ความชุกของเชื้อเอสเชอริเชียโคไลที่สร้างเอนไซม์เอ็กเทนเดด-สเป็กตรัม บีตา-แลคแทมเมส ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในจังหวัดพิษณุโลก

Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* Isolated from Blowflies in Phitsanulok Province

เพชรดา ทองเงิน (Phetrada Thongngen)* พีรพัฒน์ ปัญญาดี (Phiraphat Punyadi)* คณิต อัศวเทพทวี (Kanit Assawatheptawee)* อนงค์ คิดดี (Anong Kiddee)** อรรถพล ตันไสว (Uttapoln Tansawai)**
ดร.นพวรรณ บุญชู (Dr.Nophawan Bunchu)*** ดร.พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ (Dr.Pannika Ritvirool)****

บทคัดย่อ

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียถือเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบไปทั่วโลก ในปัจจุบัน ประเทศไทยมีรายงานของเชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL-producing *E. coli*) ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวบริเวณพื้นที่ชุมชนและเกษตรกรรมในจังหวัดพิษณุโลก จำนวนทั้งหมด 200 ตัว จากนั้นคัดแยกเชื้อโดยใช้อาหารลี้ยงเชื้อที่เติมยา cefotaxime พบเชื้อ Cefotaxime-resistant *E. coli* ในพื้นที่ชุมชนและเกษตรกรรม 78 และ 80 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า เชื้อทั้งหมดดื้อต่อยา cefotaxime และ ampicillin นอกจากนี้เชื้อที่พบในพื้นที่เกษตรกรรมมีอัตราการดื้อยา ceftazidime cefepime และ aztreonam สูงกว่าพื้นที่ชุมชนอย่างมีนัยสำคัญ และพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในพื้นที่ชุมชนและเกษตรกรรมคิดเป็นร้อยละ 100.0 และ 98.7 ตามลำดับ จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันหัวเขียวสามารถเป็นพาหะของเชื้อดื้อยารวมถึงอาจมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อ ESBL-producing *E. coli* มาสู่ชุมชน รวมถึงสิ่งแวดล้อม

ABSTRACT

Antibiotic resistance bacteria is one of the most important problems worldwide. In Thailand, antibiotic-resistance bacteria are increasingly reported both from clinical and community setting. The aim of this study was investigate the prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-producing *E. coli*) isolated from Blowflies in community and agricultural area in Phitsanulok province. Overall, 200 blowflies were included in this study. Seventy-eight (78%) and 80 (80%) isolates of cefotaxime-resistant *E. coli* were recovered from community and agricultural areas, respectively. Antimicrobial susceptibility testing showed that all isolates were resistant to cefotaxime and ampicillin. Isolates from agricultural area showed significantly higher resistant rates to ceftazidime, cefepime and aztreonam compared with those from community area. The prevalences of ESBL-producing *E. coli* from agricultural and community areas were 100.0% (78/78) and 98.7% (79/80), respectively. Our study showed that blowflies could carry ESBL-producing *E. coli* and suggested a possible role for blowflies in the dissemination of these organism to general public and environment.

คำสำคัญ: แบคทีเรียดื้อยา เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL แมลงวันหัวเขียว

Keywords: Antibiotic-resistant bacteria, ESBL-producing *E. Coli*, Blowflies

** นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*
*** นิสิต หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*
**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*
***** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

บทนำ

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียถือเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบไปทั่วโลก โดยสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกคนและทุกช่วงอายุ นอกจากนี้ยังมีอัตราการดื้อยาที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมาจากการที่เชื้อสามารถปรับตัวให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยอาศัยกลไกต่างๆ ร่วมกัน ทำให้การรักษาทางการแพทย์เริ่มไม่ได้ผล ส่งผลให้มีอัตราการเสียชีวิตและค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ในการรักษาสูงมากขึ้น ปัจจุบันเชื้อดื้อยาไม่ได้พบเฉพาะในโรงพยาบาลเท่านั้น แต่สามารถพบในสัตว์หรือสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้เช่นกัน (Dahms et al., 2015)

เชื้อ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม และยังเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์ อย่างไรก็ตาม เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ จากการศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในประเทศไทย โดยสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุขได้รายงานการสำรวจข้อมูลจากโรงพยาบาล 1,023 แห่งทั่วประเทศในปี พ.ศ. 2553 พบว่าเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่พบบ่อยที่สุดในโรงพยาบาลและยังสามารถที่จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด (ภาณุมาศ, 2556)

ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactam จัดเป็นยาต้านแบคทีเรียกลุ่มใหญ่และมีการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด เนื่องด้วยยาสามารถออกฤทธิ์ได้กว้าง (broad spectrum) และมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal effect) ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น penicillin, cephalosporin, monobactam, carbapenem และ beta-lactamase inhibitor (Sauvage et al., 2008) สำหรับยาในกลุ่ม cephalosporin สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่ม แต่กลุ่มที่จัดเป็นยาที่สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างคือ cephalosporin รุ่นที่ 3-5 ซึ่งสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยยาในกลุ่มนี้ เช่น cefotaxime และ ceftazidime การใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactam ในการนำมารักษาโรคติดเชื้อ ทำให้เชื้อสามารถปรับตัวให้ดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam ได้ โดยอาศัยกลไกต่างๆ เช่น การยับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยา การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา และการลดการซึมผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ เป็นต้น แต่กลไกที่สำคัญที่สุดของแบคทีเรียแกรมลบในการดื้อต่อยา คือการที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) ออกมาทำลายยา โดยเอนไซม์ ESBL มีคุณสมบัติคือ สามารถทำลายยาในกลุ่ม beta-lactam ที่ออกฤทธิ์กว้าง เช่น cephalosporin รุ่นที่ 3 และ 4 รวมถึงสามารถทำลายยาในกลุ่ม ampicillin และ monobactam แต่จะถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid ซึ่งการสร้างเอนไซม์ ESBL สามารถพบได้บ่อยในแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae (Harris et al., 2015)

จากการรายงานของงานวิจัยต่างๆ พบว่า สาเหตุที่ทำให้มีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมและการขาดมาตรการควบคุม เช่น การรับประทานยาอย่างไม่ต่อเนื่องตามที่แพทย์สั่ง หรือการหยุดรับประทานยาเมื่ออาการดีขึ้น นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินความจำเป็นและไม่เหมาะสมในสัตว์ ทำให้เกิดปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ จากปัจจัยนี้ทำให้เชื้อดื้อยามีการแพร่กระจายไปในสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ในการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาอาจมีพาหะในการทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาไปสู่คนและสิ่งแวดล้อม โดยแมลงวันอาจเป็นพาหะสำคัญในการนำพาเชื้อก่อโรคหลายชนิดซึ่งรวมถึงเชื้อที่สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะ แพร่กระจายสู่คนและสิ่งแวดล้อมได้

จากการศึกษางานวิจัยทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศพบว่า แมลงวันสามารถเป็นพาหะนำเชื้อโรคต่างๆ มากมาย ซึ่งมีรายงานการตรวจพบเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่แยกได้จากแมลงวัน เช่น *Shigella* sp. *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp. รวมถึง *E. coli* (คม, กาบแก้ว, 2555) นอกจากนี้ ในทวีปยุโรป ได้มีการรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL (ESBL-producing *E. coli*) จากแมลงวัน ในปี ค.ศ. 2011 ที่ประเทศสาธารณรัฐเช็ก ที่สามารถพบอัตราของเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ได้มากกว่าร้อยละ 18.0

(Dolejska et al., 2011) รวมถึงประเทศเนเธอแลนด์และเยอรมัน ที่สามารถพบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ที่แยกจากแมลงวันได้เช่นกัน (Blaak et al., 2014; von Salviati et al., 2015) และสำหรับการศึกษาในประเทศไทยพบว่า ในปี ค.ศ. 1983 สามารถพบเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Enteric pathogen) เช่น Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ที่แยกได้จากแมลงวันในจังหวัดนครราชสีมา (Echeverria et al., 1983) ในปี ค.ศ. 2000 จากการเก็บตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวในจังหวัดเชียงใหม่ พบแมลงวันหัวเขียวร้อยละ 87.5 สามารถเป็นพาหะของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร โดยพบเชื้อ *E. coli* ได้ร้อยละ 26.7 (Sukontason et al., 2000) และในปี ค.ศ. 2007 ได้มีการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างแมลงวันจากตลาดสดพบว่า จากตัวอย่างทั้งหมดสามารถพบแมลงวันหัวเขียวได้สูงถึง ร้อยละ 87.7 (114/130) และพบเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวคิดเป็นร้อยละ 21.5 (Sukontason et al., 2007) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2014 สามารถพบเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวคิดเป็นร้อยละ 32.0 (Chaiwong et al., 2014) จากการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของแมลงวันหัวเขียวในการเป็นพาหะของเชื้อ *E. coli* ที่อาจมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ มาสู่ชุมชนหรือคนได้

