



ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *Escherichia coli* ที่แยกได้จาก  
เด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์  
Characteristics of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from  
Children with Cancer in Songklanagarind Hospital

กฤติกา ดำมณี  
Krittika Dummunee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Microbiology  
Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเด็กที่เป็น  
 มะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ผู้เขียน              นางสาวกฤติกา คำมูณี

สาขาวิชา            จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
 (ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

.....ประธานกรรมการ  
 (ดร.ธนัชฐา ฉัตรสุวรรณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ  
 (ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

.....  
 (ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....กรรมการ  
 (ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....  
 (รองศาสตราจารย์ พญ.กมลวิช เล่าประสพวัฒนา)

.....กรรมการ  
 (รองศาสตราจารย์ พญ.กมลวิช เล่าประสพวัฒนา)

.....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ.ศรัญญู ชูศรี)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)  
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวกฤติกา ดำมณี)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....  
(นางสาวกฤติกา คำมณี)  
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
ผู้เขียน	นางสาวกฤติกา ดำมณี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2557

### บทคัดย่อ

มีการรายงานพบ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) และดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ในโรงพยาบาลหลายแห่งทั่วโลก อย่างไรก็ตามในประเทศไทยข้อมูลเหล่านี้ยังจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ การศึกษาค้นคว้านี้ได้ศึกษาในผู้ป่วยเด็กมะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยผู้ป่วยจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ไม่ได้รับยาและกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin ซึ่งแยกเชื้อ *E. coli* ได้ 100 และ 149 ไอโซเลท ตามลำดับ การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone (ดื้อยา ciprofloxacin) พบมากที่สุดทั้งในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าการได้รับยา ciprofloxacin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อต่อยา ciprofloxacin ได้ อย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาการสร้าง class A beta-lactamases (ESBLs) และ class C beta-lactamases (AmpC) พบว่า *E. coli* 15.0% และ 1.0% ที่แยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs และ AmpC ได้ตามลำดับ และ *E. coli* 13.4% และ 1.3% ที่แยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin สร้างเอนไซม์ ESBLs และ AmpC ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการได้รับยา ciprofloxacin ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ ESBLs ผลการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าพบยีน *bla*<sub>CTX-M</sub> มากที่สุด โดยเฉพาะ *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ผลการศึกษายีนบนพลาสมิดที่ทำให้ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ได้แก่ยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และ *qepA* แสดงให้เห็นว่าพบรูปแบบ *qnrA* + *qnrS* มากที่สุด การศึกษาดำแหน่งของยีน *qnrA* และ ยีน *bla*<sub>CTX-M</sub> พบว่าทั้ง 2 ยีนอยู่บนพลาสมิดซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่เชื้ออื่นๆ และจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) และ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่าเทคนิค PFGE มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี ERIC-PCR เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค PFGE สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็น clone เดียวกัน

**คำสำคัญ:** *Escherichia coli*, ESBLs, ผู้ป่วยเด็ก, leukemia, lymphoma, ciprofloxacin

**Thesis Title** Characteristics of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from children with cancer in Songklanagarind hospital

**Author** Miss Krittika Dummunee

**Major Program** Microbiology

**Academic Year** 2014

## ABSTRACT

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* has been reported in many hospitals worldwide. However, this information in Thailand is still limited especially in immunocompromised hosts with neutropenia. In this study, *E. coli* isolated from pediatric patients with leukemia and lymphoma in Songklanagarind hospital was investigated. These patients were divided into 2 groups, the not receiving ciprofloxacin group and the receiving ciprofloxacin group. One hundred and 149 isolates were obtained from the not receiving ciprofloxacin group and the receiving ciprofloxacin group respectively. Antibiotic susceptibility tests revealed that *E. coli* was resistant to fluorquinolone (ciprofloxacin resistance), mostly detected in both groups. Moreover, the results indicated that receiving ciprofloxacin significantly induced the ciprofloxacin resistance in *E. coli*. The results of class A beta-lactamases (ESBLs) and class C beta-lactamase (AmpC) revealed that 15.0% and 1.0% of *E. coli* isolated from the not receiving ciprofloxacin group produced ESBLs and AmpC respectively. Thirteen point four percent and 1.3% of *E. coli* obtained from the receiving ciprofloxacin group produced ESBLs and AmpC respectively. In addition, this study indicated that receiving ciprofloxacin did not increase the number of ESBL-producing *E. coli*. The study of ESBL genes in *E. coli* isolated from both groups displayed that most ESBL-producing isolates harbored *bla*<sub>CTX-M</sub>, especially *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes including *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qepA* were investigated in ciprofloxacin resistant strains. The data showed that most strains carried the combination of *qnrA* and *qnrS*. Both *qnrA* and *bla*<sub>CTX-M</sub> were located on plasmids which can be horizontal transferred to other species. DNA fingerprint analysis revealed that pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was more effective than enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) because it provided the clearer DNA patterns.

**Keywords:** *Escherichia coli*, ESBLs, pediatric patients, leukemia, lymphoma, ciprofloxacin

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล และรองศาสตราจารย์ พญ.กมลวิข เล่าประสพวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้และความช่วยเหลือ ตลอดทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ.ศรัณยู ชูศรี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัย และขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเป็นผู้ช่วยนักวิจัย (Research Assistant) และทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอน (Teaching Assistant)

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ของภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการแก้ปัญหาต่างๆ รวมถึงเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกเกี่ยวกับวัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณวณันสนันท์ ธัญญาพาณิชย์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่คอยให้คำแนะนำและคำปรึกษาเกี่ยวกับรายละเอียดต่างๆของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการศึกษา ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อกมล - คุณแม่ชวนชื่น ดำมณี และทุกๆคนในครอบครัวที่คอยอุปการะ ให้ความช่วยเหลือ และคอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

กฤติกา ดำมณี



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(5)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(8)
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(12)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(13)
สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน	(14)
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
ทฤษฎีและหลักการ	3
<i>Escherichia coli</i>	3
ยาในกลุ่ม beta-lactams	7
ยาในกลุ่ม fluoroquinolone	9
การกระจายของเชื้อดื้อยา	11
วัตถุประสงค์	12
ผลการทดลอง	13
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	24
สรุปผลการทดลอง	28
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก	37
ประวัติผู้เขียน	79

## รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>E. coli</i>	5
ตารางที่ 2	แสดงจำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	13
ตารางที่ 3	การดื้อยาของเชื้อ <i>E. coli</i>	15
ตารางที่ 4	ค่า MICs ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime ของเชื้อ <i>E. coli</i>	16
ตารางที่ 5	กลุ่มของเอนไซม์ beta-lactamases ที่ตรวจพบในเชื้อ <i>E. coli</i>	17
ตารางที่ 6	แสดง subtype ของ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs	18
ตารางที่ 7	Fluoroquinolone resistance genes ที่ตรวจพบในเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ดื้อยา ciprofloxacin	20
ตารางที่ 8	คุณลักษณะของเชื้อ <i>E. coli</i>	22

## รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	เชื้อ <i>E. coli</i>	3
รูปที่ 2	โครงสร้างของยาในกลุ่ม beta-lactams	7
รูปที่ 3	การทำงานของเอนไซม์ beta-lactamases	8
รูปที่ 4	โครงสร้างของยา ciprofloxacin	9
รูปที่ 5	ยีนที่ตรวจพบในเชื้อ <i>E. coli</i>	22
รูปที่ 6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่แยกจากผู้ป่วยที่ได้รับยา ciprofloxacin	24

### สัญลักษณ์และย่อ

ค.ศ.	=	คริสต์ศักราช
%	=	Percentage
°C	=	Degree Celsius
µg	=	Microgram
ml	=	Milliliter
µl	=	Microliter
µm	=	Micrometer
µM	=	Micromolar
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
CFU/g	=	Colony forming unit per gram
ESC	=	Extended-spectrum cephalosporins
ESBLs	=	Extended-spectrum beta-lactamases
PCR	=	Polymerase chain reaction
SHV	=	Sulphydryl variable
CTX-M	=	Cefotaximase
TEM	=	Temoniera (patient's name)
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
Min	=	Minute
Sec	=	Second
ATCC	=	American type culture Collection
ERIC-PCR	=	Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR
PFGE	=	Pulsed-field gel electrophoresis
ST	=	Sequence type

## รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

### ชื่อบทความ

1. ชื่อภาษาไทย การตรวจหาและการศึกษาลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Escherichia coli* จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ชื่อภาษาอังกฤษ Detection and Characterization of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Clinical isolates from Songklanagarind Hospital
2. ชื่อภาษาไทย ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
3. ชื่อภาษาอังกฤษ Characteristics of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from children with cancer in Songklanagarind hospital (อยู่ในขั้นตอนส่งต้นฉบับไปยังวารสารวิชาการ)

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

การดื้อยาปฏิชีวนะจัดเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก ซึ่งเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมทั้งทางการแพทย์และทางการเกษตร (Danishta *et al.*, 2010) นอกจากนี้แล้วยังถูกใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ (prophylaxis) โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยมะเร็ง เพราะผู้ป่วยเหล่านี้จะติดเชื้อได้ง่ายกว่าผู้ป่วยปกติ จากสาเหตุนี้จึงทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเชื้อดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant bacteria) และยังทำให้ต้องพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน รวมถึงค่าใช้จ่ายของยาที่สูง และยังทำให้การรักษาล้มเหลวได้ ในเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเหล่านี้ *E. coli* เป็นเชื้อสำคัญเชื้อหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับเคมีบำบัด (Vigil *et al.*, 2010) *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant *E. coli*) ส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์ ESBLs (Levy and Marshall, 2004) จากการศึกษาในประเทศมาเลเซียพบว่า 11.1% ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำและมีไข้หลังจากได้รับเคมีบำบัดสามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้ (Baskaran *et al.*, 2007) เชื้อส่วนใหญ่ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จะดื้อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 เนื่องจากเอนไซม์สามารถทำลายยาในกลุ่มนี้ได้ (Drawz and Bonomo, 2010) การดื้อยาในกลุ่มนี้เกิดจากการที่เชื้อได้รับพลาสมิดที่มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs (Kumarasamy *et al.*, 2010) เอนไซม์ ESBLs สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ SHV, TEM และ CTX-M ซึ่งถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> และ *bla*<sub>CTX-M</sub> ตามลำดับ ในปัจจุบันนี้ได้มีการรายงานพบเอนไซม์ ESBLs มากกว่า 100 subtypes (<http://www.lahey.org/studies/>, accessed July 16, 2015) ซึ่งเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M โดยเฉพาะ CTX-M-15 มีการรายงานว่าพบบ่อยที่สุด (Rogers *et al.*, 2011)

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ Enterobacteriaceae ทั่วโลกพบว่า ประเทศเนเธอร์แลนด์ พบ Enterobacteriaceae ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 30.5% ในกลุ่มนักท่องเที่ยง (Paltansing *et al.*, 2013) นอกจากนี้มีการรายงานเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยมะเร็ง (Bucaneve *et al.*, 2005; Freifeld *et al.*, 2011) ในเอเชียมีการรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่สูง ได้แก่ในประเทศอินเดีย (79.0%), จีน (55.0%) และไทย (50.8%) ซึ่งเชื้อเหล่านี้แยกจากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในช่องท้อง (Hawser *et al.*, 2009) สำหรับประเทศไทยพบว่า 31.0% ของเชื้อ *E. coli* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราชสามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้ (Pongpech *et al.*, 2008) นอกจากนี้ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์พบอุบัติการณ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 29.0% ในผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Anunnatsiri *et al.*, 2012)

ยาในกลุ่ม fluoroquinolone ได้แก่ ciprofloxacin เป็นยาตัวหนึ่งที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์มีการใช้ยา ciprofloxacin เพื่อป้องกันการเกิดไข้ในผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็ง (Laoprasopwattana *et al.*, 2013) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของการใช้ยาในกลุ่มนี้อาจก่อให้เกิดการดื้อยาตามมา โดยทั่วไปกลไกการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุม

การสร้างเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเกิดจากการที่เชื้อได้รับยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib* และ *qepA* ซึ่งเป็นยีนที่พบบนพลาสมิดของเชื้อที่ดื้อยา (Dalhoff, 2012) โดยทั่วไปเชื้อ *E. coli* มักดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ค่อนข้างสูง ในอเมริกาพบว่า 55.0% ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในศูนย์แพทย์ต่างๆของสหรัฐอเมริกา (US medical centers) ดื้อยา fluoroquinolone และ trimethoprim-sulfamethoxazole (Johnson *et al.*, 2010) นอกจากนี้พบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ciprofloxacin สูงถึง 98.0% ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะใน 8 ประเทศของยุโรป (Cagnacci *et al.*, 2008) ในเอเชีย พบว่า 41.0% ของเชื้อ *E. coli* ซึ่งแยกจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในประเทศอินเดียดื้อยา ciprofloxacin (Kuntaman *et al.*, 2005) สำหรับในประเทศไทยข้อมูลเกี่ยวกับ เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone มีค่อนข้างจำกัด ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ciprofloxacin ในคนและสัตว์ (Hanson *et al.*, 2003; Thongpiyapoom *et al.*, 2004; Polwichai *et al.*, 2009)

ดังนั้นในการศึกษาค้างนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์



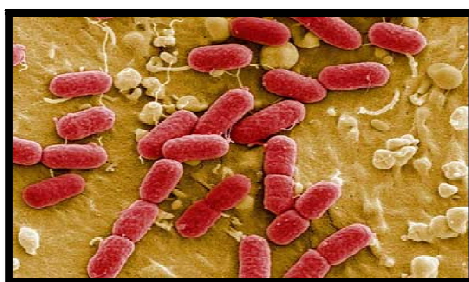
## ทฤษฎีและหลักการ

### 1. *Escherichia coli*

*E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้บ่อยอยู่ในลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในอุจจาระประมาณ  $10^6$ - $10^9$  CFU/g เชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคในคน แต่ก็มีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นของร่างกายได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยส่วนใหญ่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อลงในอาหารและน้ำดื่ม

#### 1.1 ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae มีขนาด  $1.1$ - $1.5 \times 2.0$ - $6.0 \mu\text{m}$  จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวๆหรือเชลล์คู่ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เคลื่อนที่โดย peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ คือ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิของสัตว์เลือดอุ่น ค่าความเป็นกรดต่างที่สามารถเจริญได้อยู่ที่ 7-7.5 ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity) เท่ากับ 0.96



รูปที่ 1 เชื้อ *E. coli*

<http://www.bangkokhealth.com/index.php/health/health-system/infectious/> (accessed September 20, 2012)

#### 1.2 อนุกรมวิธานของเชื้อ

Domain	:	Bacteria
Kingdom	:	Eubacteria
Phylum	:	Proteobacteria
Class	:	Gammaproteobacteria
Order	:	Enterobacteriales
Family	:	Enterobacteriaceae
Genus	:	<i>Escherichia</i>
Species	:	<i>E. coli</i>

### 1.3 คุณสมบัติของแอนติเจน

แอนติเจนของ *E. coli* มีอยู่หลายชนิด คือ

1.3.1 Somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบ lipopolysaccharide พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนความร้อนถึง 121 องศาเซลเซียส ทนกรดอ่อนและแอลกอฮอล์

