ความชุกและการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากโคขุนที่ส่งเข้าโรงฆ่าในจังหวัดสกลนคร

Prevalence and Antimicrobial resistance of Escherichia coli and Lactic Acid Bacteria Isolated from Slaughter Fattening Beef Cattle in Sakon Nakhon Province

จักรพรรดิ์ ประชาชิต[1] ไพรัตน์ ศรแผลง[2] และชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์[3]
Jakkapat Prachachit[1] Pairat Sornplang[2] and Chuleeporn Saksangawong[3]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุก และการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Escherichia coli* และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากโคขุนที่ส่งเข้าโรงฆ่าในจังหวัดสกลนคร โดยเก็บตัวอย่างจากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน จำนวน 140 ตัวอย่าง พบว่าความชุกของเชื้อ *E. coli* คิดเป็นร้อยละ 93.57 และความชุกของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย คิดเป็นร้อยละ 90.00 นำไอโซเลตมาทำการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จำนวน 11 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าเชื้อ E. coli มีอัตราการดื้อยาดังนี้ Penicillin G ร้อยละ 99.24 Tetracycline ร้อยละ 56.06 Nalidixic acid ร้อยละ 18.18 Streptomycin ร้อยละ 15.91 Ciprofloxacin และ Cefotaxime เท่ากัน ร้อยละ 12.88 Ampicillin ร้อยละ 10.60 Sulfamethoxazole/Trimethoprim ร้อยละ 9.85 Gentamycin ร้อยละ 9.10 Chloramphenicol ร้อยละ 6.82 และ Kanamycin ร้อยละ 3.37 และพบรูปแบบของการดื้อยาหลายชนิดทั้งหมด 43 รูปแบบ อย่างไรก็ตามพบความถี่ในการดื้อต่อยา Tetracycline ร่วมกับ Penicillin G มากกว่ารูปแบบอื่น ส่วนแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีอัตราการดื้อยาดังนี้ Tetracycline ร้อยละ 41.13 Cefotaxime ร้อยละ 36.30 Nalidixic acid ร้อยละ 25 Chloramphenicol ร้อยละ 21.78 Ampicillin และ Penicillin G เท่ากัน ร้อยละ 20.97 Streptomycin ร้อยละ 12.90 Kanamycin ร้อยละ 8.07 Ciprofloxacin ร้อยละ 8.06 Gentamycin ร้อยละ 7.26 และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim ร้อยละ 4.84 และพบรูปแบบของการดื้อยาหลายชนิด 42 รูปแบบ อย่างไรก็ตามพบความถี่ในการดื้อต่อยา Tetracycline ร่วมกับยา Cefotaxime มากกว่ารูปแบบอื่น การศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันความชุกการพบเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ E. coli และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากโคขุนที่ส่งเข้าโรงฆ่า และสามารถใช้ข้อมูลการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาให้เกิดประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: ความชุก การดื้อต่อยาต้านจุลชีพ เอสเชอริเชีย โคไล แลคติกแอสิดแบคทีเรีย โคขุน

[1] สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร จ.สกลนคร 47000
[1] Department of Animal science, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon 47000
[2,3]ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
[2,3]Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.

Abstract

This cross-sectional observation study was conducted to determine the prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from slaughtered fattening beef cattle in Sakon Nakhon province. A total of 140 caecal content samples were collected. It revealed a prevalence of 93.57% (132/140) of *E. coli* and 90.00% (126/140) of LAB. A total of *E. coli* isolates and LAB isolates were tested for resistance to 11 antimicrobial agents using the disc diffusion method. The results showed that *E. coli* isolates were resistant to Penicillin G (99.24%), Tetracycline (56.06%), Nalidixic acid (18.18%), Streptomycin (15.91%), Ciprofloxacin (12.88%), Cefotaxime (12.88%), Ampicillin (10.60%), Sulfamethoxazole/Trimethoprim (9.85%), Gentamycin (9.10%), Chloramphenicol (6.82%) and Kanamycin (3.37%). All *E. coli* isolates showed 43 different multidrug-resistance patterns. However, the combination of Tetracycline and Penicillin G was the most frequently observed resistance pattern from *E. coli*. The LAB isolates were resistant to Tetracycline (41.13%), Cefotaxime (36.30%), Nalidixic acid (25%), Chloramphenicol (21.78%), Ampicillin and Penicillin G at 20.97%, Streptomycin (12.90%), Kanamycin (8.07%), Ciprofloxacin (8.06%), Gentamycin (7.26%) and Sulfamethoxazole /Trimethoprim (4.84%). All LAB isolates showed 42 different multidrug-resistance patterns. However, the combination of Tetracycline and Cefotaxime resistant LAB isolates was the most frequently observed. This result may be due to a long-time use of these antibiotics by the farmers in this area.

