รายงานการศึกษา

การตรวจหาแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญจาก สิ่งแวดล้อมบริเวณฟาร์มเลี้ยงสุกรและไก่

โดยองค์กรพิทักษ์สัตว์แห่งโลก
ร่วมกับ คณะเทคนิคการแพทย์และคณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

WORLD ANIMAL PROTECTION

สารบัญ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา 03

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 04

วัตถุประสงค์และขอบเขตการศึกษา 07

ผลการศึกษา 11

อภิปราย/วิจารณ์ผลการศึกษา 16

สรุปการค้นพบ 19

เอกสารอ้างอิง 20

รายชื่อคณะผู้จัดทำ

นายโชคดี สมิทธิ์กิตติผล
ศ. ดร. อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์
รศ. น.สพ. สรรเพชญ อังกิติตระกูล
อ. ดร. อาภาศิริ ศรีเศรษฐการ
น.ส. ชณกานต์ พรชู

เกี่ยวกับองค์กรพิทักษ์สัตว์แห่งโลก:

องค์กรพิทักษ์สัตว์แห่งโลก เป็นองค์กรระหว่างประเทศที่ขับเคลื่อนเรื่องสวัสดิภาพสัตว์ ภารกิจของเรา คือสร้างโลกที่ดีขึ้นให้กับสัตว์ พื้นที่ทำงานของเรามีตั้งแต่พื้นที่ประสบภัยพิบัติทางธรรมชาติ ไปจนถึงห้องประชุมของบริษัทเอกชนรายใหญ่ การต่อสู้ของเรามีเป้าหมาย เพื่อช่วยให้สัตว์ทุกตัว มีชีวิตที่ดีขึ้น

องค์กรพิทักษ์สัตว์แห่งโลก จดทะเบียนเป็นมูลนิธิกับ Charity Commission และจดทะเบียน เป็นบริษัท (จำกัด) กับ Companies House
องค์กรพิทักษ์สัตว์แห่งโลก อยู่ภายใต้การกำกับดูแล Articles of Association
เลขจดทะเบียนมูลนิธิ: 1081849 และ เลขจดทะเบียนบริษัท: 4029540
ซึ่งหน่วยงานทั้งสองแห่งตั้งอยู่ที่ 222 Gray's Inn Road, London WC1X (สหราชอาณาจักร)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อแบคทีเรียดื้อยาจัดเป็นปัญหาวิกฤตที่องค์การอนามัยโลกถือว่าเป็นภัยคุกคามที่ทุกภาคส่วนต้องร่วมมือ ช่วยกันจัดการแก้ไขอย่างเร่งด่วน ซึ่งแบคทีเรียดื้อยามีการพัฒนาตัวเองอย่างต่อเนื่อง ให้สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิดมากขึ้น ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ที่มีการผลิตและนำออกมาใช้ไม่นานกลับพบแบคทีเรียดื้อต่อยาดังกล่าวขึ้น ทำให้ผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายชนิดมีความเสี่ยงต่อการไม่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับการรักษา

เนื่องจากการผลิตยาใหม่แต่ละชนิดต้องใช้เวลาในการศึกษาทดสอบเป็นเวลานานหลายปี แต่เมื่อนำออกมาใช้ไม่นาน ยาบางชนิดใช้ได้ไม่ถึงปี ก็เกิดเชื้อดื้อยาขึ้น เป็นเช่นนี้ต่อเนื่องมานานนับสิบปี หนทางการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ จึงเริ่มตีบตัน แต่โรคติดเชื้อที่ดื้อยากลับมีมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ยาปฏิชีวนะนอกจากการใช้ในคนแล้ว ยังมีการใช้ในสัตว์และการเกษตรร่วมด้วย จึงมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับปัญหาเชื้อดื้อยา

ปัจจุบันความต้องการบริโภคเนื้อสัตว์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้กิจการฟาร์มเลี้ยงสัตว์ต้องเพิ่มจำนวนสัตว์ที่เลี้ยงให้มากขึ้นตามความต้องการของตลาด จนเกิดความแออัดในฟาร์มเลี้ยง จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากผู้เลี้ยงมักพบปัญหาสัตว์ป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคในระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ

เพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในการรักษาและป้องกันโรค ซึ่งมีทั้งชนิดกิน ผสมในอาหารและการฉีด การใช้ยาเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่องก่อให้เกิดการสะสมและตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์ และสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมหรือมากเกินความจำเป็น ทั้งในคน สัตว์และการเกษตร จึงเป็นสาเหตุสำคัญให้เกิดปัญหาเชื้อที่ดื้อยาในปัจจุบัน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญจากสิ่งแวดล้อมบริเวณฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อรณรงค์การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเหมาะสมในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ และกระตุ้นให้ลดการบริโภคเนื้อสัตว์ให้น้อยลง

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณมากในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ต่าง ๆ ทั่วโลก มีรายงานประเทศที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงสัตว์มากที่สุดในโลกคือ ประเทศจีน รองลงมาคือ สหรัฐอเมริกา บราซิล อินเดีย และเยอรมนี[1] ใน ปีค.ศ. 2010 ประเทศจีนใช้ยาปฏิชีวนะถึงร้อยละ 30 ของยาที่ผลิตออกมา[2] ในปีค.ศ. 2015 ในกลุ่มประเทศทางซีกโลกตะวันตกที่มีการใช้ยามากที่สุดคือสหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศสและอิตาลี ส่วนประเทศทางตะวันออกที่ใช้ยา มากที่สุดคือ อินเดีย จีนและปากีสถาน โดยมีการใช้ยาเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 65 ในช่วงปีค.ศ. 2000 – 2015[3]

ยาปฏิชีวนะที่ใช้มากในฟาร์มต่าง ๆ มีดังนี้[4]

การเกษตร ได้แก่ยา

Oxytetracycline, streptomycin, penicillin, oxolinic acid, gentamycin

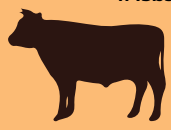
ฟาร์มสุกร ได้แก่ยา

Benzylpenicillins และ tetracycline (ใช้บ่อยที่สุด), sulfadimidine, sulfathiazole และ trimethoprim, bacitracin, lincosamides, macrolides, floroquinolones, 3 rd generation cephalosporins, colistin

ฟาร์มไก่ ได้แก่ยา

Bacitracin, chlortetracycline, decoquinate, diclazuril, naracin, nicarbazin, monensin, penicillin, rebenedine hydrochloride, virginiamycin, colistin, tylosin, doxycycline, tiamulin, roxithromycin, amikacin

ฟาร์มวัว ได้แก่ยา



Penicillin, tetracycline, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin, enrofloxacin, and tulathromycin, phenicol, lincosamide, pleuromutilin, macrolide, polypeptide, streptogramin, carbadox, bambermycin

ในอดีต ยาที่ใช้มากที่สุดในการเกษตรคือ streptomycin โดยใช้ในการป้องกันรักษาโรคพืช ต่อมาพบว่า การรักษาโรคพืชด้วย streptomycin ไม่ได้ผลดีเช่นเดิม เนื่องจากมีเชื้อหลายชนิดที่ดื้อต่อยานี้[5] ช่วงปลาย ค.ศ. 1940s จึงเริ่มมีการใช้ amikacin ซึ่งเป็นยากลุ่ม aminoglycoside เช่นเดียวกับ streptomycin และมีการใช้ amikacin ร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นเพื่อให้ได้ผลที่ดียิ่งขึ้น และลดการเกิดเชื้อดื้อยา แต่ต่อมาพบเชื้อแบคทีเรียสามารถทนต่อยา amikacin ได้ โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ออกมาดัดแปลงโครงสร้างของยา[6]

ในช่วงค.ศ. 1950's มีการใช้ยา tetracyclines บ่อยมากขึ้นอีกชนิดหนึ่ง เพื่อช่วยในการควบคุมแบคทีเรียทั้ง แกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงจุลชีพชนิดอื่น ๆ ทำให้ฟาร์มสุกรและโคมีผลผลิตที่ดีขึ้นมาก[7]

