



ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากเด็กที่
เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

Characteristics of Antibiotic Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolated
from Children with Cancer in Songklanagarind Hospital

วราภรณ์ ขุนเพชร
Waraporn Khunpet

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต 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 *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จาก
เด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ผู้เขียน นางสาววราภรณ์ ขุนเพชร

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

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

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

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พญ.กมลวิช เลาประสพวัฒนา)

.....
(รองศาสตราจารย์ พญ.กมลวิช เลาประสพวัฒนา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ัย สุขุมังกูร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

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

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.รัตนรุจิ ฟูมิเศษ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาววราภรณ์ ขุนเพชร)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาววราภรณ์ ชุนเพชร)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
ผู้เขียน	นางสาววราภรณ์ ขุนเพชร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

Klebsiella pneumoniae เป็นเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และพบบ่อยว่ามีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug-resistant) วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด การดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactam และ การดื้อยาปฏิชีวนะ fluoroquinolone ในเชื้อ *K. pneumoniae* 77 ไอโซเลทที่แยกได้จาก rectal swabs (R) ในผู้ป่วยเด็กที่เป็น acute lymphoblastic leukemia (ALL) หรือ lymphoma จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยแบ่งเชื้อ *K. pneumoniae* ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับ placebo (P) และกลุ่มได้รับยา ciprofloxacin (C) โดยทั้งสองกลุ่มแบ่งย่อยออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มก่อนได้รับยา 1 สัปดาห์ (R1) กลุ่มหลังจากได้รับยาแล้ว 1 สัปดาห์ (R2) และกลุ่มหลังจากได้รับยาแล้ว 2 สัปดาห์ (R3) จากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด ตรวจสอบหา plasmid-mediated quinolone รวมทั้งเอนไซม์ ESBLs พบว่าจำนวนเชื้อที่ดื้อต่อ ciprofloxacin ในกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ C_{R1} และ C_{R2+R3} คิดเป็น 14.6, 12.5 และ 84.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ยีนที่เป็น plasmid-mediated quinolone ที่พบมากคือ *qnrB* และ *qnrS* จำนวนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs ในกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ C_{R1} และ C_{R2+R3} คิดเป็น 35.4, 12.5 และ 23.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบยีน *bla_{TEM}* มากที่สุดคิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาพบยีน *bla_{SHV}* คิดเป็น 86.3 เปอร์เซ็นต์และพบยีน *bla_{CTX-M}* คิดเป็น 59.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังพบเชื้อที่ไม่สร้าง ESBLs แต่มียีนกลุ่มการสร้างเอนไซม์ ESBLs อีกด้วย พบว่าการที่เชื้อได้รับยา ciprofloxacin ทำให้เชื้อดื้อยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) แต่ไม่ได้มีความสัมพันธ์กันในการผลิตเอนไซม์ ESBLs และไม่ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug-resistant)

Thesis Title	Characteristics of antibiotic resistance in <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from children with cancer in Songklanagarind Hospital
Author	Miss Waraporn Khunpet
Major Program	Microbiology
Academic year	2015

Abstract

Klebsiella pneumoniae is the main causative agent of nosocomial infection. It has been frequently reported multidrug-resistant organism. Our study is aimed to determine the prevalence of multidrug-resistance, beta-lactamase producer and fluoroquinolone resistance in 77 isolates of *K. pneumoniae* obtained from rectal swabs (R) of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) or lymphoma from Songklanagarind Hospital. The patients were separated into 2 groups; placebo (P) group and ciprofloxacin (C) group based on treatment with placebo or ciprofloxacin. In both groups, bacteria were divided into 3 subgroups, *K. pneumoniae* isolated from patients before receiving placebo or ciprofloxacin 1 week (R1), *K. pneumoniae* isolated from patients after treatment with placebo or ciprofloxacin 1 week (R2) and *K. pneumoniae* isolated from patients after treatment with placebo or ciprofloxacin 2 weeks (R3). Susceptibility to nine antibiotics were investigated including, plasmid-mediated quinolone genes and ESBLs producing genes. Prevalences of ciprofloxacin resistance in $P_{R1+R2+R3}$, C_{R1} and C_{R2+R3} were 14.6%, 12.5% and 84.6% respectively. The result showed that most of *K. pneumoniae* carried *qnrB* and *qnrS* gene. The prevalence of ESBLs producing in $P_{R1+R2+R3}$, C_{R1} and C_{R2+R3} were 35.4%, 12.5% and 23.1% respectively. Most isolates carried gene *bla*_{TEM}, followed by *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} with 91.0%, 86.3% and 59.1% respectively, and then isolates were non-ESBLs beta-lactamase producer but carried ESBLs genes. This study indicated that increase detection of ciprofloxacin treatment *K. pneumoniae* was demonstrated in ciprofloxacin treatment patients ($P \leq 0.05$) but there was no correlation between

ciprofloxacin treatment both ESBLs producing and multidrug-resistance in the bacteria.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	28
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	29
วัสดุอื่นๆ	30
อุปกรณ์และเครื่องมือ	30
แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา	31
วิธีการทดลอง	32
3. ผลการทดลอง	41
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	50
5. สรุปผลการทดลอง	53
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก ก	64
ภาคผนวก ข	66
ภาคผนวก ค	68
ประวัติผู้เขียน	75

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ beta-lactamases	15
1.2 ความชุกของเชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>K. pneumoniae</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์และโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่	22
2.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนที่ดื้อยาปฏิชีวนะ	36
2.2 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน <i>qnr</i> (<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>)	37
2.3 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน ESBL (<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{TEM}</i>)	37
2.4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน <i>traA</i>	39
2.5 สภาวะการทำปฏิกิริยาของ PCR ของยีน <i>traA</i>	40
3.1 จำนวน isolates ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ทั้งหมด 77 isolates ที่แยกจากผู้ป่วยเด็กของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์	41
3.2 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ทั้งหมด 77 ไอโซเลท	42
3.3 แบบแผนการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อกลุ่ม P _{R1+R2+R3} , C _{R1} และ C _{R2+R3}	44
3.4 จำนวนยีนกลุ่ม fluoroquinolone ในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่ดื้อต่อ ciprofloxacin	46
3.5 การผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม beta-lactamase ในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i>	47
3.6 ชนิดของยีนที่พบในกลุ่ม non-ESBLs และกลุ่ม ESBLs	48

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> บน MacConkey agar	8
1.2 โครงสร้าง beta-lactam ring ในยาในกลุ่ม beta-lactam	12
1.3 ตัวอย่างโครงสร้างของยาในกลุ่ม beta-lactam	13
1.4 การใช้วิธี combination disk diffusion method ในการหาการสร้างเอนไซม์ ESBL	24
1.5 ตัวอย่างการหาค่า MIC ด้วยวิธี E-test	24

สัญลักษณ์และคำย่อ

ค.ศ.	=	คริสต์ศักราช
%	=	Percentage
°C	=	Degree Celsius
bp	=	Base Pair
Kb	=	Kilobase
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
mM	=	Millimolar
μM	=	Micromolar
μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
μm	=	Micrometer
ml	=	Milliliter
l	=	Liter
Min	=	Minute
s	=	Second
hr	=	Hour
ESBL	=	Extended-Spectrum Beta-Lactamase
MIC	=	Minimum Inhibitory Concentration

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องส่งผลกระทบต่อทั่วโลกจนเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งทางการแพทย์ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ต้องเข้าพักรักษาตัวที่โรงพยาบาลเป็นเวลานานหรือมีความถี่ในการเข้ารับการรักษาบ่อยมักมีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเหล่านี้จากโรงพยาบาล (nosocomial infection) ซึ่งการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเกิดจากแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) หรือเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) ซึ่งทำให้เกิดโรคได้เมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง (immunocompromised host)

กระทรวงสาธารณสุขได้เผยถึงสถานการณ์เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะของไทย พบว่าปัญหาเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็น รวมทั้งบริโภคนยาไม่ตรงตามคำสั่งแพทย์อย่างเคร่งครัด ส่งผลให้พบคนไทยติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะปีละกว่า 1 แสนคน ใช้เวลารักษาตัวนานขึ้นรวมกันปีละกว่า 3 ล้านวัน ในปี 2553 มีผู้ป่วยติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเสียชีวิต 38,481 ราย มูลค่าสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการเจ็บป่วยและเสียชีวิตก่อนวัยอันควรปีละกว่า 40,000 ล้านบาท ดังนั้นทางกระทรวงจึงเร่งแก้ไขโดยให้โรงพยาบาลทุกแห่งจ่ายยาปฏิชีวนะอย่างสมเหตุสมผล เพิ่มมาตรฐานการเฝ้าระวังอย่างเคร่งครัดและควบคุมการติดเชื้อในโรงพยาบาล รวมทั้งส่งเสริมการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างถูกต้อง (ที่มา: ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือ National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand: NARST Thailand)

จากการศึกษาผลกระทบจากการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในประเทศไทย โดยสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (Health Systems Research Institute: HSRI) ได้ศึกษาข้อมูลของผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาล และข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาลทุกระดับทั่วประเทศจำนวน 1,023 แห่งในปี 2553 พบแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug-resistant) เรียงตามลำดับดังนี้ 1) *Escherichia coli* 2) *Klebsiella pneumoniae* 3) *Acinetobacter baumannii* 4) *Pseudomonas aeruginosa* 5) *Staphylococcus aureus* เห็นได้ว่า *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะที่พบได้มากเป็นอันดับสองและมีความสำคัญในการ

ก่อโรครุนแรงอีกหลายชนิด เช่น โรคปอดบวม (pneumonia) โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) โรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ (urinary tract infections: UTI) เป็นต้น

การดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug-resistant) มักพบมากในกลุ่ม Enterobacteriaceae (Paterson, 2006, Pfeifer *et al.*, 2010) โดยเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล การดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam ของเชื้อกลุ่มนี้เกิดจากการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase และเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้อง เอนไซม์ในกลุ่ม beta-lactamase ที่พบการรายงานสูง ได้แก่ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) (Winokur *et al.*, 2001) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการทำลายโครงสร้างที่เรียกว่า beta-lactam ring ของยาในกลุ่ม beta-lactam ได้แก่ penicillins, third generation cephalosporins, fourth generation cephalosporins รวมทั้งกลุ่ม monobactams เอนไซม์ ESBL มีหลายชนิด และมีประสิทธิภาพในการทำลายยาในแต่ละตัวแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการรายงานการดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ด้วยเนื่องจากในระยะหลังมีการใช้ยาในกลุ่มนี้มากขึ้นในการรักษาโรคติดเชื้อจาก *K. pneumoniae*

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactam และ fluoroquinolone ในเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งในเชิงอุบัติการณ์ (incidence) และลักษณะการดื้อยาทั้งสองชนิด เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันผู้ป่วยและเป็นการช่วยแพทย์ในการเลือกจ่ายยาในการรักษาผู้ป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อ *K. pneumoniae* เพื่อป้องกันการเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด และเพื่อเฝ้าระวังการระบาดและการถ่ายทอด multidrug-resistant gene สู่อีกกลุ่ม Enterobacteriaceae

การตรวจเอกสาร

1. Enterobacteriaceae

แบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (gram negative bacilli) โดยปกติแล้วแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน น้ำ และพืช นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหาร สามารถเจริญได้ง่ายทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) ไม่มีการสร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase แต่สร้างเอนไซม์ catalase ได้ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดและก๊าซ หรือให้กรดเพียงอย่างเดียว และรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้ มีทั้งพวกที่เคลื่อนที่ได้ (motile) และไม่เคลื่อนที่ได้ (non-motile) โดยแบคทีเรียบางกลุ่มจะอาศัยแฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) ในการเคลื่อนที่

แบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ enriched media เช่น blood agar หรือ chocolate agar บางชนิดมีลักษณะโคโลนีเยิ้มเพราะสามารถสร้าง capsule ได้ เช่น *Klebsiella* spp. บางชนิดสามารถสลายเม็ดเลือดบน blood agar ได้ แต่ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ออกจากกันได้ การแยกเชื้อในกลุ่มนี้ทำได้โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท selective media ที่มีการเติมสารบางชนิดลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยสารที่เติมลงไปนั้นไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ต้องการ เช่น MacConkey agar ซึ่งสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และอาหารชนิดนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ Enterobacteriaceae ตามความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ lactose fermenter, non-lactose fermenter และ delayed fermenter โดยกลุ่ม lactose fermenter สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสให้เป็นกรดแลคติก ซึ่งสามารถเปลี่ยนสี indicator ทำให้โคโลนีมีสีแดงหรือสีชมพู ตัวอย่างเชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. เป็นต้น ส่วนกลุ่ม non-lactose fermenter โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่มีสี ตัวอย่างเชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Edwardsiella* spp. และ *Proteus* spp. เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้แต่ใช้เวลา 3-7 วันหรือ delayed fermenter ได้แก่ *Citrobacter* spp. และ *Arizona* spp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถแยกกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยใช้อาหาร differential media หรือ transport media เพื่อให้มีความจำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละชนิดมากขึ้น โดยเลือกใช้ให้เหมาะสมกับจุดประสงค์และประเภทของแบคทีเรียแต่ละชนิด

แบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในมนุษย์ โดยบาง Genus พบการดำรงชีวิตเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์เช่น *E. coli* และ *Enterobacter* spp. บาง Genus สามารถก่อโรคได้หลากหลายชนิด โดยเป็นได้ทั้งเชื้อก่อโรคจริง (true pathogen) และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) Genus ที่พบเป็นเชื้อก่อโรคจริง ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ *Yersinia enterocolitica* เป็นต้น รวมไปถึงบางสายพันธุ์ของ *E. coli* โดยแบคทีเรียเหล่านี้มักก่อโรคในระบบทางเดินอาหารจากการกินอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป ส่วนเชื้อที่ก่อโรคแบบฉวยโอกาสได้แก่ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *Proteus mirabilis* เป็นต้น โดยพบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหารและก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Paterson, 2006) โรคที่มักพบคือโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infections: UTI) (Dias Neto *et al.*, 2003, Sudha *et al.*, 2013) โดยเฉพาะภาวะกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของโรคดังกล่าวถึงร้อยละ 70 ของเชื้อที่เป็นสาเหตุทั้งหมด นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (respiratory tract infection) การติดเชื้อของแผล (wound infection) การติดเชื้อในกระแสเลือด (bloodstream infection) รวมไปถึงการติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System infection) ได้อีกด้วย แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถแยกจากสิ่งส่งตรวจได้ถึงร้อยละ 50 ของแบคทีเรียทั้งหมด และพบถึงร้อยละ 70-80 ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ รูปแท่ง (Denton, 2007) จึงมีความจำเป็นที่ห้องปฏิบัติการต้องให้ความสำคัญในการแยกพิสูจน์และทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะกับแบคทีเรียกลุ่มนี้

2. *Klebsiella* spp.

2.1 *Klebsiella* spp.

เชื้อ *Klebsiella* spp. สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถแบ่ง 2 กลุ่มคือกลุ่มที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ในผิวน้ำ สิ่งปฏิภูลของเสีย ในดินหรือพืชผัก ต้นไม้ต่างๆ และกลุ่มที่พบในสิ่งมีชีวิต ทั้งคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลากหลายชนิดเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30-35°C โดยเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกมักโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C หรือใกล้เคียงอุณหภูมินี้

Klebsiella spp. สามารถเติบโตได้ดีในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ น้ำทิ้งหรือน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงโรงงานพวกผลิตภัณฑ์จากไม้และผักสด อาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลและกรดในปริมาณสูง แม้กระทั่งในน้ำผลไม้เข้มข้นหรือต้นไม้และผลิตภัณฑ์จากไม้ นอกจากนี้

พบทั่วไปในเนื้อไม้แล้ว ยังมีรายงานว่า พบในฝุ่นและน้ำเสียจากโรงงานผลิตไม้หรือพวกกระดาษ เนื่องจากมีการตรวจพบเชื้อ *Klebsiella* ในโพรงจมูกของคนงานในโรงงานจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ *Klebsiella* ได้บ่อยจากบริเวณผิวยางของต้นพืชหลายชนิด ทั้งนี้ *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* หรือ *K. planticola* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ในการตรึงไนโตรเจนดังกล่าวต้องอาศัย fimbriae ของเชื้อในการเกาะติดกับรากของต้นพืช โดย type 3 fimbriae จะมีประสิทธิภาพในการยึดเกาะมากกว่า type 1 fimbriae เนื่องจากแบคทีเรียยึดเกาะกับขนรากได้แน่นและมีพื้นที่ผิวในการจับกับเมือกบริเวณหุ้มรากมากกว่า (Brisse *et al.*, 2006)

2.2 การจัดจำแนกเชื้อ *Klebsiella* spp.

การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ taxonomic structure สามารถแยก *Klebsiella* spp. ออกเป็น 8 species ดังนี้ 1) *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 subspecies ได้แก่ *K. pneumoniae* subspecies *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* และ *K. pneumoniae* subspecies *rhinoscleromatis* 2) *K. granulomatis* 3) *K. oxytoca* 4) *K. planticola* 5) *K. ornithinolytica* 6) *K. terrigena* 7) *K. mobilis* 8) *K. variicola* (Brisse *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งสายพันธุ์ของ *Klebsiella* ออกตามประเภทของ antigen ที่อยู่บนผิวเซลล์ได้เป็น 2 ประเภท คือ O antigen และ K antigen โดย O antigen เป็นองค์ประกอบของ lipopolysaccharide (LPS) จากการศึกษานี้ในปี 2006 พบว่าสามารถแบ่ง O antigen ออกเป็น 9 type ได้แก่ O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 และ O12 โดย *K. pneumoniae* O1 เป็น type ที่พบได้มากที่สุดหน้าที่สำคัญของ O antigen คือ ป้องกันเชื้อ *K. pneumoniae* จากพวก complement ส่วน K antigen เป็นส่วนของแคปซูลที่ห่อหุ้มตัวเชื้อ ซึ่งปัจจุบันสามารถจำแนกได้มากกว่า 80 type (Brisse *et al.*, 2006)

2.3 ปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค (virulence factors)

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้เพิ่มความรุนแรงของโรคของเชื้อ *Klebsiella* มีดังนี้

2.3.1 แคปซูล โดยมีองค์ประกอบคือน้ำตาล 4-6 หมู่ และกรดยูโรนิก (uronic acid) แคปซูลเป็นองค์ประกอบสำคัญในการก่อความรุนแรงของโรค ทำหน้าที่เป็น antiphagocytic โดยช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการ phagocytosis ของ polymorphonuclear cell และยับยั้งการจับหรือกระตุ้นของระบบ complement (Podschun and Ullmann, 1998)

2.3.2 Pili เป็นองค์ประกอบที่ช่วยในการยึดเกาะ (adhesion) ของตัวเชื้อโดยเชื้อจะใช้ pili ในการยึดจับกับโฮสต์บริเวณ mucosal surface สามารถแบ่งชนิดของ pili ใน

Klebsiella spp. เป็น 2 ประเภท ได้แก่ type 1 (common) pili และ type 3 pili โดย type 1 pili การตอบสนองแบบ D-mannose-sensitive hemagglutinins (MSHA) และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination of erythrocyte) ในสัตว์ทดลอง ส่วน type 3 pili จะพบการตอบสนองแบบ D-mannose-resistance hemagglutinins (MRHA)

2.3.3 Lipopolysaccharide (LPS) เป็นส่วนประกอบสำคัญในชั้นผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียแกรมลบ LPS เป็นสาเหตุสำคัญของการก่อโรคของแบคทีเรียและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการช็อกจากการติดเชื้อ (septic shock) LPS ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ 1) lipid A 2) core oligosaccharide 3) O-antigenic polysaccharide (O side chain) ซึ่งเป็น polysaccharide chain ที่มีน้ำตาลชนิดพิเศษมาต่อกัน แบคทีเรียแกรมลบสามารถเปลี่ยนโครงสร้าง O antigen ได้ จึงสามารถหลบหลีกจากการทำลายของ antibody ของโฮสต์ได้ ปัจจุบันพบว่าสามารถจำแนก O side chain ใน *K. pneumoniae* ได้ 9 serotype ดังที่กล่าวมาแล้ว โดย O1 antigen เป็น O antigen ชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดใน *K. pneumoniae* (Hsieh et al., 2012)

2.3.4 Siderophore เป็นสารเมทาโบไลต์ชนิดทุติยภูมิที่มีมวลโมเลกุลต่ำและมีความจำเพาะกับธาตุเหล็กสูง มักจะสร้างโดยราและแบคทีเรียในสภาวะที่ขาดแคลนหรือไม่มีธาตุเหล็ก โดยปล่อย siderophore ออกมานอกเซลล์เพื่อแข่งขันในการจับระหว่างเหล็กกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อนำเหล็กที่จับได้ไปใช้ในเมทาบอลิซึมของเชื้อ โดยผลจากการขาดธาตุเหล็กอาจทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคหรือเซลล์โฮสต์ไม่สามารถเจริญได้

2.4 การก่อพยาธิสภาพ (Pathogenesis)

การก่อโรคของ *Klebsiella* ต้องอาศัยปัจจัยสำคัญที่มีส่วนทำให้เกิดพยาธิสภาพ 4 ปัจจัยหลัก ได้แก่ adhesins, capsular polysaccharides, lipopolysaccharides และ siderophore ซึ่งทั้งหมดเป็นปัจจัยทำให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factors) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นที่ทำให้เชื้อเกิดการเพิ่มจำนวนหรือทำให้เกิดการอักเสบ รวมถึงเกิดการกลายพันธุ์ ในระดับ genome ของเชื้อ (Podschun and Ullmann, 1998)

K. pneumoniae เป็นสาเหตุสำคัญของโรคปอดอักเสบชุมชน (community-acquired pneumonia) และจากการศึกษาของกลุ่มนักวิจัยชาวยุโรปในปี ค.ศ.1990 พบว่า มีผู้ป่วย 2.3% เข้ารับการรักษาในแผนกผู้ป่วยวิกฤตด้วยโรคปอดอักเสบชุมชน การตรวจสอบสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดอักเสบชุมชนช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1996 ถึงปี ค.ศ. 1997 จากสิ่งส่งตรวจ 28 ตัวอย่างในประเทศไต้หวัน (ทวีปเอเชีย) และ 25 ตัวอย่างในประเทศแอฟริกาใต้ (ทวีปแอฟริกา) พบว่ามี *K. pneumoniae* ที่ก่อให้เกิดโรคปอดอักเสบชุมชนในไต้หวันคิดเป็น 29% และในแอฟริกาใต้ 62% (Ko et al., 2002)

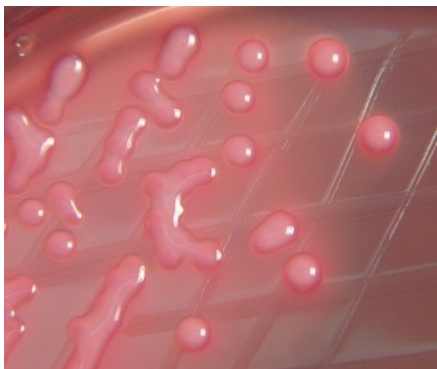
จากการศึกษาความชุกของการเกิดโรคฝีตับ (liver abscess) ที่เกิดจากเชื้อ *K. pneumoniae* ในผู้ป่วย พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ทำให้เกิดโรคฝีตับในประเทศไต้หวัน สิงคโปร์ เกาหลีใต้ ฮองกง ไทย และญี่ปุ่น ซึ่งเป็นประเทศในกลุ่มทวีปเอเชีย (Ko *et al.*, 2002) และยังพบว่า *K. pneumoniae* serotype K1 เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคฝีตับได้มากกว่าพวกที่เป็น non-*Klebsiella* และเป็นสาเหตุทำให้ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานเกิดโรคฝีตับ (Kim J. *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่สรุปว่า *K. pneumoniae* serotype K1 และ serotype K2 เป็นสายพันธุ์สำคัญที่ก่อโรคฝีตับ (Yeh *et al.*, 2007, Siu *et al.*, 2012)

นอกจากนั้น *K. pneumoniae* ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โดยมีรายงานจากผู้ป่วยที่เป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบทั้งหมด 7 คน เป็นชาวไต้หวัน 5 คนและชาวแอฟริกาใต้ 2 คน พบว่ามีผู้ป่วย 4 คนเคยเป็นโรคเบาหวานมาก่อน (Ko *et al.*, 2002) และมีรายงานในประเทศไต้หวันว่าผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบทั้งหมด 115 คนพบว่า 84% เป็นโรคปอดบวมชุมชน และ 64% มีการติดเชื้อในกระแสเลือดร่วมด้วย (Costerus *et al.*, 2012)

2.5 *Klebsiella pneumoniae*

เชื้อ *K. pneumoniae* จัดเป็น species หนึ่งใน Genus *Klebsiella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) มีขนาดประมาณ 0.3-1.0 ไมโครเมตร (μm) และยาว 0.6-6.0 ไมโครเมตร (μm) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) มีแคปซูล (encapsulated) จัดเป็น facultative anaerobic เมื่อย้อมแกรมจะเห็นแคปซูลเป็นวงใสรอบตัวเชื้อ ลักษณะเด่นของโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อคือ โคโลนีใหญ่ เยิ้ม และเหนียว (รูปที่ 1.1)

K. pneumoniae เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและเป็นแบคทีเรียก่อโรคอื่นอีกหลายชนิด ได้แก่ โรคปอดบวม โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ รวมไปถึงการติดเชื้อในระบบอื่นของร่างกาย แบคทีเรียนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งพื้นดินหรือผิวน้ำ รวมถึงพบในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทั้งคนและสัตว์ เช่น ลำไส้ทางเดินปัสสาวะ ทางเดินหายใจ รวมถึงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดหรือมีบาดแผลจากการอักเสบ รวมถึงบริเวณผิวหนังและยังพบได้ในอุจจาระอีกด้วย (Berrazeg *et al.*, 2013)



รูปที่ 1.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *K. pneumoniae* บน MacConkey agar
ที่มา: <https://www.pinterest.com/source/bacteriainphotos.com/>

นอกจาก *K. pneumoniae* จะเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลแล้ว นักวิจัยกลุ่มหนึ่งพบว่า *K. pneumoniae* เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตของผู้ป่วยเด็กประเภทผู้ป่วยวิกฤต (ICU) ถึง 70% รวมถึงยังเป็น species หลักที่พบการดื้อยาหลายชนิดในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา (Gupta *et al.*, 2003)

3. การดื้อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance)

ปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อทั่วโลก มีความซับซ้อนและรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและเศรษฐกิจ การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเกิดจากการที่แบคทีเรียปรับตัวต่อยาโดยกลไกต่างๆ เพื่อกำจัดและลดประสิทธิภาพของการดื้อยาอาจเกิดขึ้นเองจากรธรรมชาติ (natural resistance) หรือเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นในภายหลังได้รับยาปฏิชีวนะ (acquired resistance)

3.1 ระบาดวิทยาของการดื้อยาปฏิชีวนะ

ความชุกของการดื้อยาปฏิชีวนะพบได้ในทุกภาคส่วนของโลกในอัตราที่ต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระดับ ได้แก่ ระดับท้องถิ่น (local level) อัตราการดื้อยาในแต่ละชุมชนจะไม่เท่ากัน โดยในโรงพยาบาลศูนย์ขนาดใหญ่จะมีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะสูงกว่าในโรงพยาบาลชุมชน นอกจากโรงพยาบาลแล้วศูนย์ดูแลผู้ป่วยระยะยาวยังเป็นแหล่งของเชื้อดื้อยาอีกด้วย ระดับที่สองคือ ระดับประเทศ (national level) พบว่าความชุกของการดื้อยาในแต่ละประเทศจะแตกต่างกัน ขึ้นกับวิธีการในการสำรวจและความสามารถของห้องปฏิบัติการในการแยกเชื้อ ในทวีปยุโรปและอเมริกาจะมีรายงานการกระจายลงไปทางทิศใต้ คือ พบมากที่แถบเมดิเตอร์เรเนียนและละตินอเมริกาตามลำดับ ในเอเชียจะพบมากในประเทศจีนและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และระดับที่สามคือ ระดับ

นานาชาติ (international level) เป็นการกระจายของเชื้อดื้อยาที่ปรากฏขึ้นใหม่ (newly emerging resistant strains) ไปทั่วโลก ซึ่งเกิดจากการเดินทางของคนที่เป็นพาหะของเชื้อดื้อยานั้น (Luvara, 2006)

ปัจจัยเสี่ยง (risk factors) ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ การใช้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้างมาก่อน การอยู่โรงพยาบาลหรือการรักษาในศูนย์ดูแลผู้ป่วยระยะยาวเป็นระยะเวลานาน ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวรุนแรง เช่น โรคเบาหวาน หัวใจวาย โรคหลอดเลือดสมอง เป็นต้น รวมทั้งการติดเชื้อจากการรักษา ได้แก่ การใส่สายสวนต่างๆ การปนเปื้อนจากการดูแลของบุคลากรทางการแพทย์ และกลไกการควบคุมการติดเชื้อที่ไม่ดีพอ ทั้งหมดนี้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะได้

3.2 อนุพันธุศาสตร์ของการดื้อยาปฏิชีวนะ

การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่ทำให้เกิดการดื้อยาอาจเกิดขึ้นได้ 3 ระดับได้แก่

3.2.1 การเกิด point mutation ซึ่งเปรียบเป็น micro evolutionary change ทางพันธุกรรม ตัวอย่างที่สำคัญทางคลินิก คือ การเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่สำคัญเพียงตำแหน่งเดียวของ enzyme beta-lactamase ตัวเก่าทำให้ได้ extended-spectrum beta-lactamases ตัวใหม่ที่มีฤทธิ์มากขึ้น

3.2.2 การเรียงตัวใหม่ของ DNA ในแบคทีเรีย เปรียบเป็น macro evolution โดยกลไก inversion, duplication, insertion, deletion หรือ transposition ของ large sequence ของ DNA ระหว่าง chromosome หรือ plasmid ของแบคทีเรีย โดยมักเกิดการแลกเปลี่ยนผ่านทาง transposon (transposon เป็นองค์ประกอบ DNA ในแบคทีเรียซึ่งจะมียีนดื้อยาปฏิชีวนะอยู่และยีนเหล่านี้สามารถเคลื่อนย้ายผ่านทาง transposon ระหว่าง plasmid หรือ chromosome ซึ่งอาจเกิดภายในแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือข้ามชนิดก็ได้)

3.2.3 การที่เชื้อแบคทีเรียมีการแทรก DNA ใหม่เข้ารวมกับ DNA เก่าของแบคทีเรียโดย DNA ใหม่นี้อาจจะมากับ plasmid, bacteriophage, transposon หรือเป็น sequence ของ DNA โดดๆ (naked sequence of DNA)

3.3 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคแบ่งออกได้ 2 แบบคือ natural resistance เป็นลักษณะการดื้อยาที่มีอยู่เดิมตามธรรมชาติของเชื้อก่อโรคนั้นๆ ซึ่งอาจเป็นผลจากยาเข้าไปออกฤทธิ์ไม่ดีหรือไม่มี target ของเชื้อที่จำเพาะต่อ และอีกแบบคือ acquired resistance เป็นการดื้อยาที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นภายหลัง การเกิด acquired resistance นับเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นทั่วโลก

เนื่องจากทำให้การรักษาโรคติดเชื้อยากขึ้นหรือไม่มียาปฏิชีวนะใช้ในการรักษาโรคนั้นๆได้ ทั้งนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษามากขึ้นและผู้ป่วยมีโอกาสเกิดภาวะทุพพลภาพหรือเสียชีวิตได้สูงขึ้น ซึ่งการเกิด acquired resistance มักเป็นผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางและไม่เหมาะสมทั้งในด้านของการเกษตรและวงการแพทย์ เชื้อก่อโรคส่วนหนึ่งจะพยายามปรับตัวเพื่อการอยู่รอดหลังจากที่มีการสัมผัสกับยาปฏิชีวนะ (selective antimicrobial exposures) กลไกการดื้อยาแบบนี้นี้อาจเกิดได้หลายวิธีคือ

1) chromosomal-mediated resistance การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ค่อนข้างยากและเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในทุกครั้งที่เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยส่วนใหญ่จะไม่เกี่ยวข้องกับยาปฏิชีวนะทำให้เชื้อที่ดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะมีอยู่จำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อที่ไวต่อยา นอกจากนี้เชื้อที่เกิดการดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะอ่อนแอกว่าเชื้อที่ไวต่อยาจึงไม่ค่อยทำให้เกิดปัญหามากนักยกเว้นในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาปฏิชีวนะที่ทำลายเชื้อส่วนใหญ่ที่ไวต่อยา เชื้อที่ดื้อต่อยาเหล่านี้ก็จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นและก่อให้เกิดปัญหาในการรักษาตามมา การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนอาจส่งผลให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์หรือผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะในส่วนที่เข้าไปออกฤทธิ์ทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้หรืออาจทำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ออกมาทำลายยา การดื้อยาโดยวิธีนี้จะถ่ายทอดเฉพาะใน species เดียวกัน

2) plasmid-mediated resistance เป็นวิธีการสำคัญที่ก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรคอย่างรวดเร็วและแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง โดยการถ่ายทอด resistance plasmids (R-plasmids) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมในเซลล์ของแบคทีเรีย (extra chromosomal genetic elements) ที่บรรจุ resistance genes (R-genes) ของการดื้อยาไว้ การดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะทำให้เชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดและสามารถถ่ายทอดได้ทั้งใน species เดียวกันและข้าม species นอกจากนี้ plasmid ยังมีสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเอง (self-replication) การส่งผ่าน R-plasmids ไปยังเชื้อก่อโรคอื่นๆ ส่วนใหญ่อาศัยวิธีที่เรียกว่า conjugation ซึ่งเป็นวิธีการส่งผ่าน R-plasmids โดยตรงจากเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่มี R-plasmids ไปยังเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่ไม่มี R-plasmids ผ่าน sex pili การส่งผ่าน R-plasmids โดยวิธีนี้จำเป็นต้องมี genes อีกชนิดหนึ่งเพิ่มเติมโดยจะเป็นตัวกำหนดให้มีการเริ่มต้นกระบวนการถ่ายทอด plasmid นอกจากนี้แล้วการส่งผ่าน R-plasmids ยังทำได้โดยวิธี transduction ซึ่งจำเป็นต้องอาศัย bacteriophage เป็นพาหะนำส่ง

3) transposon-mediated resistance นอกจาก plasmid แล้ว transposon จัดเป็น extra chromosomal genetic element อีกชนิดหนึ่งที่สามารถส่งผ่าน R-genes ได้ โดยวิธีนี้เป็นการส่งผ่าน R-genes จาก plasmid หนึ่งไปยัง plasmid, chromosome หรือ

bacteriophage อื่น ข้อแตกต่างจาก plasmid คือ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ transposon ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง ขึ้นกับการแบ่งตัวของ chromosome, bacteriophage หรือ plasmid โดยทั่วไปการส่งผ่าน transposon จาก chromosome ของแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่งต้องมีการสอดแทรกของ transposon เข้าไปใน plasmid หรือ bacteriophage และอาศัยการส่งผ่าน plasmid หรือ bacteriophage อีกต่อหนึ่ง อย่างไรก็ตามมีการค้นพบ transposons ที่ไม่จำเป็นต้องอาศัย plasmid หรือ bacteriophage เรียก transposon ชนิดนี้ว่า conjugative transposon ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ transposon ยังมีส่วนสำคัญอย่างมากต่อองค์ประกอบที่เป็นตัวกำหนดให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดใน R-plasmids

3.3.1 กลไกการดื้อยาของเชื้อ

เชื้อก่อโรคแต่ละชนิดสามารถเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดซึ่งมีกลไกการดื้อยาแตกต่างกันออกไป ขณะเดียวกันการดื้อยาแต่ละชนิดสามารถเกิดได้จากหลายกลไก กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะที่พบได้คือ

1) การสร้างเอนไซม์มาื่อยสลายยา (enzymatic inhibition) เช่น เอนไซม์ beta-lactamase ทำลายยาในกลุ่ม beta-lactams เอนไซม์ acetyltransferase ทำลายยา chloramphenicol และเอนไซม์ aminoglycoside-modifying สลายยาในกลุ่ม aminoglycosides เป็นต้น

2) การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์ (target alteration) ได้แก่

- การลด affinity ของเป้าหมายต่อยาปฏิชีวนะ เช่น การลด affinity ของ penicillin binding proteins (PBPs) ต่อยา penicillin ใน *Streptococcus pneumoniae* หรือ *Staphylococcus aureus*

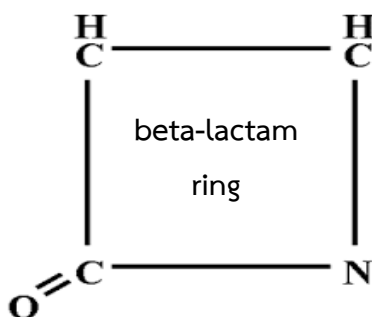
- การสร้างเป้าหมายใหม่หรือเปลี่ยนแปลงเส้นทางเมตาบอลิซึม เช่น การสร้าง PBP ชนิดใหม่ซึ่งไม่เคยมีมาก่อนใน methicillin-resistant *S. aureus*

3) การลดการนำยาเข้าเซลล์ของเชื้อก่อโรค (decrease uptake) ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การลดการซึมผ่านของยา เช่น การดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ของเชื้อ *P. aeruginosa* และการขับยาออกจากเซลล์ของเชื้อก่อโรค (efflux pump) เช่น การดื้อยาของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ต่อยา tetracycline การดื้อยาในกลุ่ม beta-lactams ของเชื้อ *P. aeruginosa* (Luvira, 2006)

3.4 ยากลุ่ม beta-lactam

ยากลุ่ม beta-lactams มีโครงสร้างที่สำคัญคือ วงแหวนที่เรียกว่า beta-lactam ring (รูปที่ 1.2) ซึ่งเป็นวงแหวนชนิด 4 อะตอม ยาออกฤทธิ์โดยการเข้าจับและยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาย peptidoglycan คือ carboxypeptidase และ transpeptidase จึงรวมเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า penicillin-binding protein (PBP) การออกฤทธิ์ของยาที่มีผลเฉพาะเซลล์ในระยะแบ่งตัวที่จำเป็นต้องมีการสร้างผนังเซลล์ ทำให้ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์และเซลล์ตายในที่สุด ยาในกลุ่ม beta-lactams จึงจัดอยู่ในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal)