Keywords: Prevalence, antimicrobial resistance, Escherichia coli, Lactic Acid Bacteria, fattening beef cattle

บทนำ

เนื้อโคมีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายและได้รับความนิยมสูงในหมู่คนไทย เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีน รวมทั้งไวตามิน และแร่ธาตุอีกหลายชนิด ในการควบคุมคุณภาพเนื้อโคนั้นต้องให้ความสำคัญกับทุกขั้นตอน จากข้อมูลทางด้านสาธารณสุขชี้ให้เห็นว่ากระบวนการผลิตเนื้อโคที่ไม่ถูกหลักสุขศาสตร์สามารถปนเปื้อนเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร เช่น เชื้อ Salmonella เชื้อ *Campylobacter* spp. และเชื้อ *E. coli* (Nyachuba, 2010) ซึ่งในการชำแหละเนื้อโคที่โรงฆ่า พบว่าความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบจากซากโคมีความสัมพันธ์กับปริมาณที่ตรวจพบในทางเดินอาหารของโค (Elder *et al*., 2002) ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแรกเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *E. coli* *Salmonella* spp. และ *Clostridium perfringens* (Gunal *et al*., 2006) ส่วนกลุ่มที่สอง คือ จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ทำหน้าที่ควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้มีมากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อร่างกาย ด้วยการเจริญแบบแข่งขัน หรืออาจมีการสร้างสารเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (รจเรข, 2546) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ที่พบมาก ได้แก่ Lactobacilli ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ สามารถใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกซึ่งถือเป็นแนวโน้มของการเลี้ยงสัตว์ในยุคปัจจุบันที่จะหาสารต่าง ๆ มาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ (Nousiainen and Setala, 1998) ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับแลคติกแอสิดแบคทีเรียในโคขุนนั้นยังมีรายงานหรือการศึกษาน้อย ซึ่งถ้าหากมีการศึกษา

อย่างละเอียดข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงโคขุนได้ต่อไป ในส่วนข้อมูลการดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียประจำถิ่นทางเดินอาหารกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เติมในอาหารสัตว์ได้นั้นต้องไม่มีพันธุกรรมการต้านยาแบบได้รับมาภายหลัง (European Commission, 2002) แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารสัตว์อาจเป็นแหล่งกักเก็บพันธุกรรมการดื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยอาจได้รับผลกระทบจากการใช้สารเร่งการเจริญเติบโต การใช้ยารักษาโรครวมถึงระบบการเลี้ยงสัตว์ที่ใกล้ชิดกับมนุษย์หรือสัตว์เลี้ยงอื่นที่อาจปนเปื้อนเชื้อดื้อยาจากมนุษย์หรือสัตว์เลี้ยงหรือได้รับพันธุกรรมการต้านยานี้จากแบคทีเรียก่อโรค เช่น เชื้อ *E. coli* และถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียประจำถิ่นหรือแบคทีเรียก่อโรคอื่น (Mathur and Singh, 2005)

แลคติกแอสิดแบคทีเรียนับได้ว่ามีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศภายในกระเพาะหมัก โดยปกติแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อสูตรอาหารที่มีปริมาณอาหารข้นสูง โดยมักจะพบในโคขุนมากกว่าโคปกติ เนื่องจากโคขุนได้รับอาหารข้นมากกว่า (Dawson and Allison, 1988) นอกจากนี้โคขุนยังมีการเสริมกากน้ำตาล ซึ่งมีผลต่อการเจริญของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความชุก และรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E.coli* และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารของโคขุน เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคขุนให้เกิดประสิทธิภาพและป้องกันไม่ให้มีการใช้ยามากเกินไปจนอาจส่งผลให้เกิดการดื้อยาได้

