Prawarun Agr. J. Volume 14(2) 2017, Pages 238-246

บทความวิจัย

ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) ที่แสดงอาการป่วย ในจังหวัดสกลนคร

ทรงทรัพย์ อรุณกมล[1*], ธราดล จิตจักร[2], นพรัตน์ พัชณีย์[1] และ สกลสุภา เจนศิริวงศ์[1]

[1]สาขาวิชาการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000
[2]สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000

บทคัดย่อ

การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากกบนาที่แสดงอาการป่วย ในพื้นที่จังหวัดสกลนคร ช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 สามารถแยกเชื้อ *A. hydrophila* จากตัวอย่างกบป่วยได้ทั้งหมด 51 ไอโซเลท โดยเชื้อมีลักษณะกลมขอบเรียบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น สร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 4% โซเดียมคลอไรด์ เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าสามารถแบ่งระดับความไวต่อยาได้ 2 กลุ่มดังนี้ คือ กลุ่มที่ให้ผลการดื้อยา (resistance: R) พบว่ามี 4 ตัวยาคือ Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin และ Penicillin G มีอัตราการดื้อยา 100, 100, 96.08 และ 100% ตามลำดับ กลุ่มที่ให้ผลพบว่ามีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive: S) มี 11 ตัวยา คือ Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Nitrofurantoin, Norfloxacin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Tetracycline, Oxytetracycline และ Streptomycin โดยมีอัตราการความไวต่อยา 94.12, 98.04, 96.08, 98.04, 92.16, 100.00, 96.08, 98.04, 39.22, 41.18 และ 92.16% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การใช้ยา Oxytetracycline และ Tetracycline มีค่าความไวต่อยาที่อัตราส่วนความไวต่อยาต่ำและมีแนวโน้มการดื้อต่อยาปฏิชีวนะซึ่งตรงกับการให้ข้อมูลของเกษตรกรในพื้นที่ที่พบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้มาเป็นระยะเวลานานจึงควรมีการเฝ้าระวังการใช้ยา 2 ชนิดนี้อย่างใกล้ชิด

คำสำคัญ: กบนา, *Aeromonas hydrophila* และความไวต่อยาปฏิชีวนะ

* ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: songsub888@gmail.com

The Testing of Antibiotic Sensitivity from Isolated *Aeromonas hydrophila* from Infected Lowland Frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) in Sakon Nakhon Province

Songsub Arungamol[1*], Tharadol Jitjak[2], Nopparat Patchanee[1] and Sakolsupa Jensiriwong[1]

[1]Department of Fisheries, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon, 47000, Thailand

[2]Department of Animal science, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon, 47000, Thailand

Abstract

The study on the antibiotics susceptibility testing of *Aeromonas hydrophila* isolated from lowland frog cultured in Sakon Nakhon province during April, 2016 – February, 2017. Total of 51 isolates were obtained in which all were identified to be *A. hydrophila*. This bacteria was smooth round in TSA, gram negative in short shape with enzymes catalase and oxidase. It is not able to grow up at 4% of sodium chloride. In the antibiotics susceptibility study the result showed that group against the resistance: R were Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin and Penicillin G. at 100, 100, 96.08, and 100% respectively. In sensitive: S, 94.12, 98.04, 96.08, 98.04, 92.16, 100.00, 96.08, 98.04, 39.22, 41.18, and 92.16% of Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Nitrofurantoin, Norfloxacin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Tetracycline, Oxytetracycline and Streptomycin were antibiotics sensitive respectively. However, It is noticeable that there were small number of antibiotic sensitivity in Oxytetracycline and Tetracycline, which the local farmers have been using these two groups of antibiotics for long time and there should be close monitoring.