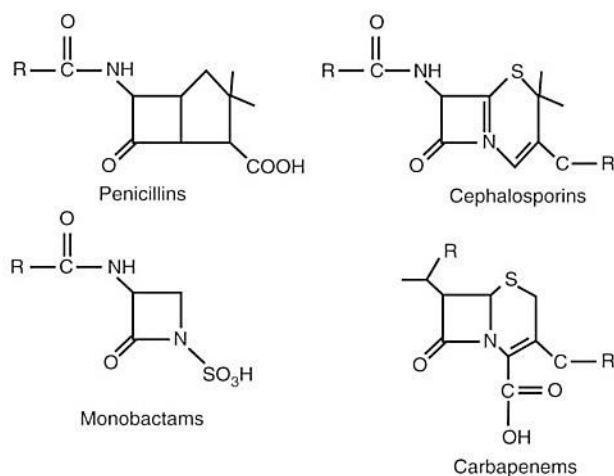
รูปที่ 1.2 โครงสร้าง beta-lactam ring ในยาในกลุ่ม beta-lactam

ยาในกลุ่ม beta-lactam มีการพัฒนาอย่างหลากหลาย โดยแบ่งเป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างของยา (Pfeifer *et al.*, 2010) คือ

1) penams ได้แก่ penicillin จัดเป็นสารที่มี beta-lactam ring เป็นโครงสร้างพื้นฐานออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โดยจับกับ penicillin-binding protein ชนิด 1-3 (PBP1-3) ทำให้ไม่เกิด transpeptidation จึงไม่มีการสร้าง peptidoglycan ก่อให้เกิด autolysis ทำให้เซลล์แตก

2) caphems ได้แก่ cephalosporins มีฤทธิ์ไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ชนิด PBP1-3 ซึ่งยาในกลุ่มนี้แบ่งเป็น 4 รุ่น (generations) ตามความกว้างในการออกฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมไปถึงการทนต่อเอนไซม์ beta-lactamase ยาที่เป็น first generation cephalosporins ได้แก่ cephalothin, cefazolin ใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ส่วนยาที่เป็น second generation cephalosporins ได้แก่ cefuroxime ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่า first generation cephalosporins คือทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ทำให้มีการออกฤทธิ์กับเชื้อแกรมลบเพิ่มขึ้น ส่วนยา third generation cephalosporins ได้แก่ cefpodoxime, ceftriaxone มีประสิทธิภาพดีใช้ได้กับแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก ส่วนยา fourth generation cephalosporins ได้แก่ cefepime มีฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบกว้างกว่าและทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ได้ดี

- 3) cephamycins ได้แก่ 7-alpha-methoxy cephalosporins เช่น cefoxitin
- 4) monobactams เช่น aztreonam เป็นยาในกลุ่ม beta-lactams ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้เซลล์ตาย โดยยาในกลุ่มนี้ทนต่อการทำลายด้วย beta-lactamases การดื้อยา aztreonam อาจพบในเชื้อ *K. oxytoca* ที่สามารถสร้าง K1 beta-lactamases ไปทำลายยาได้
- 5) penems เช่น faropenem
- 6) carbapenems เช่น imipenem และ meropenem เป็นยาในกลุ่มที่มี beta-lactams ที่ออกฤทธิ์กว้าง โดยยานี้สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีและทนต่อเอนไซม์ beta-lactamases รวมทั้ง extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)



รูปที่ 1.3 ตัวอย่างโครงสร้างของยาในกลุ่ม beta-lactam

กลไกของการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam ที่พบในกลุ่มเชื้อ Enterobacteriaceae มีหลายวิธี เช่น การสร้างเอนไซม์ทำลายยา และการลดการนำเข้ายา เป็นต้น โดยกลไกหลักจะเกิดจากเชื้อสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (drug inactivation) คือ เอนไซม์ beta-lactamases โดยเอนไซม์จะทำลาย ring ของยาในกลุ่ม beta-lactam ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้

3.5 เอนไซม์ beta-lactamases

เอนไซม์ beta-lactamases เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine peptidase ซึ่งมีตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine โดยเอนไซม์ beta-lactamases จะอาศัยหมู่ไฮดรอกซิลของ serine ในตำแหน่งออกฤทธิ์เข้าทำปฏิกิริยากับวงแหวน beta-lactam ในส่วนของยา เรียกปฏิกิริยานี้ว่า nucleophilic attack มีผลทำให้เกิดการแยกของพันธะ amide ของวง

แหวน beta-lactam และเกิดการเปิดออกของวงแหวน beta-lactam เรียกผลผลิตที่เกิดขึ้นว่า penicilloyl (สำหรับยาในกลุ่ม penicillins) หรือ cephalosporyl (สำหรับยาในกลุ่ม cephalosporins) ซึ่งจะเชื่อมกับกรดอะมิโน serine ในตำแหน่งออกฤทธิ์ของ beta-lactamases ทำให้เกิดเป็นสารกึ่งกลางที่เรียกว่า acylenzyme intermediate และต่อมาจะทำปฏิกิริยากับ โมเลกุลของน้ำ ทำให้โมเลกุลมีผลทำให้ยา beta-lactams ถูกทำให้หมดฤทธิ์ร่วมกับการคืนรูปของ beta-lactamases เพื่อทำลายยาต่อไป

การสร้าง beta-lactamases พบได้รวดเร็วภายหลังจากเริ่มมีการใช้ยา penicillin ในการต้านเชื้อ *S. aureus* โดยพบพลาสมิดที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ penicillinase และมีการแพร่กระจายออกไปอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันพบการสร้าง beta-lactamase ที่มีคุณสมบัติต่างกันไปในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ การจัดกลุ่มของ beta-lactamases ที่ใช้ในปัจจุบันมี 2 ระบบได้แก่ การจัดกลุ่มตามระบบของ Bush (Bush-jacoby-Medeiros) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (group1-4) ตาม function group คืออาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ และการจัดกลุ่มตามระบบของ Ambler ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (molecular class A-D) ตามคุณสมบัติทาง อณูชีววิทยาหรือโครงสร้างในระดับโมเลกุล (ตารางที่ 1.1)

เอนไซม์ beta-lactamases สามารถจำแนกตามลำดับ amino acid และ substrate ในแบบของ Ambler เป็น 4 classes คือ class A, B, C และ D (Szabo *et al.*, 2005, Mohawk *et al.*, 2010, Pfeifer *et al.*, 2010)

class A beta-lactamases มี serine ที่บริเวณ active site เป็นเอนไซม์ที่มีความหลากหลาย มีทั้งชนิด penicillinases และ cephalosporinases เช่น extended spectrum beta-lactamases (ESBLs), inhibitor resistant beta-lactamases (IRT) ซึ่งเอนไซม์ ESBLs เป็นเอนไซม์ beta-lactamases ที่สามารถทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยา penicillin ชนิด first generation cephalosporins, second generation cephalosporins, third generation cephalosporins และ aztreonam (แต่ไม่ดื้อยา cephamycins หรือ carbapenems) โดยการ hydrolysis ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ และถูกยับยั้งได้โดย beta-lactamase inhibitors เช่น clavulanic acid

class B มีคุณสมบัติเป็น metallo beta-lactamases คือต้องการ divalent cation ได้แก่ zinc ในการเร่งปฏิกิริยา class นี้ประกอบด้วยเอนไซม์ carbapenemases เช่น VIM และ IMP-type carbapenemases ซึ่งสามารถทำลายยาในกลุ่ม beta-lactams ได้ทุกชนิด

class C พบกรดอะมิโน serine ที่บริเวณ active site เช่นเดียวกับ class A มีคุณสมบัติเป็น chromosomal cephalosporinases ตัวอย่างเอนไซม์ เช่น ampC ซึ่งเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม cephamycins ซึ่งได้แก่ cefoxitin เอนไซม์ใน class นี้ไม่สามารถยับยั้งได้โดย clavulanic acid ซึ่งเป็น beta-lactamases inhibitor

ตารางที่ 1.1 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ beta-lactamases (ดัดแปลงจาก bush et al.)

Functional group	Subgroup	Molecular class	ยาเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์	คุณสมบัติของเอนไซม์
1	1	C	beta-lactam ทุกกลุ่ม ยกเว้น carbapenems	ampC beta-lactamases, ไม่สามารถยับยั้งด้วย clavulanic acid
2	2a	A	penicillins	penicillinases จากเชื้อแกรมบวก, สามารถยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid
	2b	A	penicillins, cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1 จากเชื้อแกรมลบหลายชนิด, สามารถยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid
	2be	A	penicillins, cephalosporins, monobactams	extended spectrum beta-lactamases (ESBL), สามารถยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid
	2br	A	penicillins	inhibitor-resistant beta-lactamases ใน TEM และ SHV
	2c	A	penicillins, carbenicillin	PSE-1 เป็นต้นไป (ยกเว้น PSE-2)
	2e	A	cephalosporins	ถูกกระตุ้นจาก <i>Proteus</i> spp., สามารถยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid

Functional group	Subgroup	Molecular class	ยาเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์	คุณสมบัติของเอนไซม์
2	2f	A	penicillins, cephalosporins, carbapenems	serine carbapenemases, สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid
	2d	D	penicillins, oxacillin	OXA-1 เป็นต้นไป รวมถึง PSE-2, สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid
3	3a, 3b, 3c	B	beta-lactam เกือบทุกกลุ่มรวมถึง carbapenems	metallo-beta-lactamases, ไม่สามารถยับยั้งด้วย clavulanic acid แต่ยับยั้งได้ด้วย EDTA
4	not determined		penicillins	penicillinases ที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้

class D enzyme มีคุณสมบัติเป็น oxacillinases สามารถทำลายยา oxacillin และสามารถ hydrolyse third generation cephalosporins นอกจากนั้น class D ยังมีคุณสมบัติเป็น plasmid cephalosporinase เช่น CMY, DHA, MOX, FOX และ ACCF

การสร้างเอนไซม์ beta-lactamases ที่พบบ่อยในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae คือ class A และ class C โดยเป็นได้ทั้งชนิด narrow spectrum และ broad spectrum enzymes

การจัดกลุ่มตามระบบของ Bush (Bush-jacoby-Medeiros) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1-4 และ 6 กลุ่มย่อย a-f ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ เอนไซม์ cephalosporinases ไม่สามารถถูกยับยั้งโดย clavulanic acid จัดอยู่ใน class C ตามการจัดจำแนกตามระบบของ Ambler

กลุ่มที่ 2 คือ เอนไซม์ penicillinase และ cephalosporinases ซึ่งสามารถถูกยับยั้งโดย clavulanic acid จัดอยู่ใน class A และ D ตามการจัดจำแนกตามระบบของ Ambler ได้แก่ เอนไซม์ TEM และ SHV ชนิดดั้งเดิม แต่เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป

จากทั้ง 2 เอนไซม์นี้มากขึ้นจึงแบ่งกลุ่มนี้ออกอีก 2 กลุ่มย่อยคือ 2a และ 2b โดยกลุ่มย่อย 2a ประกอบด้วย เอนไซม์ penicillinase เท่านั้น ส่วนกลุ่มย่อย 2b เป็น broad spectrum beta-lactamase ซึ่งหมายถึง เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถต่อการยับยั้งการทำงาน (inactivate) ของยาในกลุ่ม penicillin และ cephalosporins ในอัตราเดียวกัน นอกจากนั้นได้เกิดกลุ่มย่อยใหม่ที่แยกมาจากกลุ่มย่อย 2b ดังนี้

กลุ่มย่อย 2be ซึ่ง “e” หมายถึง extended spectrum of activity หมายถึง ESBL เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถต่อการยับยั้งการทำงานของยาในกลุ่ม third generation cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, cefpodoxime) ได้ดีเช่นเดียวกับที่ยับยั้งการทำงานของยาในกลุ่ม monobactam เช่น ยา aztreonam

กลุ่มย่อย 2br ซึ่ง “r” หมายถึง reduced binding to clavulanic acid and sulbactam หรือเรียกอีกอย่างว่า เอนไซม์ที่ต่อต้านตัวยับยั้ง beta-lactamase ที่เปลี่ยนมาจากเอนไซม์ TEM (inhibitor-resistant TEM derivative enzymes) เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถระงับความไวต่อ tazobactam ได้

กลุ่มย่อย 2c ถูกแยกออกจากกลุ่มที่ 2 เนื่องจากเอนไซม์กลุ่มนี้มีความสำคัญในการยับยั้งการทำงานของยา carbenicillin ได้ดีกว่ายับยั้งการทำงานของยา benzylpenicillin และมีผลต่อยา claxacillin บ้าง

กลุ่มย่อย 2d เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของยา cloxacillin ได้ดีกว่ายับยั้งการทำงานของยา benzylpenicillin และมีผลต่อยา carbenicillin ได้บ้าง เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid ไม่ดีนักและเอนไซม์บางชนิดในกลุ่มเป็น ESBL

กลุ่มย่อย 2e เอนไซม์ที่พบในกลุ่มนี้คือ cephalosporinases สามารถทำลายยาในกลุ่ม monobactam ได้แต่ถูกยับยั้งการทำงานโดย clavulanic acid

กลุ่มย่อย 2f ถูกเพิ่มเข้ามาเนื่องจากเอนไซม์กลุ่มนี้คือ serine-bases carbapenamases ซึ่งต่างจากกลุ่มที่ 3 ที่เป็น zinc-based carbapenamases

กลุ่มที่ 3 เอนไซม์กลุ่มนี้เป็น zinc-based หรือ metallo beta-lactamases จัดอยู่ใน molecular class B สามารถทำงานได้โดยใช้ไอออนโลหะของสังกะสี (metal ion zinc) โดยมีความสามารถในการทำลายยา penicillin และ cephalosporins นอกจากนี้ทั้งเอนไซม์กลุ่มที่ 3 และกลุ่ม 2f (zinc-based และ serine-based mechanism) สามารถยับยั้งยา carbapenamams ได้ด้วย

กลุ่มที่ 4 คือเอนไซม์ penicillinase ที่ไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid และไม่สามารถจัดใน molecular class ใดๆ

3.5.1 การตรวจหาเอนไซม์ beta-lactamases

การตรวจสารที่เกิดจากการสลายตัวโดยการ hydrolyse ที่ beta-lactam ring ของ penicillin หรือ cephalosporin แล้วให้ product ที่ค่อนข้างอยู่ตัว ซึ่งมีหลายวิธีคือ

1) Iodometric method

หลักการ คือ beta-lactamases จะ hydrolyse beta-lactam ring ของแบคทีเรียให้ dibasic acid คือ penicilloic acid จะดึง iodine จาก iodine-starch complex ที่มีสีน้ำเงินหมดไป

2) Acidimetric methods

หลักการ คือ beta-lactamases จะ hydrolyse penicillin ที่ beta-lactam ring ให้กรด penicilloic acid ซึ่งจะเปลี่ยนสีของ pH indicator

3) Chromogenic cephalosporin methods

หลักการ คือ nitrocefin ซึ่งเป็น cephalosporin เมื่ออยู่ในสารละลาย pH 7.0 จะมี absorption peak ที่ 370 นาโนเมตร จะปรากฏให้เห็นสีเหลือง แต่เมื่อถูก beta-lactamases hydrolyse ที่ amide bond ของ beta-lactam ring จะเกิดสารใหม่ซึ่งมี absorption peak 486 นาโนเมตร และปรากฏให้เห็นเป็นสีแดง

4) Inhibition (Clover-leaf) method

หลักการคือ การเพาะ indicator strain ที่ไม่สร้าง beta-lactamases ร่วมกับแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารที่มี penicillin ถ้าแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบไม่สร้าง penicillinase ออกมาทำลาย penicillin มีผลให้ indicator strain ไม่สามารถขึ้นบริเวณที่มี penicillin แต่แบคทีเรียที่ทดสอบสร้างเอนไซม์ทำลาย penicillin มีผลให้ indicator strain สามารถขึ้นได้ในบริเวณดังกล่าว ในการทดสอบดั้งเดิมของ hodge จะมีลักษณะที่แบคทีเรียขึ้นบริเวณ inhibition zone เหมือนใบไม้สามแฉกคล้าย clover leaf

3.6 Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)

ESBL เป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้แก่ penicillins, third generation cephalosporins, fourth generation cephalosporins รวมถึง monobactams ได้ และถูกยับยั้งได้โดย clavulanic acid โดยเอนไซม์ ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) เป็นอนุพันธ์ของเอนไซม์ beta-lactamase เอนไซม์นี้ถูกสร้างโดยแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยเฉพาะใน *K. pneumoniae* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบใน genus อื่นเช่น *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp.

เอนไซม์ ESBL มีความสำคัญทางคลินิก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL มักเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ทำให้โรคติดเชื้อมีความรุนแรงและส่งผลให้มีอัตราการเสียชีวิตสูง เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL มักตรวจพบได้ยากด้วยวิธีการปกติของห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล ทำให้การรักษาเป็นไปได้ยาก เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL มีการส่งต่อยีนดื้อยาในทาง plasmid ทำให้เกิดการแพร่กระจายจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งไปอีกสายพันธุ์หนึ่งได้ง่าย ดังนั้นการควบคุมการระบาดของเชื้อจึงยากขึ้นไปด้วย เชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL มักมีรูปแบบการดื้อยาแบบ multidrug resistance การแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทำให้เป็นข้อจำกัดของการใช้ยาในกลุ่ม beta-lactams และนำไปสู่การใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่ออกฤทธิ์กว้างมากกว่าและมีราคาแพงกว่า เช่น ยา imipenem เป็นต้น

3.6.1 กลุ่มของเอนไซม์ ESBL

เอนไซม์ ESBL สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้

1) SHV-type ESBL

ในช่วงแรกเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ SHV-1 มีการดื้อยากลุ่ม penicillins และ first generation cephalosporins เท่านั้น แต่ต่อมาเกิดการกลายพันธุ์ภายในโครงสร้างยีน ส่งผลให้ดื้อต่อยากลุ่ม extended spectrum cephalosporins และ monobactam ได้ การแทนที่ของกรดอะมิโนตำแหน่งหลักที่ทำให้เกิดอนุพันธ์ของเอนไซม์ SHV ชนิดต่างๆ เช่น การแทนที่ glycine ด้วย serine ในตำแหน่งที่ 238 หรือการแทนที่ glutamate ด้วย lysine ในตำแหน่งที่ 240 ซึ่งตำแหน่งนี้ถือว่าเป็นตำแหน่งสำคัญสำหรับการทำลายยา ceftazidime

2) TEM-type ESBL

เอนไซม์ TEM-1 beta-lactamase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม ampicillin และ first generation cephalosporins ถึงประมาณ 90% และเป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากเชื้อ ampicillin-resistant *E. coli*, penicillin-resistant *H. influenzae* และ *N. gonorrhoeae* แต่ต่อมาเอนไซม์ TEM-1 เกิดการกลายพันธุ์ภายในโครงสร้างของยีน ทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการทำลายยาปฏิชีวนะได้กว้างขึ้น การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ TEM-1 โดยการแทนที่กรดอะมิโนจาก lysine เป็น glutamine ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ TEM-2 แต่ทั้ง TEM-1 และ TEM-2 ยังไม่จัดเป็นเอนไซม์ ESBL ต่อมาเกิดการกลายพันธุ์โดยการแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 12 หรือเกิดการกลายพันธุ์อย่างอื่นร่วมด้วย เกิดเป็นอนุพันธ์ของเอนไซม์ TEM-1 หรือ TEM-2 ขึ้นอีกมากมาย โดยเอนไซม์ TEM-3 ถือเป็น TEM ชนิดแรกที่ถูกจัดว่าเป็นเอนไซม์ ESBL

3) CTX-M type ESBL

เอนไซม์ CTX-M เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม plasmid-mediated ESBL และเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายยา cefotaxime และ cefepime ได้ดีมาก รวมทั้งสามารถถ่ายทอดยีนดื้อ

