การคัดกรองหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในฟาร์มสุกร เขตภาคกลาง

Screening of vancomycin-resistant enterococci in pig farms of the Central Region, Thailand

จักรพันธ์ พิมาน[1] วนิดา พัสดุรักษ์[1] ธัชเวชช์ กิมประสิทธิ์[1] อลงกต บุญสูงเนิน[2] และ **จันทิมา พฤกษากร**[1]

Chakrabhandhu Pimarn[1] Wanida Passadurak[1] Thatchawet Kimprasit[1]

Alongkot Boonsoongnern[2] and Chantima Pruksakorn[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาแบบ cross-sectional study นี้ ได้ทำการคัดกรองหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant enterococci หรือ VRE) ในสุกรแม่พันธุ์ จาก 6 ฟาร์ม ใน 5 จังหวัดภาคกลาง ของประเทศไทย ตัวอย่างอุจจาระถูกสุ่มเก็บจากแม่พันธุ์สุกรโดยเทคนิคปลอดเชื้อ และทำการเพาะแยกเชื้อลงบนอาหาร bile-esculin azide agar ที่มีส่วนผสมของยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ถูกทดสอบเอนไซม์ catalase และย้อมสีแกรม ตัวอย่างที่แยกเชื้อได้เป็นแกรมบวกรูปร่างกลม และให้ผลเอนไซม์ catalase เป็นลบ บันทึกผลเป็นบวกต่อการตรวจหาเชื้อ VRE เบื้องต้น ผลการทดลองทั้งหมด 71 ตัวอย่าง พบเชื้อ VRE 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23.9 โดยฟาร์ม A พบ 5 ตัวอย่าง จาก 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 41.7 ฟาร์ม B พบ 5 ตัวอย่าง จาก 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 41.7 ฟาร์ม C พบ 2 ตัวอย่าง จาก 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.7 ฟาร์ม D พบ 3 ตัวอย่าง จาก 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 ฟาร์ม E พบ 2 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.3 และฟาร์ม F ไม่พบเชื้อ VRE เลย จาก 10 ตัวอย่าง และข้อมูลที่ได้เบื้องต้น นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับตัวยาต้านจุลชีพที่ผสมลงในอาหารสุกร และขนาดของฟาร์ม

ABSTRACT

A cross-sectional study was performed to screen vancomycin-resistant enterococci (VRE) in pigs from 6 farms in 5 provinces of the Central Region, Thailand. Fecal samples were collected aseptically from breeding sows, and screened for VRE by plating on a bile-esculin azide selective agar supplemented with 6 μg/ml vancomycin. An isolate was then tested for catalase and Gram stain. A positive isolate was gram-positive cocci and tested negative for catalase. Of 71 samples, 17 samples were presumptive for VRE (23.9%), in which farm A was found in five of 12 samples (41.7%), farm B was found in five of 12 samples (41.7%), farm C was found in two of 12 samples (16.7%), farm D was found in three of 10 samples (30%), and farm E was found in two of 15 samples (13.3%). In farm F, none of VRE was isolated. Correlation between the presence of VRE in pig farms and antimicrobial regimens supplemented in swine feed, as well as size of farm was discussed.

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

[2]ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

Key word: vancomycin-resistant enterococci, antimicrobial resistance, pigs, breeding sows, *Enterococcus spp.*
e-mail address: fvetctm@ku.ac.th

คำนำ

แบคทีเรียใน genus *Enterococcus* จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) อาจพบเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือต่อกันเป็นสาย และให้ผล catalase เป็นลบ ในอดีตถูกจัดอยู่ใน group D streptococci ต่อมาจากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ จึงถูกจัดใหม่ให้อยู่ใน genus *Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984) โดยธรรมชาติของแบคทีเรียใน genus นี้ พบประจำถิ่นอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ ยังสามารถพบได้ในทางเดินปัสสาวะ อวัยวะสืบพันธุ์ และช่องปาก และเนื่องจากมีความสามารถทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี จึงพบ enterococci ทั่วไป ทั้งใน ดิน น้ำ พืช และอาหาร (Devriese *et al*., 1992; Murray, 1990) ในทางการแพทย์ enterococci มีบทบาทที่สำคัญต่อการติดเชื้อเริ่มในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และการติดต่อจากผู้ป่วยผ่านทางการสัมผัส โรคติดเชื้อ enterococci แบ่งตามระบบ ได้แก่ โรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) โรคติดเชื้อในช่องท้อง และอุ้งเชิงกราน (intraabdominal and pelvic infection) การติดเชื้อของบาดแผล และเนื้อเยื่ออ่อน (wound and soft tissue infections) โรคลิ้นหัวใจอักเสบ (endocarditis) และการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) (ภัทรชัย, 2549; Murray, 1990) ซึ่ง species ที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ คือ *Enterococcus faecalis* และ *E. faecium* (Facklam *et al*., 1999)