แต่ในปีค.ศ. 1953 เริ่มพบเชื้อ Shigella dysenteriae[8] ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค dysentery ดื้อยา tetracycline ต่อมา พบแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ดื้อต่อยา tetracycline ได้แก่ E.coli, Enterococcus, Staphylococcus, Streptococcus ฯลฯ[7-9] สำหรับเชื้อ methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) พบอุบัติขึ้นในคนในปีค.ศ. 1961 หลังจากมีการใช้ยา methicillin ไม่นาน การดื้อยา methicillin[10] ในเชื้อ S. aureus ส่งผลให้เชื้อดื้อยา β- lactam ชนิดอื่น ๆ ด้วย ต่อมาช่วงปี 1980s มีการระบาดของ MRSA อย่างหนักในโรงพยาบาลทั่วโลก และต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน

ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อดื้อยาหลายชนิดในโรงพยาบาล และมีการใช้ยา vancomycin มากขึ้นสำหรับรักษาโรคติดเชื้อ MRSA และได้พบเชื้อ MRSA ที่ดื้อยา vancomycin ตามมา ซึ่งต่อมามีรายงานพบ MRSA ในปศุสัตว์ เช่น ในสุกร[11,12] และมีการพบ MRSA สายพันธุ์ของสุกรในคนด้วย[13,14] แสดงถึงการส่งต่อเชื้อระหว่างคนและสัตว์

การเลี้ยงสุกร และ ไก่ ในประเทศไทยในปัจจุบันถือว่าเป็นการเลี้ยงที่มุ่งเน้นในเชิงธุรกิจ โดยระบบการเลี้ยงที่ถือสัดส่วนมากที่สุดเป็นระบบแบบอุตสาหกรรม สวัสดิภาพสัตว์มักไม่ถูกคำนึงถึงมากนักในการเลี้ยงเช่นนี้ คือมีการเลี้ยงอย่างแออัดในพื้นที่จำกัด ขาดปัจจัยที่ทำให้สัตว์ได้แสดงออกพฤติกรรมตามธรรมชาติ ลูกหมูถูกหย่านมเร็ว มีการตัดตอนอวัยวะโดยปราศจากการบรรเทาความเจ็บปวด ไก่ในระบบอุตสาหกรรมเป็นเป็นสายพันธุ์โตเร็วและตัวโตเกินปกติ ไม่มีโอกาสได้เห็นแสงธรรมชาติ เป็นต้น สิ่งแวดล้อมและการปฏิบัติเหล่านี้ทำให้สัตว์มีความเจ็บปวดทั้งทางร่างกายและจิตใจ ส่งผลให้ง่ายต่อการเจ็บป่วยที่แพร่ต่อตัวอื่นได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการเลี้ยงรวมกันเป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นยังมีการใช้วัตถุดิบที่หลากหลายเพื่อผสมเป็นอาหารสูตรต่างๆ รวมทั้งการใช้ยา และสารเสริมอย่างกว้างขวาง[15] ทั้งนี้เพื่อให้สัตว์เหล่านี้อยู่รอดในระบบฟาร์มอุตสาหกรรม

มีการใช้ยาปฏิชีวนะ

เพิ่มขึ้นถึง ร้อยละ 65

ในช่วงปีค.ศ. 2000 – 2015

2010

ประเทศที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงสัตว์มากที่สุดในโลก คือ ประเทศจีน ใช้ยาปฏิชีวนะถึงร้อยละ 30 ของยาที่ผลิตออกมา

ในกลุ่มประเทศทางซีกโลกตะวันออก ที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ อินเดีย จีน และปากีสถาน

ในกลุ่มประเทศทางซีกโลกตะวันตก ที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส และอิตาลี

ในช่วง

20

ปีที่ผ่านมา

เกิดเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิด ในเชื้อกลุ่ม Enterobacterales โดยเชื้อกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่เป็นเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม และเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์

ยาต้านจุลชีพหรือยาปฏิชีวนะ เป็นยาที่มีคุณประโยชน์อย่างยิ่งที่ใช้ในการรักษาโรคทั้งในคน สัตว์ และพืช เมื่อมีการใช้ยาอย่างมากในวงการปศุสัตว์และการเกษตรมานานหลายปี โดยไม่มีการควบคุมยาที่หลงเหลือจากการใช้ มีการตกค้างสะสมทั้งในสิ่งแวดล้อมของคน และในปศุสัตว์ มีทั้งยา และเชื้อที่มียีนดื้อยาส่งผลกระทบและปนเปื้อนไปในสิ่งแวดล้อม[16]

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาเกิดเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิด (multidrug-resistant) ในเชื้อกลุ่ม Enterobacterales โดยเชื้อกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่เป็นเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม และเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์ เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เชื้อมีการกลายพันธุ์ เป็นเชื้อที่ทนต่อยานั้น ๆ ได้ และมีการเพิ่มจำนวนเชื้อแพร่กระจายมากขึ้น เกิดสายพันธุ์ที่พัฒนา การดื้อยารุ่นใหม่ ๆ โดยการผลิตเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) ซึ่งควบคุมด้วยยีนที่สามารถถ่ายทอดไปสู่เชื้อชนิดอื่น ข้ามจีนัสสปีชีส์ได้ จึงเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาอย่างรวดเร็ว เป็นความท้าทายอย่างมากต่อการควบคุมและรักษาการติดเชื้อเหล่านี้ มีรายงานพบการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะจำนวนมากในแหล่งน้ำสาธารณะ และพบเชื้อดื้อยาและยีนดื้อยาในตัวอย่างจากน้ำเสีย[17,18]

จากรายงานการศึกษาในแหล่งน้ำบริเวณฟาร์มเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยที่ จังหวัดปราจีนบุรี พบว่ายาปฏิชีวนะที่พบตกค้างมากในช่วงฤดูฝน ตามลำดับคือ amoxycillin, florfenicol และ tiamulin และยาปฏิชีวนะที่พบตกค้างมากในช่วงฤดูร้อน ตามลำดับคือ oxytetracycline, amoxycillin และ florfenicol และพบปริมาณตกค้างของ trimethroprim ในฤดูฝนมากกว่าฤดูร้อน ส่วนเชื้อดื้อยาพบ *E. coli* จากมูลสุกร น้ำเสียและน้ำผ่านการบำบัด ยาที่เชื้อดื้อมากกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ ampicillin, florfenicol และ tetracycline และพบ *E. coli* ที่ผลิต ESBL ร้อยละ 13 แต่ไม่พบการดื้อยา imipenem และไม่พบยีนดื้อยา colistin (*mcr1*)[18]

วัตถุประสงค์และขอบเขตการศึกษา

ตรวจหาเชื้อ *Escherichai coli, Klebsiella, Salmonella* และ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพ จากตัวอย่างน้ำและดินบริเวณต้นและท้ายฟาร์มเลี้ยงสุกรและไก่ในจังหวัดนครราชสีมา ฉะเชิงเทรา และนครปฐม

วิธีการศึกษา

1. วัสดุและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ได้แก่ Blood agar (BA), MacConkey agar (Mac), SS agar, Mannital salt agar (MSA), Mueller Hinton agar (MHA), EC broth, GN broth, Mannital salt broth (MSB) (Oxoid, Hampshire, England), ชุดทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย ได้แก่ Triple sugar iron (TSI), Lysine iron agar, Motility test, Indole, Citrate, oxidase, PRmannitol, coagulase

2. แผ่นสารต้านจุลชีพ

สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ ampicillin amikacin, amoxy-clavulanate, cefazolin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline, และ colistin (Oxoid, Hampshire, England) แบคทีเรียแกรมบวก คือ S. aureus ได้แก่ cefoxitin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, linezolid, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline, และ vancomycin (E-test strip)

3. สารเคมีและวัสดุสำหรับทำ PCR

ได้แก่ oligonucleotide primers, Taq DNA Polymerase, dNTPs, agarose, DNA ladder, หลอด PCR, EtB “out” Nucleic Acid Staining Solution, autopipette และ tips

2. วิธีทำ

2.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและดิน จากบริเวณต้นฟาร์มและปลายฟาร์มสุกรและไก่ ในจังหวัดนครราชสีมา ฉะเชิงเทราและนครปฐม โดยก่อนเดินทางไปเก็บตัวอย่าง ได้มีการประสานกับเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ในพื้นที่ และแจ้งขออนุญาตจากฟาร์มในบริเวณนั้น

