วารสารแก่นเกษตร
THAIJO
Content List Available at ThaiJo
Khon Kaen Agriculture Journal
Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

ความชุกของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ในจังหวัดเพชรบุรี

Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from dairy cattle with mastitis in Phetchaburi province

ธีรเจต เลาหเสถียร[1], ภวัต เสรีตระกูล[1], กนกอร นนท์ศิริ[2] และ ศิริชัย เอียดมุสิก[1]*

Teerajet Laohasatian[1], Pawat Seritrakul[1], Kanokorn Nonsiri[2] and Sirichai Eardmusic[1]*

[1] คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร 1 ม.3 ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 76120
[1] Faculty of animal science and agricultural technology, Silpakorn University. 1, Moo 3, Samphraya, Cha Am district, Phetchaburi 76120
[2] องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคใต้ 174 ถ.เพชรเกษม ตำบล หนองตาแต้ม อำเภอปราณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ 77120
[2] Dairy farming promotion organization of Thailand, Southern office. 174 Nongtatam, Pranburi district. Prachuap Khiri Khan.77120.

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อหาความชุกของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และ เชื้อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ทั้งนี้ *S. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมชนิดรุนแรง การตอบสนองต่อการรักษามักไม่แน่นอน รวมทั้งยังก่อปัญหาการดื้อยา ซึ่งส่งผลต่อปัญหาทางด้านสาธารณสุข โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม MRSA สามารถติดต่อระหว่างสัตว์และคน โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้า (Quarter milk sampling) ของโครีดนม จากฟาร์มโคนมในจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 145 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการตรวจน้ำนมด้วยน้ำยาซีเอ็มที มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ต่อมานำตัวอย่างน้ำนมเพาะแยกเชื้อ *S. aureus* โดยวิธีทางแบคทีเรียวิทยา และเชื้อ MRSA ด้วยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยเทคนิค Disc diffusion รวมทั้งตรวจยืนยันเชื้อ MRSA โดยตรวจหายีน *femA blaZ* และ *mecA* ผลการศึกษาพบว่า ในจำนวน 153 ไอโซเลต มีความชุกของเชื้อ *S. aureus* และเชื้อในกลุ่ม MRSA คิดเป็น 6.55% (10/153) และ 0.65% (1/153) ตามลำดับ ดังนั้นเกษตรกรควรตระหนักถึงการจัดการฟาร์ม สุขศาสตร์การรีดนมที่ถูกวิธี และการคัดแยกโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบออกจากฝูงโครีดนม เพื่อลดความเสี่ยงการสูญเสียรายได้ และลดปัญหาทางด้านสาธารณะสุข

คำสำคัญ: *Staphylococcus aureus*; Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; ตัวอย่างน้ำนมรายเต้า; โรคเต้านมอักเสบ

ABSTRACT: This objective of the study is to determine the prevalence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Because *S. aureus* is bacteria agent of acute mastitis. The response to treatment is not always positive. As well as causing the problem of drug resistance, which affects public health problems. In particular, MRSA infections can be zoonosis. Quarter milk sampling of 145 samples from dairy farms in Phetchaburi province, which have positive results for California Mastitis Test (C.M.T.) more than or equal to 1, were isolated for *S. aureus* by bacteriology method and isolated for MRSA by Antibiotic drug sensitivity test with Disc diffusion technique. To confirm of MRSA, *fem*A *blaZ* and *mec*A genes were detected.The results show that *S. aureus* and MRSA was 6.55% (10/153) and 0.65% (1/153), respectively. Therefore, farmers should be

* Corresponding author: esirichai_s@silpakorn.edu

Received: date; May 11, 2021 Accepted: date; July 30, 2021 Published: date; January 5, 2022

aware of farm management, milking hygiene and isolating of mastitis cow from the milking herd to reduce the risk of losing income and reduce problems in public health.
Keywords: *Staphylococcus aureus*; Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; quarter milk sampling; mastitis

