รายงานการวิจัย

ความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคแบคทีเรียในปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง และการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาต้านจุลชีพในปลานิลที่เลี้ยงบริเวณแม่น้ำตาปี จังหวัดนครศรีธรรมราช

Prevalence and risk factor for tilapia pathogen bacteria in cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*), and investigate drug resistance bacteria of tilapia pathogen bacteria in Tapi river, Nakhon si thammarat province

สุไหลหมาน หมาดโหยด Sulaiman Madyod, Asst.Prof.

สุณิษา คงทอง Sunisa Khongthong, Ms

อุมาพร ขิมมากทอง Umaporn Khimmakthong, Asst,Prof.

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้หน่วยงาน ประจำปี พ.ศ. 2562

ความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคแบคทีเรียในปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง และการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาต้านจุลชีพในปลานิลที่เลี้ยงบริเวณแม่น้ำตาปี จังหวัดนครศรีธรรมราช

สุไหลหมาน หมาดโหยด[1] สุณิษา คงทอง[1] และอุมาพร ขิมมากทอง[1]

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจสอบการดื้อยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลโดยศึกษาแบคทีเรียที่สำคัญในการก่อโรคในปลานิล 3 ชนิดคือ *Streptococcus agalactiae, Flavobacterium columnare, Aeromonas hydrophila* จากการเก็บตัวอย่างปลานิลที่ป่วยตายจากกระชังไม่พบการติดเชื้อ *F. columnare* ในช่วงระยะที่ทำการทดลอง พบการติดเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* จากนั้นทำการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จำนวน 8 ชนิด พบว่าทั้ง *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* มีการดื้อยา cephalexin สูงที่สุด รองลงมา Tetracycline, Amoxicillin-clavulanate, Oxytetracycline และต่ำสุดคือ Enrofloxacin, Gentamicin และไม่พบการดื้อต่อยา Sulfamethoxazole และ Ciprofloxacin การดื้อยาที่เกิดขึ้นส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากแหล่งน้ำมีการปนเปื้อนน้ำทิ้งชุมชน หรือน้ำทิ้งจากโรงพยาบาล และบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำบริเวณต้นน้ำ ซึ่งอาจส่งผลให้แบคทีเรียในแม่น้ำมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นได้ เช่นกัน แนวทางการใช้ระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์สัตว์น้ำที่ต้านทานโรค และการใช้จุลินทรีย์และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อลดการปนเปื้อนที่จะนำไปสู่การดื้อยาของแบคทีเรีย

คำสำคัญ: ความชุก ปัจจัยเสี่ยง เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ปลานิล

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

Prevalence and risk factor for tilapia pathogen bacteria in cage-cultured tilapia (*Oreochromis* niloticus), and investigate drug resistance bacteria of tilapia pathogen bacteria in Tapi river, Nakhon si thammarat province

Sulaiman Madyod[1] Sunisa Khongthong[1] and Umaporn Khimmakthong,[1]

Abstract

The objectives of this study is to investigate the antibiotic resistance of bacteria isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), which studies of the significant Pathogenic bacteria in those three species of Nile Tilapia, which consist of *Streptococcus agalactiac*, *Flavohacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila* As the results from sampling of Nile tilapia that died of infection in the floating basket, it has no infection from *F. columnare*. In the testing phase, it was found the infection of *S. agalactiae* and *A. hydrophila*. Then there were tested for antibiotic resistance for 8 types of Antibiotics, it was found that both *S. agalactiae* and *A. hydrophila* have the highest level of cephalexin resistance, the lower was Tetracycline, Amoxicillin-clavalanate, Oxytetracycline and the lowest was Enrofloxacin, Gentamicin. There were not found any resistance to Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin. It was found that, antibiotic resistance partially arises from the contaminants from urban area or waste water from hospital and superior fish ponds, which also affected specie development of bacteria for antibiotic resistance. The methods of biosecurity, selection and varietal improvement of disease-resistant aquatic animals, microorganism and immunostimulants are very important to reduce contamination which leads to antibiotic resistance.

Keywords : Prevalence, risk factor, drug resistance bacteria, Nile tilapia

---

[1] Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ของหน่วยงาน ประจำปี พ.ศ. 2562 ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบุคคลต่างๆที่เกี่ยวข้องดังนี้ นางสาวสุภาพร หนูชู นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์วิจัยและคลินิกสุขภาพสัตว์น้ำ ที่ช่วยเหลือทางด้านการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ ชลธิชา คงเรือง ชุตินันท์ จริตงาม แสนภูมิ บุณยรัตน์ นักศึกษาชั้นปีที่ 6 นักศึกษาช่วยวิจัย

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่อนุเคราะห์เครื่องมือวิจัยขั้นสูงให้ได้ทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการจนงานวิจัยประสบผลสำเร็จ

สุไหลหมาน หมาดโหยด
สุณิษา คงทอง
อุมาพร ขิมมากทอง
กันยายน 2562

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ……	(1)
Abstract……..	(2)
กิตติกรรมประกาศ…….	(3)
สารบัญ……..	(4)
สารบัญตาราง.....	(5)
สารบัญภาพ……...	(6)
บทนำ……	1
วัตถุประสงค์.....	2
การตรวจเอกสาร.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	8
ผลการทดลอง…….....	12
อภิปรายผล…….....	15
สรุป…….	17
เอกสารอ้างอิง.....	18
ภาคผนวก.....	21

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในปลานิลโดยเทคนิคทางพีซีอาร์	10
2	จำนวนโคโลนีที่ให้ผล positive ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคทางพีซีอาร์และค่าความชุก	12
3	การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย	13

