เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2546;1:21-32.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดแอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซิน และเซฟาเลกซินของเชื้อ *Escherichia coli* ในทางเดินอาหารสุนัขก่อนและหลังการได้รับยาต้านจุลชีพ

พิมพ์ลดา อิงคนินันท์, ศศิธร อยู่สูง, จักราวุธ พระไกยะ

สาขาวิชาคลินิกสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) ของเชื้อ *Escherichia coli* (อี.โคไล) ในทางเดินอาหารสุนัขก่อนและหลังการได้รับยาต้านจุลชีพเพาะแยกเชื้ออี.โคไล 101 โคโลนีจากสุนัขจำนวน 18 ตัว โดยแบ่งสุนัขออกเป็น 3 กลุ่ม คือ สุนัขที่ได้รับการรักษาด้วยยาแอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซิน และเซฟาเลกซิน ตามลำดับ เก็บตัวอย่างโดยใช้ rectal swab จากสุนัขก่อนได้รับการรักษา และหลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ 3 วัน พบว่าสุนัขที่ใช้ยาแอมพิซิลลิน มีค่า MIC ของยาแอมพิซิลลิน หลังการรักษาเพิ่มขึ้น (P = 0.03) สุนัขที่ใช้ยาเอน-โรฟลอกซาซิน มีค่า MIC ของยาเอนโรฟลอกซาซินและแอมพิซิลลิน หลังการรักษาเพิ่มขึ้น (P = 0.000, P = 0.0001 ตามลำดับ) และสุนัขที่ใช้ยาเซฟาเลกซินไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ MIC หลังการรักษาเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคำนวณทางสถิติ **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2546;1:21-32.

คำสำคัญ : ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา, อี.โคไล, ยาต้านจุลชีพ, สุนัข,

บทนำ

ปัจจุบันวงการสัตวแพทย์มักประสบปัญหาเกี่ยวกับการใช้ยาต้านจุลชีพรักษาโรคติดเชื้อไม่ได้ผล ความล้มเหลวจากการใช้ยาต้านจุลชีพอาจเนื่องมาจากสาเหตุต่างๆ หลายประการการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การใช้ยาต้านจุลชีพที่เคยใช้อยู่ตามปกติใช้รักษาโรคไม่ได้ผล เชื้อดื้อยาเป็น

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : พิมพ์ลดา อิงคนินันท์, สาขาวิชาคลินิกสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100 E-mail:pimjung123@yahoo.com

ได้รับบทความวันที่ 7 ตุลาคม 2545

ปัญหาที่สำคัญมาก เพราะนอกจากจะทำให้รักษาโรคไม่ได้ผลแล้ว ยังทำให้การกระจายตัวของโรคเพิ่มมากขึ้นด้วย การใช้ยาจึงจำเป็นที่จะต้องเปลี่ยนไปใช้ยาตัวใหม่ที่มีความแรงเพิ่มขึ้นตามลำดับ และเป็นที่แน่นอนว่ายากลุ่มใหม่เหล่านี้ย่อมมีราคาสูงและมีอันตรายสูง การใช้ยาที่มีความแรงเพิ่มขึ้นก็ยังเป็นการเปิดโอกาสให้เชื้อเกิดการดื้อยาเร็วมากขึ้นตามไปด้วย การใช้ยาโดยไม่จำเป็น หรือการใช้ยาที่มีฤทธิ์แรงมีผลทำให้เชื้อในร่างกายที่มีความไวต่อยาถูกทำลายไปเรื่อยๆ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อดื้อยาเกิดการขยายตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และการเกิดปรากฏการณ์การเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในหมู่แบคทีเรียที่มีอยู่ในร่างกาย (colonization) และการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (superinfection)[1] ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนตามมา[2]

การดื้อยา เป็นปรากฏการณ์ที่จุลชีพมีความทนทานต่อยาต้านจุลชีพ หรือเป็นปรากฏการณ์ที่จุลชีพในร่างกายยังคงเจริญเติบโตและขยายตัวได้ในขณะที่ได้รับยาต้านจุลชีพ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ว่าจุลชีพนั้นเกิดการดื้อยาหรือไม่ โดยดูจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย minimal inhibitory concentration (MIC)

การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย เราสามารถแยกประเด็นออกเป็น 2 ข้อ กล่าวคือ

1. ความชุกของเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยา

2. ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย MIC

ประเด็นแรกนั้นมีความสำคัญทางสาธารณสุขโดยทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาการติดเชื้อโดยรวมสูงขึ้น สำหรับประเด็นที่สองจะมีความสำคัญต่อการรักษาสัตว์เป็นรายตัว ซึ่งสัตวแพทย์ผู้ทำการรักษาจะเป็นผู้ใช้ยา หากยาต้านจุลชีพตัวใดเหนี่ยวนำให้เชื้อเพิ่มระดับ MIC มากกว่าตัวอื่น สัตวแพทย์ควรเพิ่มความระมัดระวังในการใช้ เพื่อให้สามารถใช้ยาดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นเวลานาน

การศึกษาเรื่องการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียส่วนมากมักจะทำในสัตว์เลี้ยงเพื่อบริโภค เนื่องจากมีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างมาก โดยมีจุดประสงค์ในการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อวัตถุประสงค์หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ใช้เพื่อรักษาโรค หรือแม้กระทั่งการใช้ยาต้านจุลชีพในการป้องกันโรค มีการรายงานหลายครั้งถึงปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในมนุษย์ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับเชื้อที่ดื้อยาในสัตว์เลี้ยงเพื่อบริโภค[3] ส่วนการศึกษาเรื่องการดื้อยาในสัตว์เลี้ยงยังมีไม่มากนัก ในต่างประเทศมีการศึกษา และมีรายงานเกี่ยวกับการดื้อยาของเชื้ออี.โคไล ที่แยกได้จากสัตว์เลี้ยง[3-5] โดยทำการศึกษาถึงความชุกของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อยา และการหาค่า MIC ของยาหลายชนิด โดยพบว่าเชื้ออี.โคไลที่แยกได้จากสุนัขมีการดื้อยา และพบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่าหนึ่งชนิด Multiple Drug Resistance (MDR)

งานวิจัยที่นำเสนอในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อการศึกษาผลของการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อระดับความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออี.โคไลในทางเดินอาหารสุนัข ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้เป็นสิ่งบ่งบอก (indicator) ในการศึกษาถึงการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ[6] เนื่องจากเป็นเชื้อที่ดื้อยาได้ง่ายและสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อจุลชีพตัวอื่นได้อีก จากการศึกษาเชื้ออี.โคไลพบว่า เป็นแบคทีเรียที่สามารถถ่ายทอดพลาสมิด (plasmid) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการถ่ายทอดการดื้อยาในกลุ่มจุลชีพ

พลาสมิดมีตำแหน่งอยู่ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของเชื้อแบคทีเรีย พลาสมิดจะเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จากนั้นจะสร้างไพลัส (pilus) เพื่อใช้เกาะ (attach) และถ่ายทอดพลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ให้กับแบคทีเรียรุ่นต่อไปเช่นเดียวกับดีเอ็นเอ (DNA) ทำให้แบคทีเรียที่เคยไวต่อยาเกิดการดื้อยาขึ้น และยังสามารถถ่ายทอดผ่านจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปยังอีกชนิดหนึ่งได้ เป็นผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย[7]

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ MIC ของยาแอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซิน และเซฟาเลกซิน ต่อเชื้ออี.โคไลหลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ

2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อยาก่อนและหลังได้รับยาต้านจุลชีพ

3. เพื่อศึกษาถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ MIC ของเชื้อจุลชีพ จากการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดหนึ่งต่อระดับ MIC ของยาต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาทางคลินิกแบบศึกษาไปข้างหน้า (prospective design) โดยเก็บตัวอย่าง และข้อมูลจากสุนัข การคำนวณขนาดตัวอย่างของการทดลองนี้เป็นไปตามสมการ[8]

$$n = (1-(1-\alpha)^{1/d}) \times (N-d/2) + 1$$

n = จำนวนตัวอย่าง

N = จำนวนประชากรเฉลี่ยของสุนัขที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสัตว์เล็กมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เป็นเวลา 1 เดือน

d = จำนวนสุนัขที่คาดว่าจะพบเชื้ออี.โคไลที่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในประชากร

α = ระดับความเชื่อมั่นเมื่อแทนค่าตัวเลขในสูตรจะได้

$n = (1-(1-0.05)^{1/500}) \times (1000-500/2) + 1$

n = 5

ดังนั้นหากเก็บตัวอย่างจากสุนัข 5 ตัวในช่วงระยะเวลา 1 เดือน จะสามารถตรวจพบและเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับ MIC ที่เปลี่ยนแปลงไปได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากกลุ่มตัวอย่างมีปัญหา อาจเกิดการสูญเสีย

จึงเก็บตัวอย่างสุนัข กลุ่มละ 6 ตัว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ได้อย่างน้อย 5 ตัวต่อกลุ่ม

1. สุ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระสุนัขที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ 3 วัน โดยสุ่มตัวอย่างจากสุนัขที่เข้ารับการรักษาจำนวน 18 ตัว โดยมีเงื่อนไขว่า

สุนัขกลุ่มที่ 1 คือ สุนัขที่ได้รับการรักษาด้วยยาแอมพิซิลลิน จำนวน 6 ตัว

สุนัขกลุ่มที่ 2 คือ สุนัขที่ได้รับการรักษาด้วยยาเอนโรฟลอกซาซินจำนวน 6 ตัว

สุนัขกลุ่มที่ 3 คือ สุนัขที่ได้รับการรักษาด้วยยาเซฟาเลกซินจำนวน 6 ตัว

การเก็บตัวอย่างนี้ไม่คำนึงว่าสุนัขจะป่วยด้วยโรคในระบบใด และเก็บตัวอย่างอีกครั้งจากสุนัขตัวเดิมหลังได้รับยาต้านจุลชีพ 3 วัน รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง อันดับแรกจะใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดบริเวณรูทวาร (anus) ของสุนัขให้สะอาด รอให้แห้งสักครู่ แล้วจึงใช้ rectal swab สอดเข้าไปในรูทวารประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วเก็บลงใน transport media (Stuart's media) เก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส นำไปเพาะแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากเก็บตัวอย่าง

2. เพาะแยกเชื้ออี.โคไลโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ McConkey agar อบในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (aerobic condition) นาน 12-18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้ออี.โคไล 3 โคโลนีเพื่อตรวจยืนยันเชื้ออี.โคไลโดยวิธีการตรวจคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ Motility, Indole, Lysine decarboxylase, Citrate utilization, Urease และ Triple Sugar Iron[13] อบในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (aerobic condition) นาน 12-18 ชั่วโมง

3. เชื้ออี.โคไลที่ผ่านการทดสอบทางชีวเคมีจะให้ผลการทดสอบเป็นดังนี้

Motility	Positive
Indole	Positive
Lysine decarboxylase	Positive
Citrate Utilization	Negative
Urease	Negative
Triple Sugar Iron	A/A+

นำเชื้อที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีตรงกับตารางข้างต้น เก็บลงในหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar) แช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

4. ตรวจหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย MIC ของเชื้ออี.โคไลด้วยวิธี Broth micro dilution method ตามมาตรฐานของ National Committee on Clinical Laboratory Standard (NCCLS)[9]

4.1 นำเชื้ออี.โคไลจากหลอดเก็บเชื้อมา 1 หลอด แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อมาป้ายลงใน McConkey agar อบในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (aerobic condition) นาน 12-18 ชั่วโมง

4.2 เลือกโคโลนีของเชื้ออี.โคไลจาก McConkey agar มา 1 โคโลนีแล้วเขี่ยเชื้อลงใน Tryptic Soy Agar (TSA) อบในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (aerobic condition) นาน 12-18 ชั่วโมง

4.3 เตรียมเชื้ออี.โคไลที่ได้จาก TSA ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 0.5 McFarland (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/mL) โดยใช้เครื่อง colorimeter

4.4 เตรียมสารละลายยา 3 ชนิด คือ แอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซินและเซฟาเลกซิน ให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

แอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอนโรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เซฟาเลกซิน ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5 เติม muellur hinton broth (MHB) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลง microdilution plate ทุกหลุม ตั้งแต่แถวที่ 2-12 และเติมสารละลายยาปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในแถวที่ 1 ทำ Two-fold dilution ที่แถวที่ 1 ถึง 10 ส่วนแถวที่ 11 และ12 เป็น negative และ positive control ตามลำดับ