โดยปกติแล้ว enterococci มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด และมีแบบแผนความไวต่อยาที่ไม่แน่นอน (ภัทรชัย, 2549) การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของ enterococci ที่มีความร้ายแรง และเป็นปัญหาต่อการรักษาผู้ติดเชื้อมาก คือ enterococci ที่ดื้อต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant enterococci) หรือเรียกสั้นๆ ว่า VRE เนื่องจากพบว่าเชื้อ VRE มักมีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพอื่นหลายๆ ชนิดด้วย (Murray, 1997) ยกเว้นยา quinupristin/dalfopristin (Synercid) และ linezolid (Zyvox) ซึ่งมีราคาแพง จึงมีข้อจำกัดในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ ทำให้การรักษาผู้ป่วยยุ่งยากมากขึ้น และเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วย เหล่านี้ ล้วนส่งผลก่อให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจและสังคม นอกจากนี้ เชื้อ VRE บางสายพันธุ์ มีสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังเชื้ออื่นๆ ได้ด้วย รวมถึงเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรค หรือมีข้อจำกัดในการใช้ยามากอยู่แล้ว เช่น *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ methicillin-resistant strain (MRSA) (Michel and Gutmann, 1997; Low *et al*., 1999) ดังนั้นถ้าไม่มีการเฝ้าระวัง และควบคุมเกี่ยวกับเชื้อดื้อยานี้ อาจก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาที่รุนแรงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการติดเชื้อเริ่มในโรงพยาบาลของ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin ทั่วประเทศ ที่เพิ่มขึ้นถึง 20 เท่า ภายในระยะเวลา 4 ปี จากปี พ.ศ. 2532 ถึง 2536 (Center for Disease Control and Prevention [CDC], 1993) และพบว่า การระบาดของเชื้อ VRE เกี่ยวข้องกับการใช้ยา vancomycin ที่เพิ่มขึ้น ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแกรมบวกที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam เช่น penicillins และ cephalosporins และผู้ป่วยติดเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ MRSA (Shlaes, 1992) นอกจากการเพิ่มขึ้นของการใช้ยา vancomycin ในโรงพยาบาล ที่เป็นสาเหตุสำคัญของอุบัติการณ์ของเชื้อ VRE ที่เพิ่มขึ้นแล้ว ในประเทศทางยุโรปยังพบว่าเชื้อ VRE มีแหล่งกักเก็บเชื้อมาจากสัตว์ โดยมีสาเหตุมาจากการใช้ avoparcin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม

glycopeptides เช่นเดียวกับ vancomycin ยา avoparcin ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในปศุสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไก่และสุกร โดยมีการพบ VRE ชุกตามฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่มีการใช้ avopacin ผสมในอาหารสัตว์ (Aarestrup, 1995; Klare *et al*., 1995; Bager *et al*., 1997) อุบัติการณ์ของ VRE ในอุจจาระสัตว์สูงขึ้น แล้วอาจระบาดมาสู่คนได้ จากการบริโภคเนื้อสัตว์ปนเปื้อนที่ปรุงไม่สุก หรือจากการบริโภคอาหารที่ปรุงสุกแต่มีการปนเปื้อนของเชื้อ (Stobberingh *et al*., 1999; Wegener *et al*., 1997, 1999)