ตัวอย่างน้ำจากแต่ละที่เก็บปริมาณประมาณ 600 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกที่แห้ง ส่วนดินตักประมาณ 1 - 2 ทัพพี ใส่ในถุงซิปล็อค และมีถุงครอบรองเท้าทั้ง 2 ข้าง ขณะเดินเก็บตัวอย่าง นำใส่ในถุงซิปล็อค ตัวอย่างทั้งหมดนำใส่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งแช่เย็น ขณะที่เดินทางนำมาส่งที่ห้องเพาะเชื้อ (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 ตัวอย่างสถานที่ที่ไปเก็บน้ำและตะกอนดินจากบริเวณรอบนอกฟาร์มสุกร

2.2 การเพาะเชื้อ

2.2.1 การเพาะเชื้อในอาหารส่งเสริมการเจริญ และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญ โดยใช้อาหาร EC broth, GN broth, Mannitol salt broth สำหรับส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *E. coli Klebsiella, Salmonella* และ *S. aureus* ตามลำดับ (รูปที่ 2A) อบอาหารเหลวทั้ง 3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อมาเพาะในอาหารแข็ง MacConkey agar, SS agar และ MSA ตามลำดับ (รูปที่ 2B) อบจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ได้โคโลนีสำหรับการทดสอบต่อไป

รูปที่ 2 การเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในขั้นตอนส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่ต้องการ (A) และ การเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์สำหรับการใช้โคโลนีเดี่ยว ๆ ไปทดสอบต่อไป (B)

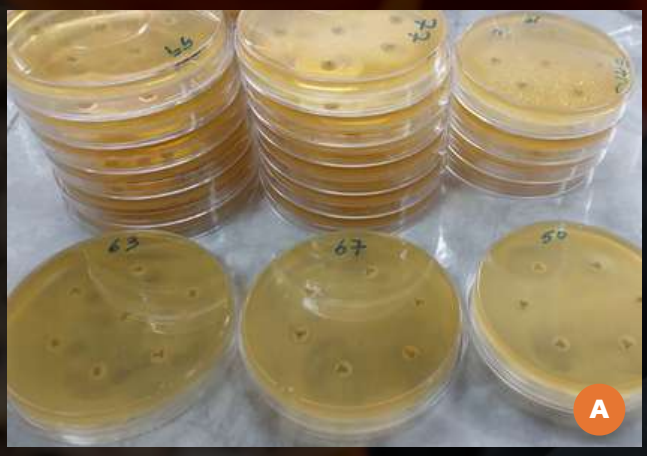
2.2.2 การทดสอบชีวเคมี เพื่อพิสูจน์ชนิดของเชื้อ

สังเกตโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เลือกลักษณะโคโลนีแต่ละแบบมาทดสอบชีวเคมี อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และอ่านผลเพื่อระบุจีนัส สปีชีส์ของเชื้อนั้น (รูปที่ 3)

รูปที่ 3 ตัวอย่างการทดสอบชีวเคมีเพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากน้ำและดิน

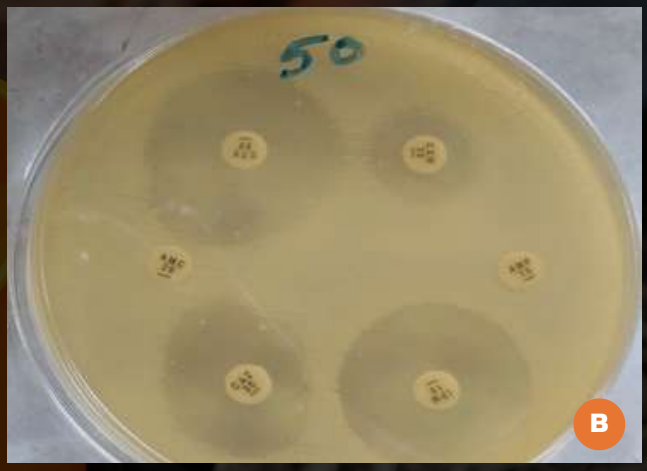
2.2.3 การทดสอบความไวต่อยาวิธี disk diffusion

คัดเลือกเชื้อที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเชื้อกลุ่มเป้าหมาย คือ *E. coli, Klebsiella, Salmonella, S. aureus* มาทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disk diffusion และทดสอบการผลิตเอนไซม์ Extended spectrum β-lactamase (ESBL) ด้วยวิธี double disk synergy test โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard แล้วใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อมาเพาะในอาหาร MHA ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน วางไว้ประมาณ 5-10 นาที ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง วาง disk ยาจานละไม่เกิน 6 disk อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (รูปที่ 4A)



รูปที่ 4A ตัวอย่างการทดสอบความไวต่อยาวิธี disk diffusion

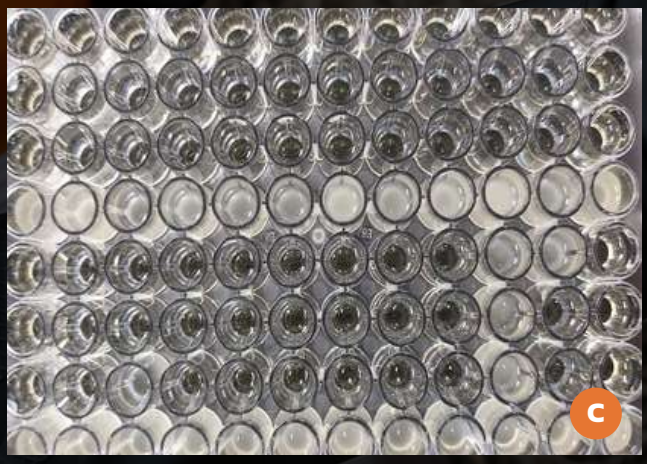
แล้วแปลผลตามคู่มือของ CLSI เป็น S, I, R (S คือ susceptible, I คือ intermediate susceptible และ R คือ resistant) การทดสอบ double disk synergy test ทำโดยวาง disk ceftazidime และ cefotaxime ไว้ข้าง disk augmentin โดยให้มีระยะห่างประมาณ 15 - 20 มิลลิเมตร หลังอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ้า ESBL บวก สังเกต inhibition zone มีขนาดใหญ่ขึ้นบริเวณที่ยา ceftazidime และ/หรือ cefotaxime ด้านที่ติดกับยา augmentin (รูปที่ 4B)



รูปที่ 4B ผล ESBL บวก

ยาที่ใช้ทดสอบได้แก่ AMP (ampicillin), AMC (amoxy-clavulanate, augmentin), AK (amikacin), CAZ (ceftazidime), CTX (cefotaxime), CXM (cefuroxime), CIP (ciprofloxacin), FEP (cefepime), GN (gentamicin), IPM (imipenem), KZ (cefazolin), SXT (co-trimoxazole), TE (tetracycline)

สำหรับยา colistin ทดสอบด้วยวิธี broth disk micro elution โดยเพาะเชื้อในอาหารเหลว MHB ที่ไม่มี และมียา colistin 2 และ 4 µg/ml อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลหากมีเชื้อเจริญที่ 2 และ/หรือ 4 µg/ml แปลผลเป็นดื้อ หากไม่เจริญทั้ง 2 และ 4 µg/ml แปลผลเป็นไวปานกลาง (รูปที่ 4C)



รูปที่ 4C colistin broth disk micro elution

3. การทดสอบหายีนดื้อยา

3.1 การตรวจยีน *nuc* หรือ *mecA*

สกัดดีเอ็นเอจากโคโลนีของเชื้อด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) นำมาทดสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ และส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับวิธี PCR ที่ใช้ในการศึกษานี้

