สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง ผลของสารสกัดจากเปลือกทับทิม และใบฝรั่ง ในการยับยั้งเชื้ออีโคไลที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่แยกได้จากมูลลูกสุกร

Effect of pomegranate rind (*Punica granatum* Linn.) and guava leaves extract (*Psidium guajava* Linn.) for inhibition of multi-drug resistance *Escherichia coli* from piglet feces.

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2557
จำนวน 50,000 บาท

หัวหน้าโครงการ สพ.ญ.ดร.กฤดา ชูเกียรติศิริ
ผู้ร่วมโครงการ ผศ.ดร.อภิชัย เมฆบังวัน
นายกิตติพงษ์ ทิพยะ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
31/สิงหาคม/2559

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องผลของสารสกัดจากเปลือกทับทิม และใบฝรั่ง ในการยับยั้งเชื้ออีโคไลที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่แยกได้จากมูลลูกสุกร (Effect of pomegranate rind (*Punica granatum* Linn.) and guava leaves extract (*Psidium guajava* Linn.) for inhibition of multi-drug resistance *Escherichia coli* from piglet feces) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฟาร์มสุกร และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ในการให้ความอนุเคราะห์เรื่องการเก็บตัวอย่าง และการใช้ห้องปฏิบัติการในการวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาคผนวก	ง
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการวิจัย	19
วิจารณ์ผลการวิจัย	24
สรุปผลการวิจัย	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	29

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ยาปฏิชีวนะ กลไกการออกฤทธิ์ และกลไกการดื้อยา	9
ตารางที่ 2	ตัวทำละลายและสารที่ใช้เจือจางยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด	17
ตารางที่ 3	แสดงการแปลผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อของยาปฏิชีวนะ (MIC) ต่อเชื้อ *E. coli*	18
ตารางที่ 4	แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดลอง	19
ตารางที่ 5	แสดงลักษณะ สี และเปอร์เซ็นต์ของสารที่สกัดได้จากเปลือกทับทิม และใบฝรั่ง	20
ตารางที่ 6	แสดงค่า MIC และการแปลผลความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร	21
ตารางที่ 7	แสดงค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกทับทิมในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร	22
ตารางที่ 8	แสดงค่า MIC ของสารสกัดจากใบฝรั่งในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร	23

สารบัญภาคผนวก

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1	แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดลอง	30
ตารางภาคผนวกที่ 2	แสดงค่า MIC ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร	32
ตารางภาคผนวกที่ 3	แสดงค่า MIC ของเปลือกทับทิมและใบฝรั่งต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร	35
ภาพภาคผนวกที่ 1	แสดงลักษณะของเปลือกทับทิมแห้งบดก่อนสกัดเทียบกับสารที่สกัดได้	37
ภาพภาคผนวกที่ 2	แสดงลักษณะของใบฝรั่งแห้งบดก่อนสกัด เทียบกับสารที่สกัดได้	38
ภาพภาคผนวกที่ 3	แสดงวิธีการสกัดสารโดยใช้ Soxhlet extraction	39
ภาพภาคผนวกที่ 4	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB และ MAC	40
ภาพภาคผนวกที่ 5	แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ผสมสารสกัดสมุนไพรแต่ละความเข้มข้น	40

ผลของสารสกัดจากเปลือกทับทิม และใบฝรั่ง ในการยับยั้งเชื้ออีโคไลที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่แยกได้จากมูลลูกสุกร

Effect of pomegranate rind (*Punica granatum* Linn.) and guava leaves extract (*Psidium guajava* Linn.) for inhibition of multi-drug resistance *Escherichia coli* from piglet feces.

กฤดา ชูเกียรติศิริ กิตติพงษ์ ทิพยะ และอภิชัย เมฆบังวัน

Kridda Chukiatsiri, Kittiphong Tippaya and Apichai Mekbungwan

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้ออีโคไลสามารถพบได้ค่อนข้างมากทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก จึงได้มีการศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกทับทิมและใบฝรั่งในการยับยั้งเชื้ออีโคไล ทำการเก็บตัวอย่างและแยกเชื้ออีโคไลจากมูลลูกสุกรที่แสดงอาการท้องเสีย จากฟาร์มในเขตจังหวัดเชียงใหม่ แล้วนำมาใช้ในการทดสอบจำนวน 50 สายพันธุ์ โดยศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยทดสอบกับยาจำนวน 11 ชนิด ด้วยวิธี broth microdilution method ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเชื้ออีโคไลที่แยกได้ทั้ง 50 สายพันธุ์มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด โดยยาปฏิชีวนะที่มีการดื้อยาทั้ง 50 สายพันธุ์ (100%) ได้แก่ โนโวไบโอซิน สเตรปโตมัยซิน ซัลฟาเมทธ็อกซาโซล เตตราซัยคลิน และไธอะมูลิน ส่วนยาปฏิชีวนะที่ดื้อยาค่อนข้างสูงได้แก่ อะม็อกซี่ซิลิน (98%) ออกซี่เตตราซัยคลิน (96%) นาลิดิซิคแอซิด (82%) เจนตามัยซิน (56%) เอ็นโรฟลอกซาซิน (54%) และ โคลิสตินซัลเฟต (46%) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเปลือกทับทิมและใบฝรั่งจะใช้วิธีการสกัดด้วย 95% เอทธานอล โดยใช้

วิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับเชื้ออีโคไลทั้ง 50 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Agar dilution method ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเปลือกทับทิมและใบฝรั่งที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) เฉลี่ยอยู่ที่ 5.94 มก./มล. และ 9.44 มก./มล. ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้ออีโคไลที่มีการดื้อยาซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: เชื้ออีโคไล เปลือกทับทิม ใบฝรั่ง การดื้อยาปฏิชีวนะ ลูกสุกร

ABSTRACT

In the present, antimicrobial resistance of *E. coli* were widely found in Thailand and worldwide. Then some antimicrobial properties of traditional plants were studied for replacement of antibacterial used. The objectives of this study were to determine antimicrobial resistance and efficacy of pomegranate rind and guava leave extract against *E. coli*. Fifty field isolates of *E. coli* were isolated from feces of piglet that showed diarrhea signs from swine farms in Chiang Mai province. The resistance of the isolates to 11 antimicrobial agents was tested by broth microdilution method. The multidrug resistance of all field isolates *E. coli* was found and all isolates were resistant to Novobiocin, Streptomycin, Sulfamethoxazole, Tetracyclin and Tiamulin, while there was a high level of resistance to Amoxicillin (98%), Oxytetracyclin (96%), Nalidixic acid (82%), Gentamicin (56%) and Colistin sulfate (46%), respectively. The extraction of pomegranate rind and guava leave were using Soxhlet extraction method and 95% Ethanol was used as solvent. The inhibitory effect of both ethanolic extract was tested against all field isolates *E. coli* by using the agar dilution method. The pomegranate rind and guava leave extract exhibited antibacterial activity against all field isolates *E. coli* with minimum inhibitory concentration 5.94 mg/ml and 9.44 mg/ml, respectively. From this study, the possibility of herbal extract using as alternative choice in prevention and treatment of high level antimicrobial resistant *E. coli* in pig may further study.

Key words: *E. coli*, pomegranate rind, guava leaves, antimicrobial resistance, piglet

คำนำ

โรคติดเชื้อ *E. coli* เป็นโรคที่ทำให้เกิดความสูญเสียลูกสุกรในช่วงอายุน้อยค่อนข้างมาก โดยเชื้อ *E. coli* สามารถพบได้ทั้งในสุกรช่วงที่กินนมและสุกรหลังหย่านมซึ่งอาจจะติดต่อจากแม่หรือปนเปื้อนมาในสิ่งแวดล้อม (กิจจา และคณะ, 2537) ลูกสุกรที่รอดชีวิต อาจจะเกิดการชะงักการเจริญเติบโตตามมาได้ นอกจากนี้การจัดการที่ไม่ดี หรือความเครียดในช่วงหย่านมก็เป็นสาเหตุโน้มนำให้พบการติดเชื้อง่ายขึ้น จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเพิ่มมากขึ้นทั้งเพื่อใช้ป้องกันโรค และการรักษาโรค โดยการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ในสุกร พบว่า ในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะในกลุ่ม Tetracyclin และ sulfa-trimetroprim (เนตรชนก และคณะ, 2551) ค่อนข้างมาก นอกจากนี้ ยาปฏิชีวนะกลุ่มที่มักใช้บ่อยในสุกรก็ยังมีรายงานการพบการดื้อยาในอัตราที่สูงด้วย เช่น Ampicillin, Tylosin, Penicillin, Spectinomycin, Lincomycin และ Gentamicin (Choi *et al*., 2002; Stannarius *et al*., 2009) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องการใช้ยาและการใช้ยาที่บ่อยเกินไป ปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะในสุกรที่สำคัญ นอกจากเรื่องการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์จากสัตว์แล้ว เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หากมีการปนเปื้อนเชื้อไปยังผู้บริโภคแล้ว จะส่งผลให้การใช้ปฏิชีวนะทั่วๆไปรักษาในคนไม่ได้ผล ทำให้ต้องมีการใช้ยาในกลุ่มที่มีระดับสูงขึ้นไป และมีราคาแพงมากขึ้น นอกจากนี้เชื้อที่ดื้อยายังสามารถส่งต่อยีนดื้อยาไปให้เชื้อจุลชีพก่อโรคตัวอื่นได้อีกด้วยทำให้เชื้ออื่นๆมีการดื้อยาปฏิชีวนะตามไปด้วย (Hammerum and Heuer, 2009) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากทางสาธารณสุข ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังเรื่องการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์

ปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะมากขึ้น โดยมีศึกษาถึงฤทธิ์ของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคในสุกรได้ เช่นการใช้สารสกัดจากใบฝรั่ง, ผลฝรั่ง, กลีบรองดอกกระเจี๊ยบแดง, ใบคูณ, เปลือกคูณ (พิทัย และคณะ, 2544), และ ข่า (ภานุวัฒน์ และคณะ, 2547) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ซึ่งหากมีการประยุกต์ใช้สมุนไพรในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ ก็จะสามารถลดการใช้ยาเพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนและลดการเกิดการดื้อยาในฟาร์ม และนอกจากนี้ยังลดการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์ที่จะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเปลือกทับทิม และใบฝรั่งที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ทั้งที่มีและไม่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ
3. เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะนำสมุนไพรมาใช้เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มสุกร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ทราบถึงสภาวการณ์ของการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ในฟาร์ม
2. เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพของเปลือกทับทิม และใบฝรั่งในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*
3. เพื่อเป็นทางเลือกในการใช้สมุนไพรรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ
4. เพื่อนำข้อมูลไปต่อยอดเพื่อทดลองใช้รักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ในฟาร์มต่อไป
5. เพื่อประยุกต์ใช้สมุนไพรที่หาได้จากท้องถิ่นในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์ม เพื่อการพัฒนาเป็นฟาร์มเกษตรอินทรีย์ต่อไป

การตรวจเอกสาร

ประวัติและความสำคัญของโรคติดเชื้อ *Escherichia coli*

เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นเชื้อที่มีความสำคัญที่ก่อปัญหาท้องเสียในลูกสุกร ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบทำให้เกิดความสูญเสียลูกสุกรในช่วงอายุน้อยค่อนข้างมาก โดยเชื้อ *E. coli* สามารถพบได้ทั้งในสุกรช่วงที่กินนมและสุกรหลังหย่านมซึ่งอาจจะติดต่อจากแม่หรือปนเปื้อนมาในสิ่งแวดล้อม (กิจจา และคณะ, 2537) ลูกสุกรที่รอดชีวิต อาจจะเกิดการชะงักการเจริญเติบโตตามมาได้ นอกจากนี้การจัดการที่ไม่ดี หรือความเครียดในช่วงหย่านมก็เป็นสาเหตุโน้มนำให้พบการติดเชื้อง่ายขึ้น

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย และการก่อโรคในสุกร

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในแฟมมิลี่ Enterobacteriaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (bacillus) เซลล์มีขนาดประมาณ 0.3-1x1-6 ไมครอน (ภัทรชัย, 2549) ไม่สร้างสปอร์ แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ดีและให้โคโลนี (Colony) สีเทาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (media) ชนิด Blood agar และให้โคโลนีสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MacConkey agar

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *E. coli* (colibacillosis) พบเป็นปัญหาแพร่กระจายทั่วโลกและจัดเป็นโรคที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจมากที่สุดเมื่อเทียบกับโรคติดเชื้ออื่นๆ ของระบบการย่อยอาหาร โรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้มี 3 กลุ่มอาการคือ (1) เลือดเป็นพิษ (Septicemia) และช็อค (shock) (2) ท้องร่วง (Diarrhea) และ(3)โรคบวมน้ำ (Edema disease) เชื้อ *E. coli* ทั้งชนิดก่อโรค (Pathogenic) และไม่ก่อโรค (Non pathogenic) จะอาศัยอยู่ในลำไส้เล็กส่วนต้นหรือดูโอดีนัม (Duodenum) ของสุกร ชนิดของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคส่วนใหญ่จะเป็นซีโรไทป์ 0141 ,0149 และ k88 (กิจจา, 2535)

กลุ่มอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* เป็นผลจากการเจริญของเชื้อในลำไส้แล้วสร้างสารพิษหรือท็อกซิน (Toxin) ขึ้นมาซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของสายเชื้อที่ก่อโรคและชนิดของท็อกซิน ลักษณะโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ได้แก่

1. สายเชื้อที่ทำให้เกิดภาวะเลือดเป็นพิษในลูกสุกรแรกเกิดและสุกรหลังหย่านม จะเป็นเชื้อที่สร้างเอนโดท็อกซิน (Endotoxin) ซึ่งเป็นสารพวกโพลีแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) และ

ทำให้เกิดปฏิกิริยาแพ้และช็อคตามมาเนื่องจากมีการหลั่งฮีสตามีน(Histamine) ออกมามาก ซึ่งจะทำให้ความดันโลหิตลดลงเพราะหลอดเลือดเกิดการขยายตัว (Vasodilatation) อย่างมาก

2. สายเชื้อที่ทำให้เกิดท้องร่วงในสุกรจะสร้าง เอนเทอโรท็อกซิน (Enterotoxin) ซึ่งเป็นเอกโซท็อกซิน (Exotoxin) ชนิดหนึ่งท็อกซินที่สร้างขึ้นมามีทั้งชนิดที่ทนและไม่ทนต่อความร้อนหรือมีเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง เอนเทอโรท็อกซินจะทำให้ลำไส้เกิดการอักเสบเนื่องจากมีการทำลายเซลล์บุเยื่อเมือก การดูดซึมสารอาหารของลำไส้จะเสียไปและทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงตามมา

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ก่อโรคท้องร่วง หรือ Diarrheagenic *E. coli* สามารถแบ่งเชื้อโดยดูกลไกการก่อโรคและลักษณะอาการ โดยในสัตว์ pathotype ที่มีความสำคัญได้แก่ enterotoxigenic E. coli (ETEC), enteropathogenic E. coli (EPEC), Shiga toxin (Stx)-producing E. coli (STEC) และ extraintestinal pathogenic E. coli (ExPEC)

3. สายเชื้อที่ทำให้เกิดโรคบวมน้ำซึ่งส่วนใหญ่เกิดโรคบวมน้ำซึ่งส่วนใหญ่เกิดโรคในสุกรหลังหย่านม จะสร้างและปล่อยเอกโซท็อกซินชนิดหนึ่งที่ไม่ทนความร้อน มีชื่อว่านิวโรท็อกซิน (Neurotoxin) หรือ วาโซท็อกซิน (Vasotoxin) ท็อกซินชนิดนี้เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะก่อความเสียหายต่อผนังหลอดเลือดทำให้คุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านผนังหลอดเลือดลดลง มีผลทำให้เกิดการซึมผ่านของสารน้ำภายในหลอดเลือดฝอย (Capillary) ออกไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการบวมน้ำของเนื้อเยื่อตามมา

การเกิดโรค

1. เลือดเป็นพิษจะเกิดกับสุกรที่ได้รับภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง (Colostrum) จากแม่น้อยเกินไปทำให้เยื่อเมือกของลำไส้ของสุกรดังกล่าวไม่มีอิมมูโนโกลบูลิน(Immunoglobulin=IG) เคลือบอยู่ เชื้อ *E. coli* ในลำไส้จึงรุกแทรกผ่านเข้าสู่กระแสเลือดจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วทำให้เกิดภาวะแบคทีรีเมียหรือภาวะเลือดเป็นพิษ นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* ดังกล่าวยังสร้างเอนโดท็อกซินทำให้เกิดการช็อคเนื่องจากเอนโดท็อกซิน (Endotoxic shock) และเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้

2. ท้องร่วงความสามารถของเชื้อ *E. coli* ในการทำให้เกิดท้องร่วงขึ้นกับคุณสมบัติสองอย่างของเชื้อชนิดนี้คือ

(1) ความสามารถในการยึดติดกับเซลล์เยื่อเมือกของลำไส้โดยปัจจัยที่ส่งเสริมความรุนแรงของอาการท้องร่วงคือการลดต่ำของอุณหภูมิสภาพแวดล้อม ทั้งนี้พบว่าถ้าอุณหภูมิของคอกคลอดลดต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสจะทำให้ลูกสุกรท้องเสียเพราะการบีบรูด (Peristalsis) ของลำไส้ลดลงและส่งผลให้เกิดการสะสมและเพิ่มจำนวนของเชื้อ *E. coli* แทนที่จะถูกขับออกมากับอุจจาระตามปกติ นอกจากนี้การบีบรูดของลำไส้ที่ลดลงจะทำให้อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) ในน้ำนมไม่สามารถเคลื่อนตัวมาเคลือบเมือกแล้วป้องกันการเกาะติดของเชื้อ *E. coli* ตามปกติได้

