รายงานการวิจัย

การเฝ้าระวังการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* spp. และ *Escherichia* coli ในสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

(Monitoring of biocide and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated in Thailand)

โดย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น*
พรเพ็ญ พัฒนโสภณ**
ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยายน 2550

* คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2549 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ (ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านอณูชีววิทยา ผศ.น.สพ.ดร. ภาวิน ผดุงทศ (ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการวิเคราะห์ทางสถิติ Dr. M.J. Woodward (Department of Food and Environmental Safety, Veterinary Laboratories Agency (Weybridge, Surrey, UK.) และ Genetic Strain Research Center, National Institute of Genetics (Shizoaka, Japan) ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อควบคุมสำหรับการวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยและเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การเฝ้าระวังการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* ในสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
สพ.ญ.ดร. พรเพ็ญ พัฒนโสภณ
ผศ.น.สพ.ดร.ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2549

บทคัดย่อ

แยก *Salmonella enterica* จำนวน 257 isolates และ *Escherichia* coli จำนวน 60 isolates จากตัวอย่างที่ได้จากไก่ สุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม ทำการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ ได้แก่ ampicillin (AMP) chloramphenicol (CHP) ciprofloxacin (CIP) erythromycin (ERY) gentamycin (GEN) tetracycline (TET) trmethoprim (TRI) benzalkonium chloride (BKC), chlorhexidine (CHX), copper sulfate ($CuSO_4$) และ zinc chloride ($ZnCl_2$) พบว่า *Salmonella* 162 isolates (63.04%) และ *E. coli* 50 isolates (83.33 %) ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิด ค่า MIC ต่อ BKC, CHX, $CuSO_4$ และ $ZnCl_2$ เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ โดยเชื้อทั้งหมดนี้ไวต่อ cyclohexane และการเติม CCCP ไม่ทำให้ค่า MIC ต่อ BKC และ CHX เปลี่ยนแปลง เมื่อตรวจหาการปรากฏของ ยีน *qacE* และ *qacEΔ1* ใน *Salmonella* ที่มีค่า MIC ต่อ BKC สูงสุดและต่ำสุดจำนวน 127 isolates ไม่พบว่ามีการปรากฏของยีน *qacE* และพบยีน *qacEΔ1* ใน 38 isolates (29.92%) ที่อาจอยู่และไม่อยู่บน class I integron เชื้อที่มียีน *qacEΔ1* ไม่มีค่า MIC ต่อ BKC และยาปฏิชีวนะสูงกว่าเชื้อที่ไม่มียีน *qacEΔ1* นอกจากนี้ *Salmonella* สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ แต่ไม่พบการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการลดความไวต่อ BKC และ CHX การสัมผัส BKC ในระดับต่ำให้ mutant ที่มีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อชนิดนี้สูงขึ้นและความไวต่อ CHP และ ERY ลดลง โดยที่ CCCP ไม่ทำให้ค่า MIC เปลี่ยนแปลง ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *Salmonella* และ *E. coli* ยังไม่พัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและโลหะหนักที่ทดสอบหรือมีการพัฒนาในระดับที่ยังไม่สูงนัก ระบบ AcrAB และระบบ eflux systems อื่นๆ ที่ใช้พลังงานจาก Proton Motif Force (PMF) ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการลดความไวต่อ BKC และ CHX การใช้ BKC ในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อยาข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้ ซึ่งสนับสนุนว่าควรมีการวางมาตรการควบคุมการใช้ยาฆ่าเชื้ออย่างสุขุมรอบคอบเช่นกัน

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title Monitoring of biocide and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated in Thailand

Name of Investigators Dr. Rungtip Chuanchuen
Dr. Pornpen Pathanasophon
Dr. Suphachai Nuannualsuwan

Year December 2006

Abstract

A total of 254 *Salmonella enterica* and 60 *Escherichia coli* were isolated from broilers, pigs and farm environment. They were tested for susceptibility to ampicillin (AMP) chloramphenicol (CHP) ciprofloxacin (CIP) erythromycin (ERY) gentamycin (GEN) tetracycline (TET) trmethoprim (TRI) benzalkonium chloride (BKC), chlorhexidine (CHX), copper sulfate ($CuSO_4$) and zinc chloride ($ZnCl_2$) using the determination of minimal inhibitory concentrations (MIC). One hundred-sixty two *Salmonella* isolates (63.04%) and 50 *E. coli* isolates (83.33%) were resistant to one antibiotic at least. The isolates formed one large population of MIC of BKC, CHX, $CuSO_4$ and $ZnCl_2$. All isolates were susceptible to cyclohexane. The addition of CCCP did not have an effect on MIC of BKC and CHX. A total of 128 *Salmonella* isolates were examined for the presence of *qacE* and *qacEΔ1* genes. None was positive for *qacE*. The *qacEΔ1* gene was detected in 38 of all (29.92%) and could be found either on or outside class I integron. The MICs of antibiotics and BKC of *qacEΔ1*-positive *Salmonella* was not higher than those of negative strains. *Salmonella* isolates were able to transfer antibiotic resistance gene but not genes conferring BKC and CHX resistance. Exposure to sublethal level of BKC generated an isogenic mutant that showed the decreased susceptibilities to BKC, CHP, and ERY. Addition of CCCP did not affect MIC of the mutant. The results in this study showed that *Salmonella* and *E. coli* have not developed or have only to a limited degree resistance to disinfectants. As AcrAB and other efflux systems energized by PMF did not play a major role in decreased susceptibility to BKC and CHX. Cross-resistance between BKC and two antibiotics, CHP and ERY, does exist. The findings warrants the promotion of prudent uses of antiseptics.

สารบัญเรื่อง

		หน้าที่
บทนำ		1
	กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรีย	3
	กลไกการดื้อยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรีย	4
	การดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรีย	5
การศึกษาและผลงานที่เกี่ยวข้อง		6
วิธีดำเนินการวิจัย		8
ระยะที่ 1	เก็บตัวอย่างเชื้อ *Salmonella enterica* และ *E. coli*	10
ระยะที่ 2	ทดสอบความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* และ *E. coli*	11
ระยะที่ 3	ศึกษากลไกที่อาจเป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามในเชื้อที่ดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและปฏิชีวนะ	13
	3.1 การดอบสนองต่อ energy uncoupler	13
	3.2 การทดสอบความดื้อต่อไซโคลเฮกเซน	13
	3.3 การตรวจหายีน *qacE* และ *qacΔE1*	14
	3.4 การหาตำแหน่งของยีน *qacE* และ *qacEΔ1*	14
ระยะที่ 4	ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ	16
	4.1 การคัดเลือก spontaneous rifampicin resistance derivatives ของ *E. coli* MG1655 (MG1655rif^r)	16
	4.2 การถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วย biparental mating	18
	4.3 การกำจัด plasmid ด้วยเทคนิค plasmid curing	18
ระยะที่ 5	ศึกษาว่าการสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้หรือไม่	19
ผลการวิจัย		19
ระยะที่ 1	เก็บตัวอย่างเชื้อ *Salmonella enterica* และ *E. coli*	19
ระยะที่ 2	ทดสอบความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* และ *E. coli*	21
ระยะที่ 3	ศึกษากลไกที่อาจเป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามในเชื้อที่ดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและปฏิชีวนะ	30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	3.1 การดอบสนองต่อ energy uncoupler	30
	3.2 การทดสอบความดื้อต่อไซโคลเฮกเซน	31
	3.3 การตรวจหาการปรากฏและตำแหน่งของยีน *qacE* และ *qacΔE1*	31
ระยะที่ 4	ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ	34
	4.1 การคัดเลือก spontaneous rifampicin resistance derivatives ของ *E. coli* MG1655 (MG1655rif^r)	34
	4.2 การถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วย biparental mating	36
	4.3 การกำจัด plasmid ด้วยเทคนิค plasmid curing	39
ระยะที่ 5	ศึกษาว่าการสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้หรือไม่	40
อภิปรายผลการวิจัย		44
สรุปผลการวิจัย		50
ข้อเสนอแนะ		53
ประโยชน์ในการนำไปใช้		55
เอกสารอ้างอิง		56
ภาคผนวก		62
ประวัตินักวิจัยและคณะ		66

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

		หน้าที่
ตารางที่ 1	ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย	12
ตารางที่ 2	Primers ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้	15
ตารางที่ 3	*Salmonella enterica* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้	19
ตารางที่ 4	จำนวน isolates ของ *Salmonella enterica* ที่มีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะที่ระดับต่างๆ	22
ตารางที่ 5	จำนวน isolates ของ *Salmonella enterica* ที่มีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อที่ระดับต่างๆ	23
ตารางที่ 6	จำนวน isolates ของ *E. coli* ที่มีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะที่ระดับต่างๆ	24
ตารางที่ 7	จำนวน isolates ของ *E. coli* ที่มีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อที่ระดับต่างๆ	25
ตารางที่ 8	รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* จำแนกตามค่า MIC ต่อ BKC	26
ตารางที่ 9	จำนวน *Salmonella enterica* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ต่อ BKC	26
ตารางที่ 10	รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* จำแนกตามค่า MIC ต่อ CHX	27
ตารางที่ 11	จำนวน *Salmonella enterica* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ต่อ CHX	27
ตารางที่ 12	รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จำแนกตามค่า MIC ของ BKC	28
ตารางที่ 13	จำนวน *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ของ BKC	28
ตารางที่ 14	รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จำแนกตามค่า MIC ของ CHX	29
ตารางที่ 15	จำนวน *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ของ CHX	29
ตารางที่ 16	ค่า MIC ของ SA085 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติม CCCP	31

ตารางที่ 17 การปรากฏของ ยีน *ins* และ3' -conserved region ใน *Salmonella* ที่มียีน *qacEΔ1* 32
ตารางที่ 18 การกระจายตัวของ *Salmonella* ที่พบยีน *qacEΔ1*เมื่อแยกเชื้อตามค่า MIC ต่อ BKC 32
ตารางที่ 19 ค่า MIC ของ *E. coli* และ *Salmonella* ที่ใช้การทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ 35
ตารางที่ 20 ค่า MIC ของ conjugants ที่ได้จากการทำ biparental mating 38
ตารางที่ 21 การเจริญเติบโตของ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่เกี่ยวข้องที่ระยะเวลาต่างๆ ของการทำ plasmid curing 39
ตารางที่ 22 ผลการสัมผัสต่อ BKC ของ *Salmonella* ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อ BKC ต่ำ 41
ตารางที่ 23 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA030 ก่อนและหลังสัมผัส BKC 41
ตารางที่ 24 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดของ SA030 ก่อนและหลังสัมผัส BKC ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติม CCCP 42
ตารางที่ 25 ผลการสัมผัสต่อ CHX ของ Salmonella ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อ CHX ต่ำ 43
ตารางที่ 26 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA027 ก่อนและหลังสัมผัส CHX 43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้าที่

รูปที่ 1 แผนภาพแสดงวิธีการวิจัย 9
รูปที่ 2 ตำแหน่งของ primers บน class I integrons 16
รูปที่ 3 การยืนยันการถ่ายทอด plasmid DNA จาก *Salmonella* ไปยัง *E. coli* 37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

A_{600nm}	absorbance at 600 nm
AMP	ampicillin
Ap_{100}	ampicillin 100 µg/ml
BGA	Brillient Gree Agar
BKC	Benzalkonium Chloride
bla	β-lactamase encoding gene
bp	base pair(s)
BPW	Buffered Peptone Water
^{o}C	*degree(s) Celcius*
Cb	carbenicillin
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CFU	Colony Forming Unit
CHP	chloramphenicol
CHX	Chlohexidine digluconate
Cip	ciprofloxacin
cm	centimeter(s)
Da	Dalton(s)
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate(s)
E.	*Escherichia*
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EPI	efflux pump inhibitors
Ery	Erythromycin
GEN	gentamicin
h	hour(s)
kb	kilobase(s) or 1000 bp
kDa	kilodalton(s)
Km	kanamycin
l	liter(s)
LB	Luria-Bertani medium

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

log	logarithic growth phase
Mb	megabasepairs
M	molar
mM	millimolar
MDR	multidrug resistance
MEX	multidrug efflux system
MFP	membrane fusion protein
MFS	major facilitator superfamily
MSRV	Modified Semisolid Rappaport Vassiliasis
mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
MIL	Motility Indole Lysine Medium
ml	milliliter(s)
mtor	มิลลิทอร์
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s);
ori	origin of replication
oriT	origin of transfer
P.	*Pseudomonas*
PCR	polymerase chain reaction
PMF	proton motive force
r	resistance/resistant
Rif	Rifampicin
Rif_{32}	Rifampicin 32 µg/ml
RND	resistance – nodulation-division family
RT	room temperature
RV	Rappaport Vassiliadis Broth
s	sensitive/susceptible
sec	seconds
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sm	streptomycin
TET	tetracycline

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

tet	tetracycline-resistance encoding gene
TRI	Trimethoprim
TSI	Triple Sugar Iron Agar
TTB	Tetra-thonate Broth
u	unit(s)
µl	microliter
µM	micromolar
µg	microgram(s)
v/v	volume by volume
WT	wild-type
XLD	Xylose-Lysine Desoxycholoate Agar
+	overexpression
%	percentage

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ปัญหาและการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้เพิ่มขึ้นตั้งแต่ปีค.ศ. 1960 ในปัจจุบัน เชื้อดื้อยาถูกจัดว่าเป็นโรคอุบัติใหม่ (Emerging disease) และเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก สร้างความเสียหายทั้งต่อวงการแพทย์และสัตวแพทย์ ปัญหานี้ทวีความซับซ้อนมากขึ้นเพราะเชื้อมักดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance, MDR) สามารถพัฒนาการดื้อข้าม (cross resistance) ไปยังยาชนิดอื่นๆ รวมถึงยาที่ใช้ในการรักษาโรคในคนและยังเป็นตัวการสำคัญที่ถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังเชื้อต่างสายพันธุ์ด้วย (31) ซึ่งเป็น ที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าสาเหตุสำคัญประการหนึ่งของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาคือ การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างขาดความระมัดระวังและเกินความจำเป็นทั้งในการรักษาผู้ป่วย การเลี้ยงสัตว์และการรักษาสัตว์และประเด็นที่วิพากษ์วิจารณ์กันอย่างมากคือ การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภค ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรคและเร่งการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อแบคทีเรียพัฒนาการดื้อยาปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ สิ่งแวดล้อมและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง food-borne pathogens ได้แก่ *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* และ *Campylobactor jejuni* จนกลายเป็นประเด็นสำคัญทางการค้าระหว่างประเทศ เช่น สหภาพยุโรปห้ามใช้ avoparcin ผสมในอาหารสัตว์ในปี 1996 และเพิกถอนการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งหมดเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ในปัจจุบัน เป็นต้น ที่ประชุม Codex เองมีการยกประเด็นเชื้อดื้อยามาพิจารณาและมีการกำหนดหน้าที่ของ Codex committee on food hygiene เกี่ยวกับเชื้อดื้อยาอย่างชัดเจน (CX/RVDF01/10) และเป็นไปได้ว่าอาจมีการยกปัญหาเชื้อดื้อยาและการควบคุมเชื้อดื้อยาภายในประเทศมาใช้ในการกำหนดเงื่อนไขทางการค้าระหว่างประเทศในอนาคต (57)

นอกจากยาปฏิชีวนะแล้ว ได้มีการใช้ยาฆ่าเชื้อหลายชนิดในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์และโรงฆ่าสัตว์ ทั้งในรูป antiseptics, disinfectants และ preservatives โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดหรือกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม และใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งอาจเป็นการใช้ฆ่าเชื้อโดยตรงหรือผสมในอาหารสัตว์ สร้างความวิตกกังวลว่าการใช้ยาฆ่าเชื้ออย่างขาดความระมัดระวังและเกินความจำเป็นอย่างต่อเนื่องจะส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อเหล่านั้นและทำให้เกิดการดื้อยาข้ามไปยังยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคได้ด้วย (13, 27) ซึ่งก่อนนี้เชื่อกันว่า การดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะกับยาฆ่าเชื้อเป็นเรื่องที่เป็นไปไม่ได้ แต่ในปัจจุบันพบว่า การดื้อข้ามปฏิชีวนะกับยาฆ่าเชื้อเกิดขึ้นได้จริงทั้งในห้องปฏิบัติการและ clinical isolates (49, 53) ทำให้นักวิจัยตะหนักถึงความเป็นไปได้และความสำคัญของการดื้อข้ามนี้ ส่งผลให้มีการศึกษาวิจัยการดื้อข้ามกันอย่างกว้างขวางทั้งในวงการแพทย์และสัตวแพทย์ โดยให้ความสำคัญในประเด็นต่อไปนี้

i) ยาปฏิชีวนะกับยาฆ่าเชื้ออาจมีเป้าหมายของการออกฤทธิ์เดียวกัน ถ้ายากลุ่มหนึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเป้าหมายของการออกฤทธิ์นั้นจะส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยาอีกกลุ่มได้

ii) แบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะมีความไวต่อยาฆ่าเชื้อที่ระดับต่างกันด้วย แบคทีเรียเหล่านี้จะถูกคัดเลือกและดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะกับยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำได้

iii) การใช้ยาฆ่าเชื้ออย่างแพร่หลายอาจเป็นสาเหตุของการวิวัฒนาการของการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดโดยใช้กลไกร่วมได้ ซึ่งการได้รับยาฆ่าเชื้อระดับต่ำเป็นเวลานานจะทำให้เกิด adaptive response และ/หรือการกลายพันธุ์บนโครโมโซม โดยแบคทีเรียรุ่นต่อมาจะพัฒนาความต้านทานขึ้นไปอีกหรือถ้าเป็น plasmid-mediated resistance จะถ่ายทอดความดื้อยานั้นไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ด้วย

กลไกสำคัญของการดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ คือ ระบบ multidrug efflux systems ระบบนี้ในเชื้อแบคทีเรียมีหลายวงศ์ตระกูล แต่ที่มีรายงานว่ามีความสำคัญใน *Salmonella* spp. และ *E. coli* คือ AcrAB ซึ่งอยู่วงศ์ตระกูล the Resistance Nodulation Cell Division (RND) (34) การแสดงออกของยีน *acrAB* จะทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ยาฆ่าเชื้อ เช่น quaternary ammonium compounds รวมถึง ethidium bromide และสีต่างๆ (4, 12) นอกจากระบบ AcrAB แล้ว ระบบ efflux pumps ที่พบว่าสามารถทำให้ดื้อทั้งต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อคือ QacE และ QacEΔ1 ซึ่งสามารถทำให้ดื้อต่อ quaternary ammonium compounds (20, 23) โดย *qacEΔ1* เป็นยีนอนุพันธ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *qacE* และทำให้เกิดการดื้อต่อ quaternary ammonium compounds ในระดับที่ต่ำกว่า (39) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ unidentified efflux systems ที่ทำให้การดื้อข้ามอีกด้วย (6) ดังนั้นการศึกษาเชื้อดื้อยาในยุคโลกาภิวัตน์นี้ไม่จำกัดอยู่แค่ยาปฏิชีวนะเท่านั้น แต่ต้องรวมถึงยาฆ่าเชื้อด้วย

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาการดื้อข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *S. enterica* และ *E. coli* เพราะเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ (Food borne diseases) ที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. enterica* ที่มักเกี่ยวข้องกับเนื้อไก่ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ โดยที่ผ่านมาการศึกษาเกี่ยวกับความไวต่อยาฆ่าเชื้อของแบคทีเรียจำกัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสและเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล ข้อมูลเกี่ยวกับความไวของ *Salmonella* spp. และ *E.coli* ต่อยาฆ่าเชื้อยังมีอยู่น้อยมาก รวมทั้งการศึกษาการดื้อข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะมีอยู่ในวงจำกัด ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาและเก็บข้อมูลความไว

ต่อยาฆ่าเชื้อของ *Salmonella* spp. และ *E. coli* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ดังนั้น คณะผู้วิจัยได้ตั้งวัตถุประสงค์สำหรับการวิจัยไว้ 3 ประการ คือ

1. เพื่อเก็บข้อมูลเกี่ยวกับความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *S. enterica* และ *E. coli* ที่แยกได้จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษากลไกที่เป็นไปได้ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ
3. เพื่อทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียชนิดอื่น

