

อธิบดีบัญชาการ

สัญญาเลขที่ R2562B0089



สำนักหอสมุด



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

อุบัติการณ์ของเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียชนิดอ็อกซาคาร์บาพีแนม  
ในแม่น้ำน่านและการแพร่กระจายของเชื้อในชุมชนภาคเหนือ  
ตอนล่าง

Occurrence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae  
in Nan river and their dissemination in the community of  
lower northern Thailand

### หัวหน้าโครงการ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน 7 มี.ค. 2565

เลขทะเบียน 1049292

เลขเรียกหนังสือ ว 67

186  
พ 2635

รศ.ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์  
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 2567

สิงหาคม 2563

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

อุบัติการณ์ของเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียชนิดอียาคาร์บาพีแนม  
ในแม่น้ำน่านและการแพร่กระจายของเชื้อในชุมชนภาคเหนือ  
ตอนล่าง

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. รศ.ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์      ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์  
มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. รศ.ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี      ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์  
มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร  
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ. 2562 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวอนงค์ คิตติ และ นางสาววิมลรัตน์ กันแดง ในการทำวิจัย และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี บรรลुวัตถุประสงค์ตามการวิจัย



(รศ.ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	iii
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	5
ผลและอภิปรายผลการวิจัย	9
สรุปผลการศึกษา	20
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	25



## บทคัดย่อ

การศึกษาเชื้อดื้อยาในแม่น้ำน่านครั้งนี้ ไม่พบเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae คือยาคาร์บาพีเนม แต่พบเชื้อ *Pseudomonas* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท และ *Acinetobacter* spp. ที่ดื้อยาหลายขนาน โดยเชื้อ *Acinetobacter* spp. นั้นพบ *Acinetobacter nosocomialis* มากที่สุดคือ 28 ไอโซเลท รองลงมาคือ, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter* spp. และ *Acinetobacter baumannii* จำนวน 10, 4 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. ดื้อต่อยา aztreonam ร้อยละ 36.4 และ cefepime ร้อยละ 27.3 แต่ยังคงไวต่อยาคาร์บาพีเนม เชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่ดื้อยาคาร์บาพีเนม โดยดื้อยา imipenem และ meropenem ร้อยละ 37.8 และ 22.2 ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ดื้อต่อยา cefepime cefotaxime ceftazidime และ ampicillin-sulbactam ร้อยละ 48.8, 41.9 27.9 และ 11.6 ตามลำดับ เชื้อ *Acinetobacter* spp. มีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลาย โดยพบเชื้อที่ดื้อยามากที่สุด 6 ชนิด นอกจากนี้ยังพบค่า MIC ต่อยา ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem และ meropenem ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. อยู่ในช่วง 2-32, 1-16, 1-16 และ 1-32 mg/L ตามลำดับ

การตรวจหายีน *bla<sub>OXA</sub>* ในเชื้อ ผลการศึกษาพบว่า *Acinetobacter* spp. จำนวน 56 ไอโซเลท พบว่า ตรวจพบยีน OXA-carbapenemase จำนวน 36 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 64.3 โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ OXA-51 จำนวน 30 ไอโซเลท ซึ่ง OXA-24 พบเพียง 3 ไอโซเลท ขณะที่ และมี 3 ไอโซเลท ที่พบทั้ง OXA-24 และ OXA-51 อย่างไรก็ตามยีน *bla<sub>OXA</sub>* ไม่สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียตัวรับโดยวิธี conjugation ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบความสามารถของเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Acinetobacter* sp. ในการแสดงออกของกระบวนการ efflux pump โดยเป็นอีกกลไกหนึ่งในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *Acinetobacter* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท และ 3 ไอโซเลท มีการแสดงออกของ efflux pump เพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อดื้อยา meropenem และ imipenem ตามลำดับ ส่วนยา ceftazidime นั้น พบว่ามีเชื้อ *Acinetobacter* spp. 15 ไอโซเลท และยา ciprofloxacin มีเชื้อเพียง 4 ไอโซเลทที่มีการแสดงออกของ efflux pump

การศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยวิธี Pulse field gel electrophoresis พบว่า มีรูปแบบ PFGE ทั้งหมด 20 รูปแบบ พบเชื้อที่มีจีโนไทป์ใกล้เคียงกันในบริเวณเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าอาจเกิดการแพร่กระจายของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ภายในพื้นที่เดียวกัน แต่ไม่พบว่ามี การแพร่กระจายในพื้นที่ๆ ต่างกัน

## 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

คาร์บาเพนิม (carbapenem) จัดเป็นยาต้านจุลชีพกลุ่ม beta-lactam ที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้รักษาโรคติดเชื้อได้หลายชนิด รวมทั้งเชื้อที่ดื้อยา cephalosporin รุ่นที่ 3 และ 4 ได้ แต่ในปัจจุบัน มีรายงานการพบเชื้อการดื้อยาคาร์บาเพนิมมากขึ้น ซึ่งจัดเป็นปัญหาที่สำคัญมาก ในทางการแพทย์และสาธารณสุข โรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยาคาร์บาเพนิมจัดเป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ ที่เป็นอันตรายร้ายแรงต่อสุขภาพของมนุษย์ ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการรักษาและอัตราการตายสูง ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียดื้อยาคาร์บาเพนิม ไม่ได้พบเฉพาะในโรงพยาบาลเท่านั้น แต่พบมากในสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เป็นเพราะมีการใช้ยาต้านจุลชีพกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งยาเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะมีการปนเปื้อนลงไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและน้ำ ในปัจจุบันแหล่งน้ำเกือบทุกแห่ง มีการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพรวมทั้งยาคาร์บาเพนิมปนเปื้อนอยู่ทั้งที่ผิวน้ำและใต้ผิวน้ำ ซึ่งเชื้อดื้อยานี้สามารถแพร่จากแหล่งน้ำสู่คนและสัตว์ได้ เนื่องจากยีนที่ควบคุมการดื้อยามักพบอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ ดังนั้นการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาจึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ผู้ที่จะได้รับผลกระทบมากจะเป็นประชาชนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ๆ มีเชื้อดื้อยาปนอยู่ในสิ่งแวดล้อม สำหรับในประเทศไทย เนื่องจากการสาธารณสุขยังไม่ทั่วถึง นอกจากนี้ประชาชนส่วนใหญ่มีอาชีพเกษตรกรรม มีการสัมผัสดินและน้ำอยู่เสมอ ดังนั้นโอกาสที่จะได้รับเชื้อก็มีมาก ถ้าได้รับเชื้อดื้อยาเข้าไปก็อาจจะทำให้รักษายาก เกิดความเสียหายต่อชีวิตและทรัพย์สินได้

ในส่วนของภาคเหนือตอนล่าง มีแม่น้ำที่สำคัญที่ไหลผ่านจังหวัดพิษณุโลก พิจิตร อุตรดิตถ์ คือแม่น้ำน่าน ซึ่งเป็น แหล่งน้ำดิบที่ใช้ทำน้ำประปาด้วย อย่างไรก็ตาม เนื่องจากประชาชนบริเวณใกล้เคียง ส่วนใหญ่มีอาชีพ เพาะปลูกและเลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้ยังมีโรงพยาบาล หลายแห่งตั้งอยู่ในทุกจังหวัด อีกด้วย น้ำทิ้งจากเกษตรกรรมและโรงพยาบาลจะไหลลงสู่แม่น้ำ น่าน จึงมีโอกาสสูงที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาจะปนเปื้อนลงไปในแม่น้ำ

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้ขึ้นมาเพื่อศึกษาความชุกของเชื้อดื้อยาคาร์บาเพนิมในแหล่งน้ำ และจะทำการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อดื้อยาคาร์บาเพนิมที่พบในแม่น้ำน่านกับที่พบในแหล่งต่างๆ เช่น ในคนและสัตว์ อีกด้วย โดยจะเน้นศึกษาในเชื้อ Enterobacteriaceae (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) ซึ่งเชื้อ Enterobacteriaceae เป็นเชื้อที่พบมากในสิ่งแวดล้อม และเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่พบมากเป็นอันดับต้นๆ ของประเทศไทย ข้อมูลที่ได้จากการวิจัย อาจนำไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในชุมชน ซึ่งจะส่งผลถึงสุขภาพของประชาชน และอาจส่งผลให้อัตราการติดเชื้อดื้อยาจากชุมชนลดลง นอกจากนี้ผลการวิจัยสามารถนำไปใช้ในการเตรียมการเพื่อเฝ้าระวังและการป้องกันการเกิดโรคของประชาชนในบริเวณใกล้เคียง