(2) ความสามารถในการสร้างและปล่อยเอนเทอโรท็อกซินออกมาในลำไส้ เอนเทอโรท็อกซินที่เชื้อสร้างขึ้นมาจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ท็อกซินที่ทนความร้อน (Heat stable) ซึ่งกลไกลการทำให้ลูกสุกรท้องเสียได้โดยโมเลกุลของท็อกซินจะไปจับกับตัวรับจำเพาะ (Specific receptor) ที่เซลล์ของเยื่อเมือกลำไส้และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะดีนีล ซัยเคลส (Adenyl cyclase) ซึ่งในที่สุดจะส่งผลเพิ่มการถ่ายโอน (Transfer) ไบคาร์บอเนต (Bicarbonate) และโซเดียม (Sodium) รวมทั้งน้ำจากเซลล์เข้าไปในช่องภายในของลำไส้ (Intestinal lumen) ปริมาณของสารน้ำและสิ่งคัดหลั่งที่เพิ่มมากขึ้นภายในลำไส้จะทำให้สุกรเกิดอาการท้องร่วงและภาวะขาดน้ำตามมา

3. โรคบวมน้ำเชื้อ *E. coli* สายเชื้อที่ทำให้เกิดโรคบวมน้ำปกติจะมีอยู่ในลำไส้แต่ปริมาณไม่มากพอที่จะก่อให้เกิดโรค เมื่อสุกรเกิดภาวะเครียดจากปัจจัยต่างๆ โดยเฉพาะการเปลี่ยนอาหารจะทำให้ภูมิคุ้มกันของสุกรลดลงและเชื้อที่เกาะติดกับเซลล์เยื่อเมือกลำไส้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น พร้อมกับการขับนิวโรท็อกซินออกมา ท็อกซินชนิดนี้เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดจะมีผลต่อเซลล์บุหลอดเลือดทำให้คุณสมบัติการซึมผ่านได้ของหลอดเลือดฝอยสูงขึ้น เกิดการซึมผ่านของสารน้ำภายในหลอดเลือดออกไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อโดยรอบมากกว่าปกติเนื้อเยื่อจึงเกิดการบวมน้ำโดยเฉพาะที่เยื่อแขวนลำไส้เนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนัง สุกรมักจะแสดงอาการทางประสาทเนื่องจากหลอดเลือดฝอยที่นำเลือดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อสมองแตกและมีลิ่มเลือดในเนื้อเยื่อสมอง นอกจากนี้อาจพบอาการช็อค เนื่องจากเอนโดท็อกซินร่วมด้วยในสุกรบางตัวเนื่องจากมีเชื้อ *E. coli* สายเชื้อที่สร้างเอนโดท็อกซินแทรกซ้อน(กิจจา, 2535)

การรักษา และปัญหาเรื่องการดื้อยาของเชื้อ *E. coli*

จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเพิ่มมากขึ้นทั้งเพื่อใช้ป้องกันโรค และการรักษาโรค โดยพบว่ามียาปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่สามารถใช้กับเชื้อ *E. coli* ได้

การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ในสุกรพบว่า ในปัจจุบันประเทศไทยพบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะในกลุ่ม Tetracyclin และ sulfa-trimetroprim (เนตรชนก และคณะ, 2551) ค่อนข้างมาก นอกจากนี้ ยาปฏิชีวนะกลุ่มที่มักใช้บ่อยในสุกรก็ยังมีรายงานการพบการดื้อยาในอัตราที่สูงด้วย เช่น Ampicillin, Tylosin, Penicillin, Spectinomycin, Lincomycin และ Gentamicin (Choi *et al.*, 2002; Stannarius *et al.*, 2009) Amoxycillin, Oxytetracyclin และ Trimetroprim (van den Bogaard et al., 2000) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องการใช้ยาและการใช้ยาที่บ่อยเกินไป ปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะในสุกรที่สำคัญ นอกจากเรื่องการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์จากสัตว์แล้ว เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หากมีการปนเปื้อนเชื้อไปยังผู้บริโภคแล้ว จะส่งผลให้การใช้ปฏิชีวนะทั่วๆไปรักษาในคนไม่ได้ผล ทำให้ต้องมีการใช้ยาในกลุ่มที่มีระดับสูงขึ้นไป และมีราคาแพงมากขึ้น นอกจากนี้เชื้อที่ดื้อยายังสามารถส่งต่อยีนดื้อยาไปให้เชื้อจุลชีพก่อโรคตัวอื่นได้อีกด้วยทำให้เชื้ออื่นๆมีการดื้อยาปฏิชีวนะตามไปด้วย (Hammerum and Heuer, 2009) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากทางสาธารณสุข ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังเรื่องการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์

กลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะสามารถเกิดขึ้นได้ในยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดโดยมีกลไกการดื้อยาแตกต่างกันไปตามชนิดของยา โดยแบ่งได้เป็น (วีรวรรณ, 2549)

1. Intrinsic resistance ยาปฏิชีวนะบางชนิดไม่สามารถใช้ได้ ในเชื้อบางกลุ่มตามธรรมชาติของการออกฤทธิของ antibiotic เช่น vancomycinใน gram negative bacilli หรือ aminoglycoside ใน anaerobic bacteria
2. Acquired resistance เป็นกลไกที่แบคทีเรียพัฒนา ขึ้นมาเพื่อจะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะโดยทั่วไป แบ่งได้เป็น 4 กลไกใหญ่ซึ่งในเชื้อแต่ละชนิดอาจจะใช้หลายๆกลไกรวมกันในการดื้อยา antibiotic แต่ละชนิด

2.1) Drug inactivation / modification เป็นกลไกที่พบมากที่สุด เกิดจากแบคทีเรียสร้าง enzyme มาทำลายหรือ เปลี่ยนแปลงยาปฏิชีวนะ ตัวอย่างที่เราพบได้บ่อย ได้แก่ penicillinases, beta-lactamases, cephalosporinases

2.2) Alteration of target site โดยวิธีการนี้ยาจะสามารถเข้าไปในผนังเซลล์ไปถึง target site ได้แต่ไม่สามารถจับกับ target site ได้เพราะมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง molecule จึงทำให้ยาออกฤทธิ์ต่อไม่ได้ เช่นใน *S. pneumoniae* PBP (penicillin binding protein) จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น PBPX ทำให้เกิดการดื้อยาตามมา

2.3) Bypass pathways เชื้อที่ดื้อยาสร้าง alternative target ขึ้นมาใหม่แล้วยาปฏิชีวนะจะมาจับกับ target อันใหม่แทน เช่น PBP2a ในกรณี MRSA

2.4) Decreased uptake แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ ยาเข้าไปในเซลล์หรือมีการใช้ energy-requiring membrane efflux pump นำยาออกไป ตัวอย่างเช่น ยา imipenam จำเป็นจะต้องอาศัย porin เฉพาะในการที่ยาจะเข้าเซลล์ได้ เมื่อ *P. aeruginusa* พัฒนาให้ไม่มี porin ชนิดนี้ก็จะสามารถดื้อต่อ imipenam ได้หรือใน *Salmonella typhi* มีการเพิ่ม expression ของยีนที่สร้าง multidrug efflux pump จึงทำให้เกิดการดื้อยา หลายชนิดตามมา

กลไกการออกฤทธิ์ของการดื้อยาชนิดต่างๆ สรุปได้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ยาปฏิชีวนะ กลไกการออกฤทธิ์ และกลไกการดื้อยา

ยาปฏิชีวนะ	กลไกการออกฤทธิ์	กลไกการดื้อยาที่สำคัญ
β-lactams (Amoxicillin)	Inhibit cell wall synthesis, Cell division	beta - lactamases, altered penicillin binding protein, altered GNB outer-membrane porins, active efflux
Glycopeptides	Inhibit cell wall division	Altered target site
Aminoglycosides (Spectinomycin)	Inhibit protein synthesis (bind to30s ribosome)	Aminoglycoside-modifying enzyme, Decreased membrane permeability, active efflux

ตารางที่ 1 ยาปฏิชีวนะ กลไกการออกฤทธิ์ และกลไกการดื้อยา (ต่อ)

ยาปฏิชีวนะ	กลไกการออกฤทธิ์	กลไกการดื้อยาที่สำคัญ
Macrolides (Erythromycin, Tylosin)	Inhibit protein synthesis (bind to 50s ribosome)	Altered target, enzymatic inactivation, active efflux
Tetracycline (Oxytetracyclin)	Inhibit protein synthesis (bind to 30s ribosome)	Efflux, altered target, enzymatic inactivation, decreased permeability
Chloramphemcol	Inhibit protein synthesis (bind to 50s ribosome)	Chloramphenicol acetyltransferase, active efflux
Quinolones (Gentamicin, Enrofloxacin)	Inhibit DNA synthesis by inhibit DNA gyrase)	Altered target, active efflux
Rifampin	Inhibits nucleic acid synthesis	Altered target, decreased permeability of membrane
Metronidazole	Inhibits nucleic acid synthesis	Not defined
Sulfonamides	Inhibit folic acid synthesis	Altered target
Trimethoprim	Inhibit folic acid synthesis	Altered target, decreased permeability of membrane
Polygene (nystatin, amphcteracin B)	Cell membrane permeability	Ergosterol deficient mutants.