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษาใน *S. enterica* และ *E. coli* ที่แยกเชื้อจากไก่ สุกร และสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์ม โดยเก็บข้อมูลความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ ทำการศึกษากลไกที่เป็นไปได้ที่อาจเป็นสาเหตุการการดื้อยาข้าม โดยเน้นการศึกษาระบบ multidrug efflux systems และ adaptive response รวมทั้งการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยานั้นไปยังแบคทีเรียต่างชนิด ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบสถานการณ์ที่แท้จริงและแนวโน้มของปัญหาการดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะในประเทศไทยสามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นส่วนหนึ่งของการเฝ้าระวังการดื้อยาใน *Salmonella* spp. และ *E. coli* และนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อกำหนดแนวทางการป้องกันการดื้อยาที่มีสาเหตุมาจากการใช้ยาฆ่าเชื้อและการควบคุมการใช้ยาฆ่าเชื้ออย่างถูกต้องรัดกุมเช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ สามารถนำผลจากการศึกษากลไกที่เป็นสาเหตุของการดื้อข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะไปใช้ในการศึกษาแนวลึกเพื่อหาความเป็นไปได้ของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการทำงานของกลไกนั้นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งต่อวงการแพทย์และสัตวแพทย์ รวมถึงต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ การสาธารณสุข และการส่งเสริมความปลอดภัยในการบริโภคอาหารที่มาจากสัตว์

กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีกลไกการดื้อยาแตกต่างกันไปตามชนิดของยาที่ใช้ แบ่งได้เป็น 2 แบบ (51) คือ

1. การดื้อยาที่เกิดจากปัจจัยภายในของแบคทีเรีย (Intrinsic resistance) เป็นการดื้อยาที่เกิดจากพันธุกรรมหรือโดยธรรมชาติของแบคทีเรีย ซึ่งจะควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโคโมโซมหรือเป็นคุณสมบัติทางกายภาพของเซลล์ เช่น ลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของ *P. aeruginosa* ที่ยอมให้สารผ่านเข้าออกได้น้อยทำให้แบคทีเรียมีโอกาสดื้อยาสูงขึ้น เป็นต้น

2. การดื้อยาที่เกิดจากปัจจัยภายนอก (Acquired resistance) เป็นการดื้อยาที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียที่ไวต่อยาแต่เมื่อได้รับอิทธิพลหรือปัจจัยภายนอกทำให้เกิดการดื้อยาขึ้นได้ ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ การกลายพันธุ์ การถ่ายทอดพลาสมิด การได้รับ transposon ตัวอย่างเช่น การ

ถ่ายทอด R-plasmid ใน *Salmonella enterica* ทำให้เกิดการกระจายตัวของยีนดื้อยาในเชื้อชนิดนี้ การดื้อยาชนิดที่เกิดจากปัจจัยภายนอกมีหลายแบบ ที่พบบ่อยได้แก่

Target alteration เกิดเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาไปออกฤทธิ์ ทำให้ยาไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียนั้นได้ ตัวอย่างเช่น การกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolones เป็นต้น

Impermeability เกิดเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้ปริมาณยาซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์น้อยลง ส่งผลให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ได้ ตัวอย่างเช่น การดื้อยาเตตร้าซัยคลินของ *Escherichia coli* ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการแสดงออกของยีน *opmF* เป็นโปรตีนที่ผนังชั้นนอกของเซลล์ลดลงทำให้ตัวยาซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง

Drug inactivation การดื้อยาที่มีสาเหตุมาจากการสร้างเอนไซม์ที่สามารถทำลายหรือเปลี่ยนแปลงยา ทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ เช่น แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ β-lactamase ทำให้ดื้อยาในกลุ่ม β-lactams

Active efflux แบคทีเรียดื้อยาได้ด้วยการขับยาที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ออกนอกเซลล์ทางโปรตีนที่อยู่บนผนังเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของยาไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ได้ เช่น การดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันด้วยระบบ multidrug efflux systems

กลไกการดื้อยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรีย

กลไกการดื้อยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรียเพิ่งได้รับการสนใจและศึกษาในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ดังนั้นข้อมูลจึงยังไม่สมบูรณ์เท่ากับกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ ในขณะที่ ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่จำเพาะ ยาฆ่าเชื้อออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายมากกว่าหนึ่งหรือไม่จำเพาะ ซึ่งมียาฆ่าเชื้อจำนวนไม่มากนักที่พบว่าออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายจำเพาะ ได้แก่ triclosan ที่ออกฤทธิ์ต่อ FabI เป็นต้น (17, 29, 30) จากการที่ยาฆ่าเชื้อออกฤทธิ์ไม่จำเพาะทำให้ไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ในการรักษา แบคทีเรียพัฒนาการดื้อยาฆ่าเชื้อได้หลายวิธี แต่ที่พบได้บ่อยที่สุดคือการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ที่ไม่ยอมให้โมเลกุลของยาฆ่าเชื้อผ่านเข้าสู่เซลล์และเพิ่มการขับออกนอกเซลล์ กลไกการดื้อยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรีย (42, 49) ได้แก่

Target alteration พบได้ไม่บ่อยนัก ที่ยกเว้นก็คือ การดื้อ triclosan ใน *E. coli* ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *fabI*

Impermeability เป็นการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ที่ไม่ยอมให้โมเลกุลของยาฆ่าเชื้อผ่านเข้าสู่เซลล์ทำให้ความเข้มข้นภายในเซลล์ลดลง ซึ่งโดยธรรมชาติแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อยาฆ่าเชื้อน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อย ได้แก่ hydrophobicity ส่วนประกอบและโครงสร้างของ outer membrane protein

Efflux เป็นระบบที่ขับโมเลกุลของยาฆ่าเชื้อออกจากเซลล์ทำให้ความเข้มข้นภายในเซลล์ลดลง เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อสารชนิดต่างๆที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางโครงสร้าง จึงเรียกว่า multidrug efflux systems

การดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรีย

จากการที่ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อมีกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ทำให้เชื่อมาเป็นเวลานานว่าการดื้อข้ามระหว่างยาทั้ง 2 กลุ่มเป็นไปไม่ได้ จนถึงปัจจุบัน ได้มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียมีกลไกร่วมที่ทำให้ดื้อทั้งต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อหรือการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อของแบคทีเรียเกิดได้จากกลไกเดียวกัน (9, 42) จึงเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า การดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรียเกิดขึ้นจริง กลไกดังกล่าวคือ multidrug efflux systems ซึ่งมีการศึกษาเป็นที่กว้างขวางในเชื้อ *P. aeruginosa* (9-11, 19) *Staphylococcus aureus* (15, 19) และ *E. coli* (34, 47) ซึ่งผลงานวิจัยที่ทำให้นักวิทยาศาสตร์ตะหนักในความสำคัญของการดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรีย ได้แก่ Chuanchuen *et al* (2001) ที่รายงานว่า การที่ให้ *P. aeruginosa* ได้รับ triclosan ในระดับต่ำ sublethal dose สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์และพัฒนาการดื้อต่อ triclosan ได้ โดยเชื้อที่มีการกลายพันธุ์นี้มีการแสดงออกของระบบ Multidrug efflux systems ได้หลายระบบส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วย (9) ซึ่งการกลายพันธุ์นี้เป็นแบบเดียวกับที่มีสาเหตุมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (43)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยาฆ่าเชื้อได้มีการใช้มาเป็นเวลานานเช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ รวมทั้งได้มีการศึกษาทั้งการออกฤทธิ์ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและกลไกการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อ ซึ่ง McDonnell and Russell (1999) ได้เขียนบทความเกี่ยวกับยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ในด้านประโยชน์ในการลดการปนเปื้อนและผลเสียที่อาจเกิดขึ้นในเชิงสาธารณสุข (28) ต่อมา Gilbert and McBain (2003) ได้เขียนบทความเกี่ยวกับความสำคัญของยาฆ่าเชื้อ ปริมาณการใช้ที่เพิ่มขึ้นและการก่อให้เกิดเชื้อดื้อปฏิชีวนะ (13) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาฆ่าเชื้อได้รับความสนใจทั้งการนำมาใช้และผลเสียที่อาจเกิดขึ้นเช่นกัน

Russell et al (1998) ได้รายงานความเป็นไปได้ของการดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ โดยพบว่า *P. stutzeri* ที่ถูกทำให้ดื้อต่อ CHX จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดด้วย (53) จากการศึกษาของผู้วิจัยหลักพบว่า triclosan ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อในกลุ่ม biphenol สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์บนโครโมโซมของ *Pseudomonas aeruginosa* ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนระบบ multidrug efflux pump และเกิด cross-resistance ต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (9) พบการแสดงออกในเชื้อดื้อยาหลายชนิดที่แยกได้จากสัตว์ป่วย (5) จากการที่มีรายงานการพบระบบ MES ใน *S.* Typhimurium และ *E. coli* ซึ่งมีความสัมพันธ์ต่อการดื้อยาปฏิชีวนะเช่นกัน (6, 7) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่การใช้ยาฆ่าเชื้ออย่างไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์และการแสดงออกของระบบใน *Salmonella* spp. ส่งผลให้เกิดการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้

Braoudaki and Hilton (2004) พบว่า *S.* Enteritidis สามารถปรับตัวและพัฒนาการดื้อต่อ benzalkonium chloride ทำให้เกิด cross-resistance ต่อ erythromycin และ chlorhexidine (7) ส่วนใน *E. Coli* เกิดการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, imipenem, tetracycline และ trimetroprim โดยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่า *Salmonella* และ *E. coli* สามารถปรับตัวต่อการสัมผัส BKC และสามารถดื้อข้ามไปยังยาปฏิชีวนะได้ (6) ซึ่งต่อมา Aarestrup และ Hasman (2004) พบว่า *S.* Typhimurium มีความไวต่อ copper sulfate, benzakonium chloride และ chlohexidine น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ (1) Hasman และ Aarestrup (2002) พบว่า *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากสุกรมี plasmid ที่มียีนดื้อ copper sulfate ซึ่งสามารถถ่ายทอดได้และทำให้เกิดการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม macrolides และ glycopeptides (16)

ระบบ AcrAB มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาโดยปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อใน *Salmonella* และ *E. coli* จึงเป็นกลไกสำคัญของการดื้อข้ามระหว่างสารต้านจุลชีพทั้ง 2 (12, 29) ซึ่งแบคทีเรียที่มีการแสดงออกของ AcrAB จะดื้อต่อ cyclohexane จึงใช้การเจริญเติบโตเป็นตัว

บ่งชี้การแสดงออกของระบบนี้ (44, 45) Asako et al (1997) พบว่า MarA เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ *E. coli* ดื้อต่อ Organic solvent หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อตัวที่ดื้อต่อ cyclohexane มีการแสดงออกของ *marA* ในระดับสูง (2) Randall et al (2005) พบว่า ในฟาร์มจะพบ *E. coli* ที่ดื้อต่อ cyclohexane ได้น้อยมาก ซึ่ง cyclohexane อาจจะไม่ใช่ตัวบ่งชี้ที่ดีหรือเชื้อที่มีการแสดงออกของ AcrAB อาจถูกทำลายด้วยยาฆ่าเชื้อแล้ว (14) ในทำนองเดียวกัน Randall and Woodword (2001) พบว่า การดื้อยาปฏิชีวนะ การดื้อต่อ cycloheaxe ใน *S.* Typhimurium อาจเกี่ยวข้องกับ *mar* หรือไม่ก็ได้ (46) นอกจากนี้ Gradel et al (2005) ยังรายงานว่า *mar* ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาฆ่าเชื้อใน *Salmonella* ที่แยกได้จากไก่กระทงในฟาร์มต่างๆ (14) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติม

เมื่อเร็วๆ นี้ Mangalappalli-Illathu and Korber (2006) พบว่า การให้ *S.* Enteritidis ที่สร้าง biofilms สัมผัสกับ BKC ที่ระดับ sublethal จะสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อให้ BKC ที่ระดับlethal และเมื่อเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี BKC สร้าง biofilms ได้หนาขึ้น ในทางตรงกันข้าม *S.* Enteritidis ที่ไม่ได้สัมผัส BKC ที่ระดับ sublethal ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี BKC ระดับ lethal แสดงว่า การสัมผัส BKC ในระดับต่ำจะช่วยให้ *S.* Enteritidis ปรับตัวเพื่อการอยู่รอดได้ (26) ดังนั้นการสร้าง biofilm จึงเป็นอีกกลไกหนึ่งที่น่าสนใจ

นอกจากนี้ยังมียีนอื่นๆ ที่ควบคุมระบบ efflux system ซึ่งขับออกได้ทั้งยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ เช่น Kazama el al (1998) พบการปรากฏของยีน *qacE* และ *qacEΔ1* ในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด (21) ต่อมา Kazama et al (1999) ยังพบว่า QacEΔ1 สามารถทำให้เกิดการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและสารสีต่างๆ ใน *Vibrio cholerae* non-O1 ได้เช่นเดียวกับใน *E. coli* (20) ในขณะที่ Kucken et al (2000) พบว่า การปรากฏของยีนทั้ง 2 ไม่ได้ทำให้เชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะมีความไวต่อ BKC สูงกว่าเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ (23) ยีน *qacE* และ *qacEΔ1* มักพบที่ด้าน 3' end ของ calss I integron (38) ดังนั้นการแพร่กระจายของ class I integron อาจมีผลต่อการแพร่กระจายของให้ยีนทั้ง 2 อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการกระจายตัวของยีนทั้ง 2 นี้ใน *S.* Enterica

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มี 5 ระยะ ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างเชื้อ *S. enterica* และ *E. coli*

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *S. enterica* และ *E. coli*

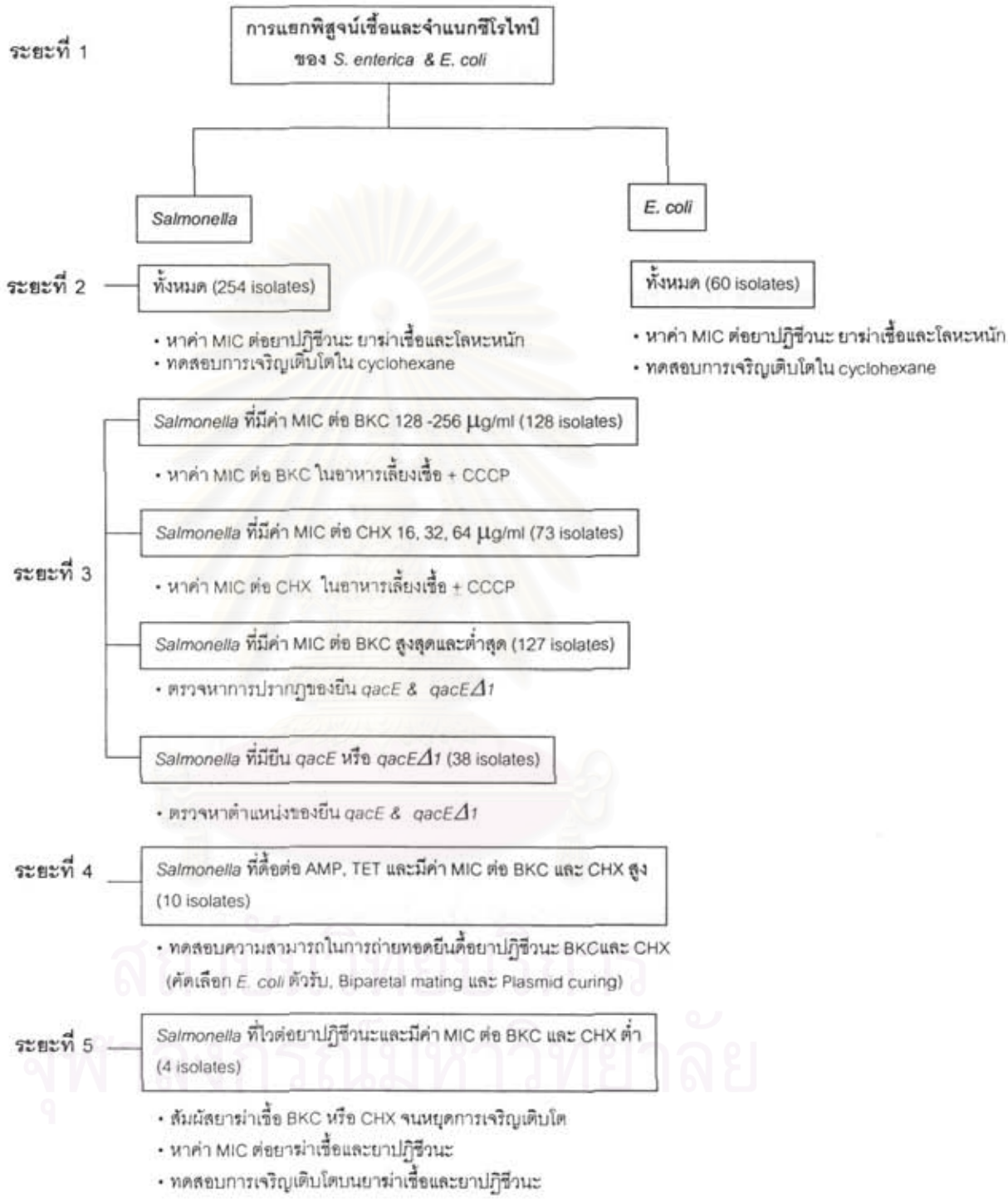
ระยะที่ 3 ศึกษากลไกที่อาจเป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามในเชื้อที่ดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและปฏิชีวนะ

ระยะที่ 4 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

ระยะที่ 5 ศึกษาว่าการสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้หรือไม่ (Exposure experiment)

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ให้ความสำคัญกับ *Salmonella* มากกว่า *E. coli* เพราะเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่พบบ่อย มีความสำคัญต่อเนื้อไก่ที่เป็นสินค้าส่งออกและยังมีการศึกษาเรื่องการดื้อข้ามไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* โดยสรุปวิธีการดำเนินการวิจัยไว้เป็นแผนภาพดังรูปที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงวิธีการวิจัย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างเชื้อ *S. enterica* และ *E. coli*

แยก *S. enterica* และ *E. coli* จากตัวอย่างที่ส่งไปยังการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพมหานคร ได้แก่ swab อุจจาระ น้ำ อาหาร โดยเป็นตัวอย่างจากไก่และสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม สุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม สำหรับการแยก *S. enterica* ทำตามวิธีมาตรฐาน ISO6579 โดยทำการ pre-enrichment เชื้อในตัวอย่าง 25 กรัมใน Buffer Peptone Water (BPW) 225 ml หรือจาก swab ใน BPW 10 ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-18 ชม. ทำการ เพิ่มจำนวน (enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Rappaport Vassiliadis Broth (RV) (Oxoid, Hamshire, UK) 41.5°C และ Tetra Thionate Broth (TTB) (Oxoid) ที่ 41.5°C นาน 24-18 ชม. จากนั้นแยก *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-Lysine Desoxycholate Agar (XLD) (Oxoid) และ Brilliant Green Agar (BGA) ที่อุณหภูมิ° 37 C เป็นเวลา 24-18 ชม. ทำการทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางชีวเคมีในอาหารทดสอบ Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Oxoid) และ Motility Indole Lysine Medium (MIL) (Difco, Detroit, USA) ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. รวมทั้ง นำเชื้อใน BPW 10 µl มาทดสอบการเคลื่อนที่โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis Medium (MSRV) (Oxoid) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24-18 ชม. แยกเชื้อที่มีการเคลื่อนที่บน BGA และคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย Urease test จากนั้นทำการทดสอบในอาหารทดสอบ TSI และ MIL ทำ serotyping และจำแนก serovars ด้วยวิธี Slide – Agglutination test ตามวิธีของ Kauffmann-White Scheme, Pasture Institute โดยใช้ specific antiserum จากบริษัท S&A REAGENTS LAB. LTD., PART. (กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย)

สำหรับ *E. coli* นำตัวอย่างมาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ lactose broth (Oxoid) จากนั้น เกลี่ยให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Difco) นำโคโลนีสีชมพูม่วง ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Carter and Cole (1990) (8)