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ CRE ที่แยกได้จากแม่น้ำน่านในเขตจังหวัดพิษณุโลก พิษณุโลก และอุตรดิตถ์
- 2.2 เพื่อศึกษารูปแบบของการดื้อยาและชนิดของยีนดื้อยาในเชื้อ CRE ที่แยกได้จากแม่น้ำน่าน
- 2.3 เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ CRE ในชุมชน โดยเปรียบเทียบเชื้อที่แยกได้จากแม่น้ำน่าน คน และ สัตว์

## 3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ CRE จากแม่น้ำน่าน ในเขตจังหวัดพิษณุโลก พิษณุโลก และอุตรดิตถ์ ทั้งหมด...8....จุด จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่มต่างๆ ชนิดยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase และศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ CRE ในแม่น้ำน่าน คน และ สัตว์

## 4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในแหล่งน้ำต่าง เป็นจำนวนมาก ซึ่งเชื้อดื้อยาเหล่านี้ อาจส่งผลให้มีการติดเชื้อมากขึ้น ทำให้ใช้เวลานานในการรักษา และอาจเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อดื้อยาคาร์บาเพนิม เนื่องจากยาคาร์บาเพนิมจัดเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูง โดยปกติแล้วน้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือแหล่งน้ำในชุมชนมักมีการปนเปื้อนด้วยน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรต่างๆ เช่น การเพาะปลูก การเลี้ยงสัตว์ สำหรับน้ำเสียในหน่วยงานต่างๆ รวมทั้งในโรงพยาบาลนั้น ถึงแม้ว่าจะมีระบบบำบัดเพื่อที่จะกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อนที่จะถูกปล่อยออกสู่ชุมชน เพื่อไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรค แต่ก็มีรายงานจำนวนมากที่พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียนั้นไม่สามารถกำจัดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจำนวนมาก

การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาคาร์บาเพนิมนั้น เกิดขึ้นได้ง่าย เนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยามักพบอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ ทำให้สามารถถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยาไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีเชื้อแบคทีเรียที่ ดื้อต่อยาคาร์บาเพนิมมากขึ้นขึ้นมาได้ถึงแม้ว่าเชื้อบางสายพันธุ์จะไม่เคยสัมผัสกับยาคาร์บาเพนิมมาก่อน

จะเห็นได้ว่าการศึกษารวบรวมเชื้อแบคทีเรียดื้อยานั้นนอกจากศึกษาในเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลแล้ว ควรศึกษาในเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมด้วย ในปัจจุบันมีรายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่พบในโรงพยาบาลมีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อดื้อยาที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ดังนั้นการศึกษาแบคทีเรียดื้อยาในแหล่งน้ำจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากมี โอกาสสูงที่เชื้อดื้อยาจะแพร่จากแหล่งน้ำสู่คน

## 5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันพบรายงานของเชื้อดื้อยาที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมากมาย ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดเชื้อดื้อยาคือใช้ยาต้านจุลชีพมากเกินไปจนเกิดความจำเป็น ไม่ว่าจะเป็นการรักษาโรคติดเชื้อในคนและสัตว์ หรือนำไปใช้ในเป็น growth promoter ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้มีการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพลงไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและน้ำ ในปัจจุบันแหล่งน้ำเกือบทุกแห่งมียาต้านจุลชีพปนเปื้อนอยู่ทั้งที่ผิวน้ำและใต้ผิวน้ำ ยาต้านจุลชีพบางชนิดพบได้ในน้ำใต้ดินที่อยู่ลึกลงไปถึง 10 เมตร ซึ่งทำให้เกิด selective pressure อย่างมากต่อเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม โดยส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อยาหลายชนิด และเกิดการดื้อยาที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ (Zhang et al., 2009) แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่พบว่ามีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง คือแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญเติบโตง่าย พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเป็น เชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์หลายชนิด มีรายงานพบว่าเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อทั้งในโรงพยาบาลและในชุมชน โดยพบว่าทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและสัตว์มากมายเช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง ระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ทางเดินหายใจ รวมไปถึงการติดเชื้อในช่องท้อง ระบบประสาท และในกระแสเลือด ฯลฯ

คาร์บาเพนิม (carbapenem) เช่น imipenem, meropenem และ ertapenem เป็นยาต้านจุลชีพ ในกลุ่ม beta-lactam ที่มีการใช้กันมาก เนื่องจากเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูง มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ (bactericidal agent) ออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum antimicrobial agents) และยังใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยาอื่นๆ ได้ดี มีความเป็นพิษต่ำ (Sotgiu et al., 2016) อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ดื้อยาคาร์บาเพนิม (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) จากหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย (Hsu et al., 2017; Kelly et al., 2017) ซึ่งกลไกในการดื้อยานั้น มีหลายกลไก แต่กลไกที่สำคัญ ได้แก่การที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase ออกมาทำลายยา ปัจจุบันมีรายงานของเอนไซม์ carbapenemase หลายชนิดที่แตกต่างกัน เอนไซม์ carbapenemase มีความสามารถในการย่อยสลายยา carbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem) รวมทั้ง beta-lactams ชนิดอื่นๆ เช่น penicillin และ cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้าง (ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone) และ monobactam (aztreonam) ได้ ปัจจุบัน carbapenemase มีหลายชนิด ดังนี้ (i). class A carbapenemase โดยตัวอย่างเอนไซม์ที่พบได้แก่ IMI/NMC-A แต่เอนไซม์ที่พบมากในกลุ่มนี้คือ KPC หรือ Klebsiella pneumoniae carbapenemase (ii). class B carbapenemase หรือ metallo beta-lactamase โดยเอนไซม์ที่พบได้แก่ IMP, NDM และ VIM และ (iii) class D carbapenemase หรือ OXA-type carbapenemase เอนไซม์ที่พบมากในกลุ่มนี้คือ OXA-48 และ OXA-181 (Nordmann et al., 2011)

เชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae หลายชนิดมีรายงานว่าสร้างเอนไซม์ carbapenemase ได้ เช่น E. coli, Klebsiella spp., Proteus spp., และ Enterobacter spp. ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase มักจะพบอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) และ



มักพบควบคู่ไปกับยีนดื้อยาชนิดอื่นๆ ทำให้เชื้อมีคุณสมบัติการดื้อยาหลายขนาน และสามารถถ่ายทอดจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง โดยกระบวนการ horizontal gene transfer ได้ ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ได้ ก็นับว่าเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อในคนและสัตว์ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีรายงานการติดเชื้อจาก CRE เพิ่มขึ้นทั่วโลก (Kelly et al., 2017)

การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ CRE ในแหล่งน้ำธรรมชาติเป็นเรื่องสำคัญ เนื่องจากเชื้อ CRE มีโอกาสแพร่มาสู่คนได้ง่าย (Woodford et al., 2014) ดังเช่นที่มีพบเชื้อ NDM-producing *Escherichia coli* ที่มีจีโนมใกล้เคียงกันจากแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำเสีย และจากคน ในประเทศไอร์แลนด์ (Mahon et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากประเทศเลบานอน พบ NDM-1-producing *Enterobacter cloacae* ที่มีจีโนมใกล้เคียงกันจากน้ำทิ้งของโรงพยาบาลและผู้ป่วย (Daoud et al., 2017)