ในปี พ.ศ. 2540 ประเทศในเครือสหภาพยุโรป จึงได้ประกาศยกเลิกการใช้ avoparcin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตเป็นต้นมา ทำให้ความชุกของ VRE ในทั้งในมนุษย์และในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ลดลงอย่างรวดเร็ว (Pantosti *et al*., 1999; Klare *et al*., 1999) อย่างไรก็ดี ในต่างประเทศ เช่น นอร์เวย์ กรีซ และไต้หวัน ยังพบความชุกของเชื้อ VRE ที่สูงขึ้นในฟาร์มสัตว์ (ร้อยละ 16-85) หลังจากการประกาศห้ามใช้ avoparcin ซึ่งหมายความว่ายังมีปัจจัยอื่น นอกเหนือจากการใช้ยา avoparcin ที่เป็นสาเหตุของการเกิด หรือการคงอยู่ของเชื้อ VRE (Borgen *et al*., 2000; Aarestrup, 2000; Boerlin *et al*., 2001; Hammerum *et al*., 2004; Lauderdale *et al*., 2007; Kotzamanidis *et al*., 2009)

นอกจากเชื้อ VRE จะเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของโลกแล้ว ยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากประเทศญี่ปุ่น ในปี พ.ศ. 2541 ได้พบผู้เสียชีวิตจากเชื้อ VRE จึงเป็นสาเหตุให้กระทรวงสาธารณสุข นำโดยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. Yasuyoshi Ike ตรวจแหล่งที่มาของเชื้อ VRE และสามารถแยกเชื้อ VRE ในเนื้อไก่นำเข้าจากประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย และพบการปนเปื้อนของเชื้อ VRE ในเนื้อไก่ไทยมากถึงร้อยละ 20 (Ike *et al*., 1999) ทำให้ประเทศไทยถูกระงับการส่งออกเนื้อไก่ไปยังประเทศญี่ปุ่น และสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างมาก กรมปศุสัตว์จึงได้มีประกาศห้ามใช้ยา avoparcin ในปศุสัตว์ ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 และแก้ไขเพิ่มเติม ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2542 และประกาศห้ามใช้ยาต้านจุลชีพอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ยา vancomycin, olaquindox, chloramphenicol, ciprofloxacin และ sulfonamides เป็นต้น อย่างไรก็ดี ประเทศไทยยังมีการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มสุกร และฟาร์มไก่อยู่มาก ทั้งเพื่อป้องกันและรักษาโรค และเพื่อเร่งการเจริญเติบโตที่ใช้ในระดับต่ำๆ ตัวอย่างเช่น amoxicillin, chlortetracycline, kanamycin และ gentamycin เป็นต้น

การศึกษาความชุกของเชื้อ VRE ในประเทศไทย ได้มีการสำรวจในเนื้อไก่แช่แข็งส่งออก และตามสิ่งแวดล้อม พบร้อยละ 9.7 และ 10.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ในร้อยละที่สูง โดยพบร้อยละ 50 ในเนื้อไก่ และร้อยละ 42 ในสิ่งแวดล้อม (Tansuphasiri *et al*., 2006) ยังมีการสำรวจเชื้อ VRE ในอุจจาระของสุนัขและแมว ซึ่งพบร้อยละ 19.5 ในสุนัข (41 จาก 210 ตัวอย่าง) และร้อยละ 22.8 ในแมว (26 จาก 114 ตัวอย่าง) (Chalermchaikit *et al*., 2005) อย่างไรก็ดี จากการค้นหาในฐานข้อมูลต่างๆ ยังไม่พบการรายงานเชื้อ VRE ในฟาร์มสุกร ดังนั้นเป้าหมายของการศึกษานี้ คือ เพื่อคัดกรองหาเชื้อ VRE ในสุกร เขตภาคกลาง ร่วมกับการศึกษาข้อมูลการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์ม ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ VRE และติดตามผลการเกิดและ/หรือการคงอยู่ของเชื้อ VRE หลังการประกาศห้ามใช้ avoparcin ในฟาร์มสุกรของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ฟาร์มสุกรและการเก็บตัวอย่าง

ฟาร์มสุกรตัวอย่างจำนวน 6 ฟาร์ม ตั้งอยู่ในจังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี และนครปฐม และมีสัตว์แพทย์ควบคุมการใช้ยาให้เป็นไปตามมาตรฐาน และปริมาณที่เหมาะสม ในการเก็บตัวอย่างจากสุกรแต่ละฟาร์ม ทำโดยการสุ่มจำนวน 10-15 ตัวอย่าง ร่วมกับการบันทึกข้อมูลการใช้ยาต้านจุลชีพที่ผสมลงในอาหาร จากการสอบถามสัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์ม และจากบันทึกประวัติการใช้ยา