จากการรายงานในประเทศไทย จะเห็นได้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวนั้นยังคงมีน้อย ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับแมลงวันหัวเขียวที่อาจเป็นพาหะสำคัญในการนำเชื้อที่สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือเชื้อ ESBL-producing *E. coli* แพร่กระจายมาสู่สิ่งแวดล้อมต่างๆ รวมถึงคนจึงเป็นเรื่องที่สำคัญ เนื่องจากข้อมูลที่ได้สามารถนำไปกำหนดแนวทางการควบคุมและลดความเสี่ยงของปัญหาการติดเชื้อและแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาความชุกของเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในบริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดพิษณุโลก

วิธีการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ (Bacterial identification)

เชื้อ *E. coli* ที่ทำการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยเชื้อแยกได้จากแมลงวันหัวเขียว บริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดพิษณุโลก จำนวนพื้นที่ละ 100 ตัว รวมทั้งหมด 200 ตัว ซึ่งเชื้อที่ได้รับการแยกจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นจะทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเบื้องต้น โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) (Oxoid, England) และนำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อนั้นนำเชื้อมา cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar (EMB) (Oxoid LTD, England) ที่มีการเติมยา cefotaxime ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว เมื่อเชื้อมีการเจริญจะทำการเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *E. coli* โดยจะเลือก 1 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility testing)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ จะใช้วิธี Disk diffusion method ตามมาตรฐานที่กำหนดของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) โดยการเตรียมเชื้อให้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (1.5×10^8 cfu/ml) และใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ swab เชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA)

(Oxoid LTD, England) จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ (Oxoid, England) ลงบนผิวหน้าอาหาร โดยแบ่งเป็นกลุ่ม beta-lactam 6 ชนิด ได้แก่ ampicillin (AMP), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM) และ imipenem (IMP) และกลุ่ม non beta-lactam 2 ชนิด ได้แก่ gentamicin (CN) และ doxycycline (DO) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของโซนใส (inhibition zone) และนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ CLSI (2014) โดยสามารถแบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ไวต่อยา (susceptible: S), ไวต่อยาปานกลาง (intermediate: I) และดื้อยา (resistant: R)

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL จะใช้วิธี Combination disk method ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI (2014) โดยอาศัยหลักการที่เอนไซม์ ESBL จะถูกยับยั้งโดย clavulanic acid วิธีการคือ เปรียบเทียบ inhibition zone ของแผ่นยากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 เพียงอย่างเดียว กับแผ่นยาที่มียากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 ร่วมกับ clavulanic acid โดยจะเปรียบเทียบระหว่าง cefotaxime (30 µg) กับ cefotaxime ร่วมกับ clavulanic acid (30/10 µg) และ ceftazidime (30 µg) กับ ceftazidime ร่วมกับ clavulanic acid (30/10 µg) วิธีการอ่านผลคือ ถ้า inhibition zone ของแผ่นยาที่มี clavulanic acid กว้างกว่าแผ่นยาที่ไม่มี clavulanic acid มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แปลผลเป็น ผลบวก คือ เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ได้

การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในจังหวัดพิษณุโลก จะรายงานเป็นร้อยละต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษา นอกจากนั้นจะใช้สถิติวิเคราะห์ค่าสัดส่วน (proportion) เปรียบเทียบอัตราส่วนของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันในบริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมภายในจังหวัดพิษณุโลก โดยใช้สถิติ 2 sample Z-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ ด้วยซอฟต์แวร์ Minitab version 18

ผลการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ *E. coli* ดื้อยา cefotaxime (cefotaxime-resistant *E. coli*) ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว 100 ตัวของแต่ละพื้นที่ในบริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดพิษณุโลก พบว่า พบเชื้อ cefotaxime-resistant *E. coli* ในบริเวณพื้นที่ชุมชน 78 ไอโซเลท และในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม 80 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 78 และ 80 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