โรคติดเชื้อ CRE ก็รักษายากและอัตราการเสียชีวิตสูง ปัจจุบัน มีรายงานหลายฉบับที่พบเชื้อ CRE ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ โรงพยาบาลและที่อยู่อาศัย (Zhang et al., 2012; Yang et al., 2016; Nasri et al., 2017) ในส่วนของแหล่งน้ำธรรมชาตินั้น ในปี ค.ศ. 2005 การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาพบ CRE ในแม่น้ำ 7 แห่ง และพบยีน bla<sub>IMI-2</sub> ซึ่งอยู่บนพลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้ (Aubron et al., 2005) การศึกษาในทวีปยุโรปพบ เชื้อ CRE ที่มียีน bla<sub>KPC</sub>, bla<sub>IMP</sub> และ bla<sub>VIM</sub> ในแม่น้ำ ประเทศสเปน (Piedra-Carrasco et al., 2017) โปรตุเกตุ (Poirel et al., 2012) และสวิสเซอร์แลนด์ (Zurfluh et al., 2015) ในทวีปเอเชียก็มีรายงานของเชื้อ เชื้อ CRE ที่มียีน bla<sub>NDM</sub> จากแม่น้ำในประเทศเกาหลี และอินเดีย (Di et al., 2017; Akiba et al., 2016)

ในประเทศไทยนั้น การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ CRE รวมทั้งชนิดของยีนดื้อยามีรายงานการศึกษาหลายฉบับ โดยพบ CRE ที่มียีน bla<sub>KPC</sub>, bla<sub>IMP</sub> และ bla<sub>VIM</sub> ในแต่ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในผู้ป่วย (Preechachuawong et al., 2015; Netikul and Kiratisin, 2015; Lunha et al., 2016) แต่การศึกษา CRE ในแหล่งน้ำธรรมชาตินั้นมีน้อย ทั้งๆที่ มีรายงานหลายฉบับที่สนับสนุนว่าแหล่งน้ำธรรมชาติเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญ และสามารถแพร่สู่คนได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชน ในชุมชน เชื้อแบคทีเรียดื้อยานั้น เป็นปัญหาที่สำคัญมากปัญหาหนึ่งในการควบคุมโรคติดเชื้อ และการแก้ปัญหาเชื้อดื้อยาที่พบบ่อยในประเทศไทย การศึกษาความชุกของเชื้อ CRE ดื้อยาในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีความใกล้ชิดกับคน จึงเป็นส่วนหนึ่งของการเตรียมการเพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ต่อไป

## 6. วิธีการดำเนินการวิจัย

### 6.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา carbapenem จากแหล่งน้ำ (Isolation of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli from water environment)

แยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา carbapenem จากแหล่งน้ำ โดยเก็บน้ำจากแม่น้ำน่าน ในเขต จ.พิษณุโลก จ. พิจิตร และ จ. อุตรดิตถ์ จำนวน 8 จุด (ภาพ 1) นำตัวอย่างน้ำมาทำการแยกเชื้อโดยวิธี membrane filtration technique และ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ซึ่งใช้เป็นจานอาหารควบคุม และอาหาร MacConkey agar ที่มีการเติมยา meropenem 0.5 mg/l บ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่เจริญ

โคโลนีที่เจริญบนจานอาหารที่มีการเติมยา meropenem จะเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน อย่างละ 3 โคโลนี นำโคโลนีที่พบมา streak บนอาหาร MacConkey agar อีกครั้ง แล้วเก็บเชื้อไว้เพื่อทำการศึกษาต่อไป

### 6.2 การตรวจหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial susceptibility testing)

ศึกษาความไวของเชื้อ CRE ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ โดยวิธี Disk diffusion test ตามวิธีการของ Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI, 2014) โดยเตรียมความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  cfu/ml) จากนั้นทำการ spread เชื้อที่ต้องการทดสอบบน Mueller-Hinton agar แล้วทำการวาง antibiotic disk ลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของ clear zone และแปลผลโดยนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานที่กำหนดไว้ (CLSI, 2014)

### 6.3 การตรวจหาค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Determination of Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

ศึกษาค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution method ตามคำแนะนำของ CLSI (CLSI, 2014) โดยทำการเจือจางยาต้านจุลชีพ ให้มีความเข้มข้น 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 mg/L ตามลำดับ แล้วเติมเชื้อ  $10^5$  cfu หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ค่า MIC อ่านจากค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

### 6.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา carbapenem

เชื้อที่ให้ผลว่าดื้อต่อยาคาร์บาพีเนม จากการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ หรือ MIC ในข้อ 6.2 และ 6.3 จะนำมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ชุดสำเร็จรูป RapID ONE (Ramel Inc, KS, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต หรือการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene โดยใช้ primer 24F และ 1492R (Lane, 1991) เชื้อที่อยู่ในจีโนม *Acinetobacter* spp. จะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสปีชีส์เพิ่มเติมโดยวิธี PCR ที่บริเวณตำแหน่งต่างๆของยีน

*gyrB* (Higgins et al., 2010) (ตารางที่ 1) เก็บเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ใน 30% glycerol และ Cryobank (Delta lab, Barcelona, Spain) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ยีน	ลำดับเบสของ primer (5'-3')	Expected PCR product	เอกสารอ้างอิง
24F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTGTACGACTT	1500	Lane, 1991
sp2F <i>A. baumannii</i>	GTTCTGATCCGAAATTCTCG	490 (sp2F-sp4R)	Higgins et al., 2010
sp4F <i>A. baumannii</i> และ GS13TU ( <i>A. nosocomialis</i> )	CACGCCGTAAGAGTGCATTA	294 (sp4F-sp4R)	
sp4R <i>A. baumannii</i> และ GS13TU ( <i>A. nosocomialis</i> )	AACGGAGCTTGTCAGGGTTA		
D16 <i>Acinetobacter</i> GS3 ( <i>A. pittii</i> ) D8	GATAACAGCTATAAAGTTTCAGGTGGT CAAAAACGTACAGTTGTACCACTGC	194	Higgins et al., 2010

### 6.5 การตรวจหา carbapenemase genes โดยวิธี multiplex PCR และการหาลำดับเบส

(Detection of carbapenemase genes by multiplex PCR and sequencing)

ตรวจหา carbapenemase gene ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* และ *bla<sub>OXA</sub>* โดยวิธี multiplex PCR ซึ่ง primers และ สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ก็จะใช้ตามที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว (ตารางที่ 2) (Woodford et al., 2006; Poirel et al., 2011)

การตรวจหา ยีนคือยาลำหรับงานวิจัยนี้จะใช้วิธี PCR โดยเตรียม template ด้วยวิธี boiling method ซึ่งสามารถทำได้โดยนำเชื้อไปละลายในน้ำกลั่น 500 µl แล้วนำไปต้ม 5 นาที จากนั้นปั่นแยกตะกอนเชื้อออกในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที นำสารละลายใสด้านบน (supernatant) ไปใช้เป็น template ใน PCR ในปฏิกิริยาของการทำ PCR ประกอบด้วย template, 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, 200 µM dNTPs, 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, Taq polymerase, 10X amplification buffer และ sterile deionized water ปรับปริมาตรรวม 50 µl สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR สำหรับการตรวจหา int1 คือ 94 °C 5 นาที 1 รอบ, 94 °C 45 วินาที (denaturing), 48 °C 45 วินาที (annealing), 72 °C 45 วินาที (extension) จำนวน 30 รอบ

และ 72 °C 10 นาที 1 รอบ หลังจากได้เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจผลการ amplification ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA molecular weight marker

เมื่อได้ PCR product แล้วก็นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยชุดสำเร็จรูปตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเพื่อนำไปหาลำดับเบสโดยจะส่งไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ carbapenemase gene ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

#### 6.6 การถ่ายทอด carbapenemase gene โดยวิธี conjugation (Transfer of carbapenemase gene by conjugation)

ศึกษาการถ่ายทอด carbapenemase gene โดยการ conjugation ด้วยวิธี broth mating method โดยใช้ *Escherichia coli* ที่ดื้อยา rifampin (rifampin-resistant *E. coli* DH5 $\alpha$ ) เป็นตัวรับ (recipient) และใช้เชื้อที่มี carbapenemase gene เป็นตัวให้ (donor) ทำการผสมเชื้อที่เป็นตัวรับและตัวให้ แล้ว บ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมา spread บนอาหารที่เติม rifampin (16 mg/L) และ imipenem (1 mg/L) แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาค่าความสามารถในการถ่ายทอดยีน (conjugation frequency)