1.3.2 Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบ polysaccharide มักพบที่ห่อหุ้มเซลล์ เช่น capsule, fimbria ที่หุ้มตัวแบคทีเรียและกลุ่ม O-antigen ทำให้เชื้อไม่สามารถเกาะกลุ่มกันในแอนติซีรัม O ได้ ยกเว้นการทำลาย K-antigen เสียก่อนโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชั่วโมง หรือที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

1.3.3 Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของ flagella ประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า flagellin ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนไหว จะไม่พบ H-antigen

Antigen O, K และ H มีคุณสมบัติทางกายภาพและภูมิคุ้มกันวิทยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจำแนก และการแยก serotype ของเชื้อจะขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนเหล่านี้ เช่น *E. coli* O157:H7, O6:K15:H16, O142:H6, O29:H7/30/32 และ O128:H7/12/21 เป็นต้น

### 1.4 คุณสมบัติด้านชีวเคมี

*E. coli* มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่หลากหลาย ดังนั้นจึงนิยมใช้คุณสมบัตินี้เป็นหลักในการจำแนกเชื้อ *E. coli* ออกจากเชื้อตัวอื่นๆในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ได้แก่ MacConkey agar (MCA) ลักษณะโคโลนีของ *E. coli* บน MacConkey agar (MCA) ซึ่งเป็น differential medium มีสีชมพู (lactose fermenter) และเมื่อเพาะเลี้ยงบน Eosin methylene blue agar (EMB) ซึ่งเป็น selective medium จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแวววาวที่เรียกว่า metallic sheen ผลการทดสอบ IMViC test เป็น + + - - หรือ - + - - ซึ่งแตกต่างจาก *Enterobacter* sp. และ *Klebsiella* sp. ซึ่งให้ผลเป็น - - + + สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae เบื้องต้นนั้นนิยมใช้คุณสมบัติการหมักน้ำตาลที่แตกต่างกันของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาล lactose นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาเชื้อ *E. coli* ได้ด้วยวิธีทางโมเลกุล ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบ (Jouini *et al.*, 2007)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* (Forbes et al., 2002)

การทดสอบ	ผล
Lactose fermentation	+
Indole production	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Citrate utilization	-
Motility test	+
Lysine decarboxylase test	+
TSI	A/A, G <sup>+</sup>
H <sub>2</sub> S	-
Urea hydrolysis	-
Acetate utilization	+
Cetrimide	-
ONPG test	+
Phenylalanine deaminase	-
Sucrose fermentation	+
Mannitol fermentation	+
Glucose fermentation	+
Dextrose fermentation	+, G <sup>+</sup>
Nitrate reduction	+, G <sup>-</sup>

G<sup>+</sup> = เกิด gas , G<sup>-</sup> = ไม่เกิด gas  
A/A = acid slant / acid butt

### 1.5 *E. coli* สายพันธุ์ก่อโรค

มีสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง จำแนกได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1.5.1 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในคนเดินทางไปต่างถิ่น (traveler's diarrhea) สร้างสารพิษที่ทนความร้อน (heat-stable toxin, ST) และไม่ทนความร้อน (heat-labile toxin, LT) ซึ่งมีสมบัติคล้ายสารพิษของเชื้อ *Vibrio cholerae* (cholera toxin) โรคอาหารเป็นพิษจาก ETEC เริ่มจากการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียที่มีชีวิตประมาณ 10<sup>6</sup> - 10<sup>10</sup> CFU/g เข้าไป แบคทีเรียสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในลำไส้เล็ก พร้อมกับขับสารพิษออกมา ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการท้องร่วง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำคล้ายได้รับเชื้อ *V. cholerae* แต่อาการรุนแรงน้อยกว่า อุจจาระมักไม่มีเลือดปน อาการท้องร่วงเป็นผลมาจากสารพิษชนิดที่ไวต่อความร้อนกระตุ้นให้ขับสาร adenylate cyclase จากผนังลำไส้ ซึ่งเป็นผลให้มีสาร cAMP (cyclic 3',5' - adenosine monophosphate) เพิ่มขึ้น ทำให้มีของเหลวหลั่งออกมามากในทางเดินอาหาร ส่วนสารพิษที่ทนความ

ร้อนกระตุ้นให้มีการหลั่ง cGMP (cyclic guanosine monophosphate) เพิ่มขึ้นในเยื่อเมือก ทำให้เกิดการสูญเสียของเหลวและอิเล็กโทรไลต์ของร่างกาย

1.5.2 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) โรคที่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษบริเวณลำไส้เล็กตอนบนทำให้เกิดอาการท้องเสียคล้ายกับอหิวาตกโรคและสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิดโดยไม่มีการสร้างสารพิษ จะเจริญในลำไส้ใหญ่และแทรกตัวไปอยู่ใน epithelial cell ของลำไส้ ลักษณะอาการจะมีไข้ หนาวสั่น ปวดศีรษะ ปวดท้อง อุจจาระเหมือนน้ำข้าวข้าว อาเจียน มีอาการขาดน้ำ ช็อค โดยส่วนมากผู้ป่วยจะไม่เสียชีวิตจากพิษของเชื้อ แต่จะเสียชีวิตจากการขาดน้ำ

1.5.3 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) เชื้อสายพันธุ์นี้ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ สามารถสร้างสารพิษไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งทำให้เกิดอาการไตวายได้ ในผู้ป่วยสูงอายุจะเกิดภาวะเลือดออกง่าย เนื่องจากเกร็ดเลือดถูกทำลายทำให้เสียชีวิตได้ อาการโดยทั่วไปจะเกิดอุจจาระร่วงบ่อยครั้ง อุจจาระเป็นมูกเลือด ปวดท้อง มีอาการช็อค ลักษณะอาการของผู้ติดเชื้อในยุโรปที่เกิดจากเชื้อกลุ่มนี้ เรียกว่า Haemolytic-uraemic syndrome (HUS)

1.5.4 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เชื้อสายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติลูก้าเข้าเซลล์ mucosal (เยื่อเมือกบุผิวในลำไส้มีส่วนเกี่ยวข้องในการดูดซึมและหลั่งสาร) ลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อกลุ่มนี้คือ ปวดบิดในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ ปวดเบ่ง เป็นไข้ ถ่ายอุจจาระบ่อยมีลักษณะเป็นมูกเลือดเพราะเซลล์ถูกทำลาย มีอาการคล้ายโรคบิดที่เกิดจากเชื้อ *Shigella dysenteriae*

1.5.5 Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC) เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็กขวบปีแรกในบางพื้นที่ของโลก

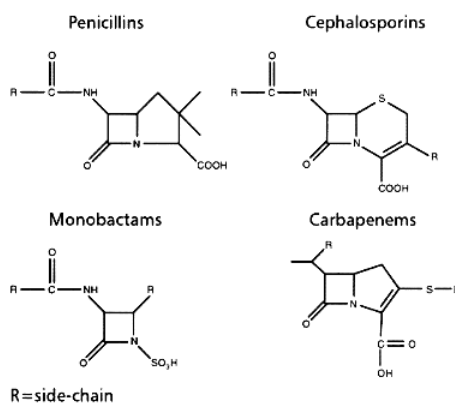
## 1.6 การก่อโรคในคน

นอกจากจะก่อให้เกิดโรคกับระบบทางเดินอาหารแล้ว ยังก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection, UTI) ซึ่ง *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยที่สุด กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) กรวยไตอักเสบ (pyelitis) ถ้าเป็นมากเชื้ออาจลุกลามเข้าสู่กระแสเลือด เกิดเป็น septicemia และอาจตายได้ เยื่อช่องท้องอักเสบ มักเกิดจากลำไส้ทะลุ เนื่องจากการแตกของไส้ติ่งอักเสบ ซึ่งภาวะนี้มักพบร่วมกับการติดเชื้อชนิดอื่นๆ ที่มีในลำไส้ การอักเสบของถุงน้ำดี (acute cholecystitis) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ มักพบในเด็กทารก การอักเสบของแผล (wound Infection) เช่น แผลผ่าตัด แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก เป็นต้น ปอดอักเสบ (pneumonitis) อาจเกิดจากการสำลัก และมักเกิดหลังการผ่าตัด เป็นฝีที่อวัยวะภายในเช่น ตับ การอักเสบในช่องท้องน้อย (pelvic inflammation disease) มักจะเป็นผลมาจากการอักเสบในโพรงมดลูก การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะช็อคและเสียชีวิตได้ การติดเชื้อในกระแสเลือดอาจเกิดจากการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆแล้วลุกลามเข้ากระแสเลือด

ภายหลังมานี้พบว่าเชื้อ *E. coli* กำลังเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์เนื่องจากมีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะยากลุ่ม beta-lactams เชื้อจะผลิตเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) (Rogers *et al.*, 2011) นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ดื้อต่อ carbapenems เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นยาที่ย่อยของยา beta-lactams (Nagaraj *et al.*, 2012)

## 2. ยากลุ่ม beta-lactams

2.1 การจัดจำแนก แบ่งเป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างของยา (Pfeifer *et al.*, 2010)



รูปที่ 2 โครงสร้างของยาในกลุ่ม beta-lactams

2.1.1 penams ได้แก่ penicillin จัดเป็นสารที่มี beta-lactam ring เป็นโครงสร้างพื้นฐาน ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โดยจับกับ penicillin-binding-protein (PBP) ชนิด 1-3 ทำให้ไม่เกิด transpeptidation จึงไม่มีการสร้าง peptidoglycan ก่อให้เกิด autolysis ทำให้เซลล์แตก

2.1.2 caphems ได้แก่ cephalosporins มีฤทธิ์ไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ชนิด PBP1-3 ซึ่งยาในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 4 รุ่น (generations) ตามความกว้างในการออกฤทธิ์กับกรัมบวกและกรัมลบและความทนต่อเอนไซม์ beta-lactamases ยาที่เป็น cephalosporins รุ่นที่ 1 ได้แก่ cephalothin, cefazolin ใช้ได้กับแบคทีเรียกรัมบวกและลบบางชนิด แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ยาที่เป็น cephalosporins รุ่นที่ 2 ได้แก่ cefuroxime มีประสิทธิภาพดีกว่า cephalosporins รุ่นที่ 1 คือ ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ทำให้มีการออกฤทธิ์กับเชื้อกรัมลบเพิ่มขึ้น ยา cephalosporins รุ่นที่ 3 ได้แก่ cefpodoxime, ceftriaxone มีประสิทธิภาพดีใช้ได้กับแบคทีเรียกรัมลบและกรัมบวก และยา cephalosporins รุ่นที่ 4 ได้แก่ cefepime มีฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียกรัมลบกว้างกว่าและทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ได้ดี

2.1.3 cephamycins ได้แก่ 7-alpha-methoxy cephalosporins (เช่น cefoxitin)

2.1.4 monobactams เช่น aztreonam เป็นยาในกลุ่ม beta-lactams ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของกรัมลบตรงแท่งที่ PBP3 ทำให้เซลล์ยืดยาวและตายในที่สุด โดยยาในกลุ่มนี้ทนต่อการทำลายด้วย beta-lactamases การดื้อยา aztreonam อาจพบในเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่สามารถสร้าง K1 beta-lactamases ไปทำลายยาได้

2.1.5 penems เช่น faropenem

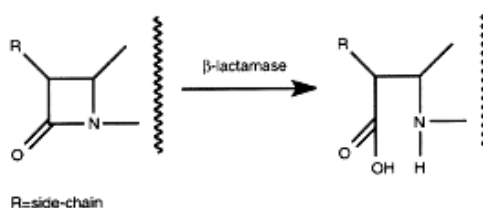
2.1.6 carbapenems เช่น imipenem และ meropenem เป็นสารที่มี beta-lactam ring ที่ออกฤทธิ์กว้างโดยยานี้สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรียกรัมลบ ได้ดีและทนต่อเอนไซม์ beta-lactamases รวมทั้ง extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)

## 2.2 กลไกการออกฤทธิ์

ยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยจับกับ penicillin binding proteins (PBPs) ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ transpeptidase ส่งผลให้การสร้าง peptidoglycan หยุดชะงัก

## 2.3 กลไกการดื้อยา

กลไกหลักของการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactams มีหลาย วิธีการ เช่น สร้างเอนไซม์ทำลายยา การลดการนำเข้ายา เป็นต้น โดยกลไกหลักเกิดจากเชื้อสร้างเอนไซม์ มาทำลายยา (drug inactivation) คือ beta-lactamases โดยเอนไซม์ที่ทำลาย ring ของยาในกลุ่ม beta-lactams ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้



### รูปที่ 3 การทำงานของเอนไซม์ beta-lactamases

## 2.4 เอนไซม์ beta-lactamases

แบ่งตามลำดับ amino acid และ substrate ได้เป็น 4 classes คือ class A, B, C และ D enzyme (Pfeifer *et al.*, 2010) เอนไซม์ beta-lactamases class A, C และ D เป็น serine beta-lactamases ส่วน class B เป็น metallo beta-lactamases (Paterson and Bonomo, 2005)

2.4.1 class A beta-lactamases : penicillinase และ cephalosporinase เช่น extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) เช่น SHV, TEM, CTX-M, PER และ GES เป็นต้น เอนไซม์ ESBLs เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่ม penicillins, cephalosporins รุ่นที่ 1, 2 และ 3 และ aztreonam (แต่ไม่ดื้อต่อ cephamycins หรือ carbapenems) โดยการ hydrolysis ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ และถูกยับยั้งได้โดย beta-lactamase inhibitors เช่น clavulanic acid

2.4.2 class B beta-lactamases : metallo beta-lactamase ประกอบด้วยเอนไซม์ carbapenemases เช่น VIM และ IMP-type carbapenemase

2.4.3 class C beta-lactamases : chromosomal cephalosporinase สามารถย่อยสลายยาในกลุ่ม 3<sup>rd</sup> cephalosporins ได้ แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid

2.4.4 class D beta-lactamases : oxacillinase นอกจากนี้ class D enzyme ยังมีคุณสมบัติเป็น plasmid cephalosporinase เช่น OXA, CMY, DHA, MOX , FOX และ ACC

### 3. ยากลุ่ม fluoroquinolone (Bryskier and Chantot, 1995; Bhanot *et al.*, 2001)

Fluoroquinolone เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม quinolones ซึ่งได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี ยาชนิดแรกในกลุ่มนี้คือ nalidixic acid ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกรัมลบได้มากกว่ากรัมบวก ใช้รักษาการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและอุจจาระร่วง จากการติดเชื้อ *Shigella sonnei* เนื่องจากการใช้ quinolones รุ่นแรกพบเชื้อมีชีวิตง่าย การดื้อยาไม่ตีจึงมีการดัดแปลงสูตรโครงสร้างพื้นฐานของ quinolones เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ครอบคลุมมากขึ้นและมีเภสัชจลนศาสตร์ดีขึ้น โดยการเติม fluorine (F) ลงไปในสูตรโครงสร้างเดิมของ quinolones เพื่อให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อกว้างขึ้น ได้แก่ เชื้อกรัมลบรูปแท่ง รวมทั้ง *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อกรัมบวก จึงเรียกสารที่ได้ในกลุ่มนี้ว่า fluoroquinolone

