การแพร่กระจายของเชื้อเอสเชอริเชียโคไลดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในพื้นที่ตลาด จังหวัดพิษณุโลก

Dissemination of Antibiotic-resistant *Escherichia coli* Isolated from Blowflies in Open-air Markets Phitsanulok Province

พีรพัฒน์ ปัญญาดี (Phiraphat Punyadi)* เพชรดา ทองเงิน (Phetrada Thongngen)* 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

การพบแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนานนับเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Escherichia coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว บริเวณพื้นที่ตลาดในจังหวัดพิษณุโลก โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวจากตลาด A (n=100) และตลาด B (n=100) พบเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 48 ไอโซเลท พบเป็นเชื้อ *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน คิดเป็นร้อยละ 66.6 (10/15) และ 57.5 (19/33) จากตลาด A และตลาด B ตามลำดับ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) พบรูปแบบ rep-PCR 3 รูปแบบที่เหมือนกันระหว่างตลาดทั้งสองแห่ง แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาโดยมีแมลงวันหัวเขียวเป็นพาหะ ทั้งภายในและระหว่างตลาดทั้งสองแห่ง การศึกษานี้อาจใช้เป็นข้อมูลเพื่อประกอบการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาภายในชุมชนได้

ABSTRACT

The presence of multidrug-resistant bacteria in community is an important public health issue. This study investigated antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from blowflies in the open-air market in Phitsanulok province. Blowflies were collected from market A (n=100) and market B (n=100). A total of 48 *E. coli* isolates were identified as multidrug-resistant *E. coli* 66.6% (10/15) and 57.5% (19/33) in market A and B, respectively. Genotypic study of *E. coli* by repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) showed 3 identical rep-PCR patterns between the two markets. This result suggested the dissemination of antibiotic-resistant *E. coli* within and between the two markets via blowflies. Our study provided useful information on the antibiotic-resistant *E. coli* among blowflies that may be used to control and prevent the dissemination of these organisms within community.

คำสำคัญ: แมลงพาหะ แมลงวันหัวเขียว *Escherichia coli* การดื้อยาหลายขนาน rep-PCR

Keywords: Insect vectors Blowflies Multi-drug resistant *Escherichia coli* rep-PCR

** นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

*** นิสิต หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

***** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะนับเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขและได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน สาเหตุสำคัญเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม หรือใช้มากเกินความจำเป็น เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะในทางการเกษตรและปศุสัตว์ เพื่อเพิ่มผลผลิตในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ทำให้สัตว์มีสุขภาพดีและไม่เป็นโรค ส่งผลให้เชื้อมีการพัฒนาตนเองและปรับตัวเพื่อความอยู่รอด เนื่องจากยีนดื้อยาส่วนใหญ่อยู่บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ได้ ทำให้เชื้อดื้อยาถ่ายทอดความสามารถในการดื้อยาไปสู่เชื้ออื่น โดยการถ่ายทอดยีนในแนวราบ (horizontal gene transfer) (von Wintersdorff et al., 2016) ปัญหาเชื้อดื้อยาจึงมีการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว

เชื้อ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น และสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และโรคนอกระบบทางเดินอาหารได้ นับว่าเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ มีรายงานอุบัติการณ์การเจ็บป่วยจากเชื้อ *E. coli* ในหลายประเทศ โดยเฉพาะในเขตที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น รวมถึงประเทศไทย (Themphachana et al., 2014) นอกจากนี้สามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในอาหารหรือน้ำดื่ม จากบริเวณสิ่งแวดล้อมต่างๆ รวมถึงแหล่งจำหน่ายอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตลาด เนื่องจากเป็นศูนย์รวมอาหารและขยะต่างๆ จึงเหมาะเป็นแหล่งชุกชุมของเชื้อก่อโรค รวมถึงแมลงพาหะซึ่งเป็นแหล่งโรคที่สำคัญ (พิสิษฐ์, 2555)

การแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาภายในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำและอาหาร เกิดได้จากหลายสาเหตุ หนึ่งในนั้นคือแมลงวัน เนื่องจากแมลงวันมีจำนวนมากและมีความหลากหลายของสายพันธุ์ เพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว และยังสามารถแพร่กระจายเชื้อก่อโรคได้อย่างกว้างขวาง แมลงวันจึงถือเป็นพาหะชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยแมลงวันหัวเขียว (Blowflies) มักพบได้มากในพื้นที่แหล่งอาหารประเภทโปรตีนสูง โดยเฉพาะตลาดสดและโรงฆ่าสัตว์ เป็นต้น (จักรวาล, 2556) เนื่องจากมีพฤติกรรมที่ชอบตอมอาหารสด ทำให้แบคทีเรียต่างๆ สามารถติดตามลำตัวและขาของแมลงวัน นอกจากนี้แมลงวันยังมีพฤติกรรมชอบถ่ายและสำรอกของเหลวออกมาเวลากินอาหาร ทำให้แบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของแมลงวันมีการแพร่กระจายลงสู่อาหาร (Sasaki et al., 2000) ซึ่งการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเป็นหนึ่งในสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้แมลงวันมักอาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกันกับมนุษย์ ทำให้มีโอกาสที่จะแพร่กระจายเชื้อดื้อยามาสู่มนุษย์ได้ ดังนั้นแมลงวันหัวเขียวจึงมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยา

ในปัจจุบันมีการใช้ยา cephalosporin รุ่นที่ 3 (third-generation cephalosporin) เช่น cefotaxime และ ceftazidime เป็นต้น ในการรักษาโรคจากแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มขึ้น โดยเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่มนี้มักจะเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (multi-drug resistant; MDR) (Moghnieh et al., 2015) มีหลายการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันบริเวณสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล ฟาร์มปศุสัตว์ หรือแม้แต่บริเวณสนามบินก็สามารถพบเชื้อ MDR ได้ (Boulesteix et al., 2005; Solà-Ginés et al., 2015; Liu et al., 2013) ซึ่งโดยทั่วไป MDR มักพบการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections) แต่เมื่อมีการแพร่กระจายของ MDR เข้าสู่ชุมชน จึงถือว่าเป็นวิกฤตการณ์ที่สำคัญ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการใช้ยาปฏิชีวนะ ค่ารักษาพยาบาล อัตราการเจ็บป่วยและการเสียชีวิต (van Duin, Paterson, 2016)

การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทยยังมีจำกัด งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่พบในแมลงวันหัวเขียวบริเวณพื้นที่ตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งอาจใช้เป็นข้อมูลเพื่อประกอบการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาของพื้นที่ดังกล่าวได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยาและการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวบริเวณตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

วิธีการวิจัย

เชื้อที่ทำการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเชื้อ *E. coli* ดื้อยา cefotaxime (cefotaxime-resistance *E. coli*; CTX-R *E. coli*) ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวบริเวณพื้นที่ของตลาด A และ B จำนวน 100 ตัวในแต่ละพื้นที่ ซึ่งทั้งสองตลาดนี้เป็นตลาดสดขายอาหารสดและอาหารแปรรูป ตั้งอยู่ในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก โดยเป็นเชื้อ CTX-R *E. coli* จากตลาด A และ B จำนวน 15 และ 33 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งเชื้อดังกล่าวได้ถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเบื้องต้น

นำเชื้อ CTX-R *E. coli* จำนวนทั้งหมด 48 ไอโซเลท มา cross streak บนอาหาร Eosin Methylene Blue agar (EMB) (Oxoid LTD, England) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เชื้อที่เจริญและให้โคโลนีที่มีลักษณะเป็น metallic sheen ถือว่าเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *E. coli* โดยอัตราการพบเชื้อจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าสัดส่วน (proportion) โดยใช้ 2 sample Z-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ ด้วยโปรแกรม Minitab version 18

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี disk diffusion method ตามวิธีการของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2014) โดยการเตรียมเชื้อถ่ายลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) (Oxoid LTD, England) จากนั้นปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland (1.5 x10^8 CFU/ml) แล้วใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ swab เชื้อลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid LTD, England) จากนั้นวาง antibiotic disk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ antibiotic disk ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ceftazidime (30 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (30 µg), doxycycline (30 µg) และ ciprofloxacin (5 µg) (Oxoid, England) จากนั้นทำการแปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะตามค่ามาตรฐานของ CLSI (2014) โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ไวต่อยา (susceptible: S), ไวต่อยาปานกลาง (intermediate: I) และดื้อยา (resistant: R) โดยผลการทดสอบ I หรือ R จะถือว่าเป็นเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้มีการพิจารณาคุณสมบัติการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant; MDR) โดยที่เชื้อต้องลดความไวต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดในกลุ่มยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปตามเกณฑ์ของ Magiorakos และคณะ (Magiorakos et al., 2012)

การศึกษารูปแบบพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR)

rep-PCR เป็นการเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งของลำดับเบสที่ซ้ำกัน (repetitive sequence) โดยในแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันจะมีช่วงลำดับเบสที่ซ้ำเหมือนกัน การเตรียม DNA template สามารถทำได้โดยการนำโคโลนีของเชื้อมาละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที ดูดส่วน supernatant ใช้เป็น DNA template ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 1 µM primer ที่จำเพาะ (rep-1R 5′-IIIICDICDICATCIGGC-3′ และ rep-2T 5′-

TCGTCTTATCTGGCCTAC-3′), DNA template 1 ไมโครลิตร และ 1 U *Taq* polymerase ในสภาวะที่เหมาะสม คือ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 7 นาที, 90 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 40 องศาเซลเซียส 1 นาที, 65 องศาเซลเซียส 5 นาที 30 รอบ, final extension 65 องศาเซลเซียส 10 นาที (Versalovic et al., 1991) แล้วตรวจสอบผลด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอ ซึ่งถ้าให้ผลรูปแบบเหมือนกันถือว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน

ผลการวิจัย

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเบื้องต้น

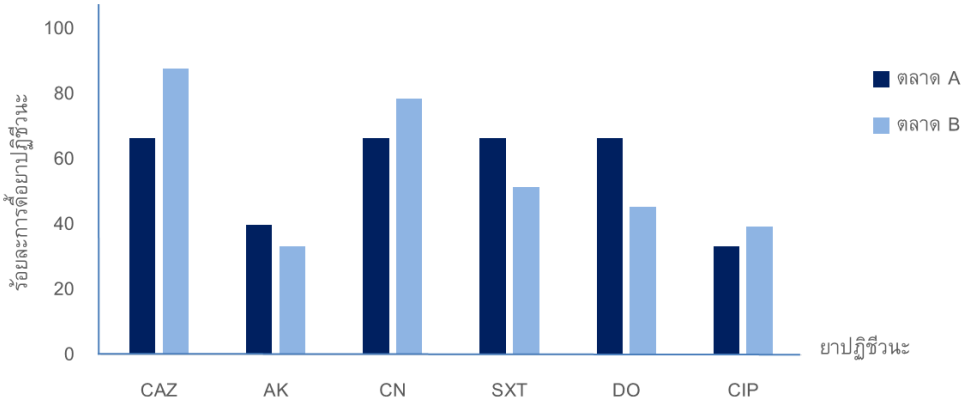
จากการนำเชื้อ *E. coli* ดื้อยา cefotaxime (cefotaxime-resistance *E. coli*; CTX-R *E. coli*) จากแมลงวันหัวเขียวทั้งหมด 200 ตัว จำนวนทั้งหมด 48 ไอโซเลท ที่ถูกเก็บอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มา cross streak บนอาหาร EMB agar พบเชื้อแบ่งเป็นพื้นที่ตลาด A ร้อยละ 31.2 (15/48) และพื้นที่ตลาด B 68.7 (33/48) (ตารางที่ 1) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) ระหว่าง 2 พื้นที่

ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อด้วยวิธี disk diffusion method โดยใช้ยาทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ceftazidime (CAZ), amikacin (AK), gentamicin (CN), trimethoprim /sulfamethoxazole (SXT), ciprofloxacin (CIP) และ doxycycline (DO) พบเชื้อ CTX-R *E. coli* ดื้อยาดังกล่าวคิดเป็นร้อยละ 77.2, 36.6, 72.6, 59.0, 56.0 และ 36.3 ตามลำดับ โดยมีร้อยละการดื้อยาในตลาด A และ ตลาด B แสดงดังภาพ 1 นอกจากนี้พบเชื้อ CTX-R *E. coli* ที่เป็น MDR ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 60.4 (29/48) โดยแบ่งเป็นตลาด A ร้อยละ 66.6 (10/15) และตลาด B ร้อยละ 57.5 (19/33) (ตารางที่ 1) ซึ่งตลาด B พบเชื้อ CTX-R *E. coli* มากกว่าตลาด A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนของเชื้อ MDR และรูปแบบ rep-PCR ของเชื้อ CTX-R *E. coli* จำนวนทั้งหมด 48 ไอโซเลท

