

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะ กลุ่ม beta-lactams และ fluoroquinolone ในเชื้อ  
*Enterobacteriaceae* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

Characterizations of beta-lactams and fluoroquinolone resistance in  
*Enterobacteriaceae* from clinical specimens

### คณะนักวิจัย

#### หัวหน้าโครงการ:

ดร. รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

#### ผู้ร่วมโครงการ:

1. รศ.พญ. กมลวิษ เล่าประสพวัฒนา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. นางสาว วนัสนันท์ ธัญญาณิชย์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ศ.ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556-2558 รหัสโครงการ SCI560059S

**ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย):** การศึกษาลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะ กลุ่ม beta-lactams และ fluoroquinolone ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

**(ภาษาอังกฤษ):** Characterizations of beta-lactams and fluoroquinolone resistance in

*Enterobacteriaceae* from clinical specimens

### คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ:

ดร. รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ

ความรับผิดชอบ: 50%

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ร่วมโครงการ:

1. รศ.พญ. กมลวิษ เลาประสพวัฒนา

ความรับผิดชอบ: 25%

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. นางสาว วนัสนันท์ ธัญญาณิชย์

ความรับผิดชอบ: 15%

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. รศ.ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล

ความรับผิดชอบ: 10%

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## สารบัญ

	หน้า
1. ชื่อโครงการวิจัย / แผนงานวิจัย	1
2. คณะนักวิจัย และคณะ/หน่วยงานต้นสังกัด	1
3. สารบัญ รายการตาราง และ รายการภาพประกอบ	3
4. กิตติกรรมประกาศ	6
5. รายการผลงาน	
6. บทคัดย่อ	7
7. บทสรุป (Executive Summary)	8
7.1 บทนำ	11
7.2 ระยะเวลาวิจัย	12
7.3 แหล่งทุนสนับสนุน	12
7.4 วิธีการดำเนินการวิจัย	12
7.5 ผล	19
7.6 การอภิปรายผล	34
7.7 สรุป	40
7.8 เอกสารอ้างอิง	42
8. ภาคผนวก ประกอบด้วย	46
- นิพนธ์ต้นฉบับที่พร้อมส่งตีพิมพ์ (manuscript)	
- Proceeding	

## รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาชนิดของยาปฏิชีวนะ	15
ตารางที่ 2 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน <i>qnr</i> ( <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> )	16
ตารางที่ 3 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน ESBLs ( <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> )	<b>16</b>
ตารางที่ 4 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ของ ERIC-PCR	18
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	19
ตารางที่ 6 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>E. coli</i>	20
ตารางที่ 7 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>K. pneumonia</i>	22
ตารางที่ 8 Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes ที่ตรวจพบในเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ดื้อยา ciprofloxacin	24
ตารางที่ 9 Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes ที่ตรวจพบในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่ดื้อยา ciprofloxacin	25
ตารางที่ 10 กลุ่มของเอนไซม์ beta-lactamases ที่ตรวจพบในเชื้อ <i>E. coli</i>	26
ตารางที่ 11 กลุ่มของเอนไซม์ beta-lactamases ที่ตรวจพบในเชื้อ <i>K. pneumonia</i>	27
ตารางที่ 12 แสดง subtype ของ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs	28
ตารางที่ 13 ชนิดของยีนที่พบในกลุ่ม non-ESBLs และกลุ่ม ESBLs	29
ตารางที่ 14 คุณลักษณะของเชื้อ <i>E. coli</i>	31

## รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 ยีนที่ตรวจพบในเชื้อ <i>E. coli</i>	31
รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่แยกจากผู้ป่วยที่ได้รับยา ciprofloxacin	33

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล รองศาสตราจารย์ พญ.กมลวิช เลาประสพวัฒนา และ คุณวนันสนันท์ ธัญญาพาณิชย์ ที่ได้ความช่วยเหลือ ตลอดทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณ ดร.ธนัชฐา นัตรสวรรณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ.ศรัณยู ชูศรี ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมจนงานวิจัยสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัย ขอขอบพระคุณคณาจารย์ของภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการแก้ปัญหาต่างๆ รวมถึงเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกเกี่ยวกับวัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ในการทำวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณทุกๆคนในครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือ และคอยเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยเสมอมา

ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ

## รายการผลงาน

1. Manuscript : Characteristics of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Children with Cancer in Songklanagarind Hospital
2. Proceeding :
  - 2.1 Detection and Characterization of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Clinical isolates from Songklanagarind Hospital
  - 2.2 Detection and Characterization of Antibiotic Resistance in *Klebsiella Pneumoniae* from Clinical Isolates from Songklanagarind Hospital

