อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R256230900

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแพร่กระจายของเชื้อวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอีที่มียีน *mcr-1* ในจังหวัดพิษณุโลก

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

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 7 มี.ค. 2565
เลขทะเบียน 104989
เลขเรียกหนังสือ ว QH
EB
W26 25
2562

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ. 2562 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.อรรถพล ตันไสว นายพีรพัฒน์ ปัญญาดี นางสาวอนงค์ คิดดี และ นายคณิต อัศวเทพทวี ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ Prof. Timothy Walsh, School of Medicine, Cardiff University ที่ให้ความอนุเคราะห์โปรแกรม Gelcompar ในการวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี บรรลุวัตถุประสงค์ตามการวิจัย

(รศ.ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์)
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	iii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	1
การทบทวนวรรณกรรม	2
วิธีการดำเนินการวิจัย	4
ผลการศึกษา	7
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	15
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	23

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจหายีน *mcr-1* ในตัวอย่างจากคน สัตว์ เนื้อสัตว์ สิ่งแวดล้อม บริเวณภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ทั้งหมด 2,217 ตัวอย่าง พบยีน *mcr-1* ทั้งหมด 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.5) โดยเป็นเชื้อจากตัวอย่างคนมากที่สุดคือ 29 ตัวอย่าง รองลงมาคือตัวอย่างน้ำ 10 ตัวอย่าง เชื้อที่พบมากที่สุดได้แก่ *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* และ *Enterobacter cloacae* ร้อยละ 94.6, 3.5 และ 1.7 ตามลำดับ การศึกษาค่า colistin MIC ของเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr-1* ทั้ง 56 ไอโซเลท พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 4 ถึง >16 mg/L โดยมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} คือ 4 mg/L และ 8 mg/L ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าค่า MIC breakpoint (2 mg/L) 2-4 เท่า การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆของเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae ทั้ง 56 ไอโซเลท พบว่าเชื้อมีการดื้อยา cefotaxime, aztreonam, trimethoprim/ sulfamethoxazole สูง คือร้อยละ 75-96.4 ดื้อยา ceftazidime, gentamicin และ ciprofloxacin ร้อยละ 42.9-67.9 เชื้อส่วนใหญ่ยังคงไวต่อยาในกลุ่ม carbapenem และ amikacin โดยพบการดื้อยาในระดับต่ำเพียง ร้อยละ 1.8-5.4

การศึกษาการถ่ายทอดยีน *mcr*-1 ด้วยวิธี conjugation พบว่า เชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae ร้อยละ 55.3 (31 ไอโซเลท) สามารถถ่ายทอดยีน *mcr-1* ให้กับ *E. coli* J53 ได้ โดยค่าความสามารถในการถ่ายทอดยีน (conjugation frequency) อยู่ในช่วง 10^{-6} – 10^{-2} เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* J53 ซึ่งไม่มียีน *mcr-1* เชื้อ transconjugant ทั้ง 31 ไอโซเลท มีค่า colistin MIC เพิ่มขึ้นมากถึง 4-8 เท่า

การศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อ *mcr-1*-positive *E. coli* จำนวน 42 ไอโซเลท ด้วยวิธี Pulse field gel electrophoresis (PFGE) พบว่า เชื้อมีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยมีรูปแบบของ PFGE 36 รูปแบบ อย่างไรก็ตามพบเชื้อที่มีรูปแบบ PFGE ที่มีความคล้ายคลึงกันอยู่ 5 กลุ่ม คือ จากตัวอย่างคน ตัวอย่างโคและตัวอย่างน้ำ แสดงให้เห็นถึงเชื้อที่อาจมีการแพร่กระจายภายในตัวอย่างชนิดเดียวกัน

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสามารถในการถ่ายทอดยีน *mcr-1* แสดงให้เห็นว่า การแพร่กระจายของเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae นั้น ส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากเชื้อตัวเดียว (clonal spread) แต่เกิดจากการถ่ายทอดยีน *mcr-1* ในแนวราบให้กับแบคทีเรียอื่นๆ

1.ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย โรคที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อทั้งในโรงพยาบาล หรือในชุมชน ทำให้มีอัตราการทุพพลภาพและอัตราการตายสูง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่นผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด ผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ หรือผู้ป่วยที่มีการให้เคมีบำบัด สาเหตุหลักของการดื้อยา ในเชื้อแบคทีเรียคือการใช้ยาต้านจุลชีพที่มากเกินความจำเป็นทั้งในคนและสัตว์ ทำให้เกิด selective pressure กระตุ้นให้เชื้อเกิดการดื้อยา และสามารถแพร่กระจายในชุมชนได้ เนื่องจากยีนที่ควบคุมการดื้อยามักพบอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ ดังนั้นการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาจึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้มีงานวิจัยหลายฉบับที่สนับสนุนว่า เชื้อดื้อยาจากสัตว์และสิ่งแวดล้อมเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในคนอีกด้วย

โดยปกติยา colistin เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคและควบคุมการเกิดโรคในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เช่น สุกร โค ในหลายๆประเทศ รวมทั้งประเทศไทย การใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในคนค่อนข้างจำกัด เนื่องจากมีความเป็นพิษกับไต แต่ในปัจจุบันยา colistin ได้ถูกนำมาใช้ เป็นทางเลือกสุดท้ายในการรักษาโรคติดเชื้อในคน ที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาหลายขนาน ทำให้มีรายงานการพบเชื้อดื้อยา colisitn ทั้งในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมต่างๆ มากขึ้น ดังนั้นการศึกษาเรื่องเชื้อดื้อยา colistin และการแพร่กระจายของเชื้อ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เพื่อให้ได้ข้อมูล สำคัญในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ซึ่งอาจจะส่งผลถึงการลดอัตราการเกิดการติดเชื้อดื้อยาในคนต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อตรวจหา เชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae จากตัวอย่างคน สัตว์เลี้ยง สัตว์ในฟาร์ม (สัตว์ปีก เนื้อไก่ โค สุกร) ดิน และแหล่งน้ำ ในเขต จ. พิษณุโลก

2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae

2.3 เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ดื้อยา colistin โดยเชื้อที่ใช้จะเป็นเชื้อที่แยกได้คน สัตว์เลี้ยง สัตว์ในฟาร์ม (สัตว์ปีก เนื้อไก่ โค สุกร) ดิน และแหล่งน้ำในเขตจังหวัดพิษณุโลก โดยจะศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (การดื้อยา colistin และการดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่มอื่นๆ) และจีโนไทป์ของการดื้อยา นอกจากนี้จะศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อภายในชุมชนอีกด้วย

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

การดื้อยา colistin (กลุ่มยา polymyxin) จัดเป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก เนื่องจากยา colistin จัดเป็นยาที่ใช้เป็นทางเลือกสุดท้ายในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา ซึ่งสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการดื้อยานี้ เชื่อว่าเกิดจากการนำยา colistin มาใช้ในฟาร์มปศุสัตว์อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน โดยอาจจะนำไปใช้ในการรักษาโรคหรือผสมในอาหารสัตว์ เพื่อควบคุมการเกิดโรค ซึ่งส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียปรับตัวให้มีการดื้อต่อยามากขึ้น

ยีนที่กำหนดการดื้อยา colistin นั้นมักพบอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ เช่นพลาสมิด ส่งผลให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อดื้อยา colisitn จากหลายแหล่ง เช่น ผู้ป่วย คนสุขภาพดีในชุมชน เนื้อสัตว์ ฟาร์มปศุสัตว์ และแหล่งน้ำธรรมชาติ จากหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทยด้วย นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า เชื้อดื้อยา colistin หลายสายพันธุ์ มีการดื้อยากลุ่มอื่นๆ เช่น cephalosporin หรือ carbapenem ทำให้เป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน ซึ่งจะส่งผลให้การรักษายากขึ้น และอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้