บทนำ

ปัญหาโรคเต้านมอักเสบ เป็นปัญหาที่ส่งผลเสียต่อทั้งด้านการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเต้านม ด้านองค์ประกอบของน้ำนม และด้านปริมาณน้ำนม ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่อเกษตรกร ทั้งนี้โรคเต้านมอักเสบมีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ภายในเต้านม โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย โคสามารถติดเชื้อแบคทีเรียได้จาก 2 แหล่งสำคัญ ได้แก่ จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและจากสิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวโคเอง เช่น มูลโค และพื้นคอก เป็นต้น ซึ่งเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมสามารถพบอยู่ตามผิวหนังบริเวณหัวนม (Teat) ของโค โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบในสิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวโต ได้แก่ *Streptococcus spp., Escherichia coli, Klebsiella spp, Enterobacter spp., Pseudomonas spp., Bacillus spp., Corynebacterium spp. ส่วนเชื้อที่พบเฉพาะที่ตัวโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ได้แก่ Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* (Haas et al., 2005) โดยเฉพาะเชื้อ Staphylococcus aureus (S. aureus)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ มีการเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ เป็นสายสั้นๆหรือรวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น และมีการดำรงชีวิตแบบ Facultative anaerobe พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อของ *S. aureus* เกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ เช่น การสร้างสารพิษ ไบโอฟิล์มและโปรตีนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่เกาะติดกับเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อโรคถูกควบคุมโดยยีนต่างๆ เช่น ยีน *nuc* เกี่ยวกับ Extracellular thermostable nuclease (thermonuclease [TNase]) ของเชื้อ ยีน *cna* เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะอาศัยของเชื้อ และยีน *cna, fnbA* และ *icaAD* เกี่ยวกับการสร้างโปรตีนที่ผิวเซลล์ (Adhesins) เป็นต้น ทั้งนี้ ยีนที่นิยมใช้ในการยืนยันเชื้อ *S.aureus* คือยีน *fem*A และ *bla*Z ส่วนยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาคือยีน *mec*A ที่อยู่บนพลาสมิด sccMec (Taechowisan et al., 2018) เป็นเชื้อที่ติดต่อจากเต้านมสู่เต้านม โดยเจริญได้ดีในเต้านมและติดต่อไปยังเต้านมของแม่โคตัวอื่นๆ ทั้งจากอุปกรณ์การรีดนมที่ไม่สะอาด เช่น เครื่องรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และมือของผู้รีดนม ซึ่งแม่โคนมที่มีการติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการแต่อาจมีการปล่อยเชื้อแบคทีเรียออกมากับน้ำนมเป็นระยะๆ โคที่ป่วยมักรักษาไม่หายเป็นปกติ ซึ่งในกรณีนี้จำเป็นต้องคัดโคป่วยออกจากฝูง

เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA เป็นสายพันธุ์หนึ่งของเชื้อ *S. aureus* ที่สามารถทนหรือดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเมธิซิลิน กลไกการดื้อยาเกิดจากยีน *mecA* ซึ่งกำหนดการสร้าง Penicillin Binding Protein (PBP) 2a ที่มีคุณสมบัติไม่จับกับยาในกลุ่มเบต้าแลคแตม ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ซึ่ง *mecA* พบอยู่ที่ mobile genetic element ที่เรียกว่า Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) ขนาด 21-67 kb (สุทธิรัตน์, 2554) นอกจากนี้เชื้อ MRSA ยังสามารถต้านยากึ่งสังเคราะห์ชนิดอื่นด้วย เช่น แอมพิซิลิน เมทธิซิลิน นาฟซิลิน เซฟาโลสปอริน เตตราซัยคลิน อิริโทรมัยซิน คลอแรมฟินิคอล สเตรปโตมัยซิน และ แวนโคมัยซิน เป็นต้น ส่งผลให้การรักษาทำได้ยาก ดังนั้นเชื้อ MRSA เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ เนื่องจากมีความสามารถในการติดต่อระหว่างสัตว์และคนได้ โดยการติดเชื้อ MRSA พบได้บ่อยในคนที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ มีการรายงานการติดเชื้อ MRSA ในม้า สุนัข แมว สุกร โคนม แพะ กระต่าย ไก่ และนกแก้ว ส่วนใหญ่สัตว์ที่ติดเชื้อ MRSA มักไม่แสดงอาการป่วย ในปัจจุบันเชื้อ MRSA เป็นปัญหาที่สำคัญทั่วโลก ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาของประเทศไทยและแถบภูมิภาคเอเชียพบว่า เชื้อ *S. aureus* ที่ก่อโรคในผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาลในประเทศไทยร้อยละ 30-50 พบว่าเป็นเชื้อ MRSA (นิตยาและมุฑิตา, 2558) รวมทั้งยังพบว่า มีอุบัติการณ์การพบเชื้อ MRSA ในโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อภายในเต้านม เชื้อ MRSA ยังสามารถปนเปื้อนกับมือผู้รีด หรือสิ่งแวดล้อม เช่น เครื่องรีด และพื้นคอก เป็นต้น (Li et al., 2015) จึงเห็นได้ว่าปัญหา MRSA สามารถส่งผลให้ทั้งมนุษย์ (ผู้ปฏิบัติงานในฟาร์ม) ให้มีความเสี่ยงต่อการป่วย หรือเสียชีวิต และโคนมที่ติดเชื้อ MRSA ที่เต้านม เป็นตัวแพร่โรค รวมทั้งยังทำให้ฟาร์มขาดรายได้จากการจำหน่ายน้ำนมดิบ เนื่องจากผลผลิตน้ำนมลดลง และต้องเพิ่มต้นทุนใน

การจ่ายค่ารักษาโรคอีก วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อหาความชุกของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และเชื้อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ในจังหวัดเพชรบุรี

วิธีการศึกษา

กระบวนการดำเนินงานวิจัย เริ่มจากทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เพื่อเพาะแยกเชื้อ *S. aureus* โดยทำการจำแนกเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมด้วยเทคนิคทางแบคทีเรียวิทยา จำแนกเชื้อ MRSA ด้วยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยเทคนิค Disc diffusion และตรวจหายีน *fem*A และ *mec*A เพื่อวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus* ชนิดที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาเมทธิซิลิน ด้วยวิธี PCR โดยมีขั้นตอนละเอียดดังนี้

