อภินันทนาการ

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการ การตรวจหาแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ class 1 integron ในแหล่งน้ำ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 12 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1478885
เลขเรียกหนังสือ 3 QR
97
.A58
W2718
2557

โดย

ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์

กันยายน 2557

สัญญาเลขที่ R2557B040

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการ การตรวจหาแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ class 1 integron ในแหล่งน้ำ


หัวหน้าโครงการวิจัย

รศ.ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 0-5596-4612

โทรสาร 0-5596-4770

E-mail pannikan@nu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ. ดร. ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 0-5596-4703

โทรสาร 0-5596-4770

E-mail tawatchais@nu.ac.th



สนับสนุนโดย มหาวิทยาลัยนเรศวร

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายอรรถพล ตันไสว นายทยาวีร์ ร่มแก้ว และ นางสาวภัทรพร คงไทย นิสิตบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาจุลชีววิทยาที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องเครื่องมือ รวมทั้งสถานที่ๆใช้ในการทำวิจัย

(ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์)
หัวหน้าโครงการวิจัย

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | i |
| บทคัดย่อ | iii |
| บทนำ | 1 |
| ระเบียบวิธีวิจัย | 7 |
| ผลและอภิปรายผลการวิจัย | 10 |
| สรุปผลการศึกษา | 28 |
| เอกสารอ้างอิง | 29 |
| ภาคผนวก | 33 |

# บทคัดย่อ

การแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ จัดเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบถึงสุขภาพของประชาชนเป็นอย่างมาก ในการศึกษานี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 23 ตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่แตกต่างกัน 6 แหล่ง คือ แม่น้ำ ($n$=4) อ่างเก็บน้ำ ($n$=6) คลอง ($n$=5) ท่อน้ำทิ้ง ($n$=1) น้ำประปา ($n$=2) และน้ำบาดาล ($n$=5) ในเขตจังหวัดพิษณุโลกและนครสวรรค์ ทำการแยกเชื้อ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยา cephalosporin รุ่น 3 โดยการนำตัวอย่างน้ำมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่เติมยา cefotaxime พบว่าแยกเชื้อ Enterobacteriaceae ได้ทั้งหมด 55 ไอโซเลท จากตัวอย่างน้ำ 18 ตัวอย่าง ยกเว้นน้ำบาดาล 5 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการทดสอบทางชีวเคมีและการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทเป็น *Escherichia coli* การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทจัดเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน และพบเชื้อ 5 ไอโซเลท (ร้อยละ 28) ลดความไวต่อยา imipenem ซึ่งจัดเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูง การตรวจหา class 1 integron พบว่าเชื้อ 34 ไอโซเลท มียีน *intI1* (ร้อยละ 62) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์หา gene cassette โดยวิธี PCR และการหาลำดับเบส พบว่ามี gene cassette ที่แตกต่างกัน 2 ขนาด คือ 1,600 bp (*dfrA17-aadA5*) ทำให้ดื้อยา trimethoprim และ spectinomycin และ 2,500 bp (*aacA4-catB3-dfrA1*) ทำให้ดื้อยา gentamicin, chloramphenicol และ trimethoprim พบในเชื้อ 13 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งการตรวจพบยีนดื้อยาเหล่านี้บน class 1 integron อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการแพร่กระจายของยีนดื้อยา ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาหลายขนานในแหล่งน้ำต่างๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต่อไป

## Abstract

The spreading of antibiotic resistant bacteria in aquatic environment is a threat to human health and becoming an increasing worldwide concern. In this study, 23 water samples were collected from various aquatic environments (4 rivers, 6 reservoirs, 5 canals, 1 wastewater, 2 tapwater and 5 groundwater) in Phitsanulok and Nakhonsawan provinces. Samples were inoculated onto MacConkey agar supplemented with cefotaxime for isolation of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to broad spectrum cephalosporin. A total of 55 Enterobacteriaceae isolates were recovered from 18 water samples. Five samples from groundwater yielded negative results. Species identification by biochemical tests and 16S rDNA sequencing showed that all isolates were *Escherichia coli*. Antimicrobial susceptibility testing showed that all isolates were resistant to multiple antibiotics. Reduced susceptibility to imipenem, the high efficacy antibiotic, was found in 5 isolates (28%). The presence of class 1 integrons was investigated in all *E. coli* isolates. Thirty-four isolates (62 %) were positive for class 1 integron as determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers for *intI1* gene. However, analysis of variable regions revealed 2 different types of gene cassettes: *dfrA17-aadA5* (1,600 bp) and *aacA4-catB3-dfrA1* (2,500 bp) which were found in 13 and 6 isolates, respectively. The presence of integron-associated antibiotic resistant genes The results from this study demonstrate that multidrug resistant *E. coli* could colonize different aquatic environments. Further surveillance of antibiotic resistant bacteria in various environments is needed to prevent the spread of these organisms within the community.

# 1. บทนำ (Introduction)

ปัจจุบัน เชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่างๆได้สร้างปัญหาที่สำคัญมาก คือ การดื้อยาต้านจุลชีพซึ่งเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเกิดจากการที่เชื้อมีการปรับตัวด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะลดประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ ปัญหาของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่มีรายงานกันมากนั้นมักเป็นเชื้อที่พบในโรงพยาบาล เพราะเห็นได้ชัดเจนจากการเกิดปัญหาในการรักษาโรค เนื่องจากเชื้อจะไม่ถูกยับยั้งหรือทำลายด้วยยาต้านจุลชีพที่เดิมเคยใช้ได้ผล อย่างไรก็ตาม การดื้อต่อยาต้านจุลชีพนั้นพบมากในเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เป็นเพราะมีการใช้ยาต้านจุลชีพกันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งในคนและสัตว์ นอกจากนี้ในด้านอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ยังมีการเติมยาต้านจุลชีพลงไปในอาหารสัตว์ (food additive) อีกด้วย ซึ่งยาต้านจุลชีพเหล่านี้ ส่วนใหญ่ก็จะมีการปนเปื้อนลงไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและน้ำ สำหรับน้ำเสียในหน่วยงานต่างๆ รวมทั้งในโรงพยาบาลนั้น ถึงแม้ว่าจะมีระบบบำบัดเพื่อที่จะกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อนที่จะถูกปล่อยออกสู่ชุมชนเพื่อไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรค แต่ก็มีรายงานหลายฉบับที่พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียนั้นไม่สามารถกำจัดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมากมายทั้งที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา ยีนดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียมักพบอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) เมื่อเชื้อเหล่านี้มาอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ก็อาจเกิดการถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยานี้ไปยังแบคทีเรียอื่นๆได้ ในปัจจุบันแหล่งน้ำเกือบทุกแห่งมียาต้านจุลชีพปนเปื้อนอยู่ทั้งที่ผิวน้ำและใต้ผิวน้ำ ยาต้านจุลชีพบางชนิดพบได้ในน้ำใต้ดินที่อยู่ลึกลงไปถึง 10 เมตรซึ่งทำให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม โดยส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อยาหลายชนิด และเกิดการดื้อยาที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ (Zhang et al., 2009) ผลที่ตามมาจากการที่ยาต้านจุลชีพที่ปนเปื้อนลงไปในสิ่งแวดล้อมนั้นคือจะไปกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมซึ่งปกติแล้วจะเป็นเชื้อที่ไม่ดื้อยากลายเป็นเชื้อดื้อยาขึ้นมาได้ และแบคทีเรียดื้อยาเหล่านี้สามารถแพร่จากสิ่งแวดล้อมไปยังคนและสัตว์ได้

แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่พบว่ามีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง คือ แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในคนและสัตว์มากมาย เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ฯลฯ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เจริญเติบโตง่าย พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นโอกาสที่จะเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์ก็มีมาก ถ้าเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดและเกิดการติดเชื้อในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ก็จะมีอาการรุนแรง และอาจเสียชีวิตได้

ยาต้านจุลชีพที่ใช้กันมากที่สุดคือยาในกลุ่ม beta-lactam เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ สำหรับในแบคทีเรียแกรมลบนั้น กลไกหลักที่เชื้อดื้อต่อยา beta lactam ได้แก่การที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ออกมาทำลายยา ปัจจุบันมีรายงานของเอนไซม์ beta-lactamase มากกว่า 400 ชนิดที่แตกต่างกัน ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase มีชื่อว่า *bla* มีรายงานหลายฉบับพบว่าสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน และน้ำ เป็น reservoir ที่สำคัญของยีน *bla* มีรายงานการพบ ยีน *bla* ในแบคทีเรียหลายชนิดในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงโค กระบือ (Srinivasan et al., 2005) บ่อบำบัดน้ำเสีย (Antunes et al. 2006; Taviani et al. 2008) และแหล่งน้ำธรรมชาติ (Poppe et al., 2006) ตัวอย่างของแบคทีเรียดื้อยาที่พบได้แก่ *Aeromonas* spp. (Jacobs and Chenia, 2007), *Enterobacter* spp. และ *Staphylococcus* spp. (Volkmann et al., 2004), *Salmonella* spp., (Moura et al., 2007) และ *Vibrio* spp. (Taviani et al., 2008) ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase อีกชนิดหนึ่งคือ *ampC* ซึ่งพบมากในแบคทีเรียแกรมลบนั้น มีรายงานการพบยีนนี้ในเชื้อที่แยกได้จากน้ำเสีย แหล่งน้ำธรรมชาติ รวมทั้ง น้ำดื่มด้วย (Schwartz et al., 2003)

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาได้มีการผลิตยา beta-lactam ชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมามากมายเพื่อใช้ทำลายแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase อย่างไรก็ตามการใช้ยาต้านจุลชีพกันมากเกินความจำเป็นโดยเฉพาะยาในกลุ่ม expanded-spectrum beta-lactams เช่น cefotaxime, ceftazidime, aztreonam และ carbapenems ซึ่งใช้ในกันมากในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบ เกิด selective pressure ทำให้แบคทีเรียมีการพัฒนาตัวเองให้ดื้อต่อยาได้อย่างรวดเร็วโดยการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติการการทำลายยาเหล่านี้ เรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า extended spectrum beta-lactamase (ESBL) และ carbapenemase สำหรับยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL และ carbapenemase นั้น นอกจากพบมากในเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยแล้ว ยังมีรายงานการพบในสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น มีรายงานการตรวจพบยีนที่สามารถย่อยสลาย imipenem, $bla_{IMP-22}$, จากเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากน้ำเสียในชุมชนในประเทศอิตาลี (Pellegrini et al., 2009) และมีการตรวจพบยีน $bla_{CTX}$ ที่สามารถย่อยสลาย cefotaxime, ceftazidime จากเชื้อ *E. coli* จากแหล่งน้ำในประเทศอังกฤษ เชค รีพับบลิก และ จีน (Lu et al., 2010; Dhanji et al., 2011; Dolejska et al., 2011) เป็นต้น

สำหรับยาต้านจุลชีพกลุ่มอื่นๆ เช่น aminoglycoside, tetracycline, macrolide, quinolone, vancomycin ฯลฯ นั้น แบคทีเรียที่ดื้อยาเหล่านี้ก็สามารถตรวจพบได้ในสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกันทั้งในบ่อบำบัดน้ำเสีย (da Silva et al. 2007) แม่น้ำ (Park et al. 2003) และแหล่งน้ำชุมชน (Taviani et al. 2008)

การศึกษาความไวของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากสิ่งแวดล้อมต่อยาต้านจุลชีพในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย พบว่ามีแนวโน้มการดื้อยาหลายชนิดเพิ่มขึ้น และมีการดื้อยาในระดับสูงอีกด้วย เชื้อแบคทีเรียที่เคยไวต่อยาแล้วเกิดการดื้อยาในภายหลังนั้น อาจเกิดมาจากการกลายพันธุ์ (mutation) หรือเกิดจากเชื้อได้รับยีนดื้อยา ซึ่งถ่ายทอดจากเชื้อที่ดื้อยาอยู่ก่อนแล้ว โดยกระบวนการ horizontal gene transfer เนื่องจากยีนดื้อยาหลายชนิดมักพบอยู่บน mobile genetic elements แต่ที่พบบ่อยคือยีนดื้อยาเหล่านี้มักจะสอดแทรกใน gene cassette ที่อยู่บน class 1 integron และ integron มักพบอยู่บน conjugative plasmid หรือ transposon จึงทำให้สามารถที่จะพายีนดื้อยาเคลื่อนที่ไปได้ ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยาเหล่านี้ไปยังแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์กันก็ได้ ซึ่ง integron จัดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการแพร่กระจายของยีนดื้อยา ทำให้สามารถที่จะถ่ายทอดยีนดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว

Integron ถูกค้นพบโดย Hall และ Collis (Hall and Collis, 1995) พบมากในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็น nosocomial pathogen และพบได้ทั่วโลก integron จัดเป็น genetic elements ที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปคือสามารถจับ gene cassettes (ส่วนใหญ่เป็นยีนดื้อยา) เข้าไปแทรกใน integron โดยใช้กลไก site-specific recombination ในปัจจุบันนี้สามารถแบ่ง integrons ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ mobile integrons ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย และ chromosomal integrons ซึ่งไม่มีบทบาทในการดื้อยา แต่จะมีบทบาทในเรื่องของวิวัฒนาการและการดำรงชีวิตของเซล สำหรับ mobile integrons นั้น แบ่งได้เป็น 5 classes (Cambray et al., 2010) ตามความแตกต่างของลำดับเบสของ integrase gene อย่างไรก็ตาม integron ที่มีบทบาทมากในเรื่องการดื้อยาได้แก่ class 1 integron ซึ่งมีโครงสร้างหลักๆดังนี้ (รูป 1)

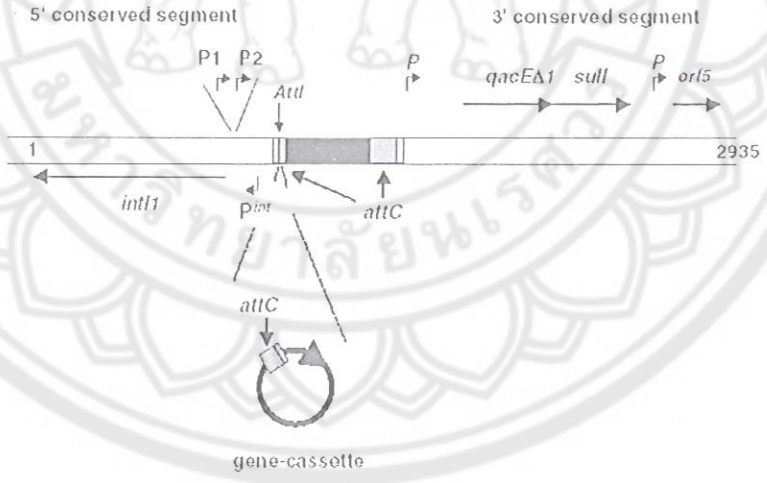
1. 5'conserved sequence (5'-CS) ซึ่งตำแหน่งนี้จะประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ *intI1* (integrase gene), attachment site (*attI1*) และ promoter โดยเอนไซม์ integrase จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการ site-specific recombination ของ gene cassettes ส่วน *attI1* นั้นจะทำหน้าที่เป็น recognition site สำหรับเอนไซม์ integrase ที่จะเข้ามาตัดและเชื่อมต่อส่วนของ gene cassettes เข้ากับส่วนของ integron สำหรับ promoter นั้น promoters ที่อยู่ใน 5' CS ของ integron ช่วย ทำหน้าที่คล้ายกับเป็น natural expression vector สำหรับช่วยในการแสดงออกของ gene cassette ที่สอดแทรกเข้าไปใน integron

2. Gene cassettes คือกลุ่มของยีนดื้อยาโดยส่วนใหญ่แล้วมักจะเป็นยีนที่ไม่มี promoter หรือมีความเป็น promoter ที่ต่ำ แล้วก็จะตามด้วย attachment site (*attC*) หรือ 59-base element (59-be) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการจดจำตำแหน่งของ integrase ในระหว่างที่

เกิด recombination ตัวอย่างของ gene cassette ได้แก่ *bla/oxa* (ดื้อยา beta-lactam), *cml/cat* (ดื้อยา chloramphenicol), *aad/aac* (ดื้อยา aminoglycoside), *dfr* (ดื้อยา trimethoprim), *arr* (ดื้อยา rifampin), *ere* (ดื้อยา erythromycin), *qnr* (ดื้อยา quinolone), *imp* (ดื้อยา carbapenem) เป็นต้น (Partridge et al., 2009)

3. 3'conserved sequence (3'-CS) โดยทั่วไปแล้วตำแหน่งนี้ก็จะมีส่วนของยีนที่ดื้อต่อ quaternary ammonium compound (*qacEΔ1*), sulphonamide (*sulI*) และมีส่วนของ open reading frame (ORF) ที่มีบทบาทต่อการดื้อยาชนิดต่างๆ

แบคทีเรียที่มี integron อยู่จะมีความสามารถที่จะพัฒนาการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดได้อย่างรวดเร็ว และยังช่วยให้สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาเหล่านี้ไปยังสปีชีส์เดียวกันหรือคนละสปีชีส์ได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่มี integron ที่มียีนดื้อยาจึงเป็นปัญหาที่สำคัญในการใช้ยาต้านจุลชีพได้ในอนาคต (Fluit et al., 2004)




รูป 1 แสดง class 1 integron โดยที่ P1 คือ promoter สำหรับการแปลรหัสของ gene cassettes, P2 คือ promoter ตัวที่สองซึ่งมักจะไม่ทำงาน, P คือ promoter สำหรับยีน *qacEΔ1* และ *sulI* (Fluit et al., 2004)

การศึกษายีนดื้อยาจากแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่พบบน class 1 integron นั้น มีรายงานจากหลายประเทศทั่วโลก ตัวอย่างเช่น การศึกษาในประเทศสวีเดน พบเชื้อในแฟมิลี่ Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella* spp. และ *Shigella* spp.) และ *Acinetobacter* spp. จากบ่อบำบัดน้ำเสีย มีการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam, quinolone, tetracycline และ trimethoprim-sulfamethoxazole และยีนดื้อยาเหล่านี้ก็อยู่บน class 1 integron (da Silva et al., 2007) การศึกษาในประเทศฝรั่งเศสพบเชื้อ *E. coli* ที่มียีน *aadA* (ดื้อ aminoglycoside) และ *dfr* (ดื้อ trimethoprim) อยู่บน class 1 integron นอกจากนี้เชื้อเหล่านี้ยังดื้อยา tetracycline, amoxicillin และ ticarcillin อีกด้วย (Laroche et al., 2009) การศึกษาในแหล่งน้ำจำนวน 10 แห่งในประเทศตุรกีพบเชื้อในกลุ่ม coliforms ดื้อยา ampicillin, tetracycline, trimethoprim, streptomycin และ nalidixic acid นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเหล่านี้มียีน *qnrS* (ดื้อยา nalidixic acid) บน class 1 integron ซึ่งอยู่บน transferrable plasmid อีกด้วย ทำให้สามารถแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้ (Ozgumus et al., 2009) ส่วนในทวีปเอเชียเองก็มีรายงานการศึกษาในประเทศเกาหลีที่พบเชื้อ *E. coli* จากแม่น้ำในกรุงโซล ที่ดื้อยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 10 ชนิด พบยีน *aadA1*, *dfr12-orfF-aadA2* และ *dfr17-aadA5* อยู่บน class 1 integron และยังพบว่าเชื้อมีการสร้าง ESBL อีกด้วย จึงได้ตั้งสมมติฐานว่าแม่น้ำเป็น reservoir ที่สำคัญสำหรับเชื้อดื้อยาและยีนดื้อยา (Kim et al., 2008) การศึกษาในประเทศจีน มีการตรวจพบยีน *tet* (ดื้อยา tetracycline) ในเชื้อจากทะเลสาบ แม่น้ำแยงซี และบ่อบำบัดน้ำเสีย ในมณฑล Jiangsu (Zhang et al., 2009)

สำหรับการศึกษายีนดื้อในเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมเช่น ดิน และน้ำในประเทศไทยนั้นยังมีจำกัด โดยในปี ค.ศ. 2003 มีรายงานของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่แยกจากบ่อปลาดื้อต่อยา erythromycin และ tetracycline ในระดับสูง นอกจากนี้ยังตรวจพบยีน *erm* (ดื้อ erythromycin) และ *tet* (ดื้อ tetracycline) ในเชื้อมากถึง 87% และ 95% ตามลำดับ (Petersen and Dalsgaard, 2003) การศึกษาในเชื้อ *Enterococcus* spp. มีรายงานเพิ่มเติมในปี ค.ศ. 2006 คือพบเชื้อในอาหารแช่แข็งและในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ดื้อยา chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole และ vancomycin สูง และได้มีการตั้งสมมติฐานว่าอาจจะมีการถ่ายทอดยีนดื้อยาจากเชื้อในสิ่งแวดล้อมไปสู่เชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ (Tansuphasiri et al., 2006) ในปี ค.ศ. 2007 ได้มีรายงานการศึกษาเชื้อดื้อยาจากแหล่งน้ำในประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้แก่ มาเลเซีย เวียดนามและ ประเทศไทย พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา chloramphenicol อยู่หลายจีนัส เช่น *E. coli*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Acinetobacter baumannii* รวมทั้งมีการตรวจพบยีน *cmr* (ดื้อ chloramphenicol) ในเชื้อ *E. coli* ด้วย (Huys et al., 2007) สำหรับการดื้อยา quinolone นั้น มีการศึกษาในปี ค.ศ. 2007 พบว่ามีเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสัตว์ ผัก และ

น้ำแข็งในเขตกรุงเทพและปริมณฑล มีการดื้อยา nalidixic acid และบางไอโซเลทยังดื้อยา ciprofloxacin อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการดื้อยานี้เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* (Sianglum et al., 2007) สำหรับยีนดื้อยาในเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่บน class 1 integron มีการตรวจพบยีนดื้อยา tetracycline (*tet*) และ sulfonamide (*sulI*) ในเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา (Agersø and Petersen, 2007)

การศึกษาวิจัยเรื่องแบคทีเรียดื้อยานั้น นอกจากศึกษาในเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลแล้ว ควรศึกษาในเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมด้วย เนื่องจากจะส่งผลกระทบต่อประชาชนที่อาศัยอยู่ในบริเวณใกล้เคียง สำหรับในประเทศไทย เนื่องจากการสาธารณสุขยังไม่ทั่วถึง นอกจากนี้ประชาชนส่วนใหญ่มีอาชีพเกษตรกรรม มีการสัมผัสดินและน้ำอยู่เสมอ ดังนั้นโอกาสที่จะได้รับเชื้อก็มีมาก ถ้าได้รับเชื้อดื้อยาเข้าไปก็อาจจะทำให้เกิดปัญหาในการรักษา เกิดความเสียหายต่อชีวิตและทรัพย์สินได้ จากข้อมูลทางวิชาการในปัจจุบันจะเห็นได้ว่าในต่างประเทศมีรายงานการพบความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียดื้อยาที่พบในโรงพยาบาลกับในสิ่งแวดล้อมหลายฉบับ แต่การศึกษาแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมในประเทศไทยนั้น ยังมีจำกัด ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาเรื่องรูปแบบของการดื้อยา แต่ในเรื่องของชนิดของยีนดื้อยาและการตรวจสอบว่ายีนเหล่านั้นอยู่บน class 1 integron ด้วยหรือไม่นั้น ยังมีน้อย การตรวจพบยีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ integron จากเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในชุมชน ต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

