การปนเปื้อนของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยา vancomycin ในทางเดินอาหารของสัตว์ที่ใช้บริโภคจากฟาร์มต่างๆในประเทศไทย

Fecal Colonization of Vancomycin–Resistant *Enterococcus* spp. among Food Producing Animals from Farms in Thailand

สวรรยา พงศ์ปริตร* อดุลย์ บุญเฉลิมชัย อุษณี ทรัพย์เจริญกุล รุ่งนภา วีระมโน
สุพัตรา วัฒนสาธิตอาภา และ สมพล แพรพันธ์

Sawanya Pongparit* Adun Bunchaleamchai Utsanee Supcharoencoon Rungnapa Veeramano
Suphatra Watanasatitarpa and Somphon Phraephan

อาจารย์ประจำ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
Faculty Staff of Faculty of Medical Technology, Rangsit University
**Corresponding author, E mail: sawanya.p@rsu.ac.th*

บทคัดย่อ

การสำรวจความชุกของ Vancomycin-resistant *Enterococcus* ในทางเดินอาหารของสุกร โค และไก่ ชนิดละ 150 ตัวอย่าง จาก 6 จังหวัดในประเทศไทย โดยเก็บอุจจาระมาเพาะเชื้อบน Enterococcosel agar ที่เติม vancomycin 6 μg/mL พบ *E. faecalis* และ *E. faecium* จากสิ่งส่งตรวจ 66 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.67) และ 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.56) ผลทดสอบความไวไม่พบเชื้อดื้อยา vancomycin และ teicoplanin แต่ *E. faecalis* 10 และ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.15 และ 4.55) ให้ผล intermediate resistant ต่อ vancomycin และและ teicoplanin ตามลำดับ *E. faecium* 2 และ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.88 และ 2.94) ให้ผล intermediate resistant ต่อ vancomycin และ teicoplanin ตามลำดับ และผลการตรวจหา *Van* gene พบ *vanB* gene ใน *E. faecalis* จากสุกร 1 ตัวอย่าง(ร้อยละ 0.67) แต่ผลการทดสอบความไวต่อยาชนิดอื่นพบ *Enterococcus* ที่แยกได้จากสัตว์ ดื้อยาหลายชนิด โดยพบ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกจากสุกรดื้อ tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 84.2 และ 82.4 ตามลำดับ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกจากไก่ดื้อ erythromycin มากที่สุด ร้อยละ 94.7 และ 88.9 ตามลำดับ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกจากโคดื้อ tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 42.9 และ 25.0 ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่าในประเทศไทยยังมีการใช้ยาในสัตว์ที่ใช้บริโภค ที่ทำให้สัตว์กลายเป็นรังโรคสำคัญของเชื้อดื้อยา โดยเฉพาะ *Enterococcus* ที่อาจก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่ยากต่อการรักษา เสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วย จึงควรมีมาตรการควบคุมการใช้ยาในสัตว์ที่ใช้บริโภค ตรวจกรองระดับการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาในคนและในสัตว์ที่อาจเป็นพาหะของเชื้อดื้อยา เพื่อลดการสูญเสียที่เกิดจากปัญหาการดื้อยาที่กำลังเผชิญอยู่ในปัจจุบัน

คำสำคัญ *: vancomycin-resistant enterococci, farm animals, multidrug resistance*

มหาวิทยาลัยรังสิต

Abstract

This study investigated the prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* in the gastrointestinal tract of farm animals from six provinces in Thailand. Stool samples were collected from 150 chickens, pigs, and cattle. *Enterococcus* were then isolated on Enterococcosel agar with vancomycin 6 μg/mL. *E. faecalis* and *E. faecium* were isolated from 66 (14.7%) and 34 (7.6%) samples, respectively. The susceptibility tests showed no isolates resisted vancomycin and teicoplanin; however, 10 (15.2%) and 3 (4.5%) isolates of *E. faecalis* were intermediately resistant to vancomycin and teicoplanin, respectively, whereas 2 (5.88%) and 1 (2.94%) isolates of *E. faecium* were intermediately resistant to vancomycin and teicoplanin, respectively. An isolate of *E. faecalis* (0.67%) from a pig with intermediate resistance to vancomycin was found *vanB* gene. Moreover, *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from farm animals showed high prevalence of multi-drugs resistance. *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from pigs showed the highest rates of tetracycline resistance of 84.2% and 82.4%, respectively. *E. faecalis and E. faecium* isolates from chickens showed the highest rates of erythromycin resistance of 94.7% and 88.9%, respectively. *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from cattle showed the highest rates of tetracycline resistance of 42.9% and 25.0%, respectively. This study showed a trend of high usage of antibiotics in food animals in Thailand. Farm animals could become reservoirs of multi-drug resistant organisms, especially *Enterococcus*, which causes difficulty to the treatment of infections and leads to a high risk of death among these patients. The effective control of antimicrobial usage in food animals and screening for contamination of resistant bacteria in humans and animals may be required in order to reduce the death rate caused by drug resistance problems that we are facing today.

