การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อเอนเทอโรคอกคัสที่มีความสำคัญทางคลินิกบางสายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทยบางชนิด

นสภ.นุชนันท์ ชุมแก้ว 513 65962 33

นสภ.ตรีภพ สังฆะโยธิน 513 65584 33

นสภ.ทิพรัตน์ ปาระแก้ว 513 65629 33

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF SOME CLINICALLY RELEVANT *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLATED FROM SOME THAI TRADITIONAL FERMENTED READY-TO-EAT FOODS

Nutchanan Chumkaew

Treepop Sungkayoltin

Tipparat Parakaw

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อเอนเทอโรคอกคัสที่มีความสำคัญทางคลินิกบางสายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทยบางชนิด
นิสิตผู้ดำเสนอโครงการ	นางสาวนุชนันท์ ชุมแก้ว นายตรีภพ สังฆะโยธิน นางสาวทิพรัตน์ ปาระแก้ว
สาขาวิชา	เภสัชกรรมผลิตภัณฑ์ แขนงการค้นพบยา
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มณีวรรณ สุขสมทิพย์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

.....คณบดี

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

.....ประธานแขนงการค้นพบยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.บุญศรี องค์พิพัฒนกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มณีวรรณ สุขสมทิพย์)

โครงการลำดับที่ 3.12
วันที่ 7 มกราคม 2556

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อเอนเทอโรคอกคัสที่มีความสำคัญทางคลินิกบางสายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทยบางชนิด

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Antibiotic Resistance of some clinically relevant *Enterococcus* spp. isolated from some Thai Traditional Fermented Ready-To-Eat Foods

หัวหน้าโครงการ : นางสาวนุชนันท์ ชุมแก้ว รหัสประจำตัวนิสิต 513 65962 33

ผู้ร่วมโครงการ : นายตรีภพ สังฆะโยธิน รหัสประจำตัวนิสิต 513 65584 33

: นางสาวทิพรัตน์ ปาระแก้ว รหัสประจำตัวนิสิต 513 65629 33

อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ภญ. ดร.มณีวรรณ สุขสมทิพย์

ภาควิชา : ชีวเคมีและจุลชีววิทยา

The purpose of this study was to determine antibiotic resistance among some *Enterococcus* spp. isolated from 4 types of Thai traditional fermented ready-to-eat foods (Nam-moo, Pla-som, Pla-ra and Kung-jom). One hundred and twenty randomly selected isolates identified as *E. faecium* and *E.faecalis* were used. Antibiotic resistance phenotype was screened by disk diffusion method and further confirmed for antibiotic resistance by MIC determination with broth microdilution method. The results showed that both *E. faecalis* and *E. faecium* strains had high incident of resistance against tetracycline (78.33% and 68.33%, respectively). The resistance against erythromycin and ciprofloxacin was detected only in *E. faecalis* (75% and 31.67%, respectively). None of nitrofurantoin and vancomycin resistant strains was detected. Multi-drug resistance (tetracycline, erythromycin and ciprofloxacin) was found only in 17.78% *E. faecalis* isolated from Nam-moo. Among four different types of fermented food, Nam-moo and Pla-som were contaminated with high number of antibiotic resistance enterococcal strains. The *E.faecalis* strains with erythromycin resistance phenotype were further used for *ermB* detection by simple PCR. Moreover, the virulent determinants (*asa1, gelE, cylA, esp* and *hyl*) were also detected by multiplex PCR. Among strains with displayed erythromycin resistant phenotype, 36.67% were positive for *ermB* gene. The virulent determinant, *gelE* was detected in strains from both Nam-moo and Pla-som, while *asa1* and *esp* were positive only in strains from Pla-som. In summary, some Thai traditional fermented ready-to-eat foods carried potentially clinical relevant and antibiotic resistant enterococci which should underline the public health concern.

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณีวรรณ สุขสมทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาวปิยนันท์ เหลืองพูลลาภ และ นางสาวนันท์ปกรณ์ ดีประดิษฐ์ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งคณาจารย์ นิสิตบัณฑิตศึกษาทุกท่าน และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยาที่กรุณาช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทำโครงการนี้

คำนำ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อเอนเทอโรคอกคัสบางสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางคลินิก ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทยบางชนิด หวังเป็น อย่างยิ่งว่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย

หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขออภัยไว้ ณ ที่นี้ และขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา รวมทั้งผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่มีส่วนร่วมในปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้จัดทำ

กุมภาพันธ์ 2556

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
คำนำ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่
1. บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
1.3 วิธีดำเนินการวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
2. อุปกรณ์และสารเคมี 5
2.1 อุปกรณ์ 5
2.2 สารเคมี 5
2.3 สายพันธุ์เชื้อ 6
3. ปริทัศน์วรรณกรรม 7
3.1 แบคทีเรียเอ็นเทอโรค็อกคัส (*Enterococcus* spp.) 7
3.2 การดื้อยาปฏิชีวนะและยีนที่ควบคุมการแสดงออกให้เกิดโรคในมนุษย์ 9
3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) 11
4. วิธีการวิจัยโดยละเอียด 15
4.1 การตรวจสอบการดื้อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion method 15

4.2 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth microdilution……....18

4.3 การตรวจหายีนดื้อยาปฏิชีวนะ Erythromycin……....20

4.4 การการตรวจหา virulence gene…….…….22

5. ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย…… 26

5.1 ผลการทดสอบหาความไวต่อยาปฏิชีวนะของโคโลนี *Enterococcus* spp.

ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร…… 26

5.2 ผลการตรวจหายีนดื้อยาปฏิชีวนะ erytromycin……... 29

5.3 ผลการตรวจหายีนก่อโรคในเชื้อ *Enterococcus* spp. …….. 31

รายการอ้างอิง …….. 33

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 Virulence factor ของ enterococci 7
ตารางที่ 2 เกณฑ์การประเมินการดื้อยาปฏิชีวนะจากการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion.……17
ตารางที่ 3 เกณฑ์การประเมินการดื้อยาปฏิชีวนะจากการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution 19
ตารางที่ 4 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบ *erm*(B).....20
ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ *erm*(B).....21
ตารางที่ 6 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ *erm*(B).....21
ตารางที่ 7 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบ virulence gene.....23
ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Multiplex PCR ในการตรวจสอบ virulence gene 24
ตารางที่ 9 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ virulence gene.....25
ตารางที่ 10 จำนวน enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด จำแนกตามชนิดของอาหาร 27
ตารางที่ 11 จำนวน enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด จำแนกตามชนิดของเชื้อ 28
ตารางที่ 12 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* ที่ตรวจพบยีน *erm*(B) 30
ตารางที่ 13 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* ที่ตรวจพบยีนก่อโรค.....32

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบการดื้อยาปฏิชีวนะระหว่างเชื้อ *E. faecalis* กับ *E. faecium* 28
ภาพที่ 2 ผลการ run gel electrophoresis ในการหายีน *erm*(B) ของ *E. faecalis* ...…....……..…….29
ภาพที่ 3 ผลการตรวจหาการตรวจหายีนก่อโรค *E. faecalis* …….....31

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับนานาชาติและมีความซับซ้อนมากขึ้นทุกขณะ ส่งผลกระทบทั้งในด้านสุขภาพและด้านเศรษฐกิจ โดยมีรายว่าแต่ละปีคนไทยมีการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะมากกว่า 100,000 คน อยู่โรงพยาบาลนานขึ้นมากกว่า 1 ล้านวัน เสียชีวิตมากกว่า 30,000 คน และมีความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากกว่า 10,000 ล้านบาท ทั้งนี้ยังไม่รวมความสูญเสีย ที่เป็นผลจากการเสียชีวิตของประชากรก่อนวัยอันควร กระทรวงสาธารณสุขของไทยจึงได้จัดให้ปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะและการส่งเสริมการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างสมเหตุสมผลเป็นนโยบายสำคัญระดับชาติ ซึ่งสอดคล้องกับทิศทางขององค์การอนามัยโลกที่มีการกำหนดคำขวัญใน พ.ศ. 2554 ว่า “ No Action Today, No Cure Tomorrow” หรือ “ถ้าไม่แก้ไขวันนี้ จะไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อได้วันพรุ่งนี้”

การศึกษาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในอดีตจะมุ่งให้ความสนใจไปยังเชื้อที่ก่อโรคโดยตรง (true pathogen) ในโรงพยาบาลเป็นส่วนใหญ่ แต่ในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) มากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น *Enterococcus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยมีลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปกลม แกรมบวก สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งดิน น้ำ พืช และผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปมาจากสัตว์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *E. faecium* และ *E. facalis* จัดว่ามีความสำคัญในทางสาธารณสุข (Johnson., 2004) ทั้งนี้มีรายงานว่าเชื้อที่ก่อโรคในโรงพยาบาลจะเป็นสายพันธุ์ดังกล่าวถึง 12% (Coque., 2008) โดยในมนุษย์เชื้อเอนเทอโรคอกคัสสามารถทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคติดเชื้อในกระแสโลหิต โรคเยื่อบุโพรงหัวใจอักเสบ และเยื่อบุช่องท้องอักเสบ ซึ่งในจำนวนนี้ 10% ของผู้ป่วยมีสาเหตุจากเชื้อสายพันธุ์ *E. faecium* และ *E. facalis* (Hancock., 2006.) และจากข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานความชุกของแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวกที่พบบ่อยทางคลินิกจากโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วประเทศกว่า 30 แห่ง ตั้งแต่ปี พ.ศ.2543-2548 พบว่าเชื้อ *E. faecalis* มีความชุกระหว่างร้อยละ 45-55 ส่วนเชื้อ *E. faecium* มีความชุกร้อยละ 10 ในปี พ.ศ.2543 แต่ความชุกเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20 ในปี พ.ศ.2545-2546 และเพิ่มเป็นร้อยละ 30 ในปี พ.ศ.2547 (อัศวโภคี., 2551) ซึ่งความรุนแรงของการก่อโรคสำหรับเชื้อดังกล่าวเกี่ยวเนื่องกับยีนหลายชนิดได้แก่ *sagA* (secreted antigen), *ace* (collagen binding cell wall protein), *hyl* (hyaluronidase), *esp* (enterococcal surface protein) รวมถึง *gelE* (gelatinase) (Klibi., 2007.)