คณะผู้วิจัย ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาหลายขนาน ทั้งจากคน เนื้อสัตว์ แหล่งน้ำ และฟาร์มเลี้ยงสัตว์ จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า มีเชื้อ Enterobacteriaceae ที่ดื้อยา colistin จากหลายแหล่ง ดังนั้นจึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้ขึ้นมาเพื่อศึกษาเพิ่มเติมทางด้านอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา colistin ใน จ. พิษณุโลก ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยสามารถนำไปใช้ประกอบเป็นแนวทางในการควบคุม และเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ซึ่งจะส่งผลถึงสุขภาพของประชาชนต่อไป

5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียแกรมลบ เช่น Enterobacteriaceae, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์หลายชนิด นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อก่อโรคในคนที่พบได้บ่อยทั้งในโรงพยาบาลและชุมชน สามารถก่อโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ทางเดินหายใจ รวมไปถึงการติดเชื้อในช่องท้อง ระบบประสาท และในกระแสเลือด ข้อมูลจากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปี พ.ศ. 2559 พบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่พบมากเป็นอันดับต้นๆ ในประเทศไทย (http://narst.dmsc.moph.go.th) ปัจจุบันมีรายงานพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาหลายขนานมากขึ้น และบางสายพันธุ์ก็ดื้อยาที่มีประสิทธิภาพสูงเช่น cephalosporin รุ่นที่ 3 & 4 และ carbapenem ทำให้การรักษาไม่ได้ผล ยา colistin จึงเป็นทางเลือกสุดท้ายที่แพทย์จะนำมาให้เพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาเหล่านี้ การศึกษาในประเทศไทยพบว่ายา colistin สามารถทำลายเชื้อ multidrug-resistant *P.*

aeruginosa และ *Acinetobacter baumannii* ได้ดี (Tunyapanit et al., 2013; Reechaipichitkul et a;., 2013)

ยา colistin (polymyxin E) จัดอยู่ในกลุ่มยาต้านจุลชีพ polymyxin antibiotic สร้างจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* ซึ่งเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน จัดเป็น polycationic peptide antibiotic ที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal agent) กลไกการออกฤทธิ์ของยา colistin คือ ยาจะไปจับที่บริเวณ lipopolysaccharide (LPS) และ phospholipid ที่บริเวณ outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้กระบวนการจัดรูปแบบของ outer membrane ของเชื้อผิดปกติไป และสามารถ solubilize เซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรียด้วย เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ และเซลล์ตาย (Caniaux et al., 2017)

การดื้อยา colistin อาจเกิดที่โครโมโซมหรือพลาสมิด โดยถ้าเป็นที่โครโมโซม จะเป็นการกลายพันธุ์ของยีนหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ LPS ทำให้ยา colistin ไม่สามารถเข้ามาจับได้ (Falagas et al., 2010) ดังเช่นที่มีรายงานในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (Poirel et al., 2015) และ *A. baumannii* (Beceiro et al., 2011) อย่างไรก็ตาม ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา กลไกการดื้อยา colistin ในแบคทีเรียแกรมลบที่สำคัญและได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือ ยีนที่ทำให้เชื้อดื้อยาที่มีชื่อว่า *mcr* (mobile colistin resistance) ซึ่งอยู่บนพลาสมิดที่เคลื่อนที่ได้ (plasmid-mediated colistin resistance) ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา colistin เกิดได้อย่างรวดเร็ว ยีน *mcr* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ MCR หรือ phosphoethanolamine transferase จะทำให้เชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา colistin โดยจะไปเปลี่ยนแปลง LPS ด้วยการย้ายหมู่ phosphoethanolamine ไปยัง lipid A ทำให้ยา colistin ไม่สามารถจับกับ LPS ได้ (Hinchliffe et al., 2017) ส่งผลให้เชื้อดื้อยา colistin

ในเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2015 นักวิทยาศาสตร์จีนรายงานของการดื้อยา colistin ในเชื้อ Enterobacteriaceae (*Escherichia coli* และ *K. pneumoniae*) ในผู้ป่วย เนื้อสัตว์และในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (Liu et al., 2016) โดยเป็นยีนที่พบบนพลาสมิดเป็นครั้งแรกและสามารถถ่ายทอดให้กับแบคทีเรียอื่นได้ และให้ชื่อยีนนี้ว่า *mcr-1* หลังจากนั้นก็มีรายงานการพบเชื้อ *mcr-1*-posititve Enterobacteriaceae ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (Trung et al., 2017; Wang et al., 2017) ผู้ป่วย และในคนสุขภาพดีที่ไม่เป็นโรค (Wang et al., 2017) เนื้อสัตว์ (Ohsaki et al., 2017) สัตว์เลี้ยง (Lei et al., 2017) แหล่งน้ำธรรมชาติ (Hembach et al., 2017; Zhou et al., 2017) ในหลายประเทศทั่วโลก (Al-Tawfiq et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่มียีน *mcr-1* บางสายพันธุ์นั้นสามารถสร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase และ carbapenemase ทำให้เชื้อดื้อยา cephalospotin รุ่น 3 และ carbapenem ได้ (Monte et al., 2017; Lai et al., 2017; Liu et al., 2017) ต่อมาในช่วงปี 2016-2017 ก็มีรายงานการพบ plasmid-mediated *mcr-2, mcr-3* และ *mcr-4* จากเชื้อ Enterobacteriaceae เช่น *E. coli, Salmonella Typhimurium,* (Xavier et al., 2016; Yin et al., 2017; Carattoli et al., 2017) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในสัตว์เช่น โค และสุกร ทั้งในเอเชียและยุโรป ซึ่ง ยีน *mcr* ทั้งหมดนี้พบบนพลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้

สำหรับประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้น ก็มีรายงานของ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae เช่นเดียวกัน เช่น มาเลเซีย (Yu et al., 2016) เวียดนาม (Tada et al., 2017)

ลาว (Rolain et al., 2016) สิงคโปร์ (Teo et al., 2016) และกัมพูชา (Stoesser et al., 2016) ในประเทศไทยเองก็มีรายงานการพบเชื้อ colistin-resistant *E. coli* ที่มียีน *mcr-1* เช่นกัน โดยเป็นเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย นอกจากนี้เชื้อนี้ยังเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน สามารถสร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase ($bla_{CTX-M-15}$) และ carbapenemase (bla_{NDM-1}) (Paveenkittiporn et al., 2017) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการตรวจหาการดื้อยา colistin ด้วยวิธี disk diffusion method นั้นยังไม่มีความไวมากพอ การใช้ colistin E-test ก็ยังได้ผลที่ไม่ดีนัก ปัจจุบันวิธีการตรวจสอบการดื้อยา colistin ที่ดีที่สุดคือการหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution method (MIC > 2 mg/L) ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลานานและไม่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล (Caniaux et al., 2017) ทำให้อุบัติการณ์ของ colistin-resistant bacteria อาจจะต่ำกว่าความเป็นจริง

