บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อเป็นโรคที่พบได้บ่อยและเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมากโดยเฉพาะโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกรัมลบในลำไส้ (enteric bacteria) ซึ่งนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้นเนื่องจากเชื้อสามารถเติบโตและปนเปื้อนได้ทุกที่โดยเฉพาะบริเวณที่มีความชื้นสูง หรืออาจมีการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายไปยังอาหาร และเครื่องดื่มได้ง่าย เชื้อที่พบในลำไส้ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae มักก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงทั้งในคนและสัตว์ ปัจจุบันได้มีการนำเอายาต้านจุลินทรีย์มาใช้ในการยับยั้งเชื้อ หรือทำลายเชื้อเหล่านี้อย่างกว้างขวางมากขึ้น ซึ่งในระยะแรกๆ ของการใช้ยานั้นค่อนข้างจะได้ผลดี ยาสามารถไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แต่ต่อมาไม่นานก็พบว่าเชื้อเริ่มมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้นและมีแนวโน้มจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ก่อให้เกิดปัญหาต่อการรักษาผู้ป่วยตามมา สำหรับสาเหตุของการดื้อยานั้นอาจมาจากหลายๆ ปัจจัย ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่เชื่อว่าเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยามากขึ้นคือ การใช้ยาปฏิชีวนะไม่เหมาะสม หรือการใช้ยาเกินความจำเป็นนั่นเอง โดยพบว่า การศึกษาถึงลักษณะและขนาดของปัญหาการดื้อยานับว่ามีความสำคัญต่อการวางแผนรักษาผู้ป่วยของแพทย์

โดยปกติเมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมีการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปกติ (normal microbiota) ของร่างกาย เช่น ในปาก ลำไส้ ผิวหนัง เป็นต้น ทำให้ จุลินทรีย์ชนิดใหม่ หรือชนิดเดิมที่ดื้อยาเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นมาแทน (van der Waaij *et al.*, 1986) การที่มีเชื้อแบคทีเรียดื้อยาอยู่ในลำไส้มีความสำคัญต่อการแพทย์เป็นอย่างมาก เหตุผลที่สำคัญคือ เชื้อที่อยู่ในลำไส้เหล่านี้อาจทำให้เกิดโรคได้เมื่อสภาวะร่างกายอ่อนแอ เช่น อาจทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบปัสสาวะ หรือโรคติดเชื้อในระบบอื่นๆ เนื่องจากว่าไม่ทราบว่าเชื้อที่ก่อโรคนั้นเป็นเชื้อที่ดื้อยาหรือไม่ ดังนั้นในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะจึงจำเป็นจะต้องทราบอัตราการดื้อยาเชื้อเหล่านี้และเหตุผลสำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ ทางเดินอาหารเป็นแหล่งที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเกิดการดื้อยาได้มากที่สุดซึ่งอาจเกิดโดยการกลายพันธุ์หรือการได้รับยีนส์ดื้อยาจากแบคทีเรียอื่นๆ ในระบบทางเดิน

อาหาร (O' Brien *et al*., 1980) การศึกษาลักษณะความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ปกติสามารถบอกถึงขนาดของปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่ง (Nord *et al*., 1984) ในระบบทางเดินอาหารจึงเหมาะที่จะใช้ในการศึกษามากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณอื่นของร่างกายเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีโอกาสได้สัมผัสกับยาที่รับประทานมากกว่าโดยอาจสัมผัสกับยาที่เหลือจากการดูดซึมจากลำไส้เข้าสู่ร่างกาย หรือสัมผัสกับยาที่ถูกขับออกทางน้ำดี หรือทางเยื่อบุของลำไส้ ในทางเดินอาหารนั้นมีเชื้อ anaerobic bacteria อยู่ในปริมาณมากที่สุดโดยเฉพาะเชื้อกลุ่ม Bacteroides (Hawkey, 1986) สำหรับเชื้อกลุ่ม facultative anaerobic bacteria นั้นจะพบเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้บ่อยที่สุด โดยเชื้อที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารและเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดก็คือ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ โดยปกติแล้วเชื้อเหล่านี้จะไม่ก่อโรคต่อมนุษย์แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคได้เช่นกัน โรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ โรคอุจจาระร่วง ดังนั้นการรักษาจึงต้องใช้ยาที่ไปออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *E. coli* โดยตรง เช่น ampicillin และ kanamycin แต่พบว่าเด็กส่วนใหญ่จะมีเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา ampicillin และ kanamycin ซึ่งเชื้อเหล่านี้นี่เองที่จะทำหน้าที่เปรียบเสมือนแหล่งของยีนส์ดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดไปให้เชื้อก่อโรคตัวอื่นๆ เช่น *Shigella*, *Salmonella* รวมทั้ง *E. coli* ชนิดอื่นที่ก่อโรคด้วย (Tauxe *et al*., 1989)

Integron เป็นกลุ่มของยีนส์ที่พบว่าเกี่ยวข้องอย่างมากกับการดื้อยาหลายชนิดในแบคทีเรียโดยเฉพาะ class 1 integron นั้นพบมากใน Enterobacteriaceae (Leverstein- van Hall *et al*., 2002) มีรายงานตรวจพบ class 1 integron ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ ทั่วโลก (Reyes *et al*., 2003; Ahmed and Shimamoto, 2004; Heir *et al*., 2004; Mathai *et al*., 2004; Nijssen *et al*., 2005) ยิ่งไปกว่านั้น Skurnik และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษา integron ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากคนสุขภาพดี 3 กลุ่ม ซึ่งไม่ได้รับยาปฏิชีวนะมาเป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน พบว่า integron เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* กลุ่มนี้ด้วย

สำหรับการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อแสดงให้เห็นถึงอุบัติการของเชื้อดื้อยา แบบแผนการดื้อยา และ class 1 integron ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยที่เข้ามาทำการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของคนปกติทั่วไปที่มีสุขภาพดีใน อำเภอ หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เพื่อจะใช้เป็นแนวทางในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาและการพิจารณาเลือกใช้ยาที่เหมาะสมได้ในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียกรัมลบในลำไส้ (Enteric bacteria)

หมายถึง แบคทีเรียกรัมลบรูปร่างเป็นแท่ง ปลายมน เติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเลือด โคโลนีมีขนาดใหญ่ประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ขอบเรียบ ตรงกลางมีลักษณะนูน รอบๆโคโลนีอาจเห็นเป็นวงใสๆเนื่องจากเชื้อบางชนิดมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เช่น nutrient agar ขนาดของโคโลนีอาจแตกต่างกันแล้วแต่สกุลของเชื้อ บางชนิดมีโคโลนีลักษณะเป็นเมือก เช่น สกุล *Klebsiella* สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารส่วนใหญ่แล้วจะหมายถึงแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae, Pseudomonaceae สำหรับเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ไม่มีเอนไซม์ oxidase ไม่มีสปอร์ บางชนิดมี capsule ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วย flagella ที่มีอยู่รอบตัว เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C แบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบได้ทั่วไปในน้ำ ในดิน พืชผัก ผลไม้ รวมทั้งในลำไส้ของคนและสัตว์ สามารถปนเปื้อนได้ทั่วทุกที่โดยเฉพาะบริเวณที่มีความชื้น หรือมีการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย เช่น ส้วม หรือ ภาชนะ จึงเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนในน้ำ อาหาร เครื่องดื่ม ยารักษาโรค และเครื่องสำอาง (Rowe and Gross, 1984; Eisentein, 1995) โดยปกติระบบทางเดินอาหารของคนตั้งแต่หลอดอาหารถึงปลายกระเพาะอาหารเป็นบริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียอาศัยอยู่เลย ในลำไส้เล็กส่วนต้นก็จะพบได้ในปริมาณน้อย แต่จะพบมากในลำไส้เล็กส่วนล่างและตลอดลำไส้ใหญ่ เชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้บ่อยที่สุดคือ เชื้อ *E. coli* (Eisentein, 1995) นอกจากนี้ก็ยังมีแบคทีเรียบางชนิดซึ่งปกติไม่พบในลำไส้ แต่สามารถก่อให้เกิดโรคได้หากได้รับเข้าไปในทางเดินอาหาร โดยอาจปนเปื้อนอยู่ในอาหารหรือน้ำดื่ม ได้แก่ *Shigella*, *Salmonella* และ *Yersinia* หากได้รับเชื้อดังกล่าวนี้เข้าไปก็มักก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง (diarrhea) ตามมา (อรพินท์, 2541)