เชื้อแบคทีเรียสามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามตัวแบคทีเรีย หรือข้ามสายพันธุ์โดยอาศัยกระบวนการหลัก 3 กระบวนการได้แก่

1. Conjugation คือการถ่ายทอด resistance plasmid (R-plasmids) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมในเซลล์ของแบคทีเรีย (extrachromosomal genetic elements) ที่บรรจุ resistance genes (R-genes) ของการดื้อยาไว้ การดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะทำให้เชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดและสามารถถ่ายทอดได้ทั้งใน species เดียวกันและข้าม species
2. Transformation เมื่อแบคทีเรียตาย ส่วนของ DNA ที่มี gene ดื้อยาอยู่ จะถูกปล่อยออกมา แบคทีเรียตัวอื่นก็จะเก็บ DNA นั้นเข้าไปอยู่ในสาย DNA ของตัวมันเอง
3. Transduction คือการส่งต่อ resistance gene ไปยังแบคทีเรียตัวอื่นโดยอาศัย bacteriophage

ซึ่งกระบวนการดังต่อไปนี้ทำให้แบคทีเรียสามารถพัฒนาให้เกิดการดื้อยาอย่างรวดเร็วและแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง แม้แบคทีเรียนั้นไม่เคยสัมผัสกับยาปฏิชีวนะมาก่อน

การใช้สมุนไพรทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

จากปัญหาสถานการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน และการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์บริโภค จึงทำให้ในปัจจุบันมีการศึกษาการใช้สมุนไพรเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะมากขึ้น โดยมีศึกษาถึงฤทธิ์ของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคในสุกรได้ เช่นการใช้สารสกัดจากใบฝรั่ง, ผลฝรั่ง, กลีบรองดอกกระเจี๊ยบแดง, ใบคูณ, เปลือกคูณ (พิทัย และคณะ, 2544) ยาสมุนไพรสกัดออลิกาโน (ภาณุวัฒน์ และคณะ, 2548) และ ข่า (ภานุวัฒน์ และคณะ, 2547) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*

ทับทิม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Punica granatum* Linn. ชื่อสามัญคือ Pomegranate ลักษณะต้นเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง สูง 2-5 เมตร เปลือกลำต้นสีเทาค่อนข้างเรียบ กิ่งและยอดอ่อนเป็นเหลี่ยมมีหนามแหลม ส่วนของลำต้นที่ผลิออกมาใหม่มีสีแดง ปลายกิ่งอ่อนห้อยลู่ลง แตกกิ่งก้านโปร่งยาว ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปขอบขนานแกมรูปหอกกลับ ปลายแหลม ใบยาว 2-9 เซนติเมตร กว้าง 1-2 เซนติเมตร โคนใบสอบ ส่วนที่ค่อนไปทางปลายใบกว้าง ขอบเรียบ ผิวใบหนาและเป็นมัน ใบอ่อนมีสีแดง ดอกออกเป็นช่อหรือเดี่ยว บริเวณปลายยอดหรือง่ามใบ 2-5 ดอก ดอกมีขนาด

ใหญ่ กลีบดอกสีส้มแดง ร่วงง่าย มี 6 กลีบ ปลายกลีบดอกแยกออกจากกัน รูปดอกคล้ายระฆัง ตรงกลางดอกมีเกสร ดอกตัวผู้จำนวนมาก สีเหลือง เกสรตัวผู้ติดอยู่ที่กลีบเลี้ยงด้านใน ดอกตัวเมียมี 1 อัน ก้านดอกสั้น กลีบเลี้ยงหนาแข็งโคนกลีบติดกันเป็นหลอด ปลายหลอดจักเป็นฟันเลื่อยและปลายหยักโค้งออก สีส้มแกมเหลือง ผลรูปกลม ขนาด 5-12 เซนติเมตร เปลือกผลหนา ผิวเรียบเกลี้ยง เป็นมัน เมื่อสุกมีสีเหลืองปนน้ำตาลและมีสีแดงฉาบบางๆ เป็นตอนๆ ผลแก่จะแตกอ้าเห็นภายในมีเมล็ดจำนวนมาก และมีเนื้อสีชมพูอ่อน โปร่งแสง มีรสเปรี้ยวอมหวาน ห่อหุ้มเมล็ดไว้ เมล็ดรูปร่างเป็นเหลี่ยมมนๆ อัดกันแน่นเต็มผล เมล็ดมีทั้งชนิดสีแดง ชมพู และสีเหลืองซีด ออกดอกและติดผลราวเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคมการสกัดด้วย 95% ethanol จะได้สาร tannins และ alkaloids ซึ่งมีผลในการช่วยสมานแผลและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ในคน เช่น *Staphylococcus aureus* (เอมอร และคณะ, 2533) นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii* และ *Salmonella London* (ตรีชฎา และคณะ, 2548)

ฝรั่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Psidium guajava* Linn. ชื่อสามัญคือ Guava ลักษณะต้นความสูง 3-5 เมตร ผิวเปลือกต้นเรียบเกลี้ยง กิ่งอ่อนเป็นสามเหลี่ยม ใบหนา หยาบ ใต้ท้องใบเป็นริ้วเห็นเส้นใบชัดเจน ขนขึ้นนวลบาง ใบยาวประมาณ 10 เซนติเมตร กว้างประมาณ 6 เซนติเมตร ดอกช่อ ช่อหนึ่งมีดอกย่อย 3-5 ดอก ดอกเล็ก สีขาวอมเขียวอ่อน กลีบเลี้ยงแข็ง ผล รูปร่างกลม รูปไข่ หรือรูปรี ผิวเกลี้ยง สีเขียว เนื้อในขาว รสหวานกรอบ ผลสุกสีเหลือง-เขียว มีเมล็ดเล็กๆ แข็งอยู่ภายใน การสกัดด้วย 95% ethanol จะได้สาร tannins และ terpenoids ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในคน เช่น *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (จริยา และคณะ, 2532) ซึ่งหากมีการประยุกต์ใช้สมุนไพรในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ ก็จะสามารถลดการใช้ยาเพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนและลดการเกิดการดื้อยาในฟาร์ม และนอกจากนี้ยังลดการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์ที่จะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ด้วย

จากการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพของฝรั่ง และทับทิมในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ โดยมีค่า MIC (minimum inhibitory concentration) แตกต่างกันไป ดังเช่นการศึกษาของ Kanbutra et al. (2003) ที่พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง และผลฝรั่งโดยใช้เมทธานอลในการสกัด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* F18+ ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8.0 mg/ml และ 7.3 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของ Dhiman et

al. (2011) ซึ่งใช้เมทธานอลในการสกัดเช่นกัน แต่มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 µg/ml และงานวิจัยของ Masadeh et al. (2013) ที่พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งโดยใช้เอทธานอลสกัดก็สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ โดยมีค่า MIC เฉลี่ยเท่ากับ 153 µg/ml ส่วนการศึกษาของประพฤกษ์ และคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดผลทับทิมโดยใช้เมทธานอลเป็นตัวสกัด โดยวิธี Disc diffusion method พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดี โดยมีค่า clear zone เท่ากับ 0.9 เซนติเมตร ในขณะที่ใบทับทิมมีค่า clear zone เท่ากับ 0.73 เซนติเมตร นอกจากนี้ตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรก็มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย โดยจากการศึกษาของ จารวี และ สุบงกช (2555) เกี่ยวกับประสิทธิภาพของทับทิมที่สกัดด้วย 95% เอทธานอลและน้ำในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่าสารที่สกัดด้วย 95% เอทธานอลมีปริมาณสารที่ได้ (% yield) มากกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำโดยมี % yield เท่ากับ 52.33% และ 46.63% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่สกัดด้วย 95% เอทธานอล และน้ำต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่ามี clear zone เท่ากับ 13.02 ± 0.87 มิลลิเมตร และ 12.50 ± 0.66 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทำการหาค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วย 95% เอทธานอล โดยวิธี Broth micro dilution assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 32 mg/ml

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ *E. coli*

เก็บตัวอย่างอุจจาระจากลูกสุกรดูดนมอายุ 7 – 21 วัน ที่แสดงอาการท้องเสีย จากฟาร์มในเขตจังหวัดเชียงใหม่ นำมาเพาะแยกเชื้อ *E. coli* โดยเก็บอุจจาระใส่ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อต่อไป

ในขั้นตอนการวินิจฉัยเชื้อ จะใช้อุจจาระประมาณ 1 กรัม ใส่ลงใน Lauryl sulfate broth แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเชื้อลงใน MacConkey agar (MAC) และ Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose agar (EMB) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยเลือกโคโลนีที่มีสีชมพูบน MAC และ โคโลนีที่มีมีสีเขียวมันวาวคล้ายโลหะ มีจุดสีดำตรงกลางบนโคโลนีบน EMB เพาะเชื้อลงบน Nutrient agar (NA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง เชื้อที่แยกได้จะนำมาทดสอบยืนยันเชื้อ *E. coli* โดยใช้วิธีทางชีวเคมี