4.6 นำเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.5 McFarland เจือจาง 1:100 ใน MHB ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เติมในแถวที่ 1-10 และ12 เก็บในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-20 ชั่วโมง อ่านผลโดยนับหลุมสุดท้ายที่สารละลายไม่ขุ่น (มีตะกอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตร) มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นปริมาณยาน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออี.โคไลได้

5. บันทึกค่า MIC ของยาแอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซิน และเซฟาเลกซิน ตามวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้วนำมาเปรียบเทียบโดยใช้วิธีการทางสถิติ

5.1 เปรียบเทียบค่า MIC ของยาแอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซิน และเซฟาเลกซินก่อนและหลังการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพในสุนัขแต่ละกลุ่มโดยใช้โปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS version 10.01; Mann-Whitney U test[8]

5.2 เปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซิน และเซฟาเลกซินก่อนและหลังการได้รับยาต้านจุลชีพในสุนัขแต่ละกลุ่ม โดยอาศัยค่า MIC breakpoint[12] ของเชื้ออี.โคไล ดังนี้

Breakpoint of ampicillin = 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Breakpoint of enrofloxacin = 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Breakpoint of cephalosporin C = 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยใช้โปรแกรมคำนวณทางระบาดวิทยา Epiinfo2000; Chisquare test[8]

ผลการทดลอง

การสุ่มเก็บตัวอย่างเชื้ออี.โคไลจากอุจจาระสุนัขจำนวน 18 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม เพื่อนำมาทดลองหาค่า MIC ก่อนและหลังการได้รับยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด สามารถเก็บเชื้ออี.โคไลได้ทั้งหมด 101 โคโลนี ข้อมูลของสุนัขทั้งหมดที่ทำการเก็บตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1

เมื่อทำการทดลองแล้วจะนำค่า MIC ที่ได้มาเปรียบเทียบโดยใช้วิธีการทางสถิติ โดยเปรียบเทียบ 2 กรณี คือ

1. เปรียบเทียบค่า MIC ของยาแอมพิซิลลิน เอนโรฟลอกซาซิน และเซฟาเลกซิน ก่อนและหลังการได้รับยาต้านจุลชีพ โดยใช้ Mann-Whitney U test เป็นสถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

2. เปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้อจุลชีพที่ดื้อยาก่อนและหลังได้รับยาต้านจุลชีพ โดยใช้ Chi-square test เป็นสถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

การเปรียบเทียบค่า MIC ของยาทั้ง 3 ชนิด ก่อน และหลังการได้รับยาต้านจุลชีพ พบว่า

1. สุนัขกลุ่มที่ได้รับยาแอมพิซิลลินมีค่า MIC ของยาแอมพิซิลลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.03) ค่า MIC ของยาเอนโรฟลอกซาซินและเซฟาเลกซินไม่มีการเปลี่ยนแปลง (P>0.05)

2. สุนัขกลุ่มที่ได้รับยาเอนโรฟลอกซาซินมีค่า MIC ของยาแอมพิซิลลินและเอนโรฟลอก

ตารางที่ 1. ตารางแสดงข้อมูลของสุนัขจำนวน 18 ตัวที่ทำการเก็บตัวอย่าง

No.of dogs	Breed	Sex	Age (year/month)	Reason to visit hospital	Abx received and total amount of Abx received(mg)
1.	Mixed	F	2/6	OVH	Amp 250 mg BID
2.	Poodle	F	-	Hematuria	Amp 15 mg TID
3.	Poodle	F	1/-	OVH	Amp 250 mg TID
4.	Shepherd	M	-/6	Wound	Amp 250 mg TID
5.	Bull dog	F	-/8	Repair cherry eye	Amp 500 mg TID
6.	Dalmatian	M	-/4	Pinning of femur	Amp 250 mg TID
7.	Mixed	F	10/-	Renal disease	Enr 200 mg BID
8.	Dalmatian	M	4/-	Convulsion	Enr 500 mg BID
9.	Basset Hound	F	2/-	Cough	Enr 500 mg BID
10.	Mixed	F	15/-	Wound	Enr 400 mg BID
11.	Mixed	F	-/9	Vaginal discharge	Enr 400 mg BID
12.	Labrador	F	1/6	Bloody diarrhea	Enr 400 mg BID
13.	Shih Tzu	M	2/6	Eye's wound	Cep 200 mg SID
14.	Golden Re.	M	4/-	Demodecosis	Cep 500 mg BID
15.	Poodle	F	-/2	Cough	Cep 25 mg BID
16.	Mixed	M	4/5	Cough	Cep 100 mg BID
17.	Miniature	F	4/-	Pyometra	Cep 150 mg TID
18.	Miniature	F	6/-	Pyometra	Cep 250 mg Bid