สำหรับเชื้อ *E. coli* นั้นนอกจากจะเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบมากที่สุดในระบบทางเดินอาหารแล้ว ปัจจุบันยังพบว่าเชื้อ *E. coli* บางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารได้เช่นกัน (อรอนงค์, 2541) เชื้อ *E. coli* ที่เป็น pathogen นอกจากจะก่อให้เกิดโรคกับระบบทางเดินอาหารแล้วยังก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบอื่นๆ เช่น ไส้ติ่งอักเสบ (appendicitis) เยื่อบุช่องท้องอักเสบ แผลติดเชื้อ โลหิตติดเชื้อ (septicemia) ไตติดเชื้อ ไตวายเนื่องจากติดเชื้ออย่างรุนแรง รวมทั้งการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เป็นต้น (Eisentein, 1995; Farmer, 1995)

สมาชิกในวงศ์ Enterobacteriaceae นั้นกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์โดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* ที่เป็น pathogen เนื่องจากปัจจุบันพบว่าอัตราการติดเชื้อและอัตราการแพร่กระจายของ

เชื้อเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว รวมทั้งสภาวะการดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ก็กำลังทวีความรุนแรงมากขึ้นดังจะเห็นได้จากรายงานการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่เพิ่มขึ้นทุกปีได้แก่ ประเทศไนจีเรีย อังกฤษ และไทย (อรพินท์, 2541; Okeke *et al.,* 2000; Leverstein-van Hall *et al*., 2002; Shannon and French, 2004) ซึ่งไม่เพียงแต่เชื้อ *E. coli* เท่านั้นที่มีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นยังพบว่าเชื้อตัวอื่นๆ ที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ก็มีการพัฒนาความสามารถในการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นด้วย เช่น *Enterobacter* spp. และ *Klebsiella* spp. จึงจำเป็นจะต้องหาวิธีการป้องกันการติดเชื้อ ตลอดจนหาวิธีรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อกลุ่มนี้ ซึ่งจะช่วยทำให้การวินิจฉัยและรักษาโรคอย่างถูกต้องเหมาะสมเพื่อที่จะได้ให้การรักษาผู้ป่วยอย่างทันท่วงทีและจะได้ควบคุมป้องกันไม่ให้สภาวะการดื้อยาของเชื้อแพร่กระจายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการรักษาผู้ป่วยและทำให้ยากต่อการควบคุมดูแลมากยิ่งขึ้น

1.1 ชนิดของเชื้อ Enterobacteriaceae

Forbes และ คณะ (2002) ได้จำแนกเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มักก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ออกเป็น genus และ species ต่างๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของเชื้อ Enterobacteriaceae (Forbes *et al*., 2002)

Genus	Species
1. *Escherichia*	*coli*
2. *Shigella*	*dysenteriae, flexneri, boydii, sonnei*
3. *Salmonella*	all serotypes
4. *Yersinia*	*pestis, enterocolitica, frederiksenii, intermedia, pseudotuberculosis*
5. *Citrobacter*	*freundii*, *koseri*, *amalonaticus*
6. *Klebsiella*	*pneumoniae, ozaenae, oxytoca*
7. *Proteus*	*mirabilis, vulgaris, penneri*
8. *Providencia*	*rettgeri, stuartii*
9. *Serratia*	*marcescens, liquefaciens*
10. *Edwardsiella*	*tarda*
11. *Hafnia*	*alvei*
12. *Morganella*	*morganii*, subsp. *morganii*
13. *Enterobacter*	*aerogenes, cloacae, agglomerans, gergoviae, sakazakii, amnigenus*

2. *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้บ่อยอยู่ในลำไส้คนและสัตว์ (Schroeder *et al*., 2002) โดยเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคในคน แต่ก็มีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นของร่างกายได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยส่วนใหญ่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อลงในอาหารและน้ำดื่ม

2.1 ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา (Doyle, 1989)

E. coli เป็นแบคทีเรียกรัมลบรูปแท่ง (rod shape) มีขนาดตั้งแต่ 1.1-1.5x2.0-6.0 ไมโครเมตร สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ (motile) โดยอาศัย flagella ที่มีอยู่รอบตัว (รูปที่ 1) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และสภาวะที่

ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ปกติสามารถเจริญบนอาหารธรรมดาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่ช่วงอุณหภูมิ 7 - 46 °C pH ของอาหารตั้งแต่ 4.4 - 10 มี capsule บางๆ หุ้มอยู่รอบตัวทำให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี เช่น มีชีวิตอยู่ตามเสื้อผ้าแห้งและในฝุ่นละอองได้หลายวัน อยู่ในน้ำได้นานหลายสัปดาห์ แต่ถูกทำลายเมื่อต้มที่ 60 °C นาน 30 นาที

รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *E. coli* (Doyle and Cliver, 1990)

2.2 อนุกรมวิธานของเชื้อ (Classification) (Bertchinger and Fairbrother, 1999)

Escherichia coli เป็นสกุลที่ตั้งชื่อตามผู้เชี่ยวชาญทางโรคเด็กชาวเยอรมันคือ Theodor Escherichia จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae, Tribe Escherichiea, Genus *Escherichia*, Species *coli* เชื้อในสกุลนี้มีหลาย serotype และหลาย biotype ดังนั้นในการจำแนกจึงต้องอาศัยลักษณะตามคุณสมบัติของแอนติเจน

2.3 คุณสมบัติของแอนติเจน (อรอนงค์, 2541)

แอนติเจนของ *E. coli* มีอยู่หลายชนิด คือ

- Somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบ lipopolysaccharide พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนความร้อนถึง 121 °C ทนกรดอ่อนและแอลกอฮอล์ ปัจจุบันมีอยู่ประมาณ 171 ชนิด

- Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบ polysaccharide มักพบห่อหุ้มเซลล์เช่น capsule, envelope หรือ fimbriae ที่หุ้มตัวแบคทีเรียและคลุม O-antigen ทำให้เชื้อไม่สามารถเกาะกลุ่มกันในแอนติซีรัม O ยกเว้นเสียแต่ทำลาย K-antigen เสียก่อนโดยการต้มที่ 100 °C นาน 2.5 ชั่วโมง หรือที่ 121 °C นาน 2 ชั่วโมง ปัจจุบันพบอยู่ประมาณ 100 ชนิด

- Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของ flagella ประกอบด้วย protein ที่เรียกว่า flagellin ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100 °C สายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนไหวจะไม่พบ H-antigen ปัจจุบันพบแล้ว 56 ชนิด

Antigen O, K และ H มีคุณสมบัติทางกายภาพและภูมิคุ้มกันวิทยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจำแนก และการแยก serotype ของเชื้อก็จะขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนเหล่านี้ เช่น *E. coli* O157:H7, O6:K15:H16, O142:H6, O29:H7/30/32, O119:H5/H6 และO128:H7/12/21 เป็นต้น

2.4 คุณสมบัติด้านชีวเคมีและการเจริญ

E. coli มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่หลากหลายดังนั้นจึงนิยมใช้คุณสมบัตินี้เป็นหลักในการจำแนกชนิดของเชื้อ *E. coli* ออกจากเชื้อตัวอื่นๆในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยทั่วไปเชื้อ *E. coli* จะสามารถเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนอยู่น้อย (facultative anaerobe) ให้ผลการทดสอบ catalase เป็นบวก ให้ผลการทดสอบ oxidase เป็น ลบและให้ผลการทดสอบ IMViC test เป็น + + - - และ - + - - เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MacConkey agar (MAC) ซึ่งเป็น differential medium จะให้โคโลนีสีชมพูหรือแดงเนื่องจากการ ferment น้ำตาล lactose และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Eosin methylene blue (EMB) ซึ่งเป็น selective medium จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแวววาวที่เรียกว่า metallic sheen สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae เบื้องต้นนั้นนิยมใช้คุณสมบัติการ ferment น้ำตาลที่แตกต่างกันของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาล lactose จึงมีผู้พยายามดัดแปลงอาหารโดยการเติมน้ำตาลต่างๆ และสารเคมีลงไปพร้อมทั้งอินดิเคเตอร์ เช่น phenol red, methyl red, bromthymol blue เป็นต้น เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของ pH การเกิด H_2S และการใช้น้ำตาล (Rowe and Gross, 1984) สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อ *E. coli* มีการทดสอบต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* (Forbes *et al*., 2002)