Keywords: *Hoplobatrachus rugulosus*, *Aeromonas hydrophila* and Antibiotic sensitivity test

* Corresponding author: E-mail: songsub888@gmail.com

บทนำ

กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) เป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทำรายได้ และสร้างอาชีพให้กับเกษตรกรทั่วประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีวิถีชีวิตการกินอยู่สัมพันธ์กับสัตว์น้ำชนิดนี้ เนื่องจากกบนาเป็นสัตว์ที่ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย มีรูปแบบการเลี้ยงที่หลากหลาย ทั้งรูปแบบบ่อดิน กระชังบ่อดิน และบ่อปูนซีเมนต์ ใช้ปริมาณน้ำในการเลี้ยงน้อยเหมาะสำหรับเกษตรกรที่มีพื้นที่ค่อนข้างจำกัด อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อค่อนข้างต่ำ ใช้ต้นทุนค่อนข้างน้อย ผลตอบแทนต่อหน่วยค่อนข้างสูง อีกทั้งกบนายังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศอย่างต่อเนื่อง เมื่อพิจารณาจากปริมาณการส่งออกไปต่างประเทศมีปริมาณเพิ่มขึ้นดังในปี พ.ศ. 2556-2558 ที่มีมูลค่าการส่งออก 27.8, 42.1 และ 42.8 ล้านบาท โดยมีประเทศคู่ค้าที่สำคัญในการส่งออกกบที่ผลิตในประเทศในช่วงห้าปีที่ผ่านมา คือ ฮ่องกง จีน สิงค์โปร์ ญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว มาเลเซีย สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์ จากความต้องการของตลาดอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปัจจุบันพบว่ามีเกษตรกรผู้เลี้ยงกบที่มีกำลังการผลิตรวมกว่า 1,783 ตัน และมีพื้นที่การเลี้ยงกว่า 657 ไร่ทั่วประเทศ (Department of Fisheries, 2015) ส่วนรูปแบบการเพาะเลี้ยงกบนาในปัจจุบันจะมีทั้งการเพาะเพื่อจำหน่ายเป็นลูกอ๊อดและการเลี้ยงเพื่อขายเป็นกบเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบในปัจจุบัน คือโรคระบาดที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยง โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียซึ่งทำให้กบป่วยและตายเป็นจำนวนมาก โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญที่พบได้อยู่เสมอเกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* (Glorioso *et al.*, 1974) ซึ่งมีรายงานการพบครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปลายปี พ.ศ. 2525 ที่แยกได้จากการติดเชื้อในปลาน้ำจืด (Camus *et al*., 1998) โดยลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีรูปร่างเป็นแท่ง สามารถเจริญอยู่ได้ทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่ามีการอยู่อย่างอิสระได้ในธรรมชาติ จัดเป็นเชื้อก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำที่สำคัญตัวหนึ่ง (Cartwright *et al.,* 1994) ด้วยสาเหตุดังที่กล่าวมาทำให้เกษตรกรได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาและป้องกันอย่างแพร่หลาย โดยไม่ทราบวิธีการและปริมาณการใช้ที่ถูกต้อง อีกทั้งวิธีการใช้ยังมีความเสี่ยงที่จะทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียวกันอย่างต่อเนื่องหรือใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันมากกว่าการรักษา นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวยังสามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ในมนุษย์ เช่น การติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) การติดเชื้อในกระเพาะอาหารทำให้ลำไส้อักเสบ เยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังอักเสบ หลอดลมอักเสบ (bronchitis) และเยื่อบุหัวใจอักเสบ (endocarditis) (Janda *et al*., 1996) ซึ่งการเฝ้าระวังเชื้อดังกล่าวจึงมีความสำคัญอย่างมากทั้งกับสัตว์น้ำและมนุษย์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบและติดตามการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าว เพื่อหาแนวทางในการควบคุม ป้องกัน และรักษาอย่างถูกวิธีต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างกบป่วย วิธีการแยกเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *A. hydrophila* จากกบที่แสดงอาการป่วย

ศึกษาเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกจากกบนาที่แสดงอาการป่วยในฟาร์มเลี้ยง เขตพื้นที่จังหวัดสกลนครโดยการสุ่มเก็บตัวอย่าง สำรวจ และศึกษาสภาพการเลี้ยงโดยทั่วไปของเกษตรกร โดยสังเกตอาการป่วยจากลักษณะภายนอก อาทิ ลักษณะการทรงตัว การว่ายน้ำผิดปกติ ตาขาวขุ่น แผลตามลำตัว ลักษณะของท้อง ในแหล่งพื้นที่การเลี้ยงในจังหวัดสกลนครตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 ครอบคลุมพื้นที่ 4 อำเภอที่มีการเลี้ยงอย่างหนาแน่นคือ อำเภอเมือง อำเภอพรรณานิคม อำเภอพังโคน และอำเภออากาศอำนวย จำนวนทั้งหมด 15 ฟาร์ม หลังจากนั้นทำการศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกบที่แสดงอาการป่วย โดยการเปิดช่องท้อง สังเกตลักษณะอวัยวะภายใน แยกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากอวัยวะภายใน คือ ไต ตับ ม้าม สมอง และบาดแผลที่บริเวณผิวหนัง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) เพาะเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยการย้อม

แกรมศึกษาลักษณะของเซลล์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เพื่อทำการศึกษาต่อไปใน Nutrient Broth 15% Glycerol ที่ -70 องศาเซลเซียส

2. ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Standard disc diffusion method

เตรียมเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Tryptic soy broth (TSB) นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเชื้อแบคทีเรียให้ตกตะกอน หลังจากนั้นเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ และป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA) ให้ทั่วหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำจำนวน 2 ซ้ำ เพื่อเป็นการยืนยันผล และวางแผ่นยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ 15 ชนิดในการทดสอบ ดังนี้

1. Amoxicillin 10 µg
2. Ampicillin 10 µg
3. Chloramphenicol 30 µg
4. Ciprofloxacin 5 µg
5. Enrofloxacin5 µg
6. Erythromycin 15 µg
7. Gentamicin 10 µg
8. Kanamycin 30 µg
9. Nitrofurantoin300 µg
10. Norfloxacin10 µg
11. Oxytetracycline30 µg
12. Penicillin G 10 µg
13. Streptomycin 10 µg
14. Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25 µg
15. Tetracycline 30 µg

บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกขนาดของ clear zone โดยใช้หน่วยเป็นมิลลิเมตร และเทียบความไวต่อยาปฏิชีวนะตามวิธีการของ MacFaddin (1980)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลจากการเก็บตัวอย่างกบป่วย วิธีการแยกเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *A. hydrophila* จากกบที่แสดงอาการป่วย

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพบว่าสภาพการเลี้ยงโดยทั่วไปของเกษตรกร ในช่วงฤดูกาลเพาะพันธุ์คือช่วงฤดูร้อนและฤดูฝนจะนิยมกางกระชังเพื่อเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดินกลางแจ้ง เมื่อพ่อแม่พันธุ์พร้อมสมบูรณ์จะปล่อยให้ผสมพันธุ์ในบ่อดินที่สร้างขึ้น ขนาดกว้างประมาณ 1 เมตร ยาวประมาณ 3 ถึง 7 เมตร อัตราส่วนเพศผู้ 2 ตัวต่อเพศเมีย 1 ตัว ความหนาแน่นประมาณ 5-10 ตัวต่อตารางเมตร ล้อมด้วยมุ้งไนล่อนความสูงประมาณ 50 ถึง 70 เซนติเมตร เมื่อหมดฤดูกาลเพาะพันธุ์ลูกอ๊อด ซึ่งเกษตรกรจะเริ่มหยุดการเพาะพันธุ์ประมาณปลายเดือนกันยายน เกษตรกรจะนิยมเก็บพ่อแม่พันธุ์ไว้ในบ่อซีเมนต์ทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 150 เซนติเมตร (Fig. 1-A) โดยมีระดับน้ำประมาณ 10-15 เซนติเมตร และเลี้ยงที่ความหนาแน่นเฉลี่ย 25-30 ตัวต่อตารางเมตร เพื่อรอการเพาะพันธุ์ต่อไป จากการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาชนิดของเชื้อ *A. Hydrophila* ที่แยกจากกบนา และลูกอ๊อดที่แสดงอาการป่วย เขตจังหวัดสกลนคร ในพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างหนาแน่น สามารถเก็บตัวอย่างกบนาที่แสดงอาการป่วยในพื้นที่การเลี้ยงที่มีการเลี้ยงอย่างหนาแน่น จำนวนทั้งสิ้น 15 ฟาร์ม โดยเก็บทั้งหมด 3 ฤดูกาล ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2559 เป็นตัวแทนในฤดูร้อน เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 เป็นตัวแทนฤดูฝน และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 เป็นตัวแทนฤดูหนาว สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อ *A. hydrophila* ได้จำนวน 51 ไอโซเลท โดยพบในช่วงฤดูหนาวมากที่สุด คือ 31 ไอโซเลท คิดเป็น 60.78% ช่วงฤดูร้อน 12 ไอโซเลท คิดเป็น 23.53% และช่วงฤดูฝน 8 ไอโซเลท คิดเป็น 15.69% ลักษณะอาการภายนอกของกบป่วยที่พบคือจะมีแผลหลุมลึกบริเวณลำตัว นิ้วเท้า ว่ายน้ำ และเคลื่อนที่แบบควงสว่าน ลักษณะตาจะพบว่ามีสีขาวขุ่น (Fig. 1-B) พบของเหลวในช่องท้อง บริเวณต้นขามีอาการบวมแดง ส่วนลักษณะอวัยวะภายในที่พบว่าบริเวณตับ และม้ามของกบนาที่ป่วยมีสีซีด สลับกับมีสีน้ำตาลคล้ำ บางครั้งพบว่ามีแกรนูโลม่า (Granulomas)