จะเห็นได้ว่าเชื้อดื้อยา colistin ที่มียีน *mcr-1* นั้น พบได้ทั้งใน คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae ที่แยกมาจากตัวอย่างสัตว์ที่ต่างกันและสถานที่ต่างกันนั้น มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม (closely related) เป็นการสนับสนุนว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา colistin เกิดขึ้นในชุมชน (Li et al., 2016) ปัจจุบันข้อมูลทางด้าน *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae ในประเทศไทยยังมีจำกัดมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ การค้นพบ plasmid-mediated *mcr-1* นั้น เริ่มมีรายงานในปี 2016 เนื่องจากยีน *mcr-1* ทำให้เชื้อดื้อต่อยา colistin ที่เป็นยาทางเลือกสุดท้ายในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบ ข้อมูลเรื่องเชื้อที่มียีน *mcr-1* จึงเป็นเรื่องสำคัญ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเบื้องต้น พบเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae ทั้งจากคนและสัตว์ในประเทศไทย จึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อที่มียีน *mcr-1* โดยจะศึกษาเชื้อในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม เพื่อเป็นข้อมูลในเรื่องของ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae ในประเทศไทยต่อไป

6. วิธีการดำเนินการวิจัย

6.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา (Bacterial isolates)

เชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากคน สัตว์เลี้ยง สัตว์ในฟาร์ม (สัตว์ปีก เนื้อสัตว์ปีก โค สุกร) ดิน และแหล่งน้ำ ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากโครงการวิจัยเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ที่ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยนเรศวร และเก็บรักษาไว้ที่ -80 °C ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

6.2 การตรวจหายีน *mcr-1* โดยวิธี PCR และการหาลำดับเบส (Detection of *mcr-1* by PCR and sequencing)

ตรวจหายีน *mcr-1* โดยวิธี PCR ซึ่งจะใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับยีน ดังนี้ Forward primer: 5′-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3′ และ Reverse primer: 5′-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3′ ซึ่งจะได้ PCR product ขนาด 309 bp (Liu et al., 2016)

เตรียม template ด้วยวิธี boiling method โดยนำเชื้อไปละลายในน้ำกลั่น 500 µl แล้วนำไปต้ม 5 นาที จากนั้นปั่นแยกตะกอนเชื้อออกในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นำสารละลายใสด้านบน (supernatant) ไปใช้เป็น template ใน PCR ในปฏิกิริยาของการทำ PCR ประกอบด้วย template 1 µl , 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, 200 µM dNTPs, 1.5 µM $MgCl_2$, *Taq* polymerase, 10X amplification buffer และ sterile deionized water ปรับปริมาตรรวม 50 µl สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ 94 °C 5 นาที 1 รอบ, 94 °C 45 วินาที (denaturing), 55 °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

เมื่อได้ PCR product แล้วก็นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยชุดสำเร็จรูปตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเพื่อนำไปหาลำดับเบสโดยจะส่งไปที่บริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *mcr-1* ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

6.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อที่มียีน *mcr-1* (Identification of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae)

เชื้อที่มียีน *mcr-1* จะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ชุดสำเร็จรูป API 20E (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เชื้อที่ให้ผลไม่ชัดเจน จะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้การหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA (Lane, 1991)

6.4 การตรวจหาค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Determination of Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

ศึกษาค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution method ตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standard Institute: 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 อ่านจากค่า ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

6.5 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion method (Antibiotic susceptibility testing)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion method ตามวิธีการของ CLSI (CLSI, 2014) โดยใช้ยาทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ cefotaxime, ceftazidime, cefoxitin, aztreonam, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole และ ciprofloxacin รวมถึงศึกษาการสร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) โดยการนำโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบถ่ายลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) (Oxoid, England) ปริมาตร 3 ml บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นให้

เท่ากับ 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/ml) แล้วใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ swab เชื้อลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid LTD, England) วาง antibiotic disk บนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแปลผลตามเกณฑ์การดื้อยาของ (CLSI, 2014) โดยสามารถแบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ไวต่อยา (susceptible: S), ไวต่อยาปานกลาง (intermediate: I) และดื้อยา (resistant: R)

6.6 การถ่ายทอด *mcr-1* โดยวิธี conjugation (Transfer of *mcr-1* by conjugation)

ศึกษาการถ่ายทอด *mcr-1* โดยการ conjugation ด้วยวิธี broth mating method โดยใช้ *Escherichia coli* ที่ดื้อยา rifampin (rifampin-resistant *E. coli* DH5α) เป็นตัวรับ (recipient) และใช้เชื้อที่มี *mcr*-1 เป็นตัวให้ (donor) ทำการผสมเชื้อที่เป็นตัวรับและตัวให้ แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมา spread บนอาหารที่เติม rifampin (16 mg/L) และ colistin (2 mg/L) แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาค่าความสามารถในการถ่ายทอดยีน (conjugation frequency) จากนั้นทดสอบว่ามีการถ่ายทอดยีนใน transconjugant หรือไม่ โดยตรวจหายีน *mcr-1* ใน transconjugant ด้วยวิธี PCR (ตามวิธีการในข้อ 6.2) และทดสอบการดื้อยาของ transconjugant โดยการหาค่า colistin MIC (ตามวิธีการในข้อ 6.4) เปรียบเทียบกับ recipient

6.7 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae โดยเทคนิค Pulsed Field Gel Electrophoresis: PFGE (Dissemination of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae by PFGE)

ศึกษาจีโนไทป์ (genotypic characterization) ของเชื้อที่มียีน *mcr-1* ด้วยวิธี PFGE โดยจะทำตามวิธีการของ Xiong et al. (2002) เริ่มจากการเตรียม plug โดยใช้เซลล์แบคทีเรียผสมกับ low melting agarose จากนั้นทำการย่อย plug ด้วย lysozyme และ proteinase K จากนั้นตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ผลแยกชิ้นส่วน DNA โดยวิธี PFGE ด้วย CHEF Mapper® XA System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) จากนั้นนำไปย้อมด้วย 0.5 μg/mL ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที และถ่ายภาพรูปแบบ PFGE ภายใต้ UV transilluminator (Gel Documentation Systems, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA) วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม GelCompar II software Version 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) สร้างเดนโดแกรมโดยใช้วิธี unweighted pair-group method using arithmetic mean (UPGMA) ไอโซเลทที่มีความใกล้ชิดกันอย่างน้อยร้อยละ 85 (≥ 85%) จัดว่าเป็นเชื้อที่มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรม

7. ผลการศึกษา

7.1 ความชุกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr*–1

จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากคน สัตว์ (สัตว์ปีก เนื้อไก่ โค สุกร) ดิน และแหล่งน้ำ จำนวนทั้งหมด 2,217 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR และการหาลำดับเบส พบว่ามีเชื้อจำนวน 56 ไอโซเลท (ร้อยละ 2.5) ที่มียีน *mcr*–1 แสดงดังตาราง 1 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae พบว่า เชื้อที่พบมากที่สุดได้แก่ *E. coli* 53 ไอโซเลท (ร้อยละ 94.6), *Klebsiella pneumoniae* 2 ไอโซเลท (ร้อยละ 3.5) และ *Enterobacter cloacae* 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 1.7) ตามลำดับ ซึ่งเชื้อที่พบส่วนใหญ่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระคน ร้อยละ 51.8 (29/56) รองลงมาคือ ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ร้อยละ 19.6 (11/56) แสดงในตาราง 2

ตาราง 1 แสดงความชุกของเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr-1* จากตัวอย่างคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย

ตัวอย่าง [1]	ปี/จังหวัดที่เก็บ	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนเชื้อที่มี *mcr-1* (ร้อยละและเชื้อที่พบ)
คน	2013, 2015/พิษณุโลก	837	29 (3.5%: 26 *E. coli*, 2 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae*)
สัตว์เลี้ยง	2014/พิษณุโลก เพชรบูรณ์ สุโขทัย พิจิตร อุตรดิตถ์ ตาก อุทัยธานี	111 (75 สุนัข/32 แมว)	3 (2.7%: 3 *E. coli*) [2]
สัตว์ปีก	2014/พิษณุโลก	786 (663 ไก่ /123 เป็ด)	2 (0.2%: 2 *E. coli*) [3]
สุกร	2014/พิษณุโลก	38	6 (15.8%: 6 *E. coli*)
โค	2014/พิษณุโลก	36	4 (11.1%: 4 *E. coli*)
เนื้อไก่	2013/พิษณุโลก	250	1 (0.4%: 1 *E. coli*)
สิ่งแวดล้อม	2013–2014, 2017/พิษณุโลก นครสวรรค์	159 (65 ดิน /94 น้ำ)	11 (6.9%: 11 *E. coli*) [4] ten from water
รวม		2,217	56 (2.5%)

[1] เชื้อ Enterobacteriaceae จากอุจจาระคนและสัตว์ เนื้อไก่ และสิ่งแวดล้อมที่แยกได้จากโครงการวิจัยเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่ได้รับทุนสนับสนุนในปี พ.ศ. 2557, 2558 และ 2560 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

[2] แยกได้จากแมวทั้งหมด

[3] แยกได้จากไก่ทั้งหมด

[4] แยกได้จากน้ำ และดิน จำนวน 10 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ

ตาราง 2 แสดงการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr–1*

ตัวอย่าง	*E. coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Enterobacter cloacae*	จำนวนที่พบ (ร้อยละ)
คน	26	2	1	29 (51.8)
สัตว์เลี้ยง	3	0	0	3 (5.4)
สัตว์ปีก	2	0	0	2 (3.6)
สุกร	6	0	0	6 (10.7)
โค	4	0	0	4 (7.1)
เนื้อไก่	1	0	0	1 (1.8)
สิ่งแวดล้อม	11	0	0	11 (19.6)
รวม (ร้อยละ)	53 (94.6)	2 (3.6)	1 (1.8)	56 (100)

7.2 การตรวจหาค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration) ด้วยวิธี broth microdilution method โดยแปลผลตามคำแนะนำของ EUCAST ปี 2019 พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *mcr–1*-positive Enterobacteriaceae ทั้ง 56 ไอโซเลท มีค่า colistin MIC อยู่ในช่วง 4 ถึง >16 mg/L ซึ่งมากกว่าค่า MIC breakpoint ของยา colistin (2 mg/L) (EUCAST, 2019) โดยมีเชื้อที่มี MIC เท่ากับ 4, 8, 16 และ >16 mg/L คิดเป็น 36, 15, 4, และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตาราง 3) นอกจากนี้ ค่า MIC_{50} และ MIC_{90} (ค่าความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ร้อยละ 50 และ 90) ของเชื้อทั้ง 56 ไอโซเลท คือ 4 และ 8 mg/L ตามลำดับ

ตาราง 3 แสดงค่า colistin MIC ของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr*–1 จากตัวอย่างประชากร สัตว์และสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย จำนวน 56 ไอโซเลท

รหัสตัวอย่าง	ตัวอย่าง	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ	ค่า colistin MIC	*mcr–1* conjugation	
				ความถี่ในการถ่ายทอดยีน	ค่า colistin MIC ใน transconjugant
17C05	น้ำ	*E. coli*	8	ไม่พบ	–
18M05	น้ำ	*E. coli*	8	ไม่พบ	–
19M05	น้ำ	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
21C02	น้ำ	*E. coli*	8	ไม่พบ	–
22C04	น้ำ	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
24M01	น้ำ	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
25M04	น้ำ	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
27M01	น้ำ	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
30C04	น้ำ	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
16CCE	แมว	*E. coli*	4	5.70×10^{-6}	4
18CCE	แมว	*E. coli*	4	3.67×10^{-6}	4
31CCE	แมว	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
17CE01	ไก่	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
12TE09	โค	*E. coli*	8	ไม่พบ	–
12CE13	เนื้อไก่	*E. coli*	8	3.82×10^{-2}	2
124B	คน	K. pneumoniae	16	ไม่พบ	–
158P	คน	*E. coli*	> 16	3.80×10^{-4}	4
169P	คน	*E. coli*	4	1.50×10^{-4}	4
58P	คน	*E. coli*	16	4.80×10^{-2}	4
231P	คน	*E. coli*	4	4.0×10^{-7}	4
248P	คน	*E. coli*	16	2.70×10^{-2}	4
229P	คน	*E. coli*	8	1.64×10^{-5}	4
262P	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
CN21	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
CN144	คน	*E. coli*	4	6.33×10^{-6}	4
C304	คน	*E. coli*	4	1.0×10^{-5}	4

C548	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
C329D	คน	*E. coli*	8	1.8×10^{-6}	4
C271D	คน	*E. coli*	4	9.84×10^{-7}	4
C168D	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
C282D	คน	*E. coli*	4	1.2×10^{-3}	4
C227	คน	*E. coli*	4	1.8×10^{-4}	4
C219	คน	*E. coli*	4	6.65×10^{-4}	2
C355	คน	*E. coli*	4	2.79×10^{-5}	4
C503	คน	*E. coli*	8	2.50×10^{-2}	4
C550D	คน	*E. coli*	8	ไม่พบ	–
CN128D	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
C270	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
C167	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
C332D	คน	*E. coli*	4	3.13×10^{-4}	4
C220D	คน	*K. pneumoniae*	8	1.58×10^{-2}	4
0903CE	เนื้อไก่	*E. coli*	4	1.0×10^{-8}	4
12PE04	สุกร	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
12PE05	สุกร	*E. coli*	8	2.63×10^{-5}	4
12PE06	สุกร	*E. coli*	4	4.64×10^{-5}	4
12PE07	สุกร	*E. coli*	4	9.62×10^{-5}	4
12TE06	โค	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
12PE08	สุกร	*E. coli*	8	7.20×10^{-3}	2
12PE09	สุกร	*E. coli*	4	8.0×10^{-2}	2
12TE07	โค	*E. coli*	4	ไม่พบ	–
12TE08	โค	*E. coli*	8	7.2×10^{-3}	2
RC88E	น้ำ	*E. coli*	8	1.80×10^{-2}	4
01SE04	ดิน	*E. coli*	8	1.2×10^{-4}	4
C527	คน	*E. coli*	16	2.09×10^{-2}	4
C129	คน	*Ent. cloacae*	4	8.33×10^{-4}	2
C137D	คน	*E. coli*	4	ไม่พบ	–

7.3 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ผลจากการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae จากตัวอย่างต่าง ๆ ที่มียีน *mcr*-1 จำนวน 56 ไอโซเลท ด้วยวิธี disk diffusion โดยใช้ยาทั้งหมด 11 ชนิด แสดงดังตาราง 4 การดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam พบว่าเชื้อมีการดื้อยา cefotaxime สูงที่สุด คือร้อยละ 96.4 รองลงมาเป็นการดื้อยา aztreonam และ ceftazidime ร้อยละ 78.6 และ 67.9 ตามลำดับ อัตราการดื้อยา cefoxitin มีการดื้อยาในระดับต่ำ พบเพียงร้อยละ 23.2 ยิ่งไปกว่านั้น อัตราการดื้อยา ertapenem, imipenem และ meropenem มีการดื้อยาในระดับค่อนข้างต่ำ พบเพียงแค่ ร้อยละ 1.8-3.6 การดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides พบว่า เชื้อมีอัตราการดื้อยา gentamicin มากกว่าร้อยละ 60 แต่มีการดื้อยา amikacin เพียง ร้อยละ 5.4 สำหรับการดื้อยาในกลุ่ม folate pathway inhibitors พบว่าเชื้อมีอัตราการดื้อยา trimethoprim/sulfamethoxazole ในระดับสูง คือร้อยละ 75.0 นอกจากนี้ เชื้อร้อยละ 42.9 มีอัตราการดื้อยา ciprofloxacin ที่อยู่ในกลุ่มยา fluoroquinolones อีกด้วย ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL พบว่าเชื้อจำนวน 47 ไอโซเลท (ร้อยละ 83.9) มีการสร้างเอนไซม์ ESBL