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่าง caecal content จากโคขุนที่ส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ของสหกรณ์การเลี้ยงปศุสัตว์ กรป. กลาง โพนยางคำ จำกัด จำนวน 140 ตัวอย่าง โดยเก็บแยกแต่ละตัวอย่างบรรจุในถุงพลาสติก แช่เย็นในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง อุณหภูมิไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส ขณะส่งตรวจห้องปฏิบัติการ

ในการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ จัดแบ่งช่วงเวลาในการเก็บเป็น 3 ช่วงเวลา ตามฤดูกาล คือ ฤดูหนาวเก็บ 40 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ฤดูร้อนเก็บ 50 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน และฤดูฝนเก็บ 50 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน

2. การตรวจหาเชื้อ

2.1 การตรวจหาเชื้อ *E. coli* โดยชั่งของเหลวจากลำไส้ส่วน caecum ตัวอย่างละ 25 กรัม ละลายใน 225 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.1% peptone เขี่ยเชื้อตัวอย่างที่เตรียมมา 1 loop ลงใน EC broth ทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่สร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส มาเลี้ยงใน eosin methylene blue agar (EMB plate) ทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีสีเขียวสะท้อนแสง มาทำการทดสอบทางชีวเคมี Indole test, Methyl red test, Voges-Proskauer test, Ammonium citrate test (IMViC test: +, +, -, -)

2.2 การตรวจหาเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย โดยชั่งของเหลวจากลำไส้ส่วน caecum ตัวอย่างละ 25 กรัม ละลายใน 225 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.1% peptone ทำ serial 10-folddilution ตามวิธีการ ISO 6887-1 (1999) แยกเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (De Man *et al*., 1960) ซึ่งดัดแปลงด้วยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.3 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำเข้าบ่มในสภาวะ anaerobic ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีการ ISO 15214 (1998) ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่สร้างกรดโดยเกิดวงใสรอบโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ 30-300 โคโลนี คำนวณปริมาณของเชื้อโดยนำจำนวนโคโลนีคูณกับ dilution factor ต่อหน่วยน้ำหนัก (colony forming unit per gram (CFU/g))

3. การทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี Disc diffusion (Bauer *et al*., 1966) โดยการนำเอาเชื้อทุกไอโซเลต มาทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด (disc ยาที่ใช้เป็นของบริษัท Oxoid (England)) ตามกลุ่มการออกฤทธิ์ ดังนี้ กลุ่ม Penicillin ได้แก่ Ampicillin ขนาด 10 µg Cefotaxime ขนาด 30 µg และPenicillin G ขนาด 10 unit กลุ่ม Chloramphenicol ได้แก่ Chloramphenicol ขนาด

30 µg กลุ่มออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ Nalidixic acid ขนาด 30 µg กลุ่มออกฤทธิ์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก-แกรมลบ ได้แก่ Tetracycline ขนาด 30 µg กลุ่ม Aminoglycosides ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ได้แก่ Streptomycin ขนาด10 µg Gentamicin ขนาด 10 µg และ Kanamycin ขนาด 30 µg กลุ่ม Quinolone ได้แก่ Ciprofloxacin ขนาด 5 µg และกลุ่ม Sulfonamides ได้แก่ Sulfamethoxazol /Trimetroprim ขนาด 25 µg ในส่วน Tetracycline Penicillin และ Streptomycin นั้นนิยมใช้แพร่หลายในการรักษาโคเนื้อในเขตพื้นที่จังหวัดสกลนคร

3.1 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *E. coli*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) มาแล้ว 5 ชั่วโมง มาปรับความขุ่นใน Normal saline solution ให้ขุ่นเท่ากับ McFarland standard nephelometer 0.5 จากนั้นใช้สำลีพันไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่น ป้ายให้ทั่วผิวหน้าจานเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar plate (MHA) แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำ disc ยาทั้ง 11 ชนิด วางบนผิวอาหาร นำเข้าบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อต่อ disc ยา เป็นมิลลิเมตร แล้วนำไปแปลผลจากตารางมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Testing Institute (CLSI, 2014)