1. ประชากรที่ศึกษา

จำนวนประชากรฟาร์มโคนม ของสหกรณ์โคนม ซึ่งมีเพียงสหกรณ์เดียวในจังหวัดเพชรบุรี มีจำนวนทั้งสิ้น 109 ฟาร์ม จำแนกตามขนาดฟาร์ม (ระเบียบมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบ ของประเทศไทย, 2542) เป็นฟาร์มขนาดเล็ก (มีจำนวนแม่โคไม่เกิน 20 ตัว) ขนาดกลาง (มีจำนวนแม่โคอยู่ระหว่าง 21-100 ตัว) และขนาดใหญ่ (มีจำนวนแม่โคเกินกว่า 100 ตัว) เท่ากับ 52, 55 และ 2 ฟาร์ม (ตามลำดับ) ทำการคัดเลือกฟาร์มโคนมตามขนาดฟาร์ม จำนวน 55 ฟาร์ม โดยแบ่งเป็น ฟาร์มขนาดเล็ก จำนวน 25 ฟาร์ม ฟาร์มขนาดกลาง จำนวน 28 ฟาร์ม และฟาร์มขนาดใหญ่ จำนวน 2 ฟาร์ม ด้วยวิธีสุ่มอย่างง่าย (Simple random sampling)

2. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้าจากฟาร์มโคนมของเกษตรกร โดยเข้าฟาร์มในช่วงบ่าย และเก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้าในการรีดนมมื้อเย็น โดยมีขั้นตอนดังนี้

ก) ภายหลังทำความสะอาดเต้านม และเช็ดเต้านมเสร็จ ทำการตรวจน้ำนมด้วยน้ำยาซีเอ็มที (California Mastitis test; C.M.T.) เพื่อตรวจหาสภาวะเต้านมอักเสบภายในฟาร์ม โดยขั้นตอนเริ่มจากรีดน้ำนมทิ้ง 1-2 ครั้ง แล้วรีดน้ำนมใส่ถาดซีเอ็มที ประมาณเต้าละ 5 มิลลิลิตร ใส่น้ำยาซีเอ็มที ปริมาณเท่ากับน้ำนม วนถาดตรวจช้า ๆ อ่านผลการตรวจภายใน 10 วินาที

ข) เก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้า ที่ให้ผลการตรวจซีเอ็มที เป็นผลบวกตั้งแต่ ผลเป็นบวกหนึ่ง (+1) ขึ้นไป เริ่มจากทำการเช็ดหัวนมโคด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทิ้งไว้ให้แห้ง เปิดขวดเก็บน้ำนมฝาเกลียว โดยคว่ำฝาขวดลงเอียงในแนวที่เอียงน้อยกว่า 45 องศา รีดน้ำนมทิ้ง 2-3 ครั้งก่อนรีดน้ำนมลงขวด จากนั้นรีดน้ำนมโดยให้น้ำนมพุ่งเป็นสายเข้าขวด ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร

ค) นำตัวอย่างน้ำนมใส่ในกล่องโฟมที่มีอุณหภูมิภายในระหว่าง 4-8 องศาเซลเซียส (°ซ.) โดยวางบนน้ำแข็ง โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ ภายใน 6-12 ชั่วโมง

3. การเพาะแยกเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิคทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างน้ำนมที่เก็บได้ ป้ายลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mannitol salt agar (MSA) จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย Staphylococci มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient agar เพื่อทำการย้อมสีแกรมและทดสอบ Coagulase test และ Catalase test ตามวิธีของกิตติศักดิ์ และสุกุมา (2550) โดยเชื้อ *S. aureus* มีคุณสมบัติติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และให้ผลบวกต่อการทดสอบ Coagulase test และ Catalase test ต่อมาจึงเลือกมาทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.การจำแนกเชื้อ MRSA ด้วยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบ MRSA จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Antibiotic drug sensitivity test) ด้วยใช้เทคนิค Disc diffusion โดยการนำเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญในอาหารเหลว (BHI broth) มาทำการเจือจางเทียบกับ McFarland Standard 0.5 ทำการ Spread plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) โดยกำหนดเชื้อ *S. aureus* (ATCC 25923) เป็นเชื้อมาตรฐาน วางยา Oxacillin (OX) 1 ไมโครกรัม (µg.) และ Cefoxitin (FOX) 30 µg. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °ซ. นาน 24 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดของโซนใสแล้วเทียบกับค่ามาตรฐานของ CLSI (2009) เพื่อดูการตอบสนองของความไวต่อยาของเชื้อ *S. aureus* โดยจำแนกเป็นเชื้อที่มีความไวต่อยา (Sensitive isolates) เชื้อที่มีความไวต่อยาปานกลาง (Intemediate-sensitive

isolates) และเชื้อที่ดื้อต่อยา (Resistant isolates) โดยเชื้อที่ดื้อต่อทั้ง Oxacillin 1 µg. และ Cefoxitin 30 µg. มีขนาดของโซนใสน้อยกว่า 10 และ 21 มิลลิเมตร ตามลำดับ แปลผลว่า เชื้อมีคุณสมบัติเป็น MRSA (ทศพล และคณะ, 2558)

5. การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ MRSA โดยตรวจหายีน *fem*A, *bla*Z และ *mec*A