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะขจัด หรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะโดยการดื้อยาอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของเชื้อนั้นๆ หรืออาจเกิดภายใต้ความกดดันของยาปฏิชีวนะ ยกตัวอย่างเช่น การดื้อยาของ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา Erythromycin มีกลไกการดื้อยา Erythromycin ได้หลายรูปแบบ เช่น การปรับเปลี่ยนส่วนที่ยาจะเข้าจับ โดยอาศัยเอนไซม์ rRNA *erm* methylase ซึ่งมีผลต่อ การเปลี่ยนแปลงที่ 23S rRNA ทำให้การจับของยาในกลุ่ม Macrolides, Lincosamides และ Streptogramin B เปลี่ยนแปลงไป โดยในกลไลการดื้อยานี้มียีนควบคุมการดื้อยา Erythromycin ซึ่งเรียกว่า *erm* gene ซึ่งในการวิจัยนี้เลือกศึกษาเพื่อตรวจหา *erm*(B) ซึ่งเป็นหนึ่งในยีนที่แสดงกลไกดื้อยา สำหรับกลไกอื่นๆ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาเพื่อให้ยาหมดฤทธิ์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามนอกจากยีนดื้อยาแล้ว ยีนที่ทำให้เชื้อ *Enterococcus* spp. เกิดความสามารถในการก่อโรคก็เป็นกลุ่มยีนที่น่าสนใจในการศึกษา เช่น *asa1 gelE cylA esp hyl* เนื่องหากเชื้อ *Enterococcus* spp. มีการแสดงออกของยีนเหล่านี้นั่นแสดงว่าเชื้อเหล่านั้นมีโอกาสที่จะแสดงความสามารถในการก่อโรคได้ และยิ่งเราสามารถตรวจพบเชื้อที่มียีนเหล่านี้ในอาหาร ยิ่งแสดงถึงความเสี่ยงที่เพิ่มมากขึ้นในการบริโภคอาหารซึ่งอาจนำมาสู่ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ

การเฝ้าระวังการดื้อยาปฏิชีวนะที่มาจากอาหารมากกำลังได้รับความสนใจในหลายประเทศ เนื่องจากพบปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสัตว์และการดื้อยาปฏิชีวนะในมนุษย์จากการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาไปยังมนุษย์หากมีการนำสัตว์เหล่านี้ไปบริโภค สำหรับประเทศไทยในปีค.ศ. 1992 พบการรายงานการปนเปื้อน *E. faecalis* ในปลาร้าแต่ยังไม่มีการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะจากอาหารดังกล่าว (Tanasupawat et al., 1992) และยังมีการศึกษาอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของ enterococci ที่แยกได้จากอาหารอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของ enterococci ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทย โดยหวังว่าผลการวิจัยที่ได้อาจเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ต่อการพิจารณากำหนดแนวทางในการเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยา หรืออาจประโยชน์แก่ภาครัฐในการออกกฎระเบียบสำหรับการควบคุมจำกัดการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และพิจารณาเพิ่มการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาการแสดงออกถึงดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อเอนเทอโรคอกคัสบางสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางคลินิก ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทยบางชนิด
2. เพื่อตรวจหายีนบางชนิดที่จำเพาะต่อคุณสมบัติการดื้อยา Erythromycin เพื่อทำนายกลไกการดื้อยา
3. เพื่อตรวจหายีนที่แสดงคุณสมบัติที่สามารถทำให้เชื้อก่อโรค หรือเพิ่มความรุนอรงของโรค

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทบทวนวรรณกรรมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย
2. เตรียมวัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
3. นำเชื้อ *Enterococcus* spp.ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทยบางชนิด ที่ผ่านการยืนยันแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ *E. faecalis* กับ *E. faecium* นำมาทดสอบหาคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะ (phenotype) กับยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางคลินิก ด้วยวิธี
    1) คัดกรองหาคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะเบื้องต้นด้วยวิธี replica plating
    2) ยืนยันความไวรับต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อด้วยวิธี disc diffusion
    3) ทดสอบความไวรับของเชื้อ enterococci ต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ erythromycin, ciprofloxacin, nitrofurantionและ vancomycin โดยการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ที่ความเข้มข้นต่างๆโดยวิธี broth microdilution
4. สุ่มโคโลนีของ enterococci ที่พบว่ามีการดื้อยา Erythromycin มาทำการทดสอบหาจีโนไทป์ของการดื้อยา เนื่องจากพบว่าเชื้อ enterococci สายพันธุ์ *E. faecalis* และ *E. faecium* มีจำนวนโคโลนีที่พบว่ามีค่าความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ Erythromycin มากที่สุด โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล คือเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ตรวจหา species specific gene โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้
    1) สกัดจีโนมของเชื้อด้วยวิธี Boiling lysis
    2) พัฒนาวิธี PCR สำหรับตรวจยีนดื้อยาชนิดต่างๆ ในปฏิกิริยาเดียวกัน ดังนี้
        - ออกแบบ primers
        - หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primer

- ปรับปรุงสภาวะต่างๆของปฏิกิริยาให้เหมาะสมเช่น อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของ primerและ DNA แม่แบบ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา

3) ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

5. สุ่มโคโลนีของ enterococci ที่พบว่ามีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Multiresistance) มาทำการทดสอบหายีนก่อโรค (Virulence Gene) ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (PCR) โดยใช้หลักการสกัดจีโนมด้วยวิธี Boiling lysis และพัฒนาวิธี Multiplex PCR เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหายีนก่อโรค เพื่อนำมาตรวจสอบ PCR product ที่ได้ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis
6. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการทดลอง
7. จัดทำรายงานปริญญานิพนธ์และ นำเสนองานวิจัย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ enterococci ที่มีอยู่ในอาหารหมักดองพื้นบ้านพร้อมบริโภคของไทยบางชนิดที่จะเป็นประโยชน์ต่อการใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อประกอบการพิจารณาควบคุม เฝ้าระวังและลดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต่อไป นอกจากนี้ได้เรียนรู้เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการศึกษาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพ และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจหาการดื้อยาปฏิชีวนะ และแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดโรค

บทที่ 2
อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 อุปกรณ์

- Incubator (POLAR 1000C Incubator, Australia)
- PCR mastercycler gradient thermal cycler (Eppendorf, Germany)
- Laminar air flow (Astec Microflow ATC 1800N, United Kingdom)
- Autoclave (HA-300MD, Hirayama, United Kingdom)
- Hot air oven (YCO-No 1, Gemmy, Taiwan)
- Centrifuge (SCR 20B Himac Centrifuge, Hiyachi, Japan)
- pH meter (Mettler Toledo S40 SevenMulti, Switzerland)
- Analytical balance (Mettler Toledo PL602-s, Switzerland)
- Vortex mixer (Votex-2 Genic, Scientific Industries, USA)
- Spin down (Mini Centrifuge C-1200,National Labnet, USA)
- Water bath (Memmert®, England)
- Gel documentation (Gel Doc XR, Bio-Rad, USA)
- Micropipette (Gilson, France)
- Micropipette tip (Axygen Scientific Inc, USA)
- Microcentrifuge tube (Axygen Scientific Inc, USA)
- PCR tube (Axygen Scientific Inc, USA)
- Laboratory Blender Stomacher (Seward Model 400, England)

2.2 สารเคมี

- Pancreatic digest of casein (Criterion, USA)
- Yeast extract (Lab M, England)
- Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
- Sodium citrate (Merck, Germany)
- Polyoxyethylene sorbitanmonooleate (tween® 80) (Ajax Finechem, Australia)
- Agar-agar (Scharlau Chemie S.A., Spain)
- Sodium carbonate (Univar, New Zealand)

- 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Fluka, Switzerland)
- Sodium azide (Labchem, Australia)
- Sodium chloride (Univar, New zealand)
- Chemical substances for PCR amplification
    - Taq polymerase, PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP (invitrogen®, Brazil)
    - Primer (operon biotechnologies, Germany)
- DNA ladder (SibEnzyme Ltd., Russia)
- DNA ladder (Invitrogen®, Brazil)
- Agarose gel (Research organics, USA)
- Ethidium bromide 10mg/ml (Fluka, Switzerland)
- EDTA (Ajax Finechem, Australia)
- Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Sigma Algrich Inc., USA)
- Boric acid (Univar, New zealand)
- Lysozyme (Sigma Algrich Inc., USA)
- Tetracycline hydrochloride powder (USB Corporation Cleveland, USA)
- Erythomycin (EMD chemicals, Inc., Germany)
- Ciprofloxacin Hydrochloride monohydrate (Tokyo chemical industry, Japan)
- Nitrofurantoin (Tokyo chemical industry, Japan)
- Vancomycin Hydrochloride (EMD biosciences, Inc., Germany)
- M.R.S broth powder (Lab M, England)
- Peptone water powder (Criterion, USA)
- Plate count agar (Britania, Argentina)
- Mueller hinton ii broth (cation-adjusted) powder (BD, France)
- Muller hinton agar (oxoid, UK)
- bromophenol blue **(**J.T. Baker Inc., USA**)**
- antibiotic discs (Oxoid, UK) ของยาปฏิชีวนะ Erythromycin

2.3 สายพันธุ์เชื้อ

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

บทที่ 3
ปริทรรศน์วรรณกรรม

3.1 แบคทีเรียเอ็นเทอโรค็อกคัส (*Enterococcus* spp.)

Enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น น้ำ ดิน อาหาร และยังเป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณทางเดินอาหารของคนและสัตว์ คุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางอย่างของ enterococci ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ใน สภาวะที่ไม่เอื้อนวยต่อแบคทีเรียชนิดอื่น จึงนำมาเป็นคุณสมบัติที่ใช้แยกออกจาก streptococci ซึ่งมีลักษณะภายนอกเหมือนกัน แต่ enterococci เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือสูง (6.5% NaCl) อุณหภูมิตั้งแต่ 5°C จนถึง 50°C และสามารถอยู่รอดได้ 30 นาทีในอุณหภูมิ 60 °C มีชีวิตอยู่ได้ในช่วง pH 4.8-9.6 และนอกจากนี้ยังทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 40% ได้อีกด้วย (Fisher., 2009)

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคหรือ Virulence factor หมายถึงคุณลักษณะหรือสารที่เชื้อโรคสร้างขึ้นเพื่อช่วยในการแบ่งตัวและให้มีชีวิตรอดจากระบบภูมิคุ้มกันของ host ซึ่ง virulence factor ของ enterococci ที่ได้มีการค้นพบและศึกษาถึงบทบาทหน้าที่มีแสดงในตารางที่ 1 โดยตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการแสดงออกมักอยู่ที่ conjugative plasmid หรือ transposon ซึ่งทำให้ยีนสามารถถูกถ่ายทอดได้อย่างง่ายดาย (Palmer., 2010) โดยการถ่ายทอดยีนเกิดได้ทั้งระหว่าง *Enterococcus spp*. และแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน หรือระหว่าง enterococci ให้กับแบคทีเรียสกุลอื่นก็ได้ (Ray., 2003)

ตารางที่ 1 Virulence factor ของ enterococci (Vu., 2011)

Virulence factor	หน้าที่
1. Surface adhesions aggregation substance	เป็นโปรตีนรูปร่างคล้ายเส้นขนฝังตัวอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ใช้ยึดเกาะกับเซลล์ของ host และใช้จับกับเซลล์ที่จะเกิด conjugation ด้วย
2. Enterococcus surface protein (Esp)	ใน *E. faecalis* ใช้ยึดติดกับกระเพาะปัสสาวะ ส่วนใน *E. faecium* พบว่าเกี่ยวข้องกับการสร้าง biofilm ของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่เกิดจากอุปกรณ์ทางการแพทย์
3. Secreted factors Cytolysin	ทำให้เกิดการแตกของเซลล์ เม็ดเลือดแดง Macrophage และ Neutrophil

4. Gelatinase	ย่อยสลาย gelatin, collagen, casein และ hemoglobin
5. Extracellular superoxide	ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด แต่อาจมีบทบาทในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก
6. Antibiotic resistance Multiple plasmid and chromosome genes	สามารถแลกเปลี่ยนผ่าน conjugation, transposons หรือ bacteriophages เป็นสาเหตุที่สำคัญของการดื้อยาของเชื้อต่อ aminoglycosides, β-lactams, vancomycin

ในปัจจุบันแบคทีเรียสกุล *Enterococcus* มีทั้งหมด 38 สายพันธ์ (Murray., 2009) โดย *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* เป็นสายพันธ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดเนื่องจากเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อ enterococci โดยพบ *E. faecalis* ประมาณ 80%-90% (Vu., 2011) ของการติดเชื้อ enterococci ทั้งหมด case ที่เหลือส่วนใหญ่เกิดจาก *E. faecium* การติดเชื้อ Enterococci ได้แก่ โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ โรคติดเชื้อในกระแสโลหิต เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ การเกิดแผลหนอง และ การติดเชื้อในช่องท้อง (Vu., 2011)

เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจึงสามารถเจริญได้ในอาหารหมัก เนื่องจากความเป็นกรดในอาหารเหล่านี้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต enterococci บางสายพันธุ์จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในต่างประเทศโดยใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตอาหารหมักประเภทเนยแข็ง ไส้กรอก และการหมักเนื้อสัตว์ดิบเนื่องจากให้กลิ่นและรสที่ดี นอกจากนั้นมีการนำ enterococci บางสายพันธุ์มาใช้เป็นโพรไบโอติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย อย่างไรก็ตามในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา enterococci ได้ถูกจัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายทางชีวภาพในอาหารได้ เนื่องจากพบว่ามีรายงานการก่อโรคติดเชื้อทั้งในชุมชนและในโรงพยาบาลสูงขึ้น (Lynn, 2006) สามารถก่อโรครุนแรงได้ในลักษณะของการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) ในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ และผู้ป่วยวิกฤติ เป็นต้น ส่วนในอาหารไทย enterococci ทำหน้าที่เป็นเลคติกเอซิดแบคทีเรียในอาหารหมักดองร่วมกับแบคทีเรียในสกุลอื่นๆ เช่น *Lactobacillus, Pediococcus, Halobacterium, Staphylococcus* เป็นต้น อาหารหมักดองของไทยที่มี enterococci เช่น ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาส้ม ไส้กรอกหมูเปรี้ยว หม่ำ ผักกาดดอง เมี่ยง (Tanasupawat., 1995) เป็นต้น

จากข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานความชุกของแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวกที่พบบ่อยทางคลินิกจากโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วประเทศกว่า 30 แห่งตั้งแต่ปี พ.ศ.2543-2548 พบว่า *E. faecalis* มีความชุกระหว่าง 45-55% ส่วน *E. faecium* มีความชุก 10% ในปี พ.ศ.2543 และความชุกเพิ่มขึ้นเป็น 20% ในปี พ.ศ.2545-2546 และเพิ่มเป็น 30% ในปี พ.ศ. 2547 ทั้งยังมีรายงานการดื้อยาปฏิชีวนะของ enterococci มากขึ้น

นอกจากเป็นเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหารแล้ว enterococci ยังมีคุณสมบัติเป็นแหล่งสะสมของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้อีกด้วย (Wilcks., 2005) ในหลายประเทศเริ่มมีการเฝ้าระวังอันตรายจาก enterococci มากขึ้น เช่น ประเทศแคนาดาได้ยกเลิกการใช้ enterococci เป็นโพรไบโอติก ส่วนทางยุโรปมีมาตรการออกกฎหมายป้องกันซึ่งห้ามมี enterococci ปนเปื้อนในน้ำดื่มที่จำหน่ายขนาด 100 และ 250 ml เป็นต้น สำหรับประเทศไทยข้อมูลการปนเปื้อน enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะยังมีอยู่จำกัด และตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค พ.ศ.2552 ยังไม่มีมาตรการควบคุม enterococci ที่ปนเปื้อนในอาหาร

3.2 การดื้อยาปฏิชีวนะและยีนที่ควบคุมการแสดงออกให้เกิดโรคในมนุษย์

การดื้อยาของ enterococci มีด้วยกัน 2 ลักษณะคือ intrinsic resistance หรือการดื้อยาโดยธรรมชาติของตัวเชื้อเอง และ acquired resistance หรือการดื้อยาภายหลังเชื้อสัมผัสยาต้านจุลชีพ ซึ่งการดื้อยาปฏิชีวนะ ของ enterococci ส่วนใหญ่ จัดเป็น acquired resistance ซึ่งพบการดื้อยาได้บ่อย

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อฉวยโอกาสมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อประจำถิ่นในร่างกาย เช่น enterococci ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหาร ซึ่งพบว่าสามารถเป็นแหล่งที่สะสมยีนดื้อยาปฏิชีวนะได้ และยังสามารถส่งต่อยีนดื้อยาผ่านทาง conjugative plasmids และ transposons (Cocconcelli et al., 2003) โดยสาเหตุของการดื้อยาปฏิชีวนะจาก enterococci ในมนุษย์อาจเกิดจากการใช้ยาไม่ถูกต้อง เช่น การรับประทานยาไม่เหมาะสมทั้งในแง่ของ ชนิด ขนาด ระยะเวลา และในอดีตมีการใช้ยาปฏิชีวนะขนาดต่ำๆในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ (antibiotic growth promoter; AGP) ทำให้สัตว์เป็นแหล่งสะสมเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะและเกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาหรือมีการส่งต่อยีนดื้อยาดังกล่าวมายังมนุษย์ได้ การส่งถ่ายดังกล่าวนั้นอาจเกิดได้ทั้งถ่ายยีนดื้อยาระหว่างเชื้อเดียวกันในทางเดินอาหาร และส่งถ่ายไปยังเชื้อกลุ่มอื่นรวมทั้งเชื้อก่อโรคได้

การดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาทางคลินิกหลายชนิด (Multidrug resistance) ของเชื้อแต่ละ species ทำให้เกิดปัญหาต่อการเลือกยาที่จะนำมาใช้ในการรักษาทางคลินิก เพราะจำนวนยาที่จะใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์มีลดลง (Macovei and Zurek., 2006) การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาทางคลินิกจึงมีความสำคัญ

Erythromycin มีกลไกยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยการจับที่ P-site บน 50s ribosome แบบ irreversible ทำให้ ribosome ไม่สามารถ translocation ได้ เป็นการยับยั้งการสร้าง polypeptide ในขบวนการสังเคราะห์โปรตีน Erythromycin ถูกนำมาใช้ในทางคลินิกเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจและโรคซิฟิลิส (ยุพิน ศุพุทธมงคล., 2548) ปัจจุบันพบการดื้อยาปฏิชีวนะ Erythromycin อย่างแพร่หลาย โดยมีกลไกหลัก 3 กลไก ได้แก่

- การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยาที่ 23S rRNA โดยพบว่าการดื้อยาปฏิชีวนะ Erythromycin ของ enterococci มียีนที่ควบคุมการแสดงออกต่อดื้อยาที่พบได้บ่อยคือ *Erm*
- สร้างเอนไซม์ EreA, EreB มาทำลายโครงสร้าง lactone ring ของยา
- ทำให้ยาหมดฤทธิ์โดยเอนไซม์ Phosphotransferase (Sutcliffe et al., 1996)

Ciprofloxacin มีกลไกรบกวน DNA Gyrase (topoisomerase 2) หรือเอนไซม์ที่ทำให้ DNA ถูกยืดขยายออก (uncoil) เป็นผลให้ DNA ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ Ciprofloxacin ถูกนำมาใช้ในทางคลินิกเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ และทางเดินอาหาร (ยุพิน ศุพุทธมงคล., 2548) จากการทดลองของ Lynette Johnston และคณะ พบการดื้อยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin ของเชื้อ enterococci สายพันธุ์ *E.faecium* 28 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนโคโลนีที่ทำการทดลองทั้งหมด (Johnston et al., 2004) ในขณะที่ **Nitrofurantion** ซึ่งออกฤทธิ์ทำลายดีเอ็นเอและถูกนำมาใช้ในรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (ยุพิน ศุพุทธมงคล., 2548) มีรายงานการ ทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus Species* ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์ จากการทดลองของ Joshua Hayes และคณะ โดยพบว่าเชื้อ enterococci สายพันธุ์ *E.faecium* มีการดื้อยา Nitrofurantion มากถึงครึ่งของจำนวนโคโลนีที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด (Heyes et al., 2003) ส่วน **Vancomycin** ที่มีกลไกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ พบรายงานการดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus Species* ในทวีปยุโรปจากการใช้ยา Avoparcin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ (Diarra et al., 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Vancomycin จะเก็บไว้ใช้กับผู้ป่วยติดเชื้อรุนแรงที่ไม่ได้ผลจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะตัวอื่น เช่นรักษาการติดเชื้อจาก methicillin-resistant *S. aureas* (MRSA) (ปัญญาวุธโธ., 2553) ดังนั้น Ciprofloxacin, Nitrofurantoin และ Vancomycin จึงเป็นยาปฏิชีวนะที่น่าสนใจนำมาต่อยอดการศึกษาเรื่องการดื้อยาของเชื้อ enterococci

นอกจากนี้เชื้อ *Enterococcus* สายพันธุ์ *E.faecium* และ *E.faecalis* ยังพบการรายงานถึงยีนที่ควบคุมการแสดงออกให้เกิดโรคในมนุษย์ (Virulence gene) ได้แก่ยีน ***asa1*** (Aggregation substance) เป็นสาเหตุของโรค endocarditis, ยีน ***gelE*** (Gelatinase) เป็นสาเหตุของโรค endocarditic, ยีน ***cylA*** (Cytolycin) เป็นสาเหตุของโรค endocarditis กับ endophthalmitis, ยีน ***esp*** (Enterococcal surface protein) เป็นสาเหตุของโรคในทางเดินปัสสาวะ และยีน ***hyl*** (Hyaluronidase) เป็นสาเหตุของโรค nasopharynx กับ pneumocaccal pneumonia (Vankerckhoven et al., 2004) ซึ่งหากเชื้อ *Enterococcus Species* พบยีนเหล่านี้จะสามารถเพิ่มโอกาสและความรุนแรงในการเกิดโรคของผู้ป่วยได้

3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคสำคัญและใช้อย่างกว้างขวางในงานด้านชีววิทยาโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA replication สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาที่สั้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีขั้นตอนการทำงานน้อย ใช้เวลาสั้น และให้ดีเอ็นเอสายใหม่ปริมาณมาก

PCR ใช้หลักพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR มีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน แต่ละขั้นตอนต้องการสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม ได้แก่

- Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่ออกเป็นสายเดี่ยว ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 92-98°C
- Primer annealing เป็นขั้นตอนที่อุณหภูมิลดลงเพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบเข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ มักใช้อุณหภูมิระหว่าง 37-60 °C อาจต้องมีการทดลองเปลี่ยนแปลงจนได้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ PCR product มากที่สุด
- Extension เป็นขั้นตอนสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์จากปลาย 3’ ของไพรเมอร์โดย thermostable DNA polymerase ใช้อุณหภูมิ 72-75°C โดยอุณหภูมิในขั้นนี้ควรเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของ DNA polymerase ที่ใช้ในปฏิกิริยา เช่น *Taq* DNA polymerase

การทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase คือการนำเอา dNTP ทั้งสี่ชนิดเข้าไปสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ ทำให้เกิดดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสคู่สมดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้งสามขั้นตอนนับเป็นหนึ่งรอบของปฏิกิริยา ผลที่ได้คือมีดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มเป็นสองเท่า เมื่อเกิดปฏิกิริยา PCR หลายๆรอบก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการได้เป็นจำนวนมาก (มณีวรรณ สุขสมทิพย์, 2551)

สารที่ใช้ใน PCR

1. Primers เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ แต่ละ primer ควรมีความยาวประมาณ 20-30 เบสและควรประกอบด้วยเบสทั้งสี่ชนิดจำนวนเท่าๆกัน สำหรับปฏิกิริยา PCR นั้นจะใช้ primer สองชนิดคือ forward primer และ reverse primer (20 μM) ในน้ำ
2. Template DNA คือดีเอ็นเอต้นแบบ หรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยดีเอ็นเอส่วนนี้จะเป็นส่วนย่อยส่วนหนึ่งของชิ้นดีเอ็นเอ หรือเป็น genomic DNA หรือสารตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป็นส่วนประกอบอยู่ โดยต้องนำไปละลายในสารละลาย 10 mM Tris-Cl (pH 7.6) ที่ประกอบด้วย EDTA ความเข้มข้นต่ำๆ (< 0.1 mM)
3. Thermostable DNA Polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์ เอนไซม์มาตรฐานและเหมาะสมใน PCR เกือบทุกชนิดคือ *Taq* DNA Polymerase สกัดจากแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำพุร้อนชื่อ *Thermus aquaticus* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ทำงานดีที่อุณหภูมิ 72^{o}C และควรมีคุณสมบัติ 3’$\rightarrow$5’ proofreading
4. PCR buffer สำหรับควบคุมสภาวะต่างๆให้เหมาะสมต่อปฏิกิริยา PCR เช่น pH, Mg^{2+} , และความเข้มข้นของเกลือชนิดต่างๆ เป็นต้น ค่าความเป็นกรด-ด่างของ buffer ควรมีค่า 8.3 ที่ 25^{o}C
5. Deoxyribonucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ adenine, guanine, cytosine และ thymine ซึ่งใช้เป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
6. $MgCl_2$ เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA Polymerase
7. น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR ควรประกอบด้วยสารต่างๆในความเข้มข้นดังต่อไปนี้

Mg^{2+}	KCl	dNTPs	Primers	DNA Polymerase	Template DNA
1.5 mM	50 mM	200 μM	1 μM	1-5 units	1 pg – 1 μg

Multiplex PCR

Mutiplex PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการหลายๆชิ้นในปฏิกิริยาเดียวกัน การทำ multiplex PCR ต้องใช้ primer หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวเพื่อให้ได้ amplicon ที่มีขนาดต่างๆกันซึ่งจำเพาะต่อลำดับเบสชนิดต่างๆ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งชิ้นในเวลาเดียวกันทำให้ได้รับข้อมูลมากขึ้น ประหยัดทั้งเวลาและสารเคมี การทำ multiplex PCR ต้องมีการทดสอบหา annealing temperature สำหรับ primer แต่ละคู่เพื่อให้สามารถเพิ่มยีนชนิดต่างกันได้ภายในปฏิกิริยาเดียว ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR ควรมีขนาดต่างกันเพื่อทำให้สามารถแยกแถบดีเอ็นเอออกจากกันได้เมื่อดูผลวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองเพื่อหาสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสม เพราะอาจเกิด primer-dimer และ non-specific product อื่นๆที่อาจรบกวนการเพิ่มดีเอ็นเอที่ต้องการ แนวทางการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ multiplex PCR เช่น

1. การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR จำนวนหนึ่งรอบสำหรับ primer แต่ละคู่ โดยเตรียม reaction mixture จำนวน 50 µl สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ประกอบด้วย primer หนึ่งคู่ ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้
   - 100 – 200 ng ของ genomic DNA
   - 0.2 µM ของ primer แต่ละชิ้น
   - 1 X PCR buffer
   - 1.25-2.5 unit ของ *Taq* DNA Polymerase

   ปรับอุณหภูมิและระยะเวลาของขั้นตอน □primer annealing และ □extension จนกระทั่งได้ PCR product จำนวนใกล้เคียงสำหรับ primer ทุกคู่
2. ทำ multiplex PCR โดยใช้ความเข้มข้น primer ทุกคู่เท่ากันก่อน และนำสภาวะที่เหมาะสมซึ่งหาได้จากขั้นที่ 1 มาใช้
3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR โดยปรับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จนได้ PCR product ตามที่ต้องการ
   - ความเข้มข้นของ primer เปลี่ยนแปลงครั้งละ 0.1-0.2 µM
   - อุณหภูมิที่ใช้ในขั้น annealing เปลี่ยนแปลงทีละ $1^{o}C$
   - เวลาของ □extension time เปลี่ยนแปลงทีละ 30 วินาที

   หากยังไม่ได้ PCR product ตามที่ต้องการให้แก้ไขตามตัวอย่างต่อไปนี้
   - เพิ่มความเข้มข้นของ primer, ลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลง, ถ้า PCR product ได้ปริมาณน้อย ให้เพิ่มความเข้มข้นของ primer, ถ้าได้ PCR product มากเกินไป ให้ลดความเข้มข้นของ primer, ถ้า PCR product มีขนาดสั้น ให้ลด extension time, ถ้า PCR product ที่ได้เป็นดีเอ็นเอสายยาว ให้เพิ่ม extension time เป็นต้น

การตรวจสอบผลผลิตจาก PCR

PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบได้โดยวิธี gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอใน agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำ agarose gel ที่ได้ย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ เช่น ethidium bromide ซึ่งโมเลกุลสามารถสอดแทรกเข้าไปในช่องว่างระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอได้ และยังสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลทแล้วจะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ เมื่อนำไปเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) จะทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอที่ได้

บทที่ 4

วิธีการวิจัยโดยละเอียด

4.1 การตรวจสอบการดื้อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion method

เป็นวิธีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยอาศัยการแพร่ของยาจาก Antibiotic disks ในแต่ละครั้งของการทดสอบจะใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อมาตรฐานในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของยาและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนการตรวจสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk diffusion method มีดังนี้

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid, UK)

a) เตรียม MHA จำนวน 300 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปวัดความเป็นกรด-ด่าง ปรับให้ pH อยู่ในช่วง 7.2-7.4

b) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

c) นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ตั้งอุณหภูมิไว้ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง MHA มีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส

d) ปิเปต MHA ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงจานเพาะเชื้อ จะได้จานเพาะเชื้อ MHA หนา 4 มิลลิเมตร

2. การเตรียมเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบ

a) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหาร PCA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

b) ใช้ loop เขี่ยเชื้อ 3-4 โคโลนีใส่ลงในหลอดน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์

c) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.13 เนื่องจากค่าดังกล่าวมีความเข้มข้นของเชื้อเทียบเท่า 0.5 Mcfarland (10^8 cfu/ml)

3. การเตรียม Antibiotic disks

Antibiotic disks ของยา tetracycline ซึ่งมีความเข้มข้น 30 μg (Oxoid, UK) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4. วิธีการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ

a) ใช้ sterile cotton จุ่มลงในเชื้อที่ต้องการทดสอบ กดข้างแก้วหมาดๆ

b) ทำการ swab เชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ MHA จำนวน 3 ระนาบซึ่งห่างกัน 60 องศา

c) วาง Antibiotic discs ลงบนจานเพาะเชื้อ MHA

d) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5. การอ่านผล

ในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบจะเริ่มอ่านผลโดยจะต้องดูผลจากเชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็นเชื้อควบคุม ก่อนว่าได้ผลตรงตามเกณฑ์ที่ CLSI กำหนดหรือไม่ ในการอ่านผลนั้นจะทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของเชื้อที่ทำการทดสอบทั้ง 2 ด้านเพื่อหาค่าเฉลี่ย และนำค่าดังกล่าวไปเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อผลตรงตามเกณฑ์จึงเริ่มอ่านผลของเชื้อที่ทำการทดสอบซึ่งวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเช่นเดียวกัน และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน ปรากฏในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์การประเมินการดื้อยาปฏิชีวนะจากการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion. (CLSI, 2011)

Antibiotic agents	**Zone diameter breakpoints**
Tetracycline	$\leq$ 14 mm
Erythromycin	$\leq$13 mm
Ciprofloxacin	$\leq$ 15 mm
Nitrofurantoin	$\leq$ 14 mm
Vancomycin	$\leq$ 14 mm

4.2 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth microdilution

วิธีนี้ใช้สำหรับหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (Minimum Inhibition Concentration, MIC) ขั้นตอนการทดสอบ ได้แก่

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Cation Supplemented Mueller-Hinton broth (CSMHB) สำหรับทดสอบโดยเตรียม CSMHB ปริมาณ 6 ml และ 9.9 ml ใส่ในหลอดทดลองอย่างละหลอด และเตรียม CSMHB 100 ml ใน flask ปรับให้ pH อยู่ในช่วง 7.2-7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

- การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบทำโดยนำเชื้อมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar เพื่อให้เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ CSMHB 6 ml ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 nm แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.13 ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อเทียบเท่า 0.5 Mcfarland (10^8 CFU/ml) แล้วเจือจางให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 x 10^6 CFU/ml โดยปิเปตต์เชื้อจำนวน 0.1 ml ใส่ใน CSMHB จำนวน 9.9 ml

- เตรียมยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น tetracycline ความเข้มข้น 1,024 µg/ml (ยา tetracycline ที่ใช้ในการทดลอง 1 g มีความแรงเท่ากับ tetracycline 0.976 g) ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดความพรุน 0.2 ไมครอน ได้เป็น stock solution ของยา tetracycline

- เตรียม micro dilution tray (96 well plate) ซึ่งมี 8 แถวในแต่ละแถวมี 12 หลุม ดังนั้นทำการทดลองได้ 8โคโลนีต่อถาด ปิเปตต์ส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

1. ในหลุมที่ 1-9
- ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อ CSMHB ปริมาณ 0.1 ml ลงในหลุมที่ 2-9
- ปิเปตต์ stock solution ของยา tetracycline 1,024 µg/ml 0.1 ml ใส่ลงหลุมที่ 1 และ 2
- ผสมสารละลายในหลุมที่ 2 ให้เข้ากันโดยดูดขึ้น-ลงเบาๆ ประมาณ 6 ครั้ง จากนั้นปิเปตต์สารละลายยาจากหลุมที่ 2 จำนวน 0.1 ml ลงในหลุมที่ 3 ผสมให้เข้ากับ อาหารเลี้ยงเชื้อ CSMHB จนถึงหลุมที่ 9 แล้วดูดสารละลายยาจากหลุมที่ 9 ปริมาณ 0.1 ml ทิ้งไป ดังนั้นความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ tetracycline ตั้งแต่หลุมที่ 1-9 จะเป็นดังนี้คือ 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml และ 2 µg/ml
- ปิเปตต์เชื้อที่มีความเข้มข้น 1 x 10^6 CFU/ml ที่เตรียมไว้ลงในหลุมที่ 1-9 จำนวน 0.1 ml ดังนั้นทุกหลุมมีสารละลายเท่ากับ 0.2 ml และจะมีเชื้อความเข้มข้น 5x 10^5cfu/ml ทุกหลุม

2. ในหลุมที่ 10 ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อ CSMHB 0.1 ml และเชื้อ 0.1 ml ใส่ลงไป

3. ในหลุมที่ 11 ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อ CSMHB 0.1 ml และ stock solution tetracycline 0.1 ml
4. ในหลุมที่ 12 ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อ CSMHB 0.2 ml

จากนั้นนำ micro dilution tray ไปบ่มเพาะเชื้อใน incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง การหาค่า MIC พิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ สังเกตหลุมที่ใสหลุมสุดท้าย หลุมที่ใสแสดงให้ทราบว่าความเข้มข้นของยาในหลุมนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ส่วนหลุมที่มีลักษณะขุ่นคือมีเชื้อเจริญได้ เริ่มดูผลจากเชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็นเชื้อควบคุมซึ่งในการทดลองนี้ใช้ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 เป็นเชื้อมาตรฐานในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของยาและอาหารเลี้ยงเชื้อ การอ่านผลทุกครั้งให้เริ่มอ่านผลจากหลุมควบคุมหลุมที่ 10-12 ก่อน ซึ่งใช้ควบคุมการทดลอง เมื่อได้ผลตรงตามเกณฑ์ที่ CLSI กำหนดสำหรับ MIC testing-acceptable limits (µg/ml) ของยา tetracycline สำหรับเชื้อมาตรฐานนี้คือ 8-32 µg/ml เมื่อผ่านแล้วจึงดูผลของเชื้อที่ทดสอบต่อไป และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3: เกณฑ์การประเมินการดื้อยาปฏิชีวนะจากการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution (CLSI, 2011)