ตาราง 4 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae จากตัวอย่างต่าง ๆ

ยาต้านจุลชีพ (11 ชนิด)	เชื้อ *mcr*-1 positive (56 ไอโซเลท)	
	จำนวนเชื้อที่ดื้อ	ร้อยละ
CTX	54	96.4
CAZ	38	67.9
FOX	13	23.2
ATM	44	78.6
ETP	2	3.6
IMP	1	1.8
MEM	1	1.8
AK	3	5.4
CN	35	62.5
SXT	42	75.0
CIP	24	42.9

หมายเหตุ: CTX; cefotaxime, CAZ; ceftazidime, FOX; cefoxitin, ATM;aztreonam, ETP; ertapenem, IMP; imipenem, MEM; meropenem, AK; amikacin, CN; gentamicin, SXT; trimethoprim/sulfamethoxazole, CIP; ciprofloxacin

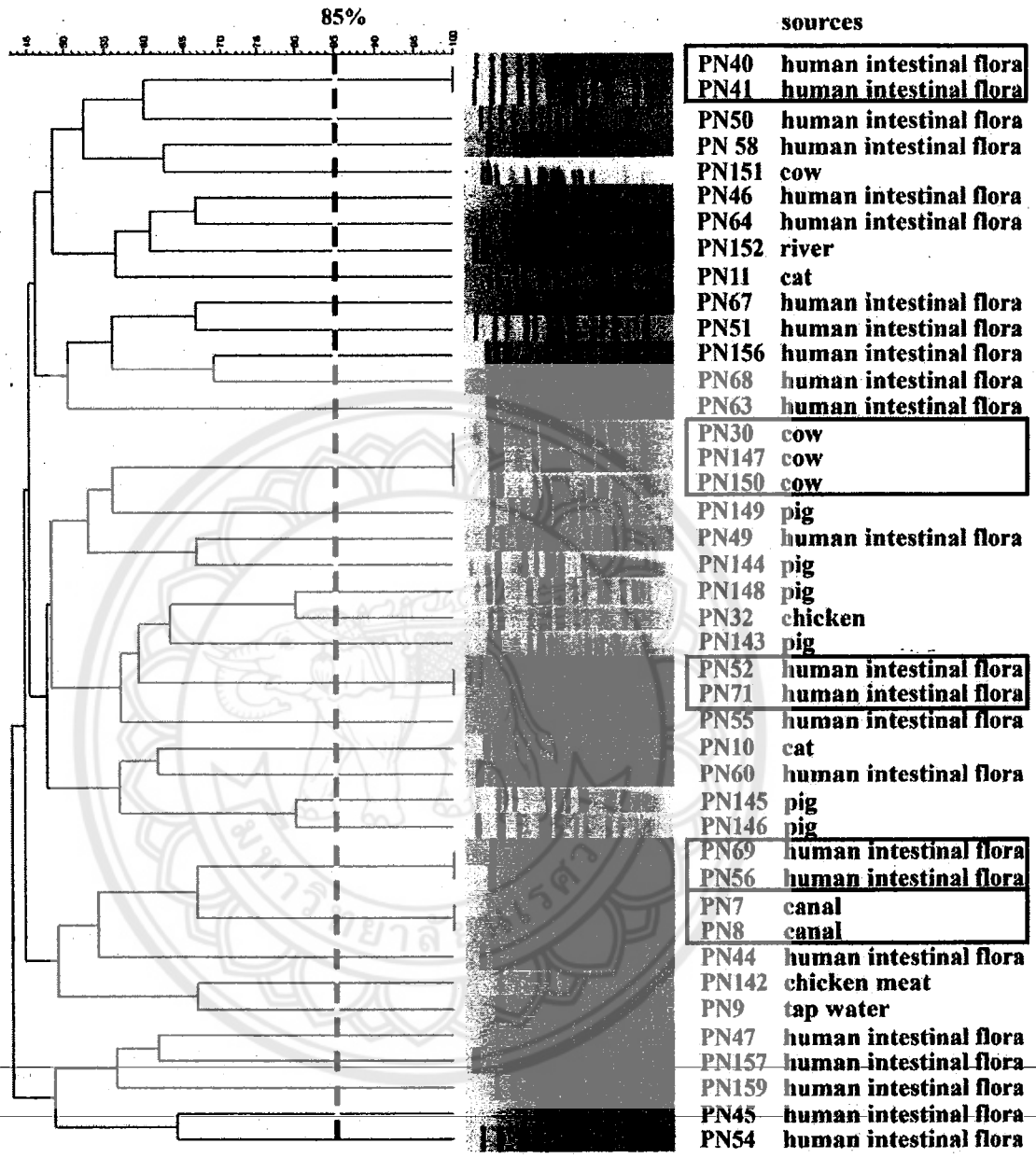
7.4. การถ่ายทอดยีน *mcr*–1 โดยวิธี conjugation

การศึกษาการถ่ายทอดยีน *mcr*–1 จากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่งโดยกระบวนการ conjugation ด้วยวิธี broth mating method พบว่า เชื้อ *mcr–1* positive Enterobacteriaceae จำนวน 31 ไอโซเลท (ร้อยละ 55.3) สามารถถ่ายทอดยีน *mcr–1* ไปยัง rifampin–resistant *E. coli* DH5α ซึ่งเป็นแบคทีเรียตัวรับได้ โดยเป็นเชื้อที่มาจากตัวอย่างสัตว์เลี้ยง เนื้อไก่ คน สุกร โค และ สิ่งแวดล้อม จำนวน 2, 2, 19, 5, 1 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตาราง 3) โดยมีค่าความสามารถในการถ่ายทอดยีน (conjugation frequency) สูง คือ 10^{-6} – 10^{-2} ยกเว้นเชื้อบางไอโซเลทที่มาจากตัวอย่างเนื้อไก่และตัวอย่างคนที่มีความสามารถในการถ่ายทอดยีนต่ำคือ 10^{-8} – 10^{-7}

การทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* DH5α ที่ได้รับยีน *mcr–1* หรือ transconjugant โดยหาค่า colistin MIC ของ transconjugant ทั้ง 31 ไอโซเลท พบว่าส่วนใหญ่มีค่า MIC อยู่ในช่วง 2–4 mg/L ซึ่งมากกว่าค่า colistin MIC ของ *E. coli* DH5α ที่ไม่มียีนมากถึง 4–8 เท่า (ตาราง 3)

7.5 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ mcr–1–positive Enterobacteriaceae โดยเทคนิค Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

การศึกษาจีโนไทป์ (genotypic characterization) ของเชื้อ *mcr–1*–positive *E. coli* จำนวน 42 ไอโซเลท ด้วยวิธี PFGE (ภาพ 1) พบว่า เชื้อส่วนใหญ่มีรูปแบบ PFGE ที่แตกต่างกัน โดยมีรูปแบบของ PFGE 36 รูปแบบ อย่างไรก็ตามมีเชื้อบางไอโซเลทที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างเดียวกันมีรูปแบบ PFGE ที่มีเหมือนกัน หรือมีจีโนไทป์ (genotype) เดียวกัน เช่น เชื้อจากตัวอย่างคน PN40 และ PN41, PN52 และ PN71, PN56 และ PN69 ตัวอย่างโค PN30, PN147, PN150 และตัวอย่างน้ำ PN7 และ PN8 2