ตัวอย่างสำหรับการศึกษา ได้จากอุจจาระสุกรระยะแม่พันธุ์ โดยเก็บด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ และรักษาความเย็นบนน้ำแข็ง ก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการเพาะแยกเชื้อต่อไป

การเพาะแยกเชื้อเพื่อคัดกรองหา VRE ในตัวอย่างอุจจาระสุกร

การแยกเชื้อจากอุจจาระสุกร ทำโดยการผสมตัวอย่าง 1 กรัม ลงใน 9 มิลลิลิตร ของ peptone saline diluent (0.1 กรัม peptone และ 0.85 กรัม NaCl มีค่า pH 7 ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) และทำให้ตัวอย่างเจือจางด้วย dilution ค่าต่างๆ แล้วทำการเพาะเชื้อ โดยการเกลี่ยตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ bile-esculin azide agar (Becton Dickinson, Oxford, UK) ที่มียา vancomycin (Sigma-Alarich™, St. Louis, MO) ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (BEV) เพื่อคัดเลือกเบื้องต้นสำหรับเชื้อ VRE แล้วนำไปบ่มเพาะที่ 37 องศาเซสเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การตรวจสอบการเจริญเติบโตของ *Enterococcus* spp. จากตัวอย่าง ได้ทำควบคู่กันไปด้วยโดยการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ bile-esculin azide agar (Becton Dickinson) ที่ไม่ใส่ยา vancomycin

สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ และเลือกจานเพาะเชื้อ BEV ที่พบโคโลนีและอาหารเลี้ยงเชื้อโดยรอบเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ สุ่มเลือกโคโลนีบนจานเพาะเชื้อเหล่านั้น มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บน tryptic soy agar นำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบเอนไซม์ catalase และย้อมสีแกรม ตัวอย่างที่ได้โคโลนีให้ผลเอนไซม์ catalase เป็นลบ และย้อมติดสีแกรมเป็นแกรมบวกรูปร่างกลม บันทึกผลเป็นบวกสำหรับเชื้อ VRE สำหรับตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อขึ้นบน BEV บันทึกผลเป็นลบ หลังจากนั้นเก็บเชื้อที่แยกได้ใน Luria-Bertani broth ที่มี glycerol ร้อยละ 20 ที่ -80 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพต่อไป

ผลและวิจารณ์

การใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มสุกร

ฟาร์มที่เก็บตัวอย่างมีการใช้ยาในแม่พันธุ์สุกร เพื่อป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร โดยผสมยาลงในอาหาร และให้ตลอดอายุของแม่พันธุ์สุกร มีตัวยาที่ให้เหมือนกันคือ ยา chlortetracycline ขนาดที่ใช้คือ 400 ppm และยา amoxicillin ขนาดที่ใช้ คือตั้งแต่ 250 ถึง 300 ppm นอกจากนี้ในฟาร์มขนาดใหญ่ มีการใช้ยา tilmicosin และยา colistin ด้วย ขนาดที่ใช้ คือ 250 ppm และ 80 ppm ตามลำดับ รูปแบบของยาที่ใช้ในฟาร์มแต่ละฟาร์ม ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Characteristics of sampled farms, antimicrobial usage, and number of pigs screened positive for VRE.

Farm	Number of breeding sows	Antibiotic supplemented	No. of fecal samples	No. of samples screened positive for VRE (%)
A	500	C.T.C + Amoxicillin	12	5 (41.7)
B	400	C.T.C + Amoxicillin	12	5 (41.7)
C	1,200	C.T.C + Amoxicillin	12	2 (16.7)
D	4,000	C.T.C + Amoxicillin + Tilmicosin C.T.C + Amoxicillin + Colistin	10	3 (30)
E	1,100	C.T.C + Amoxicillin	15	2 (13.3)
F	300	C.T.C + Amoxicillin	10	0 (0)
Total			71	17 (23.9)