แหล่งของเชื้อ	จำนวนเชื้อ CTX-R *E. coli*	จำนวนเชื้อ MDR (ร้อยละ)	จำนวนรูปแบบ rep-PCR
ตลาด A	15	10 (66.6)	9
ตลาด B	33	19 (57.5)	14
รวม	48	29 (60.4)	20

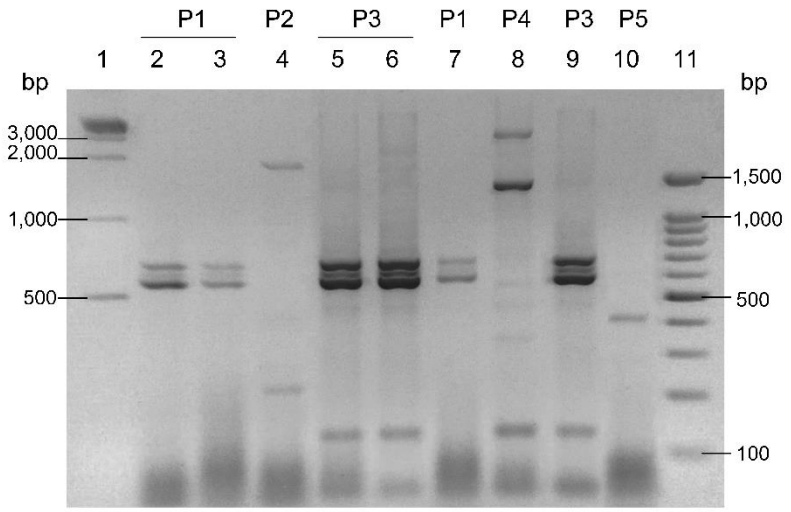


ภาพที่ 1 แสดงร้อยละการดื้อยาของเชื้อ CTX-R *E. coli* (n=48) ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในแต่ละพื้นที่ของตลาด A (n=15) และตลาด B (n=33)

หมายเหตุ: CAZ = ceftazidime, AK = Amikacin, CN = gentamicin, SXT = trimethoprim/sulfamethoxazole, DO = doxycycline และ CIP = ciprofloxacin

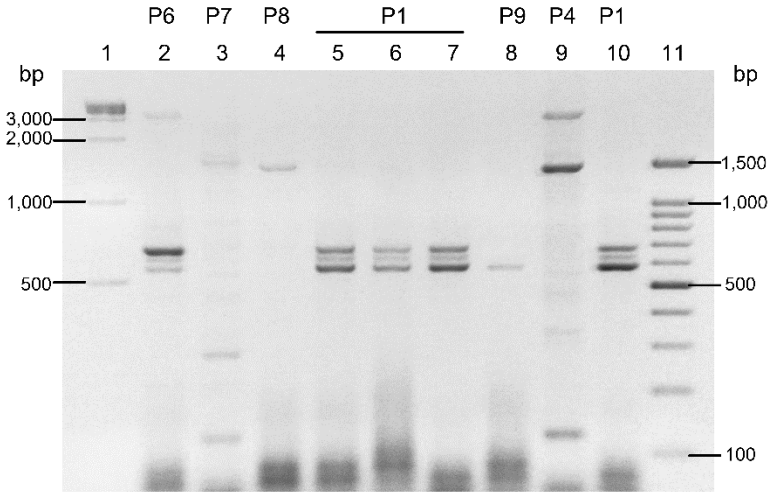
ผลการการศึกษารูปแบบพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli*

จากการศึกษารูปแบบพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี rep-PCR พบรูปแบบ rep-PCR (rep-PCR patterns) ของเชื้อ CTX-R *E. coli* จำนวน 48 ไอโซเลท พบรูปแบบ rep-PCR ที่แตกต่างกัน 20 รูปแบบโดยมี 9 รูปแบบจาก 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากตลาด A และ 14 รูปแบบจาก 33 ไอโซเลทจากตลาด B (ตารางที่ 1) ซึ่งรูปแบบที่พบมากที่สุด คือ รูปแบบที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 31.2 (15/48) รองลงมาคือรูปแบบที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 20.0 (12/48) และรูปแบบที่ 4 คิดเป็นร้อยละ 6.2 (3/48) (ภาพ 2) นอกจากนี้พบรูปแบบ rep-PCR 3 รูปแบบที่เหมือนกันระหว่างตลาดทั้งสอง เช่น รูปแบบที่ 1 (P1) เลนที่ 2, 3 และ 7 (ภาพ 2A) กับเลนที่ 5, 6 และ 7 (ภาพ 2B)