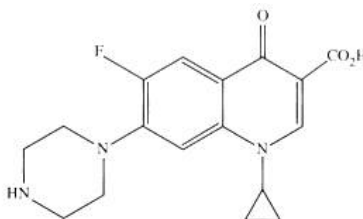
#### 3.1 การจัดแบ่งกลุ่มตามขอบเขตในการออกฤทธิ์ (Naber, 2001)

class I : fluoroquinolone เป็นแบบที่ใช้ในรูปรับประทาน มีข้อบ่งใช้จำกัดในการรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ได้แก่ norfloxacin และ pefloxacin

class II : fluoroquinolone ที่มีข้อบ่งใช้ครอบคลุมเชื้อได้ทั้งในทางเดินปัสสาวะและโรคติดเชื้อทาง systemic อื่นๆ ได้แก่ enoxacin, fleroxacin, ofloxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin

class III : fluoroquinolone ที่มีข้อบ่งใช้สำหรับเชื้อกรัมบวกและเชื้อ atypical ได้แก่ levofloxacin และ sparfloxacin

class IV : fluoroquinolone ที่ครอบคลุมเชื้อกรัมบวก เชื้อ atypical และเชื้อ anaerobe ได้แก่ gatifloxacin, moxifloxacin, gemifloxacin



รูปที่ 4 โครงสร้างของยา ciprofloxacin (Ball, 2000)

#### 3.2 กลไกการออกฤทธิ์ (Wang *et al.*, 2009; Al-Agamy *et al.*, 2012)

ยาในกลุ่ม fluoroquinolone มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) โดยจะไปยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) และ topoisomerase IV ของแบคทีเรีย เอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย (tetrameric enzyme) ได้แก่ GyrA และ GyrB อย่างละ 2 หน่วย ซึ่งควบคุมการทำงานโดยยีน *gyrA* และ *gyrB* เอนไซม์ topoisomerase IV ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย (tetrameric enzyme) ได้แก่ ParC และ ParE อย่างละ 2 หน่วย ซึ่งควบคุมการทำงานโดยยีน *parC* และ *parE* เอนไซม์สองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญและการเพิ่มจำนวน

ของแบคทีเรีย (Drlica and Zhao, 1997) ในกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) เอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) หรือเอนไซม์ topoisomerase IV จะมีหน้าที่ช่วยคลายเกลียวดีเอ็นเอบริเวณเหนือ replication fork เนื่องจากการคลายเกลียวคู่ของดีเอ็นเอออกจากกันทำให้ส่วนเหนือขึ้นไปขดเป็นเกลียวแน่น เอนไซม์ topoisomerase IV จะมีหน้าที่ตัดดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่งเหนือ replication fork เพื่อให้สามารถคลายเกลียวที่แน่นออกได้และจะเชื่อมต่อเข้าด้วยกันใหม่อีกครั้ง นอกจากนี้เอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) ยังมีหน้าที่ปิดเกลียวดีเอ็นเอ ทำให้โครโมโซมของแบคทีเรียหดพับจนสามารถบรรจุลงในเซลล์ของแบคทีเรียได้ เมื่อยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้และตายในที่สุด

ยาในกลุ่ม fluoroquinolone แต่ละตัวมี affinity ต่อเอนไซม์แต่ละตัวไม่เท่ากัน ทำให้การขัดขวางการสร้าง DNA ไม่เท่ากัน และเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งหรือทั้งสองตัวไม่เท่ากัน ย่อมมีผลทำให้เชื้อดื้อต่อยาแต่ละตัวแตกต่างกัน

### 3.3 กลไกการดื้อยา

3.3.1 เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเป้าหมายของยาที่อยู่บนโครโมโซมได้แก่ *gyrA*, *gyrB*, *parC* และ *parE* ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาในระดับสูง มีรายงานพบว่ายีน *gyrA* เกิดการกลายพันธุ์มากกว่า ยีน *gyrB* และยีน *parC* เกิดการกลายพันธุ์มากกว่า ยีน *parE* (Gomez *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2011) สำหรับการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) เกิดขึ้นได้น้อยมาก (Zhao *et al.*, 1997)

3.3.2 เกิดจากการลดการนำเข้าของยาหรือเพิ่มการขับยาออกนอกเซลล์ เช่น การสร้าง multidrug efflux pumps ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Hooper, 1999; Al-Agamy *et al.*, 2012)

3.3.3 เกิดจากยีนดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิด ได้แก่ *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* และ *qepA* ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิกเนื่องจากสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาแบบ horizontal ผ่านทางพลาสมิดได้ กลไกการดื้อยาของกลุ่ม fluoroquinolone ที่เกิดจากการถ่ายทอดพลาสมิด ถูกค้นพบครั้งแรกในปี.ศ. 1998 ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin โดยเกิดจากการถ่ายทอดพลาสมิด pMG252 ซึ่งเป็นส่วนที่ก่อให้เกิด multidrug resistance (Martinez-Martinez *et al.*, 1998)

3.3.3.1 *qnr* เป็นยีนดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิด ผลิตโปรตีน Qnr ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) และ topoisomerase IV จากการจับของยากกลุ่ม fluoroquinolone (Cattoir and Nordmann, 2009)

3.3.3.1.1 *qnrA* ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* เมืองเซียงไฮ้ ประเทศจีน (Wang *et al.*, 2003)

3.3.3.1.2 *qnrB* ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากประเทศอินเดีย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน *qnrA* เท่ากับ 41% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน *qnrS* เท่ากับ 39% (Jacoby *et al.*, 2006)

3.3.3.1.3 *qnrC* ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *Proteus mirabilis* (Wang *et al.*, 2009)



3.3.3.1.4 *qnrS* ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *Shigella flexneri* 2b (Hata *et al.*, 2005)

3.3.3.1.5 *qnrD* ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *Salmonella enterica* (Cavaco *et al.*, 2009)

3.3.3.2 *aac(6')-Ib-cr* ผลิตโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase โดยมีหน้าที่ไปเปลี่ยนแปลงหมู่อะมิโนของ piperazin ring ของยาในกลุ่ม fluoroquinolone ส่งผลให้ความสามารถของยา ciprofloxacin ลดลง (Robicsek *et al.*, 2006)

3.3.3.3 *qepA* ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* ผลิตโปรตีน QepA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) เพื่อลดระดับของยาภายในเซลล์ (Yamane *et al.*, 2007)

#### 4 การกระจายของเชื้อดื้อยา

##### 4.1 การกระจายของเชื้อดื้อยาที่สร้างเอนไซม์ ESBLs

ในปัจจุบันเอนไซม์ ESBLs เป็นปัญหาในการรักษาผู้ป่วยในโรงพยาบาลทั่วโลก การตรวจหาความชุกของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่แยกได้ในคลินิกมีความแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เมือง สถานที่ เช่น ในอเมริกาใต้พบความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ได้ตั้งแต่ 33-40% ในยุโรปพบอุบัติการณ์ของการดื้อยา ceftazidime ของเชื้อ *K. pneumoniae* มีจำนวน 20% และ 42% ที่แยกได้จากผู้ป่วยใน non-ICU และ ICU ตามลำดับ (Winokur *et al.*, 2001) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ ESBL ชนิด TEM-10 มักมีรายงานการตรวจพบในประเทศแถบยุโรปเท่านั้น แถบประเทศในเอเชียพบว่าในประเทศจีนมีอุบัติการณ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs อยู่ในช่วง 13-15% ในเชื้อ *K. pneumoniae* มีอุบัติการณ์สูงถึง 60% (Dhillon and Clark, 2011) สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาในโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ พบว่า 26% ของผู้ป่วยที่ศึกษาได้ตรวจพบยีน *bla<sub>CTX-M</sub>* 26% และไม่พบยีน *bla<sub>SHV</sub>* (Kiratisin *et al.*, 2007) สำหรับโรงพยาบาลขอนแก่นจะตรวจพบ *bla<sub>SHV</sub>* เป็นส่วนใหญ่ (Chanawong *et al.*, 2007) ยีน *bla<sub>CTX-M-15</sub>* เป็นยีนที่มีการรายงานทั่วโลก (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008) และในประเทศไทยก็ได้ตรวจพบยีนชนิดนี้ด้วย ซึ่งพบในผู้ป่วยในโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ (Apisarntharak *et al.*, 2007)

##### 4.2 การกระจายของเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone

มีการรายงานทั่วโลกถึงการพบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone (Corkill *et al.*, 2005; Jonas *et al.*, 2005; Mammeri *et al.*, 2005) มีรายงานการตรวจพบยีน *qnrA* ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin 7.7% ในเมืองเซียงไฮ้ของประเทศจีน (Wang *et al.*, 2003) นอกจากนี้ในประเทศไทยพบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone 38.3% ในแผนก ICU (Thongpiyapoom *et al.*, 2004) แต่ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ส่วนใหญ่พบเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone (Hortiwakul *et al.*, 2012)

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งใน  
โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

## ผลการทดลอง

จากการศึกษาผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็ง จำนวน 84 ราย แยกเป็นผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) 64 ราย และผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) 20 ราย ในการทดลองนี้ได้แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับยา ciprofloxacin (42 ราย) กลุ่มที่ 2 ได้รับยา ciprofloxacin (42 ราย) ในกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin แบ่งย่อยออกเป็นกลุ่มที่ 1 เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยก่อนได้รับยา ciprofloxacin (R1) กลุ่มที่ 2 เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยหลังได้รับยา ciprofloxacin เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (R2) และกลุ่มที่ 3 เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยหลังได้รับยา ciprofloxacin เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (R3) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ผู้ป่วย	จำนวนเชื้อ <i>E. coli</i> (ไอโซเลท)	
ไม่ได้รับยา ciprofloxacin		100
	R1	55
ได้รับยา ciprofloxacin	R2	59
	R3	35
<b>รวม</b>		<b>249</b>

R1 = เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยก่อนได้รับยา ciprofloxacin

R2 = เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยหลังได้รับยา ciprofloxacin เป็นเวลา 1 สัปดาห์

R3 = เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยหลังได้รับยา ciprofloxacin เป็นเวลา 2 สัปดาห์

### 1. ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli*

ในการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ใช้ยาปฏิชีวนะจำนวน 9 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ fluoroquinolone (ciprofloxacin), ESC; extended-spectrum cephalosporins (ceftazidime และ cefotaxime), aminoglycosides (amikacin และ gentamicin), beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors (sulperazone; cefoperazone+sulbactam) และยาชนิดอื่นๆ (cefoxitin, imipenem และ meropenem) จากการศึกษพบว่าเชื้อ *E. coli* ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone (ciprofloxacin) มากที่สุด โดยพบมากที่สุดทั้งในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin (24.0%) และกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin (67.8%) ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ (*p*-value) จะเปรียบเทียบในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin และผู้ป่วยกลุ่มก่อนได้รับยา ciprofloxacin (R1) ก่อน จากการศึกษพบว่าในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต่างๆ

แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ยกเว้นในเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม ESC (extended-spectrum cephalosporins) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ ( $p=0.011$ ) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติระหว่างเชื้อที่แยกได้จากระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาก 3 ระยะซึ่งดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ( $p=0.000$ ), aminoglycosides ( $p=0.010$ ) และ fluoroquinolone + aminoglycosides ( $p=0.002$ ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin จำนวนของเชื้อที่แยกได้ก่อนจากได้รับยา (R1) มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้หลังจากได้รับยา (R2, R3) นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors ตรวจพบในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin เท่านั้น (2.0%)

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้มีเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin จำนวน 66 ไอโซเลท (66.0%) และกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin จำนวน 45 ไอโซเลท (30.2%) ไม่ดื้อยาทั้ง 9 ชนิดที่ใช้ทดสอบ และเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อ *E. coli* ทุกไอโซเลทที่แยกได้จากผู้ป่วยทุกกลุ่มไม่ดื้อยา imipenem และ meropenem

Multidrug resistant *E. coli* หมายถึงไอโซเลทที่ดื้อยา 3 กลุ่มขึ้นไป (Magiorakos *et al.*, 2011) จากการศึกษาพบ multidrug resistant *E. coli* จำนวน 6 ไอโซเลทในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin สำหรับในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบ multidrug resistant *E. coli* จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งในเชื้อที่แยกได้ในระยะ R2 และ R3 จำนวน 1 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การศึกษาค้นคว้านี้ได้ตรวจหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime พบว่าค่า MIC ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin อยู่ในช่วง 0.004 - >32 และ 0.032 - >256  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ทดสอบได้ 50% ( $\text{MIC}_{50}$ ) ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime เท่ากับ 0.016 และ 0.125  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ทดสอบได้ 90% ( $\text{MIC}_{90}$ ) ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime มีค่าเท่ากับ >32 และ 32  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ และค่า MIC ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin ในเชื้อ *E. coli* จากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา ciprofloxacin อยู่ในช่วง 0.003 - >32 และ 0.047 - 64  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ โดยมีค่า  $\text{MIC}_{50}$  ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime เท่ากับ >32 และ 0.19  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ สำหรับค่า  $\text{MIC}_{90}$  ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime เท่ากับ >32 และ 8  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 การดื้อยาของเชื้อ *E. coli*

Resistance phenotype	<i>E. coli</i> แยกจากผู้ป่วย				<i>p</i> -value <sup>b</sup>
	ไม่ได้รับยา ciprofloxacin (n=100), (%)	ได้รับยา ciprofloxacin (n=149) R1 (n=55, (%))	R2 (n=59, (%))	R3 (n=35, (%))	
<b>One drug group resistance</b>					
1. Fluoroquinolone <sup>a</sup>	24 (24.0)	9 (16.4)	57 (96.6)	35 (100.0)	0.000*
2. ESC <sup>a,c</sup>	11 (11.0)	0	2 (3.4)	1 (2.9)	0.402
3. Aminoglycosides <sup>a</sup>	13 (13.0)	2 (3.6)	13 (22.0)	8 (22.9)	0.010*
4. Beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors <sup>a</sup>	2 (2.0)	0	0	0	-
5. Any of above	3 (3.0)	2 (3.6)	2 (3.4)	4 (11.4)	0.191
<b>More than one drug group resistance</b>					
1. Fluoroquinolone + ESC	0	0	0	1 (2.9)	0.194
2. Fluoroquinolone+ aminoglycosides	3 (3.0)	0	12 (20.3)	6 (17.1)	0.002*
3. ESC + aminoglycosides	1 (1.0)	0	0	0	-
4. Multidrug resistance (ดื้อยา ≥3 กลุ่ม)	6 (6.0)	0	1 (1.7)	2 (5.7)	0.166

<sup>a</sup> = Fluoroquinolone (ดื้อยา ciprofloxacin), ESC; extended-spectrum cephalosporins (ดื้อยา ceftazidime และ/หรือ cefotaxime), aminoglycosides (ดื้อยา amikacin และ/หรือ gentamicin), beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors (ดื้อยา sulperazone) และ any of above; ยาชนิดอื่นๆ (ดื้อยา cefoxitin)

<sup>b</sup> = วิเคราะห์จากจำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากกระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin

<sup>c</sup> = จำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin และผู้ป่วยกลุ่มก่อนได้รับยา ciprofloxacin (R1) มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ ( $p=0.011$ )

\* =  $p < 0.05$  แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4 ค่า MICs ต่อยา ciprofloxacin และ ceftazidime ของเชื้อ *E. coli*

Antibiotic	<i>E. coli</i> แยกจากผู้ป่วย					
	ไม่ได้รับยา ciprofloxacin (n=100)			ได้รับยา ciprofloxacin (n=149)		
	MIC range (µg/mL)	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	MIC range (µg/mL)	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)
Ciprofloxacin	0.004 - >32	0.016	>32	0.003 - >32	>32	>32
Ceftazidime	0.032 - >256	0.125	32	0.047 - 64	0.19	8

## 2. การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ beta-lactamases

ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบเชื้อ *E. coli* สร้างเอนไซม์ class A beta-lactamases (non-ESBLs) มากที่สุด ซึ่งพบในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin เท่ากับ 45 (45.0%) และ 80 (53.7%) ไอโซเลท ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยเปรียบเทียบในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin และผู้ป่วยกลุ่มก่อนได้รับยา ciprofloxacin (R1) พบว่าในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamases ชนิดต่างๆที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติระหว่างเชื้อที่แยกได้จากระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin เชื้อ *E. coli* ในระยะ R2 ที่สร้าง non-ESBLs มีจำนวนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.000$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ในระยะ R1 นอกจากนี้ตรวจพบเชื้อ *E. coli* สร้างเอนไซม์ class A beta-lactamases (ESBLs) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin เท่ากับ 15 (15.0%) และ 20 (13.4%) ไอโซเลท ตามลำดับ และพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ class C beta-lactamases (AmpC) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยาและได้รับยา ciprofloxacin เท่ากับ 1 (1.0%) และ 2 (1.3%) ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่ามีเชื้อ *E. coli* จำนวน 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin สามารถสร้างทั้งเอนไซม์ class A (ESBLs) และ class C (AmpC) beta-lactamases (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 กลุ่มของเอนไซม์ beta-lactamases ที่ตรวจพบในเชื้อ *E. coli*

Beta-lactamases		<i>E. coli</i> แยกจากผู้ป่วย				p-value <sup>b</sup>
		ไม่ได้รับยา ciprofloxacin (n=100), (%)	ได้รับยา ciprofloxacin (n=149)			
			R1 (n=55, %)	R2 (n=59, %)	R3 (n=35, %)	
Class A	non- ESBLs	45 (45.0)	17 (30.9)	42 (71.2)	21 (60.0)	0.000 *
	ESBLs	15 (15.0)	5 (9.1)	11 (18.6)	4 (11.4)	0.302
Class C	AmpC	1 <sup>a</sup> (1.0)	1 (1.8)	1 (1.7)	0	0.731

<sup>a</sup> = ไอโซเลทที่สร้างทั้งเอนไซม์ AmpC และ ESBLs

<sup>b</sup> = วิเคราะห์จากจำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin

\* =  $p < 0.05$  แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

### 3. การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ( $bla_{SHV}$ , $bla_{TEM}$ และ $bla_{CTX-M}$ ) และยีน $ampC$

นำเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs มาศึกษา ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ ยีน  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$  และ  $bla_{CTX-M}$  ด้วยวิธี multiplex PCR จากนั้นนำ amplicon ที่ได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs 4 ยีน ( $bla_{SHV-12}$ ,  $bla_{TEM-20}$ -like,  $bla_{CTX-M-14}$  และ  $bla_{CTX-M-15}$ ) ยีนที่พบมากที่สุดคือ  $bla_{CTX-M-15}$  โดยพบในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin เป็นจำนวน 7 และ 11 ไอโซเลท ตามลำดับ ยีนที่ตรวจพบรองลงมาในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin คือ  $bla_{CTX-M-14}$ ,  $bla_{SHV-12} + bla_{TEM-20}$ -like,  $bla_{SHV-12}$  และ  $bla_{TEM-20}$ -like โดยพบในเชื้อ *E. coli* จำนวน 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ สำหรับยีนที่ตรวจพบรองลงมาในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin คือ  $bla_{CTX-M-14}$  และ  $bla_{TEM-20}$ -like โดยพบเป็นจำนวน 8 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

เป็นที่น่าสนใจว่า มีการตรวจพบการร่วมกันของยีน  $bla_{SHV-12} + bla_{TEM-20}$ -like ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin ขณะเดียวกันไม่พบการร่วมกันของยีนใดในเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยเปรียบเทียบในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin และผู้ป่วยกลุ่มก่อนได้รับยา ciprofloxacin (R1) พบว่าในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีเชื้อ *E. coli*

ที่มียีนสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิดต่างๆที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติระหว่างเชื้อที่แยกได้จากระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน

การตรวจหายีน *ampC* เพื่อยืนยันการสร้างเอนไซม์ class C beta-lactamases (AmpC) ด้วยเทคนิค PCR และนำ amplicon ที่ได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ พบว่าเชื้อ *E. coli* ทุกไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ AmpC มียีน *ampC*

ตารางที่ 6 แสดง subtype ของ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs

ESBLs related gene	<i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs				p-value <sup>a</sup>
	ไม่ได้รับยา	ได้รับยา ciprofloxacin (n=20)			
	ciprofloxacin (n=15), (%)	R1 n=5, (%)	R2 n=11, (%)	R3 n=4, (%)	
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	1 (6.7)	0	0	0	-
<i>bla</i> <sub>TEM-20-like</sub>	1 (6.7)	1 (20.0)	0	0	0.206
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	4 (26.7)	3 (60.0)	4 (36.4)	1 (25.0)	0.530
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	7 (46.7)	1 (20.0)	7 (63.6)	3 (75.0)	0.178
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-20-like</sub>	2 (13.3)	0	0	0	-

<sup>a</sup> = วิเคราะห์จากจำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin

#### 4. การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม fluoroquinolone (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และ *qepA*)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ได้แก่ยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และ *qepA* ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นยีนดื้อยาที่พบบนพลาสมิด ในการตรวจหายีนเหล่านี้จะทำการศึกษาในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ciprofloxacin โดยแบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin จำนวน 24 ไอโซเลท และเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin จำนวน 101 ไอโซเลท จากการศึกษาพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone รูปแบบ *qnrA* + *qnrS* มากที่สุดทั้งในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยาและได้รับยา ciprofloxacin (ตารางที่ 7)

ในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบเชื้อ *E. coli* จำนวน 1 ไอโซเลท ที่มียีนร่วมกัน 4 ยีน ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin ในระยะ R2 นอกจากนี้ไม่สามารถตรวจพบยีน *qnrB* ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin (ตารางที่ 7)



ในการศึกษาครั้งนี้สิ่งที่น่าสนใจคือ ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin พบรูปแบบที่มียีนร่วมสูงสุดแค่ 3 ยีน ขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบว่ามียีนร่วมกันสูงสุดถึง 4 ยีน (ตารางที่ 7)

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยเปรียบเทียบในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin และผู้ป่วยกลุ่มก่อนได้รับยา ciprofloxacin (R1) พบว่าในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีเชื้อ *E. coli* ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ในแต่ละแบบที่ตรวจพบที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติระหว่างเชื้อที่แยกได้จากระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 7 Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes ที่ตรวจพบในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ciprofloxacin

Fluoroquinolone resistance genes	<i>E. coli</i> แยกจากผู้ป่วย				<i>p</i> -value <sup>a</sup>
	ไม่ได้รับยา ciprofloxacin (n=24), (%)	ได้รับยา ciprofloxacin (n=101)			
		R1 n=9, (%)	R2 n=57, (%)	R3 n=35, (%)	
1. ตรวจไม่พบยีน	0	0	0	1 (2.9)	0.386
2. ตรวจพบ 1 ยีน	6 (25.0)	1 (11.1)	5 (8.8)	3 (8.6)	0.970
<i>qnrA</i>	2	1	3	2	
<i>qnrS</i>	4	0	1	0	
<i>qepA</i>	0	0	1	1	
3. ตรวจพบ 2 ยีน	14 (58.3)	3 (33.3)	39 (68.4)	23 (65.7)	0.122
<i>qnrA</i> + <i>qnrS</i>	12	3	33	20	
<i>qnrA</i> + <i>qepA</i>	2	0	3	3	
<i>qnrS</i> + <i>qepA</i>	0	0	3	0	
4. ตรวจพบ 3 ยีน	4 (16.7)	5 (55.6)	12 (21.1)	8 (22.9)	0.079
<i>qnrA</i> + <i>qnrS</i> + <i>qepA</i>					
5. ตรวจพบ 4 ยีน	0	0	1 (1.8)	0	0.677
<i>qnrA</i> + <i>qnrB</i> + <i>qnrS</i> + <i>qepA</i>					

<sup>a</sup> = วิเคราะห์จากจำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากระยะ R1, R2 และ R3 ของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin

## 5. ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone และยีน ESBLs

เพื่อที่จะศึกษาความสามารถในการถ่ายโอนยีนดื้อยา จึงได้เลือกยีน *qnrA* และยีน *bla<sub>CTX-M</sub>* ซึ่งเป็นตัวแทนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone และยีน ESBLs ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากผู้ป่วย 3 คน จากกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin (P019, P053 และ P072) ซึ่งมีเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ครบทั้ง 3 ระยะ (R1, R2 และ R3) โดยผู้ป่วยทั้ง 3 คนในระยะ R1 เชื้อไม่ดื้อยา ciprofloxacin และไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs แต่เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้ง 3 คน ในระยะ R2 และ R3 ดื้อยา ciprofloxacin สำหรับการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในผู้ป่วย P019 และ P072 พบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้ในระยะ R3 ส่วนผู้ป่วย P053 พบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ในระยะ R2 และ R3 (ตารางที่ 8)

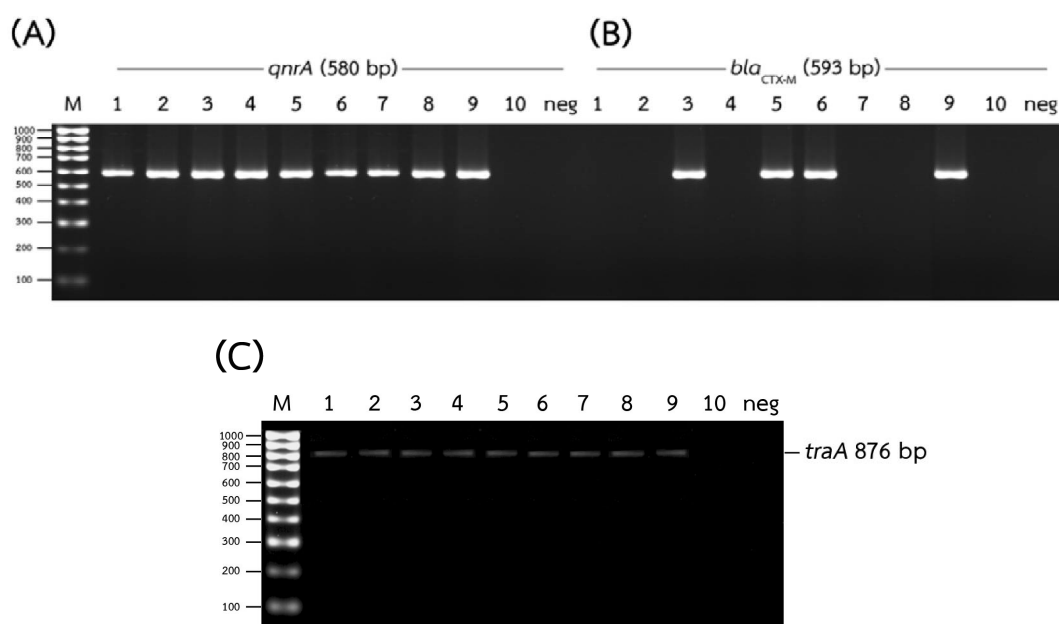
เพื่อศึกษาว่ายีน *qnrA* และยีน *bla<sub>CTX-M</sub>* อยู่บนพลาสมิด จึงทำการสกัดพลาสมิดจากเชื้อ *E. coli* และใช้พลาสมิดเป็น DNA template เพื่อตรวจหายีนทั้งสองด้วยเทคนิค PCR นอกจากนั้นยังทำการตรวจหายีน *traA* ในเชื้อ *E. coli* กลุ่มดังกล่าว ซึ่งยีน *traA* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง pillus ที่มีความจำเป็นในการถ่ายทอดยีนดื้อยาผ่านทางพลาสมิดด้วยกระบวนการ conjugation

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *E. coli* ทั้ง 9 ไอโซเลทที่แยกได้ผู้ป่วย 3 คนมียีน *qnrA* เป็นที่น่าสังเกตว่าในระยะ R1 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อยา ciprofloxacin ก็สามารถตรวจพบยีน *qnrA* ได้ (รูปที่ 5A lane 1, 4 และ 7) สำหรับยีน *bla<sub>CTX-M</sub>* ตรวจพบเฉพาะในเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ได้เท่านั้น (รูปที่ 5B lane 3, 5, 6 และ 9) และจากการตรวจหายีน *traA* พบว่าเชื้อ *E. coli* ทั้ง 9 ไอโซเลทมียีน *traA* (รูปที่ 5C) แสดงว่าเชื้อเหล่านี้สามารถถ่ายทอดยีน *qnrA* และ *bla<sub>CTX-M</sub>* ไปสู่เชื้ออื่นๆทางพลาสมิดได้ แต่การศึกษานี้ไม่สามารถบอกได้ว่ายีน *qnrA*, *bla<sub>CTX-M</sub>* และ *traA* อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน จึงไม่สามารถบอกได้ว่าการดื้อยา ciprofloxacin และการสร้างเอนไซม์ ESBLs จะถ่ายทอดไปพร้อมกัน จึงควรมีการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 8 คุณลักษณะของเชื้อ *E. coli*

รหัสผู้ป่วย	เชื้อ <i>E. coli</i>	การดื้อยา ciprofloxacin	การสร้างเอนไซม์ ESBLs
019	R1	-	-
	R2	+	-
	R3	+	+
053	R1	-	-
	R2	+	+
	R3	+	+
072	R1	-	-
	R2	+	-
	R3	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922		-	-