Keywords: *vancomycin-resistant enterococci, farm animals, multidrug resistance*

1. บทนำ

Enterococcus เป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อย และมีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อนี้สูงถึง ร้อยละ 61 สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนได้บ่อยได้แก่ *E. faecalis* และ *E. faecium* (Fisher & Phillips, 2009) ความสำคัญทางคลินิกของเชื้อนี้เกิดจากการดื้อยาหลายชนิด ทั้งการดื้อยาตามธรรมชาติ (intrinsic resistance) และพัฒนาให้เกิดการดื้อยาหลังได้รับยา(acquired resistance) จึงต้องใช้ยา vancomycin ที่ฆ่าเชื้อ Gram positive อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดมาใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อรุนแรง จึงเกิดการดื้อยา vancomycin หรือที่เรียกว่า vancomycin-resistant enterococci (VRE) (Linden, 2002) การดื้อยา vancomycin เกิดจาก *van* gene ที่แยกได้ในปัจจุบัน ได้แก่ *vanA- vanG* ซึ่งแต่ละ gene จะควบคุมการดื้อยากลุ่ม glycopeptides แต่ละชนิดแตกต่างกัน และมีระดับการดื้อต่อยา vancomycin ต่างกัน gene ดื้อยา vancomycin ที่พบใน *E. faecalis* และ *E. faecium* ได้บ่อยได้แก่ *vanA* และ *vanB* ซึ่งอยู่บน mobile genetic element transposon ทำให้มีการถ่ายทอด *vanA* และ *vanB* gene ได้ง่าย มีผลให้เกิดการแพร่เชื้อดื้อยาอย่างรวดเร็ว และบน transposon มักพบ gene ดื้อยาชนิดอื่นร่วมด้วย ทำให้มียาทางเลือกในการรักษาการติดเชื้อ VRE น้อยมาก (Courvalin, 2006) ยาที่สามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อ VRE

ได้แก่ quinupristin/dalfopristin และ linezolid แต่ยาทั้งสองมีราคาแพง และมีผลข้างเคียงมาก จึงมีข้อจำกัดในการเลือกใช้ยา ทำให้การรักษาผู้ป่วย VRE ยุ่งยากมากขึ้น และเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วย (Linden, 2002)

Enterococcus เป็นเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ จึงเป็นแหล่งแพร่เชื้อสำคัญจากคนและสัตว์สู่สิ่งแวดล้อม อุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆ รวมทั้งแพร่กระจายจากคนสู่คนและสัตว์สู่คนได้ง่าย (Donabedian et al., 2010; Peter, Radhakrishnan, Mathew & Zachariaa, 2012; Ramos et al., 2012) การใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรค หรือป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ เป็นสาเหตุหนึ่งของการดื้อยาของ *Enterococcus* ในทางเดินอาหารของสัตว์ เช่น การใช้ avoparcin ซึ่งเป็นยากลุ่ม glycopeptides เช่นเดียวกับ vancomycin เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในไก่และสุกร ทำให้ตรวจพบเชื้อ VRE ในทางเดินอาหารของสัตว์มากขึ้น และเป็นเหตุให้เกิดการระบาดของโรคติดเชื้อจาก VRE เพิ่มสูงขึ้น จนเป็นสาเหตุให้ประเทศต่างๆรวมทั้งประเทศไทยต้องประกาศยกเลิกการใช้ยา avoparcin ในอาหารสัตว์ มีผลทำให้อัตราชุกของเชื้อ VRE ในมนุษย์และไก่ลดลงอย่างรวดเร็ว (Ozawa et al., 2002; กองควบคุมอาหารและยาสัตว์, 2542)