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิค Disk diffusion assay	14

บทนำ

การเลี้ยงปลานิลจัดเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย เพื่อการบริโภคในประเทศและการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศทั่วโลก ทั้งสหรัฐอเมริกายุโรปออสเตเรียและเอเชีย โดยประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับที่สี่ของโลกในการผลิตปลานิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มีปริมาณผลผลิตประมาณ 200,000 เมตริกตัน จากปริมาณการผลิตทั้งหมดทั่วโลกประมาณ 3,000,000เมตริกตัน (Darryl, 2011) ในปัจจุบันรูปแบบการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยมักอยู่ในลักษณะการเลี้ยงอย่างหนาแน่น(intensive aquaculture) ซึ่งหากมีการจัดการฟาร์มที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ปลาเกิดความเครียดความชุกของการเกิดโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น (Zorrilla, *et. al.,* 2003, Shoemaker *et al*. 2006) ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อฟาร์มเลี้ยงปลานิลเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะโรคแบคทีเรียในปลานิล เช่น สเตรปโตคอคโคซิส (Streptococosis) ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* sp.)ซึ่งโรคดังกล่าวถูกจัดให้เป็นหนึ่งในโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรงมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงปลานิล และมักเป็นสาเหตุทำให้เกิดอัตราการตายของปลาในระดับสูงอย่างต่อเนื่องยาวนาน (Shoemaker *et al*., 2001; Yang, 2009) หรือ โรค *Flavobacterium columnare* ที่สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมปลานิล และรวมถึงโรค *Aeromonas hydrophila* แม้ว่าในปัจจุบันจะมีความพยายามการคิดค้นยา และสารเคมี รวมถึงวัคซีนเพื่อใช้ในการควบคุม และป้องกันการระบาดของโรคดังกล่าว ก็ยังคงมีการระบาดอย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจต่อเกษตรกรผู้ประกอบการ ปริมาณผลผลิตปลานิลในภาพรวมของประเทศ และเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่มีส่วนทำให้การควบคุมและป้องกันไม่มีประสิทธิภาพคือ การขาดข้อมูลทางระบาดวิทยาในเรื่องความชุก (prevalence) และปัจจัยการเกิดโรค ซึ่งจะช่วยทำให้เกิดความเข้าใจวงจรและธรรมชาติของการเกิดโรคอย่างแท้จริง

และจากพฤติกรรมการใช้ยาของเกษตรกรผู้เลี้ยงปลา มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันและรักษาโรคแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในขณะเลี้ยงปลา ซึ่งมีการใช้ยาเกินความจำเป็น อาจส่งผลให้แบคทีเรียต้านยาปฏิชีวนะขึ้น หรือมีการใช้ยาปฏิชีวนะแบบ ผิด ๆ จะไม่ใช่แค่เพิ่มความต้านทานยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียที่เป็นพาหะนำโรคเท่านั้น แต่ยังเป็นการเพิ่มความต้านทานยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียที่มีอยู่ในมนุษย์ และสัตสัตว์อื่นๆด้วย Chelossi et al. (2003) รายงานว่า มีการ เปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในบริเวณใกล้ฟาร์มปลาในขณะเดียวก็มีการพบเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ดื้อยาด้วย

การดื้อยาเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนมาก มีปัจจัยมากมายรวมถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดการดื้อยา (Alanis, 2005) การเกิดแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมจะเกิดขึ้นจากแบคทีเรียเหล่านี้ได้รับยาปฏิชีวนะที่หลากหลาย ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาตัวเองไปเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะ (Pathak and Gopal, 2005) ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจความชุก และวิเคราะห์ปัจจัยความเสี่ยงต่อการเกิดโรคแบคทีเรียในปลานิล และตรวจสอบการดื้อยาต้านจุลชีพ Amoxicillin Enrofloxacin และ Oxytetracycline ในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังบริเวณแม่น้ำตาปี จ.นครศรีธรรมราช เพื่อให้สามารถใช้เป็นในการวางแนวทางการควบคุม และป้องกันการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและเพื่อสร้างอาชีพที่ยั่งยืนของเกษตรกรลุ่มน้ำตาปีในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคแบคทีเรียในปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง บริเวณแม่น้ำตาปี จังหวัดนครศรีธรรมราช

2. เพื่อตรวจสอบเชื้อดื้อต้านจุลชีพในปลานิลปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง ในแม่น้ำตาปี จ.นครศรีธรรมราช

การตรวจเอกสาร

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และเนื้อปลามีรสชาติดี การเพาะเลี้ยงปลานิลพบอย่างแพร่หลายในเขตอบอุ่น โดยพบว่าปัจจุบันมีจำนวนประเทศผู้ผลิตปลานิลรายใหญ่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงประมาณ 100 ประเทศทั่วโลก (Romana-Eguia*et al*., 2004) สำหรับประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการผลิตอันดับที่สี่ของโลก (Darryl, 2011) และมีแนวโน้มการผลิตเพิ่มสูงขึ้นทุกปีโดยมีการขยายพื้นที่การเลี้ยงทั้งที่เป็นการเลี้ยงแบบบ่อดินและการเลี้ยงในกระชังในลักษณะการเลี้ยงอย่างหนาแน่นในทุกภูมิภาคของประเทศไทยอย่างไรก็ตามการขยายตัวอย่างรวดเร็วของฟาร์มเพาะเลี้ยง และการเลี้ยงอย่างหนาแน่นส่งผลให้เกิดปัญหาต่างๆขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาเรื่องโรค ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน

โรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococosis) มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส *(Streptococcus* sp.*)* โรคดังกล่าวถูกจัดให้เป็นหนึ่งในโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรงมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงปลานิล และเป็นสาเหตุในเกิดการป่วยและการตายในปลาทั่วโลก

อาการที่เป็นลักษณะเด่นของโรคสเตรปโตคอคโคซีสคือ อาการตาโปนโดยอาจเกิดเพียงข้างเดียวหรือทั้ง 2 ข้างซึ่งเป็นผลมาจากการคั่งของเลือดบริเวณหลังลูกตาและเกิดการบวมน้ำ นอกจากนั้นยังพบการขยายกว้างเบ้าตาการตกเลือดบริเวณเนื้อเยื่อในลูกตาการเกิดวุ้นใสในเบ้าตาและการตายของเนื้อเยื่อต่างๆในตาเช่นบริเวณกระจกตาเส้นประสาทตา (optic nerve) และโครอยด์ (choroid) (Inglis *et al*., 1993) เมื่อทำการผ่าซากปลาที่ติดเชื้อมักพบการคั่งของเลือดบริเวณช่องว่างของลำตัว การบวมแดงของม้าม การขยายใหญ่แต่ซีดของตับร่วมกับการอักเสบของหัวใจและไต (Salvador *et al*., 2005) อย่างไรก็ตามปลาที่ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการทางคลินิกก่อนการตายโดยตรวจพบเพียงภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด(septicaemia) และการติดเชื้อของสมองและระบบประสาท (Yanong and Floyd, 2002)