ตารางที่ 2. ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบค่า MIC ของเชื้ออี.โคไลโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

Treatment Abx	Tested Abx	Time	N (colonies)	Median MIC (mcg/mL)	P25	P75	P-value
Amp	Amp	Before	15	4	2	64	0.030*
		After	14	64	49	64	
	Enr	Before	15	0.03	0.015	4	0.417
		After	14	0.25	0.03	4	
	Cep C	Before	15	64	32	64	1.000
		After	14	64	32	64	
Enr	Amp	Before	18	4	2	64	0.001*
		After	16	64	64	64	
	Enr	Before	18	0.015	0.015	4	0.000*
		After	16	4	4	4	
	Cep C	Before	18	64	64	64	0.348
		After	16	64	32	64	
Cep	Amp	Before	21	64	4	64	0.342
		After	17	64	64	64	
	Enr	Before	21	0.03	0.015	4	0.410
		After	17	0.25	0.015	4	
	Cep C	Before	21	64	32	64	0.516
		After	17	64	48	64	

Abx=antimicrobial drug, Amp=Ampicillin, Enr=Enrofloxacin, Cep =Cephalexin, Cep C=Cephalosporin C, N=total number of colonies in each groups, P25=persentile25, P75=persentile75, *=statistical significant

ซาซินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.001, P = 0.000 ตามลำดับ) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสถิติของค่า MIC ของยาเซฟาเลกซิน

3. สุนัขกลุ่มที่ได้รับยาเซฟาเลกซินไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสถิติของค่า MIC ของยาทั้ง 3 ชนิด

นำค่า MIC ที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยา โดยนำค่า MIC ที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่า MIC breakpoint ของยาแต่ละชนิด ถ้าค่า MIC ของเชื้ออี.โคไลค่าใดมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC breakpoint แสดงว่าเชื้ออี.โคไลดื้อต่อยาชนิดนั้น นำมาเปรียบเทียบด้วยการคำนวณทางสถิติแบบ Chi - square test จะได้ผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 3

การเปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อยา พบว่าสุนัขกลุ่มที่ได้รับยาแอมพิซิลลินมีสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.035)

ตารางที่ 3. ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพก่อนและหลังได้รับยาต้านจุลชีพ

Treatment Abx	Tested Abx	Percent resistance before	Percent resistance after	Chi-square	P-value	OR (before/after)	95%CI
Amp	Amp	40	79	4.44	0.035*	0.18	0.02<OR<1.19
	Enr	27	36	Fisher exact*	0.699	0.65	0.1<OR<4.12
	Cep C	73	71	Fisher exact*	1.000	1.1	0.16<OR<7.43
Enr	Amp	33	94	13.09	0.0002*	0.03	0.00<OR<0.36
	Enr	28	94	5.22	0.00009*	0.03	0.00<OR<0.29
	Cep C	67	81	Fisher exact*	0.44	0.46	0.07<OR<2.83
Cep	Amp	67	82	Fisher exact*	0.46	0.43	0.07<OR<2.45
	Enr	33	29	0.07	0.79	1.2	0.25<OR<5.95
	Cep C	62	78	0.92	0.33	0.5	0.09<OR<2.53

Abx=antimicrobial drugs, Amp=Ampicillin, Enr=Enrofloxacin, Cep=Cephalexin
CepC=Cephalosporin C, OR=Odd Ratio, *=statistical significant

สุนัขกลุ่มที่ได้รับยาเอนโรฟลอกซาซินมีสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน และเอนโรฟลอกซาซินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.0002, p = 0.00009 ตามลำดับ) และสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยาจากสุนัขกลุ่มที่ได้รับยาเซฟาเลกซินไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเปรียบเทียบค่า MIC ของยาสามชนิดต่อเชื้ออี.โคไลในทางเดินอาหารสุนัขก่อนและหลังการได้รับยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้ออี.โคไลจากสุนัขที่ได้รับยาแอมพิซิลลิน มีค่า MIC ของยาแอมพิซิลลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.03, p < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อยาจากสุนัขที่ได้รับยาแอมพิซิลลินพบว่าเชื้ออี.โคไลมีสัดส่วนของเชื้อที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (p = 0.035, p < 0.05)