แม้ว่าจะมีประกาศยกเลิกการใช้ยากลุ่ม glycopeptide ในอาหารสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ที่ทำให้โอกาสในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดื้อยาหมดไป แต่ในหลายประเทศยังมีรายงานการพบเชื้อ VRE ในสัตว์ แม้ในฟาร์มที่งดใช้ยากลุ่ม glycopeptide เป็นเวลาหลายปี (Sorum et al., 2006) เนื่องจากเชื้อ VRE มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้เป็นเวลานาน หากฟาร์มต่างๆ ไม่ได้งดใช้ยากลุ่ม glycopeptide โดยสิ้นเชิง ไม่ได้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อสภาวะแวดล้อมอย่างเหมาะสม หรือไม่มีแนวทางการเฝ้าระวังการได้รับยานี้ที่ตกค้างในชุมชน เชื้อ VRE อาจยังคงแฝงตัวในในทางเดินอาหารของสัตว์ที่ใช้บริโภค และกลายเป็นแหล่งแพร่สำคัญของเชื้อดื้อยาที่มีผลทางสาธารณสุข การปนเปื้อนของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยา vancomycin ในทางเดินอาหารของสัตว์ที่ใช้บริโภคจากฟาร์มต่างๆในประเทศไทย น่าจะเป็นข้อมูลสำคัญเบื้องต้นในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ VRE และเชื้อดื้อยาอื่นๆ จากสัตว์มาสู่คน

2.วัตถุประสงค์

เพื่อสำรวจหาความชุกของเชื้อ vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่ใช้บริโภค ได้แก่ สุกร ไก่ และโค ในจากฟาร์มในจังหวัดต่างๆของประเทศไทย ภายหลังจากการประกาศยกเลิกการใช้ยากลุ่ม glycopeptide ในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ VRE จากสัตว์มาสู่คน ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน selective enrichment media และสำรวจหา gene ดื้อยา *vanA* และ *vanB* ที่มักพบในเชื้อ VRE และ gene ดื้อยา *vanC* ที่เป็น natural resistance gene รวมทั้งสำรวจรูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพที่นิยมใช้รักษาการติดเชื้อ *Enterococcus* ของเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของสัตว์ เพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยากลุ่มต่างๆ

3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง: ขนาดของกลุ่มตัวอย่างคำนวณจากผลงานวิจัยของ Donabedian และคณะในปี ค.ศ. 2010, Peter และคณะในปี ค.ศ. 2012 และ Ramos และคณะในปี ค.ศ. 2012 ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 พบว่าจำนวนตัวอย่างสุกร ที่เหมาะสม เท่ากับ 149.24 ตัวอย่าง, ตัวอย่างไก่ที่เหมาะสม เท่ากับ 138.30 ตัวอย่าง และ

จำนวนโคที่เหมาะสม เท่ากับ 54.75 ตัวอย่าง (Donabedian et al., 2010; Peter et al., 2012; Ramos et al., 2012) ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาหาเชื้อ VRE จากระบบทางเดินอาหารของ ไก่, โค และ สุกร ชนิดละ 150 ตัวอย่าง จากฟาร์มต่างๆ ในจังหวัดสระบุรี, จังหวัดนครปฐม, จังหวัดนครราชสีมา, จังหวัดปทุมธานี, จังหวัดนราธิวาส และ จังหวัดชัยภูมิ ระหว่าง เดือนมิถุนายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2557

3.2 การเพาะแยกเชื้อ: ทำการเพาะแยกเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* จาก stool swab ของสุกร ไก่ และโค ชนิดละ 150 ตัวอย่างบน enterococcosel agar ที่เติมยา vancomycin 6 μg/ml บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากไม่พบเชื้อ หรือ colony ที่ขึ้นไม่ชัดเจนบ่มต่อถึง 48 ชั่วโมง เลือก colony ขนาดเล็กใสที่มี zone สีดำ และให้ผลการย้อมเป็น Gram-positive cocci in chain และ catalase test ลบ มาแยกวินิจฉัยเชื้อ ดังตารางที่ 1

3.3. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ: ทดสอบความไวต่อยา 9 ชนิด: vancomycin, teicoplanin, ampicillin, tetracycline, erythromycin, ciprofloxacin, nitrofurantoin, fosfomycin และ linezolid โดยวิธี agar disk diffusion ตามวิธีมาตรฐาน CLSI, 2014 ควบคุมคุณภาพด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และตรวจการดื้อยาในระดับสูงของยา กลุ่ม aminoglycoside โดยทดสอบกับยา gentamicin และ streptomycin ควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วยเชื้อ *E. faecalis* ATCC 29212 เชื้อที่ให้ผล intermediate resistant ต่อยา vancomycin ให้ทดสอบ E-test เพื่อหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) (CLSI, 2014) นำเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่ให้ผลทดสอบความไวดื้อยา หรือ intermediate resistance ต่อยา vancomycin หรือยา teicoplanin resistant spp. มาคัดกรอง *van* gene โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ของ Kariyama และคณะ (Kariyama, Mitsuhata, Chow, Clewell, & Kumon, 2000)