ทดสอบว่ามีการถ่ายทอดยีนใน transconjugant หรือไม่ โดยตรวจหายีนใน transconjugant ด้วยวิธี PCR และ การดื้อยาของ transconjugant โดยการหาค่า carbapenem MIC (ตามวิธีการในข้อ 6.3) เปรียบเทียบกับ recipient

#### 6.7 การแสดงออกของ efflux pump (Efflux pump overexpression)

ศึกษาการแสดงออกของ efflux pump การเปรียบเทียบค่า MIC ของยาต้านจุลชีพ ในสภาวะที่มีการเติม โดยทำการเติม Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PABN) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น efflux pump inhibitor ลงในยาที่ต้องการทดสอบ หากค่า MIC ลดลงอย่างน้อย 4 เท่า สามารถแปลผลได้ว่ามีการแสดงออกของ efflux pump (positive)

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน carbapenemase genes

ยีน	ลำดับเบสของ primer (5'-3')	Expected PCR product	เอกสารอ้างอิง
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTAAYAAAACAACCACC	232	Poirel et al., 2011
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	GATGGTGTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390	Poirel et al., 2011
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	Poirel et al., 2011
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621	Poirel et al., 2011
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	Woodford et al., 2006
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	Woodford et al., 2006
<i>bla<sub>OXA-24</sub></i>	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246	Woodford et al., 2006
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599	Woodford et al., 2006

## 6.8 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมโดยเทคนิค Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

ศึกษาจีโนไทป์ (genotypic characterization) ของเชื้อเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธี PFGE โดยจะทำตามวิธีการของ Xiong et al. (2002) เริ่มจากการเตรียม plug โดยใช้เซลล์แบคทีเรียผสมกับ low melting agarose จากนั้นทำการย่อย plug ด้วย lysozyme และ proteinase K จากนั้นย่อย plug ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ผลแยกชิ้นส่วน DNA โดยวิธี PFGE ด้วย CHEF Mapper XA System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) จากนั้นนำไปย้อมด้วย 0.5 mg/L ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที และถ่ายภาพรูปแบบ PFGE ภายใต้ UV transilluminator (Gel Documentation Systems, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA) แปลผลโดยใช้เกณฑ์ของ Tenover et al. (1995)

## 7. ผลการศึกษา

### 7.1 ความชุกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาคาร์บาพีเนม

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำน่านทั้งหมด 8 จุด ในจังหวัดอุตรดิตถ์ พิษณุโลก และ พิจิตร (ภาพ 1) นำมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาคาร์บาพีเนม ได้ผล ดังนี้

7.1.1 ใน จ.อุตรดิตถ์ 2 จุด (A และ B) โดยจุด A พบ *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter pittii* และ *Acinetobacter nosocomialis* จำนวน 2, 1 และ 1 ไอโซเลทตามลำดับ จุด B พบ *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. จำนวน 10 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ

7.1.2 ใน จ.พิษณุโลก 3 จุด (C, D และ E) โดยจุด C พบ *Acinetobacter* sp. จำนวน 9 ไอโซเลท จุด D พบ *Pseudomonas otitidis* จำนวน 1 ไอโซเลท จุด E พบ *Pseudomonas aeruginosa* 1 ไอโซเลท

7.1.3 ใน จ.พิจิตร 3 จุด (F, G และ H) โดยจุด F พบ *Acinetobacter* spp. และ *Pseudomonas* spp. จำนวน 10 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ จุด G พบ *Acinetobacter* spp. และ *Pseudomonas* spp. จำนวน 7 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ และ จุด H พบ *Acinetobacter* spp. และ *Pseudomonas* spp. จำนวน 7 และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ

การพิสูจน์เอกลักษณ์พบเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Pseudomonas otitidis* จำนวน 10 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนเชื้อในจีนัส *Acinetobacter* sp. พบ *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter* spp. และ *Acinetobacter baumannii* และ จำนวน 28, 10, 4 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 1 แสดงระยะห่างของแต่ละจุดพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างน้ำ

ตารางที่ 3 แสดงผลการแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. จากตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ในแต่ละพื้นที่ของจังหวัด พิจิตร พิษณุโลก และ อุตรดิตถ์

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	วันที่เก็บ	จุดเก็บตัวอย่าง	เชื้อ	ชนิดของ OXA
1	1NM12V	13/8/2560	A	<i>Acinetobacter pittii</i>	-
2	2NM13V	13/8/2560	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
3	2NM19BR	13/8/2560	B	<i>Acinetobacter</i> sp.	-
4	2NM20BR	13/8/2560	B	<i>Pseudomonas otitidis</i>	-
5	3NM10V	13/8/2560	C	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
6	3NM11V	13/8/2560	C	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
7	3NM19V	13/8/2560	C	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
8	4NM13V	13/8/2560	F	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
9	6NM1B	13/8/2560	H	<i>Acinetobacter pittii</i>	-
10	1.2NM8V	7/10/2560	A	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
11	1.2NM12V	7/10/2560	A	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
12	2.2NM9V	7/10/2560	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
13	3.2NM6P	7/10/2560	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	51
14	3.2NM7P	7/10/2560	C	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
15	3.2NM12P	7/10/2560	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	51
16	3.2NM13V	7/10/2560	C	<i>Acinetobacter baumannii</i>	51
17	4.2NM5V	7/10/2560	F	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
18	4.2NM10V	7/10/2560	F	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
19	4.2NM11V	7/10/2560	F	<i>Acinetobacter baumannii</i>	24,51
20	2.3NM6P	10/2/2561	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	24,51
21	3.3NM2V	10/2/2561	C	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
22	4.3NM2V	10/2/2561	F	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
23	4.3NM4B	10/2/2561	F	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
24	4.3NM5B	10/2/2561	F	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
25	4.3NM6V	10/2/2561	F	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
26	4.3NM8P	10/2/2561	F	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
27	5.3NM4V	10/2/2561	G	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
28	5.3NM7V	10/2/2561	G	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
29	5.3NM10V	10/2/2561	G	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
30	6.3NM5V	10/2/2561	H	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
31	6.3NM6V	10/2/2561	H	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
32	6.3NM9V	10/2/2561	H	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51



ตารางที่ 3 แสดงผลการแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. จากตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ในแต่ละพื้นที่ของจังหวัด พิจิตร พิษณุโลก และ อุตรดิตถ์ (ต่อ)

ลำดับ ที่	รหัสเชื้อ	วันที่เก็บ	จุดเก็บ ตัวอย่าง	เชื้อ	ชนิด ของ OXA
33	6.3NM10P	10/2/2561	H	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
34	1.4NM5P	6/4/2561	A	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
35	2.4NM1E	6/4/2561	B	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
36	2.4NM3V	6/4/2561	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
37	2.4NM4B	6/4/2561	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
38	2.4NM6B	6/4/2561	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
39	2.4NM7V	6/4/2561	B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	24,51
40	2.4NM8V	6/4/2561	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
41	2.4NM9V	6/4/2561	B	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
42	3.4NM4V	6/4/2561	C	<i>Acinetobacter pittii</i>	-
43	4.4NM2V	6/4/2561	F	<i>Acinetobacter pittii</i>	-
44	4.4NM4V	6/4/2561	F	<i>Acinetobacter pittii</i>	-
45	4.4NM10P	6/4/2561	F	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
46	5.4NM5P	6/4/2561	G	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
47	5.4NM6B	6/4/2561	G	<i>Acinetobacter pittii</i>	-
48	5.4NM7B	6/4/2561	G	<i>Acinetobacter pittii</i>	-
49	5.4NM8B	6/4/2561	G	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
50	5.4NM10P	6/4/2561	G	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	51
51	6.4NM2E	6/4/2561	H	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
52	6.4NM6V	6/4/2561	H	<i>Acinetobacter pittii</i>	24
53	6.4NM7V	6/4/2561	H	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
54	6.4NM8V	6/4/2561	H	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
55	6.4NM10V	6/4/2561	H	<i>Acinetobacter pittii</i>	24
56	6.4NM11V	6/4/2561	H	<i>Acinetobacter pittii</i>	24