การทดสอบ	ผล
Lactose fermentation	+
Indole production	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Citrate utilization	-
Motility test	+
Lysine decarboxylase test	+
TSI	A/A, G^+
H_2S	-
Urea hydrolysis	-
Acetate utilization	+
Cetrimide	-
ONPG test	+
Phenylalanine deaminase	-
Sucrose fermentation	+
Mannitol fermentation	+
Glucose fermentation	+
Dextrose fermentation	+, G^+
NO_3 reduction	+, G^-

G^+ = เกิด gas, G^- = ไม่เกิด gas

A/A = acid butt / acid slant

2.5 *E. coli* ที่ก่อโรค (อรอนงค์, 2541)

เชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง (diarrhoeagenic *E. coli*) ในคนแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ตามกลไกการก่อโรคดังนี้

2.5.1 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ก่อโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ แต่จะพบมากในเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี และในผู้เดินทางไปยังประเทศที่กำลังพัฒนา ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่า Traveller diarrhea เกิดโรคโดยการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ

ปัจจัยที่ทำให้สามารถก่อโรคของเชื้อคือเชื้อจะมี colonization factor antigen (CFA) ที่อยู่บนผิวของ fimbriae ทำให้เกาะ (colonize) ที่ผิวของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก แล้วสร้างสารพิษ (enterotoxin) ออกมาทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ สารพิษที่สำคัญต่อการก่อโรคมี 2 ชนิดคือ

- Heat-labile toxin (LT) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ขนาด 84 kilodalton มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน แต่ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 65 °C มีคุณสมบัติเหมือนสารพิษจากเชื้ออหิวาต์ (cholera toxin) และถูก neutralize ได้ด้วย antibody ต่อ cholera toxin โครงสร้างของสารพิษประกอบด้วย A subunit 1 หน่วย และ B subunit 5 หน่วย โดย B subunit จะเข้าเกาะกับ receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเยื่อบุลำไส้เล็ก จากนั้น A subunit จะเข้าสู่ภายในเซลล์ กระตุ้นเอนไซม์ adenyl cyclase ภายใน epithelial cell toxin ทำให้เกิดมีการคั่งของ cyclic adenosine monophosphate (c-AMP) ยังผลให้มีการหลั่งสารน้ำและโซเดียมเข้าไปในลูเมนของลำไส้ก่อให้การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยมีการขับน้ำและเกลือแร่ต่างๆ ออกมาสู่ระบบทางเดินอาหารเป็นจำนวนมากทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงคล้ายอหิวาตกโรค

- Heat-stable toxin (ST) เป็นโปรตีนโมเลกุลเล็ก ขนาดน้อยกว่า 5 kilodalton มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C 15 นาที ก่อให้เกิดโรคด้วยกลไกที่ต่างจากสารพิษชนิด LT โดย ST กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ guanylate cyclase ในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก เกิดการคั่งของ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) ทำให้เกิดการหลั่งสารน้ำและโซเดียมจากลำไส้ ซึ่งสามารถทดสอบฤทธิ์ของสารพิษได้ใน suckling mouse intestine

เชื้อ ETEC บางสายพันธุ์ เช่น O6:K15:H16, O15:H11, O73:H45, O115:H51 และ O168:H16 เป็นต้น จะมีการสร้างสารพิษชนิด LT หรือ ST เพียงชนิดเดียวเท่านั้นแต่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษได้ทั้ง 2 ชนิด

อาการทางคลินิก คือ ผู้ป่วยมีไข้ต่ำ คลื่นเหียน ปวดเกร็งในช่องท้อง และถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ (watery diarrhea) อาการรุนแรงคล้ายอหิวาตกโรค

2.5.2 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ก่อโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ โดยการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ EIEC ไม่สร้าง enterotoxin (LT, ST) เหมือนเชื้อกลุ่ม ETEC แต่ผู้ป่วยมีอาการและกลไกการเกิดโรคคล้ายโรคบิดที่เกิดจาก *Shigella* คือเชื้อมี invasive virulence factor ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนส์ที่อยู่บน plasmid ทำให้เชื้อสามารถสังเคราะห์โปรตีน (invasive protein) ช่วยให้เชื้อสามารถแทรกตัวเข้าไปใน epithelial cell ของลำไส้ใหญ่ เชื้อแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนขึ้นมากภายในเซลล์ทำให้เซลล์แตก เชื้อจะลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงเกิดการทำลายเซลล์บริเวณนั้นมากขึ้น ทำให้ลำไส้เป็นแผลและเกิดการอักเสบที่บริเวณนั้น ผู้ป่วยจึงมีอาการปวดบิด

อย่างแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด มีไข้สูง และตรวจพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมากในอุจจาระ นอกจากติดต่อทางอาหารแล้วเชื้ออาจติดต่อโดยตรงจากผู้ป่วยไปยังผู้อื่น

เชื้อ EIEC นอกจากก่อโรคโดยกลไกที่คล้ายกับ *Shigella* แล้วยังมีลักษณะโคโลนีและการทดสอบทางชีวเคมีที่คล้ายกันมากคือ โคโลนีกลม ขนาดเล็ก ไม่ใช้น้ำตาล lactose ย่อยสลาย glucose แต่ไม่เกิดแก๊ส การทดสอบ lysine decarboxylase ได้ผลลบ นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิดผลบวกปลอม (cross agglutination) กับน้ำเหลืองที่ใช้ในการตรวจเชื้อ *Shigella* การตรวจวินิจฉัยเชื้อ EIEC จึงอาจเกิดการผิดพลาดในการวินิจฉัยหาสาเหตุของโรคได้

2.5.3 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็กแรกเกิดอายุต่ำกว่า 18 เดือน (infantile diarrhea) มักพบการระบาดของเชื้อ EPEC ในห้องเลี้ยงเด็กในโรงพยาบาลและสถานรับเลี้ยงเด็ก เชื้อ EPEC ไม่สร้าง enterotoxin ไม่มี invasive virulence factor กลไกการก่อโรคยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาทาง histopathology ของลำไส้ทารกและผู้ป่วยที่ป่วยด้วย EPEC มักพบแบคทีเรียเข้าเกาะที่เยื่อบุผนังลำไส้ (enterocyte) มีการทำลาย microvilli brush border ของเยื่อบุผนังลำไส้ เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) ภายในเซลล์มี microfilament เกิดขึ้นมากมายบริเวณเชื้อเข้าเกาะเซลล์ เยื่อบุผนังลำไส้จะยื่นส่วนของเซลล์ออกมาล้อมรอบแบคทีเรียและกลืนแบคทีเรีย (engulfment) เข้าไปในเซลล์ โดยไม่พบร่องรอยของการแทรกผ่านเข้าไปในเซลล์ เป็นที่คาดว่าคุณสมบัติการเกาะ membrane ดังกล่าวซึ่งเรียกว่า entero adherence factor (EAF) เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคกับ *E. coli* ในกลุ่มนี้

2.5.4 Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC) เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงและปัญหาในเด็กเล็ก โดยเฉพาะอายุต่ำกว่า 1 ปี เด็กมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ คุณสมบัติพิเศษของเชื้อคือ สามารถเข้าเกาะกับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง Hep-2 cell หรือ HeLa cell ด้วยรูปแบบ aggregative (AA) จากการทดลองในสัตว์พบว่า สามารถสร้าง EaggEC heat stable-enterotoxin (EAST) ซึ่งมีโมเลกุลเล็ก แต่มีความแตกต่างจาก enterotoxin ชนิด ST ของเชื้อ ETEC กลไกของสารพิษยังไม่ทราบแน่ชัด

2.5.5 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่า hemorrhagic colitis นอกจากนั้นยังก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนคือ hemolytic uremic syndrome (HUS) เชื้อในกลุ่มนี้เช่น *E. coli* O157:H7, O26:H11, O111:NM แต่ที่มีความสำคัญมากคือ O157:H7 เนื่องจากมีการระบาดของเชื้อนี้อยู่เสมอในทวีปอเมริกา ทวีปยุโรป และในประเทศญี่ปุ่น เชื้อ EHEC จะใช้ fimbriae เข้าเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ตรงส่วน caecum และ colon แล้วสร้างสารพิษ (cytotoxin) ที่มีคุณสมบัติคล้าย Shiga toxin ที่สร้างจาก *Shigella dysenteriae* type1 จึงเรียกสารพิษนี้ว่า Shiga-like toxin (Griffin, 1995) เมื่อนำสารดังกล่าวมาทดสอบกับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงชนิด Vero cell (American

monkey kidney cell) พบว่าสารพิษสามารถทำลายเซลล์จึงเรียกสารพิษอีกอย่างหนึ่งว่า Verotoxin (VT) ปัจจุบันพบว่าสารพิษมี 2 ชนิดคือ