ตารางที่ 1 การแยกวินิจฉัย *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* (Manero & Blanch, 1999)

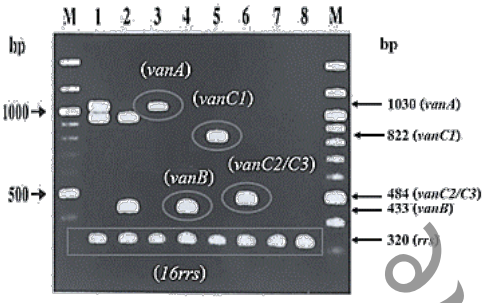
Organisms	Biochemical tests								
	6.5% NaCl	Bile esculin hydrolysis	Acid from			Arginine dihydrolase	0.04% Tellurite	Motility	Yellow pigment
			Mannitol	Sorbitol	Arabinose				
E. faecalis	G	+	+	+	-	+	G	-	-
E. faecium	G	+	+	-	+	+	NG	-	-

NaCl = Sodium chloride, G = Growth, NG = No growth

ตารางที่ 2 Primers สำหรับตรวจหา *Van* gene และ ขนาด PCR product (R Kariyama et al., 2000)

Target gene	5′--3′primer sequence	Amplicon size (bp)
VanA-F	5′-CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA-3′	1,030
VanA-R	5′-CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA-3′	
VanB-F	5′-GTGACAAACCGGAGGCGAGGA-3′	433
VanB-R	5′-CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA-3′	
VanC1-F	5′-GGTATCAAGGAAACCTC-3′	822
Van C1-R	5′-CTTCCGCCATCATAGCT-3′	
VanC2/C3-F	5′-CGGGGAAGATGGCAGTAT-3′	484
VanC2/C3-R	5′-CGCAGGGACGGTGATTTT-3′	
rrs (16S rRNA)-F	5′-GGATTAGATACCCTGGTAGTCC-3′	320
rrs (16S rRNA)-R	5′-TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC-3′	

3.4 การตรวจหาเชื้อ *Enterococcus* spp. และ *Van* gene ด้วยวิธี conventional PCR: ทำการตรวจหาเชื้อ *Enterococcus* spp. และ *van* gene ด้วยวิธี conventional PCR โดยใช้ specific primer 5 คู่ สำหรับตรวจหา *vanA, vanB* และ *vanC* gene และ *rrs* (16S rRNA) ที่จำเพาะกับเชื้อ *Enterococcus* spp. ขนาดของ PCR product ดังตารางที่ 2 และแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 .ขนาด base pair และตำแหน่งของ band ของ van gene และ rrs (16S rRNA) gene บน 1.5% agarose gel (Kariyama, et al., 2000)

4. ผลการวิจัย

4.1 การเพาะแยกเชื้อ *Enterococcus*: จากอุจจาระของของสุกร ไก่ และโค จำนวน 450 ตัวอย่าง พบเชื้อ *E. faecalis* 66 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.67) และ *E. faecium* 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.56) จำนวนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากสัตว์แต่ละชนิด ในแต่ละจังหวัด แสดงในตารางที่ 3

4.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ: ผลทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพแสดงในตารางที่ 4 พบว่า *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกได้ไม่ดื้อยา vancomycin และ teicoplanin แต่พบ *E. faecalis* และ *E. faecium* ให้ผล intermediate resistance ต่อยา vancomycin 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.15) และ 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.88) ตามลำดับ แต่ค่า MIC ของเชื้อส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 0.015 - 2 μg/ml แสดงว่าไวต่อยา vancomycin ยกเว้น *E. faecalis* ที่แยกได้จากอุจจาระของโคจากจังหวัดนครปฐม ที่ผลการตรวจกรองหาเชื้อ presumptive vancomycin resistance เป็น positive ให้ค่า MIC ต่อยา vancomycin ระหว่าง 4 - 8 μg/ml และพบ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่ให้ผล intermediate resistance ต่อยา teicoplanin 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.54) และ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.94) ตามลำดับ จากการตรวจการดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycoside ในระดับสูง พบเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* ดื้อยา high-level streptomycin 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.15) และ 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 35.29) ตามลำดับ ขณะที่พบ เชื้อ *E. faecalis* ดื้อต่อยา high-level gentamicin 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.51) แต่ไม่พบการดื้อต่อยา gentamicin ใน *E. faecium* ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกได้จากสัตว์พบการดื้อยาหลายชนิด (multi-drug resistant) ในอัตราสูงมาก โดยพบ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกจากสุกรดื้อยา tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 84.2 และ 82.4 ตามลำดับ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกจากไก่ดื้อยา erythromycin มากที่สุด ร้อยละ 94.7 และ 88.9 ตามลำดับ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกจากโคดื้อยา tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 42.9 และ 25.0 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อ *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิด ในแต่ละจังหวัด