ยาระหว่าง species ได้ เอนไซม์ CTX-M มักถูกสร้างจากเชื้อ *Salmonella enterica* และ *E. coli* แต่ก็มีพบที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม Enterobacteriaceae สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามเอนไซม์ CTX-M ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเอนไซม์ TEM และ SHV

4) OXA-type ESBL

เอนไซม์ OXA จัดเป็น class D beta-lactamase และจัดอยู่ใน functional group 2d ตามแบบของ Bush ซึ่งหมายถึงกลุ่มของเอนไซม์ ESBL ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม cephamycins และยาในกลุ่ม beta-lactam อื่นได้ แต่ไม่สามารถทำลายยาในกลุ่ม carbapenems ได้ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำลายยา ampicillin, cephalothin, oxacillin และ cloxacillin รวมทั้งถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid ได้น้อยมาก เอนไซม์ OXA ส่วนใหญ่พบว่าถูกสร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa*

5) ESBL อื่นๆ ได้แก่ PER-type ESBL พบอนุพันธ์ของ PER ชนิดแรกชื่อว่า PER-1 ใน *P. aeruginosa* ในประเทศตุรกี และต่อมาพบว่า *Acinetobacter baumannii* สามารถสร้างเอนไซม์ PER-1 ได้เช่นเดียวกัน ต่อมาพบว่าเอนไซม์ PER-1 มีการกระจายไปทั่วประเทศตุรกีและพบได้สูงถึง 60% มีการรายงานการพบเชื้อ *A. baumannii* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ PER-1 คิดเป็น 46% ในโรงพยาบาลของประเทศตุรกี (Vahaboglu *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่นๆ ได้แก่ VEB-1, BES-1, GES, BES และ IBC ซึ่งเป็นตัวอย่างของ ESBL ที่ไม่ใช่ TEM หรือ SHV (Bradford, 2001)

3.6.2 ระบาดวิทยาของการดื้อยาในกลุ่ม ESBL

การระบาดของ ESBL เริ่มมีการรายงานในช่วงต้นของปี ค.ศ. 1980 ในประเทศเยอรมันและฝรั่งเศส ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์ของ penicillinases, TEM-1, TEM-2 และ SHV-1 ใน *E. coli* และ *K. pneumoniae* มีการรายงานว่าพบ ESBL พบอุบัติการณ์มากที่สุดในประเทศฝรั่งเศส ส่วนประเทศอื่นๆที่พบการรายงาน ได้แก่ อังกฤษ ซิเลีย ตุรกี และสหรัฐอเมริกา (Denton, 2007)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1990 มีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ TEM และ SHV เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการติดเชื้อในโรงพยาบาลมีความรุนแรงขึ้นในหลายพื้นที่ทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศอังกฤษ (Denton, 2007) รวมถึงในสถานพยาบาลที่ดูแลผู้ป่วยเรื้อรังเด็กแรกเกิด (neonatology) ผู้ป่วยศัลยกรรมประสาท (neurosurgery) กุมารเวชศาสตร์ (pediatrics) และผู้ป่วยจากสูตินรีเวช (obstetrics) โดยเฉพาะหน่วยรักษาพยาบาลผู้ป่วยวิกฤต (Intensive Care Units: ICUs) พบรายงานความรุนแรงมากที่สุดนอกจากพบการผลิต ESBL ใน *E. coli* แล้วยังพบใน *S. enterica* serotype Typhimurium, *Citrobacter diversus* และ *K. oxytoca* (Paterson *et al.*, 2003)

มีการรายงานว่า เชื้อ *K. pneumoniae* สามารถผลิตเอนไซม์ ESBL ได้และพบได้อย่างกว้างขวางในโรงพยาบาล รวมทั้งมีการระบาดข้ามโรงพยาบาลเป็นบริเวณกว้าง มีการยืนยัน

ว่า *Klebsiella* spp. เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตเอนไซม์ ESBL และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดย *K. pneumoniae* เป็น species ที่สามารถผลิตเอนไซม์ ESBL ได้มากเป็นอันดับต้นๆ

จากการสำรวจพบอัตราการเกิด ESBL ในเชื้อ *Klebsiella* spp. ถึง 23-25% จากผู้ป่วยวิกฤต (ICUs) ในทวีปยุโรปในปี ค.ศ. 1994 และปี ค.ศ. 1997-1998 ส่วนในปี ค.ศ. 1996-1997 พบการรายงานในทวีปยุโรปและอเมริกา (Babini and Livermore, 2000) นอกจากนี้ *K. pneumoniae* แล้วยังพบว่า 4.7% ของ *E. coli* ที่แยกจากโรงพยาบาล และ 9.5% ของ *Proteus mirabilis* สามารถผลิต ESBL ได้เช่นกัน (Saurina et al., 2000)

ในช่วงปี ค.ศ. 1985 พบการปรากฏขึ้นของกลุ่ม CTX-M เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีการพัฒนาจากเอนไซม์ beta-lactamase จากโครโมโซมที่พบใน *Kluyvera ascorbata* และ *Kluyvera* spp. ซึ่งพบว่า 99% ของเอนไซม์ beta-lactamase ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ชนิด CTX-M-2 (Gniadkowski, 2001) โดยเอนไซม์ดังกล่าวได้มีการรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1986 ว่าสามารถทำลายยา cefotaxime และ ceftazidime ได้ (Bonnet, 2004) ต่อมาในปี ค.ศ. 1990 พบการรายงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ในประเทศโปแลนด์และอาร์เจนติน่า (Palucha et al., 1999, Radice et al., 2002) ในปี ค.ศ. 2000 พบว่ามีการระบาดของเอนไซม์ CTX-M อย่างกระจัดกระจายในประเทศอังกฤษจากเชื้อ *Klebsiella* spp. (Livermore and Hawkey, 2005) ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 มีการรายงานการพบเอนไซม์ชนิดนี้ในเมืองลอนดอนและแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอังกฤษ พบว่า 45% ของเชื้อ *E. coli*, *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. ผลิตเอนไซม์ CTX-M คือยาในกลุ่ม third-generation cephalosporin (Potz et al., 2006)

ประเทศในทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทยให้ความสำคัญกับปัญหาเชื้อ *Klebsiella* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL เช่นเดียวกัน นักวิจัยของประเทศต่างๆ มีการศึกษาและรายงานการพบเอนไซม์ในกลุ่ม ESBL ตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1988 ในประเทศจีน ได้หวัน เกาหลีใต้ ญี่ปุ่น อินเดียและปากีสถาน (Hawkey, 2008) ส่วนในประเทศไทยพบว่าศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand, NARS Thailand) ตระหนักถึงปัญหาเชื้อดื้อยาและได้สำรวจข้อมูลเชื้อ *Klebsiella* spp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ ESBL ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี และโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2002) และเนื่องจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไม่มีการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ การดื้อต่อยา ceftazidime เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการคัดคะแนนเบื้องต้นถึงความชุกของเชื้อ แบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากการสำรวจตามโรงพยาบาลขนาดใหญ่บางแห่งในภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อต่อยา

ceftazidime คิดเป็น 32% ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (ข้อมูลเดือน มกราคม-มิถุนายน ปี 2002) คิดเป็น 21.05% ในโรงพยาบาลหาดใหญ่ (ข้อมูลเดือน มกราคม-พฤษภาคม ปี 2003) คิดเป็น 26% ในโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี (ข้อมูลปี 2002) และคิดเป็น 21% ในโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช (ข้อมูลเดือน มกราคม-มีนาคม ปี 2001) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากโรงพยาบาลระดับมหาวิทยาลัยในประเทศไทยอยู่บ้างดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์และโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

โรงพยาบาล	จำนวนเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL/จำนวนเชื้อทั้งหมด (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ^a (ข้อมูลเดือน มกราคม-ธันวาคม ปี 2002)	96/500 (19.2)	129/400 (32.25)
โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ^b (ข้อมูลเดือน มกราคม-ธันวาคม ปี 2003)	398/2662 (14.95)	359/1343 (26.73)
โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ^b (ข้อมูลเดือน มกราคม-กันยายน ปี 2004)	368/2022 (18.20)	390/1023 (38.12)

^aที่มา: (Ingviya *et al.*, 2003)

^bที่มา: กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

ปัจจุบันปัญหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ ESBL เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีนักวิจัยในประเทศไทยสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้เพิ่มขึ้นด้วย เช่น การศึกษาความชุกและแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกจากผู้ป่วยในจังหวัดน่าน (Amornthipayawong *et al.*, 2009) การตรวจหาเอนไซม์ ESBL ใน *K. pneumoniae* จากเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยของโรงพยาบาลในแถบภาคเหนือตอนล่าง (Teeraputon *et al.*, 2012) เป็นต้น

3.6.3 การทดสอบหาเอนไซม์ ESBL

CLSI ได้แนะนำการทดสอบโดยใช้ screening agent ซึ่งประกอบด้วย cefotaxime, ceftriazone, ceftazidime, cefpodoxime และ aztreonam ถ้าเชื้อแบคทีเรีย

สามารถสร้างเอนไซม์และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone น้อยกว่าที่กำหนดอย่างน้อย 1 ชนิดของยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบให้ถือว่าเป็น screening test ให้ผลบวกต้องทำการทดสอบยืนยันต่อด้วย confirmatory test ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่

1) double disk diffusion method

เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการคือ ESBL ถูกยับยั้งด้วยสารต้าน beta-lactamases จึงใช้ clavulanic acid ในยา amoxicillin/clavulanic acid (AMX/CLA) วิธีการทำได้โดยเลี้ยงเชื้อและปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland ใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อพามาป้ายบน MHA ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำแผ่นยา AMX/CLA วางตรงกลางระหว่างวางแผ่นยา cefotaxime (CTX), ceftriazone (CRO) และ ceftazidime (CAZ) ให้ระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของแผ่นยา AMX/CLA กับจุดศูนย์กลางของยาอื่นประมาณ 30 mm บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเสริมฤทธิ์ของ inhibition zone ของแผ่นยาที่มีการด clavulanic และแผ่นยา CTX, CRO และ CAZ ถ้ามีการเสริมฤทธิ์กันแสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ ESBL

2) combination disk diffusion method

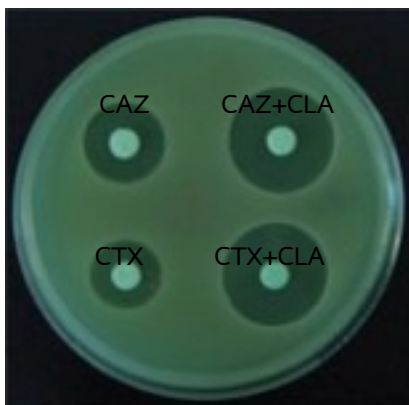
ใช้หลักการเดียวกับวิธี double disk โดยใช้แผ่นยาที่มี extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียว กับแผ่นยาที่มี ESC ร่วมกับ clavulanic acid โดยดูจาก inhibition zone ของ disk ยาทั้งสองซึ่ง CLSI แนะนำให้เปรียบเทียบระหว่าง

- cefotaxime (30 µg) กับ cefotaxime + clavulanic acid (30/10 µg)
- ceftazidime (30 µg) กับ ceftazidime + clavulanic acid (30/10 µg)

ถ้า inhibition zone ของแผ่นยาที่มี clavulanic acid กว้างกว่าแผ่นยาที่ไม่มี clavulanic acid มากกว่าหรือเท่ากับ 5 mm แสดงว่า เชื้อสร้าง ESBL

3) broth dilution method

วิธีมาตรฐาน broth dilution ของ CLSI ทำได้โดยเปรียบเทียบ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ระหว่างหลอดที่เติม extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียว กับ MIC ของหลอดที่เติม ESC ร่วมกับ clavulanic acid สำหรับการวัด MIC ทำโดยการเจือจางยาปฏิชีวนะจากความเข้มข้นมากไปน้อยแล้วเติม clavulanic acid ลงในทุกหลอดให้ได้ความเข้มข้น 4 µg/ml ถ้าค่า MIC ที่ลดลงจากการใส่ clavulanic acid มากกว่าหรือเท่ากับ 3 two-fold dilution (≥ 8 เท่า) แสดงว่าเชื้อสร้าง ESBL



รูปที่ 1.4 การใช้วิธี combination disk diffusion method ในการหาการสร้างเอนไซม์ ESBL

4) E-test method

ESBL E-test เกิดจากบริษัทผู้ผลิต E-test ได้นำวิธี combined disk มาผสมผสานกับวิธี dilution โดยทำให้มียาปฏิชีวนะทั้งสองด้านของแถบยา (double-ended strips) ด้านหนึ่งจะมีระดับความเข้มข้นของ cefotaxime และอีกด้านหนึ่งมีระดับความเข้มข้นของ cefotaxime ร่วมกับ clavulanic acid อัตราส่วนระหว่าง MIC ที่มีและไม่มี clavulanic acid (ซึ่งอยู่คนละด้านของแถบ E-test) มากกว่าหรือเท่ากับ 3 two-fold dilution (≥ 8 เท่า) แสดงว่าเชื้อสร้าง ESBL



รูปที่ 1.5 ตัวอย่างการหาค่า MIC ด้วยวิธี E-test

ที่มา: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/etest>

5) การใช้เครื่องอัตโนมัติ VITEK

เป็นวิธีการที่ใช้เวลาในการบ่มน้อยกว่าวิธี broth dilution และ agar dilution ทั้งยังสามารถส่งข้อมูลแบบ Laboratory Information System (LIS) ได้ แต่วิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือ และ card ที่มีราคาแพงทำให้มีราคาต่อตัวอย่างสูง

6) วิธีทางโมเลกุล

เทคนิคทางโมเลกุลโดยเฉพาะ PCR เป็นวิธีการที่แพร่หลายและได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการใช้ตรวจหาฮีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่พบอาจจะไม่มีความสัมพันธ์กับการพบฮีนก็ได้ ส่วน multiplex PCR เป็นเทคนิคการทำ PCR ที่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ primer หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งจะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวที่แตกต่างกัน การทำ multiplex PCR ต้องปรับสภาวะพหุของปฏิกิริยาเพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากทุก primer ที่ใส่ลงไปได้เท่ากันซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือ ช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจด้วย

3.7 ยากลุ่ม fluoroquinolones และการดื้อยา

ยาในกลุ่ม fluoroquinolone เกิดจากการเติม fluorine เข้าไปในโมเลกุลของ nalidixic acid ซึ่งเป็น quinolone ตัวแรกที่มีการใช้ ทำให้ได้ fluorinated 4-quinolones หรือเรียกว่า fluoroquinolone การเพิ่ม fluorine ในโครงสร้างจะทำให้ยามีฤทธิ์เพิ่มขึ้น สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างขึ้นทำลายเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น และมีโอกาสดื้อยาลดลง ยาในกลุ่ม fluoroquinolone ที่มีใช้ในปัจจุบันสามารถแบ่งกลุ่มจากการดัดแปลงโครงสร้างได้ดังนี้

1) fluoroquinolone, single fluorinated ได้แก่ norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, ciprofloxacin และ pefloxacin

2) fluoroquinolone, multiple fluorinated ได้แก่ lomefloxacin, fleroxacin, sparfloxacin

ciprofloxacin เป็นยาในกลุ่ม fluoroquinolone มีทั้งในรูปแบบของยาฉีดและยารับประทาน มีผลข้างเคียงน้อย จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในมนุษย์ โดยยา ciprofloxacin เป็นยาในกลุ่มที่สามารถทำลายเชื้อในกลุ่มแกรมลบและมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดี ยา ciprofloxacin หรือ fluoroquinolone ชนิดอื่นๆ จะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง DNA โดยจับกับ A subunit ของ DNA gyrase ยับยั้งการเชื่อมปิดของ DNA ยา ciprofloxacin ออกฤทธิ์แตกต่างกับยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, macrolides หรือ tetracyclines ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาต่างๆเหล่านี้อาจจะไวต่อยา ciprofloxacin หรือยา quinolones ตัวอื่นๆ ได้ (อุทัยพัฒน์, 2543)

กลไกหลักของการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ที่พบในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นกลไกการดื้อยาที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV ซึ่งเป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน porin ซึ่งนำส่งยาเข้าสู่เซลล์หรือเกิดจาก efflux pump โดยการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มักเกิดที่โครโมโซม ต่อมาเกิดการค้นพบกลไกการดื้อยา fluoroquinolone แบบใหม่จากการถ่ายทอดผ่าน plasmid pMG252 ซึ่งเป็นส่วนที่ก่อให้เกิด multidrug resistance โดยมียีนที่ก่อให้เกิด fluoroquinolone resistance บรรจุใน plasmid จึงเรียก plasmid นี้ว่า *qnr*-containing plasmid (Marcusson *et al.*, 2009)

ส่วนใหญ่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อต่อ fluoroquinolones โดยกลไกการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นที่โครโมโซม ในปี ค.ศ. 1994 มีการพบครั้งแรกว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาในกลุ่มนี้ผ่าน plasmid ได้ โดยพบใน *K. pneumoniae* ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยยีนที่สามารถพบและสามารถถ่ายทอดผ่านทาง plasmid ได้แก่ *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* และ *qepA* เป็นต้น โดยยีน *qnr* สามารถผลิตโปรตีน *qnr* ซึ่งทำหน้าที่ป้องกัน DNA gyrase และ topoisomerase IV ไม่ให้จับกับยาในกลุ่ม fluoroquinolone ปัจจุบันมีโปรตีน *qnr* ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* และ *qnrD* ส่วนยีน *aac(6')-Ib-cr* สามารถผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase (*aac(6')-Ib-cr*) ซึ่งสามารถลดการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้ได้ และยีน *qepA* เป็นยีนที่สามารถผลิตโปรตีน *qepA* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของ efflux pump ทำให้ยามีการขับออกนอกเซลล์เพิ่มขึ้น (Pasom *et al.*, 2013)

3.7.1 ระบาดวิทยาของยา fluoroquinolone

ยาหลักในกลุ่ม fluoroquinolone ที่ใช้ในงานปฏิบัติการทางคลินิกในประเทศอังกฤษและไอร์แลนด์ ได้แก่ ciprofloxacin ซึ่งเป็นเริ่มเป็นที่รู้จักในประเทศดังกล่าวในช่วงปลายของปี ค.ศ. 1980 อุบัติการณ์ของการดื้อยาเริ่มเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ซึ่งมีผลกับความไวต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV หรือการ efflux ของยาออกจากเซลล์ (Denton, 2007)

ปี ค.ศ. 1990 มีการเพิ่มขึ้นของการดื้อยานี้ใน Enterobacteriaceae อย่างช้าๆ ในประเทศอังกฤษและไอร์แลนด์ (Livermore *et al.*, 2003) ต่อมาในปี ค.ศ. 1999-2000 มีการรายงานอัตราการดื้อยา ciprofloxacin ในประเทศอังกฤษ (0.6%) สเปน (14.7%) และโปรตุเกส (5.8%) การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการใช้ยาในแต่ละประเทศและระดับการดื้อยา (Guyot *et al.*, 1999)

มีการศึกษา *K. pneumoniae* ทั้งหมด 69 ไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์ TEM หรือ SHV พบว่า 32 ไอโซเลท (46.4%) ดื้อต่อยา ciprofloxacin และไอโซเลทที่ดื้อยาดังกล่าวทั้งหมดมี

การกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* (Dashti *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าจากทั้งหมด 47 ไอโซเลท มี 15 ไอโซเลท (32%) ที่ดื้อยา ciprofloxacin และ cefotaxime ร่วมกัน ส่วนในโรงพยาบาลเมืองลิเวอร์พูลพบยีน *qnr* ในเชื้อ *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli* และ *C. freundii* จากเชื้อจำนวน 13 ไอโซเลท และพบว่า 11 ไอโซเลทมียีน *bla_{SHV-12}* ร่วมด้วยจึงเชื่อว่าการดื้อยา fluoroquinolone และการผลิตเอนไซม์ ESBL มีความสัมพันธ์กันในระดับยีนและมีการแพร่กระจายในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae (Corkill *et al.*, 2005, Mammeri *et al.*, 2005)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความชุกและเปรียบเทียบการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม multidrug-resistance ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
2. ศึกษาอุบัติการณ์และการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
3. ศึกษาอุบัติการณ์และลักษณะเอนไซม์ beta-lactamase ESBLs และเอนไซม์ AmpC ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Agar	Difco
Luria Bertani (LB) broth	Difco
Mueller Hinton agar (MHA)	Difco
Mueller Hinton broth (MHB)	Difco
Tryptic soy agar (TSA)	Difco
Tryptic soy broth (TSB)	Difco

2.1.2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Ethidium bromide	Sigma
Glycerol	Sigma
Sodium hydroxide	Sigma
Tris base	Promega

2.1.3 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Agarose	Gibco
MyTaq Reaction buffer	Bioline
MyTaq DNA polymerase	Bioline
Taq polymerase	Bioline
ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid
ชุด DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I	Roche

2.2 วัสดุอื่นๆ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Antibiotic disk	BD BBL
E-test	BD BBL
กระดาษ Whatman 3MM	Whatman
แผ่นไนลอนเมมเบรน (nylon membrane)	GE Healthcare

2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วและอุปกรณ์วิเคราะห์สำหรับงานจุลชีววิทยา
- หลอด PCR ขนาด 1.5 ml
- Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 μ l (Gilson, France)
- ชุด Electrophoresis และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น 200/2.0 (Bio-Rad, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (MIKRO 22R, Germany)
- เครื่อง vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -80°C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -20°C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็น 4°C (Sanyo, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet) รุ่น ABS 1200A (ASTEC microflow, UK)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Metrohm, Switzerland)
- เครื่อง Waterbath รุ่น TW20 (Julabo, Germany)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Perkin Elmer, UK และ ASTEC, Japan)
- เครื่อง Hot plate & Stirrer (Fisher Scientific, USA)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)
- เครื่อง Gel Documentation รุ่น WSE-5200 printgraph 2M (ATTO, USA)
- เครื่อง Centrifuge รุ่น Centrifuge 5804 (Eppendorf, USA)
- เครื่อง Microcentrifuge (Eppendorf, USA)
- เครื่อง Elite dry bath incubator รุ่น MS major science elite (Gibthai, USA)

2.4 แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

K. pneumoniae สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 700603 และ *K. pneumoniae* จาก rectal swab ของผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

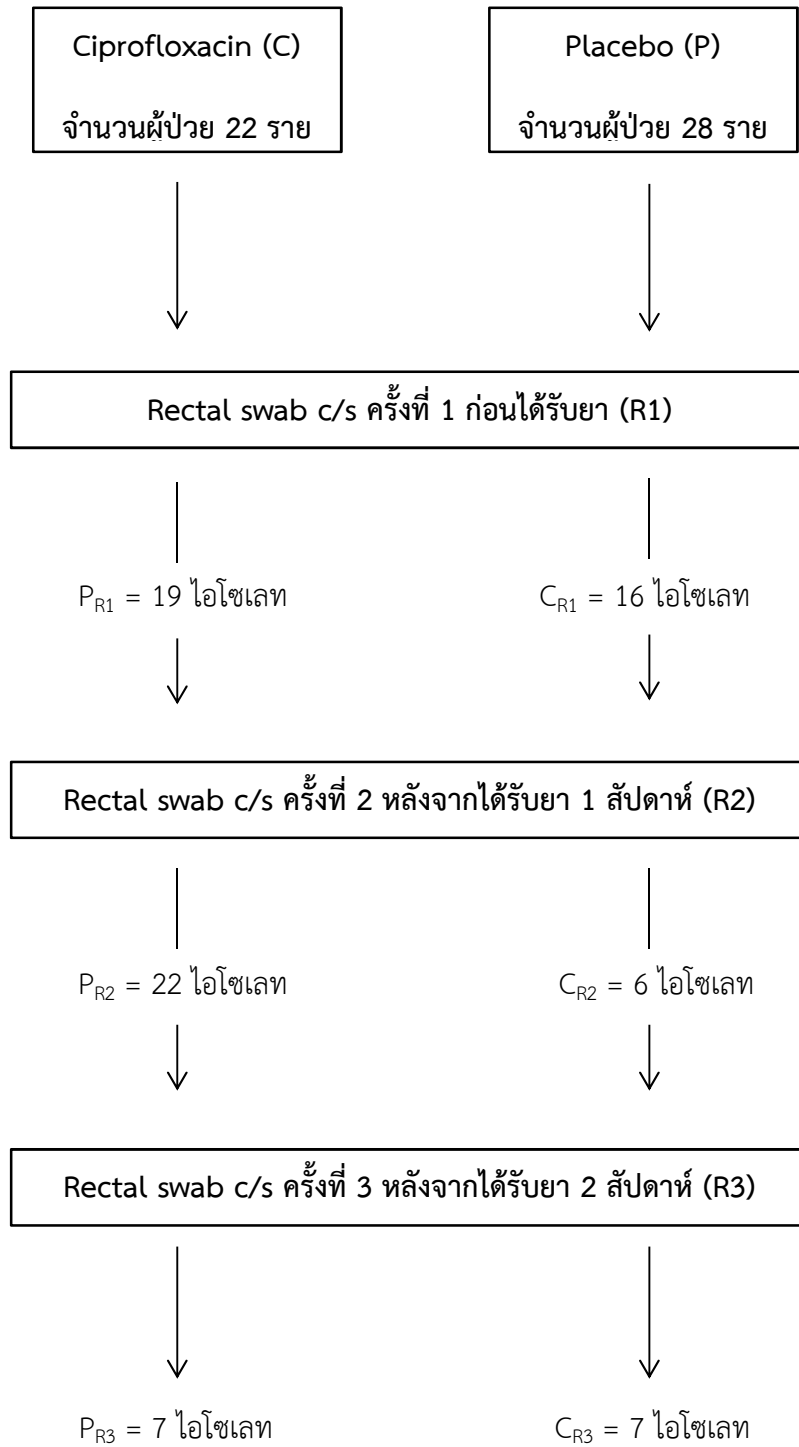
วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* จาก rectal swab ของผู้ป่วยเด็กในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ทำการเก็บเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 77 ไอโซเลท จาก rectal swabs ของผู้ป่วยเด็ก Acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ lymphoma จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ทั้งหมด 50 ราย เก็บในช่วงเดือนเมษายน ปี 2007 ถึงเดือนมีนาคม ปี 2009 ผู้ป่วยได้รับ placebo (ยาปลอม) หรือ ciprofloxacin ขนาด 10 mg/kg/วัน ในปริมาณเท่ากัน โดยเก็บเชื้อ 3 ช่วงคือ เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก่อนได้รับ placebo หรือ ciprofloxacin 1 สัปดาห์ (R1) เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับ placebo หรือ ciprofloxacin 1 สัปดาห์ (R2) และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับ placebo หรือ ciprofloxacin 2 สัปดาห์ (R3) (Laoprasopwattana *et al.*, 2013) เชื้อทั้งหมดทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ได้แก่ TSI, lysine decarboxylase test, citrate utilization, urea hydrolysis และ sulfide indole motility (SIM) โดยมี *K. pneumoniae* ATCC 700603 เป็นสายพันธุ์ควบคุม

ผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 18 ปีที่เป็น Acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ lymphoma จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ผู้ป่วยถูกทำการทดลองแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุม (double blind randomized control trial) เพื่อรับ placebo หรือ ciprofloxacin จำนวน 28 และ 22 รายตามลำดับ ก่อนและหลังจากผู้ได้รับ placebo หรือ ciprofloxacin 1 หรือ 2 สัปดาห์ โดยผู้ป่วยถูกทำ rectal swab culture เพื่อเพาะเชื้อ *K. pneumoniae* ดังแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการเก็บ rectal swab ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ placebo หรือ ciprofloxacin



2. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *K. pneumoniae*

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะใช้วิธี disk diffusion ตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เป็นมิลลิเมตร นำค่าที่วัดได้เปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมาตรฐานใน CLSI แล้วรายงานเป็น susceptible (S), intermediate (I) หรือ resistant (R) ชุดควบคุมใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *K. pneumoniae* ATCC 700603

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ amikacin (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) และ sulperazone (75/30 µg) ทำการทดสอบโดยนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 3 ml นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 2 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard หรือมีเชื้อความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml แล้วใช้ไม้ปั่นสำลีจุ่มเชื้อนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าวุ้นอาหาร MHA และวางแผ่นยาแต่ละชนิดบนอาหาร MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ยาแต่ละชนิดนำไปเทียบผลในตารางมาตรฐานของ CLSI (2012)

3. การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC)

ใช้แผ่น E-test ของยา 2 ชนิดในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ได้แก่ ceftazidime และ ciprofloxacin โดยผลของยา ceftazidime ใช้คัดกรองการดื้อยาในกลุ่ม class A beta-lactamase โดยการสร้าง ESBL ส่วนยา ciprofloxacin ใช้ตรวจการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone โดยใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานคือ *K. pneumoniae* ATCC 700603 เป็นชุดควบคุม

วิธีทดสอบโดยนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 2 ชั่วโมงปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard หรือมีเชื้อความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml แล้วใช้ไม้ปั่นสำลีจุ่มเชื้อนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าวุ้นอาหาร MHA และวางแผ่น E-test บน MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้โดยเทียบกับค่ามาตรฐานจาก CLSI (2012)

4. การตรวจหาเอนไซม์

การตรวจหาเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ การตรวจหาเอนไซม์ ESBL และเอนไซม์ของ class C beta-lactamase (AmpC)

4.1 การตรวจหาเอนไซม์ ESBL

การทดสอบนี้ใช้วิธี combined disk method ในการยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ ในการศึกษานี้เลือกใช้การเปรียบเทียบ inhibition zone ของ disk ยา 2 คู่ตามคำแนะนำของ CLSI

1) cefotaxime (30 µg) กับ cefotaxime-clavulanic acid (30/10 µg)

2) ceftazidime (30 µg) กับ ceftazidime-clavulanic acid (30/10 µg)

ทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 2 ชั่วโมงปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard หรือมีเชื้อความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml แล้วใช้ไม้ปั่นสำลีจุ่มเชื้อนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าวุ้นอาหาร MHA และวางแผ่นยาแต่ละคู่บนอาหาร MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone ของยาแต่ละคู่

โดยหาก inhibition zone ของแผ่นยาที่มีกรด clavulanic มีขนาดกว้างมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับแผ่นยาที่ไม่มีกรด clavulanic แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ได้

4.2 การตรวจหาเอนไซม์ AmpC (class C beta-lactamase)

ในการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ AmpC ของเชื้อใช้หลักการ combined disk method เช่นเดียวกับการหาเอนไซม์ ESBL ในการทดสอบเปรียบเทียบ inhibition zone ของยา cefoxitin (30 µg) กับยา cefoxitin-cloxacillin (30/200 µg) (Polsfuss *et al.*, 2011)

ทำการทดสอบโดยนำเชื้อที่ให้ผลคือยา cefoxitin มาทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 4.1 โดยหาก inhibition zone ของแผ่นยาที่มี cloxacillin มีขนาดกว้างมากกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับแผ่นยาที่ไม่มี cloxacillin แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ AmpC ได้

5. การตรวจสอบหายีนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาแขวนลอยน้ำ DI (distilled water) 100 µl แล้วนำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอออกจากเซลล์จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีประมาณ 5-10 นาที เพื่อป้องกันดีเอ็นเอสายเดี่ยวกลับมาเข้าคู่กัน แล้วนำมาใช้เพื่อเป็น DNA template

การทำ PCR เพื่อตรวจหายีนในกลุ่ม fluoroquinolone ทั้งหมด 4 ยีนได้แก่ ยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และยีน *qepA* ส่วนยีนในกลุ่ม ESBL ทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ ยีน *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* และยีน *bla_{TEM}* รวมทั้งยีน *ampC* โดยใช้ primer ที่จำเพาะดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนที่ดื้อยาปฏิชีวนะ

Target genes	Primers	Sequence (5'-3')	PCR product (bp)	References
<i>qnrA</i>	qnrAF qnrAR	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>qnrB</i>	qnrBF qnrBR	GGMATHGAAAATTCGCCACTG ^C TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA ^C	264	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>qnrS</i>	qnrSF qnrSR	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>qepA</i>	qepAF qepAR	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT GTCTACGCCATGGACCTCAC	596	(Kim H. B. <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla_{SHV}</i>	bla-SHV.SE bla-SHV.AS	ATGCGTTATATTCGCCTGTG TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	747	(Monstein <i>et al.</i> , 2007)
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-U1 CTX-M-U2	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593	(Monstein <i>et al.</i> , 2007)
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-164.SE TEM-165.AS	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	445	(Monstein <i>et al.</i> , 2007)
<i>ampC</i>	AmpC AK AmpC BK	GTCCGGATCCCATTACCCTGGCGCATCGT CGAGAATTCGGACCCGATGGAATTTTAC	2,500	(Mammeri <i>et al.</i> , 2004)

ส่วนผสมของ PCR ประกอบด้วย 5 ไมโครลิตรของ DNA template, 5X MyTaq Reaction Buffer, 10 µM specific primers และ 1 unit *Taq* polymerase และนำ reaction mixture เข้าเครื่อง PCR (Astec รุ่น PC818) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สภาวะการทำปฏิกิริยาของ PCR แสดงในตารางที่ 2.2 การตรวจหายีน *qnr* (*qnrA*, *qnrB* และ *qnrS*), *qepA* และยีน *ampC* จะใช้วิธี conventional PCR ส่วนยีน *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* และยีน *bla_{TEM}* จะใช้วิธี multiplex PCR และสภาวะการทำปฏิกิริยาของ PCR แสดงในตารางที่ 2.3

นำ PCR product มาทำ electrophoresis ใน 1.5% agarose gel เพื่อตรวจหา amplicon ของยีน *qnr* (*qnrA*, *qnrB* และ *qnrS*) ขนาด 580 bp, 264 bp และ 428 bp ตามลำดับ

และ amplicon ของยีน *qepA* ขนาด 596 bp ส่วนยีน *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* และยีน *bla_{TEM}* ขนาด 747 bp, 593 bp และ 445 bp ตามลำดับ แยกแถบดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เวลา 60 นาที แล้วนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (10µg/ml) 2 นาที และแช่ในน้ำกลั่น 15 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอใต้แสง UV โดยเครื่อง gel documentation (ATTO) เทียบขนาดดีเอ็นเอที่แยกได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp) ส่วนยีน *ampC* มีขนาด 2,500 bp ใช้ 1% agarose gel แยกแถบดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เวลา 90 นาที และเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb)

ตารางที่ 2.2 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	10	1
Denaturation	95	1	} 35
Annealing*	54	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	10	1

*ยีน *qepA* ใช้อุณหภูมิ annealing 55 °C เวลา 1 นาที, ยีน *ampC* annealing 56 °C เวลา 1 นาที

ตารางที่ 2.3 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน ESBL (*bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	15 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 30
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

6. การหา subtype ของยีน ESBLs

นำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน ESBLs ทั้ง 3 ชนิดซึ่งได้แก่ ยีน *bla_{SHV}* ทั้งหมด 49 ไอโซเลท, ยีน *bla_{CTX-M}* ทั้งหมด 13 ไอโซเลท และยีน *bla_{TEM}* ทั้งหมด 27 ไอโซเลท มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid,

Taiwan) จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบส DNA โดยส่งวิเคราะห์ (Macrogen, Korea) โดยใช้ primer ที่จำเพาะดังแสดงในตารางที่ 2.1

การทำ screening เพื่อหา subtype ของยีน *bla_{SHV}* และยีน *bla_{TEM}* ใช้ primer สาย forward เพียงสายเดียวในการส่งวิเคราะห์ลำดับเบส ส่วนยีน *bla_{CTX-M}* ใช้ primer สาย reverse เพียงสายเดียว จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อหา subtype ของ ESBL gene โดย subtype ที่เปรียบเทียบกับมีความคล้ายกับฐานข้อมูลซึ่งเปอร์เซ็นต์มากกว่า 95%

7. การตรวจหายีน *traA* ด้วยวิธี PCR

การตรวจหายีน *traA* โดยใช้ plasmid DNA ที่ได้แยกจาก *K. pneumoniae* ด้วยวิธี phenol-chloroform extraction โดยเฉพาะเลี้ยง *K. pneumoniae* ในอาหาร LB broth 4 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทส่วน supernatant ที่เติม solution I (50 mM glucose; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0) 200 µl ดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน แช่ไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที เติมน้ำ solution II (5 N NaOH; 10% SDS) ที่เตรียมใหม่ 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำ potassium acetate-2 M acetic acid ซึ่งเก็บที่ -20°C 400 µl เขย่าแรงๆ แล้ว แช่ในน้ำแข็ง 10 นาทีทันที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอา supernatant ใส่ eppendorf tube (ประมาณ 600-700 µl) จากนั้นเติมน้ำ phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 1 volume ของ supernatant ที่ดูดได้ (ประมาณ 600 µl) ผสมให้เข้ากันโดย vortex (Scientific Industries) และหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วน supernatant ใส่ eppendorf tube ใหม่ไว้ (ประมาณ 400-500 µl) เติมน้ำ RNase A (50 µg/µl) 2 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 1 volume ของ supernatant ที่ดูดได้ (ประมาณ 500 µl) นำไป vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วน supernatant ใส่ eppendorf tube ใหม่ไว้ (ประมาณ 300-400 µl) เติมน้ำ absolute ethanol ซึ่งเก็บที่ -20°C ปริมาตร 2 volume ของ supernatant ที่ดูดได้ (ประมาณ 800 µl) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วน supernatant ที่เติม 70% ethanol 500 µl หมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เท supernatant ที่เหลือและระเหยเอา ethanol ออกที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือ dry ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย deionized water

(DI) 30 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำมาใช้เป็น plasmid stock

ตรวจ plasmid DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ในสารละลาย 0.5x TAE Buffer ใช้กระแสไฟฟ้ากระแสคงที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 60 นาที นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 1 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่นประมาณ 15 นาที นำไปส่องภายใต้แสง UV เพื่อดูชิ้นส่วนของ plasmid ที่แยกได้

เชื้อที่คัดเลือกจำนวน 3 ไอโซเลทที่มีทั้งยีนกลุ่ม ESBLs และยีนกลุ่ม fluoroquinolone ได้แก่ KP034R1/2, KP066R2/2 และ KP075R1/2 นำมาหายีน *traA* เพื่อยืนยันการถ่ายโอนของยีนโดยใช้ primer ที่จำเพาะ (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *traA*

Target genes	Primers	Sequence (5'-3')	PCR product (bp)	References
<i>traA</i>	p206-F p206-R	TGCCCCCTGCGGCGTTAGTA TTGCCAACGCAGCCGCTGAT	876	(Wang <i>et al.</i> , 2011)