### บทคัดย่อ

มีการรายงานพบเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่สร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) และคือยาในกลุ่ม fluoroquinolone ในโรงพยาบาลหลายแห่งทั่วโลก อย่างไรก็ตามในประเทศไทยข้อมูลเหล่านี้ยังจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ การศึกษารุ่นนี้ได้ศึกษาในผู้ป่วยเด็กมะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยแยกเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ได้ 249 และ 77 ไอโซเลท ตามลำดับ การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* คือยาในกลุ่ม fluoroquinolone (คือยา ciprofloxacin) พบมากที่สุดทั้งในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับยา ciprofloxacin ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าการได้รับยา ciprofloxacin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อต่อยา ciprofloxacin ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาการสร้าง class A beta-lactamases (ESBLs) และ class C beta-lactamases (AmpC) พบว่า *E. coli* 15.0% และ 1.0% ที่แยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ciprofloxacin สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs และ AmpC ได้ตามลำดับ และ *E. coli* 13.4% และ 1.3% ที่แยกจากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ciprofloxacin สร้างเอนไซม์ ESBLs และ AmpC ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการได้รับยา ciprofloxacin ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ ESBLs ผลการตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าพบยีน *bla*<sub>CTX-M</sub> มากที่สุด โดยเฉพาะ *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ผลการศึกษายืนยันบนพลาสมิดที่ทำให้ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ได้แก่ยีน *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* และ *qepA* แสดงให้เห็นว่าพบรูปแบบ *qnrA* + *qnrS* มากที่สุด การศึกษาคำแหน่งของยีน *qnrA* และ ยีน *bla*<sub>CTX-M</sub> พบว่าทั้ง 2 ยีนอยู่บนพลาสมิดซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่เชื้ออื่นๆ และจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) และ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่าเทคนิค PFGE มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี ERIC-PCR เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค PFGE สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็น clone เดียวกัน

จากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด ต่อเชื้อ *K. pneumoniae* ตรวจสอบหาชิ้น plasmid-mediated quinolone รวมทั้งเอนไซม์ ESBLs พบว่าจำนวนเชื้อที่ดื้อต่อ ciprofloxacin ในกลุ่ม P<sub>R1+R2+R3</sub>C<sub>R1</sub> และ C<sub>R2+R3</sub> คิดเป็น 14.6, 12.5 และ 84.6% ตามลำดับ ยีนที่เป็น plasmid-mediated quinolone ที่พบมากที่สุดคือ *qnrB* และ *qnrS* จำนวนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs ในกลุ่ม P<sub>R1+R2+R3</sub>C<sub>R1</sub> และ C<sub>R2+R3</sub> คิดเป็น 35.4, 12.5 และ 23.1% ตามลำดับ พบยีน *bla*<sub>TEM</sub> มากที่สุดคิดเป็น 91% รองลงมาพบยีน *bla*<sub>SHV</sub> คิดเป็น 86.3% และพบยีน *bla*<sub>CTX-M</sub> คิดเป็น 59.1% นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สร้าง ESBLs แต่มียีนกลุ่มการสร้างเอนไซม์ ESBLs อีก



ด้วย พบว่าการที่เชื้อได้รับยา ciprofloxacin ทำให้เชื้อดื้อต่อยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แต่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ ESBLs และไม่ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug-resistant)

## ABSTRACT

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and fluoroquinolone resistant Enterobacteriaceae has been reported in many hospitals worldwide. However, this information in Thailand is still limited especially in immunocompromised hosts with neutropenia. In this study, 249 and 77 of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from pediatric patients with leukemia and lymphoma in Songklanagarind hospital was investigated. Antibiotic susceptibility tests revealed that *E. coli* was resistant to fluorquinolone (ciprofloxacin resistance), mostly detected in both groups. Moreover, the results indicated that receiving ciprofloxacin significantly induced the ciprofloxacin resistance in *E. coli*. The results of class A beta-lactamases (ESBLs) and class C beta-lactamase (AmpC) revealed that 15.0% and 1.0% of *E. coli* isolated from the not receiving ciprofloxacin group produced ESBLs and AmpC respectively. Thirteen point four percent and 1.3% of *E. coli* obtained from the receiving ciprofloxacin group produced ESBLs and AmpC respectively. In addition, this study indicated that receiving ciprofloxacin did not increase the number of ESBL-producing *E. coli*. The study of ESBL genes in *E. coli* isolated from both groups displayed that most ESBL-producing isolates harbored  $bla_{CTX-M}$ , especially  $bla_{CTX-M-15}$ . Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes including *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qepA* were investigated in ciprofloxacin resistant strains. The data showed that most strains carried the combination of *qnrA* and *qnrS*. Both *qnrA* and  $bla_{CTX-M}$  were located on plasmids which can be horizontal transferred to other species. DNA fingerprint analysis revealed that pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was more effective than enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) because it provided the clearer DNA patterns.

Antibiotic susceptibilities of *K. pneumoniae* for nine antimicrobials, plasmid-mediated quinolone genes and ESBLs producing genes were investigated. 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 mostly *K. pneumoniae* carried *qnrB* and *qnrS* gene. The prevalence of ESBL producers 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. Certain isolates were non-ESBLs beta-lactamase producer but carried ESBLs genes. Our study indicated that ciprofloxacin treatment induced the ciprofloxacin resistance ( $P \leq 0.05$ ) but not ESBLs producing and multidrug-resistance.