โดยการตรวจหายีน *femA* และ *blaZ* ซึ่งจำเพาะต่อ *S. aureus* และยีน *mecA* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1) การตรวจหายีน *fem*A, *blaZ* และ *mecA* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ทำการตรวจหายีน *fem*A และ *mecA* ด้วยเทคนิค PCR เริ่มต้นด้วยนำเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้ มาปั่นให้ตกตะกอนและสกัด DNA โดยใช้ชุด QIAamp DNA mini kit (Qiagen®, USA) ซึ่งเป็นชุดสกัด DNA โดยใช้แท่ง Silica column ที่มีประสิทธิภาพสามารถแยกสกัด DNA จากแบคทีเรียได้จากตัวอย่างหลากหลายชนิด เช่น Cell ที่เพาะเลี้ยงไว้ เลือด ชิ้นเนื้อ น้ำนม หรือสารคัดหลั่งต่าง ๆ และ DNA มีความสะอาดสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลได้ทันที

ยีนเป้าหมาย ได้แก่ *femA* และ *blaZ* ซึ่งพบใน *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ (Taechowisan et al., 2018) ส่วนยีนเป้าหมายของเชื้อ MRSA ได้แก่ *mecA* ทั้งนี้ยีน *fem*A, *blaZ* และ *mecA* จะถูกตรวจสอบด้วยวิธี PCR เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ MRSA ตามลำดับ โดยการตรวจสอบ จะใช้ PCR primers ที่มีการใช้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ รวมทั้ง primers ที่ออกแบบโดยโปรแกรม Geneious Prime และตรวจสอบโดยวิธี Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) เพื่อป้องกันการเกิด false positive จาก DNA ที่อาจปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *S. aureus* โดยใช้งานผ่านทางเว็บไซต์ primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) **(Table 1)**

Table 1 The sequence of the primers used in the PCR assay.

Primers	The sequence of the primers
BlaZ_F1	TGTCCGTAACCTGAATCAGC
BlaZ_R1	TGCTATCCACCCTCAAACAG
FemA_F1	CGATCCATATTTACCATATCA
FemA_R1	ATCACGCTCTTCGTTTAGTT
MecA_F1	TACAACTGTAATATCGGAGGG
MecA_R1	AGGTTCAGATTGGCCCTTAGG

เมื่อได้ Primers ที่เหมาะสมแล้ว ดำเนินการตรวจหายีน ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ condition และ อุณหภูมิที่เฉพาะเจาะจงกับ annealing temperature ของ primers แต่ละคู่ PCR condition มีดังต่อไปนี้

Reagents: template DNA (สกัดจาก *S. aureus*), forward primer, reverse primer, Taq polymerase enzyme, dNTPs, $MgSO_4$, Taq buffer + KCl

Condition:

1. Initial denaturation 94 °ซ. 10 นาที
2. denaturation 94 °ซ. 30 วินาที
3. annealing 60 °ซ. 30 วินาที
4. extension 72 °ซ. 1 นาที
5. amplification ซ้ำขั้น 2-4 จำนวน 35-40 รอบ
6. final extension 72 °ซ. 5 นาที
7. รักษาอุณหภูมิคงที่ 4 °ซ.

เมื่อตรวจหายีน ด้วยเทคนิค PCR เสร็จสมบูรณ์แล้ว Product จะถูกนำไปผสมกับ Loading dye และแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) ผ่าน Agarose gel ควบคู่กับ Ladder DNA เพื่อยืนยันขนาดและปริมาณของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น

6.การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานความชุกของเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมรายเต้าของโครีดนม ในช่วงเวลาที่ศึกษา ทั้งนี้ความชุกของเชื้อ *S. aureus* รายงานได้เป็น ค่าร้อยละ (%) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

ความชุกของเชื้อ *S. aureus* (%) = [(*S. aureus*-positive isolates)/(total isolates)]*100

ความชุกของเชื้อ MRSA (%) = [(*S. aureus*-positive isolates)/(total isolates)]*100

ผลการศึกษา

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ

ผลการเก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้าจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (ให้ผลการทดสอบน้ำนมด้วยน้ำยาซีเอ็มที ตั้งแต่ +1 ขึ้นไป) จากฟาร์มโคนมซึ่งเป็นสมาชิกของสหกรณ์โคนมชะอำ-ห้วยทราย จำกัด จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 55 ฟาร์ม ได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมดเท่ากับ 145 ตัวอย่าง (น้ำนมรายเต้า)

ผลการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม ภายหลังนำตัวอย่างน้ำนมรายเต้า จำนวน 145 ตัวอย่าง มาเพาะแยกเชื้อ พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 153 ไอโซเลต (Isolates) โดยมีความชุกของเชื้อ *S. aureus* แยกจากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบคิดเป็น 6.54% (10/153) และเชื้อในกลุ่ม Coagulase Negative *Staphylococcus* (CNS) คิดเป็น 11.11 % (17/153) **(Table 2)**

Table 2 The prevalence of S. aureus in quarter milk of dairy cows at Cha-am district, Phetchaburi province.

Bacteria	Number of Isolate	Prevalence (%)
Staphylococcus aureus	10	6.54
Coagulase Negative *Staphylococcus*	17	11.11
other*	126	82.35
total	153	100

*other : Coagulase Positive *Staphylococcus* and *Staphylococcus* spp.