ภาพ 2A

ภาพที่ 2 แสดงรูปแบบ rep-PCR ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว บริเวณพื้นที่ตลาด A (ภาพ 2A) และบริเวณพื้นที่ตลาด B (ภาพ 2B)



ภาพ 2B

ภาพที่ 2 แสดงรูปแบบ rep-PCR ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียว บริเวณพื้นที่ตลาด A (ภาพ 2A) และบริเวณพื้นที่ตลาด B (ภาพ 2B) (ต่อ)

หมายเหตุ: เลนที่ 1 และ 11 = DNA marker 1,000 bp (RBC Bioscience, Taiwan) และ DNA marker 100 bp (Genedirex) , เลนที่ 2-10 = ตัวอย่างเชื้อ CTX-R *E. coli* ในแต่ละพื้นที่ และ P1-P9 = รูปแบบ rep-PCR

เมื่อเปรียบเทียบผลรูปแบบ rep-PCR และลักษณะทางฟีโนไทป์ พบว่า เชื้อ CTX-R *E. coli* มีรูปแบบ rep-PCR และรูปแบบการดื้อยาที่เหมือนกันทั้งในตลาดเดียวกันหรือระหว่างตลาดทั้ง 2 แห่ง เช่น Caz Ak Cn Sxt Do Cip ซึ่งพบ 3 จาก 12 ไอโซเลทในรูปแบบที่ 3 (P3) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่มีรูปแบบ rep-PCR เหมือนกัน แต่มีรูปแบบการดื้อยาแตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลรูปแบบ rep-PCR และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ CTX-R *E. coli* ในแต่ละพื้นที่

รูปแบบ rep-PCR	จำนวนไอโซเลทเชื้อ	รูปแบบการดื้อยา
P1	ตลาด A = 2	Caz Ak Cn Sxt Do Cip
	ตลาด A = 1	Cn Sxt Do Cip
	ตลาด A = 1	-
	ตลาด B = 1	Caz Ak Cn Sxt Cip
	ตลาด B = 2	Caz Cn Sxt Do Cip
	ตลาด B = 3	Caz Ak Cn Sxt Do
	ตลาด B = 1	Caz Cn Sxt Cip
	ตลาด B = 1	Caz Ak Cn
	ตลาด B = 2	Caz Cn
	ตลาด B = 1	Caz
รวม	15	
P3	ตลาด A = 2, ตลาด B = 1	Caz Ak Cn Sxt Do Cip
	ตลาด A = 2	Caz Cn Sxt Cip
	ตลาด B = 1	Caz Cn Sxt Do Cip
	ตลาด B = 1	Cn Sxt Do Cip
	ตลาด B = 1	Caz Cn Do
	ตลาด B = 2	Caz Cn
	ตลาด B = 1	Caz
	ตลาด B = 1	-
รวม	12	
P4	ตลาด A = 1	Ak Cn Do Cip
	ตลาด A = 1	Caz Cn
	ตลาด B = 1	Caz Sxt Cip
รวม	3	
รวมทั้งหมด	30	

หมายเหตุ: Caz = ceftazidime, Ak = Amikacin, Cn = gentamicin, Sxt = trimethoprim/sulfamethoxazole, Do = doxycycline, Cip = ciprofloxacin และ - = ไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิด

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อ CTX-R *E. coli* เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ โดยแมลงวันจัดเป็นแมลงพาหะที่สามารถทำให้เชื้อดื้อยาแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว จากผลการศึกษาการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ CTX-R *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวจำนวน 200 ตัว บริเวณพื้นที่ของตลาด 2 แห่ง ในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก พบเชื้อ CTX-R *E. coli* ทั้งหมด 48 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นตลาด A ร้อยละ 31.2 และตลาด B ร้อยละ 68.7 ซึ่งตลาด B พบเชื้อ CTX-R *E. coli* มากกว่าตลาด A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

จากผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CTX-R *E. coli* ทั้งหมดดื้อยา ceftazidime และ gentamicin มากกว่าร้อยละ 70 และดื้อยา trimethoprim/sulfamethoxazole และ doxycycline มากกว่าร้อยละ 50 โดยเชื้อ CTX-R *E. coli* ทั้งหมดพบเป็น MDR สูงถึงร้อยละ 60.4 (29/48) การที่ไม่พบความแตกต่างของ MDR จากตลาดทั้งสอง อาจเป็นเพราะเชื้อดื้อยามีการแพร่กระจายภายในตลาดและระหว่างตลาด ทำให้เชื้อระหว่าง 2 ตลาด มีความเหมือนกัน หรือในตลาดมีการขายอาหารจำพวกเนื้อสดที่อาจมาจากแหล่งเดียวกัน ซึ่งเนื้อเหล่านั้นอาจมีการปนเปื้อนเชื้อดื้อยาผ่านการใช้ยาปฏิชีวนะในการปศุสัตว์ เป็นต้น

จากงานวิจัยนี้พบเชื้อ MDR ค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่ศึกษาเชื้อ *E. coli* ดื้อยาในแมลงพาหะทั้งในฟาร์มปศุสัตว์และชุมชน เช่น ในปี ค.ศ. 2013 มีการศึกษาแบคทีเรียแกรมลบในลำไส้ของแมลงวันหัวเขียวและแมลงวันอื่นๆ บริเวณท่าอากาศยานในประเทศจีน พบว่าทุกไอโซเลทเป็นเชื้อ MDR (Lui et al., 2013) ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 ได้ศึกษาเชื้อ *E. coli* จากแมลงวันบ้านบริเวณฟาร์มไก่เนื้อในประเทศสเปน พบว่าทุกไอโซเลทเป็นเชื้อ MDR (Solà-Ginés et al., 2015) และในปี ค.ศ. 2016 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันบ้านและแมลงวันหัวเขียว บริเวณมหาวิทยาลัย Jahangirnagar ประเทศบังกลาเทศ พบเชื้อ MDR ร้อยละ 55 (Parvez et al., 2016) จากการศึกษาเหล่านี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่ดื้อยาในกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 และเป็นสายพันธุ์ MDR นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ให้ผลแตกต่างกันออกไป โดยพบเชื้อ MDR ในปริมาณต่ำ เช่น ในปี 2010 มีการศึกษาเชื้อ *E. coli* ดื้อยา จากแมลงวันบริเวณคอกสัตว์และแมลงวันบ้านบริเวณฟาร์มโคของสาธารณรัฐเช็ก (Rybaricova et al., 2010) และการศึกษาแบคทีเรียดื้อยาในแมลงวันบ้านและแมลงสาบบริเวณชุมชนเมืองแทนเจียร์ ประเทศ (Bouamama et al., 2010) การพบจำนวนเชื้อ MDR ในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ อาจมีสาเหตุมาจากการควบคุมระบบสุขอนามัย ซึ่งในงานวิจัยนี้พบจำนวนเชื้อ MDR สูงถึงร้อยละ 60.4 อันเนื่องมาจากบริเวณที่ทำการศึกษาเป็นตลาดแบบเปิดโล่ง รวมทั้งเป็นแหล่งรวมของเศษอาหาร และสิ่งปฏิกูลต่างๆ ทำให้เชื้อดื้อยามีโอกาสแพร่กระจายได้มากขึ้นโดยมีแมลงวันหัวเขียวเป็นพาหะ รวมถึงการใช้ยาปฏิชีวนะสูงขึ้นในการเลี้ยงสัตว์ก่อนออกจำหน่ายที่ตลาด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ดื้อยาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์และผักที่จำหน่ายในตลาด (Rasheed et al., 2014)

ผลการศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ CTX-R *E. coli* ที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในบริเวณตลาด ด้วยวิธี rep-PCR แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาในแต่ละพื้นที่ รวมถึงสามารถบ่งบอกการแพร่กระจายภายในพื้นที่และระหว่างพื้นที่ได้ โดยผลของรูปแบบ rep-PCR ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากตลาดทั้ง 2 แห่ง พบว่ามีรูปแบบ rep-PCR และรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่เหมือนกัน (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า แมลงวันอาจเป็นพาหะและปัจจัยสำคัญต่อการแพร่กระจายเชื้อ *E. coli* ดื้อยาระหว่างตลาดทั้ง 2 แห่ง โดยระยะห่างของตลาดทั้ง 2 มีระยะห่างประมาณ 1 กิโลเมตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปี ค.ศ. 2005 พบว่า แมลงวันสามารถบินได้ไกลถึง 30 กิโลเมตร (Nazni et al., 2005) จึงเป็นไปได้ว่าแมลงวันหัวเขียวสามารถเป็นพาหะและแพร่กระจายเชื้อดื้อยาในระยะไกลได้ สำหรับเชื้อดื้อยาที่มีรูปแบบ rep-PCR เหมือนกัน แต่มีรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะเชื้อได้รับคุณสมบัติการดื้อยาในภายหลังผ่านทางหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ เช่น พลาสมิด และทรานสโปซอน เป็นต้น ทำให้เชื้อมีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ หรือกลายเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาหลายขนานได้ (von Wintersdorff et al., 2016)

มีหลายรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยา ซึ่งแมลงถือว่าเป็นพาหะที่สำคัญสามารถส่งเสริมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้ โดยในปี ค.ศ. 2009-2013 มีการศึกษาในประเทศต่างๆ เช่น สาธารณรัฐเช็ก สเปน เยอรมนี และ ญี่ปุ่น ได้ทำการการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาในบริเวณฟาร์มเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจเช่น ไก่ สุกรและวัว พบว่า เชื้อ *E. coli* ดื้อยามีการแพร่กระจายระหว่างอุจจาระของสัตว์กับแมลงวัน (Literak et al., 2009; Rybarikova et al., 2010; Usui et al., 2013; Solà-Ginés et al., 2015) และในปี ค.ศ. 2015 Salviati และคณะ

ได้แยกเชื้อ *E. coli* ดื้อยาบริเวณฟาร์มเลี้ยงสุกร พบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาระหว่างแมลงวันและสิ่งแวดล้อมภายในของฟาร์ม (Salviati et al., 2015) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาการแพร่กระจายของ *E. coli* ดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในพื้นที่ตลาดของจังหวัดพิษณุโลก แสดงให้เห็นถึงความสามารถของแมลงวันหัวเขียวในการเป็นพาหะของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาหลายชนิด และแมลงวันยังมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายเชื้อ *E. coli* ดื้อยาในตลาด เนื่องจากแมลงวันหัวเขียวส่วนใหญ่มักอาศัยอยู่ตามอาคารบ้านเรือน ตลาดสด โรงฆ่าสัตว์ โดยแหล่งเพาะพันธุ์ของแมลงวันชนิดนี้คือแหล่งที่มีอาหารเน่าเสีย กองขยะ เนื้อสด และสิ่งปฏิกูลต่างๆ (พิสิษฐ์, 2555) รวมถึงมีพฤติกรรมชอบตอมและสำรอกเวลากินอาหาร เชื้อจึงสามารถติดตามตัว รวมทั้งเข้าสู่ภายในระบบทางเดินอาหารของแมลง ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการถ่ายทอดยีนในแนวราบ สามารถเกิดขึ้นได้ทั่วไปในลำไส้ของแมลงวัน (Petridis et al., 2006) ทำให้เชื้อสามารถถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยา ส่งผลให้มีการเพิ่มโอกาสในการแพร่กระจายเชื้อดื้อยามากขึ้น นอกจากนี้มีรายงานแสดงให้เห็นว่าแมลงวันสามารถถ่ายทอดปัจจัยการก่อโรคต่างๆ ได้ (Akhtar et al., 2009) ทำให้ผู้บริโภคที่รับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อดื้อยาจากแมลงวัน อาจเกิดการติดเชื้อดื้อยาและนำไปสู่การเกิดโรคได้ ดังนั้นข้อมูลจากงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสาธารณสุขในการพัฒนาหรือใช้ประกอบการออกนโยบายเกี่ยวกับการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาโดยมีแมลงวันหัวเขียวเป็นพาหะในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตรการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือหรือวัสดุในการทำวิจัย รวมทั้งคณาจารย์ทุกท่านที่ให้บริการทางวิชาการเพื่อให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

พิสิษฐ์ สุนทราวิฑูร. แมลงวัน: บทบาทที่สำคัญทางการแพทย์. สงขลานครินทร์เวชสาร 2555; 30(3): 167-1.