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธีทางชีวเคมี (Biochemical test)

Gram stain	Gram negative bacteria
Shape	Rod shape
Motility	+
Indole formation	+
Citrate	-
Methyl red reaction	+
Voges-Prokauer reaction	-

เชื้อที่ผ่านการยืนยันเชื้อแล้วจะเก็บไว้ใน Tryptic soy broth + glycerol 20% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

สมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม (จากผลที่แก่แล้ว) และใบฝรั่ง (ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป และเก็บในช่วงก่อนออกดอก) นำสมุนไพรทั้งสองชนิดมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วอบในตู้อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก และใส่ลงใน Thimble แล้วประกอบเข้ากับชุด Soxhlet extractor โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวสกัดด้วยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง (Continuous extraction) สารสกัดที่ได้จะละลายอยู่ในแอลกอฮอล์ที่ใช้สกัด จากนั้นนำไประเหยแอลกอฮอล์ออกด้วย Rotary evaporator ชั่งน้ำหนักที่ได้แล้วเก็บใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของยาปฏิชีวนะ และสารสกัดสมุนไพร

ทดสอบความไวของของเชื้อทั้ง 50 สายพันธุ์ ต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี broth microdilution method ตามมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2008) โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 11 ชนิด ได้แก่ Amoxycillin, Colistin sulfate, Enrofloxacin, Gentamicin, Nalidixic acid, Novobiocin, Oxytetracyclin, Streptomycin, Sulfamethoxazole, Tetracyclin และ Tiamulin นำมาละลายและเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5,120 µg/ml โดยใช้สารละลายต่างกันตามชนิดของยา ดังตารางที่ 2 แล้วนำมาเจือจางใน 96 well plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Broth (MHB) ให้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 256 µg/ml จนถึง 0.125 µg/ml จากนั้นเติมเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ลงไปในหลุมให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 x 10^5 CFU/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (หลุมที่อาหารเลี้ยงเชื้อใส) โดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุม แล้วแปลผลการดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังตารางที่ 3 ส่วนสมุนไพร จะหาค่า MIC ด้วยวิธี agar dilution method โดยการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (serial two fold dilution) โดยใช้ตัวทำละลายและเจือจางโดยใช้ 95% ethanol 1 ส่วนละลายสารสกัด แล้วเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ส่วน ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ นำมาผสมกับ Muller Hinton Agar (MHA) ในอัตราส่วน 1:10 (สารสกัด 2 ml: MHA 18 ml) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ โดยความเข้มข้นของ

สมุนไพรที่เตรียมเท่ากับ 25 mg/ml จนถึง 1.56 mg/ml ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แบ่งพื้นที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5 ส่วน นำเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์มาปรับปริมาณเชื้อให้เป็น Standard Mcfarland No. 0.5 (ปริมาณเชื้อ 10^8 cfu/ml) แล้วเจือจาง 10 เท่าด้วย 0.9% Normal Saline จะได้เชื้อปริมาณ 10^7 cfu/ml จากนั้นใช้ Micropipette ขนาด 2 µl ดูดเชื้อมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนละ 4 จุด (1ส่วน ต่อเชื้อ 1 ชนิด) จะไปปริมาณเชื้อแต่ละจุดเป็น 10^4 cfu/ml แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง บันทึกผล โดยดูความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) โดยเทียบกับจานเพาะเลี้ยงที่เป็นกลุ่มควบคุม คือมีสารละลายที่ใช้คือ 95% ethanol ต่อน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1: 3 (95% ethanol 0.5 ml + น้ำกลั่น 1.5 ml) และ MHA 100%

ตารางที่ 2 ตัวทำละลายและสารที่ใช้เจือจางยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด

ยาปฏิชีวนะ	สารที่ใช้ละลาย	สารที่ใช้เจือจาง
Amoxicillin	Phosphate buffer, pH 6, 0.1 M	Phosphate buffer, pH 6, 0.1 M
Colistin sulfate	Distilled water	Distilled water
Enrofloxacin	½ DW + 1 M NaOH	Distilled water
Gentamicin	Distilled water	Distilled water
Nalidixic acid	Distilled water	Distilled water
Novobiocin	Distilled water	Distilled water
Oxytetracyclin	Distilled water	Distilled water
Streptomycin	Distilled water	Distilled water
Sulfamethoxazole	0.1 ml of 0.1M NaOH ต่อ 10 g	Distilled water
Tetracyclin	Distilled water	Distilled water
Tiamulin	Distilled water	Distilled water

ที่มา CLSI (2008)

ตารางที่ 3 แสดงการแปลผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อของยาปฏิชีวนะ (MIC) ต่อเชื้อ *E. coli*

ยาปฏิชีวนะ	Minimum inhibitory concentration (MIC) (µg/ml)		
	Susceptible	Intermediate	Resistance
Amoxicillin	≤ 8		> 8
Colistin sulfate	≤ 2		> 2
Enrofloxacin	≤ 2		≥ 8
Gentamicin	≤ 4		≥ 16
Nalidixic acid	≤ 16		> 16
Novobiocin	≤ 2		≥ 8
Oxytetracyclin	≤ 8		≥ 16
Streptomycin	≤ 4		≥ 16
Sulfamethoxazole	≤ 256		≥ 512
Tetracyclin	≤ 4		≥ 16
Tiamulin	≤ 16		≥ 32

ที่มา CLSI (2008) ; BSAC (2011)

ผลการวิจัย

เชื้อ *E. coli*

จากการเก็บตัวอย่างมูลลูกสุกรที่แสดงอาการท้องเสีย โดยเก็บตัวที่พบอุจจาระเหลวสีเหลืองครีม เพื่อนำมาแยกเชื้อ โดยเก็บจากฟาร์มสุกรในจังหวัดเชียงใหม่ทั้งหมด 13 ฟาร์ม 4 ครั้ง ระยะเวลาห่างกันเดือนละครั้ง ครั้งละ 2-3 ตัวอย่าง นำมาเพาะแยกหาเชื้อ *E. coli* พบว่าสามารถแยกเชื้อ *E. coli* ได้ทั้งหมด 57 สายพันธุ์ (isolate) จาก 13 ฟาร์ม (จาก 5 อำเภอ) และคัดเลือกมาใช้ในการทดลอง 50 สายพันธุ์ (ดังตารางที่ 4) ซึ่งตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* บางตัวอย่าง อาจเนื่องจากบางฟาร์มมีการให้ยาปฏิชีวนะก่อนที่จะมีการเข้าไปเก็บเชื้อในฟาร์มจึงทำให้เชื้อตายและไม่สามารถแยกเชื้อได้ และนอกจากนี้ลูกสุกรที่พบอาการท้องเสียมักจะเป็นลูกสุกรที่อยู่ในช่วงกินนมแม่ ซึ่งอาจจะเกิดได้ทั้งการติดเชื้อภายในเล้าที่มีการสุขาภิบาลไม่ดี หรือติดจากแม่ที่ป่วย หรือมีปัญหาเต้านมอักเสบ

ตารางที่ 4 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดลอง

แหล่ง	จำนวนฟาร์ม	จำนวนสายพันธุ์
ฟาร์มสุกรในอ.ดอยสะเก็ด	1	2
ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง	3	14
ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย	5	21
ฟาร์มสุกรในอ.แม่แตง	1	3
ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม	3	10

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

ผลการสกัดสารจากเปลือกทับทิม และใบฝรั่งด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลายเป็น 95% Ethanol ได้ลักษณะ สี และเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะ สี และเปอร์เซ็นต์ของสารที่สกัดได้จากเปลือกทับทิม และใบฝรั่ง

ชนิดของสารสกัด	ลักษณะ และสี	% สารที่สกัดได้ (% yield)
เปลือกทับทิม	ของเหลวสีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด	48 %
ใบฝรั่ง	ของเหลวสีเขียวเข้ม เหนียวหนืด	28.5 %

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของยาปฏิชีวนะและสารสกัดสมุนไพร

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของยาปฏิชีวนะพบว่า เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากลูกสุกรทุกสายพันธุ์มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ แต่มากน้อยชนิดแตกต่างกันออกไป โดยพบว่ามีหลายสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด (multidrug resistance) (ดังตารางที่ 6) โดยยาปฏิชีวนะที่พบว่ามีการดื้อยามากที่สุดได้แก่ Novobiocin, Streptomycin, Sulfamethoxazole, Tetracyclin และ Tiamulin คือ 100% รองลงมาได้แก่ Amoxicillin (98%), Oxytetracyclin (96%) Nalidixic acid (82%), Gentamicin (56%), Enrofloxacin (54%) และ Colistin sulfate (46%) ตามลำดับ

ตารางที่ 6 แสดงค่า MIC และการแปลผลความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร