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากตารางที่ 3 ได้แสดงถึงแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S.aureus* ที่แยกจากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ผลการศึกษาพบว่า มีเชื้อ Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA จำนวน 1 ไอโซเลต (Isolate) ได้แก่ ตัวอย่าง I2 ดังนั้นความชุกของเชื้อ MRSA จากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จึงคิดเป็น 0.65 % (1/153) **(Table 3)**

Table 3 Biochemical test results and Antibiotic drug sensitivity test of *S.aureus* isolated from mastitis cows.

Sample	Coagulase test	Catalase test	Antibiotic drug sensitivity test			
			Oxacillin (1 µg)		Cefoxitin (30 µg)	
			Inhibition zone (mm.)	Drug sensitivity	Inhibition zone (mm.)	Drug sensitivity
I1	+	+	15.5	S	26.5	S
I2	+	+	6.0	R	6.0	R
I3	+	+	20.5	S	30.5	S
I4	+	+	18.0	S	28.5	S
I5	+	+	20.0	S	30.0	S
I6	+	+	17.5	S	25.5	S
I7	+	+	17.0	S	28.0	S
I8	+	+	17.0	S	29.0	S
I9	+	+	17.5	S	29.5	S
I10	+	+	19.0	S	28.5	S

Note:

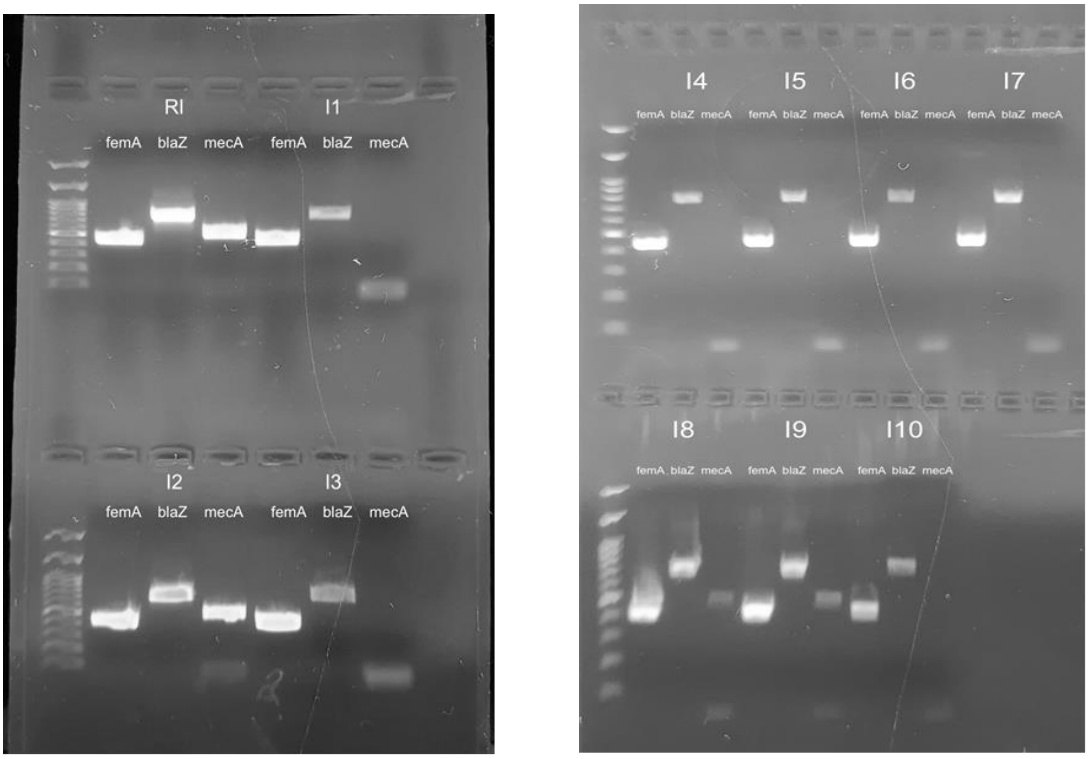
I1-I10 : *S. aureus* sample isolated from mastitis cows.

R : Resistance

S : Susceptible

ผลการพิสูจน์เชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (PCR)

ผลการพิสูจน์เชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ isolate I1 ถึง I10 และเชื้ออ้างอิง (RI) โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยยีน *fem*A, *bla*Z และ *mec*A พบว่าเชื้อทุก ๆ isolate มียีน *fem*A และ *bla*Z (**Figure 1**) ซึ่งเป็นเป็นยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *S.aureus* เป็นผลตรงกันกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ (Taechowisan et al., 2018)



(a) (b)

Figure 1 Results of PCR assay for the detection of antimicrobial resistance genes of *S.aureus* isolated from mastitis cows as reference isolate (RI) , isolate I1-I3 (a) and isolate I4-I10 (b)

ส่วนผลการตรวจด้วยยีน *mec*A ส่วนใหญ่ได้ผลตรงกันกับวิธีทางชีวเคมีและแบคทีเรียวิทยา โดยเชื้อที่ไม่ดื้อยาต้านจุลชีพ ตรวจไม่พบยีน *mec*A ได้แก่ I1, I3-I7 และ I10 และเชื้อที่ดื้อยาต้านจุลชีพ ตรวจพบยีน *mec*A ได้แก่ RI และ I2 แต่มีเชื้อจำนวน 2 isolates ที่ตรวจพบยีน *mec*A โดยวิธี PCR แต่เชื้อไม่แสดงการดื้อยาเมื่อตรวจโดยใช้วิธีทางแบคทีเรียวิทยา ได้แก่ I8 และ I9 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อมียีนที่จำนวน Copy number ไม่สูง หรือมีการเกิด Gene silencing ขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการตรวจด้วยวิธี PCR ให้ผลที่มีความแม่นยำ และมีความไวสูงกว่าการตรวจโดยทดสอบการดื้อยาเพียงอย่างเดียว และสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคได้