- Verotoxin 1 (VT1) หรือ Shiga-like toxin 1 (SLT1) มีคุณสมบัติเหมือน Shiga toxin ของเชื้อ *S. dysenteriae* type 1 และสามารถถูก neutralize ได้ด้วย antiserum ต่อ shiga toxin

- Verotoxin 2 (VT2) หรือ Shiga-like toxin 2 (SLT2) แตกต่างจาก VT1 โดยที่ไม่ถูก neutralize ด้วย antiserum ต่อ Shiga toxin

เชื้อ EHEC บางสายพันธุ์สร้างสารพิษชนิด SLT1 หรือ SLT2 แต่บางสายพันธุ์สร้างได้ทั้ง SLT1 และ SLT2

การเกิดโรคของเชื้อ EHEC เกิดได้ในทุกช่วงอายุแต่ในเด็กเล็กและผู้สูงอายุมีความเสี่ยงก่อให้เกิดโรคและอาการรุนแรงมากกว่า เชื้อปริมาณ 10 เซลล์สามารถทำให้เกิดโรคได้ ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 3-9 วัน ผู้ที่ติดเชื้ออาจมีหรือไม่มีอาการ และอาการตั้งแต่น้อยไปจนถึงรุนแรงและทำให้เสียชีวิตได้ การรักษาโดยการให้น้ำหรือเกลือแร่ทดแทนสิ่งที่ร่างกายสูญเสียและรักษาตามอาการ การให้ยาปฏิชีวนะไม่ได้ช่วยให้อาการดีขึ้นเร็ว ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมีอาการดีขึ้นภายใน 2 สัปดาห์และหายเองในที่สุด ยกเว้นผู้ป่วยเด็กและผู้สูงอายุที่เกิดอาการไตวาย อาการรุนแรงและถึงตายได้ แหล่งแพร่กระจายของเชื้อส่วนใหญ่พบในสัตว์เท้ากีบ เช่น วัว ควาย แพะ และ แกะ นอกจากนี้ยังพบในหมูและไก่งวง ตรวจพบเชื้อทั้งในสัตว์ที่มีสุขภาพแข็งแรงดีและสัตว์ที่มีอาการของอุจจาระร่วง การติดเชื้อมาสู่คนโดยการรับประทานอาหารที่ประกอบจากเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อ (van den Bogaard *et al*., 2001)

โรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ก่อโรคเหล่านี้สามารถตรวจพบได้ทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประชากรที่มีสุขอนามัยร่างกายไม่ดีหรือมีลักษณะการอุปโภคบริโภคที่ไม่ได้มาตรฐาน เช่น ในเด็กเล็ก หรือในกลุ่มผู้ใหญ่ที่ขาดความรู้เรื่องสุขอนามัยที่ดี (Ahmed and Shimamoto, 2004) ซึ่งส่วนมากแล้วมักจะพบในประเทศที่กำลังพัฒนาและประเทศที่ด้อยพัฒนา สาเหตุของการเกิดโรคนี้มักเกิดจากการไม่ระวังด้านการสุขาภิบาลและอนามัยส่วนบุคคลที่ดีพอส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรค (Rappelli *et al*., 2005) โดยกลุ่มที่มีอนามัยส่วนบุคคลต่ำ เช่น ในเด็กจะมีการแพร่กระจายของเชื้อโดยตรงจากนิ้วมือที่เปื้อนอุจจาระไปจับต้องของใช้ร่วมกัน ดังนั้นการระบาดจะเกิดกับผู้ที่อาศัยอยู่ในครอบครัวเดียวกัน สำหรับการระบาดในประเทศที่พัฒนาแล้วหรือกลุ่มที่มีอนามัยส่วนบุคคลดี การเกิดโรคมักเกิดจากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อปนอยู่โดยผู้ปรุงอาหาร หรือแมลงวัน แมลงหวี่เป็นตัวนำเชื้อมาปนเปื้อนโดยตรง หรืออาจเกิดจากการนำวัตถุดิบที่ไม่มีคุณภาพมาใช้ (van den Bogaard *et al*., 2001)

บางครั้งพบว่าการระบาดอาจเกิดจากผลิตภัณฑ์ เครื่องดื่ม เครื่องใช้ที่ไม่สะอาด หรือการได้รับความร้อนไม่เพียงพอ เช่น เนื้อบดในแฮมเบอร์เกอร์หากให้ความร้อนไม่พอก็จะยังคงมีเชื้อปะปนอยู่ หรือในน้ำนมวัว แพะ แกะ อาจมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อนี้ระหว่างการรีดนม แต่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ก็สามารถทำลายเชื้อนี้ได้ ดังนั้นองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา จึงได้กำหนดให้มีการตรวจสอบคุณภาพของอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง ตลอดจนยารักษาโรค ให้ได้มาตราฐานเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค เช่น กำหนดให้การปรุงแฮมเบอร์เกอร์ต้องใช้อุณหภูมิภายในถึง 80 ^{0}C และมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำดื่ม น้ำใช้ตลอดจนน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ จะต้องได้ตรงตามที่มาตรฐานกำหนดไว้จึงจะสามารถจำหน่ายได้ (Mermelstein *et al*., 1993)

2.6 อัตราความชุกของโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli*

โรคอุจจาระร่วง จัดเป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญ สาเหตุมักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* ที่เป็น pathogen ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมาก (Du *et al*., 2005) ดังจะเห็นได้ว่าในประเทศที่กำลังพัฒนา ถึงแม้อัตราความชุกของโรคนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละแห่ง แต่ก็เป็นโรคที่ทำให้เกิดอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายในผู้ป่วยเด็กได้ไม่น้อยเช่นกัน (Rappelli *et al*., 2005) จากรายงานในประเทศออสเตรเลียตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างอุจจาระผู้ที่ติดเชื้อจากระบบทางเดินอาหารได้บ่อยที่สุด (12.8%) (Robins-Browne *et al*., 2004)

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยจำนวน 601 ราย ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2534 พบว่าเชื้อกลุ่ม Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) และ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง 5.5% และ 1.3% ตามลำดับ (Jaruratanasirikul and Kalnauwakul, 1991) แต่จากรายงานของ Echeverria และคณะ (1993) พบว่า *E. coli* เป็นสาเหตุโรคอุจจาระร่วงถึง 13.0%

2.7 การวินิจฉัย (นรีกุล และคณะ, 2526)

การวินิจฉัยโรคนั้นอาศัยอาการทางคลินิก นอกจากอาศัยอาการที่ตรวจพบแล้วยังต้องอาศัยการตรวจสนับสนุนจากห้องปฏิบัติการด้วย ตัวอย่างส่งตรวจคือ อุจจาระซึ่งจะพบเชื้อจำนวนมากในอุจจาระส่วนมูกเลือด แต่เชื้อจะตายได้ง่ายเมื่ออยู่นอกร่างกาย ดังนั้นการเก็บอุจจาระส่งตรวจต้องใช้อุจจาระที่ถ่ายใหม่ๆ รีบส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะเชื้อโดยเร็วที่สุด แต่หากไม่สามารถส่งห้องปฏิบัติการได้จะต้องใส่เชื้อไว้ใน transport medium เช่น buffered glycerol saline การแยกเชื้อที่สำคัญมีดังนี้

- การตรวจอุจจาระถ้าดูอุจจาระสดๆ จะเห็นมูกเลือดแยกจากเนื้ออุจจาระ เลือดมักจะมีสีแดง มีกลิ่นคาว แต่ไม่เหม็นเน่า ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่า มีเม็ดเลือดขาวและแบคทีเรียจำนวนมาก

- การแยกเชื้อจากอุจจาระควรเพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อทันที เพราะเชื้ออาจตายง่ายถ้าแห้งทิ้งไว้นานเกินไป การเลือกใช้อาหารเพาะเชื้อก็ต้องเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมาก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกเชื้อ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจหรือที่ได้จาก rectal swab ได้แก่ MacConkey agar (MCA) และ Eosin methylene blue agar (EMB) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MCA จะให้โคโลนีสีชมพูหรือแดงเนื่องจากการ ferment น้ำตาล lactose ขณะที่โคโลนีบนอาหาร EMB จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแววววาวที่เรียกว่า metallic sheen

- การพิสูจน์ชนิด โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมีและการทดสอบโดยใช้คุณสมบัติของแอนติเจนในการจำแนกเชื้อ *E. coli* ในการจำแนกหา serotype