การตรวจวินิจฉัยการติดโรคโรคสเตรปโตคอคโคซีสสามารถทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากอวัยวะภายในโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสมองและไต (Yanong and Floyd, 2002)โดยเชื้อสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดbovine blood trptose agar, brian heart infusion agar (BHIA) หรือ Todd-Hewitt broth nutrient agar ที่เติมเลือดกระต่าย ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 22-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ก่อนโคโลนีสีเทาขุ่นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตรจะเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 ไมโครเมตร ปรากฏในลักษณะคู่หรือเป็นสายเมื่อเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ไม่เคลื่อนที่ และไม่มีการสร้างสปอร์ (Yanong and Floyd, 2002) เชื้อแบคทีเรียเตรปโตคอคคัสสามารถเจริญได้ทั้งในสภาพ

ที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ (α-hemolysis) หรือย่อยเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์(β-hemolysis) บนอาหารวุ้นที่เติมเลือด (blood agar) นอกจากนั้นยังถูกให้จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) ให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid fermentation) แต่ไม่เกิดการผลิตแก๊สในกระบวนการหมัก ให้ผลลบต่อปฏิกิริยาคะตะเลส (catalase) และออกซิเดส(oxidase)(Holt *et al*, 1994)สำหรับการวินิจฉัยแยกเชื้อ *Streptococcus iniae* และ *S. agalactiae* สามารถทำได้โดยการทดสอบ carbohydrate group antigen โดยพบว่าเฉพาะ *S. agalactiae*เท่านั้นที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ โดยเชื้อ *S. agalactiae* เท่านั้นจัดอยู่ในกลุ่ม B streptococcal species ในขณะที่ *S. iniae* ไม่มี carbohydrate group antigen นอกจากนั้นหากการทดสอบการย่อยแป้งเป็นบวกก็สามารถวินิจฉัยแยก*S. iniae* จาก *S. agalactiae* ได้เช่นเดียวกัน (Evans *et al*., 2004)

โรคคอรัมนาริส (Columnaris disease) หรือ โรคติดเชื้อแฟลกซิแบคเตอร์(Flexibacteriosis) เกิดจากแบคทีเรียในสกุลฟลาโวแบคทีเรี่ยม *Flavobacterium columnare* (ชื่อเดิมคือ *Flexibacter columnaris*) เกิดจากแบคทีเรียในสกุลฟลาโวแบคทีเรี่ยม ติดเชื้อแทรกซ้อนเข้าไป หลังจากปลาเกิดแผลถลอกต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแผลถลอกหลังจากการคัดแยกปลามักมีแผลเล็กๆ ตามตัวหางกุด มีตะกอนสี เหลืองบริเวณแผลเหล่านี้คล้ายโรคเหงือกเปื่อย แต่มีลักษณะที่แตกต่างออกไป คือ ปลาจะมีเกล็ด สำหรับอาการในปลากะรังซึ่งอยู่ในน้ำเค็ม มีเกล็ดหลุดเป็นแถบๆมองดูเหมือนแผลไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก (ชาญณรงค์, 2550)

โรคแบคทีเรียล เฮโมราจิก เซปติซีเมีย (Bacterial haemorrhagic septicemia) เกิดจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* อาการที่แสดงออกและลักษณรอยโรคมีความหลากหลาย แต่อาการที่ปรากฏร่วมกันในการติดเชื้อแต่ละ Serotype คือ อาการมีเลือดออก (Hemorrhage) ที่ผิวหนัง ช่อง ปาก และกล้ามเนื้อซึ่งมักเกิดร่วมกับการมีแผลหลุมที่ชั้น Epidermis บางครั้งอาจพบลักษณะเป็นแผลหลุมลึก (Furunculosis)เหมือนกับรอยโรคที่เกิดจาก *Aeromonas salmonicida* นอกจากนี้ยังมัก พบอาการตาโปน (Exophthalmus) และ ท้องมาร (Ascites) ได้ อาการอื่นๆ ที่อาจพบได้แก่ อาการ เกล็ดตั้ง ท้องกาง ครีบเปื่อย (Fin rod) เมื่อผ่าซากจะพบม้ามโต ไตบวม และเมื่อทำการตรวจอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ที่ติดเชื้อทางจุลพยาธิวิทยามักพบจุดเนื้อตาย หลายบริเวณที่ม้าม ตับ ไต และหัวใจ ซึ่งจะพบไปพร้อม ๆ กับการปรากฏของแบคทีเรียรูปร่างแท่ง เชื้อ *Aeromonas hydrophila* สามารถติดต่อสู่คนได้โดยทำให้ เกิดอาการต่างๆ ในคนได้แก่ Myonecrosis, cellulitis และ ecthyma gangrenosum (ชาญณรงค์, มปป)

การดื้อยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียมีการพัฒนาตนเอง ให้สามารถทนต่อการทำลายด้วยยาปฏิชีวนะ หรือที่เรารู้จักกันว่าการดื้อยา ซึ่งมีความรุนแรงมากขึ้น เป็นตามเทคโนโลยีของการผลิต และการใช้ยาปฏิชีวนะตัวใหม่ๆ

การดื้อยาของแบคทีเรีย เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutation) ของแบคทีเรีย โดยการเปลี่ยนแปลงนี้ อาจเกิดขึ้นที่ส่วนของสารพันธุกรรมหลักของเชื้อที่เรียกว่า โครโมโซม โครโมโซมนั้นประกอบด้วยยีน (gene) ที่จะแสดงออกเป็นลักษณะต่างๆ ของเชื้อมากมายรวมทั้งการดื้อยา ยีนที่ควบคุมการดื้อยานี้ สามารถถ่ายทอดจากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่งได้ง่าย จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายการดื้อยา จากเชื้อหนึ่งไปสู่อีกเชื้อหนึ่งได้รวดเร็ว

การดื้อยาของแบคทีเรีย เกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือ

1.เกิดจากการเลือกสรรตามธรรมชาติ (Natural selection) แบคทีเรีย แต่ละชนิด จะมีแบคทีเรียที่มียีนดื้อยาอยู่ในตัวปะปนอยู่แล้วตามธรรมชาติ แต่เป็นจำนวนน้อย โดยไม่เกี่ยวข้องกับการมียาปฏิชีวนะหรือไม่ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นก็คือ เมื่อเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีการสัมผัสยาปฏิชีวนะมากและนานขึ้น ยาจะทำลายส่วนที่ไม่ดื้อยาให้หมดไป เหลือส่วนที่ดื้อต่อยาไว้ ซึ่งส่วนนี้ก็จะทำการเจริญเพิ่มจำนวน และแสดงออกเป็นแบคทีเรียดื้อยาอย่างสมบูรณ์