จังหวัด	*E. faecalis*				*E. faecium*			
	สุกร	โค	ไก่	รวม	สุกร	โค	ไก่	รวม
นครราชสีมา	8	9	6	23	6	4	3	13
	32.00%	36.00%	24.00%	30.67%	24.00%	16.00%	12.00%	17.33%
สระบุรี	0	2	8	10	1	0	2	3
	0%	8.00%	32.00%	13.33%	4.00%	0%	8.00%	4.00%
ชัยภูมิ	0	4	1	5	6	0	0	6
	0%	16.00%	4.00%	6.67%	24.00%	0.00%	0.00%	8.00%
ปทุมธานี	5	3	0	8	1	2	2	5
	20.00%	12.00%	0.00%	10.67%	4.00%	8.00%	8.00%	6.67%
นครปฐม	4	4	0	8	1	2	2	5
	16.00%	16.00%	0.00%	10.67%	4.00%	8.00%	8.00%	6.67%
นราธิวาส	2	6	4	12	2	0	0	2
	8.00%	24.00%	16.00%	16.00%	8.00%	0.00%	0.00%	2.67%
รวม	**19**	**28**	**19**	**66**	**17**	**8**	**9**	**34**
	12.67%	**18.67%**	**12.67%**	**14.67%**	**11.33%**	**5.33%**	**6.00%**	**7.56%**

ตารางที่ 4 ผลทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกได้จากสัตว์ จากฟาร์ม 6 จังหวัดในประเทศไทย

Antimicrobial agent (μg)		*E. faecalis* (n=66)			*E. faecium* (n=34)		
		S	I	R	S	I	R
Vancomycin (VA)	**(30)**	56 (84.85%)	10 (15.15%)	0 (0%)	32 (94.12%)	2 (5.88%)	0 (0%)
Teicoplanin (TEC)	**(30)**	63 (95.45%)	3 (4.55%)	0 (0%)	33 (97.06%)	1 (2.94%)	0 (0%)
Ampicillin (AMP)	**(10)**	65 (98.48%)	0 (0%)0	1 (1.52%)	24 (70.59%)	0 (0%)0	10 (29.41%)
Erythromycin (E)	**(15)**	11 (16.67%)	14 (21.21%)	41 (62.12%)	8 (23.53%)	4 (14.71%)	22 (61.76%)
Tetracycline (TE)	**(30)**	25 (37.88%)	1 (1.52%)	40 (60.60%)	14 (41.18%)	1 (2.94%)	19 (55.88%)
Ciprofloxacin (CIP)	**(5)**	28 (42.42%)	20 (30.30%)	18 (27.27%)	22 (64.71%)	9 (26.47%)	3 (8.82%)
Nitrofurantoin (F)	**(300)**	61 (92.42%)	1 (7.58%)	4 (0%)	17 (50.0%)	11 (32.35%)	6 (17.65%)
Fosfomycin (FOS)	**(50)**	62 (93.94%)	0 (0%)	4 (6.06%)	32 (94.12%)	1 (2.94%)	1 (2.94%)
Linezolid (LZD)	**(30)**	60 (90.91%)	4 (6.06%)	2 (3.03%)	32 (94.12%)	2 (5.88%)	0 (0%)
Gentamicin (CN)	**(120)**	64 (96.97%)	1 (1.52%)	1 (1.52%)	34 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Streptomycin (S)	**(300)**	30 (45.46%)	26 (39.39%)	10 (15.15%)	16 (47.06%)	6 (17.65%)	12 (35.29%)