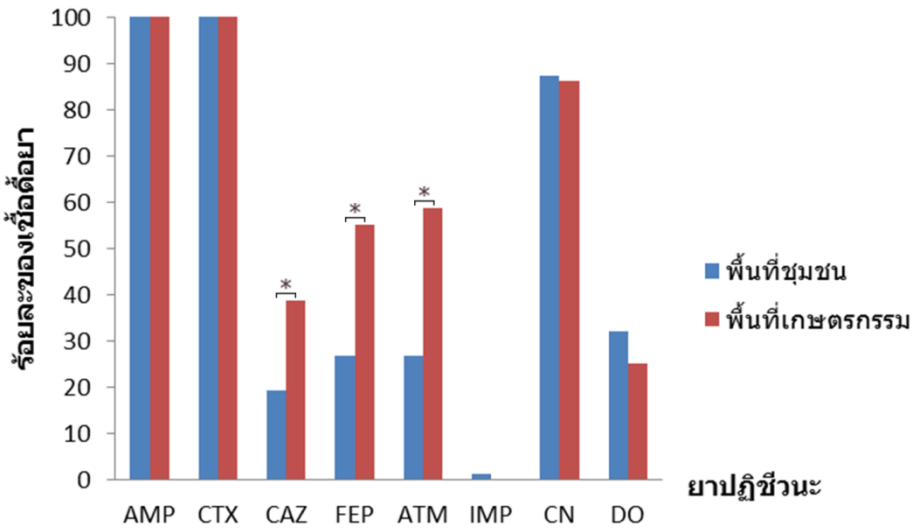
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนเชื้อ Cefotaxime-resistant *E. coli* และ ESBL-producing *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในแต่ละพื้นที่ของจังหวัดพิษณุโลก

พื้นที่	แมลงวัน	Cefotaxime-resistant *E. coli*	ESBL-producing *E. coli*
	จำนวนทั้งหมด (ตัว)	ร้อยละ (ไอโซเลท)	ร้อยละ (ไอโซเลท)
ชุมชน	100	78.0 (78/100)	100.0 (78/78)
เกษตรกรรม	100	80.0 (80/100)	98.7 (79/80)
ทั้งหมด	200	79.0 (158/200)	99.3 (157/158)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ผลการศึกษารูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว ด้วยวิธี disk diffusion method ซึ่งทดสอบกับยาทั้งหมด 8 ชนิด พบว่า เชื้อจากทั้งสองพื้นที่สามารถดื้อต่อยา cefotaxime และ ampicillin คิดเป็นร้อยละ 100.0 นอกจากนี้เชื้อส่วนใหญ่ในพื้นที่เกษตรกรรม ยังมีอัตราการดื้อต่อยา ceftazidime cefepime และ aztreonam สูงกว่าในบริเวณพื้นที่ชุมชนอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 1)

โดยเชื้อ *E. coli* ในพื้นที่ชุมชน พบว่ามีการดื้อต่อยา ceftazidime cefepime และ aztreonam คิดเป็นร้อยละ 19.2, 26.9 และ 26.9 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ในพื้นที่เกษตรกรรมพบว่า ในพื้นที่เกษตรกรรมมีอัตราการดื้อยา ceftazidime cefepime และ aztreonam สูงกว่าคิดเป็นร้อยละ 38.7 55.0 และ 58.7 ตามลำดับ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อจากทั้งสองพื้นที่ยังคงไวต่อยา imipenem ได้มากกว่าร้อยละ 90.0 และสำหรับอัตราการดื้อยาในกลุ่ม non beta-lactam ในบริเวณพื้นที่ชุมชนพบว่า มีอัตราการดื้อยา gentamicin และ doxycycline คิดเป็นร้อยละ 87.1 และ 32.0 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่เกษตรกรรมที่มีอัตราการดื้อยาคิดเป็นร้อยละ 86.2 และ 25.0 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 แสดงร้อยละการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวัน

AMP; ampicillin, CTX; cefotaxime, CAZ; ceftazidime, FEP; cefepime, ATM; aztreonam, IMP; imipenem CN; gentamicin และ DO; doxycycline

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในบริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดพิษณุโลก ทั้งหมด 158 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อ ESBL-producing *E. coli* สูงถึง 157 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 99.3 (157/158) (ตารางที่ 1)