ในการเก็บรักษา *Salmonella* และ *E. coli* นำโคโลนีบริสุทธิ์มาผสมกับ 10% skim milk แบ่งใส่หลอดแก้วหลอดละ 100 µl แช่ในไนโตรเจนเหลวจนส่วนผสมกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นนำไปทำเยือกแข็งด้วยเครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) (VIRIS™, SPIndustries Company, USA) โดยลดอุณหภูมิลงจนถึง -80°C ความดัน 0 มิลลิทอร์ (mtor.) ซึ่งเป็นสภาพสูญญากาศ ปิดหลอดด้วยเครื่องมือปิดหลอดแก้วด้วยเปลวไฟ

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* และ *E. coli*

ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเชื้อเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) หรือ Microdilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Muller Hinton Broth (MHB) ตามวิธีมาตรฐานของ Clnical Laboratory Standard Intitute (CLSI) ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อถูกเจือจางแบบ two-fold เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27853 *E. coli* ATCC 25922 และ *S.aureus* ATCC 29212 ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ benzalkonium chloride และ chlorhexidine ซื้อจาก Sigma ส่วน copper sulfate และ zinc chloride ซื้อจาก UNILAB (NSW, Australia) โดยใช้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (µg/ml)	breakpoint* (µg/ml)
1. ampicillin (AMP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
2. chloramphennicol (CHP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
3. ciprofloxacin (CIP)	0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	4
4. erythromycin (ERY)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	-**
5. gentamycin (GEN)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	8
6. sulfamethoxazole (SUL)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	512
7. tetracycline (TET)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	16
8. trimethoprim (TRI)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16
9. benzalkonium chloride (BKC)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	-**
10. chlorhexidine digluconate (CHX)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	-**
11. copper sulfate ($CuSO_4$)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	-**
12. zinc choride ($ZnCl_2$)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	-**

* ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา

** ยังไม่มีการกำหนดความเข้มข้นที่เป็น breakpoint ของสารเหล่านี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 3 ศึกษากลไกที่อาจเป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามในเชื้อที่ดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและปฏิชีวนะ

3.1 การตอบสนองต่อ energy uncoupler

ทำการหาค่า MIC ต่อ carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) (Sigma) ของ *Salmonella* ที่ได้จากการสุ่มเลือกจำนวน 3 isolates เพื่อหาระดับความเข้มข้นของ CCCP ที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจนสังเกตุเห็นได้ด้วยตาเปล่า จากนั้นทำการหาค่า MIC ต่อ BKC และ CHX ด้วยวิธี Agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติม CCCP ที่ sublethal concentration คือ 50 μM โดยชุดควบคุมคือ เชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CCCP ที่ความเข้มข้น 50 μM แต่ไม่มียาฆ่าเชื้อ ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง

3.2 การทดสอบความดื้อต่อไซโคลเฮกเซน (cyclohexane)

ทำการทดสอบความไวต่อ cyclohexane ของเชื้อทั้งหมดตามวิธีของ Asako *et al* (1997) ดังนี้ แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 18-24 ชม. นำโคโลนีเดี่ยวของแต่ละเชื้อมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 2-3 มล. บ่มเลี้ยงเชื้อในตู้เพาะเลี้ยงแบบ shaker ที่ความเร็ว 250 rpm. อุณหภูมิ 30°C นาน 18-24 ชม. จากนั้นนำเชื้อแต่ละตัวใส่ลงใน 96-well plates หลุมละ 100 μl และถ่าย (transfer) ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อแบบแก้วด้วย multi-point inoculator แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เทเฮกเซน (n-hexane) หรือ cyclohexane ปริมาตร 6 มล.ทับลงบนจุดเชื้อที่แห้ง ปิดฝาจานเพาะเชื้อและ seal ด้วยแผ่นพลาสติคหรือ parafilm นำไปอบเลี้ยงเชื้อที่ 30°C อ่านผลการทดสอบที่ 24 และ 48 ชม. โคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตได้ใน cyclohexane ถือว่าดื้อต่อ cyclohexane (cyclohexane – resistant, Cyclo^r) (2) เชื้อควบคุมคือ *E. coli* MG1655 ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ใน n-hexane แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน cyclohexane ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การตรวจหายีน *qacE* และ *qacΔE1*

ตรวจหายีน *qacE* และ *qacΔE1* ใน *Salmonella* spp. ที่สุ่มเลือกจากที่มีค่า MIC ต่อ BKC สูงสุดและต่ำสุดจำนวน 127 isolates ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายทั้ง 2 จาก whole cell DNA โดยใช้ primers จำเพาะดังแสดงในตารางที่ 2 ในการเตรียม DNA ต้นแบบด้วย boiling technique ละลายโคโลนีในน้ำกลั่น 50 µl ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาทีเพื่อทำให้เซลล์แตกและนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg นาน 5 นาที เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก ไปเปดของเหลวใสที่มี DNA ละลายอยู่ลงใน eppendrof tube หลอดใหม่และเก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ โดยนำมาละลายบนน้ำแข็งทันทีก่อนใช้ ปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรทั้งหมด 50 µl ประกอบด้วย DNA ต้นแบบ 200-500 ng (5 µl), DMSO 5%, primers แต่ละตัว 30 µM, dNTPs 0.2 mM, $MgCl_2$ 3 mM และ เอนไซม์ Taq polymerase 5 units ในปฏิกิริยาลูกโซ่ DNA ต้นแบบถูกแยกเป็นสายเดี่ยว (predenaturation) ที่ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นปฏิกิริยาดำเนินต่อที่ 95°C นาน 45 วินาที 75°C นาน 45 วินาที และ 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 30 cycles และเก็บ PCR products ที่ -20°C ตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของ PCR products ด้วย agarose gel elctrophoresis

3.4 การหาตำแหน่งของยีน *qacE* และ *qacEΔ1*

ทำการหาตำแหน่งของยีนทั้ง 2 ในเชื้อที่ให้ผลบวกหรือการปรากฏของยีน *qacE* และ *qacEΔ1* เมื่อทดสอบด้วย PCR โดยทำ PCR ด้วย primers (ตารางที่ 2) ที่จำเพาะต่อยีน *int* เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าเชื้อนั้นอาจมี class I integrons และที่จำเพาะต่อ 3'-conserved region เพื่อยืนยันว่ายีนทั้ง 2 เป็นส่วนหนึ่งของ class I integrons เตรียม DNA ต้นแบบด้วย boiling technique ดังที่กล่าวข้างต้น ปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรทั้งหมด 50 µl ประกอบด้วย DNA ต้นแบบ 200-500 ng (5 µl), DMSO 5%, primers แต่ละตัว 30 µM, dNTPs 0.2 mM, $MgCl_2$ 3 mM และ เอนไซม์ Taq polymerase 5 units ปฏิกิริยาลูกโซ่สำหรับยีน *ins* DNA ต้นแบบถูกแยกเป็นสายเดี่ยว (predenaturation) ที่ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นปฏิกิริยาดำเนินต่อที่ 95°C นาน 45 วินาที 72°C นาน 45 วินาที และ 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 30 cycles ส่วนปฏิกิริยาลูกโซ่สำหรับ 3'-conserved region มีสภาวะดังนี้ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นปฏิกิริยาดำเนินต่อที่ 95°C นาน 45 วินาที 75°C นาน 45 วินาที และ 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 30 cycles เก็บ PCR products ที่ -20°C ตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของ PCR products ด้วย agarose gel elctrophoresis

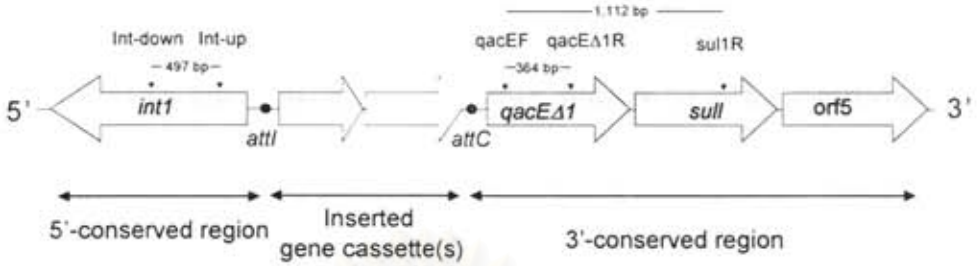
ตารางที่ 2 primers ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ยีน	Primers*	ลำดับเบส (5' –3')	ขนาด PCR products (bp)	แหล่งที่มา
qacE	qacEF	TAAGCCCTACACAAATTGGGAGATAT	362	การศึกษาครั้งนี้
	qacER	TTAGTGGGCACTTGCTTTGGAAAG		
*qacEΔ1***	qacEΔ1R	GCCTCCGCAGCGACTTCCACG	364	การศึกษาครั้งนี้
int1	int1F	CCTGCACGGTTCGAATG	497	การศึกษาครั้งนี้
	int1R	TCGTTTGTTCGCCCAGC		
3'conserved region**	sul1R	GGGTGCGGACGTAGTCAGC	1,112	การศึกษาครั้งนี้

* F หมายถึง forward primers เกาะที่ด้าน 5' ของ coding strand และ R หมายถึง reverse primers เกาะที่ด้าน 3' ของ coding strand

** ในการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายนี้ forward primers คือ qacEF

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 ตำแหน่งของ primers บน class I integrons (ลูกศรชี้ลง) และขนาดของ PCR products (bp) โดยโครงสร้างของ Class I Integrons ประกอบด้วยยีน *ins* ที่ผลิตโปรตีน integrase ทำหน้าที่ในการถ่ายทอดยีนดื้อยาใน gene cassette ตามด้วย variable regions ประกอบด้วย gene cassette ที่มีขนาดต่างกันขึ้นกับชนิดและจำนวนของยีนดื้อยาที่บรรจุอยู่ โดยส่วนท้ายเป็น 3' conserved region ประกอบด้วย *qacE*Δ1 ซึ่งเป็นยีน multidrug efflux ที่ทำให้ดื้อต่อ quaternary ammonium compound และยาปฏิชีวนะได้ ตามด้วยยีน *sulI* ที่ทำให้ดื้อต่อยา sulphonamides และสุดท้ายเป็น orf5 ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน

ระยะที่ 4 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

4.1. การคัดเลือก spontaneous rifampicin resistance derivatives ของ *E. coli* MG1655 (MG1655rif^r)

ทำการคัดเลือกให้ได้ *E. coli* MG1655rif^r เพื่อใช้เป็นตัวรับ plasmid ที่มียีนดื้อยาและถ่ายทอดได้ ในการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วย biparental mating โดยเพาะเลี้ยง *E. coli* MG1655 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 4 มล. ใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชม. วัดค่า OD_{600} และ Plate 100 µl บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มี rifampicin ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 128 µg/ml ($LBrif_8$, $LBrif_{16}$, $LBrif_{32}$, $LBrif_{64}$ และ $LBrif_{128}$ ตามลำดับ) อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 18-24 ชม.ชุดควบคุมคือ เชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ไม่มี rifampicin

เลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตบน $LBrif_{32}$, $LBrif_{64}$ และ $LBrif_{128}$ ซึ่งเป็น MG1655rif^r ที่เป็นอนุพันธ์ของ *E. coli* MG1655 นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี rifampicin และนำโคโลนีที่ได้ในแต่ละวันมา streak อย่างต่อเนื่องทุกวันนาน 10 วัน เมื่อครบกำหนดทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มี rifampicin ที่ความเข้มข้น

ที่เกี่ยวข้องอีกครั้ง จากนั้นหาค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ ชุดควบคุมคือ เชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ไม่มี rifampicin เก็บโคโลนีที่มีค่า MIC ต่อ rifampicin สูง และค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อชนิดอื่นๆ ไม่แตกต่างจาก *E. coli* MG1655 จำนวน 2 โคโลนี ให้ชื่อว่า MG1655rif^{r}2 และ MG1655rif^{r}3

4.2. การถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วย biparental mating (Conjugation)

ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยการทดสอบว่า ยีนดื้อยาอยู่บน plasmid หรือไม่ โดยใช้เทคนิค biparental mating ตัวรับคือ MG1655rif^{r}2 และตัวให้ (donor) คือ MDR *Salmonella* จำนวน 10 ตัว (ตารางที่ 19) ที่มีค่า MIC ต่อ BKC สูงและดื้อต่อ AMP หรือ TET ทำการสกัด plasmid DNA ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Qiagen® Plasmid kit (Valencia, CA, USA.) และทำการวิจัยดังนี้ เพาะเลี้ยง MG1655rif^{r}2 และ MDR *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 4 มล. ใน shaking incubator ที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. จากนั้นเจือจางด้วย LB ในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงเชื้อต่อใน shaking incubator ที่ 37 °C จนถึง Mid-log phase (3-4 ชม.) ผสมตัวรับและตัวให้อย่างละ 700 µl ใน eppendrof tube ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนใน LB อุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C 30-50 µl และไปเปดลงบนแผ่น nitrocellulose filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm และ pore size 0.45 µm ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง นำไปอบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. จากนั้นนำแผ่น filter พร้อมส่วนผสมเชื้อใส่ลงใน LB 1 มล. ใน eppendrof tube ใหม่ vortex ประมาณ 1 นาที นำแผ่น filter ออก และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 1 นาที Plate เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี rifampicin 32 µg/ml และ ampicillin 100 µ g/ml ($LBRif_{32}Ap_{100}$) คัดเลือกโคโลนีที่ดื้อต่อ rifampicin และ ampicillin (Rif^rAp^r) หรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี rifampicin 32 µg/ml และ tetracycline 25 µg/ml ($LBRif_{32}Tet_{25}$) คัดเลือกโคโลนีที่ดื้อต่อ rifampicin และ tetracycline (Rif^rTet^r) และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ eosin methylene blue (EMB) agar และ brilliant green agar (BGA) เพื่อยืนยันว่าเป็น *E. coli* จากนั้นนำมา patch อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี tetracycline 25 µg/ml ($LBRif_{32}Tet_{25}$) gentamycin 4 µg/ml ($LBRif_{32}Gm_4$) trimethoprim 32 µg/ml ($LBRif_{32}Tri_{32}$) chloramphenicol 64 µg/ml ($LBRif_{32}CHPC_{64}$) ciprofloxacin 4 µg/ml ($LBRif_{32}Cip_4$) benzakonium chloride 128 µg/ml ($LBRif_{32}BKC_{128}$) หรือ chlorhexidine 32 µg/ml ($LBRif_{32}CHX_{32}$) สุดท้าย ทำการสกัด plasmid จาก transconjugants และตรวจสอบว่ายังมี plasmid หรือไม่บน gel electrophoresis ชุดควบคุมคือ MG1655rif^r ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin หรือ rifampin และ ยาฆ่าเชื้อ

ทำ conjugation ระหว่าง MG1655rif^{r}2 และ MDR *Salmonella* โดยคัดเลือก transconjugants บนอาหารเลี้ยงเชื้อ $LBRif_{32}BKC_{128}$ หรือ $LBRif_{32}CHX_{32}$ เพื่อเป็นการยืนยันการถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ benzakonium chloride (BKC^r) และ chlorhexidine (CHX^r)

4.3. การกำจัด plasmid ด้วยเทคนิค plasmid curing

ทำการสกัด plasmid DNA MDR *Salmonella* ที่มีค่า MIC ต่อ benzakonium chloride และ chlorhexidine สูง จากนั้นทำ plasmid curing ตามวิธีดัดแปลงมาจาก Moreira et al (2005) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 2 มล. ใน shaking incubator ที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. เจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:50 ใน LB ที่มี Sodium dodecylsulfate (SDS) ที่ความเข้มข้น 1% ($LBSDS_{1\%}$) 2 มล. เลี้ยงเชื้อต่อ 18-24 ชม. ทำซ้ำจนครบ 21 วัน โดยในวันที่ 7 14 และ 21 เจือจางเชื้อแต่ละตัวและ plate ลงใน LB เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้น patch 50 โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB, $LBAp_{100}$, $LBBKC_{128}$ และ $LBCHX_{32}$ จากนั้นสกัด plasmid DNA จากโคโลนีที่ไม่เจริญเติบโตบน $LBAp_{100}$ และ $LBBKC_{128}$ และ/หรือ $LBCHX_{32}$ และตรวจสอบว่ายังมี plasmid หรือไม่บน gel electrophoresis โดยเปรียบกับเชื้อที่ไม่ได้เจริญเติบโตใน 1% SDS (22, 32)

ระยะที่ 5 ศึกษาว่าการสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้หรือไม่ (Exposure experiment)

ทำการวิจัยตามวิธีของ (14) คัดเลือกเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อต่ำ นำมา streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยวและเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 4 มล. ใน shaking incubator ที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. ไปเปตเชื้อ 100 µl ลงใน LB 4 มล. ที่มี BKC หรือ CHX ที่ความเข้มข้นเป็นครึ่งหนึ่งของค่า MIC เลี้ยงเชื้อต่อใน shaking incubator ที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. ในวันต่อมาทำเช่นเดิม โดยใช้เชื้อ 100 µl จากวันก่อนและยาฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้เมื่อวันก่อน ทำจนกระทั่งไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อหรือไม่มีความขุ่นเพิ่มขึ้น นำเชื้อในวันสุดท้ายก่อนที่จะหยุดการเจริญเติบโตมาเพาะเลี้ยงใน LB และหาค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการเปรียบเทียบด้วย

ผลการวิจัย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างเชื้อ *Salmonella enterica* และ *E. coli*

ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษาใน *Salmonella enterica* จำนวน 257 isolates ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ (ตารางที่ 3) แยกได้จากไก่และสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม 126 isolates สุกรสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม 131 isolates ส่วน *E. coli* จำนวน 60 isolates แยกได้จากไก่และสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม 21 isolates และสุกรสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม 39 isolates

ตารางที่ 3 *Salmonella enterica* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ (257 isolates)

ลำดับที่	*Salmonella*	แหล่งที่มา		จำนวน
		ไก่	สุกร	(isolates)
1.	*S*.Albany	4	1	5
2.	*S*.Altona	0	3	3
3.	*S*.Agona	3	0	3
4.	*S*.Amsterdam	11	0	11
5.	*S*.Anatum	0	9	9
6.	*S*.Bovismorbifican	1	4	5
7.	*S*.Bsilla	0	18	18
8.	*S*.Bareilly	1	0	1
9.	*S*.Biafra	0	1	1
10.	*S*.Blockley	1	0	1
11.	*S*.Corvallis	5	6	11
12.	*S*.Djugo	0	1	1
13.	*S*.Enteritidis	32	2	34
14.	*S*.Emek	5	0	5
15.	*S*.Eppendorf	1	0	1
16.	*S*.Give	4	1	5
17.	*S*.Hvittingfoss	3	0	3
18.	*S*.Infantis	1	0	1
19.	*S*.Kedougou	1	9	10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับที่	*Salmonella*	แหล่งที่มา		จำนวน
		ไก่	สุกร	(isolates)
20.	*S*.Kingston	0	1	1
21.	*S*.Kentucky	3	0	3
22.	*S*.Lexington	1	0	1
23.	*S*.Madjorio	2	0	2
24.	*S*.Mbandaka	1	0	1
25.	*S*.Muenster	1	0	1
26.	*S*.Orion	1	2	3
27.	*S*.Panama	0	1	1
28.	*S*.Paratyphi B	1	0	1
29.	*S*.Paratyphi B2	1	0	1
30.	*S*.Poona	2	0	2
31.	*S*.Rissen	1	13	14
32.	*S*.Stanley	5	25	30
33.	*Salmonella* subspecies I	4	8	12
34.	*S*.Sainpaul	1	1	2
35.	*S*.Schwarzengrund	1	0	1
36.	*S*.Senftenberg	4	3	7
37.	*S*.Singpore	1	0	1
38.	*S*.Suberu	1	0	1
39.	*S*.Thyphimurium	7	13	20
40.	*S*.Thomson	1	0	1
41.	*S*.Virginia	0	1	1
42.	*S*.Virchow	3	1	4
43.	*S*.Worthington	2	2	4
44.	*S*.Weltevreden	9	5	14
	รวม	**126**	**131**	**257**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* และ *E. coli*

จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า การกระจายตัวของค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อของ *Salmonella* และ *E. coli* แสดงในตารางที่ 4-5 และ 6-7 ตามลำดับ โดยมี *Salmonella enterica* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด คือ ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamycin, tetracycline และ trimetroprim จำนวน 107 (39.05 %), 61 (22.26%), 3 (1.09%), 27 (9.85%), 136 (49.64%) และ 72 (26.28%) ตามลำดับ เมื่อจัดรูปแบบของการดื้อยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 8 และ 10) มี *Salmonella* ที่ดื้อต่อยา 1 ชนิด คือ ampicillin, chloramphenicol, tetracycline และ trimetroprim รวมทั้งหมด 24.45% (67/274) isolates โดยมีเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน 35.77% (98/274) isolates สำหรับค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อ BKC อยู่ระหว่าง 8-256 μg/ml โดยส่วนใหญ่ (112/274, 40.88%) มีค่า MIC ต่อ BKC ที่ 64 μg/ml ส่วนเชื้อที่มีค่า MIC ต่อ BKC ที่ 8 และ 16 μg/ml มีจำนวนรวมกันเพียง 1.09% (3/274) ส่วนค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อ CHX อยู่ระหว่าง 8-64 μg/ml โดยส่วนใหญ่ (173/274, 63.14%) มีค่า MIC ต่อ CHX ที่ 8 μg/ml ค่า MIC ต่อ $CuSO_4$ และ $ZnCl_2$ เกาะกลุ่มอยู่ที่ 512 – 2048 และ 1024 – 2048 μg/ml ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า MIC ต่อ BKC ร่วมกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ (ตารางที่ 8 และ 9) พบว่า เชื้อที่มีค่า MIC ต่อ BKC ที่ 256 128 และ 64 μg/ml และดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดคิดเป็น 67.39% (31/46) 65.73 % (48/73) และ 64.29 (72/112) ของเชื้อที่ค่า MIC นั้นๆตามลำดับ ในขณะที่เชื้อที่มีค่า MIC ต่อ BKC ที่ 8 16 และ 32 μg/ml และดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดรวมกันคิดเป็น 32.56%(14/43) ของเชื้อที่ค่า MIC ทั้ง 3 เมื่อพิจารณาค่า MIC ต่อ CHX ร่วมกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ (ตารางที่ 10 และ 11) พบว่า เชื้อที่มีค่า MIC ต่อ CHX 64 และ 32 μg/ml และดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดรวมกันคิดเป็น 65.00% (13/20) ของเชื้อที่ค่า MIC ทั้ง 2 โดยเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดส่วนใหญ่มีค่า MIC ต่อ CHX 8 μg/ml (105/178) จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาปฏิชีวนะกับการมีค่า MIC ต่อ BKC หรือ CHX สูง ($P < 0.01$) ไม่ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับค่า MIC ต่อ $CuSO_4$ และ $ZnCl_2$ เพราะค่า MIC ต่อโลหะหนักทั้ง 2 เกาะกลุ่มกันและไม่สามารถแบ่งกลุ่มหรือระดับค่า MIC ได้

ตารางที่ 4 จำนวน isolates ของ *Salmonella enterica* ที่มีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะที่ระดับต่างๆ (n = 257)

MIC (µg/ml)	จำนวน isolates ที่ค่า MIC ต่าง ๆ *													
ยาปฏิชีวนะ	<0.125	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Ampicillin				1 (0.39)	2 (0.78)	100 (38.9)	36 (14.00)	7 (2.72)	4 (1.56)		1 (0.39)		2 (0.78)	104 (40.50)
Chloramphenicol					1 (0.39)		23 (8.95)	120 (46.70)	52 (20.20)	8 (3.11)	20 (7.78)	20 (7.78)	11 (4.28)	2 (0.78)
Ciprofloxacin	115 (44.70)	22 (8.56)	65 (25.30)	36 (14.00)	8 (3.11)	8 (3.11)	3 (1.17)							
Gentamycin		34 (13.20)	3 (1.17)	131 (51.00)	49 (19.10)	12 (4.67)	1 (0.39)	5 (1.95)	12 (4.67)	5 (1.95)	5 (195)			
Tetracycline		4 (1.56)		5 (1.95)	51 (19.80)	36 (14.00)	27 (10.50)	1 (0.39)	2 (0.78)	7 (2.72)	23 (8.95)	42 (16.30)	57 (22.20)	2 (0.78)
Trimethroprim	5 (1.95)		101 (39.30)	42 (16.30)	33 (12.80)	2 (0.78)	2 (0.78)		5 (1.95)	1 (0.39)	1 (0.39)		11 (4.28)	54 (21.00)

* ตัวเลขในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณจาก n = 257

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 จำนวน isolates ของ *Salmonella enterica* ที่มีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อที่ระดับต่างๆ (n = 257)

MIC (µg/ml)	จำนวน isolates ที่ค่า MIC ต่าง ๆ*												
ยาฆ่าเชื้อ	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**	**1024**	**2048**	**4096**
Benzalkonium chloride				1 (0.39)	1 (0.39)	24 (9.34)	112 (43.58)	73 (28.40)	46 (17.90)				
Chlorhexidine digluconate		2 (0.78)	20 (7.78)	162 (63.04)	53 (20.62)	16 (6.23)	4 (1.56)						
Zinc chloride								1 (0.39)		55 (21.40)	120 (46.69)	98 (38.13)	
Copper sulphate									1 (0.39)		2 (0.78)	254 (98.83)	

* ตัวเลขในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณจาก n = 257

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 จำนวน isolates ของ *E. coli* ที่มีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะที่ระดับต่างๆ (n = 60)

MIC (µg/ml)	จำนวน isolates ที่ค่า MIC ต่าง ๆ *													
ยาปฏิชีวนะ	**<0.125**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**>256**
Ampicillin					1 (1.67)		1 (1.67)	3 (5.00)			1 (1.67)	1 (1.67)		53 (88.33)
Chloramphenicol							2 (3.33)	15 (25.00)	9 (15.00)	8 (13.33)	12 (20.00)	6 (10.00)	4 (6.67)	4 (6.67)
Ciprofloxacin	28 (46.67)	2 (3.33)	3 (5.00)	6 (10.00)	3 (5.00)	1 (1.67)	1 (1.67)	11 (18.33)	1 (1.67)	4 (6.67)				
Gentamycin				16 (26.66)	34 (56.67)	4 (6.67)					3 (5.00)	3 (5.00)		
Tetracycline							3 (5.00)			1 (1.67)	3 (5.00)	21 (35.00)	31 (51.66)	1 (1.67)
Trimethroprim			1 (1.67)	3 (5.00)	3 (5.00)								24 (40.00)	29 (48.33)

* ตัวเลขในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณจาก n = 60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 จำนวน isolates ของ *E. coli* ที่มีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อที่ระดับต่างๆ (n = 60)

MIC (µg/ml)	**จำนวน isolates ที่ค่า MIC ต่าง ๆ***												
ยาปฏิชีวนะ	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**	**1024**	**2048**	**4096**
Benzalkonium chloride						3 (5.00)	15 (25.00)	16 (26.67)	26 (43.33)				
Chlorhexidine digluconate		23 (38.33)	14 (23.33)	18 (30.00)	4 (6.67)		1 (1.67)						
Zinc chloride											4 (6.67)	56 (93.33)	
Copper sulphate											52 (86.67)	8 (13.33)	

* ตัวเลขในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณจาก n = 60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* จำแนกตามค่า MIC ของ BKC (n=257)

รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ	**จำนวน isolates**	**ค่า MIC ของ BKC**					
	(%)*	**256**	**128**	**64**	**32**	**16**	**8**
AMP	18(7.00)	2	7	7	2	-	-
CHP	4(1.56)	1	2	1	-	-	-
TET	35(13.62)	5	5	24	1	-	-
TRI	7(2.72)	2	-	5	-	-	-
AMP,CIP	3(1.17)	-	-	3	-	-	-
AMP,TET	15(5.84)	5	4	5	1	-	-
AMP,TRI	3(1.17)	-	-	3	-	-	-
CHP,TRI	3(1.17)	-	3	-	-	-	-
TET,TRI	11(4.28)	-	4	4	2	1	-
AMP,CHP,TET	15(5.84)	8	3	3	1	-	-
AMP,TET,TRI	9(3.50)	-	5	4	-	-	-
CHP,GEN,TET	1(0.39)	-	-	1	-	-	-
CHP,TET,TRI	3(1.17)	1	0	2	-	-	-
AMP,CHP,GEN,TET	8(3.11)	4	4	-	-	-	-
AMP,CHP,TET,TRI	18(7.00)	1	9	8	-	-	-
AMP,CHP,GEN,TET,TRI	9(3.50)	2	2	2	3	-	-

* ตัวเลขในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณจาก n = 257

ตารางที่ 9 *Salmonella* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ต่อ BKC

จำนวน *Salmonella*	**ค่า MIC ของ BKC (μg/ml)**					
	256	**128**	**64**	**32**	**16**	**8**
จำนวนทั้งหมด	46	73	112	24	1	1
จำนวนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด	31	48	72	10	1	0
จำนวนที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ	15	25	40	14	0	1

ตารางที่ 10 รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* จำแนกตามค่า MIC ของ CHX (n=257)

รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ	จำนวน isolates	ค่า MIC ของ CHX ต่าง ๆ					
	(%)*	64	32	16	8	4	2
AMP	18(7.00)	-	1	3	10	4	-
CHP	4(1.56)	-	1	1	2	-	-
TET	35(13.62)	-	2	7	24	2	-
TRI	7(2.72)	-	2	-	5	-	-
AMP,CIP	3(1.17)	-	-	-	2	1	-
AMP,TET	15(5.84)	-	1	3	11	-	-
AMP,TRI	3(1.17)	-	-	-	2	1	-
CHP,TRI	3(1.17)	-	-	-	1	-	2
TET,TRI	11(4.28)	1	-	4	6	-	-
AMP,CHP,TET	15(5.84)	-	1	7	5	2	-
AMP,TET,TRI	9(3.50)	-	1	1	7	-	-
CHP,GEN,TET	1(0.39)	-	-	-	1	-	-
CHP,TET,TRI	3(1.17)	-	-	-	3	-	-
AMP,CHP,GEN,TET	8(3.11)	-	-	2	6	-	-
AMP,CHP,TET,TRI	18(7.00)	2	-	1	13	2	-
AMP,CHP,GEN,TET,TRI	9(3.50)	-	1	1	5	2	-

* ตัวเลขในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณจาก n = 257

ตารางที่ 11 *Salmonella* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ของ CHX

จำนวน *Salmonella*	ค่า MIC ของ CHX (μg/ml)					
	64	32	16	8	4	2
จำนวนทั้งหมด*	4	16	53	162	20	2
จำนวนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด	3	10	30	103	14	2
จำนวนที่ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ	1	6	23	59	6	0

ตารางที่ 12 รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จำแนกตามค่า MIC ของ BKC (n=60)

รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ	จำนวน isolates	จำนวนที่มีค่า MIC ของ BKC			
	(%)*	256	128	64	32
AMP,TET	2(3.3)	1	-	1	-
CIP,TET	1(1.7)	1	-	-	-
TET,TRI	1(1.7)	1	-	-	-
AMP,CIP,TET	2(3.3)	2	-	-	-
AMP,TET,TRI	15(25.0)	3	1	1	1
CHP,CIP,TRI	1(1.7)	-	1	-	-
CHP,TET,TRI	1(1.7)	-	-	1	-
AMP,CHP,CIP,TET	1(1.7)	1	-	-	-
AMP,CHP,CIP,TRI	1(1.7)	1	-	-	-
AMP,CHP,TET,TRI	21(3.5)	6	12	3	-
AMP,CIP,TET,TRI	4(6.7)	2	-	1	1
AMP,CHP,CIP,TET,TRI	5(8.3)	3	2	-	-
AMP,CHP,GEN,TET,TRI	2(3.3)	2	-	-	-
AMP,CHP,CIP,GEN,TET,TRI	2(3.3)	2	-	-	-

ตารางที่ 13 *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ของ BKC

จำนวน *E. coli*	ค่า MIC ของ BKC (μg/ml)			
	256	128	64	32
จำนวนทั้งหมด	26	16	15	3
จำนวนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด	25	16	7	2
จำนวนที่ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ	1	0	8	1

ตารางที่ 14 รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จำแนกตามค่า MIC ของ CHX (n=60)

รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ	จำนวน isolates (%)*	จำนวนที่มีค่า MIC ของ CHX					
		64	32	16	8	4	2
AMP,TET	2(3.3)	-	-	-	1	-	1
CIP,TET	1(1.7)	-	-	-	1	-	-
TET,TRI	1(1.7)	-	-	-	1	-	1
AMP,CIP,TET	2(3.3)	-	-	-	2	-	-
AMP,TET,TRI	15(25.0)	-	-	1	3	1	10
CHP,CIP,TRI	1(1.7)	-	-	-	-	1	-
CHP,TET,TRI	1(1.7)	-	-	-	-	1	-
AMP,CHP,CIP,TET	1(1.7)	-	-	-	-	1	-
AMP,CHP,CIP,TRI	1(1.7)	-	-	-	-	1	-
AMP,CHP,TET,TRI	21(3.5)	1	-	1	5	3	11
AMP,CIP,TET,TRI	4(6.7)	-	-	1	2	1	-
AMP,CHP,CIP,TET,TRI	5(8.3)	-	-	-	2	2	1
AMP,CHP,GEN,TET,TRI	2(3.3)	-	-	-	1	1	-
AMP,CHP,CIP,GEN,TET,TRI	2(3.3)	-	-	-	-	2	-

ตารางที่ 15 *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำแนกตามค่า MIC ของ CHX

จำนวน *E. coli*	ค่า MIC ของ CHX (µg/ml)					
	64	32	16	8	4	2
จำนวนทั้งหมด	1	0	4	18	14	23
จำนวนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด	1	0	3	18	14	23
จำนวนที่ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ	0	0	1	0	0	23

ระยะที่ 3 ศึกษากลไกที่อาจเป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามในเชื้อที่ดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและปฏิชีวนะ

3.1 การตอบสนอง energy uncoupler

ระบบ multidrug efflux system ที่พบและมีความสำคัญใน *Salmonella* และ *E. coli* คือ ระบบ AcrAB-TolC ซึ่งใช้พลังงานจาก proton-motif force (PMF) อย่างไรก็ตาม อาจมีการแสดงออกของระบบอื่นที่ใช้พลังงานแบบเดียวกัน ส่วน CCCP เป็น energy uncoupler ที่จะขัดขวางการทำงานของระบบที่ใช้ proton-motif force การเติม CCCP จะทำให้ระบบไม่สามารถทำงานได้ส่งผลให้เชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อด้วยระบบเหล่านี้มีค่า MIC ลดลง ในการวิจัยครั้งนี้ทำการทดสอบการตอบสนองต่อ energy uncoupler ใน *Salmonella enterica* ที่มีค่า MIC ต่อ BKC 128 และ 256 μg/ml จำนวน 128 isolates และ CHX 16 32 และ 64 μg/ml จำนวน 73 isolates โดยทำการหาค่า MIC ต่อ CCCP ของ *Salmonella* ที่ได้จากการสุ่มเลือก คือ *S.* Typhimurium, *S.* Give และ *S.* Kedougou อย่างละ 1 isolates เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกความเข้มข้นที่ sublethal ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* จากผลการวิจัยพบว่า *S.* Typhimurium, *S.* Give และ *S.* Kedougou มีค่า MIC ต่อ CCCP เป็น 200 400 และ 200 μM ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ CCCP ที่ ความเข้มข้น คือ 50 μM ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่า *S.* Enteritidis 1 isolate คือ SA085 มีค่า MIC ต่อ BKC ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม CCCP ในขณะที่ไม่มีเชื้อตัวใดที่มีค่า MIC ต่อ CHX ลดลงมากกว่า 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติม CCCP เชื้อควบคุมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CCCP ที่ความเข้มข้นทั้ง 2 แต่ไม่มียาฆ่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ แสดงว่า ระบบ multidrug efflux system ที่ใช้พลังงานจาก PMF เกี่ยวข้องกับการลดความไวต่อ BKC แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการลดความไวต่อ CHX ในเชื้อ SA085 ดังนั้นจึงทำการหาค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA085 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติม CCCP 50 μM (ตารางที่ 16) พบว่า ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA085 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติม CCCP 50 μM ไม่แตกต่างกันแสดงว่า ระบบ multidrug efflux system ที่ใช้พลังงานจาก PMF รวมถึง ระบบ AcrAB-TolC ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อตัวนี้

ตารางที่ 16 ค่า MIC ของ SA085 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติม CCCP

CCCP	ค่า MIC (μg/ml)					
(μM)	AMP	CHP	CIP	GEN	TET	BKC
0	>256	256	0.5	1	128	64
50	>256	256	0.5	1	64	8

3.2 การทดสอบความดื้อต่อไซโคลเฮกเซน (cyclohexane)

จากรายงานที่มีก่อนหน้านี้ พบว่า *Salmonella* และ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันและมีการแสดงออกของระบบ multidrug efflux system โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบ AcrAB-TolC จะดื้อต่อ cyclohexane ด้วย จึงใช้ cyclohexane เป็นตัวบ่งชี้ถึงการแสดงออกของระบบนี้ ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการทดสอบความไวต่อ cyclohexane ของเชื้อทั้งหมดไม่เชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ใน cyclohexane แสดงว่า เชื้อทั้งหมดไวต่อ cyclohexane และไม่มีการแสดงออกของระบบ AcrAB-TolC ใน *Salmonella* และ *E. coli* เหล่านี้

3.3 การตรวจหาการปรากฏและตำแหน่งของยีน *qacE* และ *qacEΔ1*

QacE และ QacEΔ1 เป็นระบบ multidrug efflux system ที่ขับ BKC ออกจากเซลล์และอาจส่งผลให้ค่า MIC ต่อ BKC สูงขึ้น ในขณะที่สามารถขับออกยาปฏิชีวนะได้ด้วย ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการตรวจหาการปรากฏของยีนทั้ง 2 ใน *Salmonella* spp. ที่มีค่า MIC ต่อ BKC สูงสุดและต่ำสุดจำนวน 127 ตัว ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ไม่มีเชื้อตัวใดที่มียีน *qacE* ในขณะที่พบยีน *qacEΔ1* ในเชื้อจำนวน 38 isolates (29.92 %) (ตารางที่ 17) เนื่องจากยีน *qacE* และ *qacEΔ1* มักปรากฏอยู่บน class I integron ซึ่งเป็น genetic element ที่มียีนที่ควบคุมการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ และสามารถถ่ายทอดได้ โดยมักพบใน *Salmonella* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ยีน *qacE* และ *qacEΔ1* อยู่ที่ด้าน 3' ของ class I integron และตามด้วยยีน *sulI* เรียกว่า 3' conserved region ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการหายีน *ins* และ 3'-conserved region ในเชื้อที่มียีน *qacEΔ1* ด้วยเทคนิค PCR โดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ครอบคลุมด้าน 3' ของ *qacEΔ1* และด้าน 5' ของ *sulI* เพื่อยืนยันการมี 3'-conserved region ของ class I integron พบว่า *Salmonella* spp. ที่มียีน *qacEΔ1* จำนวน 25 isolates (65.79 %) ให้ PCR products ขนาด 1,112 bp เมื่อ amplify ด้วย primers ที่จำเพาะต่อ 3'-conserved region แสดงว่า มี *sulI*

ที่ด้าน 3' ของ *qacEΔ1* แสดงว่ายีน *qacEΔ1* อยู่บน class I integron ในขณะที่ยีน *qacEΔ1* ใน *Salmonella* spp. อีก 13 isolates (34.21%) ไม่ได้อยู่บน class I integron โดย *Salmonella* ที่มียีน *qacEΔ1* ไม่จำเป็นต้องดื้อยาปฏิชีวนะและเชื้อที่มีค่า MIC ต่อ BKC สูงไม่จำเป็นต้องมียีน *qacEΔ1* (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 17 ยีน *ins* และ 3'-conserved region ใน *Salmonella* ที่มียีน *qacEΔ1*