จักรวาล ชมภูศรี. การควบคุมแมลงทางการแพทย์.พิมพครั้งที่ 3. นนทบุรี: หนังสือดีวัน; 2553.

Akhtar M, Hirt H, Zurek L. Horizontal transfer of the tetracycline resistance gene *tet*M mediated by pCF10 among *Enterococcus faecalis* in the house fly (*Musca domestica* L.) alimentary canal. Microbial ecology 2009; 58(3): 509-18.

Bouamamaa L, Sorlozano A, Laglaoui A, Lebbadi M, Aarab A, Gutierrez J. Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from Periplaneta americana and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. Journal of infection in developing countries 2010; 4(4): 194-201.

Boulesteix G, Le Dantec P, Chevalier B, Dieng M, Niang B, Diatta B. Role of *Musca domestica* in the transmission of multiresistant bacteria in the centres of intensive care setting in sub-Saharan Africa. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation 2005; 24(4): 361-5.

Literak I, Dolejska M, Rybarikova J, Cizek A, Strejckova P, Vyskocilova M, et al. Highly variable patterns of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from pigs, sympatric rodents, and flies. Microbial drug resistance (Larchmont, NY) 2009; 15(3): 229-37.

Liu Y, Yang Y, Zhao F, Fan X, Zhong W, Qiao D, et al. Multi-drug resistant gram-negative enteric bacteria isolated from flies at Chengdu Airport, China. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 2013; 44(6): 988-96.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection 2012; 18(3): 268-81.

Moghnieh R, Estaitieh N, Mugharbil A, Jisr T, Abdallah DI, Ziade F, et al. Third generation cephalosporin resistant Enterobacteriaceae and multidrug resistant gram-negative bacteria causing bacteremia in febrile neutropenia adult cancer patients in Lebanon, broad spectrum antibiotics use as a major risk factor, and correlation with poor prognosis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2015; 5: 11.

Nazni WA, Luke H, Wan Rozita WM, Abdullah AG, Sa'diyah I, Azahari AH, et al. Determination of the flight range and dispersal of the house fly, *Musca domestica* (L.) using mark release recapture technique. Tropical biomedicine 2005; 22(1): 53-61.

Parvez, A.K., Marzan, M., Khatun, F., Ahmed, F., Mahmud, S.A., & Rahman, S.R. Isolation of Multidrug Resistant Pathogenic Bacteria from Common Flies in Dhaka, Bangladesh. Journal of Entomology 2016; 13: 141-147.

Petridis M, Bagdasarian M, Waldor MK, Walker E. Horizontal transfer of Shiga toxin and antibiotic resistance genes among *Escherichia coli* strains in house fly (Diptera: Muscidae) gut. Journal of medical entomology 2006; 43(2): 288-95.

Rasheed MU, Thajuddin N, Ahamed P, Teklemariam Z, Jamil K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2014; 56(4): 341-6.

Rybarikova J, Dolejska M, Materna D, Literak I, Cizek A. Phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from symbovine flies, cattle and sympatric insectivorous house martins from a farm in the Czech Republic (2006-2007). Research in veterinary science 2010; 89(2): 179-83.

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.

Sasaki T, Kobayashi M, Agui N. Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157: H7 to food. Journal of medical entomology 2000; 37(6): 945-9.

Solà-Ginés M, González-López JJ, Cameron-Veas K, Piedra-Carrasco N, Cerdà-Cuéllar M, Migura-Garcia L. Houseflies (*Musca domestica*) as Vectors for Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Spanish Broiler Farms. Applied and environmental microbiology 2015; 81(11): 3604-11.

Themphachana M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Seto K, Rattanachuay P, Singkhamanan K, et al. First report in Thailand of a stx-negative *Escherichia Coli* 0157 strain from a patient with diarrhea. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 2014; 45(4): 881-9.

Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The role of flies in spreading the extended-spectrum beta-lactamase gene from cattle. Microbial drug resistance (Larchmont, NY) 2013; 19(5): 415-20.

van Duin D, Paterson D. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. Infectious disease clinics of North America 2016; 30(2): 377-90.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 1991; 19(24): 6823-31.

von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Frontiers in Microbiology 2016; 7: 173.