2.เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ กล่าวคือแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้น จะมีความไวต่อยาอยู่เดิม (ไม่ดื้อยา) แต่เมื่อมีโอกาสสัมผัสกับยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะในขนาดและระยะเวลาในการให้ ที่ไม่เหมาะสมที่จะทำลายเชื้อได้หมด เชื้อก็จะพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในตัวเอง ให้มีความสามารถทนทานต่อการทำลายของยาได้มากขึ้น

เมื่อเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ ก็เท่ากับว่าเชื้อสามารถทนทานต่อการทำลายมากขึ้น ซึ่งหมายความว่า เชื้อมีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคมากขึ้น รักษาหายยาก และเมื่อเกิดการดื้อของเชื้อต่อยาชนิดหนึ่ง มักจะมีการดื้อต่อยาหลายๆ กลุ่มตามมา ทำให้มียาที่จะให้เลือกใช้น้อยมาก หรืออาจไม่มียาใดรักษาได้ในที่สุด กลไกการดื้อยาดังที่กล่าวมาแล้วว่าแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรมของตัวมันทำให้มีคุณสมบัติพิเศษต่างๆ เพิ่มขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัวมันจากการถูกทำลายด้วยยาต้านจุลชีพ คุณสมบัติเหล่านี้พอจะสรุปรวมเป็นกลไกการดื้อยาของแบคทีเรียได้ 5 กลไกล คือ1. การสร้างเอ็นซัยม์ทำลายยาตัวอย่างเช่น การสร้างเอ็นซัยม์ที่มีชื่อว่า Beta-lactamase ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม Beta-lactams ทำให้ยาหมดฤทธิ์ เช่น penicillins, cephalosporins เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอ็นเซัยม์ทำลายยาได้มีหลายชนิด เช่น เชื้อที่เป็นสาเหตุของฝี, หนอง คือ Staphylococcus aureus บางสายพันธุ์ เชื้อทำให้เกิดโรคหนองในคือ Neisseria gonorrhoea บางสายพันธุ์ เป็นต้น2. การลดการผ่านเข้าสู่เซลล์ของยาแบคทีเรียที่ดื้อยาอาจสร้างผนังกั้นการผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียของยา บางชนิดจะสร้างสิ่งที่ทำหน้าที่เป็น pump เพื่อเร่งการขับยาออกนอกเซลล์ ทำให้ไม่มีปริมาณยาภายในเซล์มากพอที่จะทำลายแบคทีเรียได้ ตัวอย่างการดื้อยาโดยกลไกนี้ พบในเชื้อมากมายหลายชนิดที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม tetracyclines และ aminoglycosides

3. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวรับยาโดยปกติการเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียของยาจะต้องไปจับกับตัวรับจำเพาะของมัน ซึ่งส่วนมากเป็นสารโปรตีนที่เยื่อหุ้มผนังเซลล์หรือภายในเซลล์ การดื้อยา

โดยกลไกนี้เชื้อแบคทีเรียจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวรับยา ทำให้ยาไม่สามารถจับกับตัวรับของมันหรือจับได้ไม่แน่น ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ แบคทีเรียหลายชนิดดื้อต่อยาในกลุ่ม erythromycin โดยใช้กลไกนี้

4. การเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตะบอลิกของตัวแบคทีเรีย โดยใช้ขบวนการอื่นที่ไม่ใช้ขบวนการเดิมที่ยาเคยออกฤทธิ์ขัดขวางได้ตัวอย่างเช่นการดื้อต่อยา sulfamethoxazole และ trimethoprim

5. การใช้กลไกทางอ้อมต่างๆ เช่น ยากลุ่ม penicillin จะไม่สามารถทำลายแบคทีเรียกลุ่ม Mycoplasma ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญหนึ่งของโรคติดเชื้อของทางเดินหายใจ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นเป้าในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของยากลุ่มนี้

วิธีการแก้ปัญหากับเชื้อดื้อยา

1.การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างถูกต้อง ได้แก่ การใช้ยาเฉพาะกรณีมีการติดเชื้อแบคทีเรียจริง ใช้ยาในขนาดระยะเวลา และวิธีการที่ถูกต้อง

2. การใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันควรใช้เมื่อจำเป็น และสั้นที่สุดภายใต้การคำแนะนำของแพทย์และเภสัชกร

3. การมีมาตรการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจากผู้ที่ติดเชื้อ สู่ผู้อื่น หรือสู่สิ่งแวดล้อม

ยาต้านจุลชีพ

ในการควบคุมโรคสัตว์น้ำ เดิมนิยมใช้เกลือ ฟอร์มาลิน (Formalin) คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate) ต่อมาในปี พ.ศ.2548 จึงเริ่มใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย ยากลุ่มแรกที่ใช้ คือ กลุ่มยาซัลฟา โดยยาซัลฟาเมอราซีน (Sulfamerazine) จัดว่าเป็นยาต้านจุลชีพพวกแรกที่มีการแนะนำให้ใช้ในสหรัฐอเมริกา และได้รับการขึ้นทะเบียนให้ใช้เป็นยารักษาโรคฟูรังคูโลซิส (Furunculosis) ในสัตว์น้ำ

ยาสัตว์น้ำที่ได้รับการขึ้นทะเบียนในประเทศไทย

ปัจจุบันการขึ้นทะเบียนยาสัตว์น้ำอยู่ภายใต้การควบคุมของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งปัจจุบันได้มียาสัตว์น้ำที่ขึ้นทะเบียนถูกต้องอยู่ 13 ตัวยา (กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2550) ด้วยกัน และในแต่ละตัวยาจะมีข้อบ่งใช้กับสัตว์น้ำที่แตกต่างกันตามชนิดของยา

ยาต้านจุลชีพสำหรับใช้ในสัตว์น้ำที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับยาจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้แก่ เอนโรโฟลซาซิน (Enrofloxacin) ซาราโฟลซาซิน (Sarafloxacin) ออกโซลินิค แอซิด (Oxolinic acid) ออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracyclin) เตตราซัยคลิน (Tetracyclin) ซัลฟาไดเมททอกซีน-ออร์เมทโธพริม (Sulfadimethoxin-Ormethoprim) ซัลฟาไดเมททอกซีน-ไตรเมทโธพริม (Sulfadimethoxin-Trimethoprim) ซัลฟาไดเมททอกซีน (Sulfadimethoxin) ซัลฟาโมโนเมททอกซีน (Sulfamonomethoxin) ซัลฟาไดอาซีน (Salfadiazine) ไตรเมทโธพริม (Trimethoprim) ออร์เมทโธพริม (Ormethoprim) โทลทราซูริล (Toltrazuril)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจข้อมูลการเลี้ยงและการเก็บตัวอย่างปลาป่วยของเกษตรกร