2.8 การรักษา

ผู้ป่วยที่รับเชื้อ *E. coli* เข้าไปโดยเฉพาะในเด็กและผู้สูงอายุจะมีภาวะขาดน้ำซึ่งมีผลมาจากการสูญเสียน้ำจากการขับถ่ายและการอาเจียน จัดว่าเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องได้รับการทดแทนโดยทันที สำหรับรายที่มีการสูญเสียน้ำระดับเล็กน้อยถึงปานกลางควรให้ดื่มน้ำเกลือตั้งแต่เริ่มมีอาการถ่ายอุจจาระเหลว และในรายที่มีการขาดน้ำอย่างรุนแรงควรให้สารน้ำทางหลอดเลือดดำเข้าไปทดแทนทันที (Dupont, 1995) ในผู้ป่วยที่มีอาการไม่ค่อยรุนแรงอาจไม่จำเป็นต้องให้ยาต้าน จุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามการให้ยาต้านจุลินทรีย์ก็เป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *E. coli* ได้ในระดับหนึ่งก็คือยาจะไปช่วยลดอาการไข้ ลดจำนวนเชื้อ และช่วยลดระยะเวลาในการรักษาตัวของผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยหายป่วยเร็วขึ้น สำหรับยาต้านจุลินทรีย์ ที่ควรเลือกใช้ในรายที่เชื้อไวต่อยาคือ ampicillin และ kanamycin แต่ปัจจุบันพบว่าในเด็กส่วนใหญ่จะมีเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา ampicillin และ kanamycin ที่นำมาใช้ในการรักษา จึงมีการจำกัดการใช้ยาต้านจุลินทรีย์โดยจะใช้รักษาเฉพาะในรายที่มีอาการรุนแรงเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในลำไส้นี้สามารถถ่ายทอดจากบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่ง จึงนิยมใช้ยาต้านจุลินทรีย์ที่ไปออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *E. coli* โดยตรง ซึ่งเชื้อเหล่านี้จึงเปรียบเสมือนแหล่งของยีนส์ดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดไปให้เชื้อก่อโรคอื่นๆ เช่น *Salmonella, Shigella* รวมทั้ง *E. coli* ชนิดอื่นที่ก่อโรคด้วย (Tauxe *et al*., 1989)

2.9 การป้องกันและควบคุมโรค

ในการป้องกันการแพร่กระจายของโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* นั้น ควรแยกผู้ป่วยไว้ในกลุ่มโรคติดต่อที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร (enteric isolation) จนกว่าตรวจไม่พบเชื้อในอุจจาระ สำหรับอุจจาระควรมีการทำลายเชื้อโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเสียก่อน เสื้อผ้าและเครื่องใช้

ต่างๆ ของผู้ป่วยควรทำการต้ม หรือทำลายเชื้อโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ ส่วนในรายที่เป็นพาหะจะต้องรีบรักษาให้หายและไม่ให้เกี่ยวข้องกับการประกอบอาหาร (Gray, 1995) มาตรการต่างๆ ที่ใช้ในการควบคุมโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ได้แก่ การจัดหาแหล่งน้ำอุปโภคบริโภคที่สะอาดโดยเฉพาะในบริเวณที่มีการสุขาภิบาลไม่ดีหรือต่ำกว่ามาตรฐาน และระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อสู่ภาชนะ ข้าวของเครื่องใช้ตลอดจนเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่ม หากเป็นไปได้ควรทำการต้มหรือใช้น้ำยาฆ่าเชื้อทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการอุปโภคบริโภคก่อนที่จะนำมาประกอบอาหารเพื่อเป็นการควบคุมไม่ให้เชื้อแพร่กระจายไปยังบุคคลอื่น

นอกจากนี้ยังมีมาตรการอื่นๆ ที่สามารถป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้ แก่ การจัดการระบบบำบัดน้ำเสีย น้ำทิ้งและอุจจาระจากชุมชนอย่างมีประสิทธิภาพและมีมาตรฐาน เพื่อไม่ให้เชื้อไปปะปนในแหล่งน้ำ หรือมีสัตว์มาตอม เช่น แมลงวัน แมลงสาบ และสิ่งสำคัญที่สุดในการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของโรคก็คือ การให้ความรู้ เกี่ยวกับสุขอนามัยส่วนบุคคลในการดำรงชีวิตซึ่งรวมทั้งการทำความสะอาดร่างกาย การขับถ่าย และการประกอบอาชีพ ค้าขายเครื่องอุปโภค บริโภค หากพ่อค้า แม่ค้าปฏิบัติตนให้ถูกสุขลักษณะก็สามารถควบคุมการเกิดโรคได้เช่นกัน

3. การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ถ้าได้รับการรักษาไม่ทันท่วงที ซึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียสามารถรักษาหรือช่วยให้ผู้ป่วยอาการดีขึ้นโดยการใช้ยาต้านจุลินทรีย์ในการรักษา ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย แม้จะออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ก็ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทุกชนิด ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียบางชนิดมี inherent resistance กล่าวคือมีลักษณะการดื้อยาได้ตั้งแต่กำเนิด ดังกรณีของแบคทีเรียกรัมลบหลายชนิด สามารถดื้อยาที่มีผลต่อแบคทีเรียกรัมบวก และระหว่างพวกกรัมลบด้วยกันเอง ยังมีหลายชนิด เช่น เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีผลดีต่อเชื้อแบคทีเรียกรัมลบด้วย เนื่องจาก inherent resistance ของเชื้อมีลักษณะคงทน

ดังนั้นในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อเหล่านี้ จึงพยายามหลีกเลี่ยงการใช้ยาชนิดที่เชื้อมีการดื้อยาอยู่ก่อนแล้ว แต่ปัจจุบันพบว่าโรคติดเชื้อแบคทีเรียนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีวิวัฒนาการการดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์มากขึ้น การดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์นี้ส่งผลให้การติดเชื้อทวีความรุนแรงขึ้นในผู้ป่วยและในบางรายอาจถึงแก่ชีวิต สาเหตุดังที่กล่าวมานี้ไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของมนุษย์ แต่เกิดจากความผิดปกติของตัวแบคทีเรียเอง (มาลิน, 2540)

3.1 ประวัติการดื้อยา

การดื้อยาต้านจุลินทรีย์เริ่มมีขึ้นหลังจากที่มีการใช้ยาได้ไม่นานโดยในปี ค.ศ.1910 Ehrlich สังเกตพบว่ามี trypanosome เริ่มดื้อยาพวก arsenicals จากนั้นในปี ค.ศ. 1912 เขารายงานว่า trypanosome ดื้อยา parafuchsin ครั้นเมื่อนำ prontosil มาใช้ปรากฏว่าเชื้อจากปัสสาวะคนไข้ที่รักษาด้วยยาดังกล่าวเกิดการดื้อ sulfanilamide (prontosil เมื่ออยู่ในร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น sulfanilamide) หลัง ค.ศ. 1993 การดื้อยา sulfanilamides เด่นชัดมากขึ้นในเชื้อ gonococci และในปี ค.ศ. 1948 พบว่า 80% ของเชื้อ gonococci ดื้อยาดังกล่าว ส่วนในปี ค.ศ. 1943 Finland ได้รายงานการพบเชื้อ pneumococci ที่ดื้อ sulfonamides จากคนไข้ที่กำลังรักษาด้วย sulfapyridine และเมื่อมีการนำ เอา trimethoprim มาใช้ในวงการแพทย์ ได้ไม่นานก็ได้มีผู้พบการดื้อของเชื้อต่อยาดังกล่าวเช่นกัน ซึ่งในปี ค.ศ. 1975 Felmink ได้รายงานการพบ plasmid ว่าเป็นตัวบงการการดื้อของเชื้อต่อยาชนิดนี้เป็นครั้งแรก (อ้างตาม มาลิน, 2540)