เพื่อศึกษาการดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae และชนิดของยีนดื้อยาบนอินทิกรอนในเชื้อที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ

## 3. คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

antibiotic resistance, Enterobacteriaceae, water environment, integron

## 4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

แยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae และศึกษาชนิดของยีนดื้อยาบนอินทิกรอนในเชื้อที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตจังหวัดพิษณุโลก และนครสวรรค์

## 5. ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and Methods)

5.1 การแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยาต้านจุลชีพจากแหล่งน้ำ

แยกแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae จากแหล่งน้ำทั้งหมด 23 แห่ง (แม่น้ำ อ่างเก็บน้ำ คลอง ท่อน้ำทิ้ง น้ำประปา และน้ำบาดาล) โดยในแต่ละแหล่งเก็บตัวอย่างน้ำ 500 ml นำตัวอย่างน้ำเก็บใส่ภาชนะที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 4° C เพื่อนำมายังห้องปฏิบัติการ เมื่อนำตัวอย่างน้ำมาที่ห้องปฏิบัติการแล้ว นำน้ำตัวอย่าง 10 ml ใส่ลงใน EE broth (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) 90 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างน้ำมาทำ serial dilution และ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่มีการเติมยา cefotaxime ความเข้มข้น 2 µg/ml บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่เจริญ แล้วนำมา streak บนอาหาร Tryptic soy agar (Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, UK) พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นโดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี (เช่น การเจริญบน Eosin Methylene Blue agar) และยืนยันโดยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA โดยวิธี PCR และ sequencing (Lane et al., 1985)

5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำ

พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 5.1 โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี (เช่น การเจริญบน Eosin Methylene Blue agar) และยืนยันโดยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA โดยวิธี PCR และ sequencing

สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA โดยวิธี PCR นั้น นำโคโลนีของเชื้อผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้เข้ากัน ปิเปตมา 1 µl เพื่อใช้เป็น template โดย primer ที่ใช้คือ 24F และ 1492R (ตาราง 1) ปฏิกิริยาของการทำ PCR ประกอบด้วย template, 10 µM forward primer, 10 µM reverse primer, 200 µM dNTPs, 1.5 µM $MgCl_2$, 0.5 U *Taq* polymerase (Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor Darul Ehsan, Malaysia), 1x amplification buffer และ sterile deionized water ปรับปริมาตรรวม 50 µl สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ 94°C 5 นาที 1 รอบ, 94°C 45 วินาที, 50°C 45 วินาที 72°C 2 นาที, จำนวน 30 รอบ และ 72°C 7 นาที 1 รอบ ตรวจผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GF-1 PCR Clean-up Kit ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor Darul Ehsan, Malaysia) และทำการหาลำดับเบสโดยจะส่งไปที่บริษัท First BASE

Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีรายงาน ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์จากเวบไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

5.3 การตรวจหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Disk diffusion test โดยเตรียมความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ($1.5 \times 10^8$ cfu/ml) จากนั้น swab เชื้อที่ต้องการทดสอบบน Mueller-Hinton agar (Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, UK) แล้วทำการวาง antibiotic disk ลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของ inhibition zone จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานที่กำหนดไว้โดย Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI, 2013) ยาต้านจุลชีพที่ใช้มีทั้งหมด 13 ชนิด แบ่งเป็นยาในกลุ่ม beta-lactam 5 ชนิด (ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, imipenem และ aztreonam) aminoglycoside 4 ชนิด (streptomycin, kanamycin, gentamicin และ amikacin) และยาอื่นๆ อีก 4 ชนิด คือ chloramphenicol, ciprofloxacin, tetracycline, และ trimethoprim/sulfamethoxazole (Oxoid, Basingstoke, UK) รายงานผลความไวต่อยา 3 ระดับคือ ไวต่อยา (susceptible) ไวต่อยาระดับกลาง (intermediate) และ ดื้อยา (resistant)

5.4 การตรวจหาชนิดของยีนดื้อยาโดยวิธี PCR และ sequencing

เนื่องจากยีนดื้อยาหลายชนิดมักอยู่บน mobile genetic element โดยเฉพาะอย่างยิ่ง class 1 integron เนื่องจาก integron ในแต่ละ class นั้นจะมีความแตกต่างที่เอนไซม์ integrase ดังนั้นการตรวจหา class 1 integron นี้จะเริ่มต้นโดยใช้ specific primer ที่สามารถจับกับ *intI1* ได้

นำโคโลนีของเชื้อผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้เข้ากัน ปิเปตมา 1 µl เพื่อใช้เป็น template โดยในขั้นแรกจะใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *intI1* (ตาราง 1) เชื้อที่มีการตรวจพบยีน *intI1* แสดงว่าเชื้อมี class 1 integron อยู่ จะทำการตรวจหาส่วนของ variable region ที่อยู่ระหว่าง 5′CS และ 3′CS ซึ่งสามารถตรวจหา gene cassette ที่มีกลุ่มของยีนดื้อยาชนิดต่างๆ ได้ โดยใช้ primer In5′CS-In3′CS (ตาราง 1) ที่จำเพาะกับส่วนของ 5′CS และ 3′CS ของ class 1 integron สำหรับ positive controls นั้นจะใช้ยีน *intI1* และ gene cassette จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Kiddee et al., 2013) และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control ปฏิกิริยาของการทำ PCR ประกอบด้วย template, 10 µM forward primer, 10 µM reverse primer, 200 µM dNTPs, 1.5 µM $MgCl_2$, 0.5 U *Taq* polymerase (Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor Darul Ehsan, Malaysia), 1x

amplification buffer และ sterile deionized water ปรับปริมาตรรวม 50 µl สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ 94°C 5 นาที 1 รอบ, 94°C 45 วินาที, 48°C 45 วินาที 72°C 45 วินาที (7 นาที สำหรับการตรวจหา gene cassette), จำนวน 30 รอบ และ 72°C 7 นาที 1 รอบ ตรวจผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ และทำการหาลำดับเบส ตามวิธีการในข้อ 5.2

ตาราง 1 แสดง primers ที่ใช้ในการตรวจหา 16S rDNA และ class 1 integron

| Primer | Sequence (5′ → 3′) | Expected PCR product (bp) | References |
|---|---|---|---|
| 24F | AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG | 1500 | Lane et al., 1985 |
| 1492R | TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T | | |
| int1F | GCA TCC TCG GTT TTC TGG | 457 | Shibata et al., 2003 |
| int1R | GGT GTG GCG GGC TTC GTG | | |
| In5'CS | GGC ATC CAA GCA GCA AG | Variable | Lévesque et al., 1995 |
| In3'CS | AAG CAG ACT TGA CCT GA | | |

## 6. ผลและอภิปรายผลการวิจัย (Results and Discussion)

### 6.1 การแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยาต้านจุลชีพจากแหล่งน้ำ

การแยกเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยาต้านจุลชีพจากตัวอย่างน้ำทั้งหมด 23 ตัวอย่าง ได้แก่ แม่น้ำ (*n*=4) อ่างเก็บน้ำ (*n*=6) คลอง (*n*=5) ท่อน้ำทิ้ง (*n*=1) น้ำประปา (*n*=2) และน้ำบาดาล (*n*=5) พบว่ามีแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime ในตัวอย่างน้ำจำนวน 18 ตัวอย่าง (ตาราง 2) รูปตัวอย่างแสดงการแยกเชื้อแสดงไว้ดังรูป 2 และ 3 โดยพบเชื้อทั้งในแม่น้ำ อ่างเก็บน้ำ คลอง ท่อน้ำทิ้ง และในน้ำประปา ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ คือ น้ำบาดาล 5 ตัวอย่าง อาจเป็นเพราะน้ำบาดาลเป็นน้ำที่กักเก็บอยู่ในช่องว่างภายในชั้นดิน ชั้นหิน ผ่านการกรองตามธรรมชาติ จึงจัดเป็นน้ำที่สะอาด และจะมีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ จึงมีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคน้อยหรือไม่มีเลย (Soge et al., 2009; Datta et al., 2013)

ตาราง 2 แสดงตัวอย่างน้ำ และ เชื้อที่แยกได้

| แหล่งน้ำ | จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ | จำนวนเชื้อ |
|---|---|---|
| แม่น้ำ (*n*=4) | 4 | 15 |
| อ่างเก็บน้ำ (*n*=6) | 6 | 16 |
| คลอง (*n*=5) | 5 | 11 |
| ท่อน้ำทิ้ง (*n*=1) | 1 | 7 |
| น้ำประปา (*n*=2) | 2 | 6 |
| น้ำบาดาล (*n*=5) | 0 | 0 |
| รวม (n=23) | 18 | 55 |

A. B.

รูป 2 แสดงการแยกเชื้อ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime จากแหล่งน้ำที่ให้ผลเป็นลบ

A. จานอาหาร MacConkey agar

B. จานอาหาร MacConkey agar + 2 µg/ml cefotaxime

A. B.

รูป 3 แสดงการแยกเชื้อ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime จากแหล่งน้ำที่ให้ผลเป็นบวก

A. จานอาหาร MacConkey agar

B. จานอาหาร MacConkey agar + 2 µg/ml cefotaxime

เชื้อที่พบทั้งหมดจัดเป็น lactose fermenter (ให้โคโลนีสีชมพูบน MacConkey agar) (รูป 3) จำนวน 55 ไอโซเลท และเมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้น โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบน EMB agar พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทให้โคโลนีสีเขียวมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) เมื่อนำมายืนยันโดยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ก็พบว่าเป็น *Escherichia coli* ทั้งหมด ตัวอย่างลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของเชื้อ *E. coli* แสดงไว้ในรูป 4

```
E.coli      AATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAG
06C03_16s   ------------------------------------------------------------

E.coli      TCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT
06C03_16s   ------------------------------------------------------------

E.coli      GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATA
06C03_16s   ---.........................................................

E.coli      ACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
06C03_16s   ............................................................

E.coli      CGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      TAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
06C03_16s   ............................................................

E.coli      ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCC
06C03_16s   ............................................................

E.coli      TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
06C03_16s   ............................................................
```

```
E.coli      CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGA
06C03_16s   ............................................................

E.coli      ATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAA
06C03_16s   ............................................................

E.coli      ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCC
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
06C03_16s   ............................................................

E.coli      TCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGA
06C03_16s   ............................................................

E.coli      CCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT
06C03_16s   ............................................................

E.coli      CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTT
06C03_16s   ............................................................

E.coli      CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTA
06C03_16s   ............................................................

E.coli      GCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC
06C03_16s   ...........................-----------------------------------

E.coli      AAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA
06C03_16s   ---------------------------------------
```

รูป 4 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อ *E. coli* (gb|CP008801.1) และเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime จากแหล่งน้ำ

เครื่องหมาย . คือ ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

เครื่องหมาย - (gap) คือ ส่วนที่ไม่ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