Pathogens	Target genes	Primer names	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	References
S. aureus	*nuc*	nuc-F1	GCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAG AAG	24
		nuc-R1	ACATTAATTTAACCGTATCACCATCAATC GCT	
methicilliin-resistant gene	*mecA*	mecA-F	TGCTATCCACC CTCAAACAGG	25
		mecA-R	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	
Colistin-resistance gene	*mcr-1*	CLR F	CGGTCAGTCCGTTTGTTCC	
		CLR R	TTGGTCGGTCTGTAGGG	26
ESBL	bla_{SHV}	S4	TCAGCGAAAAACACCTTG	
		S5	TCCCGCAGATAAATCACCA	27
	$bla_{CTX-M-1-like}$	P1	GCGATGTGCAGCACCAGTAA	
		P2	GGTTGAGGCTGGGTGAAGTA	28, 29
	bla_{VER}	VEBF	CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC	30
		VEBR	GGA CTC TGC AAC AAA TAC GC	

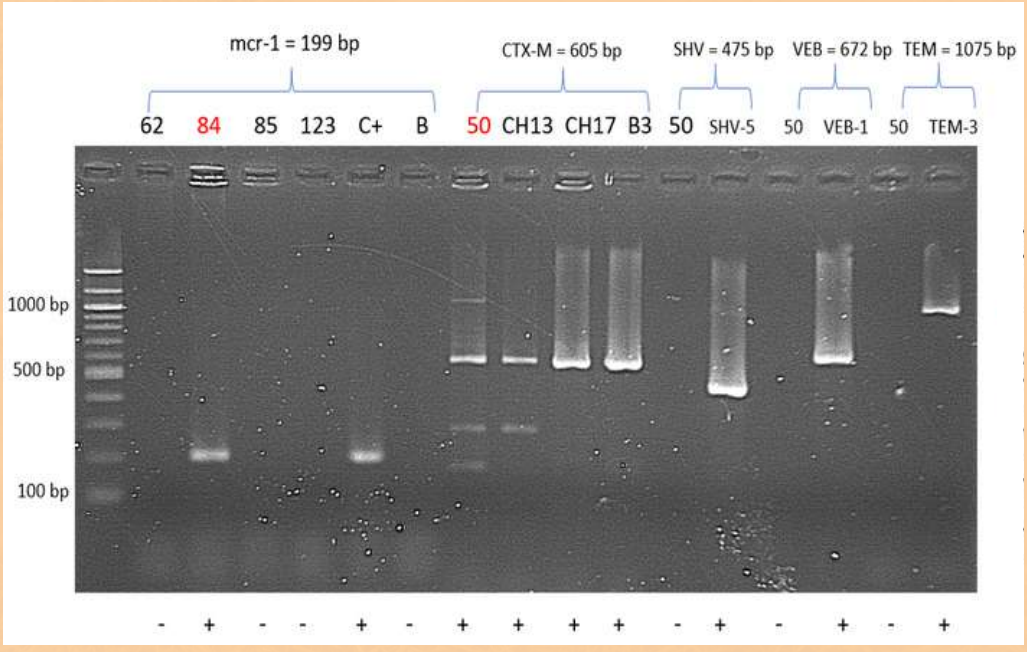
ผลการศึกษา

ตอนที่ 1 ผลการเพาะเชื้อ

ในการศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างน้ำและดินบริเวณต้นและปลายฟาร์มเลี้ยงสุกรและไก่ใน 3 จังหวัดคือนครราชสีมา ฉะเชิงเทรา และนครปฐม รวมเก็บตัวอย่างจากฟาร์มสุกร 8 แห่ง ฟาร์มไก่ 5 แห่ง ทำการเพาะหาเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญ 4 ชนิดคือ *E. coli, Klebsiella, Salmonella* และ *S. aureus* และทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อเหล่านี้ จากลักษณะโคโลนีที่เจริญแตกต่างกัน ได้คัดเลือกมาทดสอบวินิจฉัยชนิดของเชื้อจำนวน 149 โคโลนี **ผลการศึกษาพบเชื้อ *E. coli, Klebsiella* จากดินและน้ำจากทุกฟาร์ม แต่ไม่พบ *Salmonella* และ *S. aureus*** โดยพบเป็น *E. coli* จำนวน 40 ตัวอย่าง *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella* spp. และ *Klebsiella oxytoca* จำนวน 28, 5 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ตัวอย่าง booties ที่เพาะไม่พบเชื้อ *S. aureus* เมื่อตรวจยีน nuc ซึ่งจำเพาะของสปีชีส์ *S. aureus* ด้วยวิธี PCR ไม่พบยีนดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้แก่ Proteus mirabilis, Pseudomonas spp., Aeromonas spp., Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Enterobacter spp., Morganella morganii, Edwardsiella tarda, Micrococcus spp., Bacillus spp., Staphylococcus coagaluse negative เชื้อเหล่านี้บางชนิด เช่น Citrobacter, Enterobacter, Proteus มีธรรมชาติดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิด จึงไม่ได้ทดสอบความไวต่อยา

ผลการเพาะเชื้อจากน้ำและดินบริเวณต้นและปลายฟาร์มสุกรและไก่จาก 3 จังหวัด พบเชื้อมีความไว และดื้อต่อยาคล้ายกัน โดยส่วนใหญ่ดื้อต่อยา ampicillin และ amoxy-clavulanate รองลงมาคือยา tetracycline, co-trimoxazole, gentamicin และ amikacin (ตารางที่ 3) จากเชื้อที่ทดสอบความไวต่อยาทั้งหมด 74 ตัวอย่าง พบเชื้อที่ดื้อยา ampicillin, amoxy-clavulanate, tetracycline, gentamicin, co-trimoxazole, cefazolin และ colistin จำนวน 52, 25, 12, 5, 4, 3 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ

ผลการตรวจเอนไซม์ Extended spectrum β-lactamase (ESBL) ด้วย double disk synergy test พบผลบวก 1 ตัวอย่าง เป็น E. coli จากน้ำจากปลายฟาร์มสุกร ตรวจชนิดของยีน ESBL ด้วยวิธี PCR พบว่าเป็นชนิด CTX-M (รูปที่ 5) ผลการทดสอบยา colistin พบว่ามีเชื้อส่วนใหญ่มีความไวปานกลาง และพบเชื้อที่ดื้อ 2 ตัวอย่าง เป็น E. coli จากน้ำจากต้นฟาร์มสุกร 1 ตัวอย่าง และดินจากปลายฟาร์มสุกร 1 ตัวอย่าง ตรวจยีน mcr-1 จากตัวอย่างทั้ง 2 พบมียีน mcr-1 เพียง 1 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากดินต้นฟาร์มสุกร ส่วนตัวอย่างเชื้อที่ไวปานกลาง ได้สุ่มมาตรวจหายีน mcr-1 จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าได้ลบทั้งหมด



การอ่านผล

การตรวจหายีน mcr-1

- Unk 62, 85, 123: negative
- Unk 84: positive

BSBL genes

การตรวจหายีน CTX-M

- Unk 50: negative

การตรวจหายีน SHV

- Unk 50: negative

การตรวจหายีน VEB

- Unk 50: negative

การตรวจหายีน TEM

- Unk 50: negative

รูปที่ 5 ผลการตรวจหายีนดื้อยาชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR และตรวจ PCR product ด้วยการแยกใน gel electrophoresis ที่ผสมสี EtB "Out" ตรวจดูการเรืองแสงด้วยเครื่อง Gel Documentation

ตารางที่ 2 ผลการเพาะเชื้อหาแบคทีเรียที่สำคัญและความไวต่อยาปฏิชีวนะจากฟาร์ม 13 แห่งใน 3 จังหวัด

ผลการเพาะเชื้อหาแบคทีเรียที่สำคัญและความไวต่อยาปฏิชีวนะจากฟาร์ม
จังหวัด นครราชสีมา

นครราชสีมา	ผลการทดสอบความไวต่อยา													
ต้นฟาร์มสุกรและนาข้าว (3 ฟาร์ม)	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 1น	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	I
E. coli 3น	S	S	I	S	S	S	I	S	I	S	I	S	S	I
E. coli 5น	R	R	I	S	S	S	I	S	I	S	I	S	R	I
E. coli 6ด	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K. pneumoniae 2น	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
K. pneumoniae 7ด	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
Klebsiella spp. 20ด	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Klebsiella spp. 21ด	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	6/8	6/8							1/8				1/8	
ปลายฟาร์มสุกร	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 10น	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 14น	R	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
E. coli 15ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Klebsiella spp. 11น	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Klebsiella spp. 16น	R	R	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	I
Klebsiella spp. 19ด	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	4/6	3/6	1/6											
ต้นฟาร์มไก่ (2 ฟาร์ม)	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 26น	I	I	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I
E. coli 31ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K.pneumoniae 25น	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K. pneumoniae*32ด	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	2/4	2/4							1/4					
ปลายฟาร์มไก่	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 37น	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 42ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K.pneumoniae 38น	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K.pneumoniae 43ด	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	2/4	2/4												

