างหลากหลายเป็นเวลานานของเกษตรกร ดังนั้นเพื่อช่วยลด ชะลอ หรือควบคุมการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในปศุสัตว์ ควรมีการดำเนินการดังนี้

1. ส่งเสริมให้ความรู้เกี่ยวกับการใช้ยาที่ถูกต้องแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์เพื่อสร้างความตระหนักถึงปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในสัตว์
2. ส่งเสริมให้ความรู้ด้านการจัดการฟาร์มที่ดีแก่เกษตรกรทั้งการจัดการด้านสุขภาพสัตว์และสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะส่งผลให้สัตว์สุขภาพดี ลดโอกาสติดเชื้อภายในฟาร์ม การใช้ยาปฏิชีวนะก็จะลดลงตามไปด้วย
3. กรมปศุสัตว์ควรเพิ่มการรณรงค์ให้เกษตรกรเข้าร่วมโครงการ “การเลี้ยงสัตว์ปลอดการใช้ยาปฏิชีวนะในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์” และ “การลดใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์” ให้มากขึ้น

4. สนับสนุนให้มีการศึกษา วิจัย วิเคราะห์ข้อมูล รวมถึงเผยแพร่ข้อมูลสถานการณ์เชื้อดื้อยาเพื่อให้ทราบลักษณะและขนาดของปัญหา พร้อมทั้งสร้างความตระหนักรู้แก่ผู้เกี่ยวข้องให้เกิดการบูรณาการแก้ไขปัญหาเชื้อดื้อยาร่วมกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่จากสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดในพื้นที่ปศุสัตว์ เขต 7 ที่ช่วยเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อราวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการตรวจหาเชื้อและทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2561ก. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ระดับจังหวัด ปี 2561. [Online]. Available: http://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/310-report-thailandlivestock/reportservey2561/1292-2561-prov. [4 เมษายน 2562].

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2561ข. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะและเงื่อนไขของอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่ห้ามผลิต นำเข้า ขาย และใช้ พ.ศ. 2561. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 73 ง หน้า 12–16.

Boonyasiri, A., Tangkoskul, T., Seenama, C., Saiyarin, J., Tiengrim, S. and Thamlikitkul, V. 2014. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals and the environment in selected areas in Thailand. Pathogens and Global Health. 108: 235-245.

Bush, K. and Jacoby, G.A. 2010. Updated functional classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54 (3): 969–976.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI supplement M100. 27th ed. CLSI, Wayne, PA.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2016. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 6.0, valid from 2016-01-01. [Online]. Available: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Accessed April 4, 2019.

Gundran, R.S., Cardenio, P.A., Villanueva, M.A., Sison, F.B., Benigno, C.C., Kreausukon, K. Pichpol, D. and Punyapornwithaya, V. 2019. Prevalence and distribution of *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$ genes in extended- spectrum β- lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. BMC Vet Res. 15: 227. https://doi.org/10.1186/s12917-019-1975-9.

Hasman, H., Agerso, Y., Hendriksen, R., Cavaco, L.M. and Guerra-Roman, B. 2017. Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from caecal samples. [Online]. Available: https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/21-protocols/388_esbl-ampc-cpeprotocol-version-caecal-v5-03112017.pdf. Accessed April 4, 2019.

Ma, M., Wang, H., Yu, Y., Zhang, D. and Liu, S. 2007. Detection of antimicrobial resistance genes of pathogenic *Salmonella* from swine with DNA microarray. J Vet Diag Invest 19: 161–167.

National Antimicrobial Resistance Monitoring Systems (NARMS). 2010. Executive report. Interpretive criteria used for susceptibility testing of *Salmonella* and *E. coli*. p. 13.

National Antimicrobial Resistance Surveillance, Thailand (NARST). 2019. Situation of antimicrobial resistance 2000-2018. [Online]. Available: http://narst.dmsc.moph.go.th/data/AMR%202000-2018-12M.pdf. Accessed April 4, 2019.

Nuangmek, A., Rojanasthien, S., Chotinun, S., Yamsakul, P., Tadee, P., Thamlikitkul, V., Tansakul, N. and Patchanee, P. 2018. Antimicrobial resistance in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from layer and pig farms in Thailand. Acta Sci Vet. 46: 1538. [Online]. Available: https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/81823/47938. Accessed April 4, 2019.

Nuanmuang, N., Baiubon, P., Wannathong, N., Nunta, B., Suriya, N., Chaingam, P. and Kummasook, A. 2018. Phenotypic and genotypic characterization of extended-spectrum ß-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from pig feces in farms, Muang Phayao. Naresuan University Journal: Science and Technology. (26)4: 17-25.

Reich, F., Atanassova, V. and Klein, G. 2013. Extended-Spectrum ß-lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. Emerg Infect Dis 19 (8): 1253-1259.

Skuja, V., Pekarska, K., Derovs, A., Viksna, L., Piekuse, L., Kempa, I., Caune, U., Rudzite, D., Lejnieks, A. and Krumina A. 2016. Higher CTX-M, TEM and SHV extended-spectrum beta-lactamase plasmid gene combination frequency in ESBL producing *Klebsiella pneumonia* compared with ESBL producing *Escherichia coli.* [Online]. Available: https:// ojs.journals.cz/index.php/CBUIC/article/view/841. Accessed April 4, 2019.