ภายหลังนำยาปฏิชีวนะมาใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อได้มีการพบอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อในปี ค.ศ. 1943 Chain และคณะได้รายงานประสิทธิภาพของ penicillin ต่อมาในปี ค.ศ. 1944 ก็ได้พบเชื้อที่ดื้อต่อยาดังกล่าว ในปี ค.ศ. 1947 มีรายงานการดื้อยาของเชื้อ gonococci และ meningococci ต่อ streptomycin ที่เพิ่งเริ่มนำมาใช้ จากนั้นได้มีรายงานการดื้อของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สำหรับการดื้อยาในแบคทีเรียกรัมลบในลำไส้ (enteric bacteria) นั้นพบว่ามีรายงานการดื้อยาเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1953 ซึ่ง Mitsuhashi และ Hashimoto (1975) ในประเทศญี่ปุ่นได้รายงานว่ามีแบคทีเรียในสกุล *Shigella* ดื้อต่อ sulfonamide ซึ่งเป็นยาตัวแรกที่นำมาใช้รักษาโรคซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Shigella* นอกจากนี้ยังได้ศึกษาพบว่าเชื้อดื้อยาดังกล่าวดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multiple drug resistance) คือ ดื้อต่อยา streptomycin, tetracycline, chloramphinicol และ sulfonamide ต่อมาในปี ค.ศ. 1962 Akibe ได้แสดงให้เห็นว่า *Escherichia coli* ที่พบในคนปกติทั่วไปในคนนั้นก็มีชนิดที่ดื้อยาหลายชนิดเหมือนกัน และการดื้อยานี้ถูกส่งผ่านไปยัง *Shigella* ได้ เรื่องในทำนองเดียวกันได้รับการค้นพบในอังกฤษด้วย โดยในปี ค.ศ. 1965 Datta พบเชื้อ *Salmonella typhimurium* ที่ดื้อยาหลายชนิดและสามารถส่งผ่านการดื้อยานี้ไปยังเชื้อตัวอื่นได้ นอกจากนี้ Anderson และคณะ ซึ่งทำศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *S. typhimurium* ในช่วงปี ค.ศ. 1964-1076 พบว่าจำนวนเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดนั้นเพิ่มขึ้นทุกปี และการดื้อยานี้สามารถส่งผ่านจากเชื้อ *S. typhimurium* ที่พบในสัตว์ ส่วนในประเทศเยอรมัน Lebek เป็นคนแรกที่พบเชื้อ *E. coli* และแบคทีเรียกรัมลบอื่นๆที่สามารถดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกัน และสามารถส่งผ่านความสามารถในการดื้อยานี้ไปสู่เชื้อชนิด (species) เดียวกันหรือต่างชนิดกันได้ (อ้างตาม Bryan, 1984)

3.2 การดื้อยาของแบคทีเรียกรัมลบในลำไส้

แบคทีเรียกรัมลบในลำไส้ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญซึ่งก่อให้เกิดอันตรายในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี โดยพบว่าเชื้อ ที่เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ได้แก่ *E. coli*, Enteropathogenic *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* และการรักษาโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันดังกล่าว คือ การใช้ยาต้านจุลินทรีย์นั่นเอง และในปัจจุบันพบว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าวมีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้น โดยพบว่าโรคอุจจาระร่วงในประเทศที่พัฒนาแล้วมักเกิดจากเชื้อ *E. coli* และ *Campylobacter jejuni* ในขณะที่โรคอุจจาระร่วงที่เกิดจาก Enteropathogenic *E. coli*, *Shigella*, *V. cholerae* และ *S. typhi* ยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขในประเทศที่กำลังพัฒนา (Piéboji *et al*., 2004) มีรายงานการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบในลำไส้ในผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกโรงพยาบาลของประเทศอังกฤษพบว่าเชื้อ *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. มีอัตราการดื้อยา gentamicin เพิ่มขึ้น จาก 0.3% เป็น 20.8% และ 10.1% เป็น 42.% ตามลำดับ (Shannon and French, 2004) ซึ่งตรงกับรายงานในประเทศแคเมอรูนที่พบว่าอัตราการดื้อยาของเชื้อ *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. ก็มีการดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วด้วยเช่นกัน (Piéboji *et al*., 2004)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าเชื้อจะมีการพัฒนาความสามารถในการดื้อยาเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังมีเชื้อบางชนิดที่พบว่ามีอัตราการดื้อยาบางชนิดลดลง เช่น เชื้อ *E. coli* ซึ่งเดิมเคยดื้อต่อยา ceftazidime และ gentamicin แต่ปัจจุบันพบว่าความสามารถในการดื้อยาดังกล่าวลดลง (Piéboji *et al*., 2004; Shannon and French, 2004) สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อดังกล่าวนี้จำเป็นต้องใช้ยาต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ และจากการที่ใช้ยาต้านจุลินทรีย์อย่างไม่เหมาะสม หรือเกินความจำเป็นนั่นเอง จึงเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุเกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา

3.3 อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *E. coli*

E. coli เป็นเชื้อประจำถิ่นที่มักพบได้บ่อยในระบบทางเดินอาหารโดยปกติจะไม่ก่ออันตรายใดๆ ต่อร่างกาย (Murray, 1998) แต่ก็มีบางชนิดที่มักก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารได้เช่นกันโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา รายงานการดื้อยาของเชื้อในครั้งแรกๆ นั้นเข้าใจว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนส์เพียงตัวเดียวทำให้เชื้อดื้อยา เช่น แบคทีเรียสร้างเอนไซม์เพนิซิลินเนสจะเพิ่มจำนวนมากขึ้น ในขณะที่เชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะจะถูกฆ่าตาย ยีนส์ดื้อยาอาจถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียตัวอื่นโดยวิธีการต่างๆ กันแต่สำหรับยีนส์ดื้อยาโดยเฉพาะของแบคทีเรียอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) โดย genomic DNA ของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นยีนส์ดื้อยาขึ้นมา หรืออาจเกิดจากเชื้อได้รับการขนถ่ายหรือถ่ายทอด (transfer of genetic information) ยีนส์ดื้อยาจากเชื้อที่ดื้อยาอยู่ก่อนแล้ว ยีนส์ดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการขนถ่ายมานี้มักพบในรูป

แบบของ plasmid แต่เนื่องจากในปัจจุบันได้พบพวก transposon ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของ DNA ที่สอดแทรกเข้าไปในส่วนต่างๆ ของ genomic DNA ได้ง่าย (Leverstein-van Hall *et al*., 2003) โดยยีนส์ดื้อยาในรูปแบบนี้มักพบได้บ่อยครั้งในการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* (มาลิน, 2540) และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อมีการดื้อยาแบบ multiple drugs resistance (MDR) การดื้อยาลักษณะนี้ของเชื้อ *E. coli* กำลังเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นแล้วทั่วโลก ดังเช่นรายงานการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระเด็กในประเทศเม็กซิโกพบว่าเชื้อมีการดื้อยา ampicillin, trimethoprim และ tetracycline สูงถึง 90, 77 และ 62% ตามลำดับ (Calva *et al*., 1996) ซึ่งตรงกับรายงานในประเทศไนจีเรีย โดยได้แสดงถึงแนวโน้มการดื้อยา ampicillin, trimethoprim, chloramphenicol และ tetracycline ของเชื้อ *E. coli* ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละปีตั้งแต่ปี ค.ศ. 1986, 1988, 1990, 1994 และ 1998 โดยพบว่าในปี 1998 เชื้อ *E. coli* มีความสามารถในการดื้อยาเพิ่มขึ้นจาก 56% เป็น 100% (Okeke *et al.,* 2000) สำหรับในประเทศอเมริกาก็มีรายงานการดื้อยาที่เพิ่มขึ้นเช่นกันโดยพบว่าเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อยา ampicillin, sulfamethoxazole, cephalothin, tetracycline หรือ streptomycin สูงถึง 50% และพบว่าดื้อต่อยา chloramphenicol, trimethoprim-sulphamethoxazole หรือ amoxicillin-clavulanic acid 25% (Schroeder *et al*., 2002) ในแถบเอเชียมีรายงานจากประเทศเวียดนามพบว่าเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *P. mirabilis* ดื้อต่อยาในกลุ่ม cephalosporin 5.6-31.5% (Cao *et al*., 2002) รายงานจากประเทศจีนพบ *E. coli* ดื้อยา ciprofloxacin 50% (Wang *et al*., 2003) รายงานจากประเทศบังคลาเทศพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะดื้อต่อยา ampicillin, co-trimoxazole และ gentamicin 92.4, 76.4 และ 32.1% ตามลำดับ (Rahman *et al*., 2004) ส่วนในประเทศอินเดียพบว่าเชื้อ *E. coli* ดื้อยา co-trimoxazole 48.3% (Mathai *et al*., 2004)

สำหรับรายงานการดื้อยาในประเทศไทย พอพิศ และคณะ (2530) รายงานการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในของโรงพยาบาล ดื้อยา amikacin 5.61%, cephalothin 24.39% และ gentamicin 21.4% ซึ่งสูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ สีลม และคณะ (2531) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของคนชนบทในจังหวัดสงขลาดื้อต่อยา tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, cephalothin, co-trimoxazole และ kanamycin 25.48, 16.75, 14.83, 3.83, 2.39 และ 0.48% ตามลำดับ ไม่พบว่ามีการดื้อยา gentamicin และ amikacin