แอมพิซิลลินเป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มเพนนิซิลลิน (penicillin) หรือกลุ่มเบต้าแลคแตม (betalactam) ซึ่งเป็นยาที่แนะนำให้ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แอมพิซิลลินมักจะใช้สำหรับทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบต่อยาในกลุ่มเพนนิซิลลินด้วย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้ออี.โคไลมีการดื้อต่อยาแอมพิซิลลินโดยพบทั้งค่า MIC ที่เพิ่มขึ้นซึ่งหมายถึงค่าความไวของเชื้อที่ทดสอบได้ในห้องทดลองลดลง ความไวของเชื้อที่ลดลงนั้นบอกได้ว่าเชื้อมีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน เชื้ออี.โคไลหรือแบคทีเรียแกรมลบมักจะ

ดื้อยาโดยขัดขวางการซึมผ่านของยาเข้าสู่ผนังเซลล์หรือปริมาณเอนไซม์ในกลุ่ม penicillin binding proteins (PBPs) ที่ชั้นนอกเยื่อหุ้มเซลล์มีไม่เพียงพอ หรือสามารถสร้างเอนไซม์มาทำลายยาโดยตรง ซึ่งอาจเกิดขึ้นโดยวิธีใดวิธีหนึ่งหรือทุกวิธีก็ได้[1]

เชื้ออี.โคไลจากสุนัขที่ได้รับการรักษาด้วยยาเอนโรฟลอกซาซิน มีค่า MIC ต่อยา 2 ชนิด คือ แอมพิซิลลินและเอนโรฟลอกซาซิน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$, $p = 0.00$ ตามลำดับ, $p < 0.05$) และพบสัดส่วนของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลินและเอนโรฟลอกซาซินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้ออี.โคไลสามารถดื้อต่อยาต้านจุลชีพได้มากกว่าหนึ่งชนิด เอนโรฟลอกซาซินเป็นยาที่ใช้ได้ผลดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยาเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะซึมผ่านเข้าไปในส่วนไซโทพลาสซึม ของเซลล์แบคทีเรียทันที และไปขัดขวางการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) โดยไปยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอจัยเรส (DNA gyrase enzyme)[3] ซึ่งมีความสำคัญในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย การดื้อยาของเชื้อมักเกิดจากการที่เอ็นไซม์ดีเอ็นเอจัยเรสมีการปรับเปลี่ยนไปหรือยาซึมผ่านเข้าไปในเซลแบคทีเรียได้น้อยลง[9-10] ทำให้ยาไม่สามารถทำลายเชื้อนั้นได้

ปัจจุบันมีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงการดื้อยากลุ่มควิโนโลน (Quinolone) ของเชื้อแบคทีเรียในมนุษย์ โดยพบว่าสาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีการปะปนของเชื้อที่ดื้อยาอยู่ เนื่องจากยาในกลุ่มนี้นิยมใช้กันอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ เพราะออกฤทธิ์ในวงกว้าง และออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว โดยพบการสำรวจหาเปอร์เซนต์ของเชื้ออี.โคไลที่ดื้อยาเอนโรฟลอกซาซินในสัตว์เลี้ยงเพื่อบริโภคเช่น สุกร โค สัตว์ปีก มีเปอร์เซนต์สูงมาก[11] ทำให้มีแนวโน้มที่จะพบเชื้ออี.โคไลที่ดื้อต่อยาเอนโรฟลอกซาซินสูงในสัตว์เลี้ยงเช่นกัน เนื่องจากสุนัขมักจะได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเนื้อสัตว์เป็นหลัก จึงมีโอกาสที่จะสัมผัสเชื้อที่ดื้อยาได้เช่นเดียวกับมนุษย์ จากผลการทดลองครั้งนี้พบการดื้อต่อยาเอนโรฟลอกซาซินของเชื้ออี.โคไลในทางเดินอาหารสุนัขและมีแนวโน้มที่จะพบได้มากขึ้นเมื่อทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่เปลี่ยนไป เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างในการทดลองครั้งนี้เป็นเพียงกลุ่มตัวอย่างจากสุนัขที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เท่านั้น ถ้าทำการศึกษาจากประชากรสุนัขในหลายพื้นที่จะทำให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น