ภาพ 1 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr*–1 โดยเทคนิค Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) สร้างเดนโดแกรมโดยใช้วิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม GelCompar II software Version 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) ไอโซเลทที่มีความใกล้ชิดกันอย่างน้อยร้อยละ 85 (≥ 85%) จัดว่าเป็นเชื้อที่มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรม

หมายเหตุ: กรอบสี่เหลี่ยม แสดงให้เห็นถึงรูปแบบ PFGE ที่เหมือนกันภายในแต่ละกลุ่ม

1049289

สำนักหอสมุด

7 มี.ค. 2565

8. สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ตั้งแต่มีรายงานการค้นพบยีน *mcr*-1 ครั้งแรกในปี ค.ศ. 2016 ทำให้เริ่มมีการตรวจพบยีน *mcr*-1 เพิ่มขึ้นทั่วโลก โดยส่วนใหญ่พบว่าเป็นเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae เช่น *E. coli, K. pneumoniae, Salmonella enterica, E. aerogenes* และ *E. cloacae* (Liu et al., 2016) ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจหายีน *mcr-1* ในตัวอย่างจากคน สัตว์ เนื้อสัตว์ สิ่งแวดล้อม (ดินและแหล่งน้ำ) บริเวณภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ทั้งหมด 2,217 ตัวอย่าง พบยีน *mcr-1* ทั้งหมด 56 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.5 โดยเป็นเชื้อจากตัวอย่างคนมากที่สุดคือ 29 ตัวอย่าง รองลงมาคือตัวอย่างน้ำ 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) เชื้อที่พบมากที่สุดได้แก่ *E. coli* 53 ไอโซเลท (ร้อยละ 94.6), *Klebsiella pneumoniae* 2 ไอโซเลท (ร้อยละ 3.5) และ *Enterobacter cloacae* 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 1.7) (ตารางที่ 2) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr-1* ในตัวอย่าง คน สัตว์เลี้ยง สัตว์และเนื้อสัตว์จากการปศุสัตว์ แม่น้ำ จากหลายประเทศในทวีปเอเชีย อเมริกาและยุโรป โดยความชุกของเชื้อที่พบมากที่สุด คือ *E. coli, Klebsiella pneumoniae* และ *Enterobacter cloacae* (Skov & Monnet, 2016) เช่นเดียวกับการศึกษาในประเทศไทย ที่พบยีน *mcr-1* ในเชื้อ *E. coli* ทั้งเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก (Runcharoen et al., 2017)

ในการศึกษานี้ตัวอย่างจากคน (ปี พ.ศ. 2013–2015) พบความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr-1* ร้อยละ 3.5 (29/837) ซึ่งความชุกค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae จากคนในประเทศบังกลาเทศ ในปี พ.ศ. 2018 ที่พบความชุกร้อยละ 15.0 (Johura et al., 2020) ประเทศจีน ในปี พ.ศ. 2015–2016 ที่พบความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr-1* ร้อยละ 30.7 (Chen et al., 2017) และ ประเทศเวียดนาม ในปี พ.ศ. 2017–2018 ที่พบความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr-1* สูงถึงร้อยละ 58.1 (Yamaguchi et al.,2020)

สำหรับตัวอย่างจากสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นมูลสัตว์หรือเนื้อไก่ ในปี พ.ศ. 2013–2014 พบความชุกของ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae ในตัวอย่างมูลสัตว์ปีก (ไก่และเป็ด) เนื้อไก่ มูลสุกรและโค ร้อยละ 0.2 (2/786), 0.4 (1/250), 15.8 (6/38) และ 11.1(4/36) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศเยอรมนี (ปี 2010–2015) ที่พบความชุกของเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae จากตัวอย่างมูลไก่ เนื้อไก่ มูลสุกรและโค คือ ช่วงร้อยละ 0.0–8.1 (Irrgang et al., 2016) เช่นเดียวกันกับการศึกษาใน มูลไก่งวง ไก่ สุกรและโคในประเทศโปแลนด์ (ปี 2011–2016) พบเชื้อที่มียีน *mcr-1* เพียง ร้อยละ 1.3 (80/5878) ไอโซเลท ในทุกตัวอย่าง (Zajac et al., 2019) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาเชื้อ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae การศึกษาเนื้อไก่ในประเทศเนเธอร์แลนด์ ในปี พ.ศ. 2015 พบว่าความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr-1* มากกว่าการศึกษาอื่น ๆ ซึ่งพบร้อยละ 24.8 (53/214) (Schrauwen et al., 2017) หรือการศึกษาจากมูลไก่และสุกรในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2015–2016 พบว่าความชุกของ *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae มากกว่าการศึกษาอื่น ๆ โดยพบมากถึงร้อยละ 62.7 (Chen et al., 2017)

สำหรับตัวอย่างน้ำและดิน (ปี 2013–2014, 2017) ในการศึกษานี้ พบความชุกของเชื้อ *mcr–1*–positive Enterobacteriaceae ร้อยละ 10.6 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ Enterobacteriaceae จากตัวอย่างดินบริเวณฟาร์มหมูและไก่ในประเทศจีน (ปี 2016) พบความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr–1* คือ ร้อยละ 6.2 (Zheng et al., 2017) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาเชื้อ Enterobacteriaceae จากตัวอย่างแม่น้ำจำนวน 105 ไอโซเลท ในประเทศสเปน (ปี 2013) ที่พบว่า ทุกไอโซเลทไม่มียีน *mcr–1* (Ovejero et al., 2017) อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อ Enterobacteriaceae จากตัวอย่างแม่น้ำในประเทศบังกลาเทศ (ปี 2018) พบความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr–1* มากที่สุด ถึงร้อยละ 40.0 (4/10) (Johura et al., 2020)

สำหรับตัวอย่างสัตว์เลี้ยง (ปี 2014) ในการศึกษานี้ พบความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr–1* คือ ร้อยละ 2.7 ซึ่งความชุกค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับการศึกษา เชื้อ Enterobacteriaceae จากสัตว์เลี้ยงในประเทศจีน (ปี 2015–2016) ที่พบความชุกของเชื้อที่มียีน *mcr–1* ร้อยละ 10.9 (6/55) (Chen et al., 2017)

การศึกษาค่า colistin MIC ของเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr–1* ทั้ง 56 ไอโซเลท โดยวิธี broth microdilution method พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 4 ถึง >16 mg/L (ตารางที่ 3) โดยมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} คือ 4 mg/L และ 8 mg/L ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าค่า MIC breakpoint (EUCAST breakpoint = 2 mg/L) (EUCAST, 2019) 2–4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่า colistin MIC ของ *mcr–1*–positive Enterobacteriaceae จากตัวอย่างผู้ป่วย ในประเทศไทย (ปี 2014–2017) พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 4 mg/L ถึง 64 mg/L (Eiamphungporn et al., 2018; Shanmugakani et al., 2019)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆของเชื้อ *mcr–1*–positive Enterobacteriaceae ทั้ง 56 ไอโซเลท ด้วยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อมีการดื้อยา cefotaxime, aztreonam, trimethoprim/ sulfamethoxazole สูง คือร้อยละ 96.4 78.6 และ 75 ตามลำดับ ดื้อยา ceftazidime, gentamicin และ ciprofloxacin ร้อยละ 42.9–67.9 การดื้อยา cefotaxime, ceftazidime aztreonam อาจเกิดจากการที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งพบมากถึงร้อยละ 83.9 เชื้อส่วนใหญ่ยังคงไวต่อยาในกลุ่ม carbapenem (ertapenem, imipenem และ meropenem) โดยพบการดื้อยาในระดับต่ำเพียง ร้อยละ 1.8–3.6 (ตารางที่ 4) การดื้อยา carbapenem ในระดับต่ำนี้ สอดคล้องกับรายงานการดื้อยาของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand; NARST) ปี 2019 พบว่าเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อยา imipenem เพียงร้อยละ 2.4 (NARST, 2563) สำหรับอัตราการดื้อยา gentamicin พบร้อยละ 62.5 แต่มีการดื้อยา amikacin เพียง ร้อยละ 5.4 ซึ่งทั้งคู่เป็นยาในกลุ่ม aminoglycosides เหมือนกัน ซึ่งความแตกต่างของอัตราการดื้อยาทั้งคู่ อาจเป็นเพราะโครงสร้างของยา amikacin ที่มีโครงสร้างพิเศษ (Side chain) ที่สามารถป้องกันการทำลายยาจากเอนไซม์ได้ ทำให้เชื้อมีความไวต่อยา amikacin มากกว่า (Finberg & Guharo, 2012)