## 7.2 การตรวจหาค่าความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion method ของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจำนวน 11 ไอโซเลท ใช้ยาทั้งหมด 10 ชนิด พบว่า มีการดื้อต่อยา aztreonam และ cefepime คิดเป็นร้อยละ 36.4 และ 27.3 ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันไม่พบการดื้อต่อยาชนิดอื่นๆ รวมทั้งไม่ดื้อยา carbapenem (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจำนวน 45 ไอโซเลท ใช้ยาทั้งหมด 13 ชนิด (ตารางที่ 4) พบว่า มีการดื้อต่อยา imipenem ร้อยละ 37.8 และ meropenem ร้อยละ 22.2 มีการดื้อยา cefotaxime, ceftazidime (cephalosporin รุ่นที่ 3) และ cefepime (cephalosporin รุ่นที่ 5) ร้อยละ 22.2-46.7 ดื้อยา trimethoprim/sulfamethoxazole, piperacillin/tazobactam และ ciprofloxacin โดยคิดเป็นร้อยละ 16.3, 22.2 และ 20.9 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการดื้อต่อยา gentamicin และ ampicillin/sulbactam ในอัตราที่ต่ำ โดยคิดเป็นร้อยละ 2.3 และ 11.6 ตามลำดับ เชื้อ *Acinetobacter* spp. ทุกไอโซเลทไวต่อยา amikacin, levofloxacin และ doxycycline

จากผลการศึกษาพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ดื้อยา imipenem หรือ meropenem จำนวน 17 ไอโซเลท เมื่อนำมาวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยา พบว่า มีรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกันมาก คือมีทั้งหมด 16 รูปแบบ โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดได้แก่ การดื้อยา 3 ชนิด (5 รูปแบบ) ส่วนรูปแบบที่พบน้อยที่สุดได้แก่ การดื้อยา 2 ชนิด (2 รูปแบบ) สำหรับการดื้อยา 4, 5 หรือ 6 ชนิด นั้น พบเท่าๆกัน (3 รูปแบบ) โดยแต่ละรูปแบบ มีเชื้ออย่างละ 1 ไอโซเลท ต่อ 1 รูปแบบ ยกเว้นการดื้อยา 5 ชนิด คือ cefotaxime, meropenem, imipenem, cefepime และ piperacillin/tazobactam พบ 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Pseudomonas* spp. (n = 11)

ยาต้านจุลชีพ	จำนวนเชื้อที่ดื้อ (ร้อยละ)
piperacillin/tazobactam	0
ceftazidime	0
cefepime	3 (27.3)
imipenem	0
meropenem	0
aztreonam	4 (36.4)
amikacin	0
gentamicin	0
ciprofloxacin	0
levofloxacin	0

ตารางที่ 5 แสดงร้อยละการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Acinetobacter* spp. (n = 45)

ยาต้านจุลชีพ	จำนวนเชื้อที่ดื้อ (ร้อยละ)
ampicillin/sulbactam	5 (11.1)
piperacillin/tazobactam	10 (22.2)
cefotaxime	18 (40.0)
ceftazidime	12 (26.7)
cefepime	21 (46.7)
imipenem	17 (37.8)
meropenem	10 (22.2)
amikacin	0
gentamicin	1 (2.2)
trimethoprim/sulfamethoxazole	7 (15.6)
ciprofloxacin	9 (20.0)
levofloxacin	0
doxycycline	0

ตารางที่ 6 แสดงรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Acinetobacter* spp.

รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ	จำนวนไอโซเลท (n = 17)
IPM, FEP	1
MEM, IPM	1
CTX, MEM, IPM	1
IPM, FEP, TZP	1
IPM, SXT, TZP	1
MEM, IPM, FEP	1
MEM, IPM, FEP	1
CTX, IPM, CIP, TZP	1
CTX, MEM, IPM, FEP	1
MEM, IPM, FEP, TZP	1
CTX, CAZ, IPM, FEP, CIP	1
CTX, MEM, IPM, FEP, TZP	2
CTX, SAM, MEM, IPM, SXT	1
CN, CTX, CAZ, SAM, IPM, CIP	1
CTX, CAZ, IPM, FEP, CIP, TZP	1
CTX, CAZ, MEM, IPM, FEP, TZP	1

CTX; cefotaxime, CAZ; ceftazidime, FEP; cefepime, IMP; imipenem, MEM; meropenem, SAM; ampicillin/sulbactam, TZP; piperacillin/tazobactam, CN; gentamicin, SXT; trimethoprim/sulfamethoxazole and CIP; ciprofloxacin

### 7.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยนำเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจำนวนทั้งหมด 36 ไอโซเลท โดยทำการทดสอบกับยา ceftazidime (CAZ), และ meropenem (MEM) พบค่า MIC อยู่ในช่วง 2-64, 1-32 mg/L ตามลำดับ เช่นเดียวที่ทดสอบกับยา ciprofloxacin (CIP) และ imipenem (IMP) พบค่า MIC อยู่ในช่วง 1-16 mg/L ตามลำดับ (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ค่า MIC<sub>50</sub> และ MIC<sub>90</sub> ต่อยา CAZ เท่ากับ 8 และ 16 ตามลำดับ มีค่าสูงกว่าที่เชื้อมีต่อยา CIP เท่ากับ 8 และ 4 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ค่า MIC<sub>50</sub> และ MIC<sub>90</sub> ต่อยา IMP และ MEM เท่ากับ 1 และ 16 ตามลำดับ

#### 7.4 การตรวจหายีน OXA-carbapenemase และการถ่ายทอดยีน *bla*<sub>OXA</sub> โดยวิธี conjugation

ผลการตรวจหายีน OXA-carbapenemase ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจำนวนรวมทั้งหมด 56 ไอโซเลท พบว่า เชื้อที่นำมาศึกษาตรวจพบยีน OXA-carbapenemase จำนวน 36 ไอโซเลท โดยซึ่งชนิดของยีนดังกล่าวทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ OXA-24 และ OXA-51 โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ OXA-51 จำนวน 30 ไอโซเลท ซึ่ง OXA-24 พบเพียง 3 ไอโซเลท ขณะที่ยังมี 3 ไอโซเลท ที่พบทั้ง OXA-24 และ OXA-51 (ตารางที่ 3)

การศึกษาการถ่ายทอดยีน *bla*<sub>OXA</sub> จาก *Acinetobacter* spp. จำนวน 36 ไอโซเลท ไปยัง *E. coli* J53 ด้วยวิธี broth mating method พบว่า ไม่มีเชื้อใดที่สามารถถ่ายทอดยีน *bla*<sub>OXA</sub> ไปยังแบคทีเรียตัวรับได้

#### 7.5 การแสดงออกของ efflux pump

ผลการทดสอบการแสดงออกของ pump โดยทำการเติม PAβN ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น efflux pump inhibitor ลงในยาที่ต้องการทดสอบหาค่า MIC และเมื่อเติม PAβN แล้ว หากค่า MIC ลดลงอย่างน้อย 4 เท่า สามารถแปลผลได้ว่าการแสดงออกของ efflux pump (positive) จากการศึกษาพบว่า สำหรับยา carbapenem นั้น มีเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ *A. baumannii* (n = 3) และ *A. pittii* (n = 2) ที่มี meropenem MIC ลดลง 4-32 เท่า ขณะที่พบเชื้อ *A. pittii* และ *A. baumannii* จำนวน 2 และ 1 ไอโซเลท ที่มีค่า imipenem MIC ลดลง 4-16 เท่า เมื่อมีการเติม PAβN (ตารางที่ 7)

ส่วนยา ceftazidime นั้น พบว่ามีเชื้อ *Acinetobacter* spp. 15 ไอโซเลท ที่มี ceftazidime MIC ลดลง 8-32 เท่า ในขณะที่ยา ciprofloxacin มีเชื้อเพียง 4 ไอโซเลทที่มี ciprofloxacin MIC ลดลง 4-16 เท่า

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบหาค่า MICs และการแสดงออกของ efflux pump ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ

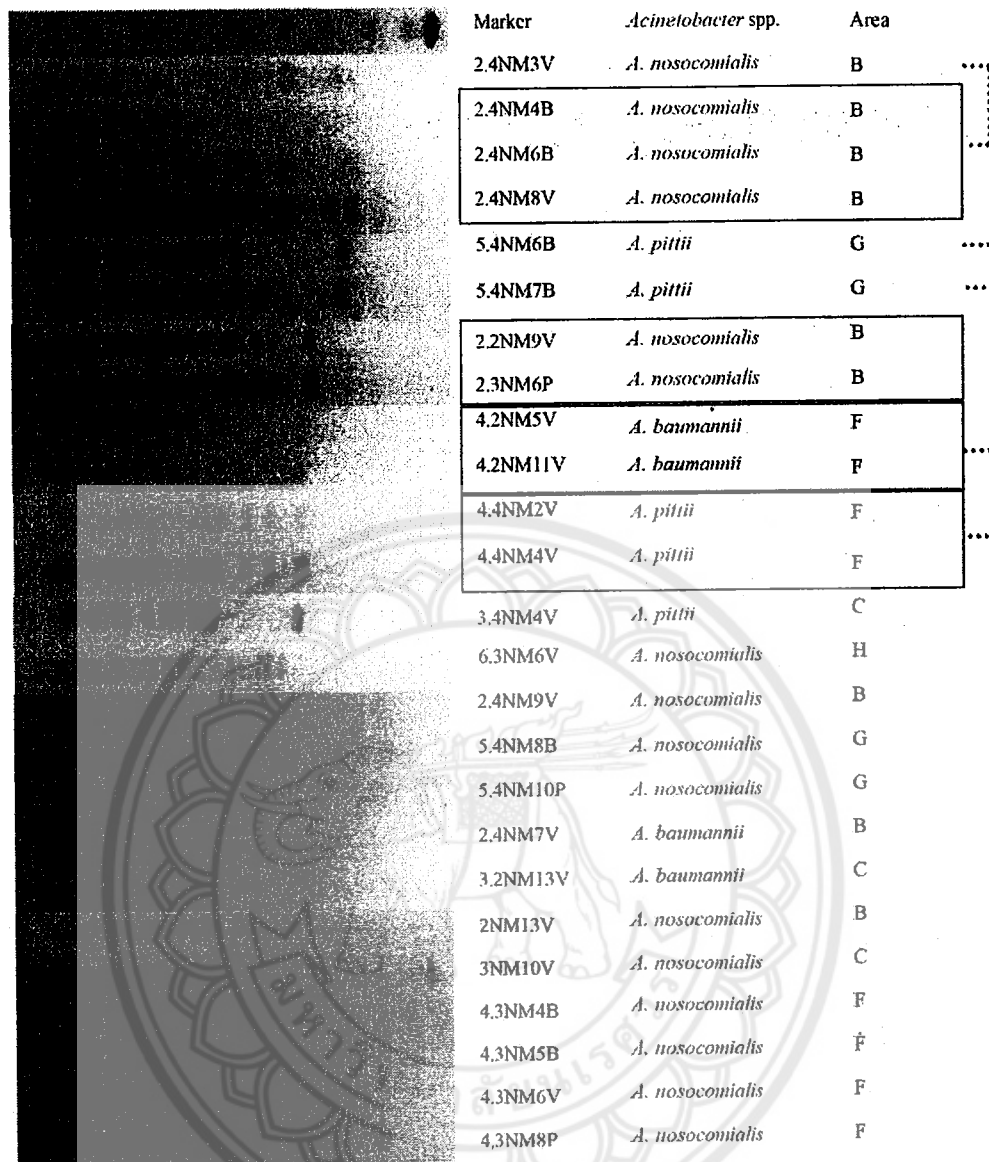
No.	รหัส	เชื้อ	MIC (mg/L)							
			CAZ	CAZ+ PAβN	CIP	CIP+ PAβN	IMP	IMP+ PAβN	MEM	MEM+ PAβN
2	2NM13V1	<i>A. nosocomialis</i>	16	2	8	0.5	1		1	
4	3NM10V1	<i>A. nosocomialis</i>	2		1		1		1	
5	3NM19V1	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		1		1	
6	1.2NM12V	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		1		1	
7	2.2NM9V	<i>A. nosocomialis</i>	16	2	1		1		1	
8	3.2NM13V	<i>A. baumannii</i>	16	2	16	4	1		1	
9	4.2NM5V	<i>A. baumannii</i>	32	2	1		8		16	4
10	4.2NM11V	<i>A. baumannii</i>	32	2	1		16	4	16	4
11	2.3NM6P	<i>A. nosocomialis</i>	64	4	16	2	1		1	
12	3.3NM2V	<i>A. nosocomialis</i>	16	4	1		1		1	
13	4.3NM4B	<i>A. nosocomialis</i>	16	2	1		1		1	
14	4.3NM5B	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		2		1	
15	4.3NM6V	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		2		1	
16	4.3NM8P	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		1		1	
17	5.3NM4V	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		1		1	
18	5.3NM7V	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		1		1	
19	6.3NM6V	<i>A. nosocomialis</i>	8		1		1		1	
20	2.4NM3V	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		1		1	
21	2.4NM4B	<i>A. nosocomialis</i>	4	0.5	1		1		1	
22	2.4NM6B	<i>A. nosocomialis</i>	16	0.5	1		1		1	
23	2.4NM7V	<i>A. baumannii</i>	8	0.5	1		16		16	0.5
24	2.4NM8V	<i>A. nosocomialis</i>	2		2		1		1	
25	2.4NM9V	<i>A. nosocomialis</i>	4		1		1		1	
26	3.4NM4V	<i>A. pittii</i>	8		1		2		8	2
27	4.4NM2V	<i>A. pittii</i>	8		1		4		4	
28	4.4NM4V	<i>A. pittii</i>	8		1		8		4	
30	5.4NM6B	<i>A. pittii</i>	8	0.5	1		2		2	
31	5.4NM7B	<i>A. pittii</i>	16	4	1		8	0.5	4	
32	5.4NM8B	<i>A. nosocomialis</i>	16	0.5	4	0.5	1		1	
33	5.4NM10P	<i>A. nosocomialis</i>	2		1		1		1	
34	6.4NM6V	<i>A. pittii</i>	4	0.5	1		2		16	
35	6.4NM10V	<i>A. pittii</i>	8		1		16		32	8
36	6.4NM11V	<i>A. pittii</i>	8		1		16	4	8	

Abbreviation: CAZ: ceftazidime, CIP: ciprofloxacin, IMP: imipenem, PAβN: Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide

#### 7.4 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยเทคนิค Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

จากการวิเคราะห์ผล Pulse field gel electrophoresis (PFGE) ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. จำนวน 25 ไอโซเลท ที่แยกได้ในตัวอย่างน้ำบริเวณพื้นที่ของจังหวัดอุดรดิตถ์ พิษณุโลก และ พิจิตร (จุด A-H) พบว่า มีรูปแบบ PFGE ทั้งหมด 20 รูปแบบ (ภาพที่ 2) โดยแบ่งเป็นกลุ่มรูปแบบที่มีลักษณะเหมือนกัน ทั้งหมด 4 กลุ่มรูปแบบ ได้แก่ กลุ่มบริเวณพื้นที่ B คือ (2.4NM4B, 2.4NM6B, 2.4NM8V) และ (2.2NM9V, 2.3NM6P) พื้นที่ F คือ (4.2NM5V, 4.2NM11V) และ (4.4NM2V, 4.4NM4V) ทั้งนี้ยังมีรูปแบบที่คล้ายกัน (เส้นประ) ในบริเวณพื้นที่เดียวกัน เช่น บริเวณพื้นที่ B, G และ F แสดงให้เห็นว่าอาจเกิดการแพร่กระจายของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ภายในพื้นที่ดังกล่าว





ภาพ 1 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยเทคนิค Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

**หมายเหตุ**

กรอบสี่เหลี่ยม หมายถึง รูปแบบ PFGE ที่เหมือนกัน  
เส้นประ หมายถึงรูปแบบ PFGE ที่คล้ายกัน