3.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LSM (LAB Susceptibility test Medium) แทนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar เนื่องจากแลคติกแอสิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารนี้ (Klare *et al*., 2005)

นำเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต (1% inoculum) ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มาแล้ว 18 ชั่วโมง มาปรับความขุ่นใน Normal saline solution ให้ขุ่นเท่ากับ McFarland standard nephelometer 0.5 จากนั้นใช้สำลีพันไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่น ป้ายให้ทั่วผิวหน้าจานเลี้ยงเชื้อ LSM agar ใน 3 ทิศทาง แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำ disc ยา ทั้ง 11 ชนิด วางบนผิวอาหาร นำเข้าบ่มในสภาวะ anaerobic อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อต่อ disc ยา เป็นมิลลิเมตร แล้วนำไปแปลผลจากตารางมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Testing Institute (CLSI, 2014)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลความชุกของเชื้อ *E.coli* และแลคติกแอสิดแบคทีเรีย โดยใช้ descriptive statistic ทำการเปรียบเทียบรูปแบบ ความสัมพันธ์ ความแตกต่างของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ Ampicillin Chloramphenicol Cefotaxime Ciprofloxacin Gentamycin Kanamycin Nalidixic acid Penicillin G Streptomycin Sulfameth-oxazol/Trimetroprim และ Tetracycline ด้วยวิธี Chi-Square analysis โดย Epiinfo 6.04 (CDC, 2001)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ความชุกของเชื้อ *E. coli*

ผลการตรวจแยกเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่ของโคขุนที่ส่งเข้าโรงฆ่า ในช่วงระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายน 2558 จากตัวอย่างทั้งหมด 140 ตัวอย่าง ตรวจพบ *E. coli* 132 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 93.57 ส่วนผลการตรวจนับจำนวนประชากรของ *E. coli* ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนประชากรของ *E. coli* ที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน

ฤดูกาล	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนประชากร *Escherichia coli* (log cfu/g.)
หนาว	20	5.05±0.28
ร้อน	20	4.91±0.44
ฝน	20	5.43±0.62

หมายเหตุ ; จำนวนประชากรไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

2. ความชุกของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

ผลการตรวจแยกเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่ของโคขุนที่ส่งเข้าโรงฆ่าจำนวน 140 ตัวอย่าง ตรวจพบแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 126 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 90.00 ส่วนผลการตรวจนับจำนวนประชากรของแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนประชากรของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน

ฤดูกาล	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนประชากรของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (log cfu/g.)
หนาว	20	7.62^{a}±0.53
ร้อน	20	6.22^{b}±0.35
ฝน	20	6.26^{b}± 0.33

หมายเหตุ : ตัวอักษร ^{a,b} ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

3. ผลการทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli*

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 11 ชนิด พบว่าเชื้อ *E. coli* ทั้ง 132 ไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน มีการดื้อต่อ Penicillin G มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 99.24 รองลงมาคือ Tetracycline ร้อยละ 56.06 Nalidixic acid ร้อยละ 18.18 Streptomycin ร้อยละ 15.91 Ciprofloxacin และ Cefotaxime เท่ากัน คือ ร้อยละ 12.88 Ampicillin ร้อยละ 10.60 Sulfamethoxazole/Trimethoprim ร้อยละ 9.85 Gentamycin ร้อยละ 9.10 Chloramphenicol ร้อยละ 6.82 และ Kanamycin ร้อยละ 3.37 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ร้อยละการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของ *E. coli* ที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน ทดสอบโดยวิธี disc diffusion