***qacEΔ1*-containing strains**	**Species**	**ยีน *ins***	**3'conserved region**	**MIC ต่อ BKC (μg/ml)**	**รูปแบบการดื้อยา**
SA012	*S.* Weltevreden	+	+	256	AMP,CHP,GEN,TET,TRI
SA014	*S.* Anatum	+	+	256	AMP,GEN,TET,TRI
SA015	*Salmonella* subspecies I	-	-	128	AMP,CHP,GEN,TET,TRI
SA016	*S.* Stanley	+	+	64	AMP,TET,TRI
SA021	*Salmonella* subspecies I	+	+	256	AMP,CHP,GEN,TET,TRI
SA022	*S.* Albany	+	+	128	AMP,CHP,TET,TRI
SA023	*S.* Albany	+	+	128	AMP,CHP,TET,TRI
SA025	*S.* Weltevreden	+	+	256	AMP,CHP,GEN,TET,TRI
SA032	*S.* Typhimurium	-	-	32	-
SA033	*S.* Typhimurium	-	-	32	-
SA034	*S.* Give	+	+	128	AMP,CHP,TET,TRI
SA035	*S.* Albany	+	+	64	AMP,CHP,TET,TRI
SA036	*S.* Albany	+	+	64	AMP,CHP,TET,TRI
SA039	*S.* Kingston	+	+	64	AMP,CHP,TET,TRI
SA040	*S.* Eppendorf	+	+	256	AMP,GEN,TET,TRI
SA041	*Salmonella subspecies I*	+	+	64	AMP,CHP,GEN,TET,TRI
SA044	*S.* Kedougou	+	+	256	AMP,CHP,GEN,TET
SA046	*S.* Kentucky	+	+	64	AMP,GEN,TET,TRI
SA047	*S.* Madjorio	-	-	64	AMP,TET,TRI
SA048	*S.* Schwarzengrund	+	+	64	AMP,TET,TRI
SA053	*S.* Albany	+	+	64	AMP,CHP,TET,TRI
SA054	*S.* Albany	+	+	64	AMP,CHP,TET,TRI
SA058	*S.* Rissen	-	-	128	TET

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 (ต่อ)

qacEΔ1-containing strains	Species	ยีน *ins*	3' –conserved region	MIC ต่อ BKC (μg/ml)	รูปแบบการดื้อยา
SA072	*S.* Albany	+	+	64	AMP,CHP, TRI
SA074	*Salmonella* subspecies I	+	+	128	AMP,CHP,GEN,TET,TRI
SA079	*S.* Stanley	-	-	128	AMP,CHP,TET,TRI
SA096	*S.* Anatum	-	-	-	TET
SA097	*S.* Emek	+	+	256	TRI
SA098	*S.* Emek	+	+	256	TRI
SA100	*Salmonella* subspecies I	-	-	256	AMP,TET
SA101	*Salmonella* subspecies I	-	-	256	AMP,TET
SA104	*S.* Orion	+	+	256	AMP,TRI
SA107	S. Singapore	-	-	256	-
SA108	*S.* Stanley	+	+	256	CHP,TET,TRI
SA109	*S.* Stanley	+	+	256	AMP,CHP,TET,TRI
SA115	*S.* Weltevreden	-	-	128	TET,TRI
SA124	S. Enteritidis	-	-	32	-
SA128	*S.* Typhimurium	-	-	16	TET,TRI

ตารางที่ 18 การกระจายตัวของ *Salmonella* ที่พบยีน *qacEΔ1* เมื่อแยกเชื้อตามค่า MIC ต่อ BKC (n = 127)

ค่า MIC ต่อ BKC (μg/ml)	จำนวนเชื้อที่แต่ละค่า MIC	จำนวนเชื้อที่มี *qacEΔ1*
256	37	15
128	34	8
64	21	11
32	34	3
16	2	1
8	1	0

ระยะที่ 4 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

สำหรับการวิจัยในระยะที่ 4 ประกอบด้วย 4 ส่วน ได้ผลการวิจัยดังนี้

4.1. การคัดเลือก spontaneous rifampicin resistance derivatives ของ *E. coli* MG1655 (MG1655rif^r)

E. coli MG1655 เป็นเชื้อมาตรฐานที่เป็นอนุพันธ์ของ *E. coli* K12 ซึ่งเป็น wide type ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อ BKC ต่ำ (ตารางที่ 19) จึงใช้ในการทำ biparental mating กับ *Salmonella* spp. ที่ค่า MIC ต่อ BKC สูง โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับ plasmid ที่มี gene ที่ควบคุมการดื้อต่อ BKC (ถ้ามี) ในการคัดเลือก transconjugants ซึ่งเป็น *E. coli* MG1655 ที่มีค่า BKC ต่อสูงขึ้นเพราะรับ plasmid จาก *Salmonella* ต้องใช้ BKC และ counter-selectable marker ที่ จำเพาะต่อ *E. coli* MG1655 เนื่องจาก *Salmonella* ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะยกเว้น rifampicin ในขณะที่ *E. coli* MG1655 ไวต่อยา rifampicin เช่นกัน ดังนั้นจึงใช้ rifampicin เป็นยาปฏิชีวนะในการคัดเลือก transconjugants ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการคัดเลือกอนุพันธ์ของ *E. coli* MG1655 ที่ดื้อต่อ rifampicin ได้ MG1655rif^{r}2 และ MG1655rif^{r}3 ซึ่งยังคงไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อ BKC ต่ำ แต่มีค่า MIC ต่อ rifampicin สูงขึ้นเป็น 256 μg/ml ไม่มี plasmid และไม่สูญเสียความดื้อต่อ rifampicin เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี selective pressure ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่ส่งผลให้ MG1655rif^{r}2 และ MG1655rif^{r}3 ดื้อต่อ rifampicin อยู่บนโครโมโซม mutants ทั้ง 2 จึงสามารถใช้เป็นตัวรับ plasmid ในการวิจัยครั้งนี้ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ค่า MIC ของ *E. coli* และ *Salmonella* ที่ใช้การทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

Species	Strains	ค่า MIC (μg/ml)								
		AP	CHPC	CIP	GEN	TET	TRI	RIF	BKC	CHX
E. coli	MG1655	2	8	0.5	0.5	1	0.5	4	32	8
E. coli	MG1655rif 2	2	8	0.5	0.5	0.5	1	256	32	8
E. coli	MG1655rif 3	2	8	0.5	0.5	0.5	1	256	32	8
S. Weltevreden	SA012	>256	64	0.25	16	128	256	16	256	32
S. Anatum	SA014	>256	8	1	>64	256	256	16	256	16
Salmonella subspecies I	SA015	>256	256	0.25	64	256	>256	16	128	16
S. Albany	SA019	256	16	0.25	1	256	>256	16	128	16
S. Typhimurium	SA020	256	16	0.25	0.5	256	>256	16	128	16
Salmonella subspecies I	SA021	>256	128	0.125	64	256	256	8	256	8
S. Panama	SA026	64	8	0.25	2	64	256	8	128	32
S. Albany	SA057	4	8	0.25	1	256	4	8	256	32
S. Bsilla	SA067	>256	64	<0.03	2	256	1	8	128	32
S. Anatum	SA072	>256	256	0.125	0.5	16	>256	8	64	8

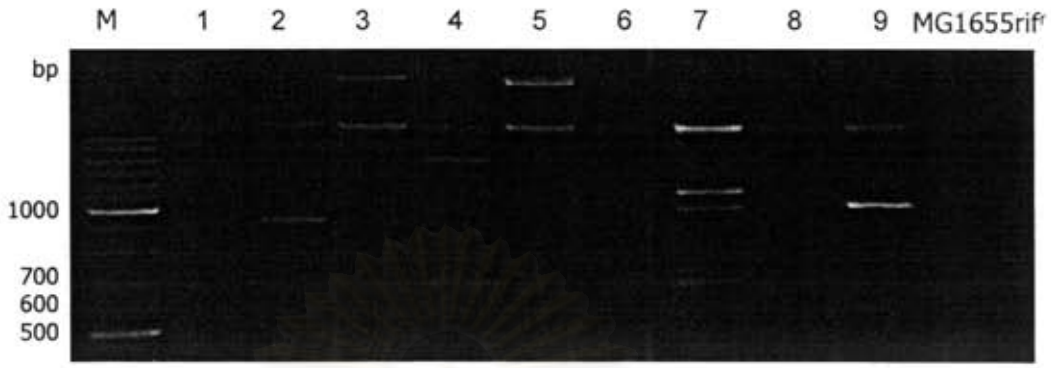
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2. การถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วย biparental mating (Conjugation)

ในการวิจัยครั้งนี้ เลือกใช้ *E. coli* MG1655rif^{r}2 เป็นตัวรับ plasmid ที่มียีนดื้อยาและ *Salmonella* จำนวน 10 isolates ที่มีค่า MIC ต่อ BKC สูงและดื้อต่อ AMP หรือ TET เป็นตัวให้ plasmid ที่มียีนดื้อยา (ตารางที่ 19) โดยการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ใช้ในการคัดเลือก Transconjugants ซึ่งเป็น *E. coli* MG1655rif^{r}2 ที่ได้รับ plasmid มียีนดื้อยา AMP จาก *Salmonella* โดยก่อนทำการทดลอง ทำการสกัด plasmid เพื่อยืนยันว่า *Salmonella* ทั้ง 10 isolates มี plasmid และ MG1655rif^{r}2 ไม่มี plasmid

หลังจากการทำ conjugation แล้วพบว่า *Salmonella* เกือบทุกตัวที่ทดสอบให้ transconjugants ที่เป็น *E. coli* ที่ดื้อต่อ rifampicin และ ampicillin (Rif^{r}Ap^r) ยกเว้น SA057 ที่ไม่ให้โคโลนีที่เป็น *E. coli* ทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ $LBRif_{32}Ap_{100}$ และ $LBRif_{32}Tet_{25}$ โดยในชุดควบคุม คือ MG1655rif^{r}2 สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ $LBRif_{32}$ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ $LBRif_{32}Ap_{100}$ และ $LBRif_{32}Tet_{25}$ เมื่อทำการสกัด plasmid ใน transconjugants พบว่า transconjugants ทุกตัวมี plasmid แสดงว่ามีการถ่ายทอด plasmid จาก *Salmonella* ไปยัง *E. coli* จริง (รูปที่ 3) โดยยีนดื้อยา AMP อยู่บน plasmid เหล่านี้ เมื่อนำ Rif^{r}Ap^r transconjugants ไปทดสอบว่า ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นหรือไม่และมีความไวต่อ BKC และ CHX ลดลงหรือไม่ พบว่า ไม่มี Rif^{r}Ap^r transconjugants ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ $LBRif_{32}BKC_{128}$ และ $LBRif_{32}CHX_{32}$ แต่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะบางชนิดได้ (ตารางที่ 20) โดย Rif^{r}Ap^r transconjugants ทุกตัวดื้อต่อ TET และไม่ดื้อต่อ CIP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 การยืนยันการถ่ายทอด plasmid DNA จาก *Salmonella* ไปยัง *E. coli* สกัด plasmid DNA จาก transjugants ที่มี *Salmonella* เป็น donors และ MG1655rif เป็น recipient ที่ไม่มี plasmid DNA lane 1-9, เป็น transconjugants ที่ได้จาก SA072, SA067, SA029, SA021, SA020, SA019, SA015, SA014 และ SA012 ตามลำดับ M, molecular weight marker

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 ค่า MIC ของ conjugants ที่ได้จากการทำ biparental mating

MG1655rif^2 x	การเจริญเติบโต (+ หรือ -)							
	AMP	CHP	CIP	GEN	TET	TRI	BKC	CHX
SA012	+	-	-	+	+	+	-	-
SA014	+	-	-	-	+	+	-	-
SA015	+	-	-	+	+	+	-	-
SA019	+	-	-	-	+	+	-	-
SA020	+	-	-	-	+	+	-	-
SA021	+	+	-	+	+	+	-	-
SA026	+	-	-	-	+	-	-	-
SA057	-	-	-	-	-	-	-	-
SA067	+	-	-	-	+	-	-	-
SA072	+	+	-	-	+	+	-	-

X biparental mating

\+ พบการเจริญเติบโต

\- ไม่พบการเจริญเติบโต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3. การกำจัด plasmid DNA ด้วยเทคนิค plasmid curing

เทคนิค plasmid curing เป็นการทำให้เชื้อที่ดื้อต่อ benzakonium chloride หรือ chlorhexidine chloride (BKC^r) และ chlorhexidine (CHX^r) อยู่บน plasmid หรือไม่ หากการสูญเสีย plasmid ทำให้เชื้อมีความไวต่อยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 เพิ่มขึ้น แสดงว่า ยีนควบคุมการดื้อต่อ benzakonium chloride (BKC^r) และ chlorhexidine (CHX^r) อยู่บน plasmid ในการวิจัยครั้งนี้กำจัด plasmid DNA ใน *Salmonella* ชุดเดียวกับที่ทำ biparental mating จำนวน 9 isolates ยกเว้น SA057 เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้จาก biparetal mating โดยใช้ Ap^r เป็น marker ในการบ่งชี้การสูญเสีย plasmid จากผลการวิจัยพบว่า การทำ plasmid curimg ด้วย 1% SDS ไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (ตารางที่ 21) เมื่อครบ 7 วัน เชื้อยังคงดื้อต่อยา AMP แสดงว่ายังมี plasmid อยู่ เมื่อครบ 14 วัน มีเชื้อ 1 isolate คือ SA020 ที่สูญเสีย plasmid แต่ยังคงมีความไวต่อ BKC และ CHX ต่ำ เมื่อครบ 21 วัน เชื้อจำนวน 4 isolates (SA012 SA019 SA020 และ SA072) ไม่สามารถเจริญเติบโตได้อีกไม่สามารถใช้เวลานานถึง 21 วัน ในขณะที่ เชื้ออีก 5 isolates (SA014 SA015 SA021 SA026 และ SA067) ยังคงมี plasmid ซึ่ง SA015 และ SA067 ไม่สามารถเจริญเติบโตใน BKC_{32} ได้อีก น่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผนังเซลล์ที่เป็นผลมาจากการสัมผัส 1% SDS เป็นเวลานาน ดังนั้นผลการวิจัยจากการทำ plasmid curing ในครั้งนี้ไม่น่าเชื่อถือและไม่สามารถนำมาใช้ยืนยันผลที่ได้จากการทำ biparetal mating ได้

ตารางที่ 21 การเจริญเติบโตของ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่เกี่ยวข้องที่ระยะเวลาต่างๆ ของการทำ plasmid curing

Strains	7 วัน				14 วัน				21 วัน			
	Ap_{100}	BKC_{32}	CHX_8	LB	Ap_{100}	BKC_{32}	CHX_8	LB	Ap_{100}	BKC_{32}	CHX_8	LB
SA012	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
SA014	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
SA015	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
SA019	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
SA020	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
SA021	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
SA026	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
SA067	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SA072	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-

\+ พบการเจริญเติบโต

\- ไม่พบการเจริญเติบโต

ระยะที่ 5 ศึกษาว่าการสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้หรือไม่ (Exposure experiment)

ในการวิจัยขั้นนี้ นำเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อต่ำ มาสัมผัส benzakonium chloride หรือ chlorhexidine ที่ความเข้มขึ้นเป็นครึ่งหนึ่งของค่า MIC และเพิ่มความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อครั้งละ 1.5 เท่า จนกระทั่งไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อหรือไม่มีความขุ่นเพิ่มขึ้น หากเชื้อในวันสุดท้ายมีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อสูงขึ้นแสดงว่า การสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อได้ และถ้าเชื้อเหล่านี้มีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะสูงขึ้นด้วย แสดงว่า มีการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะเกิดขึ้น ในการวิจัยครั้งนี้ เลือกใช้ SA029 และ SA030 (มีค่า MIC ต่อ BKC 4 μg/ml) ในการทดสอบกับ BKC และใช้ SA005, SA027, SA029 และ SA030 ซึ่งมีค่า MIC ต่อ CHX 2, 4, 8 และ 8 μg/ml ตามลำดับ ในการทดสอบกับ CHX จากการทดลอง 2 ครั้ง พบว่า SA030 สามารถเจริญเติบโตได้ใน BKC ที่ความเข้มข้นสูงถึง 16 μg/ml และ 32 μg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 22) โดยโคโลนีของ SA030 ที่ได้หลังการสัมผัสมีค่า MIC ต่อ BKC 32 μg/ml เนื่องจากค่า MIC นี้สูงกว่า SA030 ก่อนสัมผัสมากกว่า 4 เท่า จึงทำการหาค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 23) พบว่า ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะ CHP และ ERY ของ SA030 หลังสัมผัส BKC สูงกว่าค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ของ SA030 ก่อนสัมผัส โดยเมื่อทำการหาค่า MIC ต่อ BKC CHP และ ERY ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม CCCP ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า MIC (ตารางที่ 24) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงใน cyclohexane ไม่พบการเจริญเติบโต

สำหรับการทดสอบกับ CHX จากการทดลอง 2 ครั้ง พบว่า SA027 สามารถเจริญเติบโตได้ใน CHX ที่ความเข้มข้นสูงถึง 2048 μg/ml และ 24 μg/ml ตามลำดับ โดยโคโลนีของ SA027 ที่ได้หลังการสัมผัสมีค่า MIC ต่อ CHX เป็น 128 และ 32 μg/ml ตามลำดับ ส่วน SA030 สามารถเจริญเติบโตได้ใน CHX ที่ความเข้มข้นสูงถึง 12 μg/ml ทั้ง 2 ครั้ง และ SA030 ที่ได้หลังการสัมผัสมีค่า MIC ต่อ CHX เป็น 8 μg/ml (ตารางที่ 25) ดังนั้นจึงทำการหาค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA027 ที่การสัมผัส CHX ครั้งที่ 1 เท่านั้น (ตารางที่ 26) พบว่า ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA027 ก่อนและหลังสัมผัส CHX ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 22 ผลการสัมผัสต่อ BKC ของ *Salmonella* ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อ BKC ต่ำ

Strains	ค่า MIC ก่อนการสัมผัส (μg/ml)	ความเข้มข้นสูงสุด (μg/ml)		ค่า MIC หลังการสัมผัส (μg/ml)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
SA029	4	2	2	-	-
SA030	4	16	32	32	32
SA005	8	4	4	-	-
SA027	16	8	8	-	-

ตารางที่ 23 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA030 ก่อนและหลังสัมผัส BKC

ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ	ก่อนสัมผัส	หลังสัมผัส
BKC	4	32
AMP	2	4
CHP	2	8
CIP	<0.5	<0.5
ERY	2	64
GEN	<0.5	<0.5
TET	<0.5	<0.5
TRI	<0.5	<0.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดของ SA030 ก่อนและหลังสัมผัส BKC ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติม CCCP

Stains	CCCP	ค่า MIC (μg/ml)		
	(μM)	CHP	ERY	BKC
SA030	0	2	2	2
ก่อนสัมผัส*	50	2	2	2
SA030	0	64	8	32
หลังสัมผัส*	50	64	8	32

* ก่อนและหลังสัมผัส BKC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 25 ผลการสัมผัสต่อ CHX ของ Salmonella ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อ CHX ต่ำ

Strains	ค่า MIC ก่อนการสัมผัส (µg/ml)	ความเข้มข้นสูงสุด (µg/ml)		ค่า MIC หลังการสัมผัส (µg/ml)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
SA029	2	1	1	-	-
SA030	4	12	12	8	8
SA005	8	4	4	-	-
SA027	8	2048	24	128	8

ตารางที่ 26 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ SA027 ก่อนและหลังสัมผัส CHX

ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ	ก่อนสัมผัส	หลังสัมผัส
CHX	8	128
AMP	>256	>256
CHP	8	8
CIP	0.125	0.125
GEN	0.5	0.5
TET	4	4
TRI	0.25	0.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายผลการวิจัย

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคในปัจจุบัน ได้มีการนำสารเคมีต่างๆ มาใช้เพื่อรักษาโรค ป้องกันโรคและเร่งการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารต้านจุลชีพซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าทำลายแบคทีเรีย สารต้านจุลชีพที่นำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์มีมากมายหลายชนิด ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อ โลหะหนัก อาจให้กับสัตว์โดยตรงหรือผสมอาหารให้สัตว์กิน รวมถึงการใช้ทำความสะอาดอุปกรณ์การเลี้ยงสัตว์และโรงเรือน เป็นที่ทราบกันดีว่า การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเกินความจำเป็นและไม่สุขุมรอบคอบเป็นต้นเหตุสำคัญของการเกิดเชื้อดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยา และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ยาฆ่าเชื้อและโลหะหนักสามารถทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อและทำให้เกิดการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้ (6, 7) ซึ่งได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความไวต่อยาฆ่าเชื้อและโลหะหนัก และการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ (7, 9, 15, 41, 54) แต่ยังไม่การศึกษาในเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยดังกล่าวในประเทศไทย โดยทำการเก็บข้อมูลความไวต่อปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อและโลหะหนัก ความสัมพันธ์ต่อการดื้อยาปฏิชีวนะ และการเกิดการดื้อข้ามใน *Salmonella* และ *E. coli* ที่แยกได้จากไก่ สุกรและฟาร์มไก่-สุกรในประเทศไทย ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่จะเป็นพื้นฐานของการพัฒนางานวิจัยต่อไปในอนาคตและเป็นการยกระดับระบบการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศด้วย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างเชื้อ *Salmonella enterica* และ *E. coli*