ชนิดยาปฏิชีวนะ	จำนวนของเชื้อ E. coli ที่ถูกยับยั้งได้โดยความเข้มข้นต่ำสุด (MIC)													MIC range (µg/ml)	จำนวนเชื้อทั้งหมดจากการแปลผลค่า MIC					
	≤0.125 (µg/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256 (µg/ml)		Susceptible		Intermediate		Resistance	
															(n=50)	%	(n=50)	%	(n=50)	%
Amoxicillin	0	0	0	0	0	0	1	0	1	43	5	0	0	64 - 128	1	2%	0	0%	49	98%
Colistin sulfate	3	4	8	0	12	14	5	3	0	0	0	0	1	≤0.125 - >256	27	54%	0	0%	23	46%
Enrofloxacin	7	6	2	0	3	5	4	0	6	13	4	0	0	≤0.125	18	36%	5	10%	27	54%
Gentamycin	0	1	4	0	6	8	3	2	1	11	3	5	6	0.25 - >256	19	38%	3	6%	28	56%
Nalidixic acid	0	0	0	0	3	1	2	3	2	3	0	1	35	2 - >256	9	18%	0	0%	41	82%
Novobiocin	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	18	10	5	1 - >256	0	0%	0	0%	50	100%
Oxytetracyclin	0	0	0	0	0	0	2	2	16	23	6	0	1	8 - >256	2	4%	0	0%	48	96%
Streptomycin	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	5	40	16 - >256	0	0%	0	0%	50	100%
Sulfamethoxazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	>256	0	0%	0	0%	50	100%
Tetracyclin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	21	14	64 - >256	0	0%	0	0%	50	100%
Tiamulin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	8	27	64 - >256	0	0%	0	0%	50	100%

ส่วนผลการยับยั้งเชื้อของสารสกัดเปลือกทับทิม และ ใบฝรั่งพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยสารสกัดจากเปลือกทับทิมในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้มากกว่า (ดังตารางที่ 7 และ 8) ค่า MIC เฉลี่ยของสารสกัดจากเปลือกทับทิมเท่ากับ 5.94 mg/ml (ค่าต่ำสุดเท่ากับ 3.125 mg/ml ส่วนค่าสูงสุดได้แก่ 12.5 mg/ml) ในขณะที่ค่า MIC เฉลี่ยของสารสกัดจากใบฝรั่งเท่ากับ 9.44 mg/ml (ค่าต่ำสุดเท่ากับ 3.125 mg/ml ส่วนค่าสูงสุดได้แก่ 12.5 mg/ml)

ตารางที่ 7 แสดงค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกทับทิมในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร

ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิม (mg/ml)	จำนวนตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด (%)
12.50	4	8
6.25	33	66
3.125	13	26
0	0	0
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	50 ตัวอย่าง	

ตารางที่ 8 แสดงค่า MIC ของสารสกัดจากใบฝรั่งในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร

ระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่ง (mg/ml)	จำนวนตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด (%)
12.50	28	56
6.25	17	34
3.125	5	10
0	0	0
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	50 ตัวอย่าง	

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกับระดับค่า MIC ของสมุนไพรทั้งสองชนิดพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดกับค่า MIC ที่จะเพิ่มสูงขึ้นของสมุนไพร

วิจารณ์ผลการวิจัย

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในลูกสุกรช่วงดูดนม ซึ่งการดื้อยาโดยมากมักจะมาจากแม่สุกรซึ่งเคยมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคมาหลากหลายชนิด ดังเช่นการศึกษาของ Mathew et al. (2005) ที่ได้ศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะในแม่สุกรที่สอดคล้องต่อการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆของเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกร และจากการที่เชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกันสามารถส่งผ่านยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียตัวอื่นๆได้ จึงทำให้มีการพบเชื้อที่ดื้อต่อยามากขึ้น โดยผลจากการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ส่วนใหญ่มีการดื้อต่อยาหลายชนิด และมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบทั้ง 11 ชนิดค่อนข้างมาก โดยพบว่ายา 10 ชนิดมีการดื้อยาของเชื้อมากกว่า 25 สายพันธุ์ ในขณะที่ colistin sulfate มีการดื้อยาน้อยที่สุด คือ 23 สายพันธุ์ จาก 50 สายพันธุ์ ซึ่ง % การดื้อยาที่แตกต่างกันอาจจะเกิดจากการใช้ยาในฟาร์ม และกลไกการดื้อยาของเชื้อซึ่งยาบางชนิดจะเกิดการดื้อยาได้ง่าย เช่นยากลุ่ม penicillin และ tetracyclin ดังเช่นผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายๆชนิดของเชื้อ *E. coli* ที่แยกมาจากสุกร โดยเฉพาะยากลุ่มนี้ (เนตรชนก และคณะ, 2551; Choi *et al*., 2002; Stannarius *et al*., 2009; van den Bogaard et al., 2000) ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้อง เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต, ขนาดยาที่ใช้ วิธีการให้ยา ระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา ฯลฯ ซึ่งจากการเก็บข้อมูลพบว่าฟาร์มที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในฟาร์ม พบการดื้อยาหลายชนิดมากกว่าฟาร์มที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงไม่กี่ชนิด และนอกจากปัญหาเชื้อดื้อยาแล้ว ทางด้านสาธารณสุขยังมีความกังวลเรื่องปัญหาการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ซึ่งจะส่งผลเสียต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่แพ้ยาปฏิชีวนะบางตัวอาจทำให้เกิดการแพ้ยาจนถึงแก่ชีวิตได้ จึงมีการนำสมุนไพรที่มีในท้องถิ่นมาทำการศึกษาเชิงลึกมากขึ้น โดยคาดหวังว่าคุณสมบัติของสารบางชนิดที่พบในสมุนไพรจะสามารถนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะและสามารถใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ ดังเช่นสารกลุ่มแทนนินที่พบในใบฝรั่ง และเปลือกทับทิม ซึ่งแทนนินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยสารแทนนินสามารถยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ภายนอกเซลล์ของจุลชีพ (extracellular microbial enzymes), ยับยั้งสารตั้งต้นที่สำคัญในการเจริญเติบโตของจุลชีพ, ส่งผลต่อเมตาโบลิซึมของจุลชีพโดยยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation และเกี่ยวข้องกับการยับยั้งธาตุเหล็กไม่ให้จุลชีพสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Scalbert, 1991) จากผลการศึกษาพบว่าค่า MIC ของเปลือกทับทิม

ต่อเชื้อ *E. coli* ทั้ง 50 สายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยรวมน้อยกว่าใบฝรั่งซึ่งอาจจะเกิดจากปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ไม่เท่ากันในสมุนไพรแต่ละชนิด และจากค่า MIC ที่ไม่เท่ากันในแต่ละสายพันธุ์แม้จะเป็นสมุนไพรชนิดเดียวกัน ซึ่งอาจจะเกิดความทนทานของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ แต่สมุนไพรทั้งสองชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคในลูกสุกรได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิม และใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้แต่มีค่า MIC แตกต่างกันไป (จารวี และ สุบงกช, 2555; ประพฤกษ์ และคณะ, 2553; Dhiman et al., 2011; Kanbutra et al., 2003; Masadeh et al., 2013) โดยปัจจัยที่มีผลต่อค่า MIC เช่น แหล่งพื้นที่ปลูกพืชสมุนไพร, ฤดูกาล, สารที่ใช้ในการสกัด, วิธีการสกัด ฯลฯ และจากผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *E. coli* แม้จะมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดก็ยังสามารถใช้สมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ แต่การนำสมุนไพรมาใช้จริง ยังต้องมีการศึกษาถึงปริมาณที่นำมาใช้จริง ความเป็นพิษและผลข้างเคียงต่อไป

สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกรมักแยกมาจากลูกสุกรที่อยู่ในช่วงกินนมแม่ โดยแยกเชื้อได้ 57 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่าง คิดเป็น 57 % และพบว่าเชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และส่วนใหญ่มีการดื้อต่อยามากกว่า 1 ชนิด โดยยาปฏิชีวนะที่พบการดื้อยามากได้แก่ Novobiocin, Streptomycin, Sulfamethoxazole, Tetracyclin และ Tiamulin ที่ดื้อต่อยา 100% รองลงมาได้แก่ Amoxicillin (98%), Oxytetracyclin (96%) Nalidixic acid (82%), Gentamicin (56%), Enrofloxacin (54%) และ Colistin sulfate (46%) ตามลำดับ ในขณะที่การใช้สารสกัดจากเปลือกทับทิม และใบฝรั่งสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ทุกสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ แต่ใช้ปริมาณสารแตกต่างกันไปเล็กน้อย โดยไม่สัมพันธ์กับ % การดื้อยาของเชื้อ โดยสารสกัดจากเปลือกทับทิมใช้ปริมาณสารที่สามารถยับยั้งเชื้อน้อยกว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง

จากผลการศึกษานี้สามารถนำสารสกัดจากสมุนไพรไปต่อยอดในการแปรรูปสารสกัดให้มีความเหมาะสมในการให้ และทดลองใช้ในรักษาเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิจจา อุไรรงค์. 2535. แนวทางการวินิจฉัย รักษา และควบคุมโรคสุกร. โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต : กรุงเทพมหานคร. 348 หน้า.

