



รายงานวิจัย

ระบาดวิทยาและลักษณะทางอณูชีวโมเลกุลของเชื้อซัลโมเนลลาที่สร้างเอนไซม์เบตา-แลคทาเมส และเบตา-แลคทาเมส ชนิดขยายฤทธิ์ในการดื้อยาในกลุ่มเบตา-แลคแทม (ESBL) ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระ ไก่ สุกร และโค-กระบือ ในพื้นที่จังหวัดพัทลุง

Epidemiology and Molecular Characterization of β -lactamase and Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) Producing *Salmonella* Isolates from Chicken, Swine and Cattle Feces at Phatthalung Province

โดย

อ. ศุภรัตน์ สุทธิมุสิก
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

อ.ดร. มณฑล เลิศวรปรีชา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ บุษกร อุดรภิชาติ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

อ. กำชัย ตันติกาพงศ์
คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย
จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2557
มหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์สำหรับการศึกษานี้เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* และชนิดของยีน β -lactamase ที่แยกจากตัวอย่างมูลสุกร มูลไก่ มูลโค เนื้อสุกร และเนื้อไก่ ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อ *Salmonella enterica* ได้ทั้งหมดจำนวน 129 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสุกร จำนวน 40 ไอโซเลท มูลไก่ จำนวน 29 ไอโซเลท มูลโคจำนวน 6 ไอโซเลท เนื้อเนื้อไก่ จำนวน 23 ไอโซเลท และเนื้อสุกรจำนวน 31 ไอโซเลท ผลการทดสอบการดื้อยา ampicillin พบเชื้อทั้งหมด 16 ไอโซเลท ดื้อยา ตัวอย่างที่แยกจากมูลไก่ทั้งหมด 29 ไอโซเลท ไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ตัวอย่างที่แยกจากมูลโคจำนวน 6 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 2 ไอโซเลท ตัวอย่างที่แยกจากเนื้อไก่จำนวน 23 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin 18 ไอโซเลท และตัวอย่างที่แยกจากเนื้อสุกรทั้งหมด 31 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ผลการตรวจหายีนเอนไซม์ β -lactamase โดยวิธี PCR พบเชื้อทั้งหมด 25 ไอโซเลท ให้ผลบวกต่อยีน *bla*_{TEM} ทั้งหมด โดยเชื้อ *Salmonella enterica* ที่เหลือจำนวน 21 ไอโซเลท ไม่สามารถตรวจพบยีน β -lactamase ด้วย primers ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนซึ่งอนุมานมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (amino acid deduction) และการเปรียบเทียบกับยีน β -lactamase ที่สืบค้นได้จาก GenBank พบว่ายีน *bla*_{TEM} ทั้งหมด มีความคล้ายคลึงกับยีนกลุ่ม *bla*_{TEM-1} การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับพีโนไทป์ ด้วยวิธี combination disc พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 3 ไอโซเลท คือ *Salmonella* Startford, *Salmonella* Weltevreden และ *Salmonella* Typhimurium ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบทั้งในระดับการตรวจคัดกรอง การตรวจยืนยันผลในระดับจีโนไทป์ (genotype) นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่อนุมานมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน ESBL ที่ตรวจพบ เป็นยีนกลุ่ม CTX-M กลุ่มที่ 1 ซึ่งคล้ายคลึงกับ CTX-M79 มากที่สุด

คำสำคัญ: *Salmonella enterica*, การดื้อยาต้านจุลชีพ เบตา-แลคตาเมส เบตา-แลคทาเมส ชนิดขยายฤทธิ์ในการดื้อยาในกลุ่มเบตา-แลคแทม (ESBL)