S = susceptible, I = intermediate resistant, R = resistant

4.3 การตรวจหาเชื้อ *Enterococcus* spp. และ *Van* gene ด้วยวิธี conventional PCR: ผลการทดสอบ PCR พบว่า *E. faecalis* 66 ตัวอย่าง และ *E. faecium* 34 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากสัตว์จากฟาร์ม ใน 6 จังหวัด ของประเทศไทย ตรวจพบ *rrs* (16S rRNA) gene ทั้งหมด แสดงว่าเชื้อทั้ง 100 ตัวอย่างเป็น *Enterococcus* สอดคล้องกับผลการแยกวินิจฉัยทางชีวเคมี แต่ผลการตรวจหา *vanA* และ *vanB* gene พบว่าจาก *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกได้ ตรวจไม่พบ

VanA gene แต่ตรวจพบ *VanB* gene เฉพาะใน *E. faecalis* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรจากจังหวัดปทุมธานี ที่ให้ค่า MIC ต่อยา vancomycin มากกว่า 4 μg/mL ขณะที่ *E. faecium* ตรวจไม่พบ *vanB* gene คิดเป็นการตรวจพบ *vanB* gene ร้อยละ 1.52 จากเชื้อ *E. faecalis* 66 ตัวอย่าง ที่แยกได้ และคิดเป็นร้อยละ 0.67 ของการตรวจพบ *vanB* gene ในสุกรทั้งหมด 150 ตัว หรือ ร้อยละ 4 ของการตรวจพบ *vanB* gene ในสุกร 25 ตัวอย่างจากจังหวัดปทุมธานี

5. การอภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อ VRE ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่บริโภค ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย ได้แก่ การใช้ยากลุ่ม glycopeptide ในฟาร์มที่เลือกทำการศึกษา การปนเปื้อนของยากลุ่ม glycopeptide ในสิ่งแวดล้อม การใช้ยาต้านจุลชีพอื่นในฟาร์มที่เลือกทำการศึกษา โดยเฉพาะการประกาศยกเลิกการใช้ avoparcin และ vancomycin ในอาหารสัตว์ตามพรบ.ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2542 เมื่อไม่มียา vancomycin ในสิ่งแวดล้อม จึงไม่เกิดการคัดเลือกเชื้อดื้อยากลุ่ม glycopeptide ปริมาณเชื้อ VRE จึงลดลง (Bager, Aarestrup, Madsen, & Wegener, 1999) อย่างไรก็ตามจากรายงานของอัญชลี ตัณฑ์สุภศิริ และคณะ ในปี พ.ศ. 2549 หลังประกาศห้ามใช้ยา avoparcin และ vancomycin ในอาหารสัตว์ ยังคงพบเชื้อ VRE ถึงร้อยละ 8 ในเนื้อไก่เช่นเดิม (Tansuphasiri, Khaminthakul, & Pandii, 2006) แต่ ดร.เพ็ญนภา มัธยมพงศ์ รายงานการศึกษาเชื้อ VRE ในเนื้อไก่ที่ใช้บริโภคพบว่าการปนเปื้อนของ VRE ลดลงเป็นลำดับ จากปี พ.ศ. 2544 พบร้อยละ 6.5 เหลือ ร้อยละ 0.3 ในปี พ.ศ. 2549 และในปี พ.ศ. 2555 ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ VRE ในเนื้อไก่ นับตั้งแต่มีการประกาศห้ามใช้ยากลุ่ม glycopeptide ในปี พ.ศ. 2542 อัตราการพบเชื้อ VRE ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่ลดลงจนตรวจไม่พบเชื้อในปี พ.ศ. 2555 แสดงว่าต้องใช้เวลาที่จะลดการคงอยู่ของเชื้อ VRE ในสิ่งแวดล้อมของฟาร์ม (Matayompong, 2012) หลังจากการประกาศห้ามใช้ยา avoparcin และ vancomycin ในอาหารสัตว์ในปี พ.ศ. 2542 ปี พ.ศ. 2554 จักรพันธ์ พิมาน และคณะ ยังคงตรวจพบเชื้อ VRE ในอุจจาระสุกรแม่พันธุ์จากฟาร์มในเขตภาคกลาง (จักรพันธ์ พิมาน และคณะ, 2554) ขณะที่ ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และคณะทำการเก็บตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อสุกร และเนื้อโคชนิดตัวอย่างละ 100 ตัวอย่าง ในระหว่างเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2548-กรกฎาคม พ.ศ. 2549 จากตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร พบการปนเปื้อนของ *E. faecalis* ชนิด *vanA* ในไก่เพียงร้อยละ 1 เท่านั้น โดยไม่พบใน เนื้อหมู และเนื้อวัว แสดงว่าปัจจุบันเชื้อ *Enterococcus* ที่ปนเปื้อนในอาหารไม่ได้เป็นแหล่งแพร่เชื้อ VRE ที่จะมีผลต่อปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศไทย (ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ, & กนกดล สิริวัฒนชัย., 2550)