สุนัขที่ได้รับยาเซฟาเลกซินเมื่อนำเชื้ออี.โคไลมาทดสอบหาค่า MIC ของยาเซฟาโรสปอรินซี ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มเซฟาโรสปอริน รุ่นที่ 1 เช่นเดียวกับเซฟาเลกซิน โดยคาดว่าน่าจะให้ผลการทดลองในการหาค่า MIC เช่นเดียวกับการใช้ยาเซฟาเลกซิน เนื่องจากมีค่า MIC breakpoint ของเชื้ออี.โคไลเท่ากัน เป็นรุ่นที่ 1 และมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับยา

เซฟาเลกซิน ผลการทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางสถิติของเชื้ออี.โคไลจากสุนัขที่ได้รับยาเซฟาเลกซินต่อยาทั้ง 3 ชนิด

ยากลุ่มเซฟาโรสปอรินมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับยากลุ่มเพนนิซิลลินจึงจัดเป็นยาในกลุ่มเบต้าแลคแตมเช่นกัน กลไกการออกฤทธิ์ก็คล้ายกับยาในกลุ่มเพนนิซิลลิน คือ การยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย แต่แตกต่างกันที่ยากลุ่มนี้มีความคงทนต่อการทำลายยาของเอนไซม์กลุ่มเบต้าแลคตาเมส (Beta - lactamese) การดื้อยาของแบคทีเรียต่อยาในกลุ่มเซฟาโรสปอรินเกิดได้ 3 ทาง คือ ยาไม่สามารถซึมเข้าไปถึงส่วนทาร์เกท (target) ของเซลล์แบคทีเรีย หรือยาไม่สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มเอนไซม์ PBPs หรือยาถูกทำลายโดยเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมสก่อนที่จะออกฤทธิ์ โดยอาจดื้อต่อยาเพียงตัวใดตัวหนึ่งหรืออาจดื้อต่อยาทั้งกลุ่มก็ได้ ปัจจุบันยาเซฟา-เลกซินใช้ได้ดีมากในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงและพบปัญหาการรักษาที่ไม่ได้ผลเนื่องจากเชื้อดื้อยาน้อยมาก แต่เนื่องจากเป็นยาที่มีราคาสูงพอสมควรจึงทำให้ต้องพิจารณาใช้เมื่อรักษาด้วยยาชนิดอื่นไม่ได้ผล ซึ่งถ้าพบปัญหาเชื้อแบคทีเรียที่มีการดื้อยามากขึ้น อาจต้องมีการพิจารณาใช้ยาในกลุ่มนี้ซึ่งจะทำให้เจ้าของเพิ่มภาระค่าใช้จ่ายในการรักษามาก

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาไปข้างหน้าถึงการเปลี่ยนแปลงของค่า MIC ของเชื้ออี.โค-ไลต่อยา 3 ชนิดก่อนได้รับยาเปรียบเทียบกับหลังได้รับยาต้านจุลชีพ ซึ่งสามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงค่า MIC ของเชื้ออี.โคไลก่อนการได้รับยาเปรียบเทียบกับหลังได้รับยาว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นจริงหรือไม่ ผลการทดลองสามารถบอกแนวโน้มของการดื้อยาของเชื้ออี.โคไลหลังได้รับยาต้านจุลชีพได้ แต่ไม่สามารถอธิบายวัตถุประสงค์ข้อหนึ่งของการทดลองครั้งนี้ที่ต้องการศึกษา ว่าการให้สุนัขได้รับยาชนิดหนึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ MIC ของยาอีกชนิดหนึ่งหรือไม่ หมายถึงการใช้ยาชนิดหนึ่งจะทำให้เชื้อสามารถดื้อต่อยาอีกชนิดหรือไม่ เนื่องจากรายงานในต่างประเทศมักกล่าวถึงการดื้อยาของเชื้ออี.โค-ไลที่สามารถถ่ายทอดพลาสมิด หรือ R-factor ซึ่งเป็นยีนที่พบในเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาให้แก่แบคทีเรียชนิดอื่น หรือการถ่ายทอดลักษณะการดื้อยาให้แก่เชื้ออี.โคไลรุ่นต่อไป จากผลการทดลองไม่สามารถหาความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นเพียงค่า MIC ที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังได้รับยาต้านจุลชีพ จึงไม่สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีนที่ดื้อยาของเชื้ออี.โคไลของยาชนิดหนึ่งต่อยาอีกชนิดได้