Abstract

The objectives of this study were to investigate the antimicrobial susceptibility profiles and the β -lactamase genes among *Salmonella enterica* isolates from swine, chicken and cattle feces, pork and chicken meat. The total of 129 isolates, 40, 29, 6, 23 and 31 were isolated from swine, chicken and cattle feces, pork and chicken meat, respectively. Antimicrobial susceptibility testing to ampicillin indicated that 16 of total 40 isolates from swine, 2 of total 6 isolates from cattle feces, 18 of total 23 isolates from chicken meat and 10 of all total 31 isolates from pork were resistant to ampicillin. None of the isolates from chicken feces were found resistance to ampicillin. In order to identify the β -lactamase gene, all of ampicillin resistance isolates were amplified by PCR using specific primers for β -lactamase genes. The results demonstrated that only 25 isolates were positive for *bla*_{TEM} β -lactamase genes. The amino acid deducing from nucleotides sequencing confirmed that the *bla*_{TEM} β -lactamase genes of all 25 isolates were homology to *bla*_{TEM-1} group. For ESBL production, all of ampicillin resistance isolates were screened by disc diffusion method and confirmed by gene amplification and sequencing. The results of screening and phenotypic confirmatory assay indicated 3 isolates, which were *Salmonella* Startford, *Salmonella* Weltevreden and *Salmonella* Typhimurium positive for ESBL. The PCR and multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequence and phylogenetic tree construction of three ESBL producer indicated that the ESBL were the CTX-M group 1, which closely related to CTX-M79 gene.

Keywords: *Salmonella enterica*, antimicrobial drug resistance, β -lactamase, extended spectrum β -lactamase (ESBL),

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2557 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์เครื่องมือสำหรับการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวสิริลักษณ์ หนูมี นิสิตปริญญาโท นางสาวยุวดี แซ่อึ้ง นางสาวกรชนก เกียรติดำรงค์ และนายธีรยุทธ เกษมสันต์ นิสิตปริญญาตรีสาขาชีววิทยา ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย
ศุภรัตน์ สุทธิมุสิก
มณฑล เลิศวรปรีชา
บุษกร อุตระภีชาติ
กำชัย ตันติกาพงศ์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย	ii
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญ	v
สารบัญรูปภาพ	vi
สารบัญตาราง	vii
กิตติกรรมประกาศ	viii
บทที่	
1. บทนำ	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3. วิธีการทดลอง	11
4. ผลการทดลอง	15
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก1	45
• การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	
• ผลการจัดทำ alignment	
• ข้อมูลการวิเคราะห์การดื้อยาต้านจุลชีพ	
ภาคผนวก2	61
• การนำเสนอผลงานวิจัย	

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1. ความหลากหลายยีน ESBL กลุ่ม TEM เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน	6
2. ความหลากหลายยีน ESBL กลุ่ม SHV เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน	7
3. การทดสอบ phenotypic confirmation โดยวิธี combination disc assay	10
4. การทดสอบ phenotypic confirmation โดยวิธี double disc assay	10
5. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสุกร	17
6. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างมูลไก่	20
7. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างมูลโค	22
8. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่	24
9. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อสุกร	27
10. ตัวอย่างผลเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่ให้ผลบวกต่อยีน <i>bla</i> _{TEM}	29
11. Phylogenetic tree ของยีน <i>bla</i> _{TEM} จากเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank	30
12. ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับพีโนไทป์ ขั้นตอนการคัดกรองและขั้นตอนการตรวจยืนยัน	31
13. ผลการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับจีโนไทป์โดยวิธี PCR ผลผลิต DNA ของยีน CTX-M	31
14. Phylogenetic tree ของยีน ESBL จากเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank	32
15. ผลการทดสอบการถ่ายโอนพลาสมิดที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL จากเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ไปสู่เชื้อ <i>E. coli</i>	33

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลการศึกษาทางระบาดวิทยาของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในประเทศไทย	8
2. ยากลุ่ม 3 rd generation cephalosporin และการแปลผลการทดสอบการคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL	9
3. รายละเอียดของ primers สำหรับตรวจหา ยีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพ	13
4. ยีนเป้าหมายและ primers ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL และ β -lactamase	14
5. ผลการแยกและจำแนกเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างมูลสุกร	15
6. รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างมูลสุกร	16
7. ผลการแยกและจำแนกเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างมูลไก่	18
8. รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างมูลไก่	19
9. ผลการแยกและจำแนกเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างมูลโค	21
10. รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างมูลโค	21
11. ผลการแยกและจำแนกเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างเนื้อไก่	23
12. รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างเนื้อไก่	23
13. ผลการแยกและจำแนกเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างเนื้อสุกร	25
14. รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน <i>Salmonella enterica</i> จากตัวอย่างเนื้อสุกร	26
15. จำนวนเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด	28
16. ผลการตรวจยืนยันควบคุมการดื้อยาในเชื้อ <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างต่าง ๆ	29