กิจจา อุไรรงค์, ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม, วรวิทย์ วัชชวัลคุ และ ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ. 2537. การควบคุมป้องกันโรคสุกรที่สำคัญในประเทศไทย. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: นครปฐม. 273 หน้า.

จริยา สินเดิมสุข, สมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์ และวีณา จารุปรีชาชาญ. 2532. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่างใบฝรั่งและเปลือกมังคุด. วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 16(2): 32.

จารวี สุขประเสริฐ และ สุบงกช ทรัพย์แตง. 2555. การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย. วารสารผลงานวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 1(1): 99-109.

ภานุวัฒน์ แย้มสกุล, สมปรียา กองแก้ว, เทิดศักดิ์ ญาโน, วิชาญ สุขประเสริฐ, วราณี ปรากิตโกมล และศิริพร โอโกโนกิ. 2547. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข่าในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสุกรในห้องปฏิบัติการ. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. หน้า 208-215.

ภานุวัฒน์ แย้มสกุล, ประภาส พัชนี, โกษา ปัญญาโกษา, สมปรียา แสงไฟ และ ดวงพร พิชผล. 2548. ศึกษาความเข้มข้นของยาสมุนไพรสกัดออลิกาโนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Escherichia coli ที่แยกได้จากอุจจาระสุกรหลังหย่านมที่มีอาการท้องเสียในฟาร์มเขตเชียงใหม่-ลำพูน ในห้องปฏิบัติการ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. 592 หน้า.

ตรีชฎา ศิริรักษ์, ถนอมจิต สุภาวิตา, กานดา ปานทอง และศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2548. ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 27(ฉบับพิเศษ 2): 535-544.

เนตรชนก จิกาวานนท์, สุจิตราภรณ์ ลิมาภิรักษ์ และชุลีรัตน์ สร้อยสุวรรณ์. 2551. การสำรวจการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichai coli* จากอุจจาระไก่และสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนระหว่างปี 2556-2558. Thai-NIAH Journal. 2(3): 118-129.

ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง, ศรีสมัย วิริยารัมภะ, สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์ และ สุดธิดา เหล่าเปี่ยม. 2553. ประสิทธิผลของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50.

พิทัย กาญบุตร, ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, สาธร พรตระกูลพิพัฒน์, กิ่งกาญจน์, เจษฎา จิวากานนท์, ฉันทนา อารมณ์ดี และโสพิศ วงศ์คำ. 2544. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ต่อเชื้อ *Escherichia coli* F18+. 29th Report conference of Congress on Science and Technology of Thailand, ขอนแก่น. 230-231.

วีรวรรณ ลุวีระ. 2549. การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. สงขลานครินทร์เวชสาร. 24(5): 453-459.

เอมอร โสมนะพันธ์, นพมาศ สรรพคุณ, วีณา จิรัจฉริยากูล และอ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2533. ยาจากสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพ.

BSAC. 2011. BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. British society for antimicrobial chemotherapy. 26-30.

Choi, C., H-J., Ham, D., Kwon, J., Kim, D-S., Cheon, K., Min, W-S., Cho, H-K., Chung, T., Jung, K., Jung, and C., Chae. 2002. Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Pigs in Korea. J. Vet. Med. Sci. 64(1): 71-3.

CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute. 13-23.

Dhiman, A., A., Nanda, S., Ahmad, and B., Narasimhan. 2011. *In vitro* antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. J. Pharm. Bioallied. Sci. 3(2): 226-229.

Hammerum A.M., and O.E., Heuer. 2009. Human Health Hazards from Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* of Animal Origin. Clin. Infect. Dis. 48(7): 916-21.

Kanbutra, P., P., Borisuthpetch, S., Porntrakulpipat, K., Sarachoo, J., Jiwakonon, C., Aromdee, and S. Wongkham. 2003. Anti-bacterial Activity of Alocoholic Extract of Thai Medicinal Plants on Escherichia Coli (F18+). In 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kaen, Thailand. 230-231.

Mathew, A.G., K.N., Garner, P.D., Ebner, A.M., Saxton, R.E., Clift, and S. Liamthong. 2005. Effects of antibiotic use in sows on resistance of *E. coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium in their offspring. Foodborne Pathog. Dis. 2(3): 212-20.

Masadeh, M.M., A.S., Alkofahi, H.N., Tumah, N.M., Mhaidat, and K.H., Alzoubi. 2013. Antibacterial activity of some medical plants grown in Jordan. Pak. J. Pharm. Sci. 26(2): 267-70.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of Tannins. Phytochemistry. 30(12): 3875-3883.

Stannarius C., E., Bürgi, G., Regula, M.A., Zychowska, C., Zweifel, and R., Stephan. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Swiss weaned pigs and sows. Schweizer Archiv für Tierheilkunde. 151(3): 119-25.

Van den Bogaard, A.E.J.M., N., London, and E.E., Stobberingh. 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. J. Antimicrob. Chemother. 45: 663-671.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	Isolate	แหล่งที่มา
1	HH1/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.ดอยสะเก็ด
2	HH1/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.ดอยสะเก็ด
3	JT1/10-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
4	JT1/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
5	JT1/11-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
6	JT1/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
7	JT1/12-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
8	JT1/2-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
9	JT1/3-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
10	JT1/3-2	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
11	JT1/4-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
12	JT1/4-2	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
13	JT1/5-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
14	JT1/6-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
15	JT1/7-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
16	JT1/8-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
17	JT1/9-1	ฟาร์มสุกรในอ.จอมทอง
18	MF1/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
19	MF1/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
20	MF2/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
21	MJ1/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
22	MJ1/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
23	MJU1/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
24	MJU1/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
25	MJU1/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
26	MJU1/2-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ลำดับที่	Isolate	แหล่งที่มา
27	MJU1/4-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
28	MJU1/5-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
29	MJU1/5-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
30	MJU1/6-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
31	MJU1/6-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
32	MJU1/7-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
33	MJU1/7-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
34	MJU1/7-3	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
35	MJU1/8-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
36	MJU1/8-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
37	MJU2/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
38	MJU2/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.สันทราย
39	MT1/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.แม่แตง
40	MT1/2-1	ฟาร์มสุกรในอ.แม่แตง
41	MT1/2-2	ฟาร์มสุกรในอ.แม่แตง
42	PY1/1-1	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
43	PY1/1-2	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
44	PY1/2-1	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
45	PY1/2-2	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
46	PY1/2-3	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
47	PY1/3-1	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
48	PY1/3-2	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
49	PY1/4-1	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม
50	PY1/4-2	ฟาร์มสุกรในอ.แม่ริม

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงค่า MIC ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร

No.	isolate	Amoxicillin	Colistin	Enrofloxacin	Gentamicin	Nalidixic	Novobiocin	Oxytetracyclin	streptomycin	Sulfamethoxazole	Tetracyclin	Tiamulin
1	HH1/1-1	64	2	8	128	>256	128	64	>256	>256	>256	128
2	HH1/1-2	64	4	128	128	>256	128	64	>256	>256	256	>256
3	JT1/10-1	64	8	64	0.5	>256	256	32	256	>256	128	>256
4	JT1/1-1	64	2	0.25	0.5	16	256	32	>256	>256	256	128
5	JT1/11-1	64	>256	≤0.125	4	2	64	8	256	>256	128	>256
6	JT1/1-2	64	0.5	0.25	4	64	128	64	>256	>256	128	128
7	JT1/12-1	64	0.5	≤0.125	2	4	128	32	>256	>256	64	128
8	JT1/2-1	64	8	2	>256	16	64	>256	>256	>256	>256	256
9	JT1/3-1	64	8	4	2	64	>256	64	>256	>256	>256	256
10	JT1/3-2	64	4	≤0.125	4	8	128	32	128	>256	256	128
11	JT1/4-1	64	2	0.5	2	>256	128	64	>256	>256	128	>256
12	JT1/4-2	64	4	≤0.125	4	32	128	64	256	>256	256	>256
13	JT1/5-1	64	0.5	0.25	8	>256	128	64	>256	>256	256	128
14	JT1/6-1	64	0.25	0.5	4	32	256	64	>256	>256	>256	256
15	JT1/7-1	64	8	0.25	8	>256	256	64	>256	>256	256	256
16	JT1/8-1	64	4	32	64	>256	64	128	>256	>256	>256	>256
17	JT1/9-1	64	2	64	>256	>256	64	64	>256	>256	>256	>256

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงค่า MIC ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร (ต่อ)