Salmonella และ *E. coli* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้แยกได้จากตัวอย่างไก่ สุกร ฟาร์มไก่และสุกรที่ส่งไปยังสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของสถาบันฯ โดยส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่ได้จากไก่และสุกรที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ ซึ่งจะถูกส่งเข้าสู่โรงงานฆ่าสัตว์และเป็นอาหารเพื่อการบริโภค นอกจากนี้ยังมีบางส่วนแยกได้จากเป็ด นกกระทา ห่านและกระบือ ซึ่งรวมไว้ในการวิจัยครั้งนี้ด้วยเพราะเป็นสัตว์ที่นำมาใช้เพื่อการบริโภคเช่นกัน *Salmonella* ที่แยกได้มีทั้งหมด 44 serovars โดยที่แยกได้มากที่สุด คือ *S.* Enteritidis และ *S.* Stanley ในการวิจัยครั้งนี้เก็บ *Salmonella* และ *E. coli* ทั้งหมดที่ -80°C ซึ่งจะรักษาเชื้อให้อยู่ในสภาวะเดิมและป้องกันไม่ให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงที่อาจมีผลต่อการวิจัย เช่น การสูญเสีย plasmid การใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตจนหมดและตาย เป็นต้น การเก็บรักษาเชื้อมีผลอย่างยิ่งต่อผลการวิจัยที่ถูกต้อง เพราะยีนดื้อยาหลายชนิดอยู่บน plasmid ที่แบคทีเรียอาจสูญเสียได้ถ้าอยู่ในที่ๆ ไม่มี selective pressure เช่น ยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อ เป็นต้น ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้ จน

สารอาหารลดน้อยลง เชื้อเหล่านี้จะไม่แข็งแรงและมีการสูญเสีย plasmid ทำให้เชื้ออาจสูญเสียยีนดื้อยา ส่งผลให้ผลการวิจัยคลาดเคลื่อนได้

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella enterica* และ *E. coli*

ที่ผ่านมา การเก็บข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Salmonella* และ *E.coli* เป็นไปอย่างกว้างขวาง ในขณะที่ข้อมูลความไวต่อยาฆ่าเชื้อและโลหะหนักยังมีจำกัดมาก สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการเผยแพร่ข้อมูลเหล่านี้ ทั้งที่มีการใช้ยาฆ่าเชื้อและโลหะหนักในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์อย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานาน สำหรับการวิจัยครั้งนี้ทำการเก็บข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อและโลหะหนักด้วยการหาค่า MIC โดยทั่วไป จะทำการตรวจวัดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะด้วยการหาค่า MIC แต่สำหรับยาฆ่าเชื้อ ค่า MIC อาจไม่เป็นการวัดความสามารถในการฆ่าเชื้อที่ดีที่สุด เพราะค่า MIC กับอัตรารอดชีวิตของเชื้อมีความสัมพันธ์กันที่ระดับต่างๆ หรืออาจไม่มีความสัมพันธ์กันเลย ขึ้นกับระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสยาฆ่าเชื้อและความเข้มข้นที่ใช้ โดยทั่วไปความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อที่ออกฤทธิ์เป็น Bacteriostatic จะเป็นอย่างน้อย 1000 เท่าของค่า MIC ดังนั้นการหา survival curve จะสามารถบอกความไวต่อยาฆ่าเชื้อได้ดีกว่า (48, 52) อย่างไรก็ตาม เมื่อมีเชื้อจำนวนมาก การหาค่า MIC ยังคงเป็นทางเลือกที่ดี เพราะทำได้ง่าย สะดวกกว่า (14) ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกวิธีการหาค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อ

ก่อนหน้านี้ มีรายงานที่สนับสนุนว่า ยาฆ่าเชื้อชนิด cationic agents ได้แก่ BKC CHX triclosan เป็นสาเหตุของการคัดเลือกเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ การกลายพันธุ์ที่ทำให้เชื้อเหล่านี้ดื้อยามีความคงทน (18, 56) การดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Quaternary amonium compound เป็นที่ทราบกันดีทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและลบ (37) ซึ่งเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการศึกษาผลของ BKC ต่อการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ ใน *Salmonella* (26) ในรายงานก่อนหน้านี้ เชื้อที่พบว่ามีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อสูงได้แก่ *Pseudomonas* spp., *Proteus, Providencia* โดย *Pseudomonas* spp. ที่แยกได้จากโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ที่ใช้ BKC มีค่า MIC สูงกว่าที่แยกได้จากโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ที่ใช้ chlorine แบคทีเรียเหล่านี้ดื้อต่อ BKC แบบ intrinsic resistance อยู่แล้ว (24) จากผลการวิจัยครั้งนี้ *Salmonella* ส่วนใหญ่มีค่า MIC ต่อ BKC ระหว่าง 64-128 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *Salmonella* (138/156, 88.46%) มีค่า MIC ต่อ BKC 128 µg/ml แต่มีเชื้อบางส่วน (18/156, 11.54%) มีค่า MIC ต่อ BKC 64 µg/ml และ 256 µg/ml (1) ซึ่งจากการศึกษาของ Braoudaki and Hilton (2005) พบว่า *S.* Enteritidis มีค่า MIC ต่อ BKC 32 µg/ml เมื่อสัมผัสกับ BKC แล้วจะได้ mutant ที่มีค่า MIC สูงขึ้นเป็น 256 µg/ml (7) สำหรับการวิจัยครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า มี acquired

resistance ต่อยาฆ่าเชื้อ BKC เกิดขึ้นหรือไม่ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่ามี acquired resistance เกิดขึ้นจริงๆ

CHX เป็น cationic agent ที่มีการศึกษาข้อมูลความไวของเชื้อและกลไกในการดื้ออย่างกว้างขวาง จากการวิจัยครั้งนี้ ค่า MIC ต่อ CHX ของ *Salmonella* เกาะกลุ่มอยู่ที่ 8-16 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Aarestrup and Hasman (2004) ส่วน *E. coli* อยู่ที่ 2-8 µg/ml ซึ่งสูงกว่ารายงานของ Aarestrup and Hasman (2004) ที่ 1-2 µg/ml ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากเทคนิคในห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกันหรือ *E. coli* ที่แยกได้จากสัตว์ในประเทศไทยมีความไวต่อ CHX น้อยกว่า ซึ่งเกิดได้จากการใช้ CHX ที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศ ซึ่งควรมีการเปรียบเทียบข้อมูลการใช้ยาฆ่าเชื้อชนิดนี้ด้วย

สำหรับ copper sulfate และ zinc chloride ได้มีการนำมาผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต ข้อมูลความไวของเชื้อชนิดต่างๆ ต่อโลหะหนักทั้ง 2 ชนิดมีจำกัดมาก ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการดื้อต่อ copper sulfate ใน *E. coli* โดยกำหนดให้ *E. coli* ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี copper sulphate 18 mM เป็น *E. coli* ที่ดื้อต่อ copper sulfate จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า ทั้ง *Salmonella* และ *E. coli* มีค่า MIC ต่อ copper sulfate อยู่ในช่วงเดียวกันคือ 1024-2048 µg/ml หรือ 7.53 -15.05 mM ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า *Salmonella* มีค่า MIC ต่อ copper sulfate เป็น 20-28 mM ถ้าใช้ความเข้มข้น 18 mM เป็น breakpoint แสดงว่า *Salmonella* และ *E. coli* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความไว (sensitive) ต่อ copper sulfate ในประเทศเดนมาร์ค พบ *Enterococcus faecium* จากสุกร ไก่ ลูกโคและแกะดื้อต่อ copper sulfate รวมถึงเชื้อที่แยกได้จากคนด้วย สำหรับค่า MIC ต่อ zinc chloride ของ *Salmonella* และ *E. coli* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้คือ 512-2048 µg/ml หรือ 3.75-15 mM ซึ่งสูงกว่าที่ Arestrup and Hasman (2004) รายงานว่า *Salmonella* มีค่า MIC ต่อ zinc chloride เป็น 2 mM (1) ซึ่งสาเหตุของความแตกต่างนี้อาจมาจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจาก zinc chloride ไม่ละลายในสภาวะที่เป็นกลาง ในการวิจัยของ Arestrup and Hasman (2004) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติม zinc chloride ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่า pH 5.5 ดังนั้นความเป็นกรดอ่อนๆ นี้อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ส่วนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เตรียมโดยละลาย zinc chloride ในน้ำกลั่นและปรับ pH ให้เป็น 5.5 จากนั้นจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง zinc chloride สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่พบตะกอนใดๆ รวมทั้งเชื้อควบคุมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่า pH แต่ไม่เติม zinc chloride สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อสังเกตดูด้วยตาเปล่า และเมื่อทดสอบโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและปรับค่า pH เป็น 5.5 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไม่สามารถแข็งตัวได้ จึงสนับสนุนว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของค่า MIC อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายังไม่มีการพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อ BKC และ CHX copper sulfate และ zinc chloride ใน *Salmonella* และ *E. coli* ที่แยกได้ในประเทศไทย เพราะความไวของเชื้อเหล่านี้

เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่ามี acquired resistance เกิดขึ้นจริง

จากผลการวิจัยครั้งนี้ *Salmonella* และ *E. coli* ส่วนใหญ่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน เช่นเดียวกับรายงานของ Padungtod and Kaneene (2006) เมื่อเร็วๆ นี้ (35) Bangtrakulnonth et al (2006) ได้ศึกษา การดื้อยาของ *Salmonella* ที่แยกได้จากเนื้อไก่ สุกร และวัว ซึ่งก็พบว่า *Salmonella* มีความหลากหลายของการดื้อยาเช่นกัน (3) การวิจัยครั้งนี้ให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะกับค่า MIC ของยาฆ่าเชื้อ BKC และ CHX โดยจัดกลุ่มค่า MIC เป็นสูงและต่ำ เนื่องจากยังไม่มีค่า breakpoint ของยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 จึงยึดหลักว่า กลุ่มที่มีค่า MIC สูงจะรวมเชื้อที่มีค่า MIC สูงสุดและรองลงมาไม่เกิน 2 เท่า คือ 128-256 µg/ml สำหรับ BKC และ 32-64 µg/ml สำหรับ CHX ซึ่งไม่พบว่าการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อมีความสัมพันธ์กับค่า MIC ต่อ BKC ($P < 0.001$) และ CHX ($P < 0.001$) อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถยืนยันว่าไม่มีการดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อเกิดขึ้นจริง

ระยะที่ 3 ศึกษากลไกที่อาจเป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามในเชื้อที่ดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาการดื้อข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและปฏิชีวนะอย่างกว้างขวาง โดยกลไกที่ได้รับความสนใจมากที่สุด คือ efflux systems ระบบ efflux systems ที่มีบทบาทสำคัญใน *Salmonella* และ *E. coli* คือ AcrAB-TolC อยู่ในวงศ์ตระกูล Resistance Nodulation and Division (RND) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ สารสีและ detergents ได้แก่ β-lactams, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, fluoroquinolones, fusidic acid, rifampicin, acriflavin, deoxycholate, ethidium bromide, crystal violet, sodium dodecyl sulphate เป็นต้น (12, 34) ระบบนี้ควบคุมโดย the *mar* operon ที่ประกอบด้วย MarR เป็น repressor และ MarA เป็น transcriptioal regulator การกลายพันธุ์ของยีน *marR* ทำให้เกิดการแสดงออกของ AcrAB แบบ overexpression ส่งผลให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดหรือเรียกว่า MAR phenotypes เชื้อเหล่านี้ดื้อต่อ ctclohexane ดังนั้นจึงใช้ cyclohexane เป็นตัวบ่งชี้ถึงการแสดงออกของ up-regulated AcrAB (45) จากผลการวิจัยครั้งนี้ไม่พบว่าเชื้อตัวใดสามารถเจริญเติบโตได้ใน cyclohexane แสดงว่า up-regulated AcrAB efflux ไม่ได้เป็นกลไกสำคัญของการดื้อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อใน *Salmonella* และ *E. coli* ที่ใช้ทดสอบ

ถึงแม้ว่า ระบบ AcrAB จะไม่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อใน *Salmonella* และ *E. coli* ในการวิจัยครั้งนี้ อาจมีระบบ efflux system อื่นๆ ที่ทำหน้าที่เป็นกลไกสำคัญก็ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการหาค่า MIC ต่อ BKC และ CHX โดยที่มีและไม่มี CCCP ซึ่งเป็น efflux pump inhibitor สำหรับระบบที่ใช้ proton motif force โดยถ้า CCCP สามารถลดค่า MIC

ต่อยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 ก็จะศึกษาผลต่อยาปฏิชีวนะต่อไป ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่า ค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเติม CCCP ดังนั้นระบบ efflux system ที่ใช้จาก proton motif force ไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อ BKC และ CHX และไม่ได้เป็นกลไกสำคัญของการดื้อข้ามในเชื้อที่ทดสอบ อย่างไรก็ตาม อาจมีระบบ efflux system ชนิดอื่นๆ ที่ใช้พลังงานในรูปแบบอื่นๆ เช่น ATP เป็นต้น

นอกจากนี้แล้ว ในการวิจัยครั้งนี้ยังทำการตรวจหาการปรากฏของยีน *qacE* และ *qacEΔ1* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของระบบ efflux system QacE และ QacEΔ1 ระบบทั้ง 2 อยู่ในวงศ์ตระกูล Small multidrug resistance (SMR) พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมลบและบวก และใช้พลังงานจาก proton motif force เช่นกัน (40) สามารถขับออกยาปฏิชีวนะ ethidium bromide และ QACs ทำให้เชื้อดื้อต่อสารเคมีเหล่านี้ในระดับต่ำ โดย QacE จะมีประสิทธิภาพในการขับออกสารมากกว่า QacEΔ1 (20) ถึงแม้ว่า ผลจากการหาค่า MIC ต่อ BKC และ CHX ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CCCP จะแสดงให้เห็นว่า ทั้ง QacE และ QacEΔ1 ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อ BKC และ CHX ในการวิจัยครั้งนี้ แต่ระบบทั้ง 2 อาจมีส่วนร่วมในระดับหนึ่ง เพราะกลไกการดื้อข้ามอาจไม่มีเพียงหนึ่งเดียวเท่านั้น ยีนทั้ง 2 นี้มักพบอยู่บน class I integron ที่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (38) ดังนั้นการทราบการปรากฏและตำแหน่งของยีนทั้ง 2 จะช่วยบอกถึงกลไกที่มีส่วนร่วมในการดื้อปฏิชีวนะและ BKC ได้ นอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานการกระจายตัวของยีนทั้ง 2 ใน *Salmonella* ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้เลือกทำการศึกษาใน *Salmonella* ที่มีค่า MIC ต่อ BKC สูงสุดและต่ำสุด ไม่พบว่ามีการปรากฏของยีน *qacE* ในขณะที่พบยีน *qacEΔ1* ทั้งที่อยู่และไม่อยู่บน class I integron โดยเชื้อที่มียีน *qacEΔ1* ไม่จำเป็นต้องมีค่า MIC ต่อ BKC และยาปฏิชีวนะสูงกว่าเชื้อที่ไม่มียีน *qacEΔ1* ซึ่งสอดคล้องกับ Kucken et al (2000) ซึ่งทำการศึกษาใน *Enterobactor cloacae, Citrobactor freundii, P. aeruginosa* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ที่แยกได้จากผู้ป่วย ที่พบยีน *qacE* ใน *P. aerugiosa* เพียง 1 isolate เท่านั้น (23) ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การปรากฏของยีน *qacE* ต่ำมากและการปรากฏของยีน *qacEΔ1* ไม่จำเป็นต้องเกี่ยวข้องกับ class I integron เสมอไป

ระยะที่ 4 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

ในการวิจัยครั้งนี้ทำการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* ด้วย biparental mating โดยใช้อนุพันธ์ที่ดื้อต่อยา rifampicin ของ *E. coli* MG1655 ซึ่งเป็น *E. coli* K12 ที่ใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับการถ่ายทอดยีนดื้อยาอย่างกว้างขวาง โดยใช้การดื้อต่อ AMP ในการคัดเลือก transconjugants เพราะ *Salmonella* ทุกตัวที่เลือกมาทดสอบดื้อต่อ AMP และจากประสบการณ์ของคณะผู้วิจัย การคัดเลือก

transcongugants ที่มี β-lactamase gene ทำได้ง่ายกว่ายีนชนิดอื่น *Salmonella* ที่สามารถถ่ายทอดการดื้อต่อ AMP ไปยัง *E. coli* MG1655rif^r ได้นั้นแสดงว่ามี β-lactamase gene อยู่บน plasmid จากผลการวิจัยพบว่า ยีนที่ควบคุมการดื้อ BKC และ CHX ของ *Salmonella* ไม่อยู่บน plasmid ในขณะที่ยีนควบคุมการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ AP, CHPC, GEN, TET และ TRI อยู่บน plasmid ซึ่งสนับสนุนว่า กลไกสำคัญของการดื้อต่อ BKC และ ยาปฏิชีวนะในเชื้อที่ทดสอบนี้ไม่ใช่กลไกเดียวกัน ซึ่งที่ผ่านมา พบยีนควบคุมการดื้อ BKC ที่อยู่บน plasmid ใน *Staphylococcus aureus* (36) และ *Listeria monocytogenes* (25) ยังไม่มีรายงานใน *Salmonella* ถึงแม้ว่าผลการทดสอบนี้ไม่สามารถยืนยันได้ด้วยการทำ plasmid แต่การพบ plasmid ใน *E. coli* ที่เป็น transconjugants แสดงให้เห็นว่ามีการถ่ายทอด plasmid เกิดขึ้นจริง

ระยะที่ 5 ศึกษาว่าการสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามต่อยาปฏิชีวนะได้หรือไม่ (Exposure experiment)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีเชื้อหลายชนิดที่สามารถปรับตัวและลดความไวต่อยา BKC ได้ เช่น *Serratia marcencens, Pseudomonas fluorescens* (55) รวมถึง *E. coli* และ *Salmonella* ด้วยดังที่กล่าวมาแล้ว จากการศึกษา adaptation และ deadaptation ต่อ BKC และ CHX ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการให้เชื้อสัมผัสยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะทำให้เชื้อมีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น (6, 18) ซึ่งการดื้อนี้ยังคงอยู่ (stable) แม้ว่าจะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาฆ่าเชื้อทั้ง 2 หลายๆ generations แต่ในขณะที่ การวิจัยของ Gradel et al (2005) ไม่พบว่าการสัมผัสกับยาฆ่าเชื้อทำให้เชื้อมีค่า MIC เพิ่มขึ้น สำหรับการวิจัยครั้งนี้พบว่า การให้เชื้อที่มีค่า MIC ต่อ ยาฆ่าเชื้อ BKC และ CHX ต่ำสัมผัสยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 ในระดับ sublethal เชื้อสามารถที่จะปรับตัวให้เจริญเติบโตในความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อที่สูงกว่าค่า MIC โดยค่า MIC ของเชื้อหลังสัมผัสนี้สูงกว่าค่า MIC ของเชื้อดั้งเดิมอย่างน้อย 4 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gradel et al 2005 และ Russell (1998) (50) ซึ่ง Langsrud (1998) พบว่า ค่า MIC ที่สูงขึ้นนี้ยังคงอยู่แม้ว่าเชื้อจะไม่ได้สัมผัส BKC หรือ CHX เป็นเวลานาน (24) ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงว่า *Salmonella* มีความสามารถในการปรับตัวเพื่ออยู่รอดได้ในที่ที่มียาฆ่าเชื้อ ซึ่งสะท้อนว่าเชื้อเหล่านี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีการตกค้างของยาฆ่าเชื้อ