Antimicrobial agents	% Resistance		
	Resistance	Intermediate	Susceptible
AMP	10.60 (14/132)	6.82 (9/132)	82.58 (109/132)
CTX	12.88 (17/132)	9.85 (13/132)	72.27 (102/132)
PG	99.24 (131/132)	0.76 (1/132)	0 (0/132)
G	9.10 (12/132)	0 (0/132)	90.90 (120/132)
K	3.79 (5/132)	0.76 (1/132)	95.45 (126/132)
S	15.91 (21/132)	21.97 (29/132)	62.12 (82/132)
NA	18.18 (24/132)	3.79 (5/132)	78.03 (103/132)
TE	56.06 (74/132)	0 (0/132)	43.94 (58/132)
C	6.82 (9/132)	9.09 (12/132)	84.09 (111/132)
CIP	12.88 (17/132)	0 (0/132)	87.12 (115/132)
SXT	9.85 (13/132)	1.51 (2/132)	88.64 (117/132)

สารปฏิชีวนะ: AMP: Ampicillin 10 µg, CTX: Cefotaxime 30 µg, PG: Penicillin G 10 unit, G: Gentamicin 10 µg, K: Kanamycin 30 µg, S: Streptomycin 30 µg; NA: Nalidixic acid 30 µg, TE:Tetracycline 30 µg, C: Chloramphenicol 30 µg, CIP: Ciprofloxacin 10 µg, SXT: Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25 µg

รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของ *E. coli*

ผลการทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 11 ชนิด พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา 1 ชนิด ร้อยละ 20.46 ดื้อต่อยา 2 ชนิด ร้อยละ 35.60 ดื้อต่อยา 3 ชนิด ร้อยละ 22.73 ดื้อต่อยา 4 ชนิด ร้อยละ 12.87 ดื้อต่อยา 5 ชนิด ร้อยละ 4.55 และดื้อต่อยา 6 ชนิด ร้อยละ 3.79

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลาย ๆ ชนิด (Multiple-Drug Resistance; MDR) ของ *E. coli* ที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน

เชื้อ *E. coli* ไอโซเลตที่แยกได้ เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล เพื่อแสดงรูปแบบของการดื้อยาที่จัดเป็นการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลาย ๆ ชนิด พบที่เป็น MDR จำนวน 105 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 79.54 โดยสามารถจำแนกรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ MDR ได้ทั้งหมด 43 รูปแบบ โดยเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ มีการดื้อต่อ Penicillin G ร่วมกับ Tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 21.21

4. ผลการทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

ผลการทดสอบความไวของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 11 ชนิด พบว่าเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ทั้ง 124 ไอโซเลตที่แยกได้ มีการดื้อต่อ Tetracycline มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 41.13 รองลงมาคือ Cefotaxime คิดเป็นร้อยละ 36.30 Nalidixic acid ร้อยละ 25 Chloramphenicol ร้อยละ 21.78 Ampicillin และ Penicillin G ร้อยละ 20.97 เท่ากัน Streptomycin ร้อยละ 12.90 Kanamycin ร้อยละ 8.07 Ciprofloxacin ร้อยละ 8.06 Gentamycin ร้อยละ 7.26 และ Sulfamethoxazole /Trimethoprim ร้อยละ 4.84 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ร้อยละการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน ทดสอบโดยวิธี disc diffusion

Antimicrobial agents	% Resistance		
	Resistance	Intermediate	Susceptible
AMP	20.97 (26/124)	4.03 (5/124)	75.00 (93/124)
CTX	36.30 (45/124)	2.40 (3/124)	61.30 (76/124)
PG	20.97 (26/124)	30.65 (38/124)	48.38 (60/124)
G	7.26 (9/124)	0.80 (1/124)	91.94 (114/124)
K	8.07 (10/124)	0.80 (1/124)	91.13 (113/124)
S	12.90 (16/124)	41.13 (51/124)	45.97 (57/124)
NA	25.00 (31/124)	20.16 (25/124)	54.84 (68/124)
TE	41.13 (51/124)	11.30 (14/124)	46.77 (58/124)
C	21.78 (27/124)	19.35 (24/124)	58.87 (73/124)
CIP	8.06 (10/124)	24.20 (30/124)	67.74 (84/124)
SXT	4.84 (6/124)	3.22 (4/124)	91.94 (114/124)

รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

จากการทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 11 ชนิด พบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ที่ดื้อต่อยา 1 ชนิดมี 40 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 36.70 ดื้อต่อยา 2 ชนิด ร้อยละ 36.70 ดื้อต่อยา 3 ชนิด ร้อยละ 9.17 ดื้อต่อยา 4 ชนิด ร้อยละ 8.25 ดื้อต่อยา 5 ชนิด ร้อยละ 3.67 และดื้อต่อยา 6 ชนิด ร้อยละ 5.50

เชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลตที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล เพื่อแสดงรูปแบบของการดื้อยาที่จัดเป็น MDR ผลการศึกษาใน 126 ไอโซเลตที่แยกได้ พบที่เป็น MDR คิดเป็นร้อยละ 55.64 โดยสามารถจำแนกรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ MDR ได้ ทั้งหมด 42 รูปแบบ โดยมีการดื้อต่อ Tetracycline กับ Cefotaxime มากที่สุดคิดเป็น ร้อยละ 9.68

สรุปผลและวิจารณ์

จากการศึกษาความชุกและรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* และแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุนในจังหวัดสกลนครครั้งนี้ พบว่าความชุกของเชื้อ *E. coli* คิดเป็นร้อยละ 93.57 และแลคติกแอสิดแบคทีเรีย คิดเป็นร้อยละ 90 เมื่อทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ ตัวอย่างไอโซเลตเชื้อ *E. coli* พบการดื้อต่อ Penicillin G มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 99.24 รองลงมาคือ Tetracycline ร้อยละ 56.06 และ Nalidixic acid ร้อยละ 18.18 ส่วนตัวอย่างไอโซเลตของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย พบการดื้อต่อ Tetracycline มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 41.13 รองลงมาคือ Cefotaxime คิดเป็นร้อยละ 36.30 และ Nalidixic acid ร้อยละ นอกจากนี้พบว่าเชื้อที่แยกได้ส่วนมากเป็น MDR โดยในตัวอย่างไอโซเลต *E. coli* ที่แยกได้ พบรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 43 รูปแบบ ความถี่ในการแสดงคุณลักษณะของเชื้อในการดื้อต่อ Tetracycline ร่วมกับ Penicillin G มากกว่ารูปแบบอื่น ส่วนตัวอย่างไอโซเลตของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้ พบรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 42 รูปแบบ ความถี่ในการแสดงคุณลักษณะของเชื้อในการดื้อต่อ Tetracycline ร่วมกับ Cefotaxime มากกว่ารูปแบบอื่น

ผลการตรวจนับจำนวนประชากรของ *E. coli* การเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูหนาว จำนวนประชากร (Mean±SD) ของ *E.coli* ได้ 5.05±0.28 log cfu/g. การเก็บในฤดูร้อน จำนวนประชากรของ *E. coli* ได้ 4.91±0.44 log cfu/g. และการเก็บในช่วงฤดูฝน จำนวนประชากรของ *E.coli* ได้ 5.43±0.62 log cfu/g. ซึ่งเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างในแต่ละฤดูกาล (p>0.05) ผลการตรวจนับจำนวนประชากรของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย จากการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูหนาว จำนวนประชากร (Mean±SD) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้ 7.62±0.53 log cfu/g. ฤดูร้อนจำนวนประชากรของแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้ 6.22±0.35 log cfu/g. และฤดูฝนจำนวนประชากรของแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้ 6.26±0.33 log cfu/g. เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าจำนวนของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบในแต่ละฤดูกาลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ตัวอย่างที่เก็บในช่วงฤดูหนาวมีจำนวนประชากรของแลคติกแอสิดแบคทีเรียมากกว่าตัวอย่างที่เก็บในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงฤดูหนาวพืชอาหารสัตว์โดยเฉพาะหญ้าสดขาดแคลน เกษตรกรผู้เลี้ยงโคขุนต้องเพิ่มปริมาณอาหารข้นและกากน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่เอื้อต่อการเจริญของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ส่งผลให้มีปริมาณที่ตรวจพบมากกว่าในฤดูกาลอื่น