C.T.C., chlortetracycline

Tilmicosin เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม macrolide มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ใช้ในโค กระบือ แพะ แกะ และสุกร สำหรับการป้องกันและรักษาโรคของระบบทางเดินหายใจ จากการติดเชื้อ *Haemophilus* spp., *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida*, *Actinobacillus pleuropneumonia*e และ *Mycoplasma* spp. เป็นต้น (Moore *et al*., 1996; Olson and Backstrom, 2000) สำหรับสุกรที่ติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินหายใจเหล่านี้ร่วมกับการติดเชื้อไวรัส เช่น porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS virus) จะทำให้ความรุนแรงของโรคมากขึ้น ดังนั้นในฟาร์มสุกรที่พบหรือเสี่ยงต่อการระบาดของ PRRS virus นายสัตวแพทย์จะพิจารณาให้ยา tilmicosin ผสมลงในอาหารด้วย เพื่อป้องกันการติดเชื้อทางเดินหายใจที่รุนแรงในฝูงสุกร สำหรับยาปฏิชีวนะ colistin หรือเรียกว่า polymyxin E มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์สายยาว ที่ขดตัวเป็นวงกลม และมีส่วนหางที่มีคุณลักษณะไม่ชอบน้ำ สามารถจับตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้สูญเสียโครงสร้างและหน้าที่ในการเลือกสรรสารผ่านเข้าออกเซลล์ ยา colistin มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เช่น *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* เป็นต้น มักใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ beta-lactam หรือดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายตัว (Falagas *et al*., 2008) ในฟาร์มสุกร ยา colistin จะถูกใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคของระบบทางเดินอาหาร ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Escherichia coli* ที่มักปนเปื้อนในน้ำดื่มของสุกร

การเพาะแยกเชื้อเพื่อคัดกรองหา VRE ในตัวอย่างอุจจาระสุกร

จากการตรวจหาเชื้อ VRE เบื้องต้น พบตัวอย่างที่เป็นบวก ในฟาร์ม A, B, C, D และ E จำนวน 5, 5, 2, 3, และ 2 ตัวอย่าง ในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 12, 12, 12, 10 และ 15 คิดเป็นร้อยละ 41.7, 41.7, 16.7, 30 และ 13.3

ตามลำดับ สำหรับฟาร์ม F ในการสุ่มทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ VRE (Table 1) ข้อมูลที่ได้จึงชี้แนะถึงความสำคัญในการศึกษาต่อไป ซึ่งรวมถึงการจัดจำแนก *Enterococcus* species การตรวจวัดระดับการดื้อต่อยาของเชื้อ และความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ VRE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การคัดกรองเชื้อ VRE จากอุจจาระสุกร โดยการศึกษานี้ ทำโดยการใช้ bile-esculin azide agar ที่ผสมยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อนี้เป็นอาหารที่ใช้คัดเลือก *Enterococcus* spp. และเป็นที่นิยมใช้ในการคัดกรอง และศึกษาเชื้อ VRE ในตัวอย่างต่างๆ รวมทั้งอุจจาระสุกร (Edberg *et al*., 1994; Landman *et al*., 1996; Kempf *et al*., 2008) โดยหลักการอาศัยความสามารถของเชื้อในการย่อยสลาย esculin และความสามารถในการทนทานต่อ bile และ azide ปริมาณของยา vancomycin ที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นระดับที่สูงกว่าระดับ susceptibility (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ต่ำกว่าค่าความเข้มข้นของยา vancomycin ในระดับปานกลาง (8-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาหลายรายงานที่ใช้ยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อ VRE ผลบวกปลอมอาจพบได้ จากแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ genus *Enterococcus* ได้แก่ *Lactococcus* และ *Pediococcus* อย่างไรก็ตาม จากการรายงานสามารถพบ *Pediococcus* ได้ และพบในสัดส่วนที่น้อย (Sahm *et al*., 1997; Drews *et al*., 2006)