อย่างไรก็ตามจากการทบทวนปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อ VRE ในประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ที่มีการห้ามใช้ยา avoparcin ในปี ค.ศ. 1986 สิ่งส่งตรวจจากสัตว์ในฟาร์มก็ตรวจพบเชื้อ VRE น้อยลงจนตรวจไม่พบในปี ค.ศ.1995 แต่ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 กลับตรวจพบเชื้อ VRE ในปริมาณน้อยๆในไก่กระทง ที่ตรวจพบได้เฉพาะเมื่อเพาะเชื้อโดยใช้ selective media ในอัตราที่เพิ่มจาก ร้อยละ 1 ในปี ค.ศ. 2000 เป็น ร้อยละ 40 ในปี ค.ศ. 2005 โดยเชื้อที่พบเป็นเชื้อ *E. faecium* ที่มี *vanA* gene ซึ่งสาเหตุของการปนเปื้อนเชื้อ VRE ในไก่กระทงในฟาร์มที่ไม่ใช้ยากลุ่ม glycopeptide ยังหาคำอธิบายไม่ได้ (Nilsson, 2012) การลดลงแล้วกลับมาตรวจพบเชื้อ VRE อีกโดยไม่ทราบสาเหตุ ทำให้การเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาชนิดนี้ยังจำเป็นต้องมีการตรวจกรองอย่างสม่ำเสมอ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ

E. faecalis ที่มี *vanB* gene ที่ให้ผลทดสอบความไวเป็น intermediate resistant เช่นเดียวกับผลการศึกษาในประเทศโปแลนด์ที่ตรวจพบ *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่มีผลผลทดสอบความไวเป็น intermediate resistant จากไก่กระทง (Stępień-Pyśniak et al., 2016)

ผลทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดอื่นของเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* พบเชื้อที่แยกได้จากสุกรดื้อยาหลายชนิดมากที่สุด โดยทั้ง *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกได้จากสุกรมีอัตราดื้อยา tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 84.2 และ 82.4 ตามลำดับ เชื้อที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของไก่ดื้อยาหลายชนิดรองลงมาโดยทั้ง *E. faecalis* และ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่มีอัตราดื้อยา erythromycin มากที่สุด ร้อยละ 94.7 และ 88.9 ตามลำดับ เชื้อที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของโคดื้อยาน้อยชนิดที่สุด โดยทั้ง *E. faecalis* และ *E. faecium* ดื้อยา tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 42.9 และ 25.0 ตามลำดับ จากรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus* ทั้ง 2 species แสดงว่ายังคงมีการใช้ยาต้านจุลชีพหลายชนิดกับสัตว์ที่ใช้บริโภค เพื่อป้องกันโรคและเร่งการเจริญเติบโต จึงเป็นเหตุให้เกิดการดื้อยาหลายชนิด (Novais et al., 2013, จักรพันธ์ พิมาน และคณะ, 2554)

6. บทสรุป

การศึกษาครั้งนี้แสดงว่าในประเทศไทยยังมีแนวโน้มการใช้ยาในสัตว์ที่ใช้บริโภค เชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ก็ถูกกระตุ้นและพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาได้ง่าย จนมีผลให้เกิดการดื้อต่อยาหลายชนิดที่พร้อมจะแพร่ระบาดสู่ชุมชนผ่านทางการบริโภคที่อาจได้รับเชื้อจากการรับประทานเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ปรุงไม่สุก หรือจากการที่เชื้อจากสิ่งปฏิกูลในฟาร์มปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อม และปนเปื้อนในผักและผลไม้ ในน้ำและในดิน นอกจากนี้ผู้บริโภคยังได้รับยาที่หลงเหลือในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เข้าสู่ร่างกายทำให้เชื้อประจำถิ่นในร่างกายของคนพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาได้ ทำให้คนและสัตว์เป็นรังโรคสำคัญของเชื้อดื้อยา โดยเฉพาะ *Enterococcus* ที่อาจก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่ยากต่อการรักษา เสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วย จึงควรมีการควบคุมการใช้ยาในการรักษา มีการควบคุมการใช้ยาในสัตว์ที่ใช้บริโภค มีการตรวจกรองระดับการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาทั้งในคนและในสัตว์ รวมทั้งศึกษาปัจจัยอื่นที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาในคนปกติ ซึ่งอาจจะเป็นพาหะของเชื้อดื้อยา ที่อาจนำไปสู่การเสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาที่มีมากยิ่งขึ้น และเพื่อเป็นการแก้ปัญหาอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการ วิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต โครงการวิจัยรหัสที่ สวจ.26/2557

8. เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมอาหารและยาสัตว์กรมปศุสัตว์. (2542). พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. 2542.