ปัญหาการดื้อยาเป็นปัญหาที่สำคัญอันหนึ่งที่สัตวแพทย์ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ ทั้งนี้การรักษาโรคติดเชื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ โดยมีหลักการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ ดังนี้

1. ใช้ยาต้านจุลชีพเมื่อจำเป็นเท่านั้น
2. พยายามอย่าใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อเป็นการป้องกันโรคโดยไม่จำเป็น

3. ต้องใช้ยาต้านจุลชีพตามขนาดและระยะเวลาที่กำหนดอย่างเคร่งครัด

4. ช่วงระยะเวลาที่ใช้ยาต้านจุลชีพต้องเหมาะสม

นอกจากนี้ยังต้องอาศัยการวินิจฉัยโรคที่แม่นยำ และการซักประวัติซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องระวังให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องเป็นจริง ในกรณีที่มีห้องปฏิบัติการพร้อมที่จะทำการทดสอบได้ หลังจากแยกเชื้อแล้วควรทำการทดสอบความไวของเชื้อที่มีต่อยา และยังต้องพิจารณาถึงความปลอดภัยของยาที่มีต่อสัตว์ป่วยด้วย

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อมีผลทำให้เชื้อจุลชีพในร่างกายสัตว์มีการเปลี่ยนแปลงโดยทำให้ค่า MIC มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น และยังพบสัดส่วนของเชื้อที่ดื้อยาเพิ่มขึ้นอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ อ.น.สพ.ดร.ภาวิน ผดุงทศ และ อ.น.สพ.ประภาส พัชนี ผู้กรุณา ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ในการออกแบบการทดลอง การคำนวณขนาดตัวอย่างและการทดสอบทางสถิติ คุณศิริพรรณ อาทรธุระสุข ผู้กรุณาให้ความช่วยเหลือแนะนำเรื่องการทำการทดลอง และผศ.ดร.ประภาพร ตั้งธนธานิช ผู้กรุณาให้การตรวจสอบและแก้ไขการเขียนรายงาน

เอกสารอ้างอิง

1. มาลินี ลิ้มโภคา. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพ : คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2540.
2. กมลชัย ตรงวานิชนาม. ยาต้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ : ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2543.
3. Monaghan C, Tierney U, Colleran E. Antibiotic resistance and R-factors in the fecal coliform flora of urban and rural dogs. Antimicrob Agents Chemother 1981:266-70.
4. Moss S, Frost A. The resistance to chemotherapeutic agents of Escherichia coli from domestic dogs and cats. Aust Vet J 1984; 61(3).
5. Normand E, Gibson N, Taylor D, Carmichael S, Reid S. Trend of antimicrobial resistance in bacterial isolates from a small animal referral hospital. Vet Rec 2000;146: 151-5.
6. Normand E, Gibson N, Reid S, Taylor D. Antimicrobial resistance trends in bacterial isolates from companion animal community practice in UK. Prev Vet Med 2000;46:267-78.
7. Davis B, Renato D, Herman E. Microbiology. 3rd ed. Philadelphia: Harper & Row; 1980.
8. Thrusfield M. Veterinary epidemiology. 2nd ed. Great Britain: Blackwell Science; 1995.
9. Hirai K. Isolation and characterization of norfloxacin resistant mutants of E.coli K-12. Antimicrob Agents Chemother 1986;29:635.
10. Hooper DC, Wolfson JS. Mode of action of the new quinlones. Eur J Clini Micro Inf Dis 1990;10:223.
11. Mitsuhashi. Bacterial drug resistance,R plasmids. Kodansha Scientific Books 1980.
12. Prescott J, Baggot J. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 2nd ed. Iowa: Blackwell Scientific Publications; 1988.
13. Quinn P, Carter M, Markey B, Cartor G. Clinical veterinary microbiology. London: Mosby; 1999.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards.Villanova PA 1990.