ฟาร์ม A, B และ F ซึ่งเป็นฟาร์มขนาดเล็ก มีจำนวนแม่พันธุ์น้อยกว่า 1,000 ตัว และเมื่อเปรียบเทียบกับฟาร์ม C และ E ซึ่งเป็นฟาร์มขนาดใหญ่ แต่มีการใช้ตัวยาผสมลงในอาหารสุกรเหมือนกัน คือ chlortetracycline และ amoxicillin พบว่าสัดส่วนตัวอย่างที่พบเชื้อ VRE ในฟาร์มขนาดเล็กมีทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ใน 34 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 29.4 ในฟาร์มขนาดใหญ่พบทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ใน 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.8 ดังนั้นในฟาร์มขนาดเล็กพบเชื้อ VRE ในตัวอย่างมากกว่าฟาร์มขนาดใหญ่ถึง 2 เท่า ในฟาร์ม D มีการใช้ตัวยาผสมลงในอาหารสุกรแตกต่างจากฟาร์มอื่น คือ มีตัวยา pilmicosin และ colistin ด้วย นอกเหนือจาก chlortetracycline และ amoxicillin เมื่อเปรียบเทียบกับฟาร์ม C และ E ซึ่งเป็นฟาร์มขนาดใหญ่เหมือนกัน พบว่ามีการพบเชื้อ VRE ในสุกรร้อยละ 30 เปรียบเทียบกับร้อยละ 14.8 ตามลำดับ คิดเป็นความแตกต่างกันถึง 2 เท่า จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการพบเชื้อ VRE และความสัมพันธ์กับปัจจัยการใช้ตัวยา และขนาดของฟาร์มต่อไป ซึ่งจะช่วยอธิบายการเกิด และ/หรือการคงอยู่ของเชื้อ VRE ในฟาร์มสุกร

สรุป

การศึกษานี้เป็นการรายงานถึงผลการตรวจคัดกรองเชื้อ VRE ที่แยกได้จากอุจจาระสุกร ในฟาร์มของเขตภาคกลาง พบตัวอย่างที่เป็นบวก ในฟาร์ม A, B, C, D และ E จำนวน 5, 5, 2, 3, และ 2 ในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 12, 12, 12, 10 และ 15 คิดเป็นร้อยละ 41.7, 41.7, 16.7, 30 และ 13.3 ตามลำดับ สำหรับฟาร์ม F ในการสุ่มทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ VRE ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ VRE ตรวจวัดระดับการดื้อต่อยาของเชื้อ และความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา รวมทั้งศึกษาปัจจัยอื่นนอกเหนือจากการใช้ avoparcin ที่เกี่ยวข้องกับการการเกิด และ/หรือการคงอยู่ของเชื้อ VRE ในฟาร์มสุกรต่อไป เพื่อการแก้ไขปัญหาได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

ภัทรชัย กีรติสิน. 2549. **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์**. วี.เจ. พริ้นติ้ง, กรุงเทพฯ.

Aarestrup, F.M. 1995. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. **Microb Drug Resist.** 1(3): 255-257.

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. **J Clin Microbiol.** 38(7): 2774-2777.

Bager, F., M. Madsen, J. Christensen, and F.M. Aarestrup. 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. **Prev Vet Med.** 31(1-2): 95-112.

Boerlin, P., A. Wissing, F.M. Aarestrup, J. Frey, and J. Nicolet. 2001. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs. **J Clin Microbiol.** 39(11): 4193-4195.

Borgen, K., G.S. Simonsen, A. Sundsfjord, Y. Wasteson, O. Olsvik, and H. Kruse. 2000. Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. **J Appl Microbiol.** 89(3): 478-485.

Centers for Disease Control and Prevention. 1993. Nosocomial *Enterococcus* resistant to vancomycin: United States, 1989-1993. **Morb Mortal Wkly Rep.** 42: 597-599.

Chalermchaikit, T., K. Siriwattanachai, N. Lertworapreecha, W. Suriyasathaporn, and S. Kaewthama. 2005. **Chiang Mai Vet J.** 3: 5-14.

Devriese, L.A., M.D. Collins, and R. Wirth. 1992. The genus *Enterococcus*, pp. 1465-1481. In A. Balows, H.G. Truper, W. Harder, and K.H. Schleifer., eds. **The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.** Springer-Verlag Press, New York.

Drews, S.J., G. Johnson, F. Gharabghi, M. Roscoe, A. Matlow, R. Tellier, and S.E. Richardson. 2006. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **J Clin Microb.** 44(4): 1578-1580.

Edberg, S.C., C.J. Hardalo, C. Kontnick, and S. Campbell. 1994. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. **J Clin Microbiol.** 32(9): 2182-2184.

Facklam, R.R., D. Sahm, and L.M. Teixeira. 1999. *Enterococcus*, pp. 297-305. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Yolken., eds. **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press, Washington DC.

Falagas, M.E., A.P. Grammatikos, and A. Michalopoulos. 2008. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 6(5): 593-600.