Antimicrobial agent	MIC interpretive standard (µg/ml)		
	susceptible	intermediate	resistance
tetracycline	≤ 4	8	≥ 16
erythromycin	≤ 0.5	1 – 4	≥ 8
ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
nitrofurantoin	≤ 32	64	≥ 128
vancomycin	≤ 4	8 – 16	≥ 32

4.3 การตรวจหายีนดื้อยาปฏิชีวนะ Erythromycin

1. เลือก Primer ให้เหมาะสม

   เนื่องด้วยการดื้อยาของปฏิชีวนะของ Erythromycin มีกลไกการดื้อยาหลายรูปแบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันออกไป โดยในการทดลองนี้สนใจการตรวจหายีน *erm*(B) ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกถึงการดื้อต่อยา Erythromycin ซึ่งพบในเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค

ตารางที่ 4: ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบ *erm*(B) (Sutcliffe,J. et al., 1996)

Genes	Primer	Sequence	Size of PCR product (bp)
erm(B)	*erm*(B) F	5'- GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3'	639
	erm(B) R	5'- AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'	

2. การสกัด genomic DNA โดยใช้วิธี boiling lysis
   - นำเชื้อ enterococci ที่ต้องการตรวจสอบจำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
   - ปิเปตต์เชื้อ *E. faecalis* ที่ผ่านการบ่ม 1.8 ml ใส่ใน microcentrifuge tube
   - นำไปปั่นตกตะกอนที่ ความเร็วรอบ 9000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
   - ดูดสารละลายใสที่อยู่ชั้นบนทิ้ง
   - นำเซลล์ที่ตกตะกอนไปแขวนลอยอีกครั้งใน deionized water ที่ปราศจากเชื้อ 20 µl และ lysozyme (5mg/ml) 30 µl ซึ่งช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ผสมให้เข้ากัน
   - นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที
   - นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 5 นาที
   - นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
   - genomic DNA จะละลายอยู่ในส่วนของสารละลาย เก็บตัวอย่าง DNA ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8ºC

3. การเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการตรวจสอบโดยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

ตารางที่ 5: ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ *erm*(B) (Strommenger,B. et al., 2003)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR	ปริมาณ (µl)
10x PCR buffer	2.5
dNTPs mixed	2
$MgCl_2$	0.75
Taq DNA polymerase	0.125
DNA template	5
Primer *erm*(B) Forward *erm*(B) Reverse	 1.25 [0.5 µM] 1.25 [0.5 µM]
DI water	12.125
Total volume (µl)	25

ตารางที่ 6: สภาวะของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ *erm*(B) (Strommenger,B. et al., 2003)

สภาวะของปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา
1. Initial denaturation	94ºC	3 min
2. Denaturation Annealing Extension Repeat 35 cycles	94ºC 56ºC 72ºC	1 min 1 min 1 min
3. Final extension	72ºC	4min

4. การตรวจสอบ PCR product โดยการทำ gel electrophoresis
   - นำ PCR product 5 µl ผสมกับ loading dye 3 µl
   - ใส่ลงในหลุมของเจล 1% agarose gel
   - ใส่ DNA ladder (Invitrogen®,Brazil) 4 µl เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ DNA
   - ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง ใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้าเท่ากับ 100 V เวลา 60 นาที
   - นำแผ่นเจลไปย้อมสี ethidium bromide ประมาณ 30 วินาที
   - ล้างใน deionized water นาน 3 นาที
   - นำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

4.4 การตรวจหา virulence gene

1. เลือก Primer ให้เหมาะสม

เนื่องด้วยความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ ถูกควบคุมด้วยลักษณทางพันธุกรรมได้หลายแบบ แต่จากการศึกษาพบว่าเชื้อ enterococcus ที่มักก่อโรค มักมียีนที่ทำให้เกิดความสามารถในการก่อโรค หรือควบคุมความรุนแรงของโรคดังนี้ *sagA* (secreted antigen), *ace* (collagen binding cell wall protein), *hyl* (hyaluronidase), *esp* (enterococcal surface protein) และ *gelE* (gelatinase) ซึ่งแต่ละยีนรูปแบบมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะตรวจสอบยีนเหล่านี้จากเชื้อ *E.faecalis* ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย โดยมีลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบ virulence gene ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7: ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบ virulence gene (Vankerckhoven et., 2004)

คู่ที่	Primer	Sequence 5' to 3'	Size of PCR product (bp)
1	*asa1* F	GCACGCTATTACGAACTATGA	375
	asa1 R	TAAGAAAGAACATCACCACGA	
2	*gelE* F	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	213
	gelE R	AGATGCACCCGAAATAATATA	
3	*cylA* F	ACTCGGGGATTGATAGGC	688
	cylA R	GCTGCTAAAGCTGCGCTT	
4	*esp* F	AGATTTCATCTTTGATTCTTGG	510
	esp R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG	
5	*hyl* F	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276
	hyl R	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	

2. การสกัด genomic DNA โดยใช้วิธี boiling lysis
   - นำเชื้อ enterococci ที่ต้องการตรวจสอบจำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
   - ปิเปตต์เชื้อ *E. faecalis* ที่ผ่านการบ่ม 1.8 ml ใส่ใน microcentrifuge tube
   - นำไปปั่นตกตะกอนที่ ความเร็วรอบ 9000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
   - ดูดสารละลายใสที่อยู่ชั้นบนทิ้ง
   - นำเซลล์ที่ตกตะกอนไปแขวนลอยอีกครั้งใน deionized water ที่ปราศจากเชื้อ 20 µl และ lysozyme (5mg/ml) 30 µl ซึ่งช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ผสมให้เข้ากัน

- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที
- นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 5 นาที
- นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- genomic DNA จะละลายอยู่ในส่วนของสารละลาย เก็บตัวอย่าง DNA ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8ºC

3. การเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการตรวจสอบด้วยวิธี Multiplex Polymerase Chain Reaction การเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี Multiplex PCR มีส่วนประกอบของปฏิกริยา และสภาวะของปฏิกริยาดังตารางที่ 8 และตารางที่ 9

ตารางที่ 8: ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Multiplex PCR ในการตรวจสอบ virulence gene

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR	ปริมาณ (µl)
10x PCR buffer	2.5
dNTPs mixed	200 µM
$MgCl_2$	1.5 mM
Taq DNA polymerase	2.5 U
DNA template	5
Primer *asa*, *gelE*, *hyl* *cylA*, *esp*	 0.1 µM 0.2 µM
DI water	qs 50
Total volume (µl)	50

ตารางที่ 9: สภาวะของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ virulence gene (Vankerckhoven et., 2004)

สภาวะของปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา
1. Initial denaturation	95ºC	15 min
2. Denaturation	94ºC	1min
Annealing	55ºC	1 min
Extension	72ºC	1 min
Repeat 30 cycles		
3. Final extension	72ºC	10 min

4. การตรวจสอบ PCR product โดยการทำ gel electrophoresis

- นำ PCR product 25 µl ผสมกับ loading dye(50% glycerol, 0.8 mg bromophenol blue per ml) 3 µl
- ใส่ลงในหลุมของเจล 1% agarose gel
- ใส่ DNA ladder (Invitrogen®,Brazil) 4 µl เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ DNA
- ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง ใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้าเท่ากับ 100 V เวลา 60 นาที
- นำแผ่นเจลไปย้อมสี ethidium bromide ประมาณ 30 วินาที
- ล้างใน deionized water นาน 3 นาที
- นำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

บทที่ 5
ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

5.1 ผลการทดสอบหาความไวต่อยาปฏิชีวนะ Erytromycin , Ciprofloxacin , Nitrofurantoin และ Vancomycin ของโคโลนี *Enterococcus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร

นำโคโลนี enterococci ที่ผ่านการทดสอบทางชีวเคมีว่าเป็นสาย*พันธุ์ E. faecalis E. faecium* มาทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดอื่น โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ และการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

5.1.1 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี disk diffusion

ทำการบันทึกค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น(Zone diameter breakpoints, nearest whole) ในหน่วย มิลลิเมตร อ้างอิงตามเกณฑ์สำหรับใช้ประเมินการดื้อยา จากการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion (CLSI, 2011) โดย

เชื้อที่ดื้อยา tetracycline จะมีค่าดังกล่าว $\leq$ 14 mm
เชื้อที่ดื้อยา erythromycin จะมีค่าดังกล่าว $\leq$ 13 mm
เชื้อที่ดื้อยา ciprofloxacin จะมีค่าดังกล่าว $\leq$ 15 mm
เชื้อที่ดื้อยา nitrofurantoin จะมีค่าดังกล่าว $\leq$ 14 mm
เชื้อที่ดื้อยา vancomycin จะมีค่าดังกล่าว $\leq$ 14 mm

5.1.2 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth microdilution

นำเชื้อ enterococci จำนวน 120 โคโลนี มาหาทดสอบหาค่า MIC ที่มีต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดโดยวิธี broth microdilution ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8