+ = ตรวจพบ, - = ตรวจไม่พบ



รูปที่ 5 ยีนที่ตรวจพบในเชื้อ *E. coli*

(A) ยีน *qnrA*, (B) *bla*<sub>CTX-M</sub> และ (C) ยีน *traA*

lane 1, 2 และ 3 = เชื้อ *E. coli* จาก R1, R2 และ R3 ตามลำดับ ของผู้ป่วย P019,

lane 4, 5 และ 6 = เชื้อ *E. coli* จาก R1, R2 และ R3 ตามลำดับ ของผู้ป่วย P053,

lane 7, 8 และ 9 = เชื้อ *E. coli* จาก R1, R2 และ R3 ตามลำดับ ของผู้ป่วย P072 และ

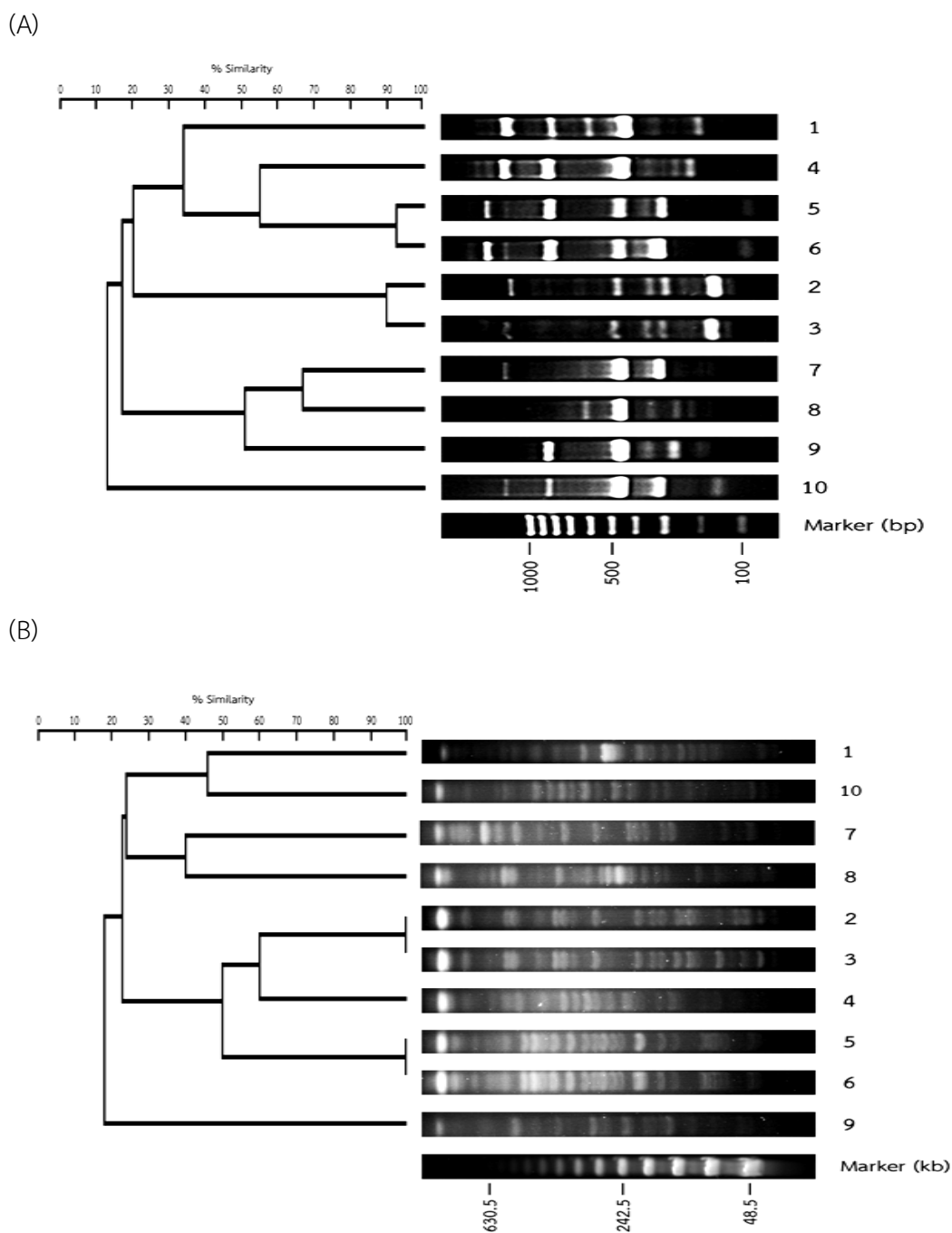
lane 10 = *E. coli* ATCC 25922

## 6. การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี ERIC-PCR และ PFGE

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin โดยพบว่าจากเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จำนวน 149 ไอโซเลท เชื้อดื้อยา ciprofloxacin จำนวน 101 ไอโซเลท และในจำนวนนี้สร้างเอนไซม์ ESBLs ร่วมด้วยจำนวน 18 ไอโซเลท จึงทำการเลือกเชื้อมาจากผู้ป่วย 3 คน (P019, P053 และ P072) (ตารางที่ 8) จากนั้นนำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี ERIC-PCR เปรียบเทียบกับวิธี PFGE จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี ERIC-PCR พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระยะ R2 และ R3 ของผู้ป่วย P019 มีความเหมือนกัน 88% (รูปที่ 6A) และในการตรวจโดยวิธี PFGE มีความเหมือนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 100% (รูปที่ 6B) แสดงว่าเชื้อที่แยกได้เป็น clone เดียวกัน และเป็น clone ที่ต่างจากเชื้อที่พบในระยะ R1 ของผู้ป่วยคนดังกล่าวเนื่องจากผลของ ERIC-PCR และ PFGE ให้ผลเป็น 20% และ 25% ตามลำดับ (รูปที่ 6)

ในผู้ป่วย P053 จากวิธี ERIC-PCR พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ในระยะ R2 และ R3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความเหมือนกัน 92% (รูปที่ 6A) และจากวิธี PFGE ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความเหมือนกัน 100% (รูปที่ 6B) ซึ่งก็เป็นการยืนยันว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็น clone เดียวกัน และเป็น clone ที่ต่างจากเชื้อที่พบในระยะ R1 ของผู้ป่วยคนดังกล่าวเนื่องจากผลของ ERIC-PCR และ PFGE ให้ผลเป็น 55% และ 50% ตามลำดับ (รูปที่ 6)

สำหรับผู้ป่วย P072 พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระยะ R1, R2 และ R3 ที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี ERIC-PCR และ PFGE มีความเหมือนกัน 65% (R1 และ R2), 50% (R3) และ 40% (R1 และ R2), 18% (R3) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อต่าง clone กัน นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า วิธี PFGE มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี ERIC-PCR (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากผู้ป่วยที่ได้รับยา ciprofloxacin

(A) ตรวจสอบโดยวิธี ERIC-PCR, (B) ตรวจสอบโดยวิธี PFGE

1, 2 และ 3 = เชื้อ *E. coli* จาก R1, R2 และ R3 ตามลำดับ ของผู้ป่วย P019,

4, 5 และ 6 = เชื้อ *E. coli* จาก R1, R2 และ R3 ตามลำดับ ของผู้ป่วย P053,

7, 8 และ 9 = เชื้อ *E. coli* จาก R1, R2 และ R3 ตามลำดับ ของผู้ป่วย P072 และ

10 = *E. coli* ATCC 2592

## การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในปัจจุบันนี้มีการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในวัตถุประสงค์ของการป้องกัน (prophylaxis) และการรักษา (treatment) จึงอาจส่งผลให้เกิดการพัฒนาของเชื้อดื้อยาได้ ยาในกลุ่ม fluoroquinolone และ beta-lactams มักถูกนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าแกรมลบ ซึ่งพบว่าเชื้อมีการดื้อยาสองกลุ่มนี้เพิ่มขึ้น ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistant Surveillance Thailand, NARST) รายงานการพบเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วย ซึ่งมีอัตราการดื้อยา ampicillin, ceftriaxone, ceftazidime, gentamicin และ ciprofloxacin เพิ่มขึ้นจาก 79.3% เป็น 85.3%, 12.7% เป็น 28.5%, 10.7% เป็น 15.2%, 25% เป็น 32.9% และ 45.1% เป็น 51% ตามลำดับ ในช่วง 6 ปี (ค.ศ. 2000-2005) นอกจากนี้ยังรายงานว่า การดื้อยา ciprofloxacin มีความสัมพันธ์กับการใช้ยาในกลุ่ม fluoroquinolone อย่างมีนัยสำคัญ (Polwichai *et al.*, 2009)

จากการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาก rectal swabs ของผู้ป่วยเด็กมะเร็งที่ได้รับเคมีบำบัด พบว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin กลุ่มยาที่เชื้อ *E. coli* ดื้อมากที่สุดได้แก่ fluoroquinolone (24.0% และ 67.8% ตามลำดับ) และยาที่เชื้อ *E. coli* ดื้อน้อยที่สุดในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับ ciprofloxacin คือยาในกลุ่ม beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors (2.0%) และในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin คือ extended-spectrum cephalosporins (2.0%) (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. coli* ทุกไอโซเลทยังคงไวต่อยา imipenem และ meropenem ซึ่งยาทั้ง 2 ชนิดเป็นยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs

การศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant *E. coli*) ซึ่งแยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยาและได้รับยา ciprofloxacin เท่ากับ 6.0% (6/100) และ 2.0% (3/149) ตามลำดับ เชื้อเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดปัญหาในการรักษาตามมาได้เนื่องจากเชื้อดื้อยาหลายกลุ่มที่ใช้ในการรักษา

จากการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ beta-lactamases ด้วยวิธี combination disk พบว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin มีเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 15 ไอโซเลท ซึ่งพบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลทเท่านั้น ที่ดื้อยา ceftazidime (CAZ) และ cefotaxime (CTX) มี 1 ไอโซเลทที่ดื้อยา ceftazidime (CAZ) เพียงชนิดเดียว และอีก 4 ไอโซเลท ไม่ดื้อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ที่ใช้ทดสอบเลย (initial screening test) ส่วนในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin มีเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 20 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้น ที่ดื้อยา ceftazidime (CAZ) และ cefotaxime (CTX) อีก 19 ไอโซเลท ไม่ดื้อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ที่ใช้ทดสอบเลย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *E. coli* จำนวน 4 และ 19 ไอโซเลทดังกล่าวอาจจะดื้อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ชนิดอื่นที่ไม่ได้อยู่ในการศึกษาครั้งนี้ เช่น cefpodoxime ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk ควรจะเพิ่มแผ่นยา cefpodoxime และ cefpodoxime/clavulanic acid เข้ามาใช้

ในการตรวจหาด้วย และอาจจะใช้วิธีอื่นร่วมด้วย เช่น วิธี double disk เพื่อใช้ตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับ initial screening test

จากผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ESBLs (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* และ *bla<sub>CTX-M</sub>*) พบว่า ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin ตรวจพบยีน *bla<sub>CTX-M</sub>* มากที่สุด โดยเฉพาะ *bla<sub>CTX-M-15</sub>* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CTX-M-15 โดยเอนไซม์นี้มีการรายงานพบในเชื้อ *E. coli* sequence type (ST) 131 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดทั่วโลก (Rogers *et al.*, 2011) ในประเทศไทยมีการรายงานพบเอนไซม์ CTX-M-15 เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจต่างๆในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Chanawong *et al.*, 2007)

เอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M สามารถจัดได้ 6 กลุ่มตามความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence similarity) คือ CTX-M-1, -2, -8, -9, -25 and -45 lineages (Rossolini *et al.*, 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบการสร้างเอนไซม์ CTX-M-14 และ CTX-M-15 ในเชื้อ *E. coli* ซึ่งแยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin ซึ่ง CTX-M-14 จัดอยู่ใน CTX-M-9 lineage และ CTX-M-15 จัดอยู่ใน CTX-M-1 lineage

นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs มากกว่า 1 ยีน คือยีน *bla<sub>SHV-12</sub>* + *bla<sub>TEM-20</sub>*-like ในเชื้อซึ่งแยกจากกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin ก่อนหน้านั้นการศึกษาของ Kiratisin *et al* (2008) พบว่า 11.5% ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลศิริราชและโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs มากกว่า 1 ยีน นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า จำนวนยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ไม่สัมพันธ์กับค่า MIC ของยา ceftazidime กล่าวคือไม่ได้ทำให้ MIC ของยาสูงขึ้น

จากการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ AmpC ด้วยวิธี combination disk (phenotypic confirmatory test) พบว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin มีเชื้อดื้อยา ceftazidime จำนวน 3 ไอโซเลท (initial screening test) สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC ได้จำนวน 1 ไอโซเลท และในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin มีเชื้อดื้อยา ceftazidime จำนวน 8 ไอโซเลท (initial screening test) สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC ได้จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลทที่ดื้อยา ceftazidime แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC ได้เหล่านี้ อาจเกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณ promoter ของยีน *ampC* ซึ่งเมื่อตรวจหายีน *ampC* ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 8 ไอโซเลท ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC ได้ แต่ดื้อยา ceftazidime พบว่าทุกไอโซเลทมียีน *ampC* เชื้อ *E. coli* ทั้งหมดจะสร้างเอนไซม์ AmpC ในระดับต่างๆ เนื่องจากมี weak promoter แต่เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยาในกลุ่ม beta-lactams โดยเฉพาะยา ceftazidime (strong inducer) จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ นอกจากนี้ promoter ที่มีการกลายพันธุ์จะส่งผลให้เชื้อ *E. coli* สร้างเอนไซม์ AmpC ในปริมาณมากได้ (overexpression) และน้อยลงได้ (Polsfuss *et al.*, 2011) ดังนั้นการศึกษารายการกลายพันธุ์ของ promoter ด้วยวิธีการ sequencing เพื่อยืนยันจึงมีความจำเป็น ในการศึกษาต่อไปอาจจะใช้การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ AmpC วิธีอื่น เช่น วิธี AmpC disk test (Black *et al.*, 2005) ควบคู่กันไป นอกจากนี้อาจจะมีการศึกษาอื่นที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา ceftazidime ซึ่งไม่ใช่การสร้างเอนไซม์ AmpC

แม้มีรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างทั้งเอนไซม์ ESBLs และดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone (Pasom *et al.*, 2013; Winissorn *et al.*, 2013) ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ *E. coli*



ที่ดื้อยา ciprofloxacin ร่วมกับการสร้างเอนไซม์ ESBLs และ จำนวน 7.0% (7/100) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin และจำนวน 12.1% (18/149) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin ซึ่งในปี ค.ศ. 2003 มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ซึ่งแยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs และดื้อยา ciprofloxacin จำนวน 47.0% (Ingviya *et al.*, 2003)

การศึกษาดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone มีความสำคัญเนื่องจากยาในกลุ่ม fluoroquinolone เช่น ciprofloxacin เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และยังมี การใช้ยาในกลุ่มนี้ในผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับเคมีบำบัดด้วย Laoprasopwattana *et al* (2013) ได้รายงานว่ายาน ciprofloxacin สามารถลดการเกิดไข้ในผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ ในประเทศไทยพบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone จำนวน 38.3% ในแผนก ICU ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (Thongpiyapoom *et al.*, 2004) ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ciprofloxacin ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin เท่ากับ 24.0% (24/100) และ 67.8% (101/149) ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ในผู้ป่วยหลังได้รับยา ciprofloxacin เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ (R2, R3) มีจำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้ก่อนได้รับยา ciprofloxacin (R1) แสดงว่าการได้รับยา ciprofloxacin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา ciprofloxacin ได้

การดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone เป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ของยีน DNA gyrase และ topoisomerase IV นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเกิดจากการที่เชื้อได้รับยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และ *qepA* ซึ่งเป็นยีนที่พบบนพลาสมิด (Dalhoff, 2012) โดยยีน *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) ผลิตโปรตีน Qnr มีหน้าที่ป้องกันเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) และ topoisomerase IV จากการจับของยา กลุ่ม fluoroquinolone (Cattoir and Nordmann, 2009; Jacoby *et al.*, 2009) และยีน *qepA* ผลิตโปรตีน QepA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) เพื่อลดระดับของยาภายในเซลล์ (Perichon *et al.*, 2007; Fabrega *et al.*, 2009) ดังนั้นเชื้อที่ดื้อหรือไม่ได้ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone หากมียีนเหล่านี้ร่วมอยู่ด้วยก็จะสามารถทำให้เชื้ออยู่ในสภาวะที่มียาในกลุ่มนี้ได้ เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ciprofloxacin ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin มี 101 ไอโซเลท และ 87 ไอโซเลท มีค่า MIC ต่อยา ciprofloxacin  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  (E-test) การที่เชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่มีค่า MIC ต่อยา ciprofloxacin ที่สูงอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในหลายตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV ดังนั้นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เหล่านี้จึงมีความน่าสนใจ

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin จำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งดื้อยา ciprofloxacin แต่ตรวจไม่พบยีนทั้ง 4 ชนิด (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และ *qepA*) ดังนั้นกลไกการดื้อยาในไอโซเลทนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเป้าหมายบนโครโมโซม (*gyrA*, *gyrB*, *parC* และ *parE*) จึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปโดยการตรวจหายีนเหล่านี้ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อดูตำแหน่งการกลายพันธุ์

มีการรายงานพบเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากปัสสาวะของผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น มียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone มากกว่า 1 ยีน (Pasom *et al.*,

2013) ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone มากกว่า 1 ยีน ซึ่งพบทั้งในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin เนื่องจากยีนเหล่านี้อยู่บน พลาสมิด จึงสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปสู่เชื้ออื่นๆได้

มักมีรายงานว่าพบยีน *qnr* อยู่ร่วมกับยีนอื่นๆบน *sul1*-type integron ยีน *qnrA* และ *qnrB* มักจะแทรกเข้าสู่ integron ซึ่งเป็นแหล่งเก็บยีนดื้อยาตัวอื่นๆ นอกจากนี้ยีน *qnr* มักพบใน แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้ (Guan *et al.*, 2013)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *qnrA* และยีน *bla<sub>CTX-M</sub>* อยู่บนพลาสมิด แต่การที่จะบอกว่ายีนทั้ง 2 อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน จะต้องทำการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่ดื้อยา ciprofloxacin แต่มียีน *qnr* อยู่ แสดงให้เห็นว่ายีน *qnr* ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV จากการจับของยากกลุ่ม fluoroquinolone ไม่ได้เกี่ยวข้องในการดื้อต่อยา ciprofloxacin เพียงอย่างเดียว ยีน *qnr* อาจจะทำหน้าที่อื่นที่ไม่ใช่การป้องกันเอนไซม์ดังกล่าว หรืออาจเกิดจากการได้รับพลาสมิดที่มียีน *qnr* เข้ามา

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin โดยดูจากลายพิมพ์ DNA ของเชื้อโดยใช้วิธี ERIC-PCR และ PFGE พบว่า เชื้อที่แยกได้ใน ระยะ R1 ของผู้ป่วย P019 และ P053 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่างจากเชื้อ ที่แยกได้ในระยะ R2 และ R3 เป็นไปได้ว่าเชื้อที่แยกได้ในระยะ R1 ของผู้ป่วยทั้ง 2 คน ซึ่งไม่ดื้อยา ciprofloxacin หลังจากได้รับยา ciprofloxacin ทำให้เชื้อเหล่านี้ตาย ส่วนเชื้อที่ดื้อยา ciprofloxacin จะเหลือรอดมาจนถึงระยะ R2 และ R3 ซึ่งผลการศึกษาด้วยวิธี PFGE ได้แสดงให้เห็นว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระยะ R2 และ R3 ของผู้ป่วยทั้ง 2 คน มีความเหมือนกัน 100% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อ clone เดียวกัน สำหรับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย P072 ในระยะ R1, R2 และ R3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อมีความแตกต่างกันมาก จึงสามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อต่าง clone กัน

การศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานครั้งแรกของอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นแนวทางสำคัญ สำหรับแพทย์ต่อการเลือกยาปฏิชีวนะในการรักษา นอกจากนี้ควรมีการศึกษาถึงแนวโน้มของการดื้อยา และกลไกในการดื้อยาต่อไป

## สรุปผลการทดลอง

1. พบการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin 24.0% (24/100) และในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin 67.8% (101/149)
2. การได้รับยา ciprofloxacin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา ciprofloxacin ได้
3. พบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin 15.0% (15/100) และในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin 13.4% (20/149)
4. การได้รับยา ciprofloxacin ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ESBLs ได้
5. พบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M-15 มากที่สุด ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม
6. พบเชื้อ *E. coli* ที่มีการสร้างเอนไซม์ class A non-ESBLs beta-lactamases ซึ่งมีจำนวนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin ในระยะ R1, R2 และ R3
7. พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ AmpC ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin 1.0% (1/100) และในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin 1.3% (2/149)
8. จากการศึกษาคความไวของยาปฏิชีวนะพบอุบัติการณ์ของ multidrug resistant *E. coli* ที่แยกจากผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin 6.0% (6/100) และจากผู้ป่วยที่ได้รับยา ciprofloxacin 2.0% (3/149)
9. พบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ciprofloxacin ร่วมกับการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin 7% (7/100) และในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin 12.1% (18/149)
10. พบยีน *qnrA* และยีน *bla<sub>CTX-M</sub>* บนพลาสมิดของเชื้อ *E. coli*
11. จากตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin พบว่าเชื้อที่ดื้อยา ciprofloxacin และ สร้างเอนไซม์ ESBLs ซึ่งอยู่ในระยะ R2 และ R3 เป็นเชื้อ clone เดียวกัน
12. ในการการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าวิธี PFGE มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี ERIC-PCR

## บรรณานุกรม

- Al-Agamy, M. H. M., Shibl, A. M. and Radwan, H. H. 2012. Detection of mutations in quinolone-resistant determining regions in clinical isolates of *Escherichia coli* from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*. 11(5): 1054-1058.
- Anunnatsiri, S., Towiwat, P. and Chaimanee, P. 2012. Risk factors and clinical outcomes of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* septicemia at Srinagarind University Hospital, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 43(5): 1169-1177.
- Apisarnthanarak, A., Kiratisin, P., Saifon, P., Kitphati, R., Dejsirilert, S. and Mundy, L. M. 2007. Clinical and molecular epidemiology of community-onset, extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infections in Thailand: A case-case-control study. *American Journal of Infection Control*. 35: 606-612.
- Ball, P. 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46(3): 17-24.
- Baskaran, N. D., Gan, G. G., Adeeba, K. and Sam, I.-C. 2007. Bacteremia in patients with febrile neutropenia after chemotherapy at a university medical center in Malaysia. *International Journal of Infectious Diseases*. 11(6): 513-517.
- Bhanot, S., Singh, M. and Chatterjee, N. 2001. The Chemical and Biological Aspects of Fluoroquinolones Reality and Dreams. *Current Pharmaceutical Design*. 7(5): 311-335.
- Black, J. A., Moland, E. S. and Thomson K. S. 2005. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(7): 3110-3113.
- Bryskier, A. and Chantot, J.-F. 1995. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs*. 49(2): 16-28.
- Bucaneve, G., Micozzi, A., Menichetti, F., Martino, P., Dionisi, M. S., Martinelli, G., Allione, B., D'Antonio, D., Buelli, M. and Nosari, A. M. 2005. Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *New England Journal of Medicine*. 353(10): 977-987.
- Cagnacci, S., Gualco, L., Debbia, E., Schito, G. C. and Marchese, A. 2008. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25: H4-ST 131 and O15: K52: H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(8): 2605-2612.

- Cattoir, V. and Nordmann, P. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry*. 16(8): 1028-1046.
- Cavaco, L., Hasman, H., Xia, S. and Aarestrup, F. M. 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(2): 603-608.
- Chanawong, A., Lulitanond, A., Kaewkes, W., Lulitanond, V., Srigulbutr, S. and Homchampa, P. 2007. CTX-M extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Thai university hospital. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 38(3): 493-500.
- Corkill, J. E., Anson, J. J. and Hart, C. A. 2005. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(6): 1115-1117.
- Dalhoff, A. 2012. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012: 1-37.
- Danishta, I., Ismet, M., Sonatum, D. and Jaufeerally-Fakin, Y. 2010. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates from Environment and waste water samples in Mauritius. *Advances in Environmental Biology*. 4(1): 1-9.
- Dhillon, R. H.-P. and Clark, J. 2011. ESBLs: A clear and present danger? *Critical Care Research and Practice*. 2012: 1-11.
- Drawz, S. M. and Bonomo, R. A. 2010. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(1): 160-201.
- Drlica, K. and Zhao, X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(3): 377-392.
- Fabrega, A., Madurga, S., Giralt, E. and Vila, J. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*. 2(1): 40-61.
- Frank, T., Mbecko, J. R., Misatou, P. and Monchy, D. 2011. Emergence of quinolone resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the Central African Republic: genetic characterization. *BioMed Central Research Notes*. 4(1): 309.
- Freifeld, A. G., Bow, E. J., Sepkowitz, K. A., Boeckh, M. J., Ito, J. I., Mullen, C. A., Raad, I. I., Rolston, K. V., Young, J.-A. H. and Wingard, J. R. 2011. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010

- update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 52(4): e56-e93.
- Gomez, P. J., de los Rios, J. G., Mendoza, A. R., de Pedro Ramonet, P., Albiach, R. G. and Sainz, M. R. 2004. Molecular basis of quinolone resistance in *Escherichia coli* from wild birds. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 68(3): 229.
- Hanson, R., Kaneene, J. B., Padungtod, P., Hirokawa, K. and Zeno, C. 2003. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli*, and their resistance to antimicrobial agents, in farming communities in northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 33: 120-126.
- Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S. and Sakae, K. 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(2): 801-803.
- Hawser, S. P., Bouchillon, S. K., Hoban, D. J., Badal, R. E., Hsueh, P.-R. and Paterson, D. L. 2009. Emergence of high levels of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(8): 3280-3284.
- Hooper, D. C. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*. 2(1): 38-55.
- Hortiwakul, T., Nagij, S., Chusri, S. and Silpapojakul, K. 2012. Nosocomial bloodstream infection in Songklanagarind Hospital: outcome and factors influencing prognosis. *Journal of the Medical Association of Thailand* 95(2): 170-174.
- Ingvaya, N., Hortiwakul, R., Chayakul, P. and Thamjarungwong, B. 2003. Prevalence and susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing extended-spectrum betalactamases in Songklanagarind Hospital, Thailand. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*. 20(3): 127-134.
- Jacoby, G. A., Gacharna, N., Black, T. A., Miller, G. H. and Hooper, D. C. 2009. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(4): 1665-1666.
- Jacoby, G. A., Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A. and Hooper, D. C. 2006. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(4): 1178-1182.
- Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A. and Castanheira, M. 2010. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 51(3): 286-294.

- Jonas, D., Biehler, K., Hartung, D., Spitzmuller, B. and Daschner, F. D. 2005. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in German intensive care units. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(2): 773-775.
- Jouini, A., Vinue, L., Slama, K. B., Saenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A. and Torres, C. 2007. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60(5): 1137-1141.
- Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Saifon, P., Laesripa, C., Kitphati, R. and Mundy, L. M. 2007. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58: 349-355.
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G. and Irfan, S. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 10(9): 597-602.
- Kuntaman, K., Lestari, E. S., Severin, J. A., Kershof, I. M., Mertaniasih, N. M., Purwanta, M., Hadi, U., Johnson, J. R., Belkum, A. v. and Verbrugh, H. A. 2005. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Indonesia. *Emerging Infectious Diseases*. 11(9): 1363-1369.
- Laoprasopwattana, K., Khwanna, T., Suwankeeree, P., Sujjanunt, T., Tunyapanit, W. and Chelae, S. 2013. Ciprofloxacin reduces occurrence of fever in children with acute leukemia who develop neutropenia during chemotherapy. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 32(3): e94-e98.
- Levy, S. B. and Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*. 10: S122-S129.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L. and Nordmann, P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(1): 71-76.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A. and Jacoby, G. A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*. 351(9105): 797-799.
- Naber, K. G. 2001. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17(4): 331-341.

- Nagaraj, S., Chandran, S., Shamanna, P. and Macaden, R. 2012. Carbapenem resistance among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in south India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 30(1): 93.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J. and Johnson, J. R. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25: H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61(2): 273-281.
- Paltansing, S., Vlot, J. A., Kraakman, M. E., Mesman, R., Bruijning, M. L., Bernards, A. T., Visser, L. G. and Veldkamp, K. E. 2013. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae among travelers from the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 19(8): 1206-1213.
- Pasom, W., Chanawong, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Kenprom, S. and Puang-Ngern, P. 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac (6)-Ib-cr*, *qnrS*, *qnrB*, and *qnrA*, in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a teaching hospital, Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 66(5): 428-432.
- Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(4): 657-686.
- Perichon, B., Courvalin, P. and Galimand, M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(7): 2464-2469.
- Pfeifer, Y., Cullik, A. and Witte, W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 300(6): 371-379.
- Polsfuss, S., Bloemberg, G. V., Giger, J., Meyer, V., Böttger, E. C. and Hombach, M. 2011. Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(8): 2798-2803.
- Polwichai, P., Dejsirilert, S., Panpetch, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N. and Mootsikapun, P. 2009. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urine in Thailand from 2000 to 2005. *Journal of The Medical Association of Thailand* 92(4): S59-67.
- Pongpech, P., Naenna, P., Taipobsakul, Y., Tribuddharat, C. and Srifuengfung, S. 2008. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and class 1 integron integrase gene *intl1* in *Escherichia coli* from Thai patients and healthy adults. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 9(3): 425-433.



- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K. and Hooper, D. C. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*. 12(1): 83-88.
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E. and Paterson, D. L. 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(1): 1-14.
- Thongpiyapoom, S., Narong, M. N., Suwalak, N., Jamulitrat, S., Intaraksa, P., Boonrat, J., Kasatpibal, N. and Unahalekhaka, A. 2004. Device-associated infections and patterns of antimicrobial resistance in a medical-surgical intensive care unit in a university hospital in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 87(7): 819-824.
- Vigil, K. J., Johnson, J. R., Johnston, B. D., Kontoyiannis, D. P., Mulanovich, V. E., Raad, I. I., DuPont, H. L. and Adachi, J. A. 2010. *Escherichia coli* pyomyositis: an emerging infectious disease among patients with hematologic malignancies. *Clinical Infectious Diseases*. 50(3): 374-380.
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D. C. and Wang, M. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(5): 1892-1897.
- Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F. and Hooper, D. C. 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(7): 2242-2248.
- Winissorn, W., Pharm, B., Tribuddharat, C., Naenna, P., Leelarasamee, A. and Pongpech, P. 2013. Fluoroquinolone Resistance and Effect of *qnrA* Integron Cassettes in *Escherichia coli* Clinical Isolates in a University Hospital. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*. 30(1): 15-25.
- Winokur, P., Canton, R., Casellas, J.-M. and Legakis, N. 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clinical Infectious Diseases*. 32(Supplement 2): S94-S103.
- Yamane, K., Wachino, J.-i., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T. and Arakawa, Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(9): 3354-3360.
- Zhao, X., Xu, C., Domagala, J. and Drlica, K. 1997. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(25): 13991-13996.