PCR reaction mixture ประกอบด้วย 5 ไมโครลิตรของ DNA template, 5X MyTaq Reaction Buffer, 0.5 μ M primers-F/R *traA* และ 1 unit *Taq* polymerase และ DI water รวมเป็น 20 ไมโครลิตรนำ reaction mixture เข้าเครื่อง PCR (Astec รุ่น PC818) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมีสถานะของ PCR ดังแสดงในตารางที่ 2.5 และตรวจหา PCR product โดยการทำให้ gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ละลายใน 0.5X TAE buffer เพื่อตรวจหายีน *traA* ขนาด 876 bp แยกแถบดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เวลา 60 นาที แล้วนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (10 μ g/ml) 2 นาทีและแช่ในน้ำกลั่น 15 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอใต้แสง UV โดยเครื่อง gel documentation (ATTO) และเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่แยกได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp)

ตารางที่ 2.5 สภาวะการทำปฏิกิริยาของ PCR ของยีน *traA*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 30
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อ *K. pneumoniae* จาก rectal swab ของผู้ป่วยเด็กในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

แยกเชื้อ *K. pneumoniae* จากผู้ป่วยเด็กทั้งหมด 50 รายซึ่งเป็นโรค acute lymphoblastic leukemia (ALL) หรือ lymphoma จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในช่วงเดือนเมษายนปี 2007 ถึงเดือนมีนาคมปี 2009 โดยผู้ป่วยได้รับ placebo หรือ ciprofloxacin ขนาด 10 mg/kg/วัน ในปริมาณเดียวกัน สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* จาก rectal swab ได้ทั้งหมด 77 ไอโซเลท รายละเอียดของเชื้อแสดงดังตารางที่ 3.1

เชื้อแยกได้จากผู้ป่วยเด็กที่ได้รับ placebo ทั้งหมด 48 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก่อนได้รับยา 1 สัปดาห์ (P_{R1}) จำนวน 19 ไอโซเลท แยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับยา 1 สัปดาห์ (P_{R2}) จำนวน 22 ไอโซเลท และแยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับยา 2 สัปดาห์ (P_{R3}) จำนวน 7 ไอโซเลท

เชื้อแยกได้จากผู้ป่วยเด็กที่ได้รับ ciprofloxacin ทั้งหมด 29 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก่อนได้รับยา 1 สัปดาห์ (C_{R1}) จำนวน 16 ไอโซเลท แยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับยา 1 สัปดาห์ (C_{R2}) จำนวน 6 ไอโซเลท และแยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับยา 2 สัปดาห์ (C_{R3}) จำนวน 7 ไอโซเลท และเนื่องจากจำนวนเชื้อในกลุ่มนี้มีค่อนข้างน้อย จึงรวมกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับยา 1 สัปดาห์ (C_{R2}) และเชื้อแยกได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับยา 2 สัปดาห์ (C_{R3}) เป็นกลุ่มเดียวกันคือ C_{R2+R3} ซึ่งสามารถจัดเป็นกลุ่มเชื้อหลังจากได้รับ ciprofloxacin ได้

ตารางที่ 3.1 จำนวนไอโซเลทของเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 77 ไอโซเลทที่แยกจากผู้ป่วยเด็กของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ยาที่ผู้ป่วยได้รับ	จำนวนไอโซเลทของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i>		
	R1	R2	R3
1. Placebo (P) (n=48)	19	22	7
2. Ciprofloxacin (C) (n=29)	16	6	7
รวม (n=77)	35	28	14

2. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *K. pneumoniae*

นำเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 77 ไอโซเลทมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิดด้วยวิธี disk diffusion method ได้แก่ amikacin (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) และ sulperazone (75/30 µg) ผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ เชื้อกลุ่มที่ได้รับ placebo ($P_{R1+R2+R3}$) เชื้อกลุ่มก่อนได้รับ ciprofloxacin 1 สัปดาห์ (C_{R1}) และเชื้อกลุ่มหลังจากได้รับ ciprofloxacin 1 และ 2 สัปดาห์ (C_{R2+R3}) ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 77 ไอโซเลท

Antibiotic drug	จำนวนเชื้อที่ดื้อยา (%)			P
	Placebo ($P_{R1+R2+R3}$) (48)	Ciprofloxacin		
		(C_{R1}) (16)	(C_{R2+R3}) (13)	
amikacin	0	1 (6.3)	0	0.145
cefotaxime	15 (31.3)	1 (6.3)	2 (15.4)	0.132
cefoxitin	3 (6.3)	2 (12.5)	1 (7.7)	0.722
ceftazidime ^a	14 (29.2)	2 (12.5)	1 (7.7)	0.148
ciprofloxacin ^a	7 (14.6)	2 (12.5)	11 (84.6)	0.000
gentamicin	16 (33.3)	1 (6.3)	3 (23.1)	0.098
imipenem	0	0	0	-
meropenam	0	0	0	-
sulperazone	2 (4.2)	0	0	0.538

^a ผลจากการทดสอบด้วยวิธี E-test

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าเชื้อจากกลุ่ม placebo และกลุ่มก่อนได้รับยา ciprofloxacin ($P_{R1+R2+R3}$ และ C_{R1}) เชื้อดื้อต่อยา gentamicin (ยากกลุ่ม aminoglycoside) มากที่สุด คิดเป็น 26.6 (17/64) เปอร์เซ็นต์ และเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มได้รับยา ciprofloxacin (C_{R2+R3}) ดื้อต่อยา ciprofloxacin (ยากกลุ่ม fluoroquinolone) มากที่สุด คิดเป็น 84.6 (11/13)

เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาเชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ และ C_{R1} พบว่าเปอร์เซ็นต์การดื้อต่อยา ciprofloxacin เท่ากับ 14.6 (7/48) และ 12.5 (2/16) ตามลำดับ แสดงว่าการได้รับ ciprofloxacin ทำให้เชื้อดื้อยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

สำหรับยาชนิดอื่นๆผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การให้ยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อต่อยาเพิ่มขึ้น ในกรณีของยา gentamicin พบว่าเชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ และ C_{R1} มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเท่ากับ 26.6 (17/64) ซึ่งสูงกว่าเชื้อจากกลุ่ม C_{R2+R3} ที่มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเป็น 23.1 (3/13) ส่วนยา cefotaxime พบว่าเชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ และ C_{R1} มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเท่ากับ 25 (16/64) ซึ่งสูงกว่าเชื้อจากกลุ่ม C_{R2+R3} ที่มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเป็น 15.4 (2/13) ส่วนยา ceftazidime พบว่าเชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ และ C_{R1} มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเท่ากับ 25 (16/64) ซึ่งสูงกว่าเชื้อจากกลุ่ม C_{R2+R3} มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเป็น 7.7 (1/13) และยา cefoxitin พบว่าเชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ และ C_{R1} มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเท่ากับ 7.8 (5/64) ซึ่งไม่แตกต่างจากเชื้อในกลุ่ม C_{R2+R3} มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาเป็น 7.7 (1/13) นอกจากนี้พบเชื้อกลุ่ม C_{R1} ดื้อต่อยา amikacin คิดเป็น 6.3 (1/16) เปอร์เซ็นต์และเชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ ดื้อต่อยา sulperazone คิดเป็น 4.2 (2/48) เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบเชื้อดื้อต่อยาทั้งสองชนิดในกลุ่ม C_{R2+R3} นอกจากนั้นไม่พบการดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem (imipenem และ meropenem) ในเชื้อทั้ง 77 ไอโซเลท ส่วนค่า MIC ของยา ciprofloxacin อยู่ในช่วง 0.19 ถึง >32 $\mu\text{g/ml}$ โดยค่า MIC_{50} มีค่าเท่ากับ 0.032 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MIC_{90} มีค่าเท่ากับ >32 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนค่า MIC ของยา ceftazidime อยู่ในช่วง 0.064 ถึง >256 $\mu\text{g/ml}$ โดยค่า MIC_{50} มีค่าเท่ากับ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MIC_{90} มีค่าเท่ากับ 96 $\mu\text{g/ml}$

จากผลความไวต่อยาปฏิชีวนะสามารถจัดแบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiogram) ได้หลายรูปแบบ โดยแบ่งตามกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$, C_{R1} และ C_{R2+R3} ดังตารางที่ 3.3

ในกลุ่มเชื้อ $P_{R1+R2+R3}$ ทั้งหมด 48 ไอโซเลทสามารถจัดรูปแบบการดื้อยาได้ทั้งหมด 12 แบบ พบว่ารูปแบบที่ 10 ซึ่งดื้อต่อยา CTX+CAZ+GEN เป็นแบบที่พบมากที่สุดในกลุ่มนี้ คิดเป็น 12.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ รูปแบบที่ 14 ดื้อต่อยา CTX+CAZ+GEN+CIP คิดเป็น 6.25 เปอร์เซ็นต์ และถัดมาเป็นรูปแบบที่ 6 ดื้อต่อยา CTX+GEN คิดเป็น 4.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรูปแบบอื่นที่เหลืออีก 9 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1, 2, 3, 4, 5, 8, 15, 16 และ 17 พบเท่ากันทั้งหมดคิดเป็นรูปแบบละ 2.1 เปอร์เซ็นต์ และจะเห็นว่าเชื้อในกลุ่มนี้ดื้อต่อยาได้มากที่สุด 6 ชนิดในรูปแบบที่ 17 ซึ่งดื้อต่อยา CTX+CAZ+GEN+CIP+FOX+SUL ส่วนรูปแบบที่ดื้อยากกลุ่ม third generation cephalosporin และดื้อต่อ fluoroquinolone ร่วมกันได้แก่รูปแบบที่ 14, 16 และ 17 คิดเป็น 10.4 (5/48) เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.3 แบบแผนการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อกลุ่ม P_{R1+R2+R3}, C_{R1} และ C_{R2+R3}

รูปแบบ ที่	แบบแผนการดื้อยาปฏิชีวนะ	จำนวนไอโซเลท (%)			P
		P _{R1+R2+R3} (48)	C _{R1} (16)	C _{R2+R3} (13)	
1	CAZ	1 (2.1)	1 (6.25)	0	0.538
2	CIP	1 (2.1)	2 (12.5)	8 (61.5)	0.000
3	FOX	1 (2.1)	1 (6.25)	0	0.538
4	GEN	1 (2.1)	0	0	0.736
5	CTX+CAZ	1 (2.1)	0	0	0.736
6	CTX+GEN	2 (4.2)	0	1 (7.7)	0.560
7	CAZ+FOX	0	1 (6.25)	0	0.145
8	CIP+GEN	1 (2.1)	0	0	0.736
9	CIP+FOX	0	0	1 (7.7)	0.083
10	CTX+CAZ+GEN	6 (12.5)	0	0	0.140
11	CTX+CIP+GEN	0	0	1 (7.7)	0.083
12	CAZ+CIP+GEN	0	0	1 (7.7)	0.083
13	AMK+CTX+CAZ+GEN	0	1 (6.25)	0	0.145
14	CTX+CAZ+GEN+CIP	3 (6.25)	0	0	0.389
15	CTX+CAZ+GEN+SUL	1 (2.1)	0	0	0.736
16	CTX+CAZ+GEN+CIP+FOX	1 (2.1)	0	0	0.736
17	CTX+CAZ+GEN+CIP+FOX+SUL	1 (2.1)	0	0	0.736

AMK=amikacin, CTX=cefotaxime, CAZ=ceftazidime, CIP=ciprofloxacin,
FOX=cefoxitin, GEN=gentamicin, IMP=imipenem, MER=meropenem,
SUL=sulperazone

รูปแบบที่จัดเป็น multidrug resistance เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 กลุ่ม ได้แก่ รูปแบบที่ 14-17 คิดเป็น 12.5 (6/48) เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนเชื้อในกลุ่ม P_{R1+R2+R3} ทั้งหมด 48 ไอโซเลท

ในกลุ่มเชื้อ C_{R1} ทั้งหมด 16 ไอโซเลทสามารถจัดรูปแบบการดื้อยาได้ทั้งหมด 5 รูปแบบ โดยรูปแบบที่ 2 เชื้อดื้อต่อยา ciprofloxacin มากที่สุดคิดเป็น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรูปแบบการดื้อยาอีก 4 รูปแบบพบรูปแบบละ 6.25 เปอร์เซ็นต์ เชื้อกลุ่มนี้ดื้อต่อยามากที่สุด 4 ชนิดคือ รูปแบบที่ 13 (AMK+GEN+CTX+CAZ) และกลุ่มนี้ไม่มีเชื้อที่เป็น multidrug resistance

ในกลุ่มเชื้อ C_{R2+R3} ทั้งหมด 13 ไอโซเลทสามารถจัดรูปแบบการดื้อยาได้ทั้งหมด 5 รูปแบบ โดยจำนวนรูปแบบการดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่ม C_{R1} รูปแบบที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มนี้คือ รูปแบบที่ 2 คือเชื้อดื้อต่อยา ciprofloxacin เพียงชนิดเดียวคิดเป็น 61.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการได้รับยา ciprofloxacin สามารถทำให้เชื้อดื้อต่อยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และรูปแบบการดื้อยาที่ 9, 11 และ 12 มีการดื้อต่อยา ciprofloxacin ร่วมกับยาชนิดอื่น โดยรูปแบบที่ 9 เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ AmpC ร่วมกับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ในรูปแบบที่ 11 (CTX+CIP+GEN) และรูปแบบที่ 12 (CAZ+CIP+GEN) ซึ่งเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporin ยากลุ่ม fluoroquinolone และยากลุ่ม aminoglycoside โดยเชื้อทั้งสองรูปแบบนี้จัดเป็น multidrug resistant ด้วยคิดเป็น 15.4 (2/13) เปอร์เซ็นต์

3. การตรวจสอบหายีนในกลุ่ม fluoroquinolone

ในการตรวจสอบหายีนในกลุ่ม fluoroquinolone ทั้งหมด 4 ยีนได้แก่ยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และยีน *qepA* ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin (MIC) จำนวน 20 ไอโซเลท

กลไกหลักในการดื้อ ciprofloxacin คือ การเกิด mutation ที่ DNA gyrase และ topoisomerase IV ทำให้ยาจับเป้าหมายได้น้อยลง ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดขึ้นในระดับโครโมโซม นอกจากนั้นพบว่ากลไกการดื้อต่อยา ciprofloxacin สามารถเกิดขึ้นโดยยีนที่อยู่บน plasmid ซึ่งได้แก่ ยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และยีน *qepA*

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อทั้ง 3 กลุ่มได้แก่ เชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ เชื้อกลุ่ม C_{R1} และเชื้อกลุ่ม C_{R2+R3} ดังตารางที่ 3.4 พบว่า เชื้อกลุ่ม $P_{R1+R2+R3}$ พบยีน *qnrB* มากที่สุดคิดเป็น 71.4 (5/7) เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามียีนร่วมกันมากที่สุด 2 ยีน ได้แก่ ยีน *qnrA* และ *qnrB* ร่วมกันคิดเป็น 28.6 (2/7) เปอร์เซ็นต์ และพบยีน *qnrB* และ *qnrS* ร่วมกันคิดเป็น 14.3 (1/7) เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อที่พบยีนในกลุ่ม fluoroquinolone จำนวน 1 ยีน พบยีน *qnrB* คิดเป็น 28.6 (2/7) เปอร์เซ็นต์ ในเชื้อกลุ่ม C_{R1} ไม่มีการพบยีนใดๆเลย ส่วนเชื้อกลุ่ม C_{R2+R3} พบยีน *qnrS* มากที่สุดคิดเป็น 45.5 (5/11) เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือยีน *qepA* คิดเป็น 36.4 (4/11) เปอร์เซ็นต์ โดยพบยีนร่วมกันมากที่สุด 2 ยีน ได้แก่ ยีน *qnrS* ร่วมกับยีน *qepA* คิดเป็น 18.2 (2/11) เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อที่พบยีนในกลุ่ม fluoroquinolone จำนวน 1 ยีน สามารถพบยีนได้ทุกชนิดทั้งยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และยีน *qepA* โดยพบยีน *qnrS* มากที่สุดคิดเป็น 27.3 (3/11) เปอร์เซ็นต์ ยีนที่พบทั้งหมดเป็นยีนดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ที่สามารถถ่ายทอดทาง plasmid ได้ แสดงว่าเชื้อที่ดื้อยา ciprofloxacin มีการเปลี่ยนจากกลายพันธุ์ที่ระดับโครโมโซมมาผลิตโปรตีน qnr ซึ่งสามารถป้องกัน DNA gyrase และ

topoisomerase IV ไม่ให้จับกับยาในกลุ่ม fluoroquinolone ทั้งนี้การพบยีน *qepA* ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ efflux pump ทำให้ยาถูกขับออกจากเซลล์เพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 3.4 จำนวนยีนกลุ่ม fluoroquinolone ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อ ciprofloxacin

รูปแบบที่	จำนวนยีนที่พบ	จำนวนไอโซเลท (%)			P
		P _{R1+R2+R3} (n=7)	C _{R1} (n=2)	C _{R2+R3} (n=11)	
1	0	2 (28.6)	2 (100)	1 (9.1)	0.023
2	1	2 (28.6)	0	8 (72.7)	0.062
3	2	3 (42.8)	0	2 (18.2)	0.345

เมื่อพิจารณาทั้งสามกลุ่มพบว่าสามารถพบยีนกลุ่ม fluoroquinolone จำนวน 1 ยีนมากที่สุดคิดเป็น 50 (10/20) เปอร์เซ็นต์ ยีนที่พบมากที่สุดได้แก่ยีน *qnrB* และ *qnrS* เท่ากันคิดเป็นชนิดละ 30 (6/20) เปอร์เซ็นต์ และพบยีน *qnrA* และ *qepA* คิดเป็นชนิดละ 20 (4/20) เปอร์เซ็นต์ และมีเชื้อ 5 ไอโซเลทที่พบว่าดื้อต่อ ciprofloxacin แต่ไม่พบยีนเหล่านี้ ซึ่งเชื่อว่าจะมีกลไกชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone เช่น การ mutation ของยีน *gyrA* หรือยีน *parC* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่อยู่บนโครโมโซมของเชื้อ

4. การตรวจหาเอนไซม์และยีนในกลุ่ม beta-lactamase

การทดลองในส่วนของการตรวจหาเอนไซม์และยีนกลุ่ม beta-lactamase จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ การตรวจหาเอนไซม์และยีนของ Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) และการตรวจหาเอนไซม์และยีนของ class C beta-lactamase (*ampC*)

การผลิตเอนไซม์ ESBLs จะตรวจด้วยวิธี combination disk method ในเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 77 ไอโซเลท มีเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ ESBLs ได้ 22 ไอโซเลทคิดเป็น 28.6 เปอร์เซ็นต์ และมีเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ non-ESBLs beta-lactamase ทั้งหมด 35 ไอโซเลทคิดเป็น 45.5 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3.5

เชื่อก่อนได้รับยา (P_{R1+R2+R3} และ C_{R1}) พบ non-ESBLs คิดเป็น 42.2 (27/64) เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับยา ciprofloxacin (C_{R2+R3}) พบ non-ESBLs คิดเป็น 61.5 (8/13) เปอร์เซ็นต์

ส่วนเชื้อก่อนได้รับยา ($P_{R1+R2+R3}$ และ C_{R1}) พบ ESBLs คิดเป็น 29.7 (19/64) เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับยา ciprofloxacin (C_{R2+R3}) พบ Non-ESBLs คิดเป็น 23.1 (3/13) เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการได้รับยา ciprofloxacin ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *K. pneumoniae*

ตารางที่ 3.5 การผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม beta-lactamase ในเชื้อ *K. pneumoniae*