## 8. สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่คือยาคาร์บาเพนิม แต่พบเชื้อในจีนัส *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. ที่สามารถเจริญบนจานอาหารที่มียาคาร์บาเพนิม ผสมอยู่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ เชื้อทั้ง 2 จีนัส สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำโดยเฉพาะแหล่งน้ำจืด การพิสูจน์เอกลักษณ์พบเชื้อ *Pseudomonas* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ส่วนเชื้อในจีนัส *Acinetobacter* spp. พบ *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter* spp. และ *Acinetobacter baumannii* จำนวน 28, 10, 4 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. คือต่อยา aztreonam ในอัตราที่ค่อนข้างสูง (ร้อยละ 36.4) แต่ยังคงอยู่ในอัตราที่ต่ำเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Schiavano และคณะ ในปี 2017 ที่แยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. จากตัวอย่างน้ำ พบการคือต่อยาตั้งกล่าวสูงถึงร้อยละ 100 (Schiavano et al., 2017) เช่นเดียวกับการคือต่อ cefepime ในอัตราที่ค่อนข้างสูง คิดเป็นร้อยละ 27.3 เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบเพียงร้อยละ 0.8 (Kittinger et al., 2016) นอกจากนี้การศึกษายังไม่พบเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในแหล่งน้ำที่คือต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน (multidrug resistance, MDR) ซึ่งส่วนใหญ่ เชื้อดังกล่าวจะพบในผู้ป่วยที่รักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน ซึ่งเคยมีรายงานการพบ MDR *Pseudomonas* sp. มากกว่าร้อยละ 35 (Montero et al., 2009) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าเชื้อในจีนัส *Pseudomonas* sp. ไวต่อยาคาร์บาเพนิม มีเพียงเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่คือยาคาร์บาเพนิม โดยคือยา imipenem และ meropenem ร้อยละ 37.8 และ 22.2 ตามลำดับ(ตารางที่ 5)

ในขณะที่การศึกษาค้นพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. คือต่อยา cefepime cefotaxime ceftazidime และ ampicillin-sulbactam ร้อยละ 48.8, 41.9 27.9 และ 11.6 ตามลำดับ การพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. คือต่อยา cefotaxime ซึ่งเป็นยา cephalosporin รุ่นที่ 3 นั้นสอดคล้องกับการศึกษาในแม่น้ำดานูบ ในทวีปยุโรป ซึ่งยังมีรายงานที่พบ *Acinetobacter* spp. จากตัวอย่างน้ำที่คือต่อยา cefotaxime สูงถึงร้อยละ 95.6% (Kittinger et al., 2017) รูปแบบของการคือยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่มีรูปแบบการคือยาที่หลากหลาย โดยพบเชื้อที่คือยามากที่สุด 6 ชนิด (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบค่า MIC ต่อยา ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem และ meropenem ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. อยู่ในช่วง 2-32, 1-16, 1-16 และ 1-32 mg/L ตามลำดับ

เนื่องจากเอนไซม์ที่มีบทบาทในการคือยาคาร์บาเพนิมในเชื้อ *Acinetobacter* spp. มักเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม OXA carbapenemase จึงได้ทำการตรวจหายีน *bla<sub>OXA</sub>* ผลการศึกษาพบว่าตรวจหายีน OXA-carbapenemase ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจำนวนรวมทั้งหมด 56 ไอโซเลท พบว่า เชื้อที่นำมาศึกษาตรวจพบยีน OXA-carbapenemase จำนวน 36 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 64.3 โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ OXA-51 จำนวน 30 ไอโซเลท ซึ่ง OXA-24 พบเพียง 3 ไอโซเลท ขณะที่ยังมี 3 ไอโซเลท ที่พบทั้ง OXA-24 และ OXA-51 (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาค้นพบ OXA-51 มากที่สุดใน *Acinetobacter baumannii* ขณะที่สปีชีส์อื่นก็ถูกพบเช่นกัน *A. nosocomialis* ซึ่งกลไกเหล่านี้ก่อให้เกิดการคือต่อยาของเชื้อ ส่งผลให้การรักษาเป็นไปได้ยากและอาจแพร่กระจายไปยังพื้นที่ต่าง ๆ ในที่สุดอย่างไรก็ตามยีน *bla<sub>OXA</sub>* ไม่สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียตัวรับโดยวิธี conjugation ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยีน *bla<sub>OXA</sub>* ส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซม (Evans and Amyes, 2014)

ในการศึกษายังพบความสามารถของเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Acinetobacter* sp. ในการแสดงออกของกระบวนการ efflux pump โดยเป็นอีกกลไกหนึ่งในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Blanco et al., 2016) ผลการศึกษาพบว่า สำหรับยา meropenem นั้น มีเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ *A. baumannii* จำนวน 3 ไอโซเลท และ *A. pittii* จำนวน 2 ไอโซเลท ที่มีการแสดงออกของ efflux pump ส่วนยา imipenem มีเชื้อ *A. pittii* และ *A. baumannii* จำนวน 2 และ 1 ไอโซเลท ที่มีการแสดงออกของ efflux pump ส่วนยา ceftazidime นั้น พบว่ามีเชื้อ *Acinetobacter* spp. 15 ไอโซเลท และยา ciprofloxacin มีเชื้อเพียง 4 ไอโซเลทที่มีการแสดงออกของ efflux pump (ตารางที่ 7)

การศึกษาจีโนมไทป์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยวิธี Pulse field gel electrophoresis จำนวน 25 ไอโซเลท พบเชื้อที่มีจีโนมไทป์ใกล้เคียงกันในบริเวณเดียวกัน ที่แยกได้ในตัวอย่างน้ำ บริเวณพื้นที่ของจังหวัดอุดรดิตถ์ พิษณุโลก และ พิจิตร (จุด A-H) พบว่ามีรูปแบบ PFGE ทั้งหมด 20 รูปแบบ (ภาพที่ 2) โดยแบ่งเป็นกลุ่มรูปแบบที่มีลักษณะเหมือนกัน ทั้งหมด 4 กลุ่มรูปแบบ ได้แก่ กลุ่มบริเวณพื้นที่ B และ พื้นที่ F ทั้งนี้ยังมีรูปแบบที่คล้ายกัน (เส้นประ) ในบริเวณพื้นที่เดียวกัน เช่น บริเวณพื้นที่ B, G และ F แสดงให้เห็นว่าอาจเกิดการแพร่กระจายของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ภายในพื้นที่ดังกล่าว

โดยสรุป โครงการวิจัยนี้ได้ตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. (ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *A. nosocomialis* และ *A. pittii*) ที่ดื้อยาคาร์บาเพนิมในแม่น้ำน่าน โดยกลไกการดื้อยาเกิดจากการที่เชื้อสร้างเอนไซม์ Oxacillinase ออกมาทำลายยา ส่วนการดื้อยา ceftazidime และ ciprofloxacin เกิดจากการขั้ยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. ดื้อยา มีการแพร่กระจายในพื้นที่เดียวกัน แต่ไม่พบว่ามี การแพร่กระจายในพื้นที่ๆ ต่างกัน

## เอกสารอ้างอิง

ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ (NARST), กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข. (2563). สถานการณ์เชื้อดื้อยาด้านจุลชีพปี 2000–2019. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 เมษายน 2563; สืบค้นจากเว็บไซต์: <http://narst.dmsc.moph.go.th/>

Akiba M, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Fujii Y, Murata M, et al. Distribution and relationships of antimicrobial resistance determinants among extended-spectrum-cephalosporin-resistant or carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolates from rivers and sewage treatment plants in India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Apr 22;60(5):2972–80.

Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis.* 2005 Feb;11(2):260–4.

Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon AJ, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, Martinez L. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms.* 2016;4(1):14.

Daoud Z, Farah J, Salem Sokhn E, El Kfoury K, Dahdouh E, Masri K, et al. Multidrug-resistant Enterobacteriaceae in Lebanese hospital wastewater: Implication in the one health concept. *Microb Drug Resist.* 2018;24(2):166–174.