โดยสำหรับพื้นที่ชุมชนจากทั้งหมด 78 ไอโซเลท พบ ESBL-producing *E. coli* ได้ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 100.0 และพื้นที่เกษตรกรรมจาก 80 ไอโซเลท พบ ESBL-producing *E. coli* สูงถึง 70 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 98.7 (ตารางที่ 1) โดยตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL แสดงดังภาพที่ 2

ภาพที่ 2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาความชุกของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในบริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมของจังหวัดพิษณุโลก พบว่า สามารถแยกเชื้อ cefotaxime-resistant *E. coli* ในบริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมได้ร้อยละ 78 (78/100) และ 80 (80/100) ตามลำดับ ซึ่งจากการเปรียบเทียบความชุกของเชื้อ cefotaxime-resistant *E. coli* ของทั้งสองพื้นที่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแมลงวันหัวเขียวสามารถเป็นพาหะของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาได้ เนื่องจากแมลงวันหัวเขียวจัดเป็นแมลงวันที่มีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ โดยสามารถเป็นพาหะนำโรคแบบเชิงกล (mechanical transmission) คือ เชื้อแบคทีเรียจะติดตาม ขา ปาก ลำตัว และปีก (คม, กาบแก้ว, 2548) จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในทวีปแอฟริกา ปี ค.ศ. 2016 ประเทศอียิปต์ ที่มีการเก็บตัวอย่างแมลงวันมาศึกษาบทบาทในการเป็นพาหะของเชื้อดื้อยา ซึ่งสามารถพบเชื้อ *E. coli* ดื้อยาสูงถึงร้อยละ 92.9 (Mohammed et al., 2016)

จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อจากทั้งพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมสามารถที่จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactam โดยเฉพาะยาในกลุ่ม penicillin และ cephalosporin รุ่นที่ 3 (cefotaxime) อาจเนื่องมาจากยาในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด โดยเฉพาะยาในกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae (Sauvage et al., 2008) ที่อาจทำให้เชื้อมีการปรับตัวให้ดื้อต่อยา ซึ่งมีความสอดคล้องจากการรายงานในประเทศสเปนและเยอรมัน ปี ค.ศ. 2015-2016 ซึ่งพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันสามารถที่จะดื้อต่อยา cefotaxime ในอัตราที่สูงคิดเป็นร้อยละ 100.0 (Sola-Gines et al., 2015; Schaumburg et al., 2016) และ ในปี ค.ศ. 2017 ประเทศอิหร่าน มีรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ดื้อยา cefotaxime และ Ampicillin ได้ร้อยละ 79.1 และ 45.8 ที่แยกได้จากแมลงวันบ้านบริเวณโรงพยาบาลและ ร้อยละ 90.9 และ 9.0 บริเวณสิ่งแวดล้อมต่างๆ (ร้านขายผลไม้และโรงฆ่าสัตว์) (Nazari et al., 2017) สำหรับในประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2016 มีรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ดื้อยา ampicillin คิดเป็นร้อยละ 92.6 (ชิดชนก, 2559) ชี้ให้เห็นว่า แมลงวันสามารถที่จะเป็นพาหะของเชื้อดื้อยาได้ และเป็นที่น่าสนใจที่อัตราการดื้อยา ceftazidime cefepime และ aztreonem ของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากทั้งสองพื้นที่พบว่า ในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมมีอัตราการดื้อยาที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม นอกจากการทำการเกษตรแล้วมักจะมีการเลี้ยงสัตว์ในพื้นที่บริเวณนั้นๆ ซึ่งในการเลี้ยงสัตว์อาจมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ เมื่อสัตว์ขับถ่าย ในมูลสัตว์อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาได้

ด้วยเหตุผลนี้อาจทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาจากสัตว์หรือมูลสัตว์มาสู่สิ่งแวดล้อมในบริเวณรอบๆ พื้นที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาพฤติกรรมของแมลงวัน โดยแมลงวันหัวเขียวมีพฤติกรรมชอบหากินตามกองขยะ และสิ่งปฏิกูล เมื่อแมลงวันบินไปตอมสิ่งปฏิกูล จึงอาจทำให้เชื้อดื้อยาติดไปตามส่วนต่างๆ ของแมลงวันได้ (คม, กาบแก้ว, 2548) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปี ค.ศ. 2013 ที่มีการแยกเชื้อ *E. coli* จากแมลงวัน และมูลสัตว์ ในฟาร์มเลี้ยงไก่ จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันและมูลสัตว์มีสายพันธุ์เดียวกัน ชี้ให้เห็นว่าแมลงวันอาจได้รับเชื้อ *E. coli* ที่มีการปนเปื้อนจากมูลสัตว์ และอาจเป็นพาหะของเชื้อดื้อยาและทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในบริเวณรอบๆ พื้นที่ได้ (Blaak et al., 2014)

จากการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว ในบริเวณพื้นที่ชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมพบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* จากจำนวนเชื้อ cefotaxime-resistant *E. coli* ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 100.0 (78/78) และ 98.7 (79/80) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องจากการรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาระดับชาติแห่งประเทศไทย (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand) ซึ่งได้มีการรวบรวมข้อมูลตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000-2016 พบว่ามีแนวโน้มในการพบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* เพิ่มสูงมากขึ้นในทุกๆ ปี นอกจากนี้จากการศึกษาเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในแถบทวีปเอเชีย พบว่า ในประเทศไทย ปี ค.ศ. 2008 และ 2018 มีการรายงานการพบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ที่แยกได้จากทั้งผู้ป่วยที่ติดเชื้อในโรงพยาบาลและเนื้อสัตว์ ได้มากกว่าร้อยละ 70.0 (Kiratisin et al., 2008; Tansawai et al., 2018) ในประเทศจีน ปี ค.ศ. 2009 และ 2017 สามารถพบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ที่แยกได้จากฟาร์มไก่และผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในช่องท้อง ได้มากกว่าร้อยละ 60.0 (Yuan et al., 2009; Liao et al., 2017) และในประเทศเวียดนาม ปี ค.ศ. 2016 ได้มีการศึกษาโดยการแยกเชื้อจากศูนย์อาหาร ซึ่งสามารถพบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ได้สูงกว่าร้อยละ 45.0 (Nguyen et al., 2016) ซึ่งตรงข้ามกับประเทศในแถบทวีปยุโรปที่มีการรายงานเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ในอัตราที่ต่ำกว่า ดังตัวอย่างการศึกษาในปี ค.ศ. 2015 และ 2016 ที่ประเทศเยอรมัน ได้มีการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างแมลงวันจากฟาร์มปศุสัตว์ จากผลการศึกษาพบว่า สามารถพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ร้อยละ 25.0 และ 3.3 ตามลำดับ (von Salviati et al., 2015; Schaumburg et al., 2016) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ทั้งทางด้านสภาพแวดล้อมและอุณหภูมิ โดยประเทศในแถบภูมิภาคเอเชียมักมีอุณหภูมิที่สูงกว่าประเทศในแถบยุโรป ซึ่งอาจส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า นอกจากนี้แล้วในประเทศไทย ยังคงขาดมาตรการในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งกับคนและสัตว์ เช่น สามารถซื้อยาปฏิชีวนะจากร้านขายยาโดยไม่มีใบสั่งจ่ายยาจากแพทย์ หรือการขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น การรับประทานยาปฏิชีวนะไม่ครบตามที่แพทย์ระบุ เป็นต้น จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น อาจทำให้เชื้อสามารถปรับตัวให้ดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้มีการพบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ในอัตราที่สูง

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า แมลงวันหัวเขียวสามารถเป็นพาหะในการแพร่กระจายแบคทีเรียดื้อยามาสู่คน ชุมชน รวมถึงสิ่งแวดล้อมต่างๆ ซึ่งอาจทำให้การระบาดของเชื้อดื้อยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและยากต่อการควบคุม ดังนั้นการศึกษาความชุกของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาในแมลงวันหัวเขียว จึงสะท้อนให้เห็นถึงปัญหาเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในการควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาจากสิ่งแวดล้อมมาสู่คน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ ในการวิจัย และคณาจารย์ทุกท่านให้คำปรึกษา เพื่อให้งานวิจัยสำเร็จบรรลุตามวัตถุประสงค์การวิจัยไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

คม สุคนธสรรพ์ และ กาบแก้ว สุคนธสรรพ์. แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย เล่มที่ 1. เชียงใหม่: เชียงใหม่ดิจิตอลเวิร์ค; 2548.

ชิดชนก ชมชาติ. การศึกษาแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว (DIPTERA:CALLIPHORIDAE) ที่พบในเขตพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา]. พิษณุโลก: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2559.