<http://www.bangkokhealth.com/index.php/health/health-system/infectious/> (accessed September 20, 2012)

Manuscript Number:

Title: CHARACTERISTICS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM CHILDREN WITH CANCER IN SONGKLANAGARIND HOSPITAL

Article Type: Original Article

Section/Category: Drug Resistance / Antimicrobial Susceptibility / Surveillance

Keywords: Escherichia coli, ESBLs, pediatric patients, leukemia, lymphoma, ciprofloxacin

Corresponding Author: Dr. rattanaruji pomwised, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Prince of Songkla University

First Author: Krittika Dummunee, Ms

Order of Authors: Krittika Dummunee, Ms; Kamolwish Laoprasopwattana, MD; Wanutsanun Tunyapanit, Ms; rattanaruji pomwised, Ph.D.; Varaporn Vuddhakul, Ph.D.

Abstract: The incidence of the Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and fluoroquinolone resistant Escherichia coli has been reported in many hospitals worldwide. However, this information in Thailand is still unclear especially in immunocompromised hosts with neutropenia. In this study, 100 E. coli isolates obtained from pediatric patients with leukemia and lymphoma from Songklanagarind Hospital were investigated. Using combination disk technique, 15 isolates of E. coli produced class A beta-lactamases (ESBLs) and 1 isolate produced both class A (ESBLs) and class C (AmpC) beta-lactamases. blaCTX-M, blaTEM and blaSHV were identified in 11, 1 and 1 isolates respectively whereas the combination of blaTEM and blaSHV was detected in 2 isolates. The most ESBL genes identified were blaCTX-M-15. Most of the isolates (24 isolates) were resistant to ciprofloxacin. Six, 14 and 4 of those isolates harbored 1, 2 and 3 plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes respectively. qnrA and qnrS were co-present mostly in fluoroquinolone resistant E. coli. Of the interest, 7 of 15 (46.7%) ESBL producers were also resistant to ciprofloxacin.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

1  
2  
3  
4 CHARACTERISTICS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED  
5  
6 FROM CHILDREN WITH CANCER IN SONGKLANAGARIND HOSPITAL  
7  
8  
9

10  
11 Krittika Dummunee<sup>1</sup>, Kamolwish Laoprasopwattana<sup>2</sup>, Wanutsanun Tunyapanit<sup>2</sup>, Rattana-ruji  
12  
13 Pomwised<sup>1</sup>, Varaporn Vuddhakul<sup>1</sup>  
14  
15

16  
17 <sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai campus,  
18  
19 Songkhla, Thailand, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Prince of Songkla  
20  
21 University, Hat Yai campus, Songkhla, Thailand  
22  
23

24  
25 Correspondence: Rattana-ruji Pomwised, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince  
26  
27 of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.  
28  
29

30  
31 Tel: (66) 74-288325; Fax: (66) 74-446661.  
32

33  
34 E-mail: rattana-ruji.p@psu.ac.th  
35  
36

37 **Running title:** ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* IN CHILDREN WITH  
38  
39 CANCER  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 **Abstract**  
5

6           The incidence of the Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and  
7 fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* has been reported in many hospitals worldwide.  
8  
9 However, this information in Thailand is still unclear especially in immunocompromised hosts  
10 with neutropenia. In this study, 100 *E. coli* isolates obtained from pediatric patients with  
11 leukemia and lymphoma from Songklanagarind Hospital were investigated. Using combination  
12 disk technique, 15 isolates of *E. coli* produced class A beta-lactamases (ESBLs) and 1 isolate  
13 produced both class A (ESBLs) and class C (AmpC) beta-lactamases. *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and  
14 *bla*<sub>SHV</sub> were identified in 11, 1 and 1 isolates respectively whereas the combination of *bla*<sub>TEM</sub> and  
15 *bla*<sub>SHV</sub> was detected in 2 isolates. The most ESBL genes identified were *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Most of the  
16 isolates (24 isolates) were resistant to ciprofloxacin. Six, 14 and 4 of those isolates harbored 1, 2  
17 and 3 plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes respectively. *qnrA* and *qnrS* were co-  
18 present mostly in fluoroquinolone resistant *E. coli*. Of the interest, 7 of 15 (46.7%) ESBL  
19 producers were also resistant to ciprofloxacin.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 **Keywords:** *Escherichia coli*, ESBLs, pediatric patients, leukemia, lymphoma, ciprofloxacin  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Introduction

Antibiotic resistance has become a significant problem worldwide due to inappropriate uses of antimicrobial treatment in clinical and agriculture. In addition, it has been used for prophylaxis especially in some immunocompromised hosts such as cancer patients [1] leading to increased multidrug resistant bacteria, prolonged hospitalization, costly medication and failure treatment. Among antibiotic resistant organisms, *E. coli* is one of the most causative agents detected in neutropenia patients receiving chemotherapy [2]. Multidrug resistant *E. coli* was detected especially with extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) [3]. In Malaysia, investigation of febrile neutropenia patients after chemotherapy revealed that 11.1 % of *E. coli* and *Klebsiella spp.* isolated from blood culture were ESBL producers [1]. Most ESBL-producing bacteria have been reported with the resistance to broad-spectrum antibiotics including penicillins, narrow- and extended-spectrum cephalosporins and monobactam [4]. These bacteria generally acquire plasmids containing genes encoding for ESBL enzymes. ESBLs can be categorized into 3 major groups, SHV, TEM and CTX-M encoded by *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> respectively. To date, more than hundred ESBLs have been reported (URL: <http://www.lahey.org/studies/>). The CTX-M has been predominant ESBLs especially CTX-M-15 [5].

ESBLs are widely detected among Enterobacteriaceae. ESBL-producing *E. coli* was a major cause of infections in cancer patients [6]. Specimens from intra-abdominal infections obtained from Asia/Pacific, Latin America, North America, Europe and Africa/Middle East were investigated for ESBL-producing *E. coli*. Thirty-four point nine percent, 21.6%, 4.8%, 8% and 12.1% of ESBL-producing *E. coli* have been detected respectively [7]. In addition, out of 34.9% of ESBL-producing *E. coli* in Asia/Pacific, ESBL-positive *E. coli* was highly detected in India (79%) followed by China (55%) and Thailand (50.8%) [8]. Moreover, the report from Siriraj

1  
2  
3  
4 Hospital, Bangkok, Thailand showed that 37 out of 120 clinical isolates (31%) were confirmed as  
5  
6 ESBL producers [9].

7  
8  
9 *E. coli* resisting to fluoroquinolone has been reported due to the intensive uses of this  
10  
11 antibiotic in medical treatments [10]. In the United States, 55% of ST131 *E. coli* from patients  
12  
13 hospitalized in many US medical centers were resistant to both fluoroquinolone and  
14  
15 trimethoprim-sulfamethoxazole [11]. Investigation of 148 *E. coli* with low susceptibility to  
16  
17 ciprofloxacin obtained from 8 European countries revealed that 122 (82.4%) of those isolates  
18  
19 were resistant to two or more additional antibiotics [12]. In Asia, the study program surveillance  
20  
21 from Indonesia to investigate antibiotic resistance in *E. coli* isolated from patients and healthy  
22  
23 household members revealed that the prevalence of fluoroquinolone resistance was 8% [13]. In  
24  
25 Thailand, information of fluoroquinolone resistant *E. coli* is still limited, although ciprofloxacin  
26  
27 resistant *E. coli* has been demonstrated in some samples obtained from human and animals [14-  
28  
29 16]. Therefore, the aims of this study were to determine incidence of ESBL-producing *E. coli* and  
30  
31 fluoroquinolone resistant *E. coli* isolated from pediatric patients with cancer in Songklanagarind  
32  
33 Hospital.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 **Materials and methods**

5  
6  
7 **Patients and bacterial isolation**

8  
9  
10 A total of 100 *E. coli* isolates were obtained from rectal swabs from 42 pediatric patients  
11 aged 3 months - 18 years old with leukemia and lymphoma who were hospitalized at  
12 Songklanagarind Hospital located in Songkhla province, southern Thailand during April 2007 -  
13  
14 March 2009. The patients received either the induction or consolidation phase of chemotherapy.  
15  
16 Patients with signs of fever or infections were excluded from the study. The isolates were  
17  
18 identified as *E. coli* by biochemical tests. The study was approved by the Ethics Committee of the  
19  
20 faculty of medicine, Prince of Songkla University, where the hospital is associated.  
21  
22  
23  
24  
25  
26

27  
28 **Antimicrobial susceptibility investigation**

29  
30  
31 Antimicrobial susceptibility of all isolates to ciprofloxacin (CIP), ceftazidime (CAZ),  
32  
33 sulperazone (SUL; cefoperazone+sulbactam), imipenem (IMI), meropenem (MEM), amikacin  
34  
35 (AMK), gentamicin (GEN) (BBL, USA) ceftazidime (CAZ) and cefotaxime (CTX) (Oxoid, UK)  
36  
37 was evaluated using disk diffusion method on Muller-Hinton agar according to the clinical and  
38  
39 laboratory standards institute criteria [17]. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of  
40  
41 ciprofloxacin and ceftazidime were determined by E-test (AB Biodisk, Sweden). *E. coli* ATCC  
42  
43 25922 was used as a reference strain.  
44  
45  
46  
47

48  
49 All isolates were investigated for ESBL production by the combination disk method.  
50  
51 Isolates which showed the difference of inhibition zone  $\geq 5$  mm between ceftazidime and  
52  
53 cefotaxime with/without clavulanic acid were considered as ESBL producers [17]. Ability to  
54  
55 produce AmpC was detected by the ceftazidime-cloxacillin disk diffusion test. The isolates that  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4 exhibited the difference of inhibition zone  $\geq 4$  mm between cefoxitin with/without cloxacillin  
5  
6 were considered as AmpC producers [18].  
7  
8

### 9 10 **Antibiotic resistance genotyping**

11  
12 In order to analyze antibiotic resistance genotypes, crude DNA extract was obtained by  
13  
14 boiling method. Briefly, one colony of isolates was suspended in 100  $\mu$ l of deionized water and  
15  
16 boiled at 100°C for 10 min. Then 2  $\mu$ l of the suspension were used as DNA template for PCR.  
17  
18

19  
20 To classify ESBL genes, multiplex PCR was performed using *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-</sub>  
21  
22 <sub>M</sub> primers [19] and PCR targeted to *ampC* (class C beta-lactamases detection) was established  
23  
24 [20]. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qepA*) were  
25  
26 determined by PCR technique [21-22]. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis  
27  
28 followed by staining with ethidium bromide.  
29  
30

31  
32 Confirmation of resistance genes was performed by DNA sequencing. Nucleotide  
33  
34 sequences were analyzed using the BLAST online service (URL:  
35  
36 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Results

### Antimicrobial susceptibility test

All 9 antibiotics used in this study were categorized into 6 groups including fluoroquinolone (ciprofloxacin), extended-spectrum cephalosporins (ceftazidime and cefotaxime), cephamycins (cefoxitin), carbapenems (imipenem and meropenem), beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors (sulperazone) and aminoglycosides (amikacin and gentamicin) [23]. Fluoroquinolone and 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins are common antibiotics used to treat *E. coli*. Using disk diffusion assay, 66 isolates of *E. coli* were susceptible to all antibiotics and 34 isolates were resistant to at least one antibiotic group. Nine antibiotic resistance patterns were demonstrated (Table 1). Most of the isolates (15 isolates) were in the pattern 1 (ciprofloxacin resistance), whereas 1 and 5 isolates were classified as ceftazidime and gentamicin resistance respectively (pattern 2 and 3). Two to five antibiotic resistances were detected in the pattern 4 to 9. According to these antibiogram patterns, pattern 8 was composed of 3 antibiotic resistance groups including fluoroquinolone (CIP), extended-spectrum cephalosporins (CAZ/ CTX) and aminoglycosides (GEN/ AMK) whereas 4 antibiotic resistance groups including fluoroquinolone (CIP), extended-spectrum cephalosporins (CAZ/ CTX), cephamycins (FOX) and beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors (SUL) were organized in the pattern 9. Thus, 6 isolates of *E. coli* in those patterns were classified as multidrug resistant strains. It is of interest that all *E. coli* isolates were still susceptible to imipenem and meropenem.

It has been demonstrated that most of bacterial resistance to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins (ceftazidime or cefotaxime) associated with ESBL-producing bacteria [4]. Thus, in this work, 11 isolates of *E. coli* may be the ESBL producers (Table 1).

In the current study, MIC ranges for ciprofloxacin and ceftazidime were 0.004 to >32 µg/mL and 0.032 to >256 µg/mL respectively. MIC<sub>S50</sub> and MIC<sub>S90</sub> of ciprofloxacin and

1  
2  
3  
4 ceftazidime were investigated in all *E. coli* isolates. MIC<sub>S50</sub> of ciprofloxacin and ceftazidime  
5  
6 were 0.016 µg/mL and 0.125 µg/mL respectively whereas MIC<sub>S90</sub> of ciproflaxaic and ceftazidime  
7  
8 were >32 µg/mL and 32 µg/mL respectively.  
9

### 10 11 **Determiation of beta-lactamase-producing *E. coli***

12  
13  
14 Combination disk technique was performed to investigate beta-lactamases production in  
15  
16 all 100 *E. coli* isolates. The result indicated that 60 isolates were able to produce beta-lactamases  
17  
18 (Table 2). These included 11 *E. coli* isolates that resisted to ceftazidime or ceftazidime and  
19  
20 cefotaxime (data not shown). Only 2 classes of beta-lactamases were identified, class A and class  
21  
22 C. The enzymes from 45 and 15 isolates were classified in the class A non-ESBL and ESBL beta-  
23  
24 lactamases respectively. One isolate produced not only ESBLs but also the class C beta-  
25  
26 lactamases (AmpC positive) (Table 2). This isolate resisted ceftazidime, cefotaxime and  
27  
28 cefoxitin.  
29  
30  
31

### 32 33 **Confirmation of beta-lactamases genes**

34  
35  
36 Using PCR to confirm the presence of ESBL genes, all 45 non-ESBL producing beta-  
37  
38 lactamase- isolates were positive for *bla*<sub>TEM</sub> gene, producing TEM-type beta-lactamase. One, 1  
39  
40 and 11 ESBL-producing isolates carried *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes respectively. Thus  
41  
42 these isolates produced TEM, SHV and CTX-M-type ESBLs respectively (Table 3). Two isolates  
43  
44 were positive for both *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> producing both TEM and SHV-types ESBLs.  
45  
46 Confirmation of class C beta-lactamase revealed that 1 isolate was positive for *ampC*.  
47  
48 Interestingly, 2 cefoxitin resistant isolates (Table 1-pattern 9) were negative for AmpC detection  
49  
50 but they were positive for *ampC* gene.  
51  
52  
53

54  
55 In this study, all positive amplicons in ESBL genes were sequenced for subtype  
56  
57 determination (Table 3). Nucleotide sequences analysis demonstrated that *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was mostly  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 detected (7 isolates), followed by *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (4 isolates), *bla*<sub>TEM-20</sub>-like (1 isolate) and *bla*<sub>SHV-12</sub> (1  
5  
6 isolate) respectively. Combination of *bla*<sub>TEM-20</sub>-like and *bla*<sub>SHV-12</sub> was identified in 2 isolates.  
7  
8

### 9 **Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes**

10  
11 All 24 *E. coli* isolates that were resistant to ciprofloxacin were determined for plasmid-  
12 mediated fluoroquinolone resistance genes including *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qepA*. Six, 14 and 4  
13  
14 isolates harbored 1, 2 and 3 resistance genes respectively (Table 4). The *qnrA* and *qnrS* genes  
15  
16 were detected in 20 of 24 isolates (83.3%) whereas *qepA* were detected in 6 isolates.  
17  
18  
19

20  
21 Combination of two drug resistance genes, *qnrA* + *qnrS* and *qnrA* + *qepA*, were observed in 12  
22  
23 and 2 isolates respectively. Four *E. coli* isolates harbored 3 different genes including *qnrA* + *qnrS*  
24  
25 + *qepA* (Table 4). *qnrB* gene was not detected in all ciprofloxacin resistant *E. coli*.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Discussion

Antibiotics have been used intensively as therapeutic and prophylaxis agents leading to development of multidrug resistant bacteria. Beta-lactams and fluoroquinolone have played prominent therapeutic roles in Gram negative bacterial infection and most of clinical bacterial isolates are resistant to these agents. National Antimicrobial Resistant Surveillance Thailand (NARST) reported the increase of ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolated from catheterized urine samples from 45.1% to 51% during 2000 and 2005 [16]. In the present study, investigation of antibiotic resistance in *E. coli* was performed in pediatric patients with neutropenia. These immunocompromised patients were susceptible to this commensal bacterium. In addition, multidrug resistant *E. coli* has been demonstrated mostly in immunocompromise hosts [24].