6.2 การตรวจหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ศึกษาความไวของเชื้อทั้ง 55 ไอโซเลทต่อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 13 ชนิด โดยวิธี Disk diffusion test เมื่อทำการวัดขนาดของ inhibition zone แล้วนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ CLSI (CLSI, 2013) ซึ่งจะสามารถแปลผลได้ 3 ระดับคือ เชื้อมีความไวต่อยา (S: susceptible) เชื้อมีความไวต่อยาระดับกลาง (I: intermediate) และเชื้อมีการดื้อยา (R: resistant) ผลการศึกษาแสดงไว้ในตาราง 3 และ ตาราง 4

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อดื้อต่อยาทั้งในกลุ่ม beta-lactams รวมทั้งยา cepharosporin รุ่นที่ 3 (เช่น cefotaxime และ ceftazidime) และ non-beta lactams เช่น aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol, quinolones และ trimethoprim/sulfamethoxazole ซึ่งยาต้านจุลชีพเหล่านี้จัดเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* โดยเชื้อทุกไอโซเลทดื้อยา ampicillin, cefotaxime และ streptomycin เชื้อมากกว่าร้อยละ 50 ดื้อต่อยา ceftazidime, aztreonam, chloramphenicol, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole สิ่งที่น่าสนใจคือ พบว่ามีเชื้อ 5 ไอโซเลท ที่มีการลดความไวต่อยา imipenem ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูง อย่างไรก็ตามเชื้อส่วนใหญ่ยังคงไวต่อยา amikacin นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. coli* ทุกไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจัดเป็น Multidrug resistant *E. coli* (MDR *E. coli*) ซึ่งถ้าเกิดการติดเชื้อในคน อาจทำให้เกิดปัญหาในการรักษา ส่งผลถึงอัตราการตายที่อาจจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการพบเชื้อ MDR *E. coli* ในแหล่งน้ำนั้นอาจมีสาเหตุมาจากการใช้ยาต้านจุลชีพที่มากเกินความจำเป็นทั้งในการรักษาโรคและเกษตรกรรม ทำให้มียาต้านจุลชีพตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมในปริมาณสูง สะท้อนให้เห็นว่าระบบการจัดการน้ำเพื่อการอุปโภคและบริโภคยังไม่ได้มาตรฐาน สาเหตุหนึ่ง คือ อาจเกิดจากการใช้คลอรีนในความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป (Shrivastav et al., 2004)

**ตาราง 3** แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม beta-lactams โดยวิธี Disk diffusion test

| ความไวต่อยา | จำนวนเชื้อที่ลดความไวต่อยาต้านจุลชีพ (ร้อยละ) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | AMP | CTX | CAZ | ATM | IPM |
| S | 0 | 0 | 4(7.3) | 4(7.3) | 50(90.9) |
| I | 0 | 0 | 13(23.6) | 5(9.1) | 5(9.1) |
| R | 55 (100) | 55(100) | 38(69.1) | 46(83.6) | 0 |

Abbreviations: AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam และ IPM, imipenem

ตาราง 4 แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม non beta-lactams โดยวิธี Disk diffusion test

| ความไวต่อยา | จำนวนเชื้อที่ลดความไวต่อยาต้านจุลชีพ (ร้อยละ) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S | K | CN | AK | C | CIP | TE | SXT |
| S | 0 | 10(18.2) | 30(54.6) | 38(69.1) | 19(34.5) | 18(32.7) | 9(16.4) | 20(36.4) |
| I | 0 | 29(52.7) | 8(14.5) | 16(29.1) | 0 | 11(20.0) | 0 | 3(5.4) |
| R | 55(100) | 16(29.1) | 17(30.9) | 1(1.8) | 36 (65.5) | 26(47.3) | 46(83.6) | 32(58.2) |

Abbreviations: S, streptomycin; K, kanamycin; CN, gentamicin; AK, amikacin; C, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; TE, tetracycline และ SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole

6.3 การตรวจหาชนิดของยีนดื้อยาที่พบบน class 1 integron โดยวิธี PCR และ sequencing

ปัจจุบันนี้พบปัญหาว่าเชื้อมีการดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกัน โดยเกิดจากการมี genetic element ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า integron ซึ่งแพร่กระจายมากในหมู่แบคทีเรียแกรมลบ โดย integron สามารถสะสมยีนดื้อยาชนิดต่างๆให้มาเรียงต่อกัน ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกัน และการส่งต่อยีนดื้อยาหลายชนิดไปพร้อมๆกันก็เกิดขึ้นได้ง่ายอีกด้วย เนื่องจาก integrin มักพบอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้

ยีนดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้ง *E. coli* มักจะสอดแทรกใน class 1 integron โดยใช้กลไก site-specific recombination ซึ่ง class 1 integron จะประกอบด้วย conserved segment 2 ส่วน คือ 5′conserved segment (5′CS) และ 3′conserved segment (3′CS) นอกจากนั้นยังมีส่วนของ variable region อยู่ระหว่าง 5′CS และ 3′CS ซึ่งเป็น gene cassette ที่มีกลุ่มของยีนดื้อยาชนิดต่างๆ (Fluit and Schmitz, 2004; Weldhagen, 2004) เนื่องจาก integron ในแต่ละ class นั้นจะมีความแตกต่างที่เอนไซม์ integrase ดังนั้นการตรวจหา class 1 integron นี้จะเริ่มต้นโดยการตรวจหายีน *intI1* ก่อน ดังนั้นในขั้นแรกของการศึกษานี้จึงนำเชื้อ *E. coli* จำนวน 55 ไอโซเลต ที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ มาทำการตรวจหายีน integrase 1 (*intI1*) ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *intI1* คือ int1F-int1R primer ผลปรากฏว่ามีเชื้อจำนวน 34 ไอโซเลต ให้ผลบวกกับ int1F-int1R (ตาราง 5) คือ มีการตรวจพบ PCR product ซึ่งให้ขนาดที่ใกล้เคียงกับ PCR product ของ *intI1* คือ ขนาดประมาณ 457 bp (รูป 5)

ตาราง 5 แสดงตัวอย่างน้ำ เชื้อที่แยกได้

| จำนวนเชื้อจากแหล่งน้ำต่างๆ | จำนวนเชื้อที่มี *intI1* gene | ขนาดของ variable region | |
|---|---|---|---|
| | | 1.6 kb | 2.5 kb |
| แม่น้ำ (*n*=15) | 9 | 3 | 1 |
| อ่างเก็บน้ำ (*n*=16) | 12 | 5 | 3 |
| คลอง (*n*=11) | 9 | 3 | 2 |
| ท่อน้ำทิ้ง (*n*=7) | 0 | 0 | 0 |
| น้ำประปา (*n*=6) | 4 | 2 | 0 |
| รวม (n=55) | 34 | 13 | 6 |

รูป 5 แสดงการตรวจหายีน *intI1* ในเชื้อ *E. coli* บน 1% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer

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

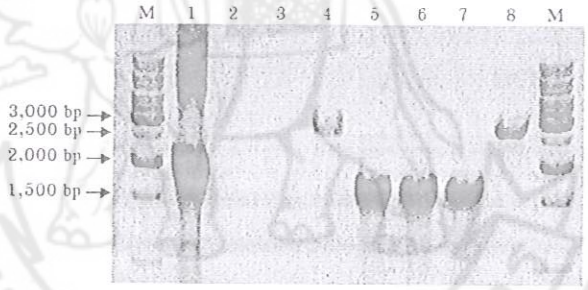
Lane 1 คือ positive control สำหรับยีน *intI*

Lane 2 คือ negative control

Lanes 3-4 คือ ตัวอย่าง PCR product ของเชื้อที่ให้ผลบวก 2 ไอโซเลท

การตรวจหายีนดื้อยาที่อยู่บน class 1 integron โดยวิธี PCR

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 34 ไอโซเลต มียีน *intI1* ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ class 1 integron ดังนั้นจึงนำเชื้อเหล่านี้มาวิเคราะห์หาชนิดและจำนวนของ gene cassette ที่อยู่บน class 1 integron โดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ In5′CS-In3′CS primer ที่จำเพาะกับส่วนของ 5′CS และ 3′CS ผลปรากฏว่าพบ PCR product ของ class 1 integron ที่มีขนาดแตกต่างกัน 2 ขนาด คือมีขนาดประมาณ 1600 bp และ 2500 bp พบในเชื้อจำนวน 13 และ 6 ไอโซเลทตามลำดับ และมีเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลท ที่ไม่พบ gene cassette (รูป 6, ตาราง 5)




รูป 6 แสดงการตรวจหายีนดื้อยาในส่วนของ variable region ของ class 1 integron ในเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime บน 0.7% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer

Lane M คือ 1 kb ladder (Fermentas, Hanover, MD, USA)

Lane 1 คือ positive control สำหรับ gene cassette

Lane 2 คือ negative control (น้ำกลั่น)

Lanes 3, 5-7 คือ ตัวอย่าง PCR product ขนาด 1,600 bp ของเชื้อ 4 ไอโซเลท

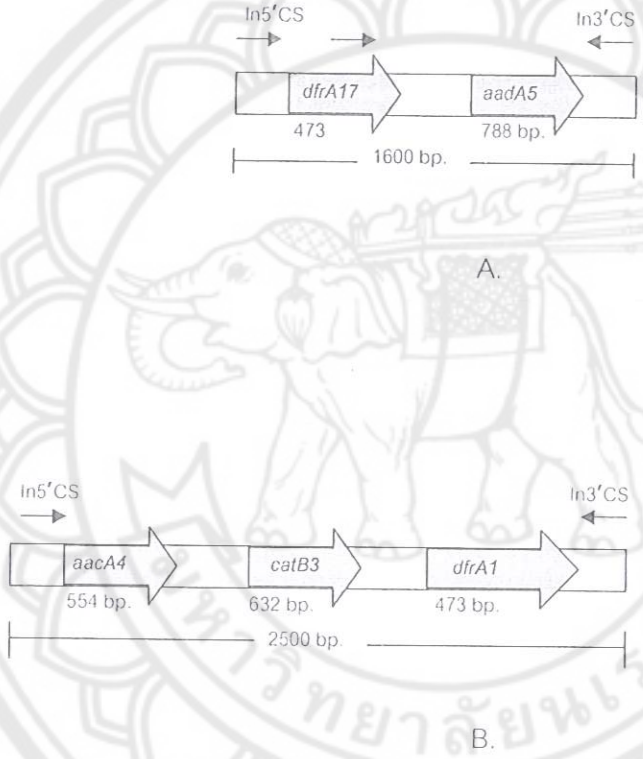
Lanes 4, 8 คือ ตัวอย่าง PCR product ขนาด 2,500 bp ของเชื้อ 2 ไอโซเลท

สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene casettes บน class 1 integron โดยใช้เทคนิค sequencing แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่า PCR product ที่มีขนาดต่างกันก็จะพบยีนดื้อยาที่แตกต่างกันด้วย ซึ่ง class 1 integron ที่พบมีขนาดประมาณ 1600 bp นั้น (รูป 7A และ รูป 8) เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่ามียีนดื้อยา 2 ชนิดคือ *dfrA17* และ *aadA5* ที่ encode เอนไซม์ dihydrofolate reductase และ aminoglycoside adenyltransferase ตามลำดับ ยีน *dfrA17* ทำให้เชื้อดื้อต่อยา trimethoprim ในขณะที่ *aadA5* ทำให้เชื้อดื้อยา spectinomycin การเรียงตัวของ gene cassette *dfrA17-aadA5* มีรายงานครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* จากผู้ป่วยโรคระบบทางเดินปัสสาวะในเมืองซิดนีย์ ประเทศออสเตรเลีย (White et al., 2000) ต่อมาก็พบว่า *dfrA17-aadA5* พบมากในเชื้อ *E. coli* จากผู้ป่วยโรคระบบทางเดินปัสสาวะในประเทศเกาหลี เช่นเดียวกัน (Yu et al., 2004) ที่พบมากทั้งนี้อาจเป็นเพราะยา trimethoprim เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ

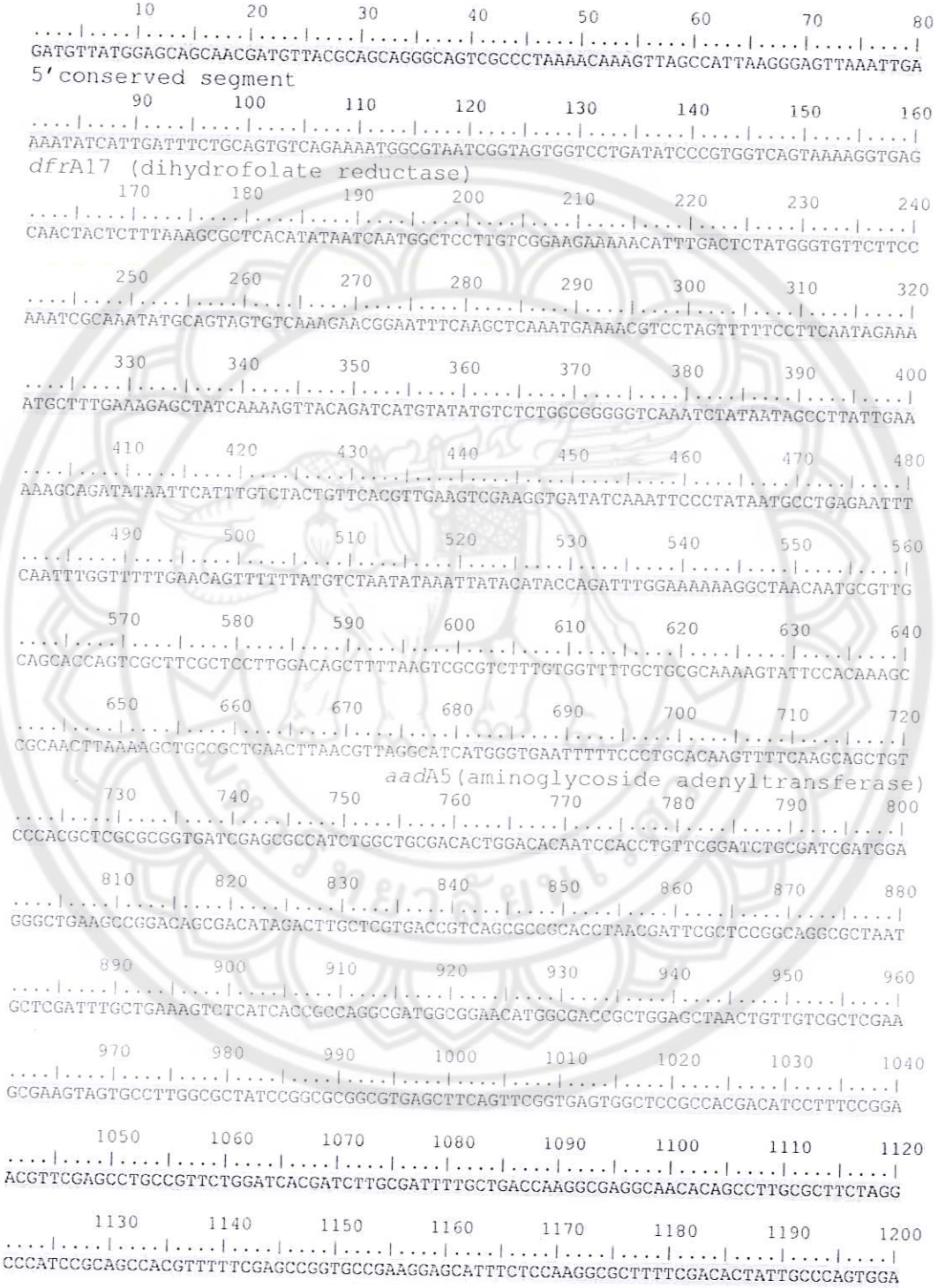
สำหรับ class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 2500 bp นั้น เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบการจัดเรียงตัวของ gene cassettes คือ *aacA4-catB3-dfrA1* (รูป 7B และ รูป 9) โดยที่ *aacA4* จะ encode เอนไซม์ aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase และทำให้เชื้อดื้อต่อ gentamicin และ tobramicin ยีน *catB3* จะ encode เอนไซม์ chloramphenicol acetyltransferase ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อยา chloramphenicol สำหรับ *dfrA1* ก็ encode trimethoprim resistance protein ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อ trimethoprim การเรียงตัวของยีน *aacA4-catB3-dfrA1* มีรายงานการพบครั้งแรกในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่โรงพยาบาลในตุรกี (Li et al., 2006) ต่อมาก็มีการพบในแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Acinetobacter* baumannii (Chang-Tai et al., 2011) และ *E. coli* (Dakić et al., 2011) โดยพบทั้งจากคนและสัตว์

สำหรับการสอดแทรกของ gene cassettes ใน class 1 integron นั้นจะต้องอาศัย attachment site (*attI*) ซึ่งเป็น recognition site สำหรับเอนไซม์ integrase ที่จะเข้ามาตัดและเชื่อมต่อส่วนของ gene cassettes เข้ากับส่วนของ integron และ recombination site (59 base element หรือ *attC*) ที่จะจดจำตำแหน่งของ *attI* ในระหว่างที่เกิด recombination ซึ่งการเข้ามาตัดและเชื่อมต่อจะอยู่บริเวณปลายสุดของ

3′CS ในการศึกษานี้พบว่า ในแต่ละ antibiotic resistant gene cassettes ที่สอดแทรกเข้าไปใน class 1 integron จะพบตำแหน่งที่จำเพาะที่อยู่รอบๆยีนดื้อยาคือ ส่วนของ *attI* และ 59 base element ซึ่งจัดเป็นตำแหน่งจำเพาะในการสอดแทรกของ gene cassettes ใน class 1 integron (รูป 8 และ 9)

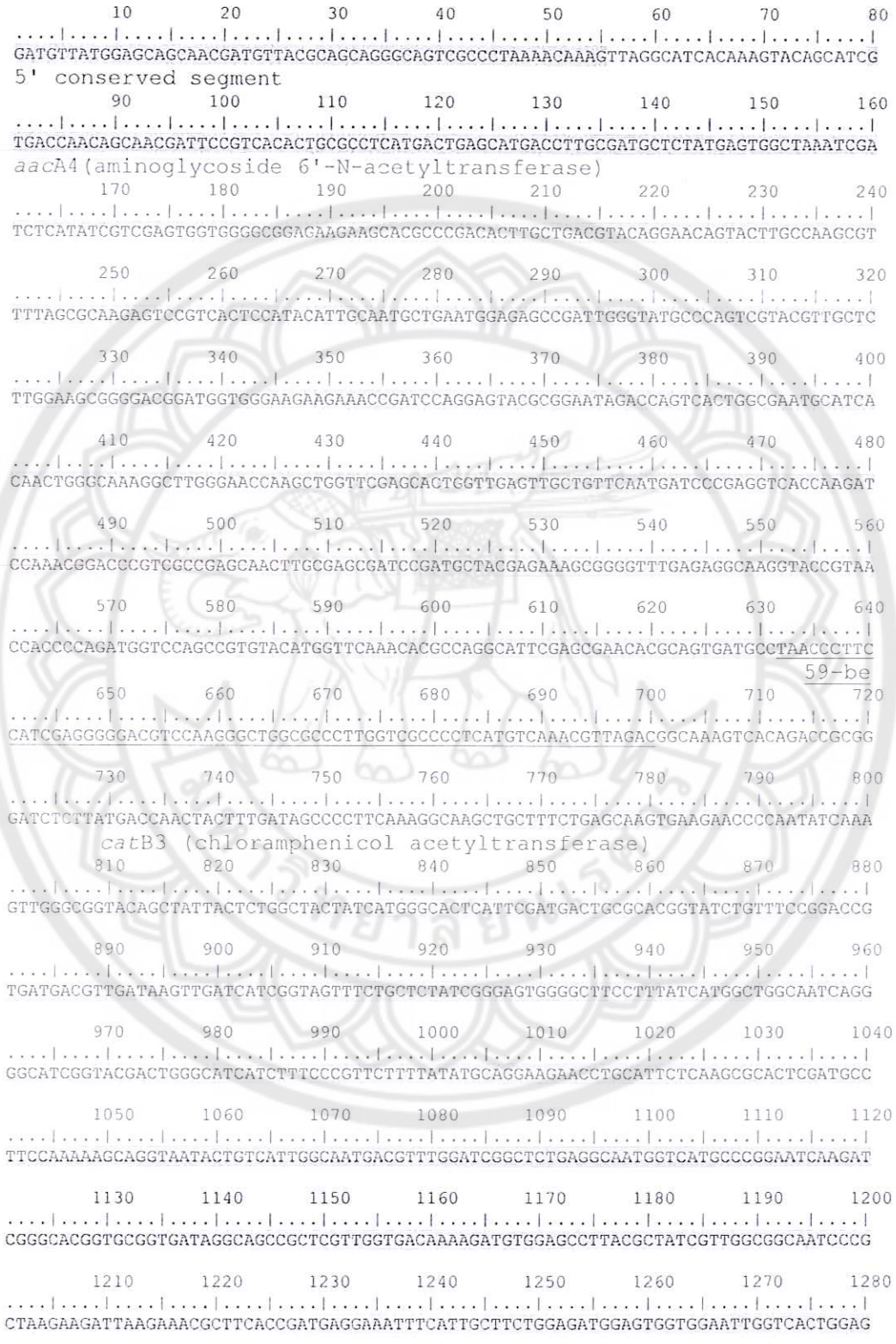



รูป 7 แสดงรูปแบบของ gene cassettes ที่อยู่บน class 1 integron ที่มีขนาดต่างกัน โดยที่ → คือทิศทางของ primer และ ⇨ คือทิศทางของ gene จาก start codon ไปยัง stop codon