ภาณุมาศ ภูมาศ, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, ภูษิต ประคองสาย, ตวงรัตน์ โพธะ, อาทร ริ้วไพบูลย์, สุพล ลิมวัฒนานนท์. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย : การศึกษาเบื้องต้น. วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข 2556; 6(3): 352-360.

Blaak H, de Kruijf P, Hamidjaja RA, van Hoek AH, de Roda Husman AM, Schets FM. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. Veterinary microbiology 2014; 171(4): 448-59.

Chaiwong T, Srivoramas T, Sueabsamran P, Sukontason K, Sanford MR, Sukontason KL. The blow fly, Chrysomya megacephala, and the house fly, Musca domestica, as mechanical vectors of pathogenic bacteria in Northeast Thailand. Tropical biomedicine 2014; 31(2): 336-46.

Dahms C, Hübner N-O, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-Producing Escherichia coli in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. PloS one 2015; 10(11).

Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J, Janoszowska D, Roubalova E, Dibdakova K, et al. Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in Escherichia coli isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. The Journal of antimicrobial chemotherapy 2011; 66(4): 757-64.

Echeverria P, Harrison BA, Tirapat C, McFarland A. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. Applied and environmental microbiology 1983; 46(1): 32-6.

Harris PN, Tambyah PA, Paterson DL. beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? The Lancet Infectious diseases 2015; 15(4): 475-85.

Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrobial agents and chemotherapy 2008; 52(8): 2818-24.

Liao K, Chen Y, Wang M, Guo P, Yang Q, Ni Y, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China. Diagnostic microbiology and infectious disease 2017; 87(1): 45-8.

Mohammed AN, Abdel-Latef GK, Abdel-Azeem NM, El-Dakhly KM. Ecological study on antimicrobial-resistant zoonotic bacteria transmitted by flies in cattle farms. Parasitology research 2016; 115(10): 3889-96.

Nazari M, Mehrabi T, Hosseini SM, Alikhani MY. Bacterial Contamination of Adult House Flies (Musca domestica) and Sensitivity of these Bacteria to Various Antibiotics, Captured from Hamadan City, Iran. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR 2017; 11(4).

Nguyen do P, Nguyen TA, Le TH, Tran NM, Ngo TP, Dang VC, et al. Dissemination of Extended-Spectrum beta-Lactamase- and AmpC beta-Lactamase-Producing Escherichia coli within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. BioMed research international 2016.

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS microbiology reviews 2008; 32(2): 234-58.

Schaumburg F, Onwugamba FC, Akulenko R, Peters G, Mellmann A, Kock R, et al. A geospatial analysis of flies and the spread of antimicrobial resistant bacteria. International journal of medical microbiology: IJMM 2016; 306(7): 566-71.

Sola-Gines M, Gonzalez-Lopez JJ, Cameron-Veas K, Piedra-Carrasco N, Cerda-Cuellar M, Migura-Garcia L. Houseflies (Musca domestica) as Vectors for Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Escherichia coli on Spanish Broiler Farms. Applied and environmental microbiology 2015; 81(11): 3604-11.

Sukontason K, Bunchoo M, Khantawa B, Piangjai S, Sukontason K, Methanitikorn R, et al. Mechanical carrier of bacterial enteric pathogens by Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae) in Chiang Mai, Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 2000; 31 Suppl 1: 157-61.

Sukontason KL, Bunchoo M, Khantawa B, Piangjai S, Rongsriyam Y, Sukontason K. Comparison between Musca domestica and Chrysomya megacephala as carriers of bacteria in northern Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 2007; 38(1): 38-44.

Tansawai U, Sanguansermsri D, Na-Udom A, Walsh T.R., Niumsup PR. Occurrence of extended spectrum β-lactamase and AmpC genes among multidrugresistant Escherichia coli and emergence of ST131 from poultry meat in Thailand. Food control 2018; 159-164.

von Salviati C, Laube H, Guerra B, Roesler U, Friese A. Emission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from pig fattening farms to surrounding areas. Veterinary microbiology 2015; 175(1): 77-84.

Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24.: Clinical and Laboratory Standards Institute 2014; 34(1): 50-112.

Yuan L, Liu JH, Hu GZ, Pan YS, Liu ZM, Mo J, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from chickens in Henan Province, China. Journal of medical microbiology 2009; 58(11): 1449-53.