กระจายทั่วบริเวณตับ ซึ่งสามารถแยกเชื้อ *A. hydrophila* ได้จากอวัยวะดังกล่าว ทั้งอวัยวะภายนอกและภายใน

คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากกบป่วยพบว่าจากตัวอย่างที่พบ 51 ตัวอย่าง มีลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบ สีขาวนวล เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้ เมื่อย้อมแกรมพบว่าติดสีแดง (แกรมลบ) มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (Fig. 1-C) โดยคุณสมบัติที่สำคัญในการแยกเชื้อ *A. hydrophila* ออกจากเชื้อชนิดอื่น คือ การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) การทดสอบคาตาเลส (catalase) การทดสอบย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) การผลิตแก๊สจากกลูโคส การทดสอบความสามารถในการย่อยเอสคูลิน (Esculin hydrolysis) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ และความต้านทานต่อVibriostatic agent (0/129) ซึ่งจากการทดสอบทางชีวเคมีโดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อตัวอย่างมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเชื้อ *A. hydrophila* ที่พบจากแหล่งต่างๆ เช่น กบนา ปลาน้ำจืด เขียดตะปาดในเขตทวีปออสเตรเลีย เนื้อสัตว์ และจากสิ่งแวดล้อม (Huys *et al*., 2003; Awan *et al*., 2005; Schadich and Cole, 2010; Samal *et al.,* 2014) ส่วนการทดสอบการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* จากกบป่วยที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0, 2, 4 และ 6% NaCl (Table 1) พบว่าเชื้อ *A. Hydrophila* ทุกไอโซเลทไม่มีการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็ม 5 และ 7% ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับ Samal *et al.* (2014) ที่ พบว่าเมื่อนำเชื้อ *A. Hydrophila* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4% ขึ้นไปจะไม่พบการเจริญของเชื้อซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการรักษาหรือบรรเทาอาการป่วยจากกบนาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ได้

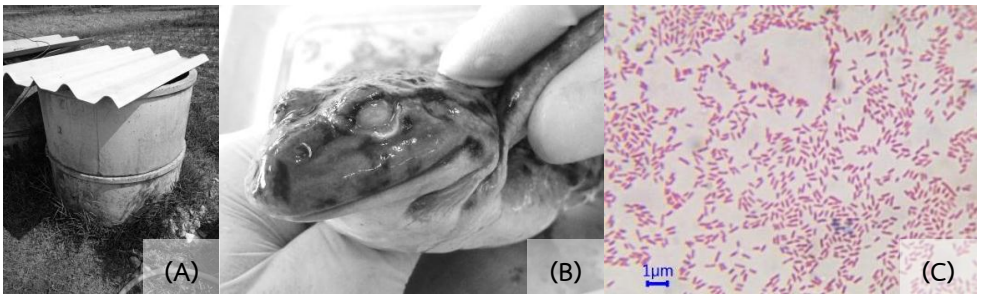

Fig. 1 The frogs were raised nurture in round cement tanks (A), The frog was exhibited symptoms by opaque eye (B) and Appearance of isolated *A. hydrophila* bacteria from infected frogs (C)

2. ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Standard disc diffusion method

การศึกษาผลความไวของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่แยกได้จากกบนาและลูกอ๊อดที่ป่วยต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี Standard disc diffusion method จำนวน 51 ไอโซเลท ซึ่งทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 15 ชนิด ตามวิธีการข้างต้น พบว่าจากการศึกษาสามารถแบ่งระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะได้ 2 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ผลการดื้อยา (resistance: R) มี 4 ตัวยาคือ Amoxicillin 10 µg, Ampicillin 10 µg, Erythromycin 15 µg และ Penicillin G 10 µg โดยมีอัตราการดื้อยา 100, 100, 96.08 และ 100% ตามลำดับ กลุ่มที่ให้ผลไวต่อยาปฏิชีวนะ (Sensitive: S) มี 11 ตัวยา คือ Chloramphenicol 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Enrofloxacin5 µg, Gentamicin 10 µg, Kanamycin 30 µg, Nitrofurantoin 300 µg, Norfloxacin 10 µg, Oxytetracycline 30 µg, Streptomycin 10 µg, Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25 µg และ Tetracycline 30 µg โดยมีอัตราความไวต่อยา 94.12, 98.04, 96.08, 98.04, 92.16, 100, 96.08, 41.18, 92.16, 98.04 และ 39.22% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนแนวโน้มการดื้อต่อยาแล้ว พบว่ามียาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ที่มีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยาคือ ยาปฏิชีวนะชนิด Amoxicillin, Oxytetracycline และ Tetracycline ซึ่งตรงกับการให้ข้อมูลของเกษตรกรในพื้นที่ ที่พบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งสามชนิดนี้จากเกษตรกร เพื่อป้องกันและรักษาโรคกบและลูกอ๊อดมาเป็นระยะเวลานานซึ่งอาจมีแนวโน้มการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อพิจารณากลุ่มหรือประเภทของยาและการตอบสนองของเชื้อแบคทีเรียพบว่า ยาในกลุ่ม Penicillins ได้แก่ Amoxicillin, Ampicillin และ Penicillin และยาใน

กลุ่ม Macrolides คือ Erythromycin แบคทีเรียในการทดสอบให้ผลการดื้อต่อยาทั้งหมด ส่วนในกลุ่มที่ให้ผลการตอบสนองปานกลางคือกลุ่ม Tetracyclines ได้แก่ Tetracycline และ Oxytetracycline และกลุ่มของยาปฏิชีวนะที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีในการทดลองครั้งนี้คือ ยาในกลุ่ม Quinolones ได้แก่ Ciprofloxacin, Enrofloxacin และ Norfloxacin ยาในกลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ Gentamicin, Kanamycin และ Streptomycin ยาในกลุ่ม chloramphenicols ได้แก่ Chloramphenicol ยาในกลุ่ม Nitrofuran ได้แก่ Nitrofurantoinและยาในกลุ่ม Sulfonamides คือ Sulfamethoxazole/Trimethoprim

Table 1 Biochemical test of isolated *A. hydrophila* compared with difference strain from the other sources