10 20 30 40 50 60 70 80
GATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGCCATTAAGGGAGTTAAATTGA
5′conserved segment
90 100 110 120 130 140 150 160
AAATATCATTGATTTCTGCAGTGTCAGAAAATGGCGTAATCGGTAGTGGTCCTGATATCCCGTGGTCAGTAAAAGGTGAG
dfrA17 (dihydrofolate reductase)
170 180 190 200 210 220 230 240
CAACTACTCTTTAAAGCGCTCACATATAATCAATGGCTCCTTGTCGGAAGAAAAACATTTGACTCTATGGGTGTTCTTCC
250 260 270 280 290 300 310 320
AAATCGCAAATATGCAGTAGTGTCAAAGAACGGAATTTCAAGCTCAAATGAAAACGTCCTAGTTTTTCCTTCAATAGAAA
330 340 350 360 370 380 390 400
ATGCTTTGAAAGAGCTATCAAAAGTTACAGATCATGTATATGTCTCTGGCGGGGGTCAAATCTATAATAGCCTTATTGAA
410 420 430 440 450 460 470 480
AAAGCAGATATAATTCATTTGTCTACTGTTCACGTTGAAGTCGAAGGTGATATCAAATTCCCTATAATGCCTGAGAATTT
490 500 510 520 530 540 550 560
CAATTTGGTTTTTGAACAGTTTTTTATGTCTAATATAAATTATACATACCAGATTTGGAAAAAAGGCTAACAATGCGTTG
570 580 590 600 610 620 630 640
CAGCACCAGTCGCTTCGCTCCTTGGACAGCTTTTAAGTCGCGTCTTTGTGGTTTTGCTGCGCAAAAGTATTCCACAAAGC
650 660 670 680 690 700 710 720
CGCAACTTAAAAGCTGCCGCTGAACTTAACGTTAGGCATCATGGGTGAATTTTTCCCTGCACAAGTTTTCAAGCAGCTGT
aadA5(aminoglycoside adenyltransferase)
730 740 750 760 770 780 790 800
CCCACGCTCGCGCGGTGATCGAGCGCCATCTGGCTGCGACACTGGACACAATCCACCTGTTCGGATCTGCGATCGATGGA
810 820 830 840 850 860 870 880
GGGCTGAAGCCGGACAGCGACATAGACTTGCTCGTGACCGTCAGCGCGCGCACCTAACGATTCGCTCCGGCAGGCGCTAAT
890 900 910 920 930 940 950 960
GCTCGATTTGCTGAAAGTCTCATCACCGCCAGGCGATGGCGGAACATGGCGACCGCTGGAGCTAACTGTTGTCGCTCGAA
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
GCGAAGTAGTGCCTTGGCGCTATCCGGCGCGGCGTGAGCTTCAGTTCGGTGAGTGGCTCCGCCACGACATCCTTTCCGGA
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
ACGTTCGAGCCTGCCGTTCTGGATCACGATCTTGCGATTTTGCTGACCAAGGCGAGGCAACACAGCCTTGCGCTTCTAGG
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
CCCATCCGCAGCCACGTTTTTCGAGCCGGTGCCGAAGGAGCATTTCTCCAAGGCGCTTTTCGACACTATTGCCCAGTGGA

```
         1210       1220       1230       1240       1250       1260       1270       1280
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATGCAGAGTCGGATTGGAAGGGTGACGAGCGGAACGTCGTTCTTGCTCTTGCTCGCATTTGGTACAGCGCTTCAACTGGT

         1290       1300       1310       1320       1330       1340       1350       1360
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CTCATTGCTCCTAAGGACGTTGCTGCCGCATGGGTATCGGAGCGTTTGCCTGCCGAGCATCGGCCCCTCATCTGCAAGGC

         1370       1380       1390       1400       1410       1420       1430       1440
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACGCGCGGCGTACCTGGGTAGCGAGGACGACGACCTAGCAATGCGCGTCGAAGAGACGGCCGCGTTCGTTCGATATGCCA

         1450       1460       1470       1480       1490       1500       1510       1520
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGCAACGATTGAGAGAATCTTGCGTTGAGCGGCATGTGCGAAAAGTGCATCGACCCGCGCCGAGGGCATCTGATGCCTA

         1530       1540       1550       1560       1570       1580       1590       1600
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACTCGGCGTTCAAGCGGACGGGCTGCGCCCGCCGCTCAACTATGCGTTAGATGCACTAAGCAC----------------
                                                                  3'conserved segment
```

รูป 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 1600 bp (*dfrA17-aadA5*) จากเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำ


10 20 30 40 50 60 70 80
GATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGCATCACAAAGTACAGCATCG
5' conserved segment
90 100 110 120 130 140 150 160
TGACCAACAGCAACGATTCCGTCACACTGCGCCTCATGACTGAGCATGACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGA
aacA4(aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase)
170 180 190 200 210 220 230 240
TCTCATATCGTCGAGTGGTGGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGT
250 260 270 280 290 300 310 320
TTTAGCGCAAGAGTCCGTCACTCCATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCCAGTCGTACGTTGCTC
330 340 350 360 370 380 390 400
TTGGAAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTCACTGGCGAATGCATCA
410 420 430 440 450 460 470 480
CAACTGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCAGTGGTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCCGAGGTCACCAAGAT
490 500 510 520 530 540 550 560
CCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGGTTTGAGAGGCAAGGTACCGTAA
570 580 590 600 610 620 630 640
CCACCCCAGATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTCGAGCGAACACGCAGTGATGCCTAACCCTTC
59-be
650 660 670 680 690 700 710 720
CATCGAGGGGGACGTCCAAGGGCTGGCGCCCTTGGTCGCCCCTCATGTCAAACGTTAGACGGCAAAGTCACAGACCGCGG
730 740 750 760 770 780 790 800
GATCTCTTATGACCAACTACTTTGATAGCCCCTTCAAAGGCAAGCTGCTTTCTGAGCAAGTGAAGAACCCCAATATCAAA
catB3 (chloramphenicol acetyltransferase)
810 820 830 840 850 860 870 880
GTTGGGCGGTACAGCTATTACTCTGGCTACTATCATGGGCACTCATTCGATGACTGCGCACGGTATCTGTTTCCGGACCG
890 900 910 920 930 940 950 960
TGATGACGTTGATAAGTTGATCATCGGTAGTTTCTGCTCTATCGGGAGTGGGGCTTCCTTTATCATGGCTGGCAATCAGG
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
GGCATCGGTACGACTGGGCATCATCTTTCCCGTTCTTTTATATGCAGGAAGAACCTGCATTCTCAAGCGCACTCGATGCC
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
TTCCAAAAAGCAGGTAATACTGTCATTGGCAATGACGTTTGGATCGGCTCTGAGGCAATGGTCATGCCCGGAATCAAGAT
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
CGGGCACGGTGCGGTGATAGGCAGCCGCTCGTTGGTGACAAAAGATGTGGAGCCTTACGCTATCGTTGGCGGCAATCCCG
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
CTAAGAAGATTAAGAAACGCTTCACCGATGAGGAAATTTCATTGCTTCTGGAGATGGAGTGGTGGAATTGGTCACTGGAG

1 6990885

12 มิ.ย. 2558

สำนักหอสมุด

จ
QR
97
.A58
N2711
2557

```
        1290       1300       1310       1320       1330       1340       1350       1360
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGATCAAAGCGGCAATGCCCATGCTGTGCTCGTCTAATATTGTTGGCCTGCACAAGTATTGGCTCGAGTTTGCCGTCTA

        1370       1380       1390       1400       1410       1420       1430       1440
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACAATTCAATCAAGCCGATGCCGCTTCGCGGCACGGCTTATTTCAGGCGTTAACCTCTGAAGGAGAATTGTGAAACTATC
59-be

        1450       1460       1470       1480       1490       1500       1510       1520
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACTAATGGTAGCTATATCGAAGAATGGAGTTATCGGGAATGGCCCTGATATTCCATGGAGTGCCAAAGGTGAACAGCTCC
dfrA1(trimethoprim resistance protein)
        1530       1540       1550       1560       1570       1580       1590       1600
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGTTTAAAGCTATTACCTATAACCAATGGCTGTTGGTTGGACGCAAGACTTTTGAATCAATGGGAGCATTACCCAACCGA

        1610       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGTATGCGGTCGTAACACGTTCAAGTTTTACATCTGACAATGAGAACGTAGTGATCTTTCCATCAATTAAAGATGCTTT

        1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750       1760
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AACCAACCTAAAGAAAATAACGGATCATGTCATTGTTTCAGGTGGTGGGGAGATATACAAAAGCCTGATCGATCAAGTAG

        1770       1780       1790       1800       1810       1820       1830       1840
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATACACTACATATATCTACAATAGACATCGAGCCGGAAGGTGATGTTTACTTTCCTGAAATCCCCAGCAATTTTAGGCCA

        1850       1860       1870       1880       1890       1900       1910       1920
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GTTTTTACCCAAGACTTCGCCTCTAACATAAATTATAGTTACCAAATCTGGCAAAAGGGTTAACAAGTGGCAGCAACGGA
                                                          59-be
        1930       1940       1950       1960       1970       1980       1990       2000
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTCGCAAACCTGTCACGCCTTTTGTACCAAAAGCCGCGCCAGGTTTGCGATCCGCTGTGCCAGGCGTTATGCAAAATGGT

        2010       2020       2030       2040       2050       2060       2070       2080
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAGTACAAAAAATTGACAACCGGCATTCAGTTTTTGAGAGAGGCCAAAAAACATGGTCTAGTTGATAACTTAGCCGATCG

        2090       2100       2110       2120       2130       2140       2150       2160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGGTTTTAAACACTTGAAGGGGTTGTATTTTTATCGCTTTTATGGGTAAGGTATTCATCAATTAATCTTGGGTTCAGCTT

        2170       2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CATACGGTGAAAACTTAACATTTGATATAACATGTATTTTTGATGAGATAGATTCACGTTATGTCCGTAATTTTCCCATT

        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310       2320
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AATGTCCCACTCCTATGTGGTGGCGGGTTTGGTGATGAATATTTCACTCCAGAGTTATGGGAAATAGCGACATTGGACAA
```

## 7. สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

การตรวจหาแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยา cefphalosporin รุ่น 3 (cefotaxime) ในแหล่งน้ำต่างๆ จำนวน 23 ตัวอย่าง จาก แม่น้ำ คลอง อ่างเก็บน้ำ ท่อน้ำทิ้ง น้ำปะปา และน้ำบาดาลในเขตจังหวัดพิษณุโลก และนครสวรรค์ พบว่า ตัวอย่างน้ำจำนวน 18 ตัวอย่าง รวมทั้งน้ำประปาพบเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime ในขณะที่น้ำบาดาลจำนวน 5 ตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ ตัวอย่างน้ำ 18 ตัวอย่างที่พบเชื้อ สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 55 ไอโซเลท เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการทดสอบทางชีวเคมีและการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทคือ *E. coli*

การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ทั้ง 55 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทจัดเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน โดยทุกไอโซเลทดื้อยา ampicillin, cefotaxime และ streptomycin เชื้อมากกว่าร้อยละ 50 ดื้อต่อยา ceftazidime, aztreonam, chloramphenicol, tetracycline ลำ trimethoprim/sulfamethoxazole อย่างไรก็ตามเชื้อส่วนใหญ่ยังคงไวต่อยา amikacin นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลทลดความไวต่อยาที่มีประสิทธิภาพสูงคือ imipenem

เนื่องจากยีนดื้อยาหลายชนิดพบอยู่บน integron ในโครงการวิจัยนี้จึงมีการตรวจหา class 1 integron ด้วย ผลการศึกษาพบ class 1 integron ในเชื้อจำนวน 34 ไอโซเลท แต่พบยีนดื้อยาเพียง 19 ไอโซเลท โดย gene cassette ที่ตรวจพบมี 2 แบบ แบบที่ 1 คือ *dfrA17-aadA5* (13 ไอโซเลท) ที่ทำให้ดื้อต่อยา trimethoprim และ spectinomycin แบบที่ 2 คือ *aacA4-catB3-dfrA1* (6 ไอโซเลท) ที่ทำให้ดื้อต่อยา gentamicin, chloramphenicol และ trimethoprim ซึ่งการตรวจพบยีนดื้อยาเหล่านี้บน class 1 integron จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการแพร่กระจายของยีนดื้อยา ทำให้เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกันและทำให้สามารถที่จะถ่ายทอดยีนดื้อยาได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย

โดยสรุป การศึกษานี้มีการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ดื้อยาจากแหล่งน้ำต่างๆ รวมทั้ง น้ำกระปา ถึงแม้ว่าจะพบว่ามีอุบัติการณ์ของ class 1 integron ค่อนข้างต่ำ การตรวจพบ *E. coli* ดื้อยาหลายขนานในแหล่งน้ำต่างๆ นั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อดื้อยาสามารถแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็ว สำหรับในประเทศไทยซึ่งประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเกษตรกรรม มีการสัมผัสดินและน้ำอยู่เสมอ โอกาสที่จะได้รับเชื้อก็มีมาก ถ้าได้รับเชื้อดื้อยาเข้าไปก็อาจจะทำให้เกิดปัญหาในการรักษา เกิดความเสียหายต่อชีวิตและทรัพย์สินได้ ผลการวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในชุมชนต่อไป

ตาราง 6 แสดงความสัมพันธ์ของยีนดื้อยาที่พบในเชื้อ *E. coli* กับรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ

| ยีนดื้อยา | เชื้อ | รูปแบบการดื้อยา |
|---|---|---|
| Integron type 1 (1600 bp) | | |
| - *dfrA17-aadA5** | 01C02, 01C03 | $TMP^R$ |
| | 17C03, 17C05, 18C03 | |
| | 21C01, 21C02, 21C04 | |
| | 22C01, 22C02, 22C04 | |
| | 30C04, 30C05 | |
| Integron type 2 (2500 bp) | | |
| - *aacA4-catB3-dfrA1* | 08C04 | $C^R$ |
| | 18C02, 23C01, 23C03 | $CN^I$, $TMP^R$ and $C^R$ |
| | 26C01 | |
| | 22C04 | $CN^R$, $TMP^R$ and $C^R$ |

หมายเหตุ *dfrA*: trimethoprim resistance, *catB*: chloramphenicol resistance
*aadA*: spectinomycin resistance , *aacA*: gentamicin resistance
*ไม่ได้ทำการศึกษาความไวต่อยา

Abbreviations: C (Chloramphenicol), CN (Gentamicin) และ TMP (Trimethoprim)
I: Intermediate, R: Resistant

# เอกสารอ้างอิง

Zhang XX, Zhang T, Fang HH. Antibiotic resistance genes in water environment. Appl Microbiol Biotechnol. 2009, 82:397-414.

Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE, Oliver SP. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. Foodborne Pathog Dis . 2005, 2:201–211

Antunes P, Machado J, Peixe L . Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. J Antimicrob Chemother. 2006, 58:297–304

Taviani E, Ceccarelli D, Lazaro N, Bani S, Cappuccinelli P, Colwell RR, Colombo MM. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. FEMS Microbiol Ecol. 2008, 64:45–54

Poppe C, Martin L, Muckle A, Archambault M, McEwen S, Weir E. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. Can J Vet Res. 2006, 70:105–114

Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. Int J Food Microbiol. 2007, 114:295–306.

Volkmann H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). J Microbiol Methods. 2004, 56:277–286

Moura A, Henriques I, Ribeiro R, Correia A. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. J Antimicrob Chemother. 2007, 60:1243–1250

Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Ecol. 2003, 43:325–335

Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, Volpe R, Amicosante G, Perilli M. Identification of bla(IMP-22) in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. J Antimicrob Chemother. 2009;63(5):901-8.

Lu SY, Li TY, Zhou HW. [Diversity changes of the microbial communities and $bla_{(CTX-M)}$ genes in urban river sediments treated with cefotaxime. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2010 ;30(3):463-7.

Dhanji H, Patel R, Wall R, Doumith M, Patel B, Hope R, Livermore DM, Woodford N. Variation in the genetic environments of $bla_{(CTX-M-15)}$ in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. J Antimicrob Chemother. 2011;66(5):1005-12.

Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, Cizek A, Guenther S, Literak I. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. J Antimicrob Chemother. 2011;66(12):2784-90.

da Silva MF, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM.) Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiol Ecol. 2007, 60:166–176

Park JC, Lee JC, Oh JY, Jeong YW, Cho JW, Joo HS, Lee WK, Lee WB. Antibiotic selective pressure for the maintenance of antibiotic resistant genes in coliform bacteria isolated from the aquatic environment. Water Sci Technol. 2003, 47:249–253

Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol. 1995, 15: 593–600.

Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. Annu Rev Genet. 2010 Dec; 44:141-66.

Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(4):757-84.

Fluit AC & Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect. 2004, 10: 272-288.

Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). FEMS Microbiol Ecol. 2009, 68: 118-130.

Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. J Microbiol. 2009, 47: 19-27.

Kim J, Kang HY, Lee Y. The identification of CTX-M-14, TEM-52, and CMY-1 enzymes in *Escherichia coli* isolated from the Han River in Korea. J Microbiol. 2008, 46: 478-481.

Zhang X, Wu B, Zhang Y, Zhang T, Yang L, Fang HH, Ford T, Cheng S. Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes *tetA* and *tetC* in different water environments of Jiangsu Province, China. Ecotoxicology. 2009, 18: 652-660.

Petersen A, Dalsgaard A. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp, isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. Environ Microbiol. 2003, 5: 395-402.

Tansuphasiri U, Khaminthakul D, Pandii W. Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water.Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006, 37: 162-170.

Huys G, Bartie K, Cnockaert M, Hoang Oanh DT, Phuong NT, Somsiri T, Chinabut S, Yusoff FM, Shariff M, Giacomini M, Teale A, Swings J. Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. Res Microbiol. 2007, 158: 228-235.

Sianglum W, Wonglumsom W, Srimanote P, Kittiniyom K. Analysis of gyrA mutations related to quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates originating from pet, human, vegetable and ice in Bangkok and vicinity. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007, 38: 1095-1101.

Agersø Y, Petersen A. The tetracycline resistance determinant *tet39* and the sulphonamide resistance gene *sulII* are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. J Antimicrob Chemother. 2007, 59: 23–27.

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA. 1985, 82: 6955-6959.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial susceptibilty Testing: Twenty-third Informational Supplement. CLSI document M100-S-23. Clinical and Laboratory Standards Institute. 940 West Valley Road, Suite 1400, Waye, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol. 2003, 41: 5407-5013.

Lévesque C, Piché L, Larose C and Roy PH. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother. 1995, 39: 185-191.

Kiddee A1, Henghiranyawong K, Yimsabai J, Tiloklurs M, Niumsup PR. Nosocomial spread of class 1 integron-carrying extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a Thai hospital. Int J Antimicrob Agents. 2013 Oct;42(4):301-6.

Soge OO, Giardino MA, Ivanova IC, Pearson AL, Meschke JS, Roberts MC. Low prevalence of antibiotic resistant gram-negative bacteria isolated from rural south-western Uganda groundwater. Water SA. 2009 Apr; 35(3), 343-8.

Datta RR, Hossain MS, Aktaruzzaman M, Fakhruddin ANM. Antimicrobial resistance of pathogenic bacteria isolated from tube well water of Costal area of Sitakunda, Chittagong, Bangladesh. Open Journal of Water Pollution and Treatment. 2014 June 1(1), 1-9.

Shrivastava R, Upreti RK, Jain SR, Prasad KN, Seth PK, Chaturvedi UC. Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonasaeruginosa*. Ecotoxicol Environ Saf. 2004 Jun;58(2):277-83.

Weldhagen GF. Integrons and beta-lactamases--a novel perspective on resistance. Int J Antimicrob Agents. 2004 Jun;23(6):556-62.

White PA, McIver CJ, Deng Y, Rawlinson WD. Characterisation of two new gene cassettes, aadA5 and dfrA17. FEMS Microbiol Lett. 2000 Jan 15;182(2):265-9.

Yu Hak Sun, Lee Je Chul, Kang Hee Young, Jeong Young Sook, Lee Eun Young, Choi Chul Hee, Tae Seong Ho, Lee Yoo Chul, Seol Sung Yong and Cho Dong Taek.Prevalence of dfr genes associated with integrons and dissemination of dfrA17 among urinary isolates of Escherichia coli in Korea. J Antimicrob Chemother 2004 Mar 12;53(3):445-50.

Li X, Shi L, Yang W, Li L, Yamasaki S. New array of aacA4-catB3-dfrA1 gene cassettes and a noncoding cassette from a class-1-integron-positive clinical strain of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jun;50(6):2278-9.

Chang-Tai Z, Yang L, Zhong-Yi H, Chang-Song Z, Yin-Ze K, Yong-Ping L, Chun-Lei D. High frequency of integrons related to drug-resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Indian J Med Microbiol. 2011, April-June; 29(2): 118-23.

Dakić I, Petrikkos G, Dimitrijević V, Charvalos E. Multidrug resistance and integrons in Escherichia coli isolated from chicken in Greece. Acta veterinaria 2011; 61(5-6): 575-84.

Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Rollán A, Peixe L, Coque TM. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase producing Escherichia coli strains over 12 years in asingle hospital in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005 May;49(5):1823-9.

Rosser SJ, Young HK. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. J Antimicrob Chemother. 1999 Jul;44(1):11-8.

Vinué L, Jové T, Torres C, Ploy MC. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical Escherichia coli strains and description of a new P2 promoter variant. Int J Antimicrob Agents. 2011 Dec;38(6):526-9.

# ภาคผนวก

ตาราง แสดงผลการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม beta-lactams ที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ โดยวิธี disk diffusion test