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *E. coli* และเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ 12-55 % ผลิตเอนไซม์ extended spectrum beta-lactamase (ESBL) (Lee and Jeong, 2002; Ingviya *et al*., 2003)

3.4 สาเหตุของการดื้อยา (อ้างตามมาลิน, 2540)

จากการศึกษาและทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์พบว่าเชื้อที่เคยไวต่อยาแล้วเกิดการดื้อยาในภายหลังนั้นเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ทำให้มียีนส์ส่วนที่กำหนดการดื้อยาขึ้น อาจปรากฏบน chromosome หรือโครโมโซมพิเศษ (extrachromosome) ที่เรียกว่า plasmid สำหรับยีนส์ดื้อยาโดยเฉพาะของแบคทีเรีย อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) หรือเกิดจากเชื้อได้รับยีนส์ดื้อยา ซึ่งถ่ายทอดหรือขนถ่าย (transfer of genetic information) จากเชื้อที่ดื้อยาอยู่ก่อนแล้ว

3.4.1 การดื้อยาที่เกิดจากการกลายพันธุ์

การดื้อยาแบบนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งถูกควบคุมโดย chromosomal gene กล่าวคือ มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสภายในยีนส์บน genomic DNA ซึ่งไม่จำเป็นต้องมียามาเหนี่ยวนำเพราะแม้เชื้อไม่เคยสัมผัสกับยามาก่อนการเปลี่ยนแปลงนี้ก็เกิดขึ้นได้ แต่เมื่อมีการให้ยาเข้าไปกำจัดเชื้อก็ทำให้ยาเข้ามามีบทบาททำให้เชื้อที่มียีนส์ดื้อยาแสดงตัวเด่นชัดยิ่งขึ้น และเชื้อที่ดื้อยาจะถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยาไปยังลูกหลานต่อไป การดื้อยาที่เกิดจากการกลายพันธุ์นี้มักก่อให้เกิดการดื้อยาอย่างต่ำ คือ จะพบเชื้อดื้อยาประมาณ 1 cfu/ml จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 10^{7}-10^{9} cfu/ml (Lorian, 1996)

3.4.2 การดื้อยาที่เกิดจากการขนถ่ายยีนส์

การดื้อยาแบบนี้มีความสำคัญ เพราะทำให้แบคทีเรียพัฒนาความสามารถในการดื้อยาได้หลายชนิดได้ในเวลาเดียวกันอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อมีการใช้ยาต้านจุลินทรีย์ เนื่องจาก extrachromosomal gene หรือ plasmid และ transposon สามารถถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาไปยังเซลล์แบคทีเรียชนิดเดียวกัน หรือชนิดอื่นได้อย่างรวดเร็ว จึงเรียกการดื้อยาแบบนี้ว่า multiple drug resistance (MDR)

ยีนส์ดื้อยาที่ได้รับการขนถ่ายมานี้อาจอยู่ในรูปแบบต่างๆ ที่สำคัญคือ naked DNA, phage หรือ plasmid รวมทั้ง transposable element ซึ่งเป็นชิ้นส่วน DNA ที่พบว่ามีความสามารถในการสอดแทรกเข้าไปในส่วนต่างๆ ของ genomic DNA ได้ง่ายและเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อดื้อยาแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วรวมทั้ง integron ซึ่งสามารถจับยีนส์ดื้อยาให้สามารถสอดแทรกเข้าไปอยู่ด้วยกันได้

3.4.2.1 Naked DNA (อ้างตามนงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

ยีนส์ดื้อยาในรูปของ naked DNA หรือ insertion element เป็นชิ้นส่วน DNA ของ chromosome หรือ plasmid ก่อนที่จะถูกถ่ายทอดเข้าเซลล์ตัวรับ (recipient) จะไม่มีอะไรห่อหุ้ม เมื่อ DNA ดังกล่าวเข้าสู่ตัวเชื้อจะสามารถสอดแทรกรวมตัวเข้าไปใน chromosome ของเชื้อที่ไวต่อยาส่ง

ผลให้เชื้อที่เคยไวกลับกลายเป็นดื้อต่อยาปฏิชีวนะ แต่การเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้จะต้องมีการเรียงตัวของลำดับเบสใน genomic DNA กับ insertion sequence โดยลำดับ base ดังกล่าวจะต้องมีคล้ายคลึงกันเพื่อให้ DNA ใหม่จะสามารถเข้าไปแทนที่และแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับ DNA เก่าที่เป็นของเชื้อได้

3.4.2.2 Plasmid

ยีนส์ดื้อยาในรูปแบบของ plasmid คือ ยีนส์ดื้อยาที่เป็น extrachromosomal gene ซึ่ง chromosome ดังกล่าวมักพบโดดเดี่ยวและแบ่งตัวอย่างอิสระภายใน แต่ก็มีชนิดที่เข้าไปอยู่เป็นส่วนหนึ่งของ chromosome และแบ่งตัวพร้อมกับ chromosome ซึ่งในเซลล์หนึ่งๆ อาจมี plasmid เพียง 1 อันหรือหลายอัน การถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาในรูปแบบของ resistance plasmid (R-plasmid หรือ R-factor) จากเชื้อหนึ่งไปยังอีกเชื้อหนึ่ง ยีนส์ดังกล่าวอาจถูกขนถ่ายไปเพียงบางส่วนในรูปของ naked DNA หรือ phage หรือถูกขนถ่ายไปในลักษณะที่เป็น plasmid ทั้งหมด โดยวิธีการ conjugation สำหรับการถ่ายทอด R-factor ของการติดเชื้อที่ลำไส้พบว่าเชื้อ *E. coli* จะเป็นผู้ให้ R-factor แก่เชื้ออื่นๆ ที่เป็นผู้รับได้ดี ได้แก่ *Enterobacter, Klebsiella, Salmonella* และ *Shigella*