จักรพันธ์ พิมาน, วนิดา พัสดุรักษ์, ธัชเวชช์ กิมประสิทธิ์, อลงกต บุญสูงเนิน และ จันทิมา พฤกษากร. (2554). การคัดกรองหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในฟาร์มสุกรเขตภาคกลาง. In *Proceedings of the 49th Kasetsart University Annual Conference: Animals, Veterinary Medicine* (Vol. 1 - 4 ก.พ. 2554, pp. 132

- 140). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา; กระทรวงศึกษาธิการ; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี; กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม; กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร; สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ, & กนกดล สิริวัฒนชัย. (2550). ความชุกของเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อคซัยที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินในหอยแครง อาหารสัตว์ และเนื้อสัตว์ในประเทศไทย: รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยงบประมาณ พ.ศ. 2549 (สัญญาเลขที่ งป 045/2549). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Aarestrup, F. M. (2000). Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococcus faecium (GRE) from Broilers and Pigs in Denmark: Genetic Evidence that Persistence of GRE in Pig Herds Is Associated with Coselection by Resistance to Macrolides. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(7), 2774–2777.

Bager, F., Aarestrup, F. M., Madsen, M., & Wegener, H. C. (1999). Glycopeptide Resistance in *Enterococcus faecium* from Broilers and Pigs Following Discontinued Use of Avoparcin. *Microbial Drug Resistance*, *5*(1), 53–56.

CLSI. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement.* (CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;).

Courvalin, P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*, *42*(Supplement 1), S25–S34.

Donabedian, S. M., Perri, M. B., Abdujamilova, N., Gordoncillo, M. J., Naqvi, A., Reyes, K. C., Bartlett, P. (2010). Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Isolated from Swine in Three Michigan Counties. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(11), 4156–4160.

Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, *155*(6), 1749–1757.

Kariyama, R., Mitsuhata, R., Chow, J. W., Clewell, D. B., & Kumon, H. (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(8), 3092–3095.

Kariyama, R., Mitsuhata, R., Chow, J. W., Clewell, D. B., & Kumon, H. (2000). Simple and Reliable Multiplex PCR Assay for Surveillance Isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(8), 3092–3095.

Linden, P. K. (2002). Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. *Drugs*, *62*(3), 425–441.

Manero, A., & Blanch, A. R. (1999). Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key, *65*(10), 4425–4430.

Matayompong, P. (2012). *Vancomycin Resistant Enterococci–Thailand Experience.*

Nilsson, O. (2012). Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. *Infection Ecology & Epidemiology*, *2*(1), 16959.

Ozawa, Y., Tanimoto, K., Nomura, T., Yoshinaga, M., Arakawa, Y., & Ike, Y. (2002). Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6457–6461.

Peter, A., Radhakrishnan, E. K., Mathew, J., & Zachariaa, S. (2012). Characterization of vancomycin resistant Enterococcus faecium from clinical and chicken sources. *Asian Pac J Trop Biomed, 2*, 1738–1741.

Ramos, S., Igrejas, G., Rodrigues, J., Capelo-Martinez, J.-L., & Poeta, P. (2012). Genetic characterisation of antibiotic resistance and virulence factors in vanA-containing enterococci from cattle, sheep and pigs subsequent to the discontinuation of the use of avoparcin. *The Veterinary Journal*, *193*(1), 301–303.

Sorum, M., Johnsen, P. J., Aasnes, B., Rosvoll, T., Kruse, H., Sundsfjord, A., & Simonsen, G. S. (2006). Prevalence, Persistence, and Molecular Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococci in Norwegian Poultry and Poultry Farmers 3 to 8 Years after the Ban on Avoparcin. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 516–521.

Stępień-Pyśniak, D., Marek, A., Banach, T., Adaszek, Ł., Pyzik, E., Wilczyński, J., & Winiarczyk, S. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* strains isolated from poultry. *Acta Veterinaria Hungarica*, *64*(2), 148–163.

Tansuphasiri, U., Khaminthakul, D., & Pandii, W. (2006). Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *37*(1), 162–170.

มหาวิทยาลัยรังสิต