วิจารณ์

โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) เป็นปัญหาที่สำคัญมากสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ซึ่งทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก โรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่รูหัวนม โดยแหล่งของเชื้อแบคทีเรียอาจพบอยู่ตามพื้นคอก มูลโค ผิวหนัง และเต้านมโค เป็นต้น ทั้งนี้การติดเชื้อแบคทีเรียอาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการรีดนมโดยผ่านทางอุปกรณ์การรีดนม เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบ แบ่งได้ 3 ประเภท ได้แก่ 1.) เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบโดยตรง (Contagious pathogen) ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* เป็นต้น โดยการติดต่อของเชื้อในกลุ่ม contagious มักติดต่อจากแม่โคที่

เป็นโรคสู่แม่โคที่ไม่เป็นโรค โดยผ่านทางผ้าเช็ดเต้า หรือเครื่องรีดนม 2.) เชื้อแบคทีเรียที่มาจากสิ่งแวดล้อม (Environment pathogen) ได้แก่ *Escherichia coli* โดยการติดเชื้อในสิ่งแวดล้อม มักติดต่อจาก มูลโค พื้นคอก และ 3.) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มพวกฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Coagulase Negative Staphylococcus (CNS) โดยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถแยกได้จากผิวหนังของหัวนม ช่องเปิดของหัวนม มักไม่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ ซึ่งติดต่อได้จากการปฏิบัติด้านสุขศาสตร์การรีดนมที่ไม่เหมาะสม (ธีรพงศ์, 2558)

จากผลการตรวจเต้านมที่ติดเชื้อโรคเต้านมอักเสบด้วยน้ำยาซีเอ็มที (California Mastitis Test; CMT) พบว่ามีจำนวน 145 เต้า (ตัวอย่าง) ที่ให้ผลทดสอบซีเอ็มทีเป็นบวก (ระดับซีเอ็มที +1, +2 และ+3) โดย ผลการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำนมรายเต้าในฟาร์มโคนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 145 ตัวอย่าง ซึ่งภายหลังจากการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ มีตัวอย่างน้ำนมที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 153 isolates ซึ่งพบว่ามีความชุกของเชื้อ *S. aureus* แยกจากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบคิดเป็น 6.55% (10/153) และเชื้อในกลุ่ม Coagulase Negative Staphylococcus (CNS) คิดเป็น 11.11 % (17/153) สอดคล้องกับการศึกษาของ จารุวรรณ และคณะ, 2553 ได้ศึกษาถึงความชุกของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบติดต่อในโคนมในเขตจังหวัดขอนแก่น พบว่ามีความชุกของเชื้อ *S. aureus* คิดเป็น 7% (9/138) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษา พบว่ามีความชุกของการพบทั้งเชื้อ *S. aureus* และเชื้อในกลุ่ม CNS ในระดับต่ำกว่าการศึกษาของ ปิยะวดี และ ชัยรัตน์ (2554) ซึ่งศึกษาถึงความชุกของโรคเต้านมอักเสบในโครีดนม จังหวัดแพร่ ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกรกฎาคม 2554 โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโครีดนมจำนวน 81 ตัว ทำการทดสอบน้ำนมด้วยน้ำยาซีเอ็มทีและเก็บตัวอย่างน้ำนมที่มีภาวะเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ จำนวน 56 ตัวอย่าง นำมาเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย พบว่า มีความชุกของ ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CNS และ *S. aureus* คิดเป็น 37.50% (21/56) และ 12.50% (7/56) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เชื้อในกลุ่ม CNS เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในระดับสูง สอดคล้องกับการศึกษาของ ศุกลรัตน์ และคณะ (2550) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สัมพันธ์กับเต้านมอักเสบในแม่โครีดนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่ พบว่า มีความชุกของเชื้อในกลุ่ม CNS ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ คิดเป็น 14.24%

จากผลการศึกษา บ่งชี้ว่าในพื้นที่ศึกษา เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CNS เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ สามารถสะท้อนให้เห็นว่าฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี ประสบกับปัญหาด้านการจัดการสุขศาสตร์การรีดนมที่ถูกวิธี ด้านการจัดการสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และการคัดแยกโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบออกจากฝูง ดังนั้นเกษตรกรควรให้ความสำคัญในการจัดการด้านสุขศาสตร์การรีดนม โดยมีการตรวจคัดกรองเต้านมอักเสบเบื้องต้นด้วยน้ำยาซีเอ็มที การใช้น้ำยาคลอรีนในการทำความสะอาดเต้านมและจุ่มหัวรีดนม (Liner) การจัดการด้านสภาพแวดล้อม และการคัดแยกโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบออกจากฝูงเพื่อป้องกันการติดเชื้อเข้าสู่รูหัวนม (ฤทธิชัย และคณะ, 2557) รวมทั้งการทำความสะอาดอุปกรณ์ และเครื่องรีดนมหลังการรีดนมทุกครั้งเพื่อป้องการติดต่อของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่รูหัวนมเพื่อลดความเสี่ยงโรคเต้านมอักเสบ (บุณฑริกา และคณะ, 2558)