1.1 ทำการสำรวจกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลในกระชังในแม่น้ำตาปี จ.นครศรีธรรมราช จำนวน 10 คน การสำรวจเพื่อตรวจสอบแนวปฏิบัติการเลี้ยง การใช้ยา และการเกิดโรคระหว่างการเลี้ยง โดยใช้แบบสอบถาม

1.2 การเก็บตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในกระชังจากสองพื้นที่ คือ ตำบลนากะชะ อำเภอฉวาง จังหวัดนครศรีธรรมราช และตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัด นครศรีธรรมราช โดยการสุ่มจำนวน 10 ฟาร์ม ในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือน พฤศจิกายน ถึง ธันวาคม 2561 โดยการเก็บตัวอย่างปลานิล 10 % ของจำนวนปลาที่แสดงอาการป่วย ผ่านการคัดกรองเชิงบวกโดยสังเกตพฤติกรรม ร่วมกับการตรวจร่างกายปลาป่วยจากภายนอก (gross lesion) และรอยโรคของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae, Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila* สามารถจำแนกได้ ดังนี้ ไม่กินอาหาร/กินอาหารลดลง ซึม/เคลื่อนไหวช้าลง ว่ายน้ำผิดปกติ (วน/ควงสว่าง) สีตัวปลาเข้ม ตาขุ่นโปน ปาก (จุดเลือดออก/หนอง) ฝาปิดเหงือก (จุดเลือด) ลำตัว (จุดเลือดออก/แผล/หนอง) ครีบ (เน่าเปื่อย/หนอง) เหงือก (ซีด/เปื่อย) ตับ (อักเสบ/ซีด มีหนอง) ลำไส้ (อักเสบ/บวม) ม้าม (บวมโต) ไต (จุดเลือด/หนอง ขนาดเล็ก/เนื้อน้อย)

ในการตรวจเบื้องต้นปลาป่วยจะสังเกตพฤติกรรมร่วมกับการตรวจร่างกายปลาป่วยจากภายนอก (gross lesion) และรอยโรคบริเวณผิวหนังหรือเยื่อบุผิวที่มีลักษณะเป็นตุ่มหนองหรือมีการอักเสบไตหรือสมอง จากนั้นนำปลานิลป่วยมายังห้องปฏิบัติของศูนย์วิจัยและคลินิกสุขภาพสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์

บันทึกอาการภายนอกที่พบในปลาป่วยที่เสียชีวิต เพื่อเก็บตัวอย่างสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ โดยอ้างอิงเกณฑ์การวินิจฉัยของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติโดย 2 วิธี คือ วิธีจุลชีววิทยา และวิธีชีวโมเลกุล

2. การวิเคราะห์และตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างปลานิล

2.1 การทดสอบทางจุลชีววิทยา

เพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของปลาที่เป็นโรค พิสูจน์ชนิดของเชื้อโดยการทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อและคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยการเก็บตัวอย่างผิวหนัง เหงือก ไต และสมอง ตัวอย่างละ 1 กรัมจากปลาแต่ละตัว เติมน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4 มล. และบดตัวอย่างผสมเข้าด้วยกัน นำไปปั่นให้เนื้อเยื่อตกตะกอน ที่ความเร็ว 500 rpm นาน 5 นาที เจือ

จางสารละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} เท่า จากนั้นดูดสารละลายที่ได้แต่ละความเข้มข้น จำนวน 100 ไมโครลิตร ไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Modified Shieh's Agar ที่ผสม tobramycin 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อแยกเชื้อ *Flavobacterium columnare* เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar + 1% NaCl เพื่อแยกเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Tryptic soy agar เพื่อแยกเชื้อ *Streptococcus* spp. จากนั้นเชื้อแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียทำการทดสอบ gram stain เพื่อแยกชนิดของแบคทีเรีย คัดเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกต่อ gram stain ที่ต้องการ นำไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA เพื่อให้ได้โคโลนีเดียวของเชื้อแบคีเรีย จากนั้นจึงนำโคโลนีเดียวของแบคทีเรียลงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยใส่ใน microtube ขนาด 1 มิลลิลิตร เพื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA mini kit จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis TAE/TBE และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การทดสอบยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีชีวโมเลกุล

การตรวจยืนยันเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลด้วยวิธีชีวโมเลกุล ซึ่งวิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแบบทวีคูณจนมีจำนวนมากพอที่จะตรวจพบได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี PCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด ประกอบด้วย *S.agalactiae, F.columnare, A.hydrophila* โดยใน 1 หลอดปฏิกิริยา ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร Forword primer ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร, reverse primer ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครลาร์ 1 ไมโครลิตร และ 5x PCR master mix 5 ไมโครลิตร รวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยนำหลอดมทำปฏิกิริยาในสภาวะ คือ Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ cool down 4 °C จากนั้นนำไปตรวจผลโดยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis

3. การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ

โดยใช้เทคนิค Disk diffusion technique สุ่มเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียใน TSB นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน ล้างด้วยน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อ นำไปวัดความขุ่น (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ค่า OD = 0.125 จากนั้นทำการนำสารละลายแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 0.1 มล. มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton และทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยเทคนิค Disk diffusion assay

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยเทคนิค Disk diffusion assay โดยนำเชื้อ *F. columnare, S. agalactiae., A. hydrophila* นำสารละลายแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 0.1 มล. มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton และ Modified Shieh's Agar ที่ผสม tobramycin 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ทั่วและสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้น วางแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (antibiotic disc) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยยา 8 ชนิด Amoxicillin-clavulanate 30 µg, Cephalexin 30 µg, Gentamicin 10 µg, Enrofloxacin 5 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Sulfamethoxazole 25 µg, Oxytetracycline 30 µg และ Tetracycline 30 µg แล้วกดแผ่นเบาๆ บนอาหาร ทิ้งให้แห้งและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. ตรวจผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางขอบใส (Clear zone) เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในปลานิลโดยเทคนิคทางพีซีอาร์

Primer name	Oligoneucleotide primer sequence	Size of amplicon	Target gene
AH – F2	5' – CCA AGG GGT CTG TGG CGA CA – 3'	200 Bp.	aerA
AH – R2	5' – TTT CA CGG TAA CAG GAT TG – 3'		
SA – F2	5' – TGG TAG TCG TGT AGA AGC CTT AAC – 3'	220 Bp.	Cfb
SA – R2	5' – TCC AAC AGC ATG TGT GAT TGC – 3'		
FC – F2	5' – TGC GGC TGG ATC ACC TCC TTT CTA GAG ACA – 3'	400 Bp.	16S-23S rRNA
FC – R2	5' – TAA TCA CTA AAG ATG TTC TTT CTA CTT GTT TG – 3'		