Characteristics	Isolate from this report	Reference* 1, 2, 3 and 4	Characteristic	Isolate from this report	Reference* 1, 2, 3 and 4
Gram	–	–	**Fermentation of**		
Motility	+	+	Glucose	+	+
Growth in 0% NaCl	+	+	Mannose	+	+
Growth in 2% NaCl	+	+	Inositol	–	–
Growth in 4% NaCl	–	–	Sorbitol	–	V
Growth in 6% NaCl	–	ND	Rhamnose	–	–
Cytochrome oxidase	+	+	Sucrose	+	+
Catalase	+	+	Manital	+	+
Nitrate reduction	+	+	**Hydrolysis of**		
Vibriostatic agent (o/129)	+	+	Urea	–	–
Citrate Utilization	+	V	Gelatin	+	+
O/F test	F	F	Esculin	+	+
Decarboxylation test			Casein	+	+
Arginine	+	+	**Production of**		
Lysine	+	+	Indole	+	+
Ornithine	–	–	Voges-proskauer	V	+
Tryptophan	–	–	H_2S	+	+

*Reference 1= Huys *et al*. (2003), 2= Awan *et al*. (2005), 3= Schadich and Cole (2010), 4= Samal *et al*. (2014)

(+) = Positive > 70%, (-) = Positive < 30%, V= variable reactions, ND=no data found

การเฝ้าระวังและการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *A. hydrophila* พบว่ามีการดำเนินการอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว พบได้ทั้งในแหล่งน้ำธรรมชาติ และในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำหลายๆ ชนิดทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมากในช่วงที่มีการระบาด จากข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าเชื้อชนิด *A. hydrophila* ที่แยกจากสัตว์น้ำที่แสดงอาการป่วยนี้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 6 กลุ่มคือ ยาในกลุ่ม Quinolones, Tetracyclines, Aminoglycosides, Nitrofuran, Chloramphenicols และ Sulfonamides เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้ (Dancer *et al*., 2008) และจากข้อมูลไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. hydrophila* จากแหล่งต่างๆ เช่น ปลาน้ำจืด น้ำ ตะกอนจากแหล่งฟาร์ม

เพาะเลี้ยงปลา สิ่งแวดล้อม เนื้อสัตว์ประเภทต่างๆ ปลานิลจากแหล่งเลี้ยง และสถานพยาบาล พบว่ามีแนวโน้มการดื้อยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากกบป่วยในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งพบว่ามีการดื้อต่อยาชนิด Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin และ Penicillin G เช่นเดียวกัน (Table 2) อย่างไรก็ตาม ยาปฏิชีวนะชนิด Tetracycline และ Oxytetracycline ให้ผลการรักษาที่ไม่คงที่ เช่นเดียวกันกับรายงานการใช้ยาทั้ง 2 ชนิดนี้ทั่วโลก ที่พบว่ามีความแปรผันในการรักษาค่อนข้างสูง (Table 2) เนื่องจากในปัจจุบันมียาปฏิชีวนะที่หลากหลาย ซึ่งถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลายทั้งในคนและในสัตว์ หรือแม้กระทั่งการใช้ยาปฏิชีวนะโดยขาดความระมัดระวัง รวมทั้งการใช้ไม่ถูกวิธี อันเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย ปัญหาดังกล่าวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งกลไกการดื้อยาโดยที่แบคทีเรียจะสร้างยีนที่ดื้อยาขึ้นมาต่อต้านกลไกการทำงานของยาปฏิชีวนะ จึงทำให้การใช้ยาในการรักษาไม่ให้ผลดีเท่าที่ควร (Dancer *et al*., 2008; Aravena-Román *et al*., 2012)

Table 2 Antimicrobial susceptibilities of isolated *A. hydrophila* compared with difference strain from the other sources

Antimicrobial agents (µg)	Sensitivity result (n=51)			Isolate from this report	Reference [1, 2, 3 and 4*]
	Sensitivity (%)	Intermediate (%)	Resistance (%)		
Amoxicillin 10	0	0	100	R (100)	R
Ampicillin 10	0	0	100	R (100)	R
Chloramphenicol 30	94.12	5.88	0	S (94.12)	S
Ciprofloxacin 5	98.04	1.96	0	S (98.04)	S
Enrofloxacin 5	96.08	3.92	0	S (96.08)	S
Erythromycin 15	0	3.92	96.08	R (96.08)	R
Gentamicin 10	98.04	1.96	0	S (98.04)	S
Kanamycin 30	92.16	7.84	0	S (92.16)	S
Nitrofurantoin 300	100	0	0	S (100)	S
Norfloxacin 10	96.08	3.92	0	S (96.08)	S
Oxytetracycline 30	41.18	27.45	31.37	S (41.18)	S
Penicillin G 10	0	0	100	R (100)	R
Streptomycin 10	92.16	7.84	0	S (92.16)	V
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim 25	98.04	1.96	0	S (98.04)	V
Tetracycline 30	39.22	23.53	37.25	S (39.22)	V