จากการที่ให้ SA030 สัมผัสกับ BKC แล้วได้ mutant ที่มีความไวต่อ BKC ลดลง โดยที่มีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะ CHP และ ERY สูงขึ้นด้วยแสดงว่ามีการดื้อข้ามเกิดขึ้นระหว่างยาฆ่าเชื้อ BKC กับยาปฏิชีวนะ CHP และ ERY การกลายพันธ์ของยีนที่ทำให้เกิดการดื้อข้ามนี้อยู่บนโครโมโซม เพราะ SA030 ไม่มี plasmid นอกจากนี้ SA030 หลังสัมผัสไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน cyclohexane และ CCCP ไม่มีผลต่อค่า MIC ต่อ BKC CHP และ ERY ของ mutant ดังนั้น AcrAB และระบบ Efflux system ที่ใช้พลังงานจาก PMF ไม่ได้เป็นกลไกของการดื้อยาใน

เชื้อนี้ ซึ่ง Braoudaki and Hilton (2005) พบว่า การที่ให้ *S.* Enterica, *S.* Typhimurium และ *S.* Virshow สัมผัสกับ BKC ได้ mutants ที่มีการแสดงออกของ active effflux มากกว่า 1 ระบบ รวมทั้งทำให้ cell surface hydrophobicity เพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจัยทั้ง 2 รวมกันอาจเป็นสาเหตุของการดื้อข้าม โดยที่ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ lipopolysaccharide ของผนังเซลล์ ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่า cell hydrophobicity และ cell surface charge เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ *P. aeruginosa* ดื้อต่อ BKC เช่นกัน (33) ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนว่ามีปัจจัยหรือกลไกหลายรูปแบบที่มีผลต่อการลดความไวต่อยาฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงควรศึกษาการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นและส่งผลให้ SA030 หลังสัมผัสกับ BKC มีค่า MIC สูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นกลไกดื้อข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ (ถ้ามี) ที่ยังไม่มีการศึกษา แต่ก็อาจเป็นกลไกที่การวิจัยครั้งนี้ครอบคลุมไม่ถึงก็ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินไปตามที่วางไว้และแผนบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ เพื่อให้เข้าโดยง่ายจึงสรุปผลการวิจัยตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยดังนี้

1.เพื่อเก็บข้อมูลเกี่ยวกับความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *S. enterica* และ *E. coli* ที่แยกได้จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคในประเทศไทย

การวิจัยครั้งนี้ได้เก็บข้อมูลความไวต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* และ *E. coli* จากการที่ ค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อ BKC และ CHX รวมทั้งโลหะหนัก $CuSO_4$ และ $ZnCl_2$ ของ *Salmonella* และ *E. coli* เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่แสดงว่า เชื้อส่วนใหญ่ยังไม่พัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและโลหะหนักและการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและโลหะหนักทั้ง 4 ชนิดนี้ยังไม่เป็นปัญหาที่สำคัญในขณะนี้ การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับค่า MIC ต่อ BKC ($P< 0.001$) และ CHX ($P < 0.001$)

2. เพื่อศึกษากลไกที่เป็นไปได้ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ

ใน *Salmonella* และ *E.coli* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ไม่พบการแสดงออกของระบบ AcrAB TolC ซึ่งมีรายงานว่าเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมาก่อน รวมทั้งไม่มีการแสดงออกของระบบที่ใช้พลังงานแบบเดียวกัน (Proton Motif Force) ที่มีผลต่อการลดความไวต่อ BKC และ CHX ดังนั้นการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีสาเหตุมาจากกลไกอื่นๆ ส่วนการลดความไวต่อ BKC และ CHX อาจเป็นผลมาจากการแสดงออกของระบบที่ใช้พลังงานในรูปแบบอื่นๆ รวมถึงอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงประจุและ hydrophobicity ของผนังเซลล์ด้านนอกก็ได้ อย่างไรก็ตาม เชื้อเหล่านี้อาจมีความไวต่อยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 ต่ำอยู่แล้ว (intrinsic resistance) ส่วนยีน *gacE1* และ *gacEΔ1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการแสดงออกของโปรตีน QacE และ QacEΔ1 เป็นระบบ efflux system ที่ขับออกทั้ง BKC และยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียแกรมลบและบวกไม่เป็นกลไกสำคัญของการลดการลดความไวต่อ BKC ใน *Salmonella* และยีน *gacEΔ1* ไม่จำเป็นต้องอยู่บน class I integron ดังนั้นกลไกการดื้อยาข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ (ถ้ามี) อาจเป็นกลไกที่ยังไม่มีการศึกษาหรือกลไกอื่นๆ ที่การวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ครอบคลุมถึง นอกจากนี้ การสัมผัส BKC และ CHX ทำให้ *Salmonella* มีค่า MIC ต่อยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 สูงขึ้นและค่า MIC นี้ยังคงอยู่แม้ว่าจะไม่มีการสัมผัสระยะหนึ่งแสดงว่า อาจมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นบนโครโมโซม โดยการกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการดื้อข้ามไปยังยาปฏิชีวนะ คือ CHP และ ERY สรุปได้ว่าการดื้อยาข้ามระหว่างยาฆ่าเชื้อและยา

ปฏิชีวนะเกิดขึ้นได้จริง ดังนั้นการใช้ยาฆ่าเชื้ออย่างไม่เหมาะสมและรอบคอบอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและส่งผลให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้

3. เพื่อทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียชนิดอื่น

Salmonella ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ โดยไม่พบการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการลดความไวต่อ BKC และ CHX ซึ่งแสดงว่า การลดความไวต่อ BKC และ CHX อาจเป็น intrinsic resistance หรืออยู่บนโครโมโซม ไม่สามารถถ่ายทอดได้พร้อมกับการถ่ายทอด plasmid

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

โดยสรุป การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปศึกษาวิจัยต่อเนื่อง ดังนั้นเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดจึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตและที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. การศึกษาและเก็บข้อมูลความไวต่อยาฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงและเป็นการเฝ้าระวังการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อ โดยการศึกษาไม่ควรจำกัดอยู่ที่แบคทีเรียก่อโรคเท่านั้น

2. การศึกษาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อใน *Salmonella* ที่แยกได้จากโรงงานฆ่าสัตว์และเนื้อสัตว์ เพราะโรงงานฆ่าสัตว์เป็นสถานที่ที่มีการใช้ยาฆ่าเชื้อตลอดเวลา โดยใช้ขนาดที่ต่ำเพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและมีโอกาสพบการตกค้างของยาฆ่าเชื้อได้บ่อย จึงเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อได้ เชื้อเหล่านั้นอาจปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ สามารถปัญหาได้เช่นเดียวกับเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ

3. การศึกษาการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามในเชื้อชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ เพราะในปัจจุบันมีการใช้ยาฆ่าเชื้ออย่างกว้างขวางทั้งในคนและสัตว์ เช่น แบคทีเรียฉวยโอกาส แบคทีเรียที่ก่อโรคผิวหนัง แบคทีเรียที่มักเป็นสาเหตุของ nosocomial infections เป็นต้น

4. ควรมีการศึกษาเพื่อกำหนดค่าความเข้มข้นที่สามารถใช้เป็น Breakpoints สำหรับการระบุว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยาฆ่าเชื้อ ทั้งนี้เพราะในปัจจุบันยังไม่มีค่า breakpoints ของยาฆ่าเชื้อที่กำหนดแน่นอน

5. จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่าการสัมผัสต่อ BKC และ CHX ทำให้ Salmonella มีค่า MIC สูงขึ้นอย่างถาวร แสดงว่ามีการแสดงออกของกลไกที่ยังไม่ทราบ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมว่า กลไกนี้คืออะไร ซึ่งจะเป็นการแสดงให้เห็นว่า การดื้อต่อยาฆ่าเชื้อเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

6. การพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อดื้อยากับค่า MIC ต่อ BKC ที่สูง ดังที่กล่าวมาแล้วว่า ความสัมพันธ์นี้นี้ไม่สามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันว่ามีการดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ทดสอบเกิดขึ้นจริง แต่เป็นข้อมูลสนับสนุนที่น่าสนใจเกี่ยวกับธรรมชาติในการพัฒนาการดื้อยาและความพยายามในการมีชีวิต

รอดของเชื้อ ควรมีศึกษาความสัมพันธ์นี้อย่างรอบคอบ เพื่อให้ได้ความจริงที่ถูกต้อง เพราะจะเป็นประเด็นสำคัญของการควบคุมการใช้ยาฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ในการนำไปใช้

การวิจัยครั้งนี้เป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อใน *Salmonella* และ *E. coli* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การดื้อข้ามระหว่างยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ ข้อมูลความไวต่อยาฆ่าเชื้อของ *Salmonella* และ *E. coli* ที่แยกได้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นองค์ความรู้ใหม่ ซึ่งเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาของการดื้อยาฆ่าเชื้อที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน สามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศไทย เป็นการยกระดับระบบการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศอีกทางหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้ทราบถึงสถานการณ์ที่แท้จริงของปัญหาการดื้อยาฆ่าเชื้อในแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อจำกัดของจำนวนเชื้อและชนิดของยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย ผลการวิจัยครั้งนี้จึงไม่ใช่คำตอบของทุกๆ คำถามที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อ รวมทั้งยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกด้วย

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังเชื้อที่ไวต่อยาได้ การสัมผัสยาฆ่าเชื้อในระดับต่ำสามารถทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อยาฆ่าเชื้อได้ ข้อมูลนี้เป็นหลักฐานสนับสนุนการวางมาตรการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้ออย่างรอบคอบและเหมาะสม เพื่อลดปัญหาเชื้อดื้อยา สามารถนำความรู้ที่ได้ไปเผยแพร่ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ ผู้ผลิตอาหารสัตว์ และนักวิชาการที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภค รวมทั้งหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตอาหารที่มาจากสัตว์และการสาธารณสุข นอกจากนี้ เทคโนโลยีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยเป็นระดับอณูชีววิทยาที่ทันสมัย สามารถนำมาถ่ายทอดให้กับเจ้าหน้าที่ของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจ เป็นการพัฒนาความรู้ให้กับบุคลากร

ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต เช่น การเฝ้าระวังเปลี่ยนแปลงการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อของ *Salmonella* การดื้อต่อยาฆ่าเชื้อใน *Salmonella* ที่แยกได้จากโรงงานฆ่าสัตว์และเนื้อสัตว์ การดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและการดื้อข้ามในเชื้อชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์

ผลงานที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้สามารถตีพิมพ์ได้ทั้งในวารสารวิชาการระดับประเทศและนานาชาติ ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการเตรียม manuscript ซึ่งเป็นการเผยแพร่ชื่อเสียงและความน่าเชื่อถือทางด้านการศึกษาเชื้อดื้อยาให้กับประเทศ สามารถแสดงให้ประเทศคู่ค้าเห็นว่าประเทศไทยมีการศึกษาวิจัยและการเฝ้าระวังปัญหาเชื้อดื้อยาอย่างจริงจัง มีความพร้อมทางด้านวิทยาศาสตร์และงานวิจัยที่สนับสนุนความปลอดภัยจากเชื้อดื้อยาที่ไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว จึงเป็นการส่งเสริมศักยภาพในการแข่งขันในฐานะประเทศผู้ส่งออกอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. **Aarestrup, F. M., and H. Hasman.** 2004. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. Vet. Microbiol. **100:**83-9.
2. **Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, and R. Aono.** 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **63:**1428-33.
3. **Bangtrakulnonth, A., S. Pornrungwong, C. Pulsrikarn, S. Boonmar, and K. Yamaguchi.** 2006. Recovery of *Salmonella* using a combination of selective enrichment media and antimicrobial resistance of isolates in meat in Thailand. Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health **37:**742-6.
4. **Baucheron, S., H. Imberechts, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2002. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204. Microb. Drug Resist. **8:**281-9.
5. **Beinlich, K. L., R. Chuanchuen, and H. P. Schweizer.** 2001. Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. **198:**129-134.
6. **Braoudaki, M., and A. C. Hilton.** 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. J. Clin. Microbiol. **42:**73-8.
7. **Braoudaki, M., and A. C. Hilton.** 2005. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. Int. J. Antimicrob. Agents **25:**31-7.
8. **Carter, G. R., and J. R. Cole.** 1990. Enterobacteria, p. 107-128, Diagnostic Procedures in Bacteriology and Mycology

Academic Press, Inc., CA, USA.

9. **Chuanchuen, R., K. Beinlich, T. T. Hoang, A. Becher, R. R. Karkhoff-Schweizer, and H. P. Schweizer.** 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps:

exposure of a susceptible strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. Antimicrob. Agents Chemother. **45:**428-432.

10. **Chuanchuen, R., R. R. Karkhoff-Schweizer, and H. P. Schweizer.** 2003. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely due to efflux. Am. J. Infect. Control **31:**124-127.
11. **Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. P. Schweizer.** 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. J. Bacteriol. **184:**5036-5044.
12. **Elkins, C. A., and H. Nikaido.** 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. J. Bacteriol. **184:**6490-6498.
13. **Gilbert, P., and A. J. McBain.** 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Rev. **16:**189-208.
14. **Gradel, K. O., L. Randall, A. R. Sayers, and R. H. Davies.** 2005. Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of mar. Vet. Microbiol. **107:**127-38.
15. **Grkovic, S., M. H. Brown, N. J. Roberts, I. T. Paulsen, and R. A. Skurray.** 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. J. Biol. Chem. **273:**18665-73.
16. **Hasman, H., and F. M. Aarestrup.** 2002. *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**1410-6.
17. **Heath, R. J., N. Su, C. K. Murphy, and C. O. Rock.** 2000. The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases FabI and FabL from *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **275:**40128-40133.
18. **Joynson, J. A., B. Forbes, and R. J. Lambert.** 2002. Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. J. Appl. Microbiol. **93:**96-107.

19. **Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **37:**1086-1094.

20. **Kazama, H., H. Hamashima, M. Sasatsu, and T. Arai.** 1999. Characterization of the antiseptic-resistance gene *qacE* delta 1 isolated from clinical and environmental isolates of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* non-O1. FEMS. Microbiol. Lett. **174:**379-84.

21. **Kazama, H., H. Hamashima, M. Sasatsu, and T. Arai.** 1998. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacE* delta 1 in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **159:**173-8.

22. **Keyhani, J., E. Keyhani, F. Attar, and A. Haddadi.** 2006. Sensitivity to detergents and plasmid curing in *Enterococcus faecalis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **33:**238-42.

23. **Kucken, D., H. Feucht, and P. Kaulfers.** 2000. Association of *qacE* and *qacE*Delta1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **183:**95-8.

24. **Langsrud, S., and G. Sundheim.** 1998. Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. J. Appl. Microbiol. **85:**1006-12.

25. **Lemaitre, J. P., H. Echchannaoui, G. Michaut, C. Divies, and A. Rousset.** 1998. Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. J. Food Prot. **61:**1459-64.

26. **Mangalappalli-Illathu, A. K., and D. R. Korber.** 2006. Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. Antimicrob. Agents Chemother. **50:**3588-96.

27. **McDonnell, G., and A. D. Russell.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. **12:**147-79.

28. **McDonnell, G., and A. D. Russell.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. **12:**147-179.

29. **McMurry, L. M., M. Oethinger, and S. B. Levy.** 1998. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **166:**305-309.

30. **McMurry, L. M., M. Oethinger, and S. B. Levy.** 1998. Triclosan targets lipid synthesis. Nature **394**:531-532.

31. **Michael, G. B., P. Butaye, A. Cloeckaert, and S. Schwarz.** 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. Microbes Infect **8**:1898-914.

32. **Moreira, M. A., J. A. Oliveira, L. M. Teixeira, and C. A. Moraes.** 2005. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. Vet. Microbiol. **109**:75-81.

33. **Nagai, K., T. Murata, S. Ohta, H. Zenda, M. Ohnishi, and T. Hayashi.** 2003. Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain. Microbiol. Immunol. **47**:709-15.

34. **Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple antibiotic-resistant (Mar) mutants. J. Bacteriol. **178**:306-308.

35. **Padungtod, P., and J. B. Kaneene.** 2006. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. Int. J. Food Microbiol. **108**:346-54.

36. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, T. G. Littlejohn, B. A. Mitchell, and R. A. Skurray.** 1996. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **93**:3630-5.

37. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. **60**:575-608.

38. **Paulsen, I. T., T. G. Littlejohn, P. Radstrom, L. Sundstrom, O. Skold, G. Swedberg, and R. A. Skurray.** 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:761-8.

39. **Paulsen, I. T., and R. A. Skurray.** 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes--an analysis. Gene **124**:1-11.

40. **Paulsen, I. T., R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Saier, R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg, and L. L. Grinius.** 1996. The SMR family: a novel family of

multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. Mol.Microbiol. **19:**1167-1175.

41. **Payne, D. J., W. H. Miller, V. Berry, J. Brosky, W. J. Burgess, E. Chen, W. E. DeWolf, Jr., A. P. Fosberry, R. Greenwood, M. S. Head, D. A. Heerding, C. A. Janson, D. D. Jaworski, P. M. Keller, P. J. Manley, T. D. Moore, K. A. Newlander, S. Pearson, B. J. Polizzi, X. Qiu, S. F. Rittenhouse, C. Slater-Radosti, K. L. Salyers, M. A. Seefeld, M. G. Smyth, D. T. Takata, I. N. Uzinskas, K. Vaidya, N. G. Wallis, S. B. Winram, C. C. K. Yuan, and W. F. Huffman.** 2002. Discovery of a Novel and Potent Class of FabI-Directed Antibacterial Agents. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**3118-3124.

42. **Poole, K.** 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol. **92:**55S-64S.

43. **Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li, and T. Nishino.** 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* effux operon in *nfxB*-type multidrug resistant strains. Mol. Microbiol. **21:**713-724.

44. **Randall, L. P., S. W. Cooles, L. J. Piddock, and M. J. Woodward.** 2004. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. J. Antimicrob. Chemother. **54:**621-7.

45. **Randall, L. P., S. W. Cooles, A. R. Sayers, and M. J. Woodward.** 2001. Association between cyclohexane resistance in *Salmonella* of different serovars and increased resistance to multiple antibiotics, disinfectants and dyes. J. Med. Microbiol. **50:**919-24.

46. **Randall, L. P., and M. J. Woodward.** 2001. Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. Appl. Environ. Microbiol. **67:**1190-7.

47. **Rosenberg, E. Y., D. Ma, and H. Nikaido.** 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. J. Bacteriol. **182:**1754-1756.

48. **Russell, A. D.** 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. J. Hosp. Infect. **43 Suppl:**S57-68.

49. **Russell, A. D.** 2001. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. Am. J. Infect. Control **29:**259-261.

50. **Russell, A. D.** 1998. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics and biocides. Prog. Med. Chem. **35:**133-97.

51. **Russell, A. D., and I. Chopra.** 1996. Understanding antibacterial action and resistance, 2nd ed. Ellis Horwood, New York.

52. **Russell, A. D., and G. McDonnell.** 2000. Concentration: a major factor in studying biocidal action. J. Hosp. Infect. **44:**1-3.

53. **Russell, A. D., U. Tattawasart, J.-Y. Maillard, and J. R. Furr.** 1998. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. Antimicrob. Agents Chemother. **42:**2151.

54. **Sasatsu, M., K. Shimizu, N. Noguchi, and M. Kono.** 1993. Triclosan-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet **341:**756.

55. **Simoes, M., M. O. Pereira, and M. J. Vieira.** 2005. Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes. Water Res. **39:**478-86.

56. **To, M. S., S. Favrin, N. Romanova, and M. W. Griffiths.** 2002. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **68:**5258-64.