AMP, ampicillin; AMC, amoxy-clavulanate, augmentin; AK, amikacin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; CIP; ciprofloxacin; FEP, cefepime; GN; gentamicin; IPM, imipenem; KZ, cefazolin; SXT, co-trimoxazole; TE, tetracycline; CL, colistin หมายเลข, ลำดับตัวอย่างเชื้อ; น, น้ำ; ด, ดิน

ตารางที่ 2 ผลการเพาะเชื้อหาแบคทีเรียที่สำคัญและความไวต่อยาปฏิชีวนะจากฟาร์ม 13 แห่งใน 3 จังหวัด

ผลการเพาะเชื้อหาแบคทีเรียที่สำคัญและความไวต่อยาปฏิชีวนะจากฟาร์ม
จังหวัด ฉะเชิงเทรา

ฉะเชิงเทรา	ผลการทดสอบความไวต่อยา													
ต้นฟาร์มสุกร (2 ฟาร์ม)	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 44น	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	R	I
E. coli 47น	R	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
E. coli 59ด	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 60ด	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K.pneumoniae 48ด	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	4/5	3/5											1/5	
ปลายฟาร์มสุกร	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 50น* (ESBL+)	R	R	I	R	R	R	I	S	I	S	R	R	R	I
E. coli 62น	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	R
E. coli 55ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 63ด	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	I
K.pneumoniae 51น	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K.pneumoniae 56ด	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K.pneumoniae 64ด	R	R	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	R	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	5/7	5/7		1/7	1/7	1/7					1/7	1/7	1/7	1/7
ต้นฟาร์มไก่ (1 ฟาร์ม)	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 67น	R	R	S	S	S	S	I	S	R	S	S	R	R	I
E. coli 71ด	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
K.pneumoniae 68น	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K. pneumoniae*72ด	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	4/4	3/4							1/4			1/4	2/4	
ปลายฟาร์มไก่	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
K.pneumoniae 75น	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 77ด	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	1/2	1/2												

AMP, ampicillin; AMC, amoxy-clavulanate, augmentin; AK, amikacin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; CIP; ciprofloxacin; FEP, cefepime; GN; gentamicin; IPM, imipenem; KZ, cefazolin; SXT, co-trimoxazole; TE, tetracycline; CL, colistin หมายเลข, ลำดับตัวอย่างเชื้อ; น, น้ำ; ด, ดิน; * ESBL+ เป็น CTX-M type

ตารางที่ 2 ผลการเพาะเชื้อหาแบคทีเรียที่สำคัญและความไวต่อยาปฏิชีวนะจากฟาร์ม 13 แห่งใน 3 จังหวัด

ผลการเพาะเชื้อหาแบคทีเรียที่สำคัญและความไวต่อยาปฏิชีวนะจากฟาร์ม
จังหวัด นครปฐม

นครปฐม	ผลการทดสอบความไวต่อยา													
ต้นฟาร์มสุกร (3 ฟาร์ม)	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 83ด	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I
E. coli 84ด	R	I	S	S	S	S	I	S	I	S	S	R	R	R**
E. coli 86ด	R	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I
E. coli 100น	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 102น	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
E. coli 104ด	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
K.pneumoniae 79น	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K. pneumoniae 85ด	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
K. pneumoniae 99น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*106ด	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	7/10						1/10				2/10	1/10	1/10	1/10
ปลายฟาร์มสุกร	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 88น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	I
E. coli 94ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 107น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I
E. coli 108น	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 113ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*Kpneumoniae*90น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*Kpneumoniae*95ด	R	S	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*109น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*114ด	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	6/9											1/9	2/9	
ต้นฟาร์มไก่ (2 ฟาร์ม)	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 118น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
E. coli 123ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 136น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
E. coli 139ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*119น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*124ด	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*134น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*140ด	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	6/8												1/8	
ปลายฟาร์มไก่	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
E. coli 126น	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R	I
E. coli 131ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
E. coli 147ด	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*127น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*132ด	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
*K.pneumoniae*144น	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
K. oxytoca 148ด	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
รวมสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ดื้อยา	5/7								1/7				2/7	

AMP, ampicillin; AMC, amoxy-clavulanate, augmentin; AK, amikacin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; CIP; ciprofloxacin; FEP, cefepime; GN; gentamicin; IPM, imipenem; KZ, cefazolin; SXT, co-trimoxazole; TE, tetracycline; CL, colistin หมายเลข, ลำดับตัวอย่างเชื้อ; น, น้ำ; ด, ดิน; ** พบยีน *mcr-1*

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจากฟาร์ม 13 แห่งใน 3 จังหวัด

	จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา													
ฟาร์มสุกร (8 ฟาร์ม)	AMP	AMC	AK	CAZ	CTX	CXM	CIP	FEP	GN	IPM	KZ	SXT	TE	CL
ต้นฟาร์ม (n=23)														
E. coli น้ำ (7)	5	3							1				2	
E. coli ดิน (7)	3	1					1				1	1	1	1
Klebsiella น้ำ (3)	3	1												
Klebsiella ดิน (6)	6	4												
รวม = 23	17	9					1		1		1	1	3	1
ปลายฟาร์ม (n=22)														
E. coli น้ำ (7)	4	1	1	1	1	1					2	2	3	1
E. coli ดิน (5)	1	1											1	
Klebsiella น้ำ (5)	5	3												
Klebsiella ดิน (5)	5	3							1				1	
รวม = 22	15	8	1	1	1	1			1		2	2	4	1
ฟาร์มไก่ (5 ฟาร์ม)														
ต้นฟาร์ม (n=16)														
E. coli น้ำ (4)	3	1							2			1	2	
E. coli ดิน (4)	1	1											1	
Klebsiella น้ำ (4)	4	2												
Klebsiella ดิน (4)	4	1												
รวม = 16	12	5							2			1	3	
ปลายฟาร์ม (n=13)														
E. coli น้ำ (2)	1								1				1	
E. coli ดิน (4)														
Klebsiella น้ำ (4)	4	2												
Klebsiella ดิน (3)	3	1											1	
รวม = 13	8	3							1				2	

AMP, ampicillin; AMC, amoxy-clavulanate, augmentin; AK, amikacin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; CIP; ciprofloxacin; FEP, cefepime; GN; gentamicin; IPM, imipenem; KZ, cefazolin; SXT, co-trimoxazole; TE, tetracycline; CL, colistin

หมายเลข, ลำดับตัวอย่างเชื้อ; น, น้ำ; ด, ดิน

อภิปราย/วิจารณ์ผลการศึกษา

ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมากในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ทั้งการรักษาและป้องกันโรค รวมถึงผสมในอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต[3,16] การใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินจำเป็น ทำให้มียาตกค้างในสิ่งแวดล้อม[18-20] ในน้ำนมและเนื้อสัตว์[31,32] และทำให้เกิดสภาวะบีบคั้นให้แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมนั้น เกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อยานั้นได้มากขึ้น และยังทำให้เกิดการคัดเลือกเชื้อที่ดื้อยาให้คงอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มียานั้น ๆ ต่อไป[4,6]

ซึ่งปัจจุบันมีประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะเงื่อนไขของอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่ห้ามผลิต นำเข้า ขาย และใช้ พ.ศ.2561 เป็นกฎหมายเพื่อกำกับดูแลอาหารสัตว์ที่ผสมยา (Medicated feed) ภายใต้พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ซึ่งรับผิดชอบโดยกองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ เพื่อควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ ให้เป็นไปอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการที่เป็นมาตรฐานสากล มีการใช้ยาอย่างสมเหตุผลเท่าที่จำเป็นเท่านั้น เนื่องจากหากคนบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้าง จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยา

โดยกรมปศุสัตว์ได้ออกประกาศกรมปศุสัตว์จำนวน 6 ฉบับ กำหนดให้ผู้รับใบอนุญาตผลิตอาหารสัตว์ จะทำการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยาได้ ต้องจดแจ้งต่อกรมปศุสัตว์ อีกทั้งต้องเป็นโรงงานที่ได้รับการรับรอง GMP (Good Manufacturing Practice) มีสัตวแพทย์ที่เป็นผู้ประกอบวิชาชีพการสัตวแพทย์ชั้นหนึ่ง และต้องได้รับการฝึกอบรมหลักสูตรที่เกี่ยวกับอาหารสัตว์ที่ผสมยา จากกรมปศุสัตว์เป็นผู้ดูแล เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้ปลอดภัยจากยาตกค้างในผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ เพื่อป้องกันภาวะดื้อยาปฏิชีวนะในคน ซึ่งส่งผลให้เมื่อเจ็บป่วยด้วยโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียดื้อยา จะหายาเพื่อใช้รักษาได้ยาก และการรักษาให้หายก็ยากด้วยเช่นกัน ซึ่งกรมปศุสัตว์มีเป้าหมายลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับสัตว์ลงร้อยละ 30 ในปีพ.ศ. 2564 ตามแผนยุทธศาสตร์ว่าด้วยการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทยในภาคการเกษตรและการเลี้ยงสัตว์[33]

การศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างน้ำและดิน จากบริเวณฟาร์มสุกรและไก่ใน 3 จังหวัด เพื่อเพาะเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญ 4 ชนิดคือ *E. coli, Klebsiella, Salmonella และ S. aureus* จากตัวอย่างที่เก็บบริเวณฟาร์มจำนวน 13 ฟาร์ม เพาะหาเชื้อโดยใช้อาหารเพาะเชื้อเหลวที่ส่งเสริมการเจริญเฉพาะกลุ่มเชื้อ ผลปรากฏว่า ไม่พบ *Salmonella* และ *S. aureus* อาจเป็นไปได้ว่า น้ำและดิน ไม่ใช่แหล่งที่เชื้อทั้งสองชนิดนี้จะอยู่ได้อย่างถาวร โดยปกติมักตรวจพบเชื้อ *Salmonella* และ *S. aureus* จากสิ่งมีชีวิตเช่น คนและสัตว์ มากกว่าในสิ่งแวดล้อม[34,35]

ส่วน *E. coli* และ *Klebsiella* พบจากทั้งน้ำและดิน โดยเชื้อที่พบจากทั้งต้นและปลายฟาร์ม ส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบ ยาที่พบเชื้อดื้อมากที่สุดคือ ampicillin ซึ่งสำหรับ Klebsiella pneumoniae มีธรรมชาติที่ดื้อยา ampicillin มาแต่กำเนิดอยู่แล้ว ส่วนยาที่พบเชื้อดื้อมากรองลงมาคือ amoxy-clavulanate และ tetracycline ซึ่งเป็นยากลุ่มที่ใช้ในฟาร์มสัตว์[4]

ในการศึกษานี้ตรวจพบยีนดื้อยา 2 ชนิด คือพบ *E. coli* ที่ผลิต ESBL ชนิด CTX-M ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อดื้อยากลุ่ม cephalosporins ทั้งรุ่น 1, 2 และ 3 และพบ *E. coli* ที่มียีน *mcr-1* ซึ่งทำให้เชื้อดื้อยา colistin อย่างไรก็ตามยังพบ *E. coli* อีก 1 ตัวอย่างที่ดื้อยา colistin แต่ตรวจไม่พบยีน *mcr-1* ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อดื้อยานี้ด้วยกลไกอื่น เช่น มีการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา หรือมีการ กลายพันธุ์ของยีนในโครโมโซม ทำให้เกิดการดัดแปลงโครงสร้างของ lipidA ในผนังเซลล์ส่วน lipopolysaccharide ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ยาออกฤทธิ์ ทำให้ยาไม่สามารถทำลายเชื้อได้[36,37] หรือเชื้ออาจมียีน *mcr* อื่น ๆ[38,39] - เช่น *mcr-2* ซึ่งพบไม่บ่อยเท่า *mcr-1* สำหรับยีน *mcr* ในประเทศไทยที่มีรายงาน ส่วนใหญ่พบเป็น *mcr-1* ชนิดอื่นที่พบบ้างได้แก่ *mcr-2, mcr-3*[40,41] สำหรับในสัตว์มีรายงานพบ *mcr-1, mcr-7, mcr-8* ใน *Klebsiella* จากสุกร[42]

สำหรับเอนไซม์ ESBL ชนิดที่พบมากในไทยมีการเปลี่ยนแปลงตามกาลเวลา ในอดีตพบชนิด TEM, SHV มาก ต่อมาพบเป็นชนิด OXA, CTX-M ซึ่ง CTX-M ที่มีรายงานพบในประเทศไทยได้แก่ CTX-M-1, CTX-M-943 ส่วนชนิดที่พบในสัตว์มีรายงานพบมากเป็นชนิด CTX-M-55[44,45] **ในการศึกษานี้พบเชื้อที่มียีนดื้อยาสำคัญ 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมดที่แยกได้ 74 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug resistant) 1 ตัวอย่าง และพบเชื้อดื้อยา ampicillin มากที่สุด** คล้ายกับรายงานการศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสัตว์และดินในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ในประเทศจีนที่พบว่า เชื้อทุกตัวอย่างดื้อต่อยา amoxicillin, colistin, doxycycline และ oxytetracycline และพบว่าเชื้อจากมูลสัตว์มีอัตราดื้อยาสูงกว่าเชื้อจากดิน และพบว่าเชื้อมากกว่าร้อยละ 70 ดื้อต่อยาหลายชนิด[46]

การศึกษาในประเทศไทยมีรายงานการวิจัยในปีพ.ศ. 2564 ศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกร มีอัตราดื้อยาร้อยละ 29 และยาที่พบเชื้อดื้อมากที่สุด โดยพบเชื้อดื้อมากกว่าร้อยละ 50 คือ ampicillin, florfenicol, tetracycline พบเชื้อที่ผลิต ESBL ร้อยละ 13 แต่ยังไม่พบยีน *mcr-1*[18]

พบยีนดื้อยา 2 ตัวอย่าง จาก 74 ตัวอย่าง

ในการศึกษานี้พบเชื้อที่มียีนดื้อยาสำคัญ 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมดที่แยกได้ 74 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug resistant) 1 ตัวอย่าง และพบเชื้อดื้อยา ampicillin มากที่สุด

มากกว่าร้อยละ 70 มาจากมูลสัตว์[18]

พบว่าเชื้อจากมูลสัตว์มีอัตราดื้อยาสูงกว่าเชื้อจากดิน และพบว่าเชื้อมากกว่าร้อยละ 70 ดื้อต่อยาหลายชนิด

ร้อยละ 29 พบจากมูลสุกร

การศึกษาในประเทศไทยมีรายงานการวิจัยในปีพ.ศ. 2564 ศึกษาเชื้อ E. coli ที่แยกได้จากมูลสุกร มีอัตราดื้อยาร้อยละ 29 และยาที่พบเชื้อดื้อมากที่สุด โดยพบเชื้อดื้อมากกว่าร้อยละ 50 คือ ampicillin, florfenicol, tetracycline พบเชื้อที่ผลิต ESBL ร้อยละ 13 แต่ยังไม่พบยีน mcr-1

รายงานการศึกษาเชื้อ E. coli ที่แยกได้จากมูลสัตว์ และดินในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ในประเทศจีน ที่พบว่าเชื้อทุกตัวอย่างดื้อต่อยา amoxicillin, colistin, doxycycline และ oxytetracycline

สรุปการค้นพบ

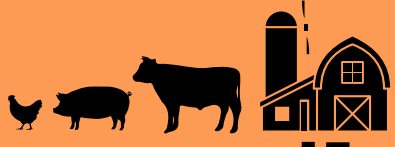
จากการศึกษาการตรวจหาแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญจากสิ่งแวดล้อมบริเวณฟาร์มเลี้ยงสุกรและไก่

1. พบ *E. coli* และ *Klebsiella* จากทั้งน้ำและดินรอบฟาร์ม โดยเชื้อที่พบส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบ

2. พบ E. coli ที่ผลิตเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อดื้อยา ทำให้ยาปฏิชีวนะ ในกลุ่มที่รักษาอาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ระบบทางเดินหายใจ การใช้ป้องกันการติดเชื้อระหว่างการผ่าตัด ทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพหรือไม่ได้ผลเลย

3. พบเชื้อที่มียีนดื้อยาต่อยาหลายชนิด ซึ่งเชื้อดื้อยานี้ ทำให้การรักษาโรคเป็นไปด้วยความยุ่งยากและซับซ้อน ส่งผลให้มีความเสี่ยงสูงขึ้นในด้านสุขภาพและชีวิต ค่าใช้จ่ายในการรักษาก็สูงด้วยเช่นกัน

4. พบ *E. coli* ที่มียีน *mcr-1* จากแหล่งน้ำรอบฟาร์มแห่งหนึ่ง ที่ทำให้เชื้อดื้อยาโคลิสติน ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด และถูกจัดเป็นยาควบคุมพิเศษ เฉพาะคนไข้มีเชื้อดื้อยาและไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะตัวอื่นได้ผลแล้วเท่านั้น



แนวทางการแก้ไขอย่างยั่งยืน

นอกจากประเด็นด้านกฎหมายแล้ว สิ่งที่สำคัญในการแก้ไขปัญหาเชื้อดื้อยาจากภาคปศุสัตว์ก็คือการแก้ไขปัญหาที่ต้นตอของการใช้ยาปฏิชีวนะแบบเกินจำเป็นนี้ ก็คือการพัฒนาสวัสดิภาพสัตว์ให้สูงขึ้น มีงานวิจัยและฟาร์มต้นแบบเป็นจำนวนมากที่แสดงให้เห็นแล้วว่าการยกระดับสวัสดิภาพสัตว์ให้สูงขึ้นช่วยทำให้สัตว์มีสุขภาพกายและใจดีขึ้น เมื่อสัตว์มีชีวิตดีที่การเจ็บป่วยก็น้อยลง ส่งผลให้ความต้องการใช้ยาปฏิชีวนะลดลงเป็นอย่างมาก การพัฒนาสวัสดิภาพสัตว์ให้สูงขึ้นนอกจากจะทำให้สัตว์มีชีวิตที่ดีขึ้น ยังทำให้อาหาร ตลอดจนสิ่งแวดล้อมรอบตัวมนุษย์ปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

สรุปการค้นพบ

พบ *E. coli* และ *Klebsiella* พบจากทั้งน้ำและดินรอบฟาร์ม
โดยเชื้อที่พบส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบ ยาที่พบเชื้อดื้อมากที่สุดคือ ampicillin ซึ่งสำหรับ *Klebsiella pneumoniae* มีธรรมชาติที่ดื้อยา ampicillin มาแต่กำเนิดอยู่แล้ว ส่วนยาที่พบเชื้อดื้อมาก รองลงมาคือ amoxy-clavulanate และ tetracycline ซึ่งเป็นยากลุ่มที่ใช้ในฟาร์มสัตว์ ซึ่งในมนุษย์ใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ หลอดลมอักเสบ ภาวะติดเชื้อที่หู ในกระแสเลือด รวมถึงการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ เป็นต้น

พบ *E. coli* ที่ผลิต ESBL ชนิด CTX-M ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อดื้อยากลุ่ม cephalosporins ทั้งรุ่น 1, 2 และ 3
โดยหากมนุษย์ได้รับเชื้อดื้อยานี้เข้าไปทำให้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ที่ใช้รักษาอาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ระบบทางเดินหายใจ การใช้ป้องกันการติดเชื้อระหว่างการผ่าตัด ทำงานได้อย่างไม่เต็มประสิทธิภาพหรือไม่ได้ผลเลย

ในการศึกษานี้พบเชื้อที่มียีนดื้อยาต่อยาหลายชนิด (multidrug resistant) 1 ตัวอย่าง
ซึ่งเชื้อดื้อยาเช่นนี้ทำให้การรักษาโรคเป็นไปด้วยความยุ่งยากและซับซ้อน ส่งผลต่อความเสี่ยงด้านสุขภาพและชีวิตสูงขึ้น ค่าใช้จ่ายในการรักษาก็สูงด้วยเช่นกัน

พบ *E. coli* ที่มียีน *mcr-1* ซึ่งทำให้เชื้อดื้อยา colistin จากแหล่งน้ำรอบฟาร์มแห่งหนึ่ง โดยเอ็มซีอาร์–1" (MCR-1) สามารถแพร่ไปยังแบคทีเรียตัวอื่นในร่างกายได้
สาเหตุที่แพทย์กลัว เนื่องจากยีนตัวนี้เกิดจาก "การดื้อยาโคลิสติน" ยาตัวนี้มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น ปาก ลำไส้ ผิวหนัง แต่ผลข้างเคียงมีมากและค่อนข้างอันตราย ทำให้เกิดพิษในตับและไต ดังนั้นยาโคลิสตินถูกจัดเป็นยาควบคุมพิเศษ เฉพาะคนไข้มีเชื้อดื้อยาและไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะตัวอื่นได้ผลแล้วเท่านั้น

รายงานฉบับนี้เป็นครั้งที่สอง ที่องค์กรพิทักษ์สัตว์แห่งโลกได้ทำการตรวจแหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อมรอบฟาร์ม โดยครั้งแรกมีการตรวจเมื่อปี พ.ศ. 2562 ซึ่งผลการตรวจยังคงมีความคล้ายคลึงกัน ไม่ว่าจะเป็นการพบยีนดื้อยาในกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นจำนวนมากแพร่กระจายออกมายังแหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อมภายนอก ตลอดจนความกังวลเป็นอย่างมากต่อการค้นพบยีนดื้อต่อยาหลายขนาน (multidrug resistant) รวมไปถึงยีน *mcr-1* ซึ่งดื้อต่อยา colistin ซึ่งถือเป็นปราการด่านสุดท้าย (last resort) ของยาปฏิชีวนะที่จะใช้เมื่อยาตัวอื่นใช้ไม่ได้ผล ดังนั้นการพบยีนดื้อยาตัวนี้ อาจหมายถึงช่องว่างในการบังคับใช้กฎหมายเพื่อควบคุมการเข้าถึงยาและใช้ยาแบบไม่ถูกต้อง ซึ่งหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้องจำเป็นต้องเข้ามาดำเนินการแก้ไขอย่างจริงจัง

นอกจากประเด็นด้านกฎหมายแล้ว สิ่งที่สำคัญในการแก้ไขปัญหาเชื้อดื้อยาจากภาคปศุสัตว์ก็คือการแก้ไขปัญหาที่ต้นตอของการใช้ยาปฏิชีวนะแบบเกินจำเป็นนี้ ก็คือการพัฒนาสวัสดิภาพสัตว์ให้สูงขึ้น **มีงานวิจัยและฟาร์มต้นแบบเป็นจำนวนมากที่แสดงให้เห็นแล้วว่า การยกระดับสวัสดิภาพสัตว์ให้สูงขึ้นช่วยทำให้สัตว์มีสุขภาพกายและใจดีขึ้น เมื่อสัตว์มีชีวิตดีที่การเจ็บป่วยก็น้อยลง ส่งผลให้ความต้องการใช้ยาปฏิชีวนะลดลงเป็นอย่างมาก การพัฒนาสวัสดิภาพสัตว์ให้สูงขึ้นนอกจากจะทำให้สัตว์มีชีวิตที่ดีขึ้น ยังทำให้อาหาร ตลอดจนสิ่งแวดล้อมรอบตัวมนุษย์ปลอดภัยมากยิ่งขึ้น**

เอกสารอ้างอิง

1. Laxminarayan R, Van Boeckel TP, Teillant A. The economic costs of withdrawing antimicrobial growth promoters from the livestock sector. OECD Food Agri. Fisheries Papers 2015. doi: 10.1787/5js64kst5wvl-en.

2. Kleina EY, Van Boeckeld TP, Martineza EP, Panta S, Gandraa S, Levine SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. PNAS 20181; 5: 3463–3470.

3. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. PNAS 2015; 112: 5649–5654.

4. Mann A, Nehra K, Rana JS, Dahiya T. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. Curr Res Microb Sci 2021; 2: 100030.

5. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chem Rev 2005; 105: 477–498.

6. Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. Molecules 2017; 22: 2267.

7. Roberts MC. Tetracycline therapy: Update. CID 2019; 36: 462–467.

8. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol Rev 1996; 19: 1–24.

9. Cadena M, Durso LM, Miller DN, Waldrip HM, Castleberry BL, Drijber RA, et al. Tetracycline and sulfonamide antibiotic resistance genes in soils from nebraska organic farming operations. Front Microbiol 2018; 9: 1283.

10. Brown DF, Reynolds PE. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett 1980; 122: 275–278.

11. Lulitanond A, Ito T, Li S, Han X, Ma XX, Engchanil C, et al. ST9 MRSA strains carrying a variant of type IX SCC*mec* identified in the Thai community. BMC Infect Dis 2013; 13: 214.

12. Crespo-Piazuelo D, Lawlor PG. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. Ir Vet J 2021; 74(1) :21.

13. Sinlapasorn S, Lulitanond A, Angkititrakul S, Chanawong A, Wilailuckana C, Tavichakorntrakool R, et al. SCC*mec* IX in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and meticillin-resistant coagulase-negative staphylococci from pigs and workers at pig farms in Khon Kaen, Thailand. J Med Microbiol. 2015; 64: 1087-1093.

14. Vestergaard M, Cavaco LM, Sirichote P, Unahalekhaka A, Dangsakul W, Svendsen CA, et al. SCCmec type IX element in methicillin resistant Staphylococcus aureus spa Type t337 (CC9) Isolated from pigs and pork in Thailand. Front Microbiol 2012; 3: 103.

15. สัมฤทธิ์ แสนบัว วิศาล ศรีสุริยะ กมล ฉวีวรรณ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ นครราชสีมา กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. การเลี้ยงสุกร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2548.

16. Menkem ZE, Ngangom BL, Tamunjoh SSA, Boyom FF. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. Acta Ecoloica Sinica 2019; 39: 411-415.

17. น้ำฝน เอกตาแสง ญาณสินี สุมา จารุพล มหิโพด. การปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 2564; 26: 1490-1501.

18. วิไล เจียมไชยศรี, ชาติ เจียมไชยศรี, พิษณุ ตุลยกุล. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการการศึกษาการปนเปื้อนและการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะจากแหล่งกำเนิดน้ำเสียประเภทโรงพยาบาลและฟาร์มสุกร. คณะวิศวกรรมศาสตร์และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์. 2564

19. Barancheshme F, Munir M. Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants. Front Microbiol 2018; 8: 2603.

20. Leiva AM, Piña B, Vidal G. Antibiotic resistance dissemination in wastewater treatment plants: a challenge for the reuse of treated wastewater in agriculture. Rev Environ Sci Biotechnol 2021; 20: 1043–1072.

เอกสารอ้างอิง

21. Li S, Ondon BS, Ho SH, Jiang J, Li F. Antibiotic resistant bacteria and genes in wastewater treatment plants: From occurrence to treatment strategies. Sci Total Environ 2022; 838 (Pt 4): 156544.

22. Manoharan RK, Ishaque F, Ahn YH. Fate of antibiotic resistant genes in wastewater environments and treatment strategies - A review. Chemosphere 2022; 298: 134671.

23. Machado EC, Freitas DL, Leal CD, de Oliveira AT, Zerbini A, Chernicharo CA, et al. Antibiotic resistance profile of wastewater treatment plants in Brazil reveals different patterns of resistance and multi resistant bacteria in final effluents. Sci Total Environ 2023; 857 (Pt 1): 159376.

24. Du Xj, Zang Yx, Liu Hb. Shuo Wang. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* via recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip. Food Anal Methods 2018; 11: 2296–2306.

25. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(1): 264-274.

26. 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(2): 161-168

27. M'Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV beta-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). J Antimicrob Chemother 1996; 37(4): 797-802.

28. Gniadkowski M, Schneider I, Pałucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(4): 827-832.

29. Chanawong A, Lulitanond A, Kaewkes W, Lulitanond V, Srigulbutr S, Homchampa P. CTX-M extended-spectrum β-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Thai university hospital. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007; 38: 493-500.

30. Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Lett 1999; 176(2): 411-419.

31. Bartkiene E, Ruzauskas M, Bartkevics V, Pugajeva I, Zavistanaviciute P, Starkute V, et al. Study of the antibiotic residues in poultry meat in some of the EU countries and selection of the best compositions of lactic acid bacteria and essential oils against Salmonella enterica. Poult Sci 2020; 99(8): 4065-4076.

32. Muaz K, Riaz M, Akhtar S, Park S, Ismail A. Antibiotic residues in chicken meat: Global prevalence, threats, and decontamination strategies: A Review. J Food Prot 2018; 81(4): 619-627.

33. คมชัดลึก on line. ข่าวประจำวันพุธที่ 11 ตุลาคม พ.ศ. 2566. [สืบค้นวันที่ 11 ตุลาคม 2566] จาก URL: https://www.komchadluek.net/news/345593

34. Geletu US, Usmael MA, Ibrahim AM. Isolation, identification, and susceptibility profile of E. coli, Salmonella, and S. aureus in dairy farm and their public health implication in Central Ethiopia. Vet Med Int 2022; 14; 2022:1887977.

เอกสารอ้างอิง

35. Trochesset DA, Walker SG. Isolation of *Staphylococcus aureus* from environmental surfaces in an academic dental clinic. J Am Dent Assoc 2012;143(2): 164-169.

36. Hamel M, Rolain JM, Baron SA. The History of colistin resistance mechanisms in bacteria: Progress and challenges. Microorganisms 2021; 9(2): 442.

37. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol 2014; 26(5): 643.

38. Feng Y. Transferability of MCR-1/2 polymyxin resistance: Complex dissemination and genetic mechanism. ACS Infect Dis 2018; 4: 291–300.

39. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Singh KS, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium. Eurosurveillance 2016; 21: 280.

40. Paveenkittiporn W, Kamjumphol W, Ungcharoen R, Kerdsin A. Whole-Genome sequencing of clinically isolated carbapenem-resistant enterobacterales harboring *mcr* genes in Thailand, 2016-2019. Front Microbiol 2021; 11: 586368.

41. Phuadraksa T, Wichit S, Arikit S, Songtawee N, Yainoy S. Co-occurrence of *mcr-2* and *mcr-3* genes on chromosome of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy individuals in Thailand. Int J Antimicrob Agents 2022; 60(4): 106662.

42. Phetburom N, Boueroy P, Chopjitt P, Hatrongjit R, Akeda Y, Hamada S, et al. A. *Klebsiella pneumoniae* complex harboring *mcr-1*, *mcr-7*, and *mcr-8* Isolates from slaughtered pigs in Thailand. Microorganisms 2021; 9(12): 2436.

43. Bubpamala J, Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Montakantikul P, Santanirand P, Chomnawang MT. Phenotypic and genotypic characterizations of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Thailand. Infect Drug Resist 2018 5; 11: 2151-2157.

44. Seenama C, Thamlikitkul V, Ratthawongjirakul P. Multilocus sequence typing and *bla* characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand. Infect Drug Resist 2019 19; 12: 2201-2214.

45. Sudatip D, Mostacci N, Tiengrim S, Thamlikitkul V, Chasiri K, Kritiyakan A, et al. The risk of pig and chicken farming for carriage and transmission of *Escherichia coli* containing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and mobile colistin resistance (mcr) genes in Thailand. Microb Genom 2023; 9(3): mgen000951.

46. Peng JJ, Balasubramanian B, Ming YY, Niu JL, Yi CM, Ma Y, Liu WC. Identification of antimicrobial resistance genes and drug resistance analysis of Escherichia coli in the animal farm environment. J Infect Public Health. 2021 Dec;14(12):1788-1795.

องค์กรพิทักษ์สัตว์แห่งโลกประเทศไทย
ชั้น 27 เลขที่ 253 อโศก ถนนสุขุมวิท 21
แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา
กรุงเทพฯ 10110.