Di DY, Jang J, Unno T, Hur HG. Emergence of *Klebsiella variicola* positive for NDM-9, a variant of New Delhi metallo beta-lactamase, in an urban river in South Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(4):1063–1067.

Evans BA, Amyes SG. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241–63.

Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;50(2):127–134.

Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4592–4594.

Hsu LY, Apisarnthanarak A, Khan E, Suwantararat N, Ghafur A, Tambyah PA. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae in South and Southeast Asia. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):1–22.

Kittinger C, Kirschner A, Lipp M, Baumert R, Mascher F, Farnleitner AH, Zarfel GE. (2017). Antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolates from the river Danube: Susceptibility stays high. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;15(1):52.

Lane, DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* 1991;115–175. John Wiley and Sons, United Kingdom.

Lunha K, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Saenjamla P, Chaimanee P, Angkititkul S, Chetchotisakd P. High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;85(2):221–6.

Mahon BM, Brehony C, McGrath E, Killeen J, Cormican M, Hickey P, Keane S, Hanahoe B, Dolan A, Morris D. Indistinguishable NDM-producing *Escherichia coli* isolated from recreational waters, sewage, and a clinical specimen in Ireland, 2016 to 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(15). pii: 30513.

Montero M, Horcajada JP, Sorli L, Alvarez-Lerma F, Grau S, Riu M, Knobel H. (2009). Effectiveness and safety of colistin for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Infection.* 2009; 37(5): 461–465.

Nasri E, Subirats J, Sánchez-Melsió A, Mansour HB, Borrego CM, Balcázar JL. Abundance of carbapenemase genes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* and *bla<sub>OXA-48</sub>*) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. *Environ Pollut.* 2017;229:371–374.

Netikul T, Kiratisin P. Genetic characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340 at a university hospital in Thailand. *PLoS One.* 2015;10(9):e0139116.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791–8.

Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sánchez T, Brown-Jaque M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175246.

Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simões RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1662–3.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119–23.

Preechachuawong P, Santimaleeworagun W, Jitwasinkul T, Samret W. Detection of new delhi metallo beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* at a general hospital in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2015;46(6):1031–6.

Schiavano GF, Carloni E, Andreoni F, Magi S, Chironna M, Brandi G, Amagliani G. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of *oprD* in imipenem resistant isolates. *PLoS One.* 2017; 12(12):172–189.

Sotgiu G, D'Ambrosio L, Centis R, Tiberi S, Esposito S, Dore S, et al. Carbapenems to treat multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):373.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233–9.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:351–353.

Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(2):287–91.

Xiong Z, Zhu D, Wang F, Zhang Y, Okamoto R, Inoue M. Investigation of extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;44(2):195–200.

Yang F, Mao D, Zhou H, Luo Y. Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China. PLoS One. 2016;11(5):e0156383

Zhang X, Lü X, Zong Z. Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(2):204-6.

Zhang XX, Zhang T, Fang HH. Antibiotic resistance genes in water environment. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;82(3):397-414.

Zurfluh K, Power KA, Klumpp J, Wang J, Fanning S, Stephan R. A novel Tn3-like composite transposon harboring *bla*<sub>VIM-1</sub> in *Klebsiella pneumoniae* spp. pneumoniae isolated from river water. Microb Drug Resist. 2015;21(1):43-9.



๖ QR  
๘๒  
.๕๖  
พ ๒๕๖๕  
๒๕๖๓  
1049292



สำนักหอสมุด

- 7 มี.ค. 2565



ตารางแสดงผลการทดสอบยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ

Code	Organism	Antibiotics																
		CN	CTX	AK	CAZ	SAM	MEM	LEV	IPM	SXT	FEP	CIP	TZP	ATM	DO			
RM4P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RM15G	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	I	I	S			
RM26G	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	S	I	I			
RM69P	<i>Pseudomonas otitidis</i>	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	S	I	S			
RM78V	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	S	I	I			
2NM20BR	<i>Pseudomonas otitidis</i>	S	-	S	S	-	-	-	S	-	S	S	S	I	S			
4NM13V	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1.2NM8V	<i>Pseudomonas</i> sp.	S	-	S	S	-	-	-	-	-	R	-	I	-	-	-	-	
6.3NM10P	<i>Pseudomonas</i> sp.	S	-	S	S	-	-	-	S	-	R	S	S	S	R	S		
1.4NM5P	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2.4NM1E	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4.4NM10P	<i>Pseudomonas</i> sp.	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	S	R	S			
5.4NM5P	<i>Pseudomonas</i> sp.	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	S	R	S			
6.4NM2E	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6.4NM7V	<i>Pseudomonas</i> sp.	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	S	I	S			
6.4NM8V	<i>Pseudomonas</i> sp.	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S	S	I	R	S			

ตารางแสดงผลการทดสอบยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ

Code	Organism	Antibiotics													
		CN	CTX	AK	CAZ	SAM	MEM	LEV	IPM	SXT	FEP	CIP	TZP	ATM	DO
1NM12V	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
2NM13V	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	R	S	S	S	S	I	R	R	R	I	S
2NM19BR	<i>Acinetobacter</i> sp.	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3NM10V	<i>A. nosocomialis</i>	R	R	I	R	R	R	S	S	S	I	R	I	-	S
3NM11V	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S
3NM19V	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	I	R	R	R	R	R	S	I	I	-	S
6NM1B	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S
1.2NM12V	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S
2.2NM9V	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	-	S
3.2NM6P	<i>Acinetobacter</i> sp.	S	I	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	-	S
3.2NM7P	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S
3.2NM12P	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.2NM13V	<i>A. baumannii</i>	S	I	S	R	S	S	S	S	R	R	R	I	-	I
4.2NM5V	<i>A. baumannii</i>	S	I	S	I	S	S	R	R	S	R	S	I	-	S
4.2NM10V	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	S	R	S	S	R	R	S	S	I	S	S	S	-	S
4.2NM11V	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	I	S	S	R	R	S	I	S	I	-	S



ตารางแสดงผลการทดสอบยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ

Code	Organism	Antibiotics																		
		CN	CTX	AK	CAZ	SAM	MEM	LEV	IPM	SXT	FEP	CIP	TZP	ATM	DO					
2.3NM6P	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	R	S	I	I	S	S	R	R	I	-	S					
3.3NM2V	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	-	S					
4.3NM2V	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S					
4.3NM4B	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	-	S					
4.3NM5B	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	I	S	S	S	S	S	R	I	R	-	S					
4.3NM6V	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	I	S	S	S	S	S	R	I	R	-	S					
4.3NM8P	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	I	S	S	S	S	S	I	I	S	-	S					
5.3NM4V	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	S					
5.3NM7V	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	I	S	S	S	S	S	R	I	R	-	S					
5.3NM10V	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	-	S					
6.3NM5V	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
6.3NM6V	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S					
6.3NM9V	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S					
2.4NM3V	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	I	R	S	I	I	R	I	R	R	R	-	I					
2.4NM4B	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	-	S					
2.4NM6B	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	I	-	S					

ตารางแสดงผลการทดสอบยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ

Code	Organism	Antibiotics															
		CN	CTX	AK	CAZ	SAM	MEM	LEV	IPM	SXT	FEP	CIP	TZP	ATM	DO		
2.4NM7V	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	I	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S		
2.4NM8V	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	I	S	I	S	R	I	R	S	R	S	S		
2.4NM9V	<i>A. nosocomialis</i>	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
3.4NM4V	<i>A. pittii</i>	S	I	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	-	S		
4.4NM2V	<i>A. pittii</i>	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	-	S		
4.4NM4V	<i>A. pittii</i>	S	I	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	-	S		
5.4NM6B	<i>A. pittii</i>	S	I	S	I	S	I	S	I	S	R	S	R	-	S		
5.4NM7B	<i>A. pittii</i>	S	R	S	I	S	R	S	R	S	R	S	R	-	S		
5.4NM8B	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	R	S	R	S	I	S	I	I	I	-	S		
5.4NM10P	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	I	I	-	S		
6.4NM6V	<i>A. pittii</i>	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	S		
6.4NM10V	<i>A. pittii</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	-	S		
6.4NM11V	<i>A. pittii</i>	S	I	S	I	S	I	S	R	R	R	S	R	-	S		