57. ศศิ เจริญพจน์ 2000 ยาต้านจุลชีพเพื่อการเลี้ยงสัตว์และความปลอดภัยของผู้บริโภค ใน "ยาสัตว์ตกค้าง ความปลอดภัยทางอาหารและการคุ้มครองผู้บริโภค" โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 96-117

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Brilliant Green Agar (BGA)

Proteose Peptone No. 3	10.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Lactose	10.0 g
Saccharose	10.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	20.0 g
Brilliant Green	12.5 mg
Phenol Red	0.08 g

Buffered Peptone Water (BPW)

Peptone	10.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	3.5 g
Monopotassium Phosphate	1.5 g

Cary-Blair Medium (pH 8.4±0.2)

Disodium hydrogen phosphate	1.0g
Sodium thioglycollate	1.5g
Sodium chloride	5.0g
Calcium chloride	0.09g
Agar	5.6g

Endo agar (pH 7.5±0.2)

Peptone	10.0 g
Lactose	10.0 g
Di-potassium phosphate	3.5g
Sodium sulphate	2.5g
Agar	10.0g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MacConkey Agar

Peptone	17.0 g
Proteose Peptone	3.0 g
Lactose	10.0 g
Bile Salts No. 3	1.5 g
Sodium Chloride .	5.0 g
Agar	13.5 g
Neutral Red	0.03 g
Crystal Violet	1.0 mg

Motility-Indole-Lysine (MIL) Medium

Peptone	10.0 g
Pancreatic Digest of Casein	10.0 g
Yeast extract	3.0 g
L-Lysine HCl	10.0 g
Dextrose	1.0 g
Ferric Ammonium Citrate	0.5 g
Bromcresol Purple	0.02 g

Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium

Tryptose	4.59 g
Casein Hydrolysate (acid)	4.59 g
Sodium Chloride	7.34 g
Monopotassium Phosphate .	1.47 g
Magnesium Chloride (anhydrous)	10.93 g
Malachite Green Oxalate	37.0 mg
Agar	2.7 g

Mueller Hinton Agar (MHA)

Beef extract powder	2.0 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	17.0g

Rappaport-Vassiliadis Broth (RV)

Pancreatic Digest of Casein	4.54 g
Sodium Chloride	7.2 g
Monopotassium Phosphate	1.45 g
Magnesium Chloride (anhydrous)	13.4 g
Malachite Green Oxalate	36.0 mg

Skim milk 10%

Skim milk	10.0 g

Adjust Deionized Water to 100 ml

เตรียมโดยละลายส่วนประกอบ แล้ว autoclave ที่110 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน10 นาที

Swarm agar

Peptone	5.0 g
Tryptone	3.0 g
Beef Extract	3.0 g
Dextrose	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Dipotassium Phosphate	2.5 g
Agar	7 g

Tetra thionate Broth (TTB)

Proteose Peptone	2.5 g
Pancreatic Digest of Casein	2.5 g
Oxgall	1.0 g
Sodium Thiosulfate	30.0 g
Calcium Carbonate	10.0 g

Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)

Beef Extract	3.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Pancreatic Digest of Casein	15.0 g
Proteose Peptone No. 3	5.0 g
Dextrose	1.0 g
Lactose	10.0 g
Sucrose	10.0 g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ferrous Sulfate	0.2 g
Sodium Chloride	5.0 g
Sodium Thiosulfate	0.3 g
Agar	12.0 g
Phenol Red	24.0 mg

Tryptic Soy Agar

Pancreatic Digest of Casein	15.0 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g

Xylose Lysine Desoxycholate (XLD Agar)

Xylose	3.75 g
L-Lysine	5.0 g
Lactose	7.5 g
Saccharose	7.5 g
Sodium Chloride	5.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Phenol Red	0.08 g
Sodium Desoxycholate	2.5 g
Sodium Thiosulfate	6.8 g
Ferric Ammonium Citrate	0.8 g
Agar	15.0 g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัตินักวิจัยและคณะ

ประวัติผู้วิจัยหลัก

ภาษาอังกฤษ Dr. Rungtip Chuanchuen
ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ระดับ 7
ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์
ที่อยู่ปัจจุบัน 95/136 หมู่ 1 ต.บ้านใหม่ อ.สามพราน จ.นครปฐม 73110
โทรศัพท์ 0-2805-8027

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
Colorado State University	Ph.D.	Microbiology (Bacterial genetics)	2547
Colorado State University	M.S.	Animal sciences (Food safety)	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	DVM.	สัตวแพทยศาสตร์	2536

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์และเผยแพร่

1. **Chuanchuen, R.,** W. Klomklew, B. Nakawej, S. Nithiuthai, R. Platt, and B. Prechatangkit. 1993. Efficacy of an ELISA test kit for canine heartworm antigen detection. Thai J. Vet. Med. 23:19-30. (In Thai with English abstract)

2. Saitanu, K., **R. Chuanchuen**, S. Nuanuansuwan, C. Koowatananukul, and V. Rugkhaw. 1996. Microbiological quality of raw cow milk. Thai J. Vet. Med. 26:193-213. (In Thai with English abstract)

3. Saitanu, K., **R. Chuanchuen**, S. Nuanuansuwan, C. Koowatananukul, and V. Rugkhaw. 1996. Fat protein lactose total solids and solid not fat in raw cow milk. Thai J. Vet. Med. 26:253-260. (In Thai with English abstract).

4. **Chuanchuen, R.**, K. Beinlich, T. T. Hoang, A. Becher, R. R. Karkhoff-Schweizer, and H. Schweizer. 2001. Cross-Resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 428-432.

5. Beinlich, K., **R. Chuanchuen**, and H. Schweizer. 2001. Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 198:129-34.

6. Schweizer, H. and **R. Chuanchuen**. 2001. Small broad-host-range *lacZ* operon fusion vector with low background activity. Biotechniques 31:1258-1262.

7. **Chuanchuen, R.**, C. T. Narasaki, and H. Schweizer. 2002. The MexJK efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. J. Bacteriol.184: 5036-5044.

8. **Chuanchuen, R.**, C. T. Narasaki, and H. Schweizer. 2002. Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. Biotechniques 33:760-763.

9. **Chuanchuen, R.** and H. Schweizer. 2003. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely due to efflux. Am. J. Infect.Control 31:124-127. Impact factor: 2.055

10. **Chuanchuen, R.**, C. Koowatananukul, V. Rugkhaw and T. Damrongwatanapokin. 2004. *In vitro* effects of sodium hypochlorite, trisodium phosphate, and organic acids on decontamination of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken skin. Thai J. Vet. Med. 34 (4):33-43. (In Thai with English abstract)

11. **Chuanchuen, R.,** J.B. Gaynor and H.P. Schweizer. 2005. Molecular Charaterization of MexL, the transcriptional repressor of the the *mexJK* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(2):1844-1851.

12. **Chuanchuen, R.,** N. Gotoh and H.P. Schweizer. 2005. Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. Antimicrob. Agents Chemother. 49(2):2133-2136.

13. **Chuanchuen, R.,** and H.P. Schweizer. 2007. Global transcriptional responses to triclosan exposure in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. Submitted

BOOK CHATERS, EXPOSITORY AND REVIEW ARTICLES

1. **รุ่งทิพย์ ชวนชื่น** เกรียงศักดิ์ สายธนู "คุณภาพน้ำนม" ประมวลความรู้เกี่ยวกับโคนม พ.ศ. 2539 หน้า 245-255

2. **Chuanchuen,** R. and H.P. Schweizer. 2004. Multidrug Efflux Systems: A mechanism of resistance to multidrug in bacteria. Thai J. Vet. Med. 34 (4):2004. (In Thai with English abstract)

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

1. การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ MexXY และ OpmG ในการขับออกยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในซูโดโมนาส แอรูจิโนซ่า สิงหาคม 2548 –กรกฎาคม 2550
2. การเฝ้าระวังการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella spp.* และ *Escherichia coli* ในสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ปีงบประมาน 2549
3. การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทย ปีงบประมาน 2550

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) สพ.ญ. ดร. พรเพ็ญ พัฒนโสภณ
(ภาษาอังกฤษ) Dr. Pornpen Pathanasophon
เพศ หญิง อายุ 52 ปี
สถานภาพสมรส ☐ โสด ☒ สมรส

2. การทำงาน
ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) ...นายสัตวแพทย์ 8 วช.
สถานที่ทำงาน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร
จังหวัดกรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10900
โทรศัพท์ 02-5798908-14 ต่อ 404 โทรสาร 02-5798918
e-mail : pornpen53@hotmail.com

3. ที่อยู่ (ที่บ้าน) บ้านเลขที่ 9 ซอย 1 หมู่บ้านสวนสน ซอย รามคำแหง 60 แขวงหัวหมาก
เขต บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240
โทรศัพท์ 02-7352853 โทรสาร -
e-mail pornpen53@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา
4.1 ปริญญาตรีสาขา สัตวศาสตร์ สถาบัน มหาวิทยาลัย.เกษตรศาสตร์
ปีที่จบ 1976
ปริญญาตรีสาขา สัตวแพทยศาสตร์ สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ที่จบ 1978
4.2 ปริญญาเอกสาขา สัตวศาสตร์ สถาบัน Tokyo University of Agriculture
ปีที่จบ 1996
4.3 อื่นๆ (ระบุ)
สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1)
Veterinary Microbiology

5. ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (โปรดระบุทั้งชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปีที่ตีพิมพ์ ฉบับที่ เล่มที่ เลขหน้า และค่า impact factor)

1.**Pathanasophon, P.,** Tanticharoenyos, T. and Sawada, T. 1994. Physiological characteristics, antimicrobial susceptibility and serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Vet. Microbial. 39:179-185.

2. **Pathanasophon, P.,** Sawada, T. and Tanticharoenyos, T. 1995. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 24:195-199.

3. **Pathanasophon, P.,** Sawada, T., Pramoolsinsap, T. and Tanticharoenyos, T. and 1996. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrated in ducks. Avian Patho. 25:705-719.

4. **Pathanasophon, P.,** Phuektes, P., Tanticharoenyos, T., Narongsak, W. and Sawada, T. 2002. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 31:267-270.

5. Songserm, T., Viriyarampa, S., Sae-Heng, N., Chamsingh, W., Bootdee, O. and **Pathanasophon, P.** 2003. *Pasteurella multocida*-associated sinusitis in Khaki Campbell ducks (Anas platyrhynchos). Avian Dis. 47:649-655.

6. Homhuan, A., **Pathanasophon, P.,** Crommelin, D.JA., Jiskoot, W., Kersten, G.FA. and Prakongpan, S. 2004. Characterization and protection in mice of outer membrane proteins from Pasteurella multocida A:1 incorporated in lipid vaccine delivery systems. ScienceAsia 30:231-237.

6. ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding ตำรา ฯลฯ)

1. Meramitmansook, **P., Pathanasophon,** P., Tungtrakarnpong, N., Siriwan, C. Neramitmansook, W. and Dumrongsiri, C. 1983. Moraxella bovis from cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. Proceeding, 10th Annual Vet. Conference, Thai Vet. Med. Association. 78-87.

2. **Pathanasophon, P.,** Mepeuj, Y., Tanticharoenyos, T. Akobole, L., Meramitmansook, P. and Sutherat, S. 1984. Swine erysipelas: cases report.. J. Thai Vet. Med. Assoc. 35 (2): 179-184.

3. **Pathanasophon, P.,** Tanticharoenyos, T. and Pipitkul, S. 1984. A survey for the prevalence of swine erysipelas. J. Thai Vet. Med. Assoc. 35 (2): 171-177.

4. **Pathanasophon, P.,** Tanticharoenyos, T., Pipitkul, S. and Praikanahok, N. 1985. A study on serotypes of *Pasteurella multocida*. J. Thai Vet. Med. Assoc. 36 (4): 385-393.

5. **Pathanasophon, P.,** Sukonthaman, A. Smitanon, J., Methiyapun, S., Chirathaworn, C. and Santivatr, W. 1987. *Streptococcus suis* meningitis in piglets. Their serotypes and zoonotic significance. J. Thai Vet. Med. Assoc. 38 (1): 41-52.

6. **Pathanasophon, P.,** Tanticharoenyos, T. and Pramoolsinsap. T., 1990. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. 41 (3): 101-106.

7. **Pathanasophon, P.,** Tanticharoenyos, T. and Morozumi, T. 1991.Characteristics and antimicrobial susceptibilities of *Pasteurella* (*Moraxella*) *anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Thai J. Hlth. Resch. 5(1) 55-61.

8. **Pathanasophon, P.,** Tanticharoenyos, T. and Morozumi, T. 1991. Identification *Pasteurella anatipestifer* by APIZYM. Thai J. Vet. Med. 21(4):235-243.

9. Tanticharoenyos, T. **Pathanasophon, P.** and Sawada, T. **1993.** Certain serotypes of *Pasteurella multocida* in poultry. Thai J. Hlth. Resch. 7(1) 21-26.

10. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T. and Sawada, T. 1994. Physiological characteristics, antimicrobial susceptibility and serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Vet. Microbial. 39:179-185.

11. Mulika, L., **Pathanasophon, P.,** Trongwongsa, L. and Tantichoaroenyos, T. 1996. A case report of an outbreak of concurrent aspergillosis and anatipestifer infection in Babary ducks. Thai J. Vet. Med. 25(1): 67-72.

12. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T. and Tanticharoenyos, T. 1995. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 24:195-199.

13. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T., Pramoolsinsap, T. and Tanticharoenyos, T. and 1996. Experiments on inactivated new duck syndrome vaccine preparation. Proceeding, 15th annual livestock conference. 96-108.

14. **Pathanasophon,P.**, Tanticharoenyos, T. and Sawadw, T. 1996. Immunogenic component of *Riemerella anatipestifer*. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47 (1): 13-20.

15. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T., Pramoolsinsap, T. and Tanticharoenyos, T. and 1996. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrated in ducks. Avian Patho. 25:705-719.

16. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, P. and Satuwpng, I. 1998. Antimicrobial drug resistances of Salmonella species and *Escherichia coli* in food animals. J. Thai Vet. Med. Assoc. 49 (1-3):11-23.

17. **Pathanasophon, P.,** Woraracha, A. and Mulika, L. 2001. Serotypes of *Pasteurella multocida* isolates from swine and dermonecrotic toxin gene detection by PCR. J. Thai Vet. Med. Assoc. 52 (3): 33-41.

18. **Pathanasophon, P.,** Phuektes, P., Tanticharoenyos, T., Narongsak, W. and Sawada, T. 2002. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 31:267-270.

19. Songserm, T., Viriyarampa, S., Sae-Heng, N., Chamsingh, W., Bootdee, O. and **Pathanasophon, P.** 2003. *Pasteurella multocida*-associated sinusitis in Khaki Campbell ducks (Anas platyrhynchos). Avian Dis. 47:649-655.

20. Homhuan, A., **Pathanasophon, P.,** Crommelin, D.JA., Jiskoot, W., Kersten, G.FA. and Prakongpan, S. 2004. Characterization and protection in mice of outer membrane proteins from Pasteurella multocida A:1 incorporated in lipid vaccine delivery systems. ScienceAsia 30:231-237.

7. รางวัลที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

1. รางวัลดีเด่น เรื่อง " การทดลองผลิตวัคซีนนิวคัดซินโดรมชนิดเชื้อตาย " การประชุมวิชาการ ปศุสัตว์ครั้งที่ 15 ประจำปี 2539 ณ โรงแรมอมารี วอเตอร์เกท ของกรมปศุสัตว์

2. รางวัลชมเชย สาขา สัตวแพทยศาสตร์ เรื่อง " Immunogenic component of *Riemerella anatipestifer* " ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 34 ประจำปี 2539 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน

ประวัติผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ นายสัตวแพทย์ ดร.ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ
DR. SUPHACHAI NUANUALSUWAN

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

3. ที่ทำงาน ภาควิชาสัตวแพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังต์ อำเภอปทุมวัน กรุงเทพมหานคร
โทรศัพท์ (02) 215-9877-9 โทรสาร (02) 215-9877

4. E-Mail Address Suphachai.N@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง เหรียญรางวัล)
(Doctor of Veterinary Medicine: DVM)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2536

5.2 ปริญญาโทอายุรศาสตร์ป้องกันทางสัตวแพทย์
(Master of Preventive Veterinary Medicine: MPVM)
University of California, Davis U.S.A. พ.ศ. 2540

5.3 ปริญญาเอกสาขาวิทยาศาตร์การอาหาร
(Doctor of Philosophy in Food Science: PhD)
University of California, Davis U.S.A. พ.ศ. 2545

6. สาขาชำนาญพิเศษ ความปลอดภัยอาหารทางจุลชีววิทยา ไวรัสที่ติดต่อทางอาหารและน้ำ

7. ประสพการณ์การบริหารงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย แผนรับรองความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์เพื่อการบริโภคและการส่งออกเนื้อไก่

7.2 หัวหน้าโครงการ : การประเมินความเสี่ยงของลิสทีเรียในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่

7.3 ผลงานวิจัยและที่ตีพิมพ์เผยแพร่

เกรียงศักดิ์ สายธนู รุ่งทิพย์ ชวนชื่น **ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ** ไฉไล คูวัฒนานุกูล และวลาศินี รักขาว 2539. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำนมโคดิบ เวชชสารสัตวแพทย์ 26(3) 193-218.

เกรียงศักดิ์ สายธนู รุ่งทิพย์ ชวนชื่น **ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ** ไฉไล คูวัฒนานุกูล และวลาศินี รักขาว 2539. ปริมาณมันเนย โปรตีน แล็คโตส ธาตุน้ำนมทั้งหมดและธาตุน้ำนมไม่รวมมันเนยในน้ำนมโคดิบ เวชชสารสัตวแพทย์ 26(3) 253-264.

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ เกรียงศักดิ์ สายธนู และ ธงชัย เฉลิมชัยกิจ 2539. การหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวสูงต่อยาหลายชนิดเพื่อนำมาใช้ตรวจหายาตกค้างในน้ำนม รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

Deng, M., **Nuanualsuwan, S.,** and Cliver, D.O. 2001. Inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts by bacterial strains. J Eukaryot Microbiol Suppl: 37S-39S.

Himathongkham, S., **Nuanualsuwan, S.,** and Riemann, H. 1999. Survival of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium in chicken manure at different levels of water activity. FEMS Microbiol Lett 172: 159-163.

Himathongkham, S., Riemann, H., Bahari, S., **Nuanualsuwan, S.,** Kass, P., and Cliver, D.O. 2000. Survival of Salmonella typhimurium and Escherichia coli O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures. Avian Dis 44: 853-860.

Himathongkham, S., **Nuanualsuwan, S.,** Riemann, H., and Cliver, D.O. 2001. Reduction of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium in artificially contaminated alfalfa seeds and mung beans by fumigation with ammonia. J Food Prot 64: 1817-1819.

Nuanualsuwan, S., and Cliver, D.O. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J Virol Methods 104: 217-225.

Nuanualsuwan, S., Mariam, T., Himathongkham, S., and Cliver, D.O. 2002. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. Photochem Photobiol 76: 406-410.

Nuanualsuwan, S., and Cliver, D.O. 2003a. Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. Appl Environ Microbiol 69: 1629-1632.

Nuanualsuwan, S., and Cliver, D.O. 2003b. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. Appl Environ Microbiol 69: 350-357.

Nuanualsuwan, S., and Cliver, D.O. 2546. Inactivation of Picornaviruses and Caliciviruses (Part 1: Biology and Epidemiology) เวชชสารสัตวแพทย์ 33: 35-54

Nuanualsuwan, S., and Cliver, D.O. 2546. Inactivation of Picornaviruses and Caliciviruses (Part 2: Inactivation) เวชชสารสัตวแพทย์ 33: 19-33

7.4 งานวิจัยดำเนินการเสร็จแล้ว

1. ผลของยาต้านจุลชีพ Flavomycin, Avilamycin และ Erythromycin ที่ใช้เร่งการเจริญเติบโตต่อเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัยที่ดื้อยาแวนโคมัยซินในไก่เนื้อ :ผู้วิจัยหลัก
(Effect of antimicrobial growth promoter, Flavomycin, Avilamycin และ Erythromycin, on the vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) on broiler)

แหล่งทุน : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การประเมินความเสี่ยงเชิงจุลชีววิทยาของซัลโมเนลลาในเนื้อไก่กระทงและไข่ไก่ : ผู้วิจัยร่วม (Microbiological Risk Assessments(MRA) of *Salmonella* in Broiler Chickens and Eggs)

แหล่งทุน : สำนักงานมาตรฐานเกษตรและอาหารแห่งชาติ(มกอช.) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3. การศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อน : ผู้วิจัยหลัก
(Thermal Inactivation of Foot-and-mouth Disease Virus)

แหล่งทุน : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

4. การประเมินความเสี่ยงของซัลโมเนลลาในเนื้อไก่ : ผู้วิจัยหลัก
(Risk assessment of Salmonella in broiler chicken)

แหล่งทุน : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย