อุบัติการและพันธุกรรมของเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน จากไก่ คนเลี้ยงไก่ และผู้ป่วย

นายวิโรจน์ คงเกลี้ยง

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-03-0047-2

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14 ก.ค. 2547

INCIDENCE AND GENOTYPE OF VANCOMYCIN RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATE FROM CHICKEN, CHICKEN RAISERS AND PATIENTS

Mr. Wirot Kongkleing

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic year 2000

ISBN 947-03-0047-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อุบัติการและพันธุกรรมของเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินที่แยกได้จากไก่ คนเลี้ยงไก่ และผู้ป่วย
โดย	นายวิโรจน์ คงเกลี้ยง
สาขาวิชา	สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์นายแพทย์อนันต์ จงเถลิง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงสมใจ เหรียญประยูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์นายแพทย์อนันต์ จงเถลิง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์เชิดศักดิ์ ธีรบุตร)

วิโรจน์ คงเกลี้ยง : อุบัติการและพันธุกรรมของเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินจากไก่ คนเลี้ยงไก่ และผู้ป่วย (INCIDENCE AND GENOTYPE OF VANCOMYCIN RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATE FROM CHICKEN, CHICKEN RAISERS AND PATIENTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์นายแพทย์อนันต์ จงเถลิง, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์ 81 หน้า ISBN 974-03-0047-2

เอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน (VRE) จำนวน 11 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากอุจจาระไก่จำนวน 1,200 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.91 ประกอบด้วย *E. faecium* 5 ตัวอย่าง (0.41%), *E. faecalis* 5 ตัวอย่าง (0.41%) และ *E. duran* 1 ตัวอย่าง (0.09%) มีลักษณะ phenotype แบบ A และ Van B ไม่พบ VRE จากคนเลี้ยงไก่ พบ VRE 15 ตัวอย่างจากเอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 1,854 รายที่เก็บไว้ระหว่าง พ.ศ.2538-2542 คิดเป็นร้อยละ 0.81 ประกอบด้วย *E. faecium* 14 ตัวอย่าง (0.75 %) และ *E. faecalis* 1 ตัวอย่าง (0.05%) ทั้งหมดมี phenotype แบบ Van B

ผลการศึกษาลักษณะพันธุกรรมด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis อาศัยเอ็นไซม์ *SmaI* พบลักษณะแตกต่างกัน 17 แบบ ประกอบด้วย A1,A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, D, E1, E2, E3, E4, F1 และ F2 พบ VRE ที่แยกได้จากผู้ป่วย 1 ราย มีลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กันกับ VRE ที่แยกได้จากอุจจาระไก่ จึงมีความเป็นไปได้ที่ VRE ในอุจจาระไก่อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด VRE ในผู้ป่วยบางราย

สหสาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

##4075247230. : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: ENTEROCOCCI / RESISTANT / VANCOMYCIN / GENOTYPE / PATIENTS

WIROT KONGKLEING : INCIDENCE AND GENOTYPE OF VANCOMYCIN RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATE FROM CHICKEN, CHICKEN RAISERS AND PATIENTS. THESIS ADVISOR : ANAN CHONGTHALEONG, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSIST.PROF. PONGPAN NUNTHAPISUD, M.Sc. 81 pp.
ISBN 974-03-0047-2

Eleven isolates (0.91%) of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) were isolated from 1,200 samples of chicken feces, There are five *E. faecium* (0.41%), five *E. faecalis* (0.41%) and one *E.duran* (0.09%) with Van A and Van B phenotypes. No VRE was isolated from chicken raisers. Fifteen clinical isolates of VRE were isolated from 1,854 enterococci (0.81%), which were collected at Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University during 1995 – 1999. There are composing of fourteen *E. faecium* (0.75%) and one *E. faecalis* (0.05%). All of it exhibit Van B phenotype.

Genotypes of these VRE isolates were compared using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) methods using enzyme *sma*I. Seventeen pulsotype patterns (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, D, E1, E2, E3, E4, F1 and F2) were found. One VRE isolate from patient was classified in the same major pulsotype with those from the chicken feces. It is possible for the VRE from patient has some relationship to VRE from chicken feces.

Inter-Department	Medical Microbiology	Student's signature.....
Field of study	Medical Microbiology	Advisor's signature.....
Academic year	2000	Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดีจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ และขอบคุณทุกท่านผู้มีรายนามดังต่อไปนี้

อาจารย์นายแพทย์อนันต์ จงเถลิง หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ และอนุญาตให้ใช้สถานที่และเครื่องมือในการวิจัย

รองศาสตราจารย์ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์ ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำและ เสนอแนวทางในการวิจัยเป็นอย่างดียิ่ง

รองศาสตราจารย์สมใจ เหรียญประยูร ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์เชิดศักดิ์ ธีรบุตร ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินดามพร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดในระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนอนุญาตให้ใช้เครื่องมือในการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง ธัมวาสร ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้สถานที่และตลอดจนสารเคมีในการวิจัยในครั้งนี้

ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนยกเว้นการเล่าเรียนและให้ทุนผู้ช่วยสอนในระหว่างการศึกษาและทำการวิจัยตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญตาราง		ฌ
สารบัญภาพ		ญ
คำอธิบายคำย่อ		ฏ
บทที่		
1.	บทนำ	1
	วัตถุประสงค์	3
2.	การสำรวจเอกสาร	
	ประวัติลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ	4
	การพิสูจน์เชื้อ	4
	พยาธิสภาพการก่อโรค	5
	ปัจจัยการก่อโรค อาการทางคลีนิค	7
	การรักษาและวิธีการตรวจสอบความไวรับของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ	8
	คุณสมบัติและโครงสร้างของยาในกลุ่ม glycopeptide	11
	กลการทำงานของยาในกลุ่ม glycopeptide	12
	การจำแนกสายพันธ์	22
	ปัจจัยส่งเสริมในการกระจายของแบคทีเรียดื้อยา	32
	Gycopeptide ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่	32
	ระบาดวิทยาของเชื้อ VRE	33
	ข้อกำหนดการใช้สารเร่งการเจริญเติบโตในประเทศไทย	34
3.	วัสดุและวิธีการ	
	เชื้อที่ในการศึกษา	36
	วิธีการ	36
	การทดสอบทาง pulsed filed gel electrophoresis	38

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4. ผลการทดลอง

ผลการตรวจหาเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน..... 42

ผลการทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ..... 42

ผลทางการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม(genotype)โดยเทคนิค .....

pulsed field gel electrophoresis..... 43

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 57

รายการอ้างอิง..... 60

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก..... 69

ภาคผนวก ข..... 77

ภาคผนวก ค..... 80

ประวัติผู้เขียน..... 81

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่1. Proposal of species to be included in the genus enterococcus..... 7

ตารางที่2. Identification of enterococcus species..... 9

ตารางที่3. Difinite and potential virulence factors for enterococci..... 10

ตารางที่4. Comparative in vitro activity of glycopeptides againt some common..... pathogenicbacteria 17

ตารางที่5. Glycopeptide resistant enterococci

ตารางที่6. คุณสมบัติของ phenotypic typing.....22

ตารางที่7. คุณสมบัติของ genotypic typing..... 25

ตารางที่8. Criteria for interpreting PFGE pattern..... 31

ตารางที่9. ตัวอย่างเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสจากผู้ป่วย 15 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบตั้งแต่ปี 2538 – 2542.....45

ตารางที่10. ตัวอย่างเชื้ออุจจาระไก่จำนวน 11 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบจากฟาร์ม.....46

ตารางที่11. คุณลักษณะทางชีวเคมีเพื่อทดสอบยืนยัน genus enterococci จากตัวอย่างอุจจาระไก่....47

ตารางที่12. เชื้อ enterococcus ที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินที่แยกได้ไก่ จำนวน11ตัวอย่าง จากทั้งสิ้น 1,200 ตัวอย่าง..... 48

ตารางที่13. เชื้อ entrococcus ที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน15 ตัวอย่างจากจำนวนทั้งสิ้น 1,854 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ0.80.....49

ตารางที่14. เปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวน band ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ที่จำเพาะของเชื้อ VRE จากไก่.....50

ตารางที่15. เปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวน band ของเชื้อ VRE จากผู้ป่วย..... 51

ตารางที่16. ลักษณะ pulsotype ของเชื้อ VRE จากไก่และผู้ป่วย..... 52

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

ภาพที่1.โครงสร้างของยาในกลุ่ม glycopeptide.....16

ภาพที่2.โครงสร้างของยา teicoplanin.....19

ภาพที่3.กลไกการยับยั้งและดื้อยาของยาแวนโคมัยซินต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก.....20

ภาพที่4.คุณลักษณะของ transposon element Tn1546..... 21

ภาพที่5.ผลการทดลองโดยใช้เอ็นไซน์ *Sma*I ตัด whole chromosomeของเชื้อ VRE จากไก่.....53

ภาพที่6. ผลการทดลองโดยใช้เอ็นไซน์ *Sma*I ตัด whole chromosomeของเชื้อ VRE จากผู้ป่วย.....54

ภาพที่7. รูปแบบ pulsotype ของเชื้อ enterococus ในไก่.....55

ภาพที่8. รูปแบบ pulsotype ของเชื้อ enterococus ในผู้ป่วย.....56

คำอธิบายคำย่อ

ชม	=ชั่วโมง
มล	=มิลลิเมตร
มม	=มิลลิลิตร
β	=beta
∝	=alpha
γ	=gramma
NaCl	=Sodium chloride
MRSA	=Methicillin Resistant *Staphyococcus aurues*
ug	=ไมโครกรัม
Kb	=กิโลเบส
kDa	=กิโลดาตัน
MIC	=Minimal Inhibitory Concentration
bp	=base pair
rpm	=round per minute
mM	=มิลิโมล
UV	=Ultraviolet
MW	=Molecular weight