การวัดผลบริเวณใสที่มีการยับยั้งตามมาตรฐาน international standards of disk diffusion method โดยใช้เชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* เป็นชุดควบคุม

ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บข้อมูลการเลี้ยงปลาของเกษตรกร

ผลการสำรวจข้อมูลเกษตรผู้เลี้ยงปลานิลในกระชังบริเวณแม่น้ำตาปี จังหวัดนครศรีธรรมราช ในพื้นที่ 2 อำเภอ คือ พื้นที่ตำบลนากะชะ อำเภอฉวาง จังหวัดนครศรีธรรมราช และพื้นที่ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ โดยได้เก็บตัวอย่างปลานิลจำนวน 10 ฟาร์ม จำนวน 20 ตัว เพื่อทำการเก็บตัวอย่างหาแบคทีเรียดื้อยา จากข้อมูลแบบสอบถาม และโดยสรุปข้อมูลการเลี้ยงและการใช้ยา พบว่าปลานิลที่เกษตรเลี้ยงประสบปัญหาปลาป่วย โดยมีลักษณะอาการ ได้แก่ ตาขุ่นขาวและโปน ครีบและเหงือกกร่อน ไม่กินอาหาร เกิดบาดแผลตามลำตัว ท้องบวม ลอยนิ่ง มีคราบตะกอนของดินติดตามตัว ว่ายน้ำเฉื่อยช้า ว่ายน้ำควงสว่าน และเกษตรกรได้มีการใช้ยาในการรักษาปลานิล ได้แก่ Oxytetracycline Enrofloxacin Sulfonamind และAmoxicillin

2. การวิเคราะห์และตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างปลานิลและการวิเคราะห์ค่าความชุก

ผลการศึกษาพบว่าจากการเก็บตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในกระชังจากสองพื้นที่ คือ ตำบลนากะชะ อำเภอฉวาง จังหวัด นครศรีธรรมราช และตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยการผ่านการทดสอบหาเชื้อ *Streptococcus agalactiae, Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila* ด้วยการคัดเลือกเบื้องต้นจากวิธี gram stain พบว่ามีโคโลนีที่ให้ผลบวกต่อ gram stain ทั้งหมด 93 โคโลนี จากนั้นจึงนำโคโลนีทั้งหมดมาทดสอบด้วยวิธี PCR โดยให้ผล positive ด้วยวิธี PCR จำนวน 14 โคโลนี ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนโคโลนีที่ให้ผล positive ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคทางพีซีอาร์ และค่าความชุก

Bacterial	Positive PCR (n= 14)/prevalence
Aeromonas hydrophila	10 (34; 29.41%)
Streptococcus agalactiae	4 (22; 18.18%)
Flavobacterium columnare	0 (8; 0%)

นำแบคทีเรียที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยเทคนิคทางพีซีอาร์มาทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Amoxicillin-clavulanate 30 µg, Cephalexin 30 µg, Gentamicin 10 µg, Enrofloxacin 5 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Sulfamethoxazole 25 µg, Oxytetracycline 30 µg และ Tetracycline 30 µg โดยผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *Aeromonas hydrophila* มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงสุดคือ Cephalexin 80%, Amoxicillin-clavulanate 30%, Oxytetracycline 30%, Tetracycline 30%, Enrofloxacin 20%, Gentamicin 10%, Ciprofloxacin 0% และSulfamethoxazole 0% ตามลำดับ ผลการทดสอบเชื้อ *Streptococcus agalactiae* พบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงสุดคือ คือ Cephalexin 75%, Tetracycline 50%, Amoxicillin-clavulanate 25%, Oxytetracycline 25%, Gentamicin 25%, Enrofloxacin 0%, Ciprofloxacin 0% และ Sulfamethoxazole 0% โดยภาพรวมของทั้งสองเชื้อแบคทีเรีย พบว่ายาที่มีการดื้อของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดคือ Cephalexin และยาที่ไม่พบการดื้อของเชื้อแบคทีเรียคือ Ciprofloxacin และ Sulfamethoxazole ดังตารางที่ 3

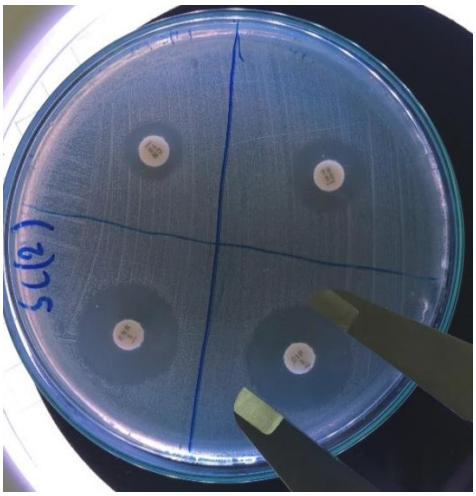
ตารางที่ 3 การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย

Antimicrobial agent	Number of resistant isolates (% of each species)[1,2,3,4,5,6 and 7]		Total resistant (% of each species)
	Aeromonas hydrophila (n=10)	*Streptococcus agalactiae* (n=4)	
Amoxicillin-clavulanate 30 µg	3 (30)	1 (25)	4 (28.57)
Enrofloxacin 5 µg	2 (20)	0 (0)	2 (14.28)
Cephalexin 30 µg	8 (80)	3 (75)	11 (78.57)
Gentamicin 10 µg	1 (10)	1 (25)	2 (14.28)
Ciprofloxacin 5 µg	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Oxytetracycline 30 µg	3 (30)	1 (25)	4 (28.57)
Sulfamethoxazole 25 µg	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tetracycline 30 µg	3 (30)	2 (50)	5 (35.71)
MDR_1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MDR_2	2 (20)	0 (0)	2 (14.28)

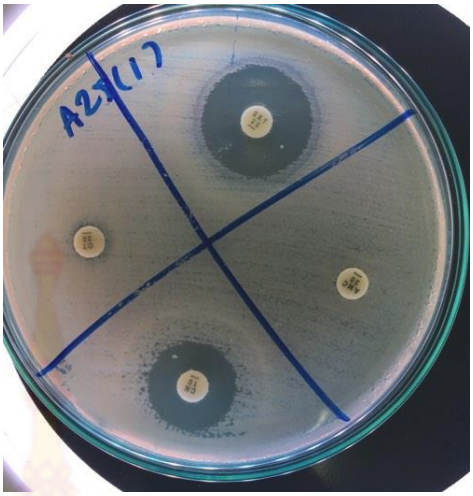
*MDR_1 : Enrofloxacin/ Sulfamethoxazole/ Oxytetracycline (ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำ)