In this work, ciprofloxacin was antibiotic that most of the *E. coli* isolates (24%) exhibited resistance and amikacin was the lowest drug resistance detection (1%). None of the isolates resisted to imipenem and meropenem. Hence, these antibiotics can be used in the treatment of ESBL-producing *E. coli*.

In the present study, 15 *E. coli* isolates were positive for ESBL genes. One isolate was resistant to ceftazidime whereas 10 isolate were resistant to both ceftazidime and cefotaxime (Table 1). The remaining 4 isolates were susceptible to ceftazidime and cefotaxime but they were classified as ESBL-producing *E. coli* by the combination disc method. In addition, these 4 isolates harbored ESBL genes. Association of these isolates with other 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins such as cefpodoxime was not detected in this work. Eleven, 2, 1 and 1 ESBL-producing isolates carried *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes respectively. CTX-M enzymes encoded by *bla*<sub>CTX-M</sub> have become the predominant ESBLs worldwide [25]. In Thailand, 89% of 82 CTX-M ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates from stool specimens of healthy volunteers in a rural area of Kanchanaburi, Thailand were *E. coli* [26]. CTX-M-9,

1  
2  
3  
4 CTX-M-14 and CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates were first reported in Thailand  
5  
6 from various clinical specimens in Srinagarind Hospital, Khon Kaen University [27]. CTX-M  
7  
8 enzymes can be divided into 6 lineages based on amino acid sequences including CTX-M-1, -2, -  
9  
10 8, -9, -25 and -45 lineages [28]. We found that 7 and 4 isolates produced CTX-M-15 and CTX-  
11  
12 M-14 respectively which were classified into CTX-M-1 and CTX-M-9 lineages respectively.  
13  
14 Combinations of two or more ESBL genes have been reported in many *E. coli* isolates from  
15  
16 Siriraj Hospital and Thammasart Hospital, Thailand [29]. We detected 2 isolates with  
17  
18 combination of ESBL genes (*bla*<sub>TEM-20</sub>-like + *bla*<sub>SHV-12</sub>). However, the combination of those  
19  
20 ESBL genes did not correlate to the MICs reported in this study (data not shown).  
21  
22  
23  
24  
25

26 In this work 7 of 15 (46.7%) ESBL-producing *E. coli* resisted to ciprofloxacin which  
27  
28 correlated to the study in 2003 that 47% of ESBL-producing *E. coli* isolates obtained from  
29  
30 patients in Songklanagarind Hospital were resistant to ciprofloxacin [30]. Two cefoxitin resistant  
31  
32 isolates (Table 1-pattern 9) could not produce AmpC enzyme, although they possessed *ampC*  
33  
34 gene. An *ampC* promoter has been reported to be important for *ampC* expression. Mutation in  
35  
36 this promoter decreases AmpC production and causes antibiotic susceptibility [31]. Thus,  
37  
38 analysis of the promoter from those 2 isolates will clarify this.  
39  
40  
41  
42

43 Fluoroquinolone resistant bacteria have been demonstrated in many hospitals. Incidence  
44  
45 of fluoroquinolone resistance in *E. coli* obtained from ICU of Songklanagarind Hospital in  
46  
47 Thailand was 38.3% [15]. Mechanisms of fluoroquinolone resistance are resulted from mutations  
48  
49 of target genes including *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* which located on bacterial chromosome.  
50  
51 However, plasmid-associated genes such as *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qepA* have been also  
52  
53 demonstrated to associate with fluoroquinolone resistance [32]. In this work, incidence of  
54  
55 fluoroquinolone resistance was detected in 24% of *E. coli* isolates and all those isolates were  
56  
57 associated with plasmid-mediated genes (Table 4). Combinations of more than one resistance  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 genes were detected in 18 of 24 isolates (75%) (Table 4). In Jamaica, combination of *qnrA*, *qnrB*  
5  
6 and *qnrS* was detected in 2% of bacteria belonging to Enterobacteriaceae [33]. In our study, the  
7  
8 quantity of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes was not associated with the MICs  
9  
10 of ciprofloxacin.  
11  
12

13  
14 In the present study, 6 isolates were classified as multidrug resistant *E. coli* (Table 1).  
15  
16 Four isolates were resistant to fluoroquinolone, extended-spectrum cephalosporins and  
17  
18 aminoglycosides. This antibiotic resistance pattern was similar to the report of Tsukamoto et al.  
19  
20 [34]. The remaining 2 isolates were resistant to four antibiotic groups including fluoroquinolone,  
21  
22 extended-spectrum cephalosporins, cephamycins and beta-lactam plus beta-lactamase inhibitors.  
23  
24 This is the first time to report this four-combination antibiotic resistance in Thailand. Thus, for  
25  
26 public health concern, further investigation on the sources of those 2 isolates is urgently needed  
27  
28 to control the spread of these resistant bacteria.  
29  
30  
31

32  
33 In conclusion, this is the first report on the incidence of multidrug resistant *E. coli* isolated  
34  
35 from pediatric patients in a Songklanagarind Hospital. The obtained results will be useful to  
36  
37 conduct an effective therapy for those immunocompromised patients. In addition, further  
38  
39 investigation on new drugs replacing those resistant antibiotics should be established.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Acknowledgments**

This work was supported by funding from the Government of Thailand (143909) and Prince of Songkla Graduate Studies Scholarship. We thank Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai campus, Songkhla, Thailand for *E. coli* clinical isolates.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Conflict of interest**

None

1  
2  
3  
4 **References**  
5  
6

- 7  
8 [1] Baskaran ND, Gan GG, Adeeba K and Sam I-C. Bacteremia in patients with febrile  
9  
10 neutropenia after chemotherapy at a university medical center in Malaysia. *Int J Infect*  
11  
12 *Dis.* 2007; 11: 513-7.  
13  
14  
15 [2] Vigil KJ, Johnson JR, Johnston BD et al. *Escherichia coli* pyomyositis: An emerging  
16  
17 infectious disease among patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis.* 2010;  
18  
19 50: 374-80.  
20  
21  
22 [3] Levy SB and Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and  
23  
24 responses. *Nat Med.* 2004; 10: S122-9.  
25  
26  
27 [4] Drawz SM and Bonomo RA. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.*  
28  
29 2010; 23(1): 160-201.  
30  
31  
32 [5] Rogers BA, Sidjabat HE and Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic,  
33  
34 multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemoth.* 2011; 66: 1-14.  
35  
36  
37 [6] Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, et al. Clinical practice guideline for the use of  
38  
39 antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious  
40  
41 Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: e56-93.  
42  
43  
44 [7] Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ and Badal RE. In vitro susceptibilities of aerobic  
45  
46 and facultative anaerobic Gram-negative bacilli from patients with intra-abdominal  
47  
48 infections worldwide from 2005–2007: results from the SMART study. *Int J Antimicrob*  
49  
50 *Agents.* 2009; 34: 585-8.  
51  
52  
53  
54 [8] Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh P R and Paterson D L.  
55  
56 Emergence of high levels of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative  
57  
58 bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:  
5  
6 3280-4.  
7  
8
- [9] Pongpech P, Naenna P, Taipobsakul Y, Tribuddharat C. and Srifuengfung S. Prevalence of  
9  
10 extended-spectrum beta-lactamase and class 1 integron integrase gene *int1* in *Escherichia*  
11  
12 *coli* from Thai patients and healthy adults. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*  
13  
14 2008; 9: 425-33.  
15  
16
- [10] Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use.  
17  
18 *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012; 2012: 1-37.  
19  
20
- [11] Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA and Castanheira M. *Escherichia coli*  
21  
22 sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections  
23  
24 in the United States. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 286-94.  
25  
26  
27  
28  
29  
30
- [12] Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC and Marchese A. European emergence of  
31  
32 ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25: H4-ST 131 and O15: K52: H1  
33  
34 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2605-12.  
35  
36  
37
- [13] Kuntaman K, Lestari ES, Severin JA, et al. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*,  
38  
39 Indonesia. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1363-9.  
40  
41  
42
- [14] Hanson R, Kaneene JB, Padungtod P, Hirokawa K and Zeno C. Prevalence of *Salmonella*  
43  
44 and *E. coli*, and their resistance to antimicrobial agents, in farming communities in  
45  
46 northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002; 33: 120-6.  
47  
48  
49
- [15] Thongpiyapoom S, Narong M, Suwalak N, et al. Device-associated infections and patterns  
50  
51 of antimicrobial resistance in a medical-surgical intensive care unit in a university hospital  
52  
53 in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2004; 87: 819-24.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 [16] Polwichai P, Dejsirilert S, Panpetch S, Sawanpanyalert P, Aswapokee N and Mootsikapun  
5  
6 P. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urine in Thailand from 2000  
7  
8 to 2005. J Med Assoc Thai. 2009; 92: S59-67.  
9  
10  
11 [17] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial  
12  
13 susceptibility testing; Twenty-second informational supplement M100-S22. Wayne.  
14  
15 CLSI, 2012.  
16  
17  
18 [18] Tan TY, Ng LSY, He J, Koh TH and Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect  
19  
20 plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus*  
21  
22 *mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 146-9.  
23  
24  
25  
26 [19] Monstein H, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M, Nilsson M, Dornbusch K and Nilsson L.  
27  
28 Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>  
29  
30 genes in Enterobacteriaceae. Apmis. 2007; 115: 1400-8.  
31  
32  
33 [20] Mammeri H, Nazic H, Naas T, Poirel L, Leotard S and Nordmann P. AmpC beta-lactamase  
34  
35 in an *Escherichia coli* clinical isolate confers resistance to expanded-spectrum  
36  
37 cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 4050-3.  
38  
39  
40 [21] Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy C J and Nordman, P. Multiplex PCR for detection of  
41  
42 plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial  
43  
44 isolates. J Antimicrob Chemoth. 2007; 60: 394-7.  
45  
46  
47 [22] Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA and Hooper DC. Prevalence of plasmid-  
48  
49 mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob Agents  
50  
51 Chemother. 2009; 53: 639-45.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 [23] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R. B. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-  
5  
6 resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim  
7  
8 standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 268–81.  
9  
10  
11 [24] Levy SB. Factors impacting on the problem of the antibiotic resistance. J Antimicrob  
12  
13 Chemoth. 2002; 49: 25-30.  
14  
15  
16 [25] Coque T, Baquero F and Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing  
17  
18 Enterobacteriaceae in Europe. Euro Surveill. 2008; 13: 5437-53.  
19  
20  
21 [26] Sasaki T, Hirai I, Niki M, et al. High prevalence of CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing  
22  
23 Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. J  
24  
25 Antimicrob Chemoth. 2010; 65: 666-8.  
26  
27  
28 [27] Chanawong A, Lulitanond A, Kaewkes W, Lulitanond V, Srigulbutr S and Homchampa P.  
29  
30 CTX-M extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae  
31  
32 in a Thai university hospital. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007; 38: 493-  
33  
34 500.  
35  
36  
37  
38 [28] Rossolini GM, D'Andrea MM and Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-  
39  
40 spectrum  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008; 14(Suppl. 1): 33-41.  
41  
42  
43 [29] Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C and Saifon P. Molecular characterization and  
44  
45 epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and  
46  
47 *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand,  
48  
49 where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 2818-24.  
50  
51  
52  
53 [30] Ingviya N, Hortiwakul R, Chayakul P and Thamjarungwong B. Prevalence and  
54  
55 susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing  
56  
57 extended-spectrum betalactamases in Songklanagarind Hospital, Thailand. J Infect Dis  
58  
59 Antimicrob Agents. 2003; 20: 127-134.  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

[31] Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009; 22: 161-82.

[32] Hernández A, Sanchez MB and Martínez JL. Quinolone resistance: much more than predicted. Front Microbiol. 2011; 2: 1-6.

[33] Stephenson S, Brown PD, Holness A and Wilks M. The emergence of *qnr*-mediated quinolone resistance among Enterobacteriaceae in Jamaica. West Indian Med J. 2010; 59: 241-4.

[34] Tsukamoto N, Ohkoshi Y, Okubo T, et al. High prevalence of cross-resistance to aminoglycosides in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. Chemotherapy. 2013; 59: 379-84.



**Table 2** Phenotypes of *beta-lactamase*-producing *E. coli*

<i>Beta-lactamases</i>		No. of <i>E. coli</i> (n = 100)
Class A	non-ESBLs	45
	ESBLs	15
Class C	AmpC	1 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> = *E. coli* co-produces AmpC and ESBLs



**Table 3** Genotypes of ESBLs detected in *E. coli*

Beta-lactamase phenotypes (no. of isolates)	Beta-lactamase genotypes (no. of isolates)	
	gene	subtype
ESBLs (15)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-20-like</sub> (1)
	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> (1)	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> (1)
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub> (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-20-like</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> (2)
	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (11)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> (4)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (7)		
AmpC (1 <sup>a</sup> )	<i>ampC</i> (1)	-

<sup>a</sup> = *E. coli* co-produces AmpC and ESBLs

**Table 4** Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes detected in ciprofloxacin resistant *E.*

*coli*

No. of detected genes	No. of <i>E. coli</i> isolates (n = 24) (%)
1. 1 gene <i>qnrA</i> <i>qnrS</i>	2 (8.3) 4 (16.7)
2. 2 genes <i>qnrA</i> + <i>qnrS</i> <i>qnrA</i> + <i>qepA</i>	12 (50.0) 2 (8.3)
3. 3 genes <i>qnrA</i> + <i>qnrS</i> + <i>qepA</i>	4 (16.7)