Beta-lactamase production		จำนวนไอโซเลท (%)			P
		$P_{R1+R2+R3}$ (48)	C_{R1} (16)	C_{R2+R3} (13)	
Class A	non-ESBLs (n=35)	19 (39.6)	8 (50)	8 (61.5)	0.340
	ESBLs (n=22)	17 (35.4)	2 (12.5)	3 (23.1)	0.190
Class B	metallo beta-lactamases	0	0	0	-
Class C	cephalosporinases	0	1 (6.25)	1 (7.7)	0.177
Class D	oxacillinases	-	-	-	-

* เชื้อที่ไม่ผลิตเอนไซม์ beta-lactamase ทั้งหมด 18 ไอโซเลท

ส่วนการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ class C beta-lactamase (AmpC) ใช้หลักการ combination disk method พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ AmpC คิดเป็น 2.6 (2/77) เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำทั้ง 2 ไอโซเลท มาตรวจหาใน class C beta-lactamase (*ampC*) ด้วยวิธี PCR พบยีน *ampC* ในเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท

ส่วนผลการตรวจหาเอนไซม์ class B metallo beta-lactamase จากการ screening ด้วยผลความไวต่อยา imipenem และ meropenem ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม carbapenem พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ทุกตัวมีความไวต่อยาทั้งสองชนิด เบื้องต้นจึงสรุปว่าไม่มีเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ ส่วนผล class D beta-lactamase ไม่ได้ทำการทดสอบ จากเชื้อทั้งหมด 77 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ beta-lactamase 18 ไอโซเลท

ในการศึกษายีนเชื้อในกลุ่มที่ผลิต non-ESBLs beta-lactamase ดังตารางที่ 3.6 ส่วนใหญ่พบยีน *bla_{SHV}* เพียงชนิดเดียวคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ และที่พบมากที่สุดได้แก่ ยีน *bla_{SHV-1}* คิดเป็น 32.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *bla_{SHV-12}* คิดเป็น 17.9 เปอร์เซ็นต์ และ *bla_{SHV-76}* คิดเป็น 10.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นพบรูปแบบที่มียีน *bla_{TEM}* เพียงชนิดเดียว คิดเป็น 14.3 เปอร์เซ็นต์ subtype ที่พบทั้งหมดเป็น *bla_{TEM-1}* ส่วนการมียีน *bla_{SHV}* ร่วมกับยีน *bla_{TEM}* นั้นพบเป็นส่วนน้อยคิด

เป็น 5.7 เปอร์เซ็นต์มีการพบ bla_{SHV-1} ร่วมกับ bla_{TEM-1} และพบ bla_{SHV-11} ร่วมกับ bla_{TEM-1} คิดเป็นชนิดละ 50 เปอร์เซ็นต์

ยีน bla_{SHV} ในกลุ่มที่ผลิต non-ESBLs beta-lactamase มีความหลากหลาย แสดงว่าเชื้อ *K. pneumoniae* สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้หลายชนิด ในการศึกษาพบ subtype ดังนี้ bla_{SHV-1} , bla_{SHV-5} , bla_{SHV-11} , bla_{SHV-12} , bla_{SHV-26} , bla_{SHV-27} , bla_{SHV-28} , bla_{SHV-76} , bla_{SHV-77} , $bla_{SHV-119}$ ซึ่ง SHV-1 และ SHV-11 เท่านั้นที่จัดเป็น broad spectrum enzyme ดังนั้น subtype อื่นที่ได้จัดเป็น ESBLs ดังนั้นจากการศึกษาพบว่ามีเชื้อทั้งหมด 17 ไอโซเลท คิดเป็น 60.7 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs แต่พบยีนที่จัดเป็น subtype ในการสร้างเอนไซม์ ESBLs จึงน่าจะทำการศึกษากลไกการดื้อยาในเชื้อกลุ่มนี้ต่อไป

ตารางที่ 3.6 ชนิดของยีนที่พบในกลุ่ม non-ESBLs และกลุ่ม ESBLs

รูปแบบที่	ชนิดของยีน	จำนวนไอโซเลท (%)		P
		Non-ESBLs (35)	ESBLs (22)	
1	bla_{SHV}	28 (80)	2 (9.1)	0.000
2	bla_{TEM}	5 (14.3)	2 (9.1)	0.561
3	$bla_{CTX-M}+bla_{TEM}$	0	1 (4.6)	0.203
4	$bla_{SHV}+bla_{TEM}$	2 (5.7)	5 (22.7)	0.057
5	$bla_{CTX-M}+ bla_{SHV}+bla_{TEM}$	0	12 (54.5)	0.000

ในกลุ่มเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ ESBLs ได้พบยีน bla_{TEM} มากที่สุดคิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาพบยีน bla_{SHV} คิดเป็น 86.3 เปอร์เซ็นต์และพบยีน bla_{CTX-M} คิดเป็น 59.1 เปอร์เซ็นต์ โดยมักพบยีนร่วมกัน โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือการมียีนร่วมกัน 3 ยีนคิดเป็น 54.5 เปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 3.6 โดย subtype ที่พบร่วมกันมากที่สุดคือ $bla_{CTX-M-15}$, bla_{SHV-5} และ bla_{TEM-1} พบเท่ากับ $bla_{CTX-M-15}$, bla_{SHV-12} และ bla_{TEM-1} กับ $bla_{CTX-M-15}$, bla_{SHV-28} และ bla_{TEM-1} คิดเป็นชนิดละ 25 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาพบยีน bla_{SHV} ร่วมกับยีน bla_{TEM} ซึ่ง subtype ที่พบมากที่สุดคือ bla_{SHV-12} ร่วมกับ bla_{TEM-1} คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์

5. การตรวจสอบหายีน *traA*

เพื่อต้องการทดสอบว่า การที่มียีนกลุ่ม ESBLs และยีนกลุ่ม fluoroquinolone บน plasmid และอาจจะสามารถมีการถ่ายโอนของยีนไปสู่เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae อื่นได้ จึง

ตรวจสอบหายีน *traA* ซึ่งเป็น transposon ใช้ในการถ่ายโอนยีน ผลการทดลองพบว่ามียีน *traA* ในเชื้อทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ KP034R1/2, KP066R2/2 และ KP075R1/2 แสดงว่า เชื้อที่มียีนกลุ่ม ESBLs และยีนกลุ่ม fluoroquinolone สามารถถ่ายทอดผ่านทาง plasmid ได้ จึงควรศึกษาเพื่อหาแนวทางป้องกันการดื้อยาในกลุ่มนี้ไม่ให้กระจายสู่เชื้อ species อื่นต่อไป

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาสำคัญที่มีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ต้องเข้าพักรักษาตัวที่โรงพยาบาลเป็นเวลานานหรือเข้ารับการรักษาย่อยมักได้รับยาปฏิชีวนะและมีโอกาสของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) สูงขึ้น เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) (Paterson, 2006) และเป็นเชื้อก่อโรคติดเชื้อในระบบอื่นๆ ของร่างกาย (Berrazeg *et al.*, 2013) ทั้งยังจัดเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug-resistant)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาอุบัติการณ์และเปรียบเทียบการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactam และ fluoroquinolone ในเชื้อ *K. pneumoniae* จากผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ESBLs ของเชื้อ งานวิจัยพบว่าการได้รับยา ciprofloxacin ทำให้ตรวจพบเชื้อที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้น แต่ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *K. pneumoniae*

การศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอด plasmid ของยีนดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone จากเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs ในผู้ป่วยเด็กของประเทศเม็กซิโก พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มียีน *qnr* คิดเป็น 13.7 (7/51) เปอร์เซ็นต์ และไม่พบยีน *qepA* (Silva-Sánchez *et al.*, 2013) งานวิจัยนี้พบว่าเชื้อที่พบยีนดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone คิดเป็น 19.5 (15/77) เปอร์เซ็นต์ พบยีน *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) คิดเป็น 26.7 เปอร์เซ็นต์ และพบยีน *qepA* คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาแบบแยกชนิดยีน *qnr* พบว่า ยีนที่พบมากที่สุดคือยีน *qnrB* และยีน *qnrS* คิดเป็นชนิดละ 30 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบยีน *qnrB* และยีน *qnrS* โดยพบยีน *qnrS* มากกว่ายีน *qnrB* (Deepak *et al.*, 2009, Pasom *et al.*, 2013)

การศึกษายีน *bla_{CTX-M}* ที่แยกได้จากลำไส้ของคนไทยในชนบท พบว่าเชื้อดื้อต่อยา gentamicin, ciprofloxacin, imipenem, meropenem และ amikacin คิดเป็น 63.1, 19.7, 0.4, 0.4 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Luvsansharav *et al.*, 2012) งานวิจัยนี้พบว่า เชื้อดื้อต่อยา gentamicin และ ciprofloxacin คิดเป็นชนิดละ 26 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ส่วนในยา imipenem และ meropenem ไม่พบการดื้อยาทั้งสองชนิดนี้แสดงว่างานวิจัยมีความสอดคล้องกัน เชื้อ *K. pneumoniae* มีความไวต่อยา imipenem, meropenem และ amikacin ส่วนใหญ่พบยีน *bla_{CTX-M-9}* และ *bla_{CTX-M-1}* ในกลุ่มผู้ป่วยคนไทย และยีน *bla_{CTX-M-15}* เป็น ESBLs หลักที่พบได้บ่อยใน

ผู้ป่วยเด็ก ในผู้ใหญ่สามารถพบได้ทั้งยีน bla_{CTX-M} และยีน bla_{SHV} (Silva-Sánchez *et al.*, 2013) ส่วนในงานวิจัยนี้พบยีน bla_{TEM} มากที่สุด รองลงมาพบยีน bla_{SHV} และยีน bla_{CTX-M} ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ ESBLs ของเชื้อ *K. pneumoniae* เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลมากกว่า 48 ชั่วโมงกับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลน้อยกว่า 48 ชั่วโมงของโรงพยาบาลชลบุรี พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ESBLs คิดเป็น 50.9 (537/1,055) เปอร์เซ็นต์ โดยผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลน้อยกว่า 48 ชั่วโมง เชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ESBLs คิดเป็น 23.8 (90/378) เปอร์เซ็นต์ ส่วนผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลมากกว่า 48 ชั่วโมง เชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ESBLs คิดเป็น 66.0 (447/677) เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าระยะเวลาในการเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลที่นานกว่ามีผลทำให้เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ ESBLs เพิ่มขึ้น (Waiwarawooth *et al.*, 2006) งานวิจัยนี้พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ ESBLs คิดเป็น 28.6 (22/77) เปอร์เซ็นต์ การศึกษาความชุกในการผลิตเอนไซม์ ESBLs ของ *K. pneumoniae* ในทวีปเอเชีย พบว่าประเทศไทยมีการผลิต ESBLs เพิ่มขึ้นจาก 8.5 เป็น 29.8 เปอร์เซ็นต์ ในประเทศเกาหลีเพิ่มขึ้นจาก 22.5 เป็น 22.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในประเทศไทยมีรายงานจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ว่า *K. pneumoniae* สามารถผลิต ESBLs ได้ 32 เปอร์เซ็นต์ และโรงพยาบาลศิริราช 56.9 เปอร์เซ็นต์ (Chaikittisuk and Munsrichoom, 2007)

การศึกษา *K. pneumoniae* ที่ผลิต ESBLs ที่แยกจากผู้ป่วยห้องฉุกเฉินสามารถพบยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} และยีน bla_{SHV} บน plasmid ได้ 75, 50 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Pornsinchai *et al.*, 2015) งานวิจัยนี้พบว่า ในกลุ่มที่เป็น ESBLs สามารถพบยีน bla_{TEM} , bla_{SHV} และยีน bla_{CTX-M} ได้ 91, 86.3 และ 59.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การศึกษายีน bla_{CTX-M} ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระของคนไทยที่มีสุขภาพดี เมื่อตรวจสอบ ESBLs phenotype ด้วยวิธี double-disk synergy test พบว่ามี 3 (2.1%) ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็น negative แต่มียีน bla_{CTX-M} (Sasaki *et al.*, 2010) ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยนี้พบว่า ในกลุ่มที่ผลิต non-ESBLs beta-lactamase ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่มีเอนไซม์ ESBLs แต่พบยีน bla_{SHV} ชนิดที่จัดเป็น ESBLs ถึง 17 ไอโซเลท คิดเป็น 22.1 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อทั้งหมด ดังนั้นควรศึกษา mechanism ของ subtype เหล่านี้ต่อไป

มีรายงานพบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug resistant) สามารถส่งผ่านยีนดื้อยาทางพลาสมิด (Jiang *et al.*, 2008, Teo *et al.*, 2009) งานวิจัยนี้ทำการทดสอบเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท (KP034R1/2, KP066R2/2 และ KP075R1/2) ที่ให้ผลบวกของยีนกลุ่ม ESBLs และยีนกลุ่ม fluoroquinolone โดยวิธี PCR และผลการทดสอบหายีน *traA* ในเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ พบว่าเชื้อมียีนนี้อยู่ซึ่งแสดงว่าเชื้ออาจส่งผ่านยีนดื้อยาไปยังเชื้ออื่นได้

การรายงานการศึกษาการผลิตเอนไซม์และยีน *ampC* บนพลาสมิดของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae พบว่า *K. pneumoniae* ผลิตเอนไซม์ AmpC คิดเป็น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (Polsfuss *et al.*, 2011) ในงานวิจัยนี้พบเชื้อผลิตเอนไซม์ AmpC คิดเป็น 2.6 (2/77) เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ AmpC จากเชื้อ *K. pneumoniae* ในผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 0.8 เปอร์เซ็นต์ (8/982) ทั้งนี้พบว่า นอกจากการทดสอบเพื่อยืนยันการผลิตเอนไซม์ AmpC โดยใช้วิธี combined disk method แล้วยังสามารถทดสอบได้ด้วยวิธีอื่น ได้แก่ three-dimensional test หรือ cefoxitin agar เป็นต้น (Nasim *et al.*, 2004, Jacoby, 2009)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพบเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยเฉพาะต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone และ third generation cephalosporin รวมถึงยากลับ beta-lactamase inhibitor การศึกษากลไกการดื้อต่อยาโดยศึกษายีนที่ทำหน้าที่ดื้อต่อยาเหล่านี้ พบว่าเชื้อมียีนที่หลากหลายและมีความซุกที่แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ นอกจากนั้นยังพบเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs แต่มียีน ESBLs ซึ่งน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป การศึกษานี้จึงมีประโยชน์เพื่อหาแนวทางในการป้องกันผู้ป่วยจากการติดเชื้อและให้ประโยชน์ในการใช้ยาปฏิชีวนะและการเลือกยาในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *K. pneumoniae* รวมถึงเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม Enterobacteriaceae อีกด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากผลความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า การได้รับ ciprofloxacin ทำให้ตรวจพบเชื้อดื้อยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้น แต่การได้รับ ciprofloxacin ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยาในกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ กลุ่ม third generation cephalosporin (cefotaxime และ ceftazidime) ยาในกลุ่ม beta-lactam/beta-lactamase inhibitor (sulperazone) และยาในกลุ่ม cephamycin (cefoxitin) รวมถึง aminoglycoside (amikacin และ gentamicin)
2. เชื้อ *K. pneumoniae* ทุกไอโซเลตยังมีความไวต่อยากลุ่ม carbapenem (imipenam และ meropenam) ยาในกลุ่มนี้จึงสามารถเลือกใช้รักษาผู้ป่วยได้
3. ค่า MIC ของยา ciprofloxacin อยู่ในช่วง 0.19 ถึง >32 $\mu\text{g/ml}$ โดยค่า MIC₅₀ มีค่าเท่ากับ 0.032 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MIC₉₀ มีค่าเท่ากับ >32 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนค่า MIC ของยา ceftazidime อยู่ในช่วง 0.064 ถึง >256 $\mu\text{g/ml}$ โดยค่า MIC₅₀ มีค่าเท่ากับ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MIC₉₀ มีค่าเท่ากับ 96 $\mu\text{g/ml}$ การทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา สามารถช่วยในการเลือกใช้ความเข้มข้นของยาในการรักษาผู้ป่วย และใช้ดูแนวโน้มในการดื้อยาในเบื้องต้นเพื่อหาแนวทางในการเลือกใช้ยาในการรักษาผู้ป่วยด้วย
4. การได้รับยา ciprofloxacin ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *K. pneumoniae*
5. จากผลการแยกแบบแผนการดื้อยาปฏิชีวนะพบว่า การใช้ ciprofloxacin ไม่ทำให้เกิดเชื้อดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant) เพิ่มขึ้น
6. ความชุกของเชื้อที่ดื้อต่อ ciprofloxacin ในกลุ่ม P_{R1+R2+R3}, C_{R1} และ C_{R2+R3} คิดเป็น 14.6, 12.5 และ 84.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนยีน plasmid-mediated quinolone ที่พบมากคือ *qnrB* และยีน *qnrS*
7. ความชุกของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs ในกลุ่ม P_{R1+R2+R3}, C_{R1} และ C_{R2+R3} คิดเป็น 35.4, 12.5 และ 23.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยพบยีน *bla*_{TEM} มากที่สุดคิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ (*bla*_{TEM-1} ทั้งหมด) รองลงมาพบยีน *bla*_{SHV} คิดเป็น 86.3 เปอร์เซ็นต์ พบ *bla*_{SHV-12} มากที่สุด รองลงมาคือ *bla*_{SHV-5} และพบยีน *bla*_{CTX-M} คิดเป็น 59.1 เปอร์เซ็นต์ (*bla*_{CTX-M-15} ทั้งหมด) ยีนที่พบในงานวิจัยนี้ได้แก่ *bla*_{SHV-1}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-26}, *bla*_{SHV-27}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-76}, *bla*_{SHV-77}, *bla*_{SHV-119}, *bla*_{TEM-1} และ *bla*_{CTX-M-15}

8. พบเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs แต่มียีน ESBLs
9. การวิเคราะห์หายีน *traA* แสดงว่ายีนกลุ่ม ESBLs และกลุ่ม fluoroquinolone อยู่บน plasmid และอาจถ่ายทอดไปสู่เชื้ออื่นได้

เอกสารอ้างอิง

- Amornthipayawong, D., Mongkolwisut, P., Jittrawongpan, P., Supajin, A. and Nontasit, W. 2009. The prevalence of extended-spectrum β -lactamases producing in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated from patients attending in Nan Hospital and Community Hospital in Nan province, Thailand (2004 – 2010). Medical technology journal. 44(3): 169-176.
- Babini, G. S. and Livermore, D. M. 2000. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997–1998. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 45(2): 183-189.
- Berrazeg, M., Diene, S. M., Drissi, M., Kempf, M., Richet, H., Landraud, L. and Rolain, J.-M. 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PloS one. 8(4): e61428.
- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial agents and chemotherapy. 48(1): 1-14.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical microbiology reviews. 14(4): 933-951.
- Brisse, S., Grimont, F. and Grimont, P. A. 2006. The genus *Klebsiella*. In The Prokaryotes. editors. Springer, City, pp. 159-196.
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J. and Nordmann, P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 60(2): 394-397.
- Chaikittisuk, N. and Munsrichoom, A. 2007. Extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children at Queen Sirikit National Institute of Child Health. J Infect Dis Antimicrob Agents. 24(3): 107-115.

- 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.
- Costerus, J. M., van de Beek, D. and Brouwer, M. C. 2012. Nosocomial meningitis caused by gas producing *Klebsiella pneumoniae*. *BMJ case reports*. 2012: bcr1120115137.
- Dashti, A., Paton, R. and Amyes, S. 2006. Linkage of ciprofloxacin resistance with a single genotypic cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*. 27(1): 73-76.
- Deepak, R. N., Koh, T. H. and Chan, K. S. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a large Singapore hospital. *Annals Academy of Medicine Singapore*. 38(12): 1070.
- Denton, M. 2007. Enterobacteriaceae. *International journal of antimicrobial agents*. 29: S9-S22.
- Dias Neto, J. A., Martins, A. C. P., Silva, L. D. M. d., Tiraboschi, R. B., Domingos, A. L. A., Cologna, A. J., Paschoalin, E. L. and Tucci Jr, S. 2003. Community acquired urinary tract infection: etiology and bacterial susceptibility. *Acta Cirurgica Brasileira*. 18: 33-36.
- Gniadkowski, M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection*. 7(11): 597-608.
- Gupta, A., Ampofo, K., Rubenstein, D. and Saiman, L. 2003. Extended spectrum β lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *Journal of perinatology*. 23(6): 439-443.

- Guyot, A., Barrett, S., Threlfall, E., Hampton, M. and Cheasty, T. 1999. Molecular epidemiology of multi-resistant *Escherichia coli* Journal of Hospital Infection. 43(1): 39-48.
- Hawkey, P. 2008. Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. Clinical Microbiology and Infection. 14(s1): 159-165.
- Hsieh, P.-F., Lin, T.-L., Yang, F.-L., Wu, M.-C., Pan, Y.-J., Wu, S.-H. and Wang, J.-T. 2012. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. PLoS One. 7(3): e33155.
- Ingvija, N., Hortiwakul, R., Chayakul, P. and Thamjarungwong, B. 2003. Prevalence and susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta lactamases in Songklanagarind Hospital, Thailand. Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents. 20(3): 127-134.
- Jacoby, G. A. 2009. AmpC β -lactamases. Clinical microbiology reviews. 22(1): 161-182.
- Jiang, Y., Zhou, Z., Qian, Y., Wei, Z., Yu, Y., Hu, S. and Li, L. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac (6')-Ib-cr in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. Journal of antimicrobial chemotherapy. 61(5): 1003-1006.
- Kim, H. B., Park, C. H., Kim, C. J., Kim, E.-C., Jacoby, G. A. and Hooper, D. C. 2009. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrobial agents and chemotherapy. 53(2): 639-645.
- Kim, J., Chung, D., Wie, S., Yoo, J., Park, S. and Abscess, K. S. G. f. L. 2009. Risk factor analysis of invasive liver abscess caused by the K1 serotype *Klebsiella pneumoniae*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases. 28(1): 109-111.

- Ko, W.-C., Paterson, D. L., Sagnimeni, A. J., Hansen, D. S., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., Casellas, J. M., Goossens, H., Mulazimoglu, L. and Trenholme, G. 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerging infectious diseases*. 8(2): 160-166.
- 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.
- Livmore, D. and Hawkey, P. 2005. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(3): 451-454.
- Livmore, D. M., Nichols, T., Lamagni, T. L., Potz, N., Reynolds, R. and Duckworth, G. 2003. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* from bacteraemias in England; increasingly prevalent and mostly from men. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(6): 1040-1042.
- Luvira, V. 2006. Overview of antibiotic resistance. *Songklanagarind Medical Journal*. 24(5): 453-459.
- Luvsansharav, U.-O., Hirai, I., Nakata, A., Imura, K., Yamauchi, K., Niki, M., Komalamisra, C., Kusolsuk, T. and Yamamoto, Y. 2012. Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in rural Thai communities. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 67(7): 1769-1774.
- Mammeri, H., Nazic, H., Naas, T., Poirel, L., Léotard, S. and Nordmann, P. 2004. AmpC β -lactamase in an *Escherichia coli* clinical isolate confers resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48(10): 4050-4053.
- 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.

- Marcusson, L. L., Frimodt-Møller, N. and Hughes, D. 2009. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS pathogens*. 5(8): e1000541.
- Mohawk, K. L., Melton-Celsa, A. R., Zangari, T., Carroll, E. E. and O'Brien, A. D. 2010. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157: H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microbial pathogenesis*. 48(3): 131-142.
- Monstein, H.-J., ÖSTHOLM-BALKHED, Å., Nilsson, M., Nilsson, M., Dornbusch, K. and Nilsson, L. 2007. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*. *Apmis*. 115(12): 1400-1408.
- Nasim, K., Elsayed, S., Pitout, J., Conly, J., Church, D. and Gregson, D. 2004. New method for laboratory detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*. 42(10): 4799-4802.
- Palucha, A., Mikiewicz, B., Hryniewicz, W. and Gniadkowski, M. 1999. Concurrent outbreaks of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44(4): 489-499.
- 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. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American journal of medicine*. 119(6): S20-S28.

- Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B. and Bonomo, M. D. 2003. the International Klebsiella study group et al. Extended spectrum b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3553-3560.
- 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.
- Podschun, R. and Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews.* 11(4): 589-603.
- 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.
- Pornsinchai, P., Chongtrakool, P., Diraphat, P., Siripanichgon, K. and Malathum, K. 2015. EMERGENCY ROOM: AN UNRECOGNIZED SOURCE OF EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 46(1): 51.
- Potz, N. A., Hope, R., Warner, M., Johnson, A. P., Livermore, D. M., London and Group, S. E. E. P. 2006. Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae in London and South-East England. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 58(2): 320-326.
- Radice, M., Power, P., Di Conza, J. and Gutkind, G. 2002. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 46(2): 602-604.

- Sasaki, T., Hirai, I., Niki, M., Nakamura, T., Komalamisra, C., Maipanich, W., Kusolsuk, T., Sa-nguankiat, S., Pubampen, S. and Yamamoto, Y. 2010. High prevalence of CTX-M β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. *Journal of antimicrobial chemotherapy*.
- Saurina, G., Quale, J. M., Manikal, V. M., Oydna, E. and Landman, D. 2000. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45(6): 895-898.
- Silva-Sánchez, J., Cruz-Trujillo, E., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A. and Garza-Ramos, U. 2013. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico. *PloS one*. 8(10): e77968.
- Siu, L. K., Yeh, K.-M., Lin, J.-C., Fung, C.-P. and Chang, F.-Y. 2012. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *The Lancet infectious diseases*. 12(11): 881-887.
- Sudha, R., Pandian, M. R. and Senthilkumar, B. 2013. Screening of Urinary Tract Infection causing bacteria and their Antibiotic sensitivity pattern in Namakkal district, TN. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*. 2(1): 57.
- Szabo, D., Silveira, F., Fujitani, S. and Paterson, D. L. 2005. Mechanisms of resistance of bacteria causing ventilator-associated pneumonia. *Clinics in chest medicine*. 26(1): 75-79.
- Teeraputon, S., Chanapool, P., Boonjaroen, S., Thanyathada, P. and Yimsabai, J. 2012. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBLs) Detection in *Klebsiella pneumoniae* between Combination Disc Test With and Without Boronic Acid. *BUDDHACHINARAJ MEDICAL JOURNAL*. 29(2): 207-214.

- Teo, J. W. P., Ng, K. Y. and Lin, R. T. P. 2009. Detection and genetic characterisation of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. International journal of antimicrobial agents. 33(2): 177-180.
- Vahaboglu, H., Oztürk, R., Aygün, G., Coşkun, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioğlu, H., Balik, I., Aydın, K. and Otkun, M. 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrobial agents and chemotherapy. 41(10): 2265-2269.
- Waiwarawooth, J., Jutiworakul, K. and Joraka, W. 2006. The prevalence and susceptibility patterns of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Chonburi Hospital. Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents. 23(2): 57-65.
- Wang, P., Xiong, Y., Lan, R., Ye, C., Wang, H., Ren, J., Jing, H., Wang, Y., Zhou, Z. and Cui, Z. 2011. pO157_Sal, a novel conjugative plasmid detected in outbreak isolates of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of clinical microbiology. 49(4): 1594-1597.
- Winokur, P., Canton, R., Casellas, J.-M. and Legakis, N. 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical infectious diseases. 32(Supplement 2): S94-S103.
- Yeh, K.-M., Kurup, A., Siu, L., Koh, Y., Fung, C.-P., Lin, J.-C., Chen, T.-L., Chang, F.-Y. and Koh, T.-H. 2007. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. Journal of clinical microbiology. 45(2): 466-471.
- อุทัยพัฒน์, อ. 2543. Fluoroquinolones. เกสัชวิทยา. 2(มหาวิทยาลัยมหิดล): 177-178.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani (LB) broth

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Tryptone	10	g
Yeast extract	10	g
Sodium Chloride	5	g
Distilled water	1	ml

ชั่ง LB 25 g มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้ละลาย ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 4 ml ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave 121°C 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2. Mueller Hinton agar (MHA)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Beef extract power	2	g
Acid Digest of Casein	17.5	g
Soluble starch	1.5	g
Agar	15	g
Distilled water	1	ml

ชั่ง MHA 38 g มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้ละลาย ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave 121°C 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. Mueller Hinton broth (MHB)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Beef extract power	2	g
Acid Digest of Casein	17.5	g
Soluble starch	1.5	g
Distilled water	1	ml

ชั่ง MHA 38 g มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้ละลาย ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave 121°C 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

4. Tryptic soy agar (TSA)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Pancreatic Digest of Casein	15	g
Papaic Digest of Soybean	5	g
Sodium Chloride	5	g
Agar	15	g
Distilled water	1	ml

ชั่ง TSA 40 g มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave 121°C 15 นาที เทใส่จานปราศจากเชื้อ (sterile petri dish) 20 ml ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

5. Tryptic soy broth (TSB)

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Pancreatic Digest of Casein	15	g
Papaic Digest of Soybean	5	g
Sodium Chloride	5	g
Distilled water	1	ml

ชั่ง TSA 40 g มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้ละลาย ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 4 ml ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave 121°C 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

ภาคผนวก ข

1. สารละลายสำหรับสกัด Plasmid DNA ด้วยวิธี Phenol-chloroform Extraction

1.1 Solution I

Glucose 50 mM	2 ml
EDTA 1 mM, pH 8.0	0.16 ml
Tris-HCl 10 mM	0.8 ml

เตรียมสารละลายตามปริมาณที่คำนวณ เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 80 ml

1.2 Solution II

5N NaOH 16 g ละลายน้ำ 80 ml

10% SDS (Sodium dodecyl sulphate)

ผสม 5N NaOH: 10% SDS: DI อัตราส่วนเท่ากับ 2:5:43

1.3 4M potassium acetate – 2M acetic acid

5M potassium acetate 64 ml

10M acetic acid 16 ml

เตรียมสารละลายตามปริมาณที่คำนวณ เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 80 ml

1.4 Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1)

ผสม Chloroform: Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 จากนั้นผสม Phenol และ Chloroform: Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 1:1 แล้วราดทับด้วย 0.1M Tris-HCl, pH 8.0

2. สารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

2.1 Loading dye

ซึ่ง bromophenol blue 25 mg และ Sucrose 4 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml
เก็บที่อุณหภูมิ 4 C

2.2 Tris-acetate-EDTA buffer (10X TAE)

ซึ่ง Tris base ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml แล้วเติม glacial acetic acid
และ 0.5M EDTA ปรับปริมาตรให้ได้ 1 L

2.3 Ethidium bromide (10mg/ml)

ซึ่ง Ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนจนละลาย อาจใช้เวลา
หลายชั่วโมง เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (ควรเตรียมด้วยความระมัดระวัง)

ภาคผนวก ค

ตารางรวมผลเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 77 isolates

No.	Group	Isolate	Antimicrobial agents									ESBL enzyme	ESBL gene			ampC gene	Quinolone gene			
			AMK	CAZ	CTX	CIP	SUL	IMP	MER	GEN	FOX		tra _{SHV}	tra _{CTX-M}	tra _{TEM}		qnrA	qnrB	qnrS	qepA
1	CR1	KP001 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							
2	CR2+R3	KP001 R3	S	S	S	S	S	S	S	S	S		12							
3	CR2+R3	KP002 R3	I	S	R	R(>32)	S	S	S	R	S	+		15	1				+	
4	CR2+R3	KP004 R2	S	S	S	R(16)	S	S	S	S	S		11		1				+	
5	PR1+R2 +R3	KP005 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1		1					
6	PR1+R2 +R3	KP006 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		12							
7	CR1	KP008 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
8	CR2+R3	KP008 R2	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	S		76						+	+
9	CR1	KP009 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S				1					
10	PR1+R2 +R3	KP010 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
11	CR1	KP014 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
12	PR1+R2 +R3	KP015 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S				1					
13	PR1+R2 +R3	KP016 R1/1	S	R(96)	R(>32)	R(>32)	S	S	S	R	R	+	11	15	1				+	
14	PR1+R2 +R3	KP016 R1/2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		5							

No.	Group	Isolate	Antimicrobial agents									ESBL enzyme	ESBL gene			ampC gene	Quinolone gene			
			AMK	CAZ	CTX	CIP	SUL	IMP	MER	GEN	FOX		tra _{SHV}	tra _{CTX-M}	tra _{TEM}		qnrA	qnrB	qnrS	qepA
15	CR1	KP017 R1	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	S				1					
16	CR2+R3	KP018 R2	S	R(64)	S	R(>32)	I	S	S	R	S						+			
17	CR2+R3	KP019 R3	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	S		76						+	
18	PR1+R2 +R3	KP021 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
19	PR1+R2 +R3	KP022 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							
20	PR1+R2 +R3	KP022 R3	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							
21	CR1	KP024 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
22	PR1+R2 +R3	KP025 R1/1	I	R (>256)	R(32)	S	R	S	S	R	S	+	5		1					
23	PR1+R2 +R3	KP025 R1/2	I	R (>256)	R(24)	S	I	S	S	R	S	+	12		1					
24	PR1+R2 +R3	KP025 R3	S	S	S	S	S	S	S	S	S		27							
25	PR1+R2 +R3	KP027 R1	S	S	S	S	S	S	S	R	S		27							
26	PR1+R2 +R3	KP028 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
27	PR1+R2 +R3	KP029 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
28	PR1+R2 +R3	KP029 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							

No.	Group	Isolate	Antimicrobial agents									ESBL enzyme	ESBL gene			ampC gene	Quinolone gene			
			AMK	CAZ	CTX	CIP	SUL	IMP	MER	GEN	FOX		tra _{SHV}	tra _{CTX-M}	tra _{TEM}		qnrA	qnrB	qnrS	qepA
29	PR1+R2 +R3	KP030 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
30	PR1+R2 +R3	KP030 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		77							
31	PR1+R2 +R3	KP030 R3	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
32	CR1	KP034 R1/2	R	R(128)	R(24)	S	S	S	S	R	S	+	12		1		+			
33	PR1+R2 +R3	KP036 R2	S	R(24)	S	S	S	S	S	S	S	+	12							
34	PR1+R2 +R3	KP038 R1/1	S	R (>256)	R(>32)	R(>32)	S	S	S	R	S	+	12		1					
35	PR1+R2 +R3	KP038 R3	S	S	I	S	S	S	S	S	S									
36	CR1	KP041 R1/1	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	I				1					
37	PR1+R2 +R3	KP047 R1	S	S	S	R(6)	S	S	S	S	S									
38	PR1+R2 +R3	KP047 R2/1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							
39	PR1+R2 +R3	KP047 R2/2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							
40	PR1+R2 +R3	KP048 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S				1					
41	CR1	KP049 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		12							
42	CR2+R3	KP050 R2	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	S	+			1			+	+	

No.	Group	Isolate	Antimicrobial agents									ESBL enzyme	ESBL gene			ampC gene	Quinolone gene			
			AMK	CAZ	CTX	CIP	SUL	IMP	MER	GEN	FOX		tra _{SHV}	tra _{CTX-M}	tra _{TEM}		qnrA	qnrB	qnrS	qepA
43	CR2+R3	KP050 R3	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	S		11							
44	PR1+R2 +R3	KP051 R2/1	S	R(96)	R(>32)	S	I	S	S	R	S	+	12	15	1					
45	PR1+R2 +R3	KP051 R2/2	S	R(128)	R(>32)	S	I	S	S	R	S	+	5	15	1					
46	CR1	KP053 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							
47	CR1	KP056 R1/1	S	R(64)	S	S	S	S	S	S	R	+			1					
48	CR1	KP056 R1/2	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
49	PR1+R2 +R3	KP057 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
50	PR1+R2 +R3	KP059 R1	S	R(48)	R(>32)	I(3)	I	S	S	R	S	+	5	15	1					
51	CR1	KP060 R1/2	S	S	S	I(2)	S	S	S	S	S		1							
52	PR1+R2 +R3	KP061 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
53	PR1+R2 +R3	KP061 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		28							
54	PR1+R2 +R3	KP066 R1/1	I	R (>256)	R(>32)	I(3)	I	S	S	R	S	+	12	15	1					
55	PR1+R2 +R3	KP066 R1/2	I	R (>256)	R(>32)	R(4)	I	S	S	R	S	+	26	15	1			+		
56	PR1+R2 +R3	KP066 R2/1	I	R (>256)	R(>32)	I(3)	I	S	S	R	S	+	12	15	1					

No.	Group	Isolate	Antimicrobial agents									ESBL enzyme	ESBL gene			ampC gene	Quinolone gene			
			AMK	CAZ	CTX	CIP	SUL	IMP	MER	GEN	FOX		tra _{SHV}	tra _{CTX-M}	tra _{TEM}		qnrA	qnrB	qnrS	qepA
57	PR1+R2 +R3	KP066 R2/2	S	R(32)	R(>32)	R(>32)	R	S	S	R	R	+	11	15	1		+	+		
58	PR1+R2 +R3	KP066 R3/1	S	I(16)	R(>32)	I(3)	I	S	S	R	S	+	28	15	1					
59	PR1+R2 +R3	KP066 R3/2	S	I(16)	R(>32)	I(2)	I	S	S	R	S	+	28	15	1					
60	CR1	KP067 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
61	PR1+R2 +R3	KP071 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		12							
62	PR1+R2 +R3	KP071 R2/1	S	S	S	S	I	S	S	S	S		26							
63	CR1	KP072 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S		1							
64	CR2+R3	KP072 R3	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	S		28				+			
65	PR1+R2 +R3	KP075 R1/1	I	R(64)	R(32)	R(>32)	I	S	S	R	S	+	12					+	+	
66	PR1+R2 +R3	KP075 R1/2	S	S	I	R(>32)	I	S	S	R	I	+	12		1		+	+		
67	PR1+R2 +R3	KP075 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		12							
68	PR1+R2 +R3	KP080 R2	S	R(24)	R(>32)	I(2)	S	S	S	S	S	+	28	15	1					
69	CR2+R3	KP081 R2	S	S	S	R(12)	S	S	S	S	R					+				+
70	CR2+R3	KP081 R3	S	S	R	I(2)	S	S	S	R	S	+	5	15	1					

No.	Group	Isolate	Antimicrobial agents									ESBL enzyme	ESBL gene			<i>ampC</i> gene	Quinolone gene			
			AMK	CAZ	CTX	CIP	SUL	IMP	MER	GEN	FOX		<i>tra</i> _{SHV}	<i>tra</i> _{CTX-M}	<i>tra</i> _{TEM}		<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>
71	PR1+R2+R3	KP083 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S									
72	CR1	KP084 R1	S	S	S	S	S	S	S	S	R					+				
73	CR2+R3	KP084 R3	S	S	S	R(32)	S	S	S	S	S		11						+	
74	PR1+R2+R3	KP087 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	R									
75	CR2+R3	KP095 R2	S	S	S	R(>32)	S	S	S	S	S		119					+		
76	PR1+R2+R3	KP097 R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S		76							
77	PR1+R2+R3	KP098 R3	S	S	S	S	S	S	S	S	S		5							