MDR_2 : Amoxicillin-clavulanate / Cephalexin / Tetracycline (ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในมนุษย์)

**Reference sensitivity result : [1](ทรงทรัพย์ และคณะ, 2017), [2](Surya Kanta Samal et al. 2014),[3](J. M. Andrews, 2009),[4](J. M. Andrews, 2001),[5](Vanita Dhanda et al. 2013) and [6](Members of the SFM Antibiogram Committee, 2003), [7](EUCAST, 2017)



Streptococcus agalactiae



Aeromonas hydrophila

ภาพที่ 1 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิค Disk diffusion assay

อภิปรายผล

ปลานิลเป็นปลาที่มีความต้านทานต่อโรคอย่างสูง โดยสามารถเลี้ยงได้อย่างหนาแน่น สามารถเจริญเติบโตด้วยอาหารธรรมชาติและอาหารสำเร็จรูป (ชนกันต์, 2556) การจัดการสุขภาพปลานิลจึงเป็นวิธีการที่สำคัญเพื่อใช้ในเพื่อวางแผนป้องกันไม่ให้ปลาเกิดโรคและมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ถ้าหากปลานิลเป็นโรคแล้วโอกาสที่จะรักษาทำได้ยากมากและการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นการเพิ่มต้นทุนที่สูงขึ้นมากจนอาจทำให้ผู้เลี้ยงไม่สามารถแบกภาระได้และอาจทำให้เกิดการใช้ยาปฏิชีวนะจนปลามีการดื้อยาส่งผลอันตรายต่อผู้บริโภค โดยเชื้อโรคที่ก่อโรคในปลานิล ได้แก่ พวกปรสิต แบคทีเรีย เชื้อราและไวรัส ซึ่งความรุนแรงของเชื้อโรคขึ้นอยู่กับความไวในการติดเชื้อของแต่ละสายพันธุ์ จำนวนของเชื้อที่มีชีวิต โดยในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาการดื้อของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรง ได้แก่ *Streptococcus agalactiae, Flavobacterium columnare* และ *Aeromonas hydrophila*

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งยาที่ใช้บ่อยในสัตว์น้ำที่นำมาใช้ได้แก่ Enrofloxacin, Oxytetracycline และ Sulfamethoxazole เพื่อรักษาเชื้อแบคทีเรีย ส่วน Amoxicillin-clavulanate, Cephalexin, Gentamicin, Ciprofloxacin และ Tetracycline มีการนำมาใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำน้อยมาก และปัจจุบันบางชนิดห้ามใช้ในสัตว์น้ำ โดยผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *Aeromonas hydrophila* มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Cephalexin มากที่สุด เท่ากับ 80% ซึ่งเป็นยาที่ไม่ค่อยนิยมนำมาใช้แต่เกิดการดื้อยาได้มากที่สุด ลำดับต่อมาพบว่า Tetracycline, Amoxicillin-clavulanate และ Oxytetracycline มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ 30 % เท่ากัน ในขณะที่ยาที่ใช้บ่อยในสัตว์น้ำคือ ยา Enrofloxacin และ ยา Gentamicin พบว่ามีการดื้อที่ 20 % และ 10% ตามลำดับ และไม่พบการดื้อต่อยา Sulfamethoxazole และ Ciprofloxacin ของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สำหรับ *Streptococcus agalactiae* มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Cephalexin มากที่สุดเช่นกันอยู่ที่ 75% ซึ่งไม่ค่อยนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ รองลงมาคือ Tetracycline พบว่ามีการดื้อยาอยู่ที่ 50 % ส่วนยา Amoxicillin-clavulanate, Gentamicin และ Oxytetracycline มีการดื้อยาที่ 25% เท่ากัน และไม่พบการดื้อต่อยา Enrofloxacin, Ciprofloxacin และ Sulfamethoxazole เนื่องจากแบคทีเรียดื้อยาที่พบในสิ่งแวดล้อม เกิด จากแบคทีเรียเหล่านี้ได้สัมผัสกับยาปฏิชีวนะนั้น ๆ แล้วต่อมาได้พัฒนาตัวเองเพื่อความอยู่รอด (Al-Bahry et al., 2009)

จากการทดลองความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่ายาที่มีการดื้อของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดคือ Cephalexin ซึ่งไม่ค่อยนิยมมารักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ ซึ่งอาจเกิดจากแหล่งน้ำอาจมีการปนเปื้อนการใช้ยาจากประชาชนที่อาศัยอยู่ ณ แหล่งน้ำนั้น หรือจากมลภาวะทางน้ำ และยาที่ไม่พบการดื้อของเชื้อแบคทีเรียคือ Ciprofloxacin และ Sulfamethoxazole ซึ่ง Ciprofloxacin ไม่ค่อยนิยมนำมาใช้

ในสัตว์น้ำ แต่ยังสามารถใช้ Sulfamethoxazole ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำได้ การดื้อยาที่เกิดขึ้นอาจส่งผลเนื่องมาจากแม่น้ำที่ปนเปื้อนน้ำทิ้งชุมชนทำให้มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคสูงกว่าระดับที่ยอมรับได้ หรือน้ำทิ้งจากโรงพยาบาล และบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจากต้นน้ำ ก็อาจส่งผลให้แบคทีเรียในแม่น้ำมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้น (Rhodes et al., 2000) ในขณะที่ Goni-Urriza et al (2000) รายงานว่า แบคทีเรีย *Aeromonas* spp. มีการดื้อยาเพิ่มขึ้นในบริเวณที่ได้ผลกระทบจากน้ำทิ้งชุมชน

ดังนั้นแนวทางเลือกในการที่จะป้องกันและรักษาโรคโดยไม่มีการใช้ยาและสารเคมีน่าจะเป็นสิ่งที่จำเป็น เช่น การใช้ระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์สัตว์น้ำให้แข็งแรงต้านทานโรค การใช้จุลินทรีย์และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