[*1] *A. hydrophila* Isolates from freshwater fish (Samal *et al*., 2014), [2] *A. hydrophila* Isolates from chicken (Igbinosa, 2014) [3] *A. hydrophila* Isolates from freshwater fish farm (Daood, 2012), [4] *A. hydrophila* Isolates from environmental (Peng *et al*., 2014), R= Resistance, S= Sensitivity, V= Variable

เมื่อพิจารณาข้อมูลตำรับยาที่สามารถใช้ได้กับสัตว์น้ำตามการอนุญาตของกรมประมง โดยตำรับยาเดี่ยวที่มีตัวยาสำคัญ 7 ตัวยาและตำรับยาผสม 5 ชนิด ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้มีตัวยาที่กรมประมงอนุญาตใช้ได้ 4 ตำรับ คือ Amoxicillin, Enrofloxacin, Oxytetracycline และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim ซึ่งจากผลการทดสอบเชื้อ *A. hydrophila* ในครั้งนี้ พบว่ายาปฏิชีวนะชนิด Enrofloxacin และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim คือให้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อ *A. hydrophila* ในครั้งนี้ที่ระดับ 96.08 และ 98.04% ส่วนยาปฏิชีวนะชนิด Oxytetracycline ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในระดับปานกลาง คือ 39.22% และยาปฏิชีวนะชนิด Amoxicillin ไม่ให้ผลในการรักษา แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline มีข้อจำกัดและผลข้างเคียงสำหรับการใช้ในกบโดย จากการรายงานของ Somsiri *et al*. (1998) ที่ได้ทำการศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากกบที่เป็นโรคขาแดงและวิธีการรักษา โดยการนำเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากจากกบป่วย ฉีดเข้าตัวกบอีกครั้งก่อนการศึกษาประสิทธิภาพของยาชนิดต่างๆ ในการรักษา ซึ่งพบว่าในการรักษาโดยการแช่ยาปฏิชีวนะชนิด Oxytetracycline ที่ 10-30 ppm ไม่ให้ผลในการรักษา และยังพบอีกว่าการแช่ยา Oxytetracycline ยังส่งผลต่ออวัยวะภายใน โดยพบว่ามีการตายของเซลล์ตับเป็นหย่อมๆ (focal necrosis) และมีแผลเลือดออกเป็นจุดเล็กๆ (Petechial hemorrhage) ทั่วไปในตับจากการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

การทดสอบความไวยาด้วยวิธี Standard disc diffusion method เป็นวิธีการที่ง่าย และสะดวกสำหรับสำหรับการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ทั้งในด้านการหาแนวทางในการรักษาและการเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาและการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาอย่างใกล้ชิด โดยข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะในพื้นที่อาจมีความแตกต่างกันในแต่ละปี ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการตัดสินใจในการใช้ยาของเกษตรกรเพื่อที่จะสามารถใช้ยาปฏิชีวนะให้ถูกต้องเหมาะสม อีกทั้งเนื่องจากสัตว์น้ำที่ศึกษาเป็นสัตว์ที่คนในพื้นที่นิยมบริโภคทั้งในจังหวัด และมีการส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้าน ดังนั้นการใช้ยาเพื่อการป้องกันโรคอย่างไม่จำเป็นอาจส่งผลต่อการดื้อยากับผู้บริโภคอีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาชนิดและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากการเพาะเลี้ยงกบนาโดยแยกเชื้อจากกบนาที่แสดงอาการป่วย และนำเชื้อที่ได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl ตั้งแต่ 4% ขึ้นไป ในส่วนของชนิดของยาปฏิชีวนะที่ให้ผลในการรักษาได้ดี พบว่ามี 11 ตัวยา คือ Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Gentamycin, Kanamycin, Nitrofurantoin, Norfloxacin, Oxytetracycline, Streptomycin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim และ Tetracycline อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาบัญชีรายชื่อตำรับยาที่สามารถใช้ได้กับสัตว์น้ำตามการอนุญาตของกรมประมงพบว่า ยาปฏิชีวนะที่แนะนำให้เกษตรกรใช้ คือ Sulfamethoxazole/Trimethoprim และ Enrofloxacin ร่วมกับการใช้เกลือที่ 4% ในการรักษา และควรมีการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อ *A. hydrophila* จากการเลี้ยงกบในพื้นที่เป็นประจำเพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้ผู้บริโภคและลดความเสี่ยงของเชื้อดื้อยาที่สามารถแพร่กระจายมาสู่มนุษย์ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัยในครั้งนี้