การศึกษาการถ่ายทอดยีน *mcr*–1 ด้วยวิธีการ conjugation พบว่า เชื้อ *mcr–1*–positive Enterobacteriaceae ร้อยละ 55.3 (31/56 ไอโซเลท) สามารถถ่ายทอดยีน *mcr–1* ให้กับ *E. coli* J53 ได้ โดยค่าความสามารถในการถ่ายทอดยีน (conjugation frequency) อยู่ในช่วง 10^{-6} – 10^{-2} เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* J53 ซึ่งไม่มียีน *mcr–1* เชื้อ transconjugant ทั้ง 31 ไอโซเลท มีค่า colistin MIC เพิ่มขึ้นมากถึง 4–8 เท่า

การศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อ *mcr–1*–positive *E. coli* จำนวน 42 ไอโซเลท ด้วยวิธี PFGE พบว่า เชื้อมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (High genetic diversity) โดยมีรูปแบบของ PFGE 36 รูปแบบ อย่างไรก็ตามพบเชื้อที่มีรูปแบบ PFGE ที่มีความคล้ายคลึงกันอยู่ 5 กลุ่ม คือ จากตัวอย่างคน ตัวอย่างโคและตัวอย่างน้ำ แสดงให้เห็นถึงเชื้อที่อาจมีการแพร่กระจายภายในตัวอย่างชนิดเดียวกัน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในประเทศจีน ที่พบความหลายหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *mcr–1*–positive *E. coli* จากตัวอย่างอาหาร สิ่งแวดล้อม สัตว์ และคน (Chen et al., 2017) การศึกษาเชื้อจากตัวอย่างคน น้ำ อาหารริมทางและน้ำล้างมือคนขายอาหาร ในประเทศบังกลาเทศ (ปี 2018) (Johura et al., 2020) รวมทั้งการศึกษาเชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วย (rectal swab) ในกรุงเทพมหานคร (ปี 2018, 13 isolate) (Shanmugakani et al., 2019) มีบางการศึกษาพบเชื้อที่มียีน *mcr–1* จากแหล่งตัวอย่างเดียวกันที่มีความเหมือนกันทางพันธุกรรม เช่น การศึกษาเชื้อ *E. coli* จากน้ำเสียในประเทศสเปน (ปี 2013) (Ovejero et al., 2017) และจากตัวอย่างดินบริเวณฟาร์มหมูและไก่ในประเทศจีน (ปี 2016) (Zheng et al., 2017) โดยการศึกษาส่วนใหญ่ไม่พบความเหมือนของรูปแบบ PFGE จากแหล่งตัวอย่างต่างชนิดกัน

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสามารถในการถ่ายทอดยีน *mcr–1* แสดงให้เห็นว่า การแพร่กระจายของเชื้อ *mcr–1*–positive Enterobacteriaceae นั้น ส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากเชื้อตัวเดียว (clonal spread) แต่เกิดจากการถ่ายทอดยีน *mcr–1* ในแนวราบให้กับแบคทีเรียอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (NARST), กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข. (2563). สถานการณ์เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพปี 2000-2019. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 เมษายน 2563; สืบค้นจากเว็บไซต์: http://narst.dmsc.moph.go.th/

Al-Tawfiq JA, Laxminarayan R, Mendelson M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals?. Int J Infect Dis. 2017;54:77-84.

Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:3370-9.

Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36:415-20.

Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017;22(31). pii: 30589.

Chen K, Chan EW, Xie M, Ye L, Dong N, Chen S. Widespread distribution of *mcr-1*-bearing bacteria in the ecosystem, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017;22(39).

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentyfourth Informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014

Eiamphungporn W, Yainoy S, Jumderm C, Tan-Arsuwongkul R, Tiengrim S, Thamlikitkul V. Prevalence of the colistin resistance gene *mcr-1* in colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Thailand. J Glob Antimicrob Resist. 2018 Dec;15:32-5.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2018

Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist. Updat. 2010;13; 132-8.

Finberg R, Guharoy R. Aminoglycosides. *In* Clinical Use of Anti-infective Agents. Springer. 2012;57-62.

Hembach N, Schmid F, Alexander J, Hiller C, Rogall ET, Schwartz T. Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. Front Microbiol. 2017 Jul 11;8:1282.

Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, Young T, Li H, Tooke CL, et al. Insights into the Mechanistic basis of plasmid-mediated colistin resistance from crystal structures of the catalytic domain of MCR-1. Sci Rep. 2017;7:39392.

Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen BA, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, et al. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010-2015. PLOS ONE. 2016;11:e0159863.

Johura FT1, Tasnim J1, Barman I1, Biswas SR1, Jubyda FT1, Sultana M, et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* carrying *mcr-1* in food, water, hand rinse, and healthy human gut in Bangladesh. Gut Pathog. 2020;12:5.

Lai CC, Chuang YC, Chen CC, Tang HJ. Coexistence of MCR-1 and NDM-9 in a clinical carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolate. Int J Antimicrob Agents. 2017;49:517-8.

Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing, p115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. 1991. John Wiley and Sons, United Kingdom.

Lei L, Wang Y, Schwarz S, Walsh TR, Ou Y, Wu Y, et al. *mcr-1* in Enterobacteriaceae from companion animals, Beijing, China, 2012-2016. Emerg Infect Dis. 2017;23:710-1.

Li XP, Fang LX, Song JQ, Xia J, Huo W, Fang JT, et al. Clonal spread of *mcr-1* in PMQR-carrying ST34 Salmonella isolates from animals in China. Sci Rep. 2016;6:38511.

Liu BT, Song FJ, Zou M, Hao ZH, Shan H. Emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in *Cronobacter sakazakii* producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the same animal. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61: e01444-16.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16:161-8.

Monte DF, Mem A, Fernandes MR, Cerdeira L, Esposito F, Galvão JA, et al. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61:e02718-16.

Ohsaki Y, Hayashi W, Saito S, Osaka S, Taniguchi Y, Koide S, et al. First detection of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* gene from retail domestic chicken meat in Japan. Jpn J Infect Dis. 2017;70:590-2.

Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B. Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. J Antimicrob Chemother. 2017;72:1050-3.

Paveenkittiporn W, Kerdsin A, Chokngam S, Bunthi C, Sangkitporn S, Gregory CJ. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance and New Delhi metallo beta-lactamase genes in extensively drug-resistant *Escherichia coli* isolated from a patient in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;87:157-9.

Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob Chemother. 2015;70: 75–80.

Runcharoen C, Raven KE, Reuter S, Kallonen T, Paksanont S, Thammachote J, et al. Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. Genome Medicine. 2017;9:81.

Reechaipichitkul W1, Phondongnok S, Bourpoern J, Chaimanee P. Causative agents and resistance among hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia patients at Srinagarind Hospital, northeastern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2013;44:490-502.