การอ่านผลเริ่มอ่านผลจากหลุมควบคุมหลุมที่ 10-12 ก่อน การทดลองควรมีผลดังนี้ หลุมที่ 11 ควรขุ่น เพราะไม่มีการใส่ยาปฏิชีวนะ เป็นหลุมที่มีการเจริญของเชื้อในอาหาร ส่วนหลุมที่ 10 และ 12 เป็นการพิจารณาความปราศจากเชื้อของอาหารและ stock solution ตามลำดับหากขุ่นขาว แสดงถึงการเกิดการปนเปื้อนของเชื้อทำให้ไม่สามารถพิจารณาผลการทดสอบในครั้งนั้นได้

การหาค่า MIC คือการพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ สังเกตหลุมที่ใสหลุมสุดท้าย หลุมที่ใสแสดงให้ทราบว่าความเข้มข้นของยาในหลุมนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ส่วนหลุมที่มีลักษณะขุ่นขาวคือมีการเจริญของเชื้อ โดยเกณฑ์การประเมินการดื้อยา tetracycline (CLSI, 2011) โดยวิธี broth microdilution คือหากมีค่า $\geq$ 16 µg/ml จัดว่าดื้อยาปฏิชีว

tetracycline, หากมีค่า ≥ 8 µg/ml จัดว่าดื้อยาปฏิชีวนะ erythromycin, หากมีค่า ≥ 4 µg/ml จัดว่าดื้อยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin, หากมีค่า ≥ 128 µg/ml จัดว่าดื้อยาปฏิชีวนะ nitrofurantoin และหากมีค่า ≥ 32 µg/ml จัดว่าดื้อยาปฏิชีวนะ vancomycin

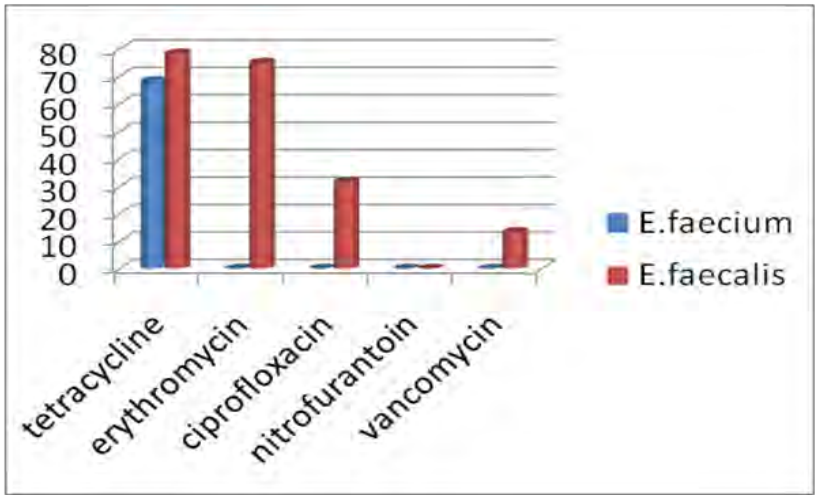
ตารางที่ 10: จำนวน enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด จำแนกตามชนิดของอาหาร

ชนิดอาหาร	สายพันธุ์	จำนวนโคโลนีที่ดื้อยาปฏิชีวนะ/จำนวนที่นำมาทดสอบ (% ที่ดื้อยา)					
		tetracycline	**erythromycin**	**ciprofloxacin**	**nitrofurantoin**	**vancomycin**	**tetracycline-erythromycin-ciprofloxacin**
แหนมหมู	*E. faecium*	11/15 (73.33%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
	E. faecalis	23/30 (76.66%)	30/30 (100%)	8/30 (26.67%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	8/30 (26.67%)
	Total	34/45 (75.55%)	30/45 (66.67%)	8/45 (17.78%)	0/45 (0%)	0/45 (0%)	8/45 (17.78%)
ปลาส้ม	*E. faecium*	10/15 (66.67%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
	E. faecalis	24/30 (80%)	15/30 (50%)	11/30 (36.67%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)
	Total	34/45 (75.55%)	15/45 (33.33%)	11/45 (24.44%)	0/45 (0%)	0/45 (0%)	0/45 (0%)
ปลาร้า	*E. faecium*	11/15 (73.33%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
	E. faecalis	-	-	-	-	-	-
	Total	11/15 (73.33%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
กุ้งจ่อม	*E. faecium*	9/15 (60%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
	E. faecalis	-	-	-	-	-	-
	Total	9/15 (60%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

ตารางที่ 11: จำนวน enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด จำแนกตามชนิดของเชื้อ

% Resistance / Antibiotic	*E. faecium*	*E. faecalis*
Tetracycline	68.33%	78.33%
Erythromycin	0%	70%
Ciprofloxacin	0%	31.67%
Nitrofurantoin	0%	0%
Vancomycin	0%	0%
Tetracycline-Erythromycin-Ciprofloxacin	0%	13.33%

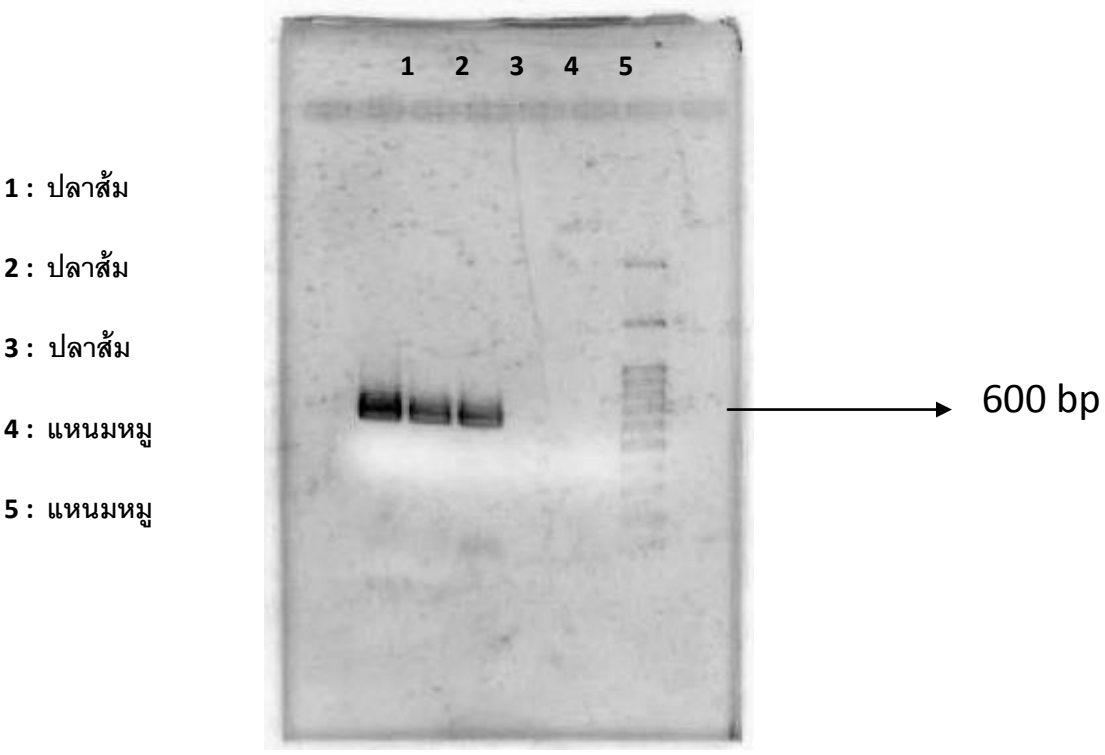
ภาพที่ 1 : แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบการดื้อยาปฏิชีวนะระหว่างเชื้อ *E. faecalis* กับ *E. faecium*



จากผลการทดสอบหาความไวต่อยาปฏิชีวนะ Erythromycin , Ciprofloxacin , Nitrofurantoin และ Vancomycin ของโคโลนี Enterococcus spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร พบการดื้อยาปฏิชีวนะ tetracycline มากที่สุด ทั้งสายพันธุ์ E. faecalis และ E. faecium คิดเป็นร้อยละ78.33% และ68.33% ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ที่ดื้อส่วนใหญ่แยกได้จากปลาส้ม ส่วนยาปฏิชีวนะ erythromycin และ ciprofloxacin ตรวจพบการดื้อยาเฉพาะ E. faecalis คิดเป็น 75% และ 31.67% ตามลำดับ ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ nitrofurantoin กับ vancomycin ไม่ตรวจพบการดื้อยา นอกจากนั้นยังตรวจพบโคลนที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในเชื้อ E. faecalis ที่แยกได้จากแหนมหมู

5.2 ผลการตรวจหายีนดื้อยาปฏิชีวนะ Erytromycin

เมื่อทดสอบสภาวะของ PCR ในการตรวจหา *ermB* โดยเทคนิค single PCR ใช้สภาวะของ PCR ตามตารางที่ 4 พบว่าส่วนผสมและสภาวะของ PCR ดังกล่าวสามารถใช้ตรวจสอบ PCR product ของ *ermB* ได้ชัดเจน ดังรูปที่ 2



ภาพที่ 2: แสดงผลการ run gel electrophoresis ในการหายีน *erm*(B)

จากการทดลองหายีน *erm*B ของเชื้อ *E. faecalis* โคโลนีที่ดื้อยาปฏิชีวนะ Erythromycin จากตัวอย่างอาหารหมักได้ผลดังตารางที่ 12