ผลการทดสอบ MRSA จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Antibiotic drug sensitivity test) ด้วยใช้เทคนิค Disc diffusion พบว่า มีเชื้อ Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA จำนวน 1 ไอโซเลต (Isolate) ดังนั้นในพื้นที่ศึกษา มีความชุกของเชื้อ MRSA จากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ คิดเป็น 0.65 % (1/153) แสดงให้เห็นว่า การเกิดโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมมีความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อ MRSA ซึ่งทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของฟาร์มโดยเฉพาะหากฟาร์มมีสุขศาสตร์การรีดนมไม่ดี แม่โคที่มีเชื้อในกลุ่ม MRSA อาจแพร่เชื้อสู่แม่โคตัวอื่น ผ่านทางมือผู้รีด ผ้าเช็ดเต้านมและเครื่องรีดนม นอกจากนี้ MRSA ยังสามารถแพร่กระจายจากสัตว์สู่คนได้โดยการสัมผัส ทำให้เกิดการติดเชื้อทางผิวหนัง เนื้อเยื่อ และอวัยวะอื่นได้ (นิติพงษ์ และ เอกชัย, 2552) มีรายงานด้านระบาดวิทยาเกี่ยวกับความชุกเชื้อในกลุ่ม MRSA ที่แยกจากน้ำนมในต่างประเทศ โดย Lim et al. (2013) พบว่า มีเชื้อในกลุ่ม MRSA ที่พบในเต้านมโค จำนวน 35 ตัวอย่าง คิดเป็น 6.3% (35/559) และ Luini et al. (2015) พบว่า มีเชื้อในกลุ่ม MRSA จากฝูงโคนมจำนวน 9 ฝูง คิดเป็น 14.75% (9/61) สำหรับในประเทศไทย มีการศึกษาในฟาร์มในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม จำนวน 12 ฟาร์ม พบว่ามี ความชุกเชื้อในกลุ่ม MRSA คิดเป็น 15.22 % (7/46) (ทศพล และคณะ, 2558) สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ และทำให้เกิดการดื้อยา มักเกิดจากการจัดการฟาร์ม สุขศาสตร์การรีดนม และการใช้ยา

ต้านจุลชีพไม่เหมาะสม โดยเฉพาะการใช้ยาปฏิชีวนะแบบสอดเต้านมไม่เหมาะสม หรือละเลยที่ทำการรักษา ทำให้ยังคงมีเชื้อ *S. aureus* และเชื้อในกลุ่ม MRSA คงเหลือในเต้านม

ผลการตรวจด้วย PCR จากเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลตที่ผ่านการเพาะแยกทางแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ให้ผลตรงกันกับผลทางแบคทีเรียวิทยา คือ ตรวจพบยีน *femA* และ *blaZ* ในเชื้อทุกไอโซเลต เนื่องจากยีนทั้งสองเป็นยีนที่ใช้ในการยืนยันเชื้อ *S. aureus* จึงพบได้ในทุก ๆ isolate ทั้งชนิดที่ดื้อและไม่ดื้อยา เป็นผลตรงกันกับงานวิจัยที่มีการตรวจเชื้อที่มาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น จากโรงพยาบาล และจากสิ่งแวดล้อม ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศที่รายงานมาก่อนหน้านี้ (Davoodi et al., 2015; Okolie et al., 2015; Taechowisan et al., 2018) สำหรับยีน *mecA* เป็นยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมขนาดเล็ก Staphylococcal cassette chromosome mec (SccMec) ในแบคทีเรียทำหน้าที่สร้างโปรตีน penicillin-binding protein PB2A ซึ่งสามารถจับกับยาต้านจุลชีพในกลุ่ม Beta-lactam ทำให้เชื้อ *S. aureus* ที่มียีนนี้แสดงอาการดื้อยา สามารถสร้างผนังเซลล์และดำรงชีวิตอยู่ได้แม้ในสภาพแวดล้อมที่มียาต้านจุลชีพดังกล่าว (Katayama et al., 2000) ดังนั้น *mecA* จึงเป็นยีนสำคัญที่ใช้ในการตรวจเชื้อ MRSA

ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อที่มียีน *mecA* จำนวน 3 ไอโซเลต จากทั้งหมด 10 ไอโซเลต คิดเป็น 30% ของเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด ซึ่งหนึ่งในนั้นเป็นเชื้อที่ตรวจพบมีการดื้อยา Oxaciilin (OX) และ Cefoxitin (FOX) ด้วยวิธี Disk Diffusion ได้แก่เชื้อ I2 เป็นผลตรงกันกับการทดสอบทางแบคทีเรียวิทยา อย่างไรก็ตาม ในเชื้อไอโซเลต I8 และ I9 ที่ตรวจพบยีน *mecA* แต่เชื้อไม่แสดงการดื้อยาเมื่อตรวจด้วยวิธี Disk Diffusion อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อมีปริมาณยีน *mecA* ที่อยู่บนพลาสมิด SccMec (Plasmid copy number) จำนวนน้อย จึงไม่มีแสดงออกทางแบคทีเรียวิทยา จึงสรุปได้ว่าผลการตรวจโดยวิธี PCR มีความไว (Sensitivity) สูงกว่าการตรวจโดยวิธีทางแบคทีเรียวิทยาเพียงอย่างเดียว