No.	isolate	Amoxicillin	Colistin	Enrofloxacin	Gentamicin	Nalidixic	Novobiocin	Oxytetracyclin	streptomycin	Sulfamethoxazole	Tetracyclin	Tiamulin
18	MF1/1-1	64	0.5	4	8	256	128	16	32	>256	128	>256
19	MF1/1-2	64	2	4	0.25	>256	64	32	16	>256	128	>256
20	MF2/1-1	64	0.5	8	64	>256	64	32	>256	>256	128	>256
21	MJ1/1-1	64	2	32	16	>256	64	32	>256	>256	>256	>256
22	MJ1/1-2	64	8	32	0.5	>256	128	64	128	>256	256	>256
23	MJU1/1-1	32	≤0.125	4	64	>256	32	32	>256	>256	256	64
24	MJU1/1-2	64	2	64	>256	>256	64	64	>256	>256	128	64
25	MJU1/1-3	64	4	128	128	>256	128	64	>256	>256	256	>256
26	MJU1/2-1	64	≤0.125	8	256	>256	128	32	>256	>256	256	256
27	MJU1/4-1	64	16	8	>256	>256	256	64	>256	>256	>256	256
28	MJU1/5-1	64	≤0.125	2	2	>256	64	16	>256	>256	128	128
29	MJU1/5-2	128	16	64	>256	>256	>256	32	>256	>256	256	>256
30	MJU1/6-1	64	2	64	16	>256	256	64	>256	>256	256	128
31	MJU1/6-2	128	16	64	64	>256	256	64	>256	>256	256	>256
32	MJU1/7-1	64	0.5	64	256	>256	128	64	>256	>256	128	128
33	MJU1/7-2	64	0.25	128	256	>256	64	32	>256	>256	128	64
34	MJU1/7-3	64	2	4	64	>256	128	64	>256	>256	256	128

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงค่า MIC ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกร (ต่อ)

No.	isolate	Amoxicillin	Colistin	Enrofloxacin	Gentamicin	Nalidixic	Novobiocin	Oxytetracyclin	streptomycin	Sulfamethoxazole	Tetracyclin	Tiamulin
35	MJU1/8-1	64	4	64	64	>256	64	128	>256	>256	>256	>256
36	MJU1/8-2	64	4	32	64	>256	64	128	>256	>256	>256	>256
37	MJU2/1-1	64	4	64	64	>256	64	128	>256	>256	>256	>256
38	MJU2/1-2	64	4	32	64	>256	64	128	>256	>256	>256	>256
39	MT1/1-1	64	4	64	256	>256	128	128	>256	>256	>256	>256
40	MT1/2-1	64	0.25	2	2	16	>256	64	128	>256	256	>256
41	MT1/2-2	128	4	32	64	>256	256	64	>256	>256	>256	>256
42	PY1/1-1	64	4	0.25	2	64	256	32	256	>256	256	>256
43	PY1/1-2	8	0.25	≤0.125	4	8	>256	64	256	>256	128	128
44	PY1/2-1	64	2	0.25	4	>256	64	8	>256	>256	64	256
45	PY1/2-2	128	2	128	64	>256	128	32	>256	>256	256	>256
46	PY1/2-3	64	0.5	≤0.125	0.5	2	64	64	>256	>256	256	256
47	PY1/3-1	64	2	64	>256	>256	128	32	>256	>256	64	>256
48	PY1/3-2	64	4	64	32	>256	128	32	>256	>256	256	>256
49	PY1/4-1	128	4	64	256	>256	256	32	>256	>256	256	>256
50	PY1/4-2	64	0.5	≤0.125	4	2	>256	64	>256	>256	256	128

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงค่า MIC ของเปลือกทับทิมและใบฝรั่งต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้

ลำดับที่	strain	EtOH	เปลือกทับทิม	ใบฝรั่ง
1	HH1/1-1	+	6.25	12.5
2	HH1/1-2	+	6.25	6.25
3	JT1/10-1	+	6.25	3.125
4	JT1/1-1	+	6.25	12.5
5	JT1/11-1	+	6.25	3.125
6	JT1/1-2	+	6.25	12.5
7	JT1/12-1	+	6.25	3.125
8	JT1/2-1	+	6.25	6.25
9	JT1/3-1	+	6.25	12.5
10	JT1/3-2	+	3.125	6.25
11	JT1/4-1	+	6.25	12.5
12	JT1/4-2	+	3.125	12.5
13	JT1/5-1	+	6.25	6.25
14	JT1/6-1	+	6.25	12.5
15	JT1/7-1	+	6.25	12.5
16	JT1/8-1	+	6.25	6.25
17	JT1/9-1	+	3.125	6.25
18	MF1/1-1	+	6.25	6.25
19	MF1/1-2	+	6.25	6.25
20	MF2/1-1	+	6.25	6.25
21	MJ1/1-1	+	3.125	12.5
22	MJ1/1-2	+	6.25	6.25
23	MJU1/1-1	+	6.25	12.5
24	MJU1/1-2	+	6.25	6.25
25	MJU1/1-2	+	6.25	12.5
26	MJU1/2-1	+	3.125	12.5

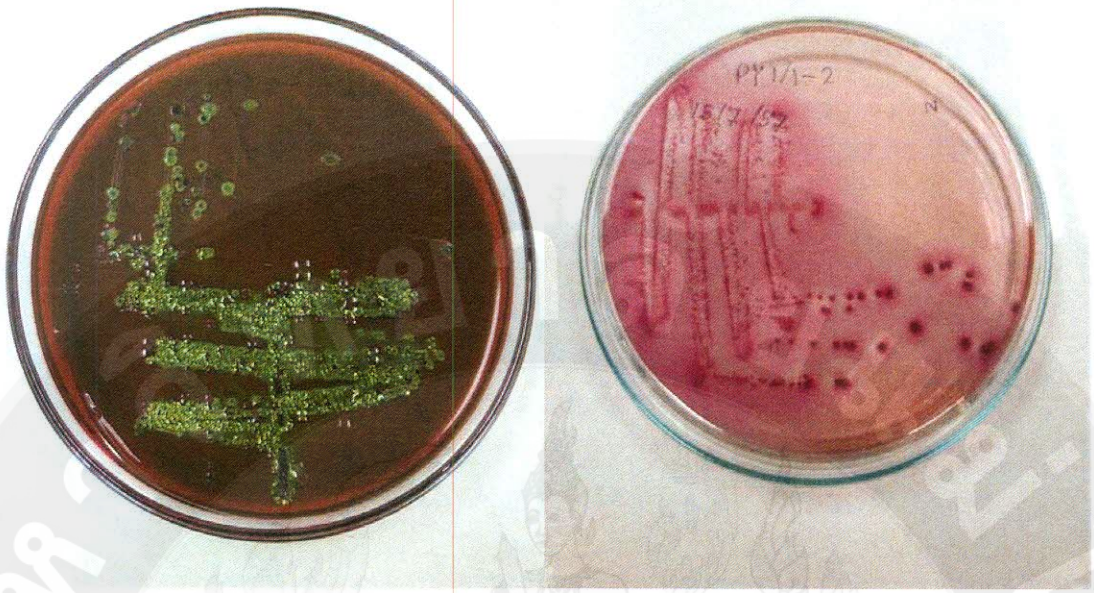
ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงค่า MIC ของเปลือกทับทิมและใบฝรั่งต่อเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ (ต่อ)

ลำดับที่	strain	EtOH	เปลือกทับทิม	ใบฝรั่ง
27	MJU1/4-1	+	6.25	12.5
28	MJU1/5-1	+	6.25	12.5
29	MJU1/5-2	+	3.125	12.5
30	MJU1/6-1	+	6.25	12.5
31	MJU1/6-2	+	12.5	12.5
32	MJU1/7-1	+	3.125	12.5
33	MJU1/7-2	+	3.125	12.5
34	MJU1/7-3	+	3.125	3.125
35	MJU1/8-1	+	6.25	12.5
36	MJU1/8-2	+	12.5	12.5
37	MJU2/1-1	+	3.125	12.5
38	MJU2/1-2	+	3.125	6.25
39	MT1/1-1	+	6.25	6.25
40	MT1/2-1	+	6.25	12.5
41	MT1/2-2	+	6.25	12.5
42	PY1/1-1	+	6.25	6.25
43	PY1/1-2	+	6.25	12.5
44	PY1/2-1	+	6.25	12.5
45	PY1/2-2	+	12.5	12.5
46	PY1/2-3	+	6.25	3.125
47	PY1/3-1	+	3.125	6.25
48	PY1/3-2	+	3.125	6.25
49	PY1/4-1	+	12.5	6.25
50	PY1/4-2	+	6.25	12.5
หมายเหตุ + หมายถึงเชื้อมีการเจริญเติบโตได้				

ภาพภาคผนวกที่ 1 แสดงลักษณะของเปลือกทับทิมแห้งบดก่อนสกัด เทียบกับสารที่สกัดได้

ภาพภาคผนวกที่ 2 แสดงลักษณะของใบฝรั่งแห้งบดก่อนสกัด เทียบกับสารที่สกัดได้

ภาพภาคผนวกที่ 3 แสดงวิธีการสกัดสารโดยใช้ Soxhlet extraction



ภาพภาคผนวกที่ 4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB (ซ้าย) และ MAC (ขวา)

ภาพภาคผนวกที่ 5 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ผสมสารสกัดสมุนไพรแต่ละความเข้มข้น