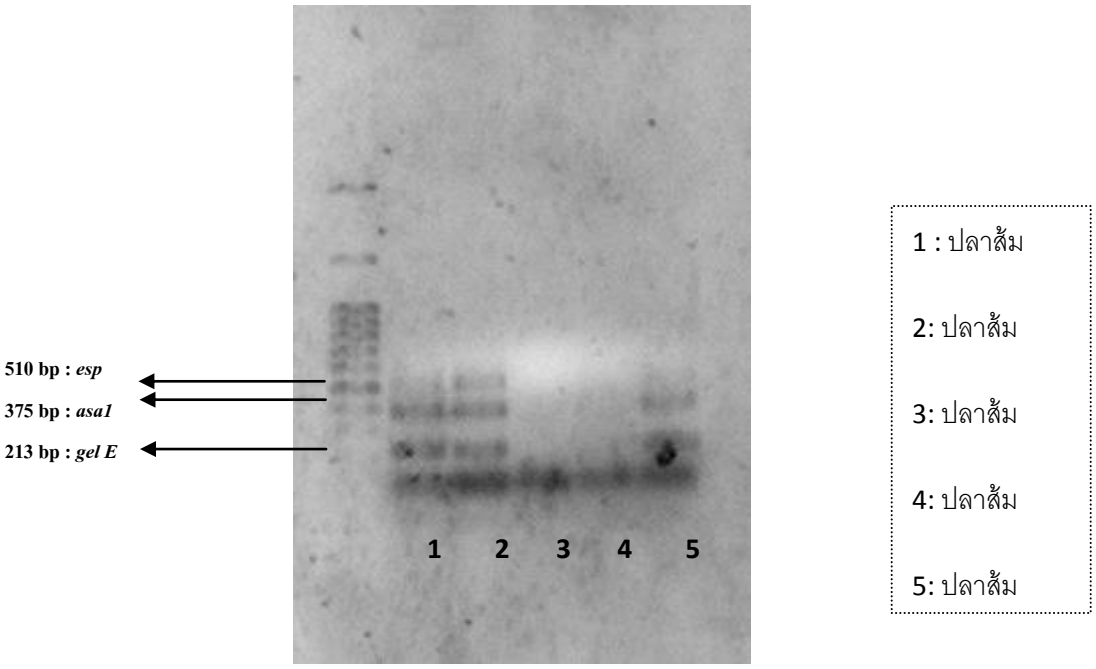
ตารางที่ 12: แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* ที่ตรวจพบยีน *erm*(B)

Origin	Total number	% of isolates
Fermented pork (แหนมหมู)	20	4(20%)
Fermented fish (ปลาส้ม)	10	7(70%)

จากการทดลองการตรวจหายีนดื้อยาปฏิชีวนะ Erythromycin ซึ่งเป็นยีน *ermB* โดยใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน พบว่าเชื้อ *E. faecalis* จากตัวอย่างอาหารหมัก คือแหนมหมูและปลาส้ม โคโลนีที่มีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) สูงกว่าค่าปกติ คือมีค่า ค่า $\geq$ 8 μg/ml ผลการทดลองพบว่าตรวจพบยีน *ermB* ได้จำนวน 11 โคโลนี จากเชื้อที่ได้จากตัวอย่างอาหารทั้งสิ้น 30 โคโลนี แบ่งเป็นพบยีน *ermB* ในแหนมหมู 4 โคโลนี จากทั้งหมด 20 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 20และพบยีน *ermB* ในปลาส้ม จำนวน 7 โคโลนี จากทั้งหมด 10 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 70 แสดงว่าอาหารหมักพื้นบ้านของไทยมีโอกาสเสี่ยงที่จะถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มียีนที่ดื้อยา Erythomycin โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *E. faecalis* ในอาหารหมักปลาส้ม ที่มีการตรวจพบยีน *ermB* ได้มากกว่าในอาหารหมักแหนมหมู ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะต่อไปได้

5.3 ผลการตรวจหายีนก่อโรคในเชื้อ Enterococcus

เมื่อทดสอบสภาวะของ PCR ในการตรวจหายีนก่อโรคโดยเทคนิค multiplex PCR ใช้สภาวะของ PCR ตามตารางที่ 7 พบว่าส่วนผสมและสภาวะของ PCR ดังกล่าวสามารถใช้ตรวจสอบ PCR product ของ ยีนก่อโรคได้ชัดเจนได้ชัดเจน ดังรูปที่ 3



ภาพที่ 3: แสดงผลการตรวจหาการตรวจหายีนก่อโรคโดยวิธี gel electrophoresis

จากการทดลองหายีน ของเชื้อ *E. faecalis* โคโลนีที่ดื้อยาปฏิชีวนะ Erythromycin จากตัวอย่างอาหารหมักได้ผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13: แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* ที่ตรวจพบยีนก่อโรค

Fermented food	***asa1***	***gelE***	***cylA***	***esp***	***Hyl***
แหนมหมู	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
ปลาส้ม	3/5 (60%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	0/5 (0%)
Total	**3/10 (30%)**	**6/10 (60%)**	**0/10 (0%)**	**3/10 (60%)**	**0/10(10%)**

จากผลการทดลองที่พบการปนเปื้อน enterococci สายพันธุ์ E. *feacalis* และ E. *feacium* ในอาหารปลาหมักพื้นบ้านพร้อมบริโภคบางชนิด ได้แก่ แหนมหมู ปลาส้ม ปลาร้า และกุ้มจ่อม การปนเปื้อนดังกล่าวอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้เพราะตรวจพบยีนก่อโรคและเป็นเชื้อที่พบการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาทางคลินิก ทั้งยาปฏิชีวนะ Tetracycline, Erytromycin และ Ciprofloxacin ดังนั้นในการบริโภคอาหารประเภทดังกล่าวควรปรุงให้สุกก่อนเพื่อป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อและการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา โดยเฉพาะ enterococci ที่มีคุณสมบัติเป็นแหล่งสะสมของยีนดื้อยาและสามารถส่งต่อยีนดื้อยาไปยังเชื้ออื่นได้ นอกจากนั้นแล้วปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายควบคุมการปนเปื้อน enterococci ในอาหารดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้อาจเป็นประโยชน์ในการออกมาตรการควบคุมการปนเปื้อน enterococci ในอาหารโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคในคนได้

เอกสารอ้างอิง

1) Cocconcelli, P.S., Cattivelli, D., Gazzola, S. 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. International Journal of Food Microbiology 88: 315– 323.

2) Coque, T. 2008. Evolutionary biology of pathogenic enterococci. Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens. 501–521.

3) Diarra M., Rempel H., Champagne J., Masson L., Pritchard J. and Topp E., 2010. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. And characterization of isolates from broiler chickens. Applied and environmental microbiology. 76: 8033-8043.

4) Fisher K., Phillips C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology, 155:1749-1757.

5) Hancock E., Gilmore M., 2006. Pathogenicity of enterococci. Gram-positive pathogens. 2:299 –311.

6) Heyes J., English L., Carter P., Proescholdt T., Lee K., Wagner D and White D., 2003. Plevalence and antimicrobial resistance *Enterococcus* species isolated from retail meats. Applied and environmental microbiology. 69: 7153-7160.

7) Johnston L., Jaykus L. 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spices isolated from produce. Applied and environmental microbiology. 70: 3133-3137.

8) Klibi K., Slama B., Saenz Y., Masmoudi A., Zanetti S., Sechi L., Boudabous A., and Torres C., 2007. Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. Microbiol. 53:372–379.

9) Lynn H., Michael G., 2006. Pathogenicity of Enterococci. Gram-Positive Pathogens. 2:299-311.

10) Macovei, L., Zurek, L. 2006. Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings. Applied and environmental microbiology. 72: 4028–4035.

11) Murray R., Rosenthal S., Pfaller A., 2009. Enterococcus and other Gram-positive cocci. Medical Microbiology. 6:243–246.

12) Palmer L., Kos N., Gilmore S., 2010. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol. 13:632-639.

13) Ray J., Pultz J., Bhalla A., Aron C., Donskey J., 2003. Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and Staphylococcus aureus in the intestinal tracts of hospitalized patients. Clin Infection. 37:875-881.

14) Sutcliffe J., Grebe T., Tait-Kamradt A., Wondrack L. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrobial agents and chemotherapy. 40: 2562-2566.

15) Tanasupawat S., Komagata K., 1995. Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11:253-256.

16) Vankerckhoven V., Autgaeerden T., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., Jabes D. and Goossens H., 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in Enterococci and survey for virulence Determinants among European hospital Isoletes of *Enterococcus faecium*. Jouenal of clinical microbiology. 42: 4473-4479.

17) Vu J., Carvalho J., 2011. Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. Frontiers in Biology, 6:357-366.

18) นลินี อัศวโภคี และ วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. การประชุมวิชาการ 120 ปี ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล 18 มีนาคม พ.ศ.2551 “บันทึกการบรรยายพิเศษเรื่อง new therapeutic options for resistant gram-positive infections.”. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.medicthai.com/picture/news/111505Pfizer2%20.pdf

19) บราลี ปัญญาวุธโธ., 2553. การตรวจติดตามระดับยาในกลุ่ม aminoglycosides และ vancomycin. Pharmacotherapy in infectious diseases. 2:105-107.

20) มณีวรรณ สุขสมทิพย์. 2551. เทคนิค PCR. ใน คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, บรรณาธิการ. ปฏิบัติการชีวเคมี.

21) ยุพิน ศุพุทธมงคล. ตาราโรคติดเชื้อ สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย. กรุงเทพ : โฮลิสติกการพิมพ์,2548