| ไอโซเลท | เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.) ของ clear zone | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CTX | CTX+CLA | CAZ | CAZ+CLA | FOX | IMP | ETP | MEM | ATM | AMP |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | | | |
| 01C02-E | 0 R | 22 | 12 R | 19 | 19 S | 25 S | 25 S | 25 S | 9 R | 0 R |
| 01C03-E | 0 R | 25 | 12 R | 23 | 16 I | 24 S | 26 S | 29 S | 7 R | 0 R |
| 01C04-E | 11 R | 24 | 16 R | 21 | 20 S | 22 I | 28 S | 27 S | 14 R | 0 R |
| 01C05-E | 14 R | 22 | 20 I | 20 | 19 S | 23 S | 29 S | 29 S | 21 S | 6 R |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | | | |
| 02C01-E | 18 R | 17 | 14 R | 15 | 12 R | 22 I | 28 S | 26 S | 17 R | 0 R |
| 02C04-E | 0 R | 23 | 15 R | 20 | 20 S | 22 I | 30 S | 25 S | 13 R | 0 R |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | | | |
| 03C03-E | 9 R | 28 | 16 R | 23 | 21 S | 25 S | 29 S | 28 S | 15 R | 0 R |
| ท่อน้ำทิ้ง | | | | | | | | | | |
| 04C01-E | 10 R | 25 | 16 R | 23 | 20 S | 24 S | 30 S | 30 S | 15 R | 0 R |
| 04C04-E | 21 R | 20 | 16 R | 18 | 13 R | 26 S | 29 S | 30 S | 20 I | 0 R |
| 04C06-E | 9 R | 24 | 16 R | 22 | 22 S | 25 S | 22 S | 24 S | 11 R | 0 R |
| 04C07-E | 8 R | 25 | 13 R | 23 | 21 S | 24 S | 25 S | 25 S | 10 R | 0 R |
| 04C09-E | 8 R | 25 | 13 R | 23 | 21 S | 25 S | 27 S | 27 S | 22 R | 0 R |
| 04C10-E | 7 R | 26 | 13 R | 24 | 23 S | 26 S | 28 S | 28 S | 11 R | 0 R |
| 04C11-E | 0 R | 26 | 11 R | 19 | 21 S | 26 S | 26 S | 28 S | 0 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | | | |
| 05C05-E | 0 R | 25 | 22 S | 21 | 20 S | 25 S | 30 S | 30 S | 17 R | 0 R |
| น้ำประปา | | | | | | | | | | |
| 06C02-E | 12 R | 25 | 19 I | 19 | 16 I | 24 S | 28 S | 27 S | 20 I | 0 R |
| 06C03-E | 0 R | 26 | 18 I | 26 | 23 S | 27 S | 28 S | 30 S | 13 R | 0 R |
| 06C04-E | 9 R | 30 | 18 I | 32 | 29 S | 30 S | 31 S | 33 S | 13 R | 0 R |
| แม่น้ำ | | | | | | | | | | |
| 08C01-E | 11 R | 28 | 17 R | 26 | 28 S | 28 S | 28 S | 30 S | 14 R | 0 R |
| 08C02-E | 13 R | 23 | 17 R | 20 | 17 I | 25 S | 30 S | 30 S | 20 I | 0 R |
| 08C03-E | 9 R | 26 | 19 I | 24 | 21 S | 26 S | 30 S | 30 S | 15 R | 0 R |
| 08C04-E | 9 R | 27 | 19 I | 24 | 19 S | 27 S | 29 S | 32 S | 15 R | 0 R |
| 08C05-E | 14 R | 26 | 23 S | 26 | 18 S | 30 S | 30 S | 30 S | 21 S | 0 R |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| คลอง | | | | | | | | | | |
| 10C05-E | 11 R | 21 | 20 I | 21 | 20 S | 24 S | 28 S | 26 S | 20 I | 0 R |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | | | |
| 17C03-E | 0 R | 24 | 12 R | 24 | 18 S | 24 S | 28 S | 29 S | 9 R | 0 R |
| 17C05-E | 0 R | 22 | 12 R | 23 | 18 S | 23 S | 26 S | 30 S | 8 R | 0 R |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | | | |
| 18C02-E | 0 R | 25 | 15 R | 24 | 21 S | 24 S | 30 S | 30 S | 11 R | 0 R |
| 18C03-E | 0 R | 25 | 12 R | 23 | 18 S | 25 S | 27 S | 28 S | 9 R | 0 R |
| 18C04-E | 0 R | 24 | 13 R | 25 | 23 S | 25 S | 28 S | 29 S | 11 R | 0 R |
| 18C05-E | 0 R | 22 | 24 S | 24 | 18 S | 26 S | 28 S | 29 S | 12 R | 0 R |
| แม่น้ำ | | | | | | | | | | |
| 19C01-E | 0 R | 25 | 19 I | 25 | 21 S | 26 S | 28 S | 29 S | 15 R | 0 R |
| 19C02-E | 12 R | 14 | 12 R | 14 | 0 R | 24 S | 27 S | 30 S | 16 R | 0 R |
| 19C03-E | 10 R | 27 | 19 I | 26 | 22 S | 26 S | 30 S | 30 S | 16 R | 0 R |
| 19C04-E | 16 R | 13 | 15 R | 13 | 9 R | 22 I | 25 S | 28 S | 21 S | 0 R |
| แม่น้ำ | | | | | | | | | | |
| 21C01-E | 0 R | 22 | 11 R | 23 | 17 I | 24 S | 24 S | 26 S | 9 R | 0 R |
| 21C02-E | 8 R | 28 | 13 R | 26 | 10 R | 26 S | 23 S | 26 S | 10 R | 0 R |
| 21C04-E | 0 R | 20 | 13 R | 25 | 18 S | 25 S | 30 S | 28 S | 9 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | | | |
| 22C01-E | 0 R | 23 | 12 R | 22 | 18 S | 26 S | 28 S | 29 S | 8 R | 0 R |
| 22C02-E | 7 R | 25 | 8 R | 25 | 20 S | 29 S | 27 S | 29 S | 8 R | 0 R |
| 22C03-E | 0 R | 24 | 13 R | 22 | 20 S | 24 S | 27 S | 28 S | 10 R | 0 R |
| 22C04-E | 9 R | 23 | 12 R | 21 | 18 S | 25 S | 27 S | 28 S | 8 R | 0 R |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | | | |
| 23C01-E | 0 R | 22 | 12 R | 23 | 19 S | 24 S | 26 S | 27 S | 9 R | 0 R |
| 23C03-E | 0 R | 25 | 13 R | 23 | 24 S | 24 S | 28 S | 28 S | 9 R | 0 R |
| 23C04-E | 9 R | 22 | 13 R | 20 | 17 I | 23 S | 25 S | 25 S | 9 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | | | |
| 24C01-E | 0 R | 25 | 14 R | 22 | 20 S | 24 S | 26 S | 27 S | 10 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | | | |
| 25C03-E | 0 R | 22 | 12 R | 20 | 20 S | 24 S | 27 S | 29 S | 10 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | | | |
| 26C01-E | 0 R | 24 | 13 R | 21 | 22 S | 20 I | 26 S | 28 S | 10 R | 0 R |
| 26C02-E | 13 R | 24 | 19 I | 24 | 22 S | 26 S | 30 S | 32 S | 16 R | 0 R |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 26C04-E | 10 R | 25 | 18 I | 23 | 22 S | 25 S | 30 S | 30 S | 16 R | 0 R |
| น้ำประปา | | | | | | | | | | |
| 30C01-E | 7 R | 23 | 12 R | 20 | 21 S | 23 S | 27 S | 27 S | 9 R | 0 R |
| 30C04-E | 12 R | 23 | 19 I | 24 | 18 S | 24 S | 30 S | 30 S | 16 R | 0 R |
| 30C05-E | 0 R | 24 | 13 R | 23 | 18 S | 25 S | 26 S | 28 S | 9 R | 0 R |
| แม่น้ำ | | | | | | | | | | |
| 32C01-E | 0 R | 27 | 15 R | 25 | 22 S | 26 S | 26 S | 28 S | 11 R | 0 R |
| 32C03-E | 13 R | 26 | 21 S | 24 | 22 S | 23 S | 28 S | 28 S | 24 S | 0 R |
| 32C05-E | 12 R | 25 | 18 I | 24 | 22 S | 28 S | 28 S | 27 S | 19 I | 0 R |
| E.coli | 26 S | 26 | 24 S | 24 | 22 S | 28 S | 34 S | 32 S | 30 S | 20 S |

ตาราง แสดงผลการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม non beta-lactams ที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ โดยวิธี disk diffusion test

| ไอโซเลท | เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.) ของ clear zone | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S | CN | AK | K | C | CIP | TE | SXT |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | |
| 01C02-E | 0 R | 15 S | 15 I | 16 I | 22 S | 19 I | 9 R | 0 R |
| 01C03-E | 8 R | 0 R | 17 S | 10 R | 21 S | 0 R | 0 R | 0 R |
| 01C04-E | 12 I | 16 S | 20 S | 18 S | 8 R | 17 I | 20 S | 25 S |
| 01C05-E | 12 I | 16 S | 17 S | 16 I | 21 S | 28 S | 0 R | 11 I |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | |
| 02C01-E | 12 I | 15 S | 15 I | 16 I | 24 S | 24 S | 21 S | 24 S |
| 02C04-E | 10 R | 16 S | 20 S | 16 I | 0 R | 14 R | 20 S | 24 S |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | |
| 03C03-E | 13 I | 16 S | 19 S | 17 I | 0 R | 18 I | 22 S | 23 S |
| ท่อน้ำทิ้ง | | | | | | | | |
| 04C01-E | 13 I | 19 S | 19 S | 19 S | 0 R | 20 I | 23 S | 25 S |
| 04C04-E | 12 I | 16 S | 17 S | 16 I | 24 S | 27 S | 23 S | 26 S |
| 04C06-E | 6 R | 0 R | 16 I | 0 R | 23 S | 23 S | 0 R | 24 S |
| 04C07-E | 11 R | 0 R | 14 R | 10 R | 20 S | 23 S | 0 R | 22 S |
| 04C09-E | 12 I | 0 R | 16 I | 15 I | 19 S | 25 S | 0 R | 22 S |
| 04C10-E | 12 I | 0 R | 16 I | 14 I | 19 S | 23 S | 0 R | 23 S |
| 04C11-E | 13 I | 7 R | 16 I | 17 I | 22 S | 25 S | 0 R | 23 S |
| คลอง | | | | | | | | |
| 05C05-E | 12 I | 15 S | 17 S | 17 I | 23 S | 0 R | 23 S | 27 S |
| น้ำประปา | | | | | | | | |
| 06C02-E | 11 R | 15 S | 18 S | 17 I | 20 S | 30 S | 0 R | 18 S |
| 06C03-E | 0 R | 17 S | 19 S | 17 I | 0 R | 28 S | 0 R | 30 S |
| 06C04-E | 0 R | 17 S | 19 S | 18 S | 7 R | 27 S | 0 R | 0 R |
| แม่น้ำ | | | | | | | | |
| 08C01-E | 0 R | 18 S | 21 S | 21 S | 7 R | 21 S | 0 R | 0 R |
| 08C02-E | 10 R | 15 S | 17 S | 17 I | 22 S | 26 S | 0 R | 12 I |
| 08C03-E | 13 I | 17 S | 18 S | 18 S | 24 S | 0 R | 22 S | 26 S |
| 08C04-E | 0 R | 18 S | 18 S | 18 S | 0 R | 30 S | 0 R | 28 S |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 08C05-E | 12 I | 16 S | 17 S | 16 I | 22 S | 23 S | 6 R | 17 S |
| คลอง | | | | | | | | |
| 10C05-E | 10 R | 16 S | 16 I | 16 I | 20 S | 26 S | 0 R | 11 I |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | |
| 17C03-E | 0 R | 0 R | 19 S | 15 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 17C05-E | 0 R | 0 R | 18 S | 14 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | |
| 18C02-E | 11 R | 13 I | 16 I | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 18C03-E | 0 R | 0 R | 18 S | 15 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 18C04-E | 12 I | 15 S | 16 S | 11 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 18C05-E | 12 I | 14 I | 17 S | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| แม่น้ำ | | | | | | | | |
| 19C01-E | 0 R | 18 S | 19 S | 17 I | 7 R | 20 I | 0 R | 0 R |
| 19C02-E | 9 R | 12 R | 16 I | 9 R | 8 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 19C03-E | 0 R | 16 S | 18 S | 17 I | 0 R | 19 I | 0 R | 0 R |
| 19C04-E | 0 R | 15 S | 16 I | 16 I | 25 S | 20 S | 21 S | 26 S |
| แม่น้ำ | | | | | | | | |
| 21C01-E | 0 R | 0 R | 15 I | 13 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 21C02-E | 8 R | 0 R | 17 S | 15 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 21C04-E | 0 R | 0 R | 16 I | 15 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | |
| 22C01-E | 0 R | 0 R | 18 S | 15 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 22C02-E | 8 R | 0 R | 19 S | 15 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 22C03-E | 12 I | 15 S | 17 S | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 22C04-E | 0 R | 0 R | 16 I | 14 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| อ่างเก็บน้ำ | | | | | | | | |
| 23C01-E | 12 I | 14 I | 17 S | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 23C03-E | 10 I | 14 I | 17 S | 11 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 23C04-E | 11 R | 13 I | 15 I | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | |
| 24C01-E | 12 I | 14 I | 17 S | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | |
| 25C03-E | 13 I | 14 I | 16 I | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| คลอง | | | | | | | | |
| 26C01-E | 12 I | 13 I | 16 I | 12 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 26C02-E | 0 R | 17 S | 17 S | 18 S | 0 R | 19 I | 0 R | 0 R |
| 26C04-E | 0 R | 16 S | 17 S | 18 S | 0 R | 19 I | 0 R | 0 R |
| น้ำประปา | | | | | | | | |
| 30C01-E | 11 R | 15 S | 18 S | 10 R | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| 30C04-E | 0 R | 15 S | 17 S | 18 S | 8 R | 18 I | 0 R | 0 R |
| 30C05-E | 0 R | 0 R | 18 S | 16 I | 0 R | 0 R | 0 R | 0 R |
| แม่น้ำ | | | | | | | | |
| 32C01-E | 13 I | 17 S | 18 S | 18 S | 21 S | 20 I | 0 R | 26 S |
| 32C03-E | 8 R | 17 S | 18 S | 16 I | 0 R | 18 I | 0 R | 0 R |
| 32C05-E | 12 I | 17 S | 19 S | 17 I | 25 S | 22 S | 0 R | 27 S |
| E.coli | 14 I | 18 S | 24 S | 22 S | 26 S | 32 S | 26 S | 28 S |