สรุป

การศึกษาความชุกของเชื้อ *S .aureus* และเชื้อ MRSA ที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนม ในฟาร์มเกษตรกร เขตอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 55 ฟาร์มโดยเก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้า ที่ให้ผลการทดสอบน้ำยาซีเอ็มทีเป็นบวก (ระดับซีเอ็มที +1, +2 และ+3) จำนวน 145 ตัวอย่าง นำตัวอย่างน้ำนมเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้จำนวน 153 isolate ผลการศึกษาพบว่า มีความชุกของเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ MRSA คิดเป็น 6.55% (10/153) และ 0.65% (1/153) ตามลำดับ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการพัฒนาการวิจัยการเกษตร (ปีงบประมาณ 2561) เพื่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกุมา สามงามนิ่ม. 2550. การตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบและคุณภาพน้ำนมดิบทางห้องปฏิบัติการ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

จารุวรรณ คำพา, วราภรณ์ ศุกลพงศ์, อนันตชัย ชัยยศวิทยากุล, ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข และอรุณี พลภักดี. 2553. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: ความชุกของเชื้อ *Mycroplasma bovis* และแบคทีเรียชนิดอื่นที่ก่อโรคเต้านมอักเสบติดต่อในโคนมในเขตจังหวัดขอนแก่น.

ทศพล สีรินทร์, อิฏฐวัชร เสตพันธ์, จันทร์เพ็ญ ภูผาพลอย และมนกานต์. 2558. รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ MRSA ที่แยกได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ และการจัดการฟาร์มที่เกี่ยวข้อง. วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสารคาม. 36 (2): 161-165.

ธีรพงศ์ ธีรภัทรสกุล. 2558. โรคเต้านมอักเสบในโคนม เล่ม 2. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน). กรุงเทพฯ.

นิตยา อินทราวัฒนา และมุฑิตา วนาภรณ์. 2558. บทความปริทัศน์: โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและสถานการณ์การดื้อยา. วารสารการแพทย์ และวิทยาศาสตร์สุขภาพ. 22(1): 81-92.

บุณฑริกา กระจ่างวงษ์,สุวิชา เกษมสุวรรณ และวราพร พิมพ์ประไพ. 2558. ความชุกและปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบมากกว่า 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของฟาร์มโคนมในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์. วารสารสัตวแพทย์. 25 (3): 105-114.

ปิยะวดี นุ่มนวล และชัยรัตน์ บัวเลิศ. 2554. ความชุกและการดื้อยาต้านจุลชีพของโรคเต้านมอักเสบในโครีดนม จังหวัดแพร่ ระหว่างเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม 2554. เอกสารวิชาการสำนักงานปศุสัตว์. แพร่.

ระเบียบมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย. 2542. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย.

ศุกลรัตน์ บุณยยาตรา, จุฬาณี ถาบุญเป็ง, ขวัญชาย เครือสุคนธ์ และวิทยา สุริยาสถาพร. 2550. การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับเต้านมอักเสบในแม่โครีดนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 5 (2): 135-145.

สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์. 2554. วิทยาการระบาดของการติดเชื้อ Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* ที่เกิดจากชุมชน. ธรรมศาสตร์เวชสาร. 11(1): 62-73.

Davoodi, N. R., S. D. Siadat, F. Vaziri, J. V. Yousefi, N. Harzandi, A. Rafi, and A. R. Bahrmand. 2015. Identification of Staphylococcus aureus and Coagulase-negative Staphylococcus (CoNS) as well as Detection of Methicillin Resistance and Panton-Valentine Leucocidin by Multiplex PCR. Journal of Pure and Applied Microbiology. 9(1): 1–5.

Haas, Y., H. W. Barkema, Y. H. Schukken, and R. F. Veerkamp. 2005. Associations between somatic cell count patterns and the incidence of clinical mastitis. Preventive Veterinary Medicine. 67: 55-68.

Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 44(6): 1549–1555.

Lim, S. K., H. M. Nam, G. C. Jang, H. S. Lee, S. C. Jung, and T. S. Kim. 2013. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment, and workers in dairy cattle farms. Foodborne Pathogens and Disease. 10(8): 731-736.

Luini, M., P. Cremonesi, G. Magro, V. Bianchini, G. Minozzi, B. Castiglioni, and R. Piccinni. 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: genotyping of isolates. Veterinary Microbiology. 178(3): 270-274.

Okolie, C. E., K. G. Wooldridge, D. P. Turner, A. Cockayne, and R. James. 2015. Development of a heptaplex PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and CoNS with simultaneous detection of virulence and antibiotic resistance genes. BMC Microbiology. 15: 1–7.

Taechowisan, T., N. Mungchukeatsakul, and W. S. Phutdhawong. 2018. Antimicrobial Resistance Pattern of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical and Hospital Environment specimens and Their Correlation with PCR-based Approaches. Research Journal of Microbiology. 13(2): 100–118.