สรุป

การเลี้ยงปลานิลภายในกระชังเป็นการสร้างรายได้ที่สำคัญให้กับเกษตรที่อาศัยอยู่ริมแม่น้ำตาปี อย่างไรก็ตามการตายของปลานิลในกระชังสามารถเกิดได้จากสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลันของแม่น้ำ การมีมลพิษที่อยู่ภายในแหล่งน้ำ และการติดเชื้อแบคทีเรียต่างๆ สามารถสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับธุรกิจ การตรวจพบแบคทีเรียดื้อยาจากเหลือก ไต ผิวหนัง และสมองของปลา จะเป็นตัวบ่งชี้ที่ชัดเจนถึง การแก้ปัญหาโรคติดเชื้อในปลานิลที่เลี้ยงภายในกระชังได้ยากขึ้น การเสริมสารที่จำเป็นต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิล การคัดเลือกสายพันธุ์ที่แข็งแรง การรักษาคุณภาพของสิ่งแวดล้อม และการพัฒนาวัคซีน อาจจะเป็นแนวทางที่สามารถนำมาปรับใช้เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันและการรักษาติดเชื้อแบคทีเรีย และนอกจากนี้มนุษย์ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียจากการทำกิจกรรมต่างๆภายในแหล่งน้ำทำให้เกิดการส่งผ่านการดื้อยาปฏิชีวนะได้ยังแบคทีเรียอื่นๆบริเวณนั้น ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลกระทบของการปนเปื้อนแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมและสุขาภิบาลชุมชนจึงมีความสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

ชาญณรงค์ รอดคำ. มปป.โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา. เอกสารประกอบการสอนวิชาโรคสัตว์น้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชาญณรงค์ รอดคำ พัฒนพล ขยันสำรวจ นพดล พิพารัตน์ เจนนุช ว่องธวัชชัย. 2550. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบดูเพล็กซ์สำหรับตรวจหาเชื้อสเตรปโตคอคคัส อินิเอ้ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส อกาแลคติเอ้ ที่ก่อโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลานิลเพาะเลี้ยงในประเทศไทย. Thai J. Vet. Med. 42: 153-158.

ชนกันต์ จิตมนัส,นิวุฒ หวังชัย,ธวัชชัย พริกทอง, Tomoaki, I., Zen,K., 2554. แบคทีเรียดื้อยาในปลานิลแดงที่เลี้ยงในกระชังบริเวณแม่น้ำปิงตอนบนของจังหวัดเชียงใหม่.คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.วารสารแม่โจ้ .49 ; 1-8.

ชนกันต์ จิตมนัส.2556.โรคปลานิล.เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(1): 75-86.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. การวินิจฉัยโรคและแนวทางในการป้องกันแก้ไขโรคในลูกปลานิล. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.4-6.

ทรงทรัพย์ อรุณกมล ,ธราดล จิตจักร, นพรัตน์ พัชณีย์ และ สกลสุภา เจนศิริวงศ์.2560.ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ Aeromonas hydrophila ที่แยกได้จากกบนา(Hoplobatrachus rugulosus) ที่แสดงอาการป่วย ในจังหวัดสกลนคร.วารสารเกษตรพระวรุณ 14 (2): 238-246.

Alanis, A.J. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? Archives of Medical Research 36(6): 697 – 705.

Al-Bahry, S.N., I.Y. Mahmoud, K.I.A. Al-Belushi, A.E. Elshafie, A. Al-Harthy, and C.K. Bakheit. 2009.

Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. Chemosphere 77(11): 1534 – 1539.

Andrews, J. M. 2009. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8).Journal of Antimicrobial Chemotherapy 64: 454–489.

Chelossi, E., L. Vezzulli, A. Milano, M. Branzoni, M. Fabiano, G. Riccardi and I.M. Banat. 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. Aquaculture 219(1 – 4): 83 – 97.

Darryl J. 2011. Global Production Estimates Key Element Of GOAL 2010 Program. *Global Aquaculture Advocate*. 14: 10-12.

European committee on antimicrobial susceptibility testing.2017. Streptococcus agalactiae Calibration of zone diameter breakpoints to MIC values.EUCAST.verson 2.

Evans, J.J., Klesius, P.H., and Shoemaker, C.A. 2004. Starch hydrolysis testing of multiples isolates for rapid differentiation of *S. iniae. Bulletin of European Association of Fish Pathology, 24, 231-239*.

Goni-Urriza, M., M. Capdepuy, C. Arpin, N. Raymond, P. Caumette and C. Quentin. 2000. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and Aeromonas spp. Applied and Environmental Microbiology 6(1): 125 – 132.

Jennifer,M.2001.BSAC standardized disc susceptibility testing method.Journal of Antimicrobial Chemotherapy.48: 43-57.

Inglis, V., Roberts, R. J. and Bromage, N. R. 1993.Bacterial Disease of Fish. New York: Academic Press.

Members of the SFM Antibiogram Committee. 2003.Comite´ de l'Antibiogramme de la Socie´te´ Franc¸aise de Microbiologie Report 2003. International Journal of Antimicrobial Agents 21 : 364/391.

Panangala, V.S., Shelby, R.A., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Mitra, A., Morrison, E.E., 2006. Immunofluorescent test for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. Dis. Aquat. Org. 68:197-207.

Pathak, S.P. and K. Gopal. 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. Environmental Research 98(1): 100 – 103.

Rhodes, G., G. Huys, J. Swings, P. McGann, M. Hiney, and R.W. Pickup. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of xTn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3883 – 3890.

Romana-Eguia, M.R.R., Ikeda, M., Basiao, Z.U. and Taniguchi, N. 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. Aquaculture 236:131-150.

Pathak, S.P. and K. Gopal. 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. Environmental Research 98(1): 100 – 103.

Salvador, R., Muller, E.E., Freitas, J.C., Leonhadt, J.H., Giordano, L.G.P. and Dias, J.A. 2005. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile Tilapia (*Oreochromisniloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northen region of Parana State, Brazil. CienciaRural.Santa Maria, 35, 1374-1378.

Surya, K. S., Basanta ,K. D. and Bibhuti .B. P. 2014. Original Research Article Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of Aeromonas hydrophila isolated from freshwater fish.Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 3(12): 259-267.

Vanita ,D., Priyanka, C., Devinder, T., Rajesh, K. and Anuradha, C. 2013. Antimicrobial susceptibility pattern of betahaemolytic group A, C and G streptococci isolated from North IndiaJournal of Medical Microbiology . 62:386–393.

Yanong, R.P.E. and Francis-Floyd, R. 2002.Streptococcal infections of fish. Report from University of Florida. Series from the Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

ภาคผนวก
(นิพนธ์ต้นฉบับเพื่อส่งตีพิมพ์วารสาร)