References

Aravena-Román, M., Inglis, T.J., Henderson, B., Riley, T.V. and Chang, B.J. 2012. Antimicrobial susceptibilities of

Aeromonas strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 56(2): 1110-1112.

Awan, M.B., Ahmed, M.M., Bari, A. and Saad, A.M. 2005. Biochemical characterization of the *Aeromonas* species isolated from food and environment. Pak. J. Physiol. 1(1-2): 1-10.

Camus, A.C., Durborow, R.M., Hemstreet, W.G., Thune, R.L. and Hawke, J.P. 1998. *Aeromonas* bacterial infections: Motile aeromonad septicemia. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 478.

Cartwright, G.A., Chen, D., Hanna, P.J., Gudkovs, N. and Tajima, K. 1994. Immunodiagnosis of virulent strains of *Aeromonas hydrophila* associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) using a monoclonal antibody. J. Fish Dis. 17(2): 123-133.

Dancer, S.J., White, L. and Robertson, C. 2008. Monitoring environmental cleanliness on two surgical wards. Int. j. Environ. Health Res. 18(5): 357-364.

Daood, N. 2012. Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. from freshwater fish farm and farmed carp (dam of 16 Tishreen, Lattakia). Damascus University Journal for Basic Sciences. 28(1): 27-39.

Department of Fisheries. 2015. Freshwater aquaculture production survey 2013. Fishery Statistics Analysis and Research Group, Information and Communication Technology Center, Ministry of Agriculture and Cooperatives: Bangkok.

Glorioso, J.C., Amborski, R.L., Amborski, G.F. and Culley, D.D. 1974. Microbiological studies on septicemia bullfrogs (*Rana catesbeiana*). Am. J. Vet. Res. 35(9): 1241-1245.

Huys, G., Pearson, M., Kämpfer, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V. and Swings, J. 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp. ranae subsp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(3): 885-891.

Igbinosa, I.H. 2014. Antibiogram profiling and pathogenic status of *Aeromonas* species recovered from chicken. Saudi J. Biol. Sci. 21(5): 481-485.

Janda, J.M., Abbott, S.L., Khashe, S., Kellogg, G.H. and Shimada, T. 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. J. Clin. Microbiol. 34(8): 1930-1933.

MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd edition. Williams and Wilkins: Maryland. pp. 162-218.

Peng, G.U.O., Na, W.A.N.G., Liu, Y.J. and Lu, C.P. 2014. Antimicrobial susceptibility and characterization of outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* isolated in China. J. Integr. Agric. 13(4): 911-917.

Samal, S.K., Das, B.K. and Pal, B.B. 2014. Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3(12): 259-267.

Schadich, E. and Cole, A.L. 2010. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* to brown tree frogs (*Litoria ewingii*). Comp. Med. 60(2): 114-117.

Somsiri, T., Chinabut, S., Phanwichien, K., Soontornvit, S. and Damrongphol, Y. 1998. Virulence of *Aeromonas* spp. isolated from red leg disease frog. Proceedings of the 36th Kasetsart University Annual Conference. February 3-5, 1998. Kasetsart University. Bangkok. pp. 102-112. (in Thai)