Hammerum, A.M., C.H. Lester, J. Neimann, L.J. Porsbo, K.E. Olsen, L.B. Jensen, H.D. Emborg, H.C. Wegener, and N. Frimodt-Moller. 2004. A vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate from a Danish healthy volunteer, detected 7 years after the ban of avoparcin, is possibly related to pig isolates. **J Antimicrob Chemother**. 53(3): 547-549.

Ike, Y., K. Tanimoto, Y. Ozawa, T. Nomura, S. Fujimoto, and H. Tomita. 1999. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. **Lancet** 353(9167): 1854.

Kempf, I., G. Hellard, A. Perrin-Guyomard, M. Gicquel-Bruneau, P. Sanders, and R. Leclercq. 2008. Prevalence of high-level vancomycin-resistant enterococci in French broilers and pigs. **Int J Antimicrob Agents**. 32(5): 463-464.

Klare, I., H. Heier, H. Claus, G. Böhme, S. Marin, G. Seltmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova, and W. Witte. 1995. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. **Microb Drug Resist**. 1(3): 265-272.

Klare, I., D. Badstübner, C. Konstabel, G. Böhme, H. Claus, and W. Witte. 1999. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. **Microb Drug Resist**. 5(1): 45-52.

Kotzamanidis, C., A. Zdragas, A. Kourelis, E. Moraitou, A. Papa, V. Yiantzi, C. Pantelidou, and M. Yiangou. 2009. Characterization of vanA-type *Enterococcus faecium* isolates from urban and hospital wastewater and pigs. **J Appl Microbiol**. 25 [Epub ahead of print].

Landman, D., J.M. Quale, E. Oydna, B. Willey, V. Ditore, M. Zaman, K. Patel, G. Saurina, and W. Huang. 1996. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. **J Clin Microbiol**. 34(3): 751-752.

Lauderdale, T.L., Y.R. Shiau, H.Y. Wang, J.F. Lai, I.W. Huang, P.C. Chen, H.Y. Chen, S.S. Lai, Y.F. Liu, and M. Ho. 2007. Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. **Environ Microbiol**. 9(3): 819-823.

Low, D.E., J.D. Kellner, and G.D. Wright. 1999. Superbugs: How They Evolve and Minimize the Cost of Resistance. **Curr Infect Dis Rep**. 1(5): 464-469.

Michel, M., and L. Gutmann. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. **Lancet** 349(9069): 1901-1906.

Moore, G.M., R.P. Basson, and L.V. Tonkinson. 1996. Clinical field trials with tilmicosin phosphate in feed for the control of naturally acquired pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in swine. **Am J Vet Res.** 57: 224–228.

Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin Microbiol Rev.** 3(1): 46-65.

Murray, B.E. 1997. Vancomycin-resistant enterococci. **Am J Med.** 102(3): 284-293.

Olson, L.B., and L.R. Backstrom. 2000. The effect of tilmicosin in minimizing atrophic rhinitis, pneumonia, and pleuritis in swine. **Swine Health Prod.** 8: 263–268.

Pantosti, A., M. Del Grosso, S. Tagliabue, A. Macrì, and A. Caprioli. 1999. Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban. **Lancet** 354(9180): 741-742.

Sahm, D.F., L. Free, C. Smith, M. Eveland, and L.M. Mundy. 1997. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. **J Clin Microbiol.** 35(8): 2026-2030.

Schleifer, K.H., and R. Kilpper-Balz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **Int J Sys Bacteriol.** 34: 31–34.

Shlaes, D.M. 1992. Vancomycin-resistant bacteria. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 13: 193-194.

Stobberingh, E., A. van den Bogaard, N. London, C. Driessen, J. Top, and R. Willems. 1999. *Enterococci* with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub) urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? **Antimicrob Agents Chemother.** 43(9): 2215-2221.

Tansuphasiri, U., D. Khaminthakul, and W. Pandii. 2006. Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 37(1): 162-170.

Wegener, H.C., M. Madsen, N. Nielsen, and F.M. Aarestrup. 1997. Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. **Int J Food Microbiol.** 35(1): 57-66.

Wegener, H.C., F.M. Aarestrup, L.B. Jensen, A.M. Hammerum, and F. Bager. 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. **Emerg Infect Dis.** 5(3): 329-335.