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของ *E. coli* พบว่าทุกไอโซเลตที่แยกได้สามารถแสดงคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด การดื้อยาของ *E. coli* สอดคล้องกับงานวิจัยของผู้ที่เคยศึกษามาก่อนหน้านี้ คือ ดื้อต่อยาในกลุ่ม Tetracycline และ Penicillin งานวิจัยของ Chu (2007) ที่ศึกษาความชุกและการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ในตลาดค้าปลีกสุกรชำแหละ พบว่าเชื้อ *E. coli* แสดงคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด และเมื่อจำแนกตามชนิดของยาพบว่ามีอัตราการดื้อต่อ Tetracycline ร้อยละ 79.8 การศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้กระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุนมีความไวรับต่อยาในกลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ Kanamycin Gentamicin ยกเว้น Streptomycin ซึ่งอาจจะเนื่องมาจาก Streptomycin ใช้กันอย่างแพร่หลายในโคเนื้อเขตพื้นที่จังหวัดสกลนคร การดื้อยาที่ใช้ประจำในพื้นที่นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของประเสริฐ และคณะ (2545) ที่ศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ในสุกรและสัตว์ปีก โดยแยกเชื้อ *E. coli* จากสุกร 28 ตัวอย่าง สัตว์ปีก 27 ตัวอย่าง ทำการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ 21 ชนิด ด้วยวิธี Disc diffusion โดยยาปฏิชีวนะที่มีการใช้บ่อยจะมีการดื้อยาที่สูงขึ้น และมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ขึ้นกับพฤติกรรมการใช้ยาของแต่ละแห่ง พบว่า Erythromycin มีอัตราการดื้อยาสูงที่สุดถึงร้อยละ 100 และดื้อต่อ Streptomycin ร้อยละ 88 Penicillin G ร้อยละ 88 และ Sulfamethoxazine /Trimethoprim ร้อยละ 83.33

ไอโซเลตของเชื้อ *E.coli* และแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ที่แยกได้จากกระพุ้งลำไส้ใหญ่โคขุน พบว่ามีอัตราการดื้อต่อ Nalidixic acid ที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน การพบเชื้อที่ดื้อต่อ Nalidixic acid นั้นกำลังเป็นที่วิตกกังวล เนื่องจากมีหลาย ๆ งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้

เห็นว่าการดื้อยาดังกล่าวจะทำให้ความไวรับต่อยาในกลุ่ม Fluoroquinolone ลดลงด้วย นพรัตน์ (2554) ได้ทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* ในน้ำเข้า น้ำออก และตะกอนของกระบวนการบำบัดน้ำเสียในชุมชน พบว่าร้อยละ 84 ของเชื้อ *E. coli* ของน้ำเข้าระบบบำบัดมีการดื้อยาปฏิชีวนะ โดยมีการดื้อยา Nalidixic acid Sulfamethoxazole และ Tetracycline เท่ากับร้อยละ 54 ร้อยละ 50 และร้อยละ 42 ตามลำดับ

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพแลคติกแอสิดแบคทีเรียต่อ Tetracycline Cefotaxime และ Nalidixic acid ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของไพรัตน์และคณะ (2550) ที่รายงานว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมืองทุกไอโซเลตต้านยา Nalidixic acid อย่างไรก็ตามสิ่งที่พบต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา คือ มีความไวรับต่อยากลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ Kanamycin และ Gentamicin

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนมากสามารถแสดงคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด คิดเป็น ร้อยละ 87.91 การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีทั้งหมด 42 รูปแบบ แสดงให้เห็นถึงเกิดการต้านยาแบบ acquired resistance ซึ่งอาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ต้านต่อยาที่ใช้ในสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ (ไพรัตน์ และคณะ, 2550)

รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่คล้ายกันของ *E. coli* และแลคติกแอสิดแบคทีเรีย คือมีการดื้อต่อ Tetracycline มากที่สุด อาจจะเกี่ยวพันธ์กับการใช้ยาในกลุ่มนี้อย่างแพร่หลายในโคเนื้อเขตพื้นที่จังหวัดสกลนคร รวมถึง Penicillin G ด้วย นอกจากนี้ยังมีความไวรับต่อยาในกลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ ยา Kanamycin และยา Gentamicin

จากการศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E.coli* และแลคติกแอสิดแบคทีเรีย พบระดับการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่สูง ซึ่งอาจจะเป็นข้อมูลสำคัญที่สะท้อนให้เห็นถึงปัญหาการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์อย่างไม่ระมัดระวังและมากเกินความจำเป็น ข้อมูลรูปแบบการดื้อยาส่วนใหญ่เชื้อ *E. coli* ดื้อยาร่วมระหว่างยา Penicillin G กับยา Tetracycline ดังนั้นควรระมัดระวังการใช้ยากลุ่มนี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสหกรณ์การเลี้ยงปศุสัตว์ กรป.กลาง โพนยางคำ จำกัด ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและสถานที่ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

นพรัตน์ พัชณีย์. 2554. การกำจัดโคลิฟอร์มและอีโคไลที่ดื้อยาปฏิชีวนะในระบบตะกอนเร่งที่บำบัดน้ำเสียชุมชน. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประเสริฐ วงศ์นาค, ยกชัย เจริญพานิชย์กุล และ สุธี เสตะพยัคฆ. 2545. การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้ออี โคไล ในสุกรและสัตว์ปีก. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียง-เหนือตอนล่าง อ.เมือง จ.สุรินทร์.ค้นเมื่อวันที่ 16 ธันวาคม 2553, แหล่งที่มา: www.dld.go.th/niah/Research/2548/53.pdf.

ไพรัตน์ ศรแผลง, สุทธิพงศ์ อุริยะพงษ์สรรค์, เกรียงศักดิ์ พูนสุข และพลสัณห์ มหาขันธ์. 2550. แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมือง. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 17 (1),33-42

ไพรัตน์ ศรแผลง, สุทธิพงศ์ อุริยะพงษ์สรรค์, เกรียงศักดิ์ พูนสุข, พลสัณห์ มหาขันธ์ และสรรเพชญ อังกิติตระกูล. 2550. ความไวรับยาต้านจุลชีพของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระไก่พื้นเมือง. วารสารวิจัย มข. (ฉบับบัณฑิตศึกษา) 7(3), 1–8.

รจเรข ชคทันต์บดี. 2546. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในอาหารเปลือกกุ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Bauer, A.W., W.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility

testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology. 45(4), 493-496

Center for Disease Control and Preventions (CDC). 2001. EpiInfo Statistical program Version 6.04. Atlanta: Center for Disease Control and Preventions.

Chu, V.T. 2007. A Study of Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Retail Fresh Pork in Hanoi, Vietnam. Master of Veterinary Public Health Thesis Chiang Mai University.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Wayne, PA,USA :Clinical and Laboratory Standards Institute.

Dawnson, K.A., and Allison, M.J. 1988. Digestive disorders and digestive toxicity. p 455. *In*: Hobson, P.N., and C.S. Stewart (Eds). Rumen Microbial Ecosystem. London: Springer.

De Man, J.C., deM Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Microbiology. 23(1), 130–135.

Elder, R.O., J.E. Keen, G.R. Siragusa, G.A. Barkocy-Gallagher, M. Koohmaraie, and W.W. Laegreid. 2002. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(7), 2999–3003.

European Commission. 2002. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Criteria for Assessing the Safety of Microorganisms Resistant to Antibiotics of Human Clinical and Veterinary Importance. Accessed 15 May 2016, Available http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out64_en.pdf.

Gunal, M., G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan, and O. Sulak. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. International Journal of Poultry Science. 5(2), 149–155.

ISO 15214. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 degrees C. Accessed 15 May 2016, Available https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15214:ed-1:v1:en.

ISO 6887-1. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Accessed 14 May 2016, Available https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6887:-1:ed-1:v1:en.

Mathur, S. and R. Singh. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. International journal of food microbiology. 105(3), 281-295.

Nousiainen, J., and J. Setala. 1998**.** Lactic acid bacteria as animal probiotics. *In:* Salminen, S and A. von Wright (eds). Lactic Acid Bacteria. 2nd ed. New York: Mercel Dekker Inc.

Nyachuba, DG. 2010. Foodborne illness: Is it on the rise? Nutrition reviews. 68(5), 257-269.