Rolain JM, Kempf M, Leangapichart T, Chabou S, Olaitan AO, Le Page S, et al. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in France and Laos. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:6994-5.

Schrauwen EJA, Huizinga P, van Spreuwel N, Verhulst C, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Kluytmans JAJW. High prevalence of the *mcr-1* gene in retail chicken meat in the Netherlands in 2015. Antimicrob Resist Infect Control. 2017;6:83.

Shanmugakani RK, Akeda Y, Sugawara Y, Laolerd W, Chaihongsa N, Sirichot S. PCR-dipstick-oriented surveillance and characterization of *mcr-1*- and carbapenemase-carrying Enterobacteriaceae in a Thai hospital. Front Microbiol. 2019;10:149

Skov R, Monnet D. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill. 2016;21:pii30155.

Stoesser N, Mathers AJ, Moore CE, Day NP, Crook DW. Colistin resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect Dis. 2016;16:285-6.

Tada T, Nhung PH, Shimada K, Tsuchiya M, Phuong DM, Anh NQ, et al. Emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates harboring *mcr-1* in Vietnam. Int J Infect Dis. 2017;63:72-3.

Teo JW, Chew KL, Lin RT. Transmissible colistin resistance encoded by *mcr-1* detected in clinical Enterobacteriaceae isolates in Singapore. Emerg Microbes Infect. 2016;5(8):e87.

Trung NV, Matamoros S, Carrique-Mas JJ, Nghia NH, Nhung NT, Chieu TT, et al. Zoonotic transmission of *mcr-1* colistin resistance gene from small-scale poultry farms, Vietnam. Emerg Infect Dis. 2017;23:529-32.

Tunyapanit W, Pruekprasert P, Laoprasopwattana K, Chelae S. In vitro activity of colistin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Songklanagarind Hospital, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2013;44:273-80.

Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. Lancet Infect Dis. 2017;17:390-9.

Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. Nat Microbiol. 2017;2:16260.

Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016;21(27).

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

Yamaguchi T, Kawahara R, Hamamoto K, Hirai I, Khong DT, Nguyen TN, et al. High prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* with chromosomally carried *mcr-1* in healthy residents in Vietnam. mSphere. 2020 Mar 4;5(2). pii: e00117-20.

Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel Plasmid-mediated colistin resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. MBio. 2017;8(3). pii: e00543-17.

Yu CY, Ang GY, Chin PS, Ngeow YF, Yin WF, Chan KG. Emergence of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* in Malaysia. Int J Antimicrob Agents. 2016;47:504-5.

Zając M, Sztromwasser P, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, Cavaco LM, Ziętek-Barszcz A, et al. Occurrence and characterization of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Poland, 2011-2016. Front Microbiol. 2019;10:1753.

Zheng B, Huang C, Xu H, Guo L, Zhang J, Wang X, et al. Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing, MCR-1-harboring *Escherichia coli* in farming soil. Front Microbiol. 2017;8:2510.

Zhou HW, Zhang T, Ma JH, Fang Y, Wang HY, Huang ZX, et al. Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried *mcr-1* in Waterborne Enterobacteriaceae in China. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Jul 25;61(8).

ภาคผนวก

ตาราง 5 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด และการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มียีน *mcr*–1 (จำนวน 56 ไอโซเลท)

เชื้อ	ตัวอย่าง	การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ										
		การสร้าง ESBL	CTX	CAZ	FOX	ATM	ETP	IMP	MEM	AK	CN	SXT	CIP
17C05/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R
18M05/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	I	R	S	S	S	S	R	R	R
19M05/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	S	R	S	S	S	I	I	R	R
21C02/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
22C04/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	S	R	S	S	S	I	R	R	R
24M01/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R
25M04/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	S	R	S	I	S	S	R	R	R
27M01/*E. coli*	น้ำ	–	S	S	R	I	R	R	R	S	S	S	S
30C04/*E. coli*	น้ำ	+	R	I	S	R	S	S	S	S	S	R	I
16CCE/*E. coli*	แมว	+	R	R	S	R	S	S	I	I	R	R	I
18CCE/*E. coli*	แมว	+	R	R	S	R	S	I	S	I	I	R	R
31CCE/*E. coli*	แมว	+	R	R	S	R	S	S	S	I	S	R	S

17CE01/*E. coli*	ไก่	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	I
12TE09/*E. coli*	โค	+	R	I	S	R	S	S	S	R	R	S	S
12CE13/*E. coli*	เนื้อไก่	+	R	R	R	I	S	S	S	S	R	R	R
124B/K. pneumoniae	คนสุขภาพดี	–	R	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S
158P/*E. coli*	คนสุขภาพดี	+	R	R	S	R	S	I	I	I	S	S	R
169P/*E. coli*	คนสุขภาพดี	+	R	R	I	R	S	I	S	R	R	R	I
58P/*E. coli*	คนสุขภาพดี	+	R	R	S	R	S	I	I	S	R	R	I
231P/*E. coli*	คนสุขภาพดี	+	R	R	R	R	S	I	S	I	I	R	R
248P/*E. coli*	คนสุขภาพดี	+	R	I	S	I	S	S	S	I	S	R	I
229P/*E. coli*	คนสุขภาพดี	+	R	I	S	I	S	S	S	I	R	R	R
262P/*E. coli*	คนสุขภาพดี	+	R	R	S	R	S	S	S	I	R	R	I
CN21/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CN144/*E. coli*	ผู้ป่วย	–	R	R	R	R	I	I	I	R	R	R	R
C304/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	I
C548/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	I
C329D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	I	S	R	S	S	S	S	R	S	I

C271D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
C168D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R
C282D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	I
C227/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	I	R	S	S	S	S	R	R	R
C219/*E. coli*	ผู้ป่วย	–	R	S	S	I	S	S	S	I	S	R	I
C355/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	I
C503/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	I
C550D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	I
CN128D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	I	R	R	I
C270/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	R
C167/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	I	R	R	S	S	S	I	R	R	R
C332D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	I	S	R	S	S	S	S	R	S	I
C220D/*K. pneumoniae*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	I	S	R	I
0903CE/*E. coli*	เนื้อไก่	+	R	I	S	I	S	S	S	S	S	R	R
12PE04/*E. coli*	หมู	+	R	I	S	R	S	S	S	I	R	S	I
12PE05/*E. coli*	หมู	+	R	R	I	R	S	S	S	I	R	R	R

12PE06/*E. coli*	หมู	–	R	I	I	I	S	S	S	I	S	R	I
12PE07/*E. coli*	หมู	+	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
12TE06/*E. coli*	โค	+	R	I	I	R	S	S	S	I	R	S	I
12PE08/*E. coli*	หมู	–	R	R	R	I	S	S	S	S	R	R	R
12PE09/*E. coli*	หมู	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	I
12TE07/*E. coli*	โค	–	R	R	I	R	S	S	S	I	R	S	I
12TE08/*E. coli*	โค	+	R	R	S	R	S	S	S	I	S	R	I
RC88E/*E. coli*	น้ำ	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S
01SE04/*E. coli*	ดิน	–	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R
C527/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	I
C129/ *Ent. cloacae*	ผู้ป่วย	–	I	S	R	I	I	I	S	S	S	S	S
C137D/*E. coli*	ผู้ป่วย	+	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R

หมายเหตุ: CTX; cefotaxime, CAZ; ceftazidime, FOX; cefoxitin, ATM; aztreonam, ETP; ertapenem, IMP; imipenem, MEM; meropenem, AK; amikacin, CN; gentamicin, SXT; trimethoprim/sulfamethoxazole, CIP; ciprofloxacin