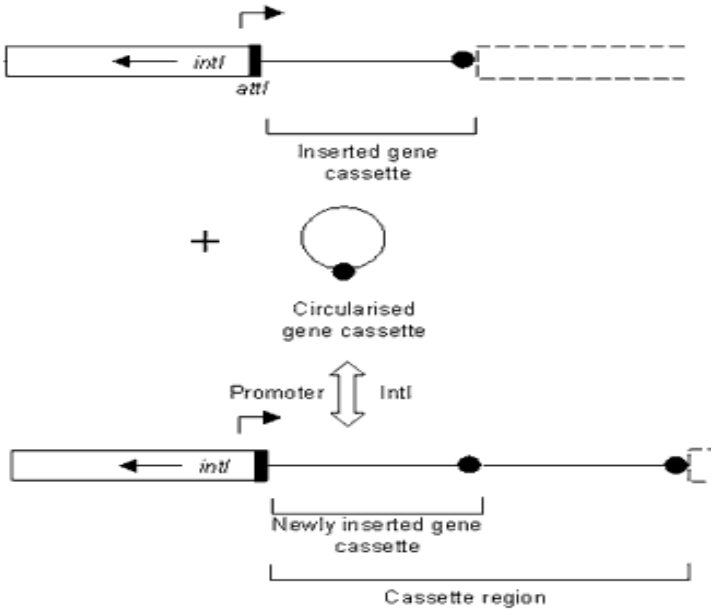
3.4.2.3 Transposon

ยีนส์ดื้อยาในรูปแบบของ transposon หรือ transposable element คือ ยีนส์ดื้อยาในลักษณะที่เป็นชิ้นส่วนของ DNA ซึ่งอาจถูกขนถ่ายมาจากเชื้ออื่นในรูปแบบต่างๆ แต่ชิ้นส่วนของ DNA นี้จะมีโครงสร้างและลักษณะอื่นๆ ต่างจากชิ้นส่วนของ DNA ทั่วไป ที่แม้จะถูกขนถ่ายมาในรูปแบบเดียวกันโดยที่ชิ้นส่วนของ DNA ทั่วไปที่สอดแทรกเข้าไปใน genomic DNA ทั้งใหม่และเก่าจำเป็นที่จะต้องมี DNA ที่มีความคล้ายคลึงกันซึ่งจะถูกควบคุมโดย *rec A* gene ของเชื้อที่รับยีนส์ซึ่งจะกำหนดการแลกเปลี่ยนและแทนที่ยีนส์จากลำดับเบสใน DNA ใหม่ที่เข้ามา แต่สำหรับ transposon เป็นชิ้นส่วน DNA ที่เคลื่อนที่ได้อย่างอิสระและสามารถสอดแทรกเข้าไปในบริเวณต่างๆ ของ genomic DNA ได้แม้ว่าบริเวณนั้นจะไม่มีการเรียงตัวของ DNA ที่คล้ายคลึงกัน บางครั้งอาจเรียก transposon ว่า jumping gene ทั้งนี้เพราะ transposon มียีนส์ที่สร้างเอนไซม์ transposase ซึ่งช่วยการสอดแทรกได้ เอนไซม์ดังกล่าวสามารถช่วยในการตัด และเชื่อม DNA เป้าหมายกับชิ้นส่วนของ transposon อย่างไรก็ดีการทำงานของเอนไซม์นี้จะตัดบริเวณที่เหมาะสมจึงจำเป็นต้องมี recognition site โดยพบว่า base ที่ส่วนปลายของชิ้นส่วน เมื่อดูการจัดเรียงตัวของลำดับเบสเหล่านี้จะเห็นว่ามีความเหมือนกันในสาย DNA ทั้งสองที่อยู่กลับข้างกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ transposon อีกอย่างที่ต่างจาก DNA ทั่วไป กรณี transposon เป็นยีนส์บน plasmid ในรูปของ transposon สามารถสอดใส่เข้าไปใน chromosome ได้เช่นเดียวกับยีนส์ดื้อยาในรูปของ naked DNA และ phage

เมื่อเคลื่อนที่เข้าใกล้ chromosome ยีนส์ดังกล่าวสามารถสอดแทรก และทำให้ยีนส์อื่นที่อยู่บน plasmid รวมเป็นหน่วยเดียวกับ chromosome (มาลิน, 2540)

3.4.2.4 Integron

เป็น genetic element ที่ทำให้แบคทีเรียสามารถจับ (capture) กับยีนส์ดื้อยาแปลกปลอม (foreign antibiotic resistance cassettes) และนำยีนส์ดื้อยานั้นสอดแทรก (integrate) เข้าไปอยู่ใน cassette integration gene (*attI*) ของ chromosome ได้ (Barlow *et al*., 2004; Du *et al*., 2005) จากนั้นก็จะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนส์ทำให้เชื้อเกิดการพัฒนาการดื้อยาเกิดขึ้น (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 การสอดแทรกของ gene cassettes เข้าไปใน integron (Jones *et al*., 2003)

Integron ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. 5′conserved segment ซึ่งจะมี 3 ส่วนย่อย ได้แก่

- DNA sequence ที่ควบคุมการสร้าง DNA integrase (*intI*1) โดยเอนไซม์ integrase นี้จะทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันใหม่ของยีนส์หลังจากที่มีการสอดแทรก gene cassette เข้าไปใน chromosome สำหรับ integron แต่ละ class จะมีเอนไซม์ integrase แตกต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับกลุ่มของ amino acid ซึ่งพบว่า integron ใน class เดียวกันจะมีเอนไซม์ integrase ที่มีกลุ่มของ amino acid ที่คล้ายคลึงกัน

- DNA sequence ที่ทำหน้าที่เป็น recognition sites สำหรับเอนไซม์ integrase [*attI* และ *attC*] ที่จะเข้ามาตัดและเชื่อมโดยจะอยู่บริเวณปลายสุดของ 3′ conserved segment และ 3′

antibiotic resistance gene cassette สำหรับการสอดแทรก gene cassettes นั้นจำเป็นต้องสอดแทรกในตำแหน่งที่จำเพาะ คือ มีลำดับยีนส์ที่เข้าคู่กัน (GTTRRRYY; R= purine,Y= pyrimidine) ดังนั้นเอนไซม์ integrase แต่ละชนิดก็จะมีความจำเพาะกับ *attI* และ *attC* แตกต่างกันไป

- DNA sequence ที่ทำหน้าที่เป็น promoters โดยจะมีทิศทางตรงข้ามกับ integrase gene เนื่องจากยีนส์ดื้อยาที่ได้รับเข้าไปเป็นพวก promoterless ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีลำดับของยีนส์ที่ทำหน้าที่เป็น promoter เพื่อช่วยในการแสดงออกของยีนส์ดื้อยาที่สอดแทรกเข้าไป (Leverstein-van Hall *et al*., 2003)

2. Gene cassettes หมายถึง กลุ่มของยีนส์ดื้อยา (antibiotic resistance gene) ที่เป็น integron-mediated antibiotic resistance ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาพบ gene cassettes ประมาณ 70 gene cassettes ที่อยู่นอก integron จะเป็น non-functional DNA fragment เป็นวงกลมและจะสามารถทำหน้าที่ได้เมื่อเข้าไปรวมอยู่ใน integron (Rowe-Magnus and Mazel, 1999; Carattoli, 2001) gene cassette มีโครงสร้างแบบง่ายๆ ประกอบด้วย open reading frame (ORF) และ flanking DNA ที่มีลำดับสั้นๆ อยู่ที่ปลาย 5′ และ 3′บน gene cassette จะมี cassette attachment site เรียกว่า 59 base pair element (59 bp) หรือ cassette attachment site (*attC*) ทำหน้าที่เป็น integrase recognition site ในระหว่างที่เกิด recombination ส่วน ORF จะ encode โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

ตัวอย่างของ gene cassette ได้แก่

- β-lactam resistance gene cassettes จะควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ทำให้ดื้อยากลุ่ม β-lactams พบประมาณ 20 ชนิด (Row-Magnus and Mazel, 2002)

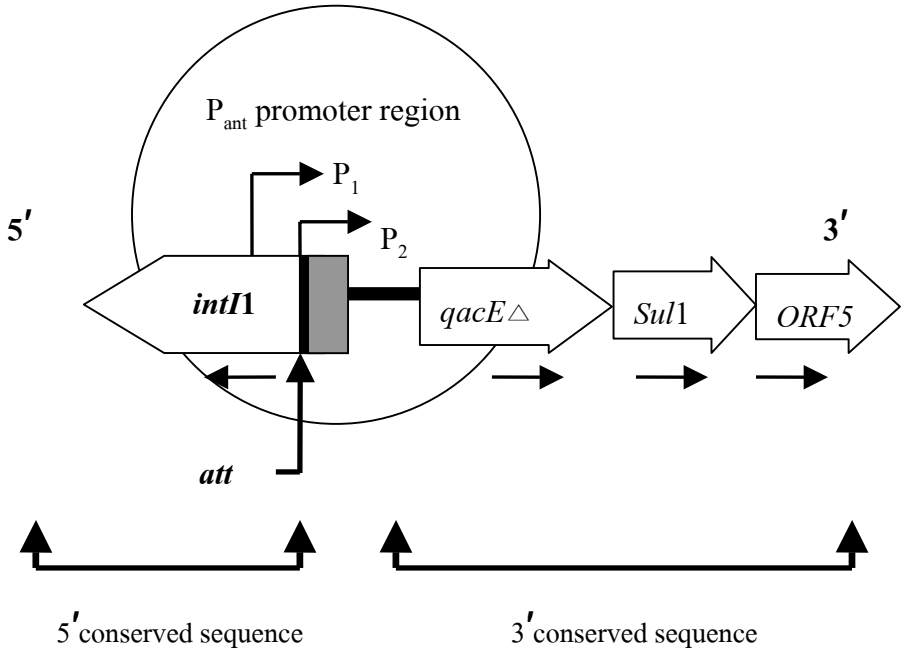
- Aminoglycoside resistance gene cassettes พบมีประมาณ 21 ชนิด (Row-Magnus and Mazel, 2001) ส่วนใหญ่ gene cassette นี้จะอยู่ในกลุ่ม *aad* (aminoglycoside adenyltransferase family) ทำให้ดื้อต่อยา streptomycin และ spectinomycin (Mazel and Davies, 2000) บางชนิดทำให้ดื้อต่อยา neomycin, gentamicin, tobramycin และ kanamycin (Saluaze *et al*., 1990 ; Fluit and Schmitz, 1999)

- Chloramphenicol resistance gene cassettes เกี่ยวข้องกับการดื้อยา chloramphenicol มีพบประมาณ 18 gene cassettes (Row-Magnus and Mazel, 2002)

- Trimethoprim resistance gene cassettes เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Trimethoprime โดยควบคุมให้มีการหลั่งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ที่ไม่จับกับยา ได้แก่ ยีนส์ *dfrA* และ *dfrB* (Saluaze *et al*., 1990)

- อื่นๆ เช่น gene cassette ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อ quaternary ammonium compound (*qacEΔ*1), erythromycin resistance gene cassette (Row-Magnus and Mazel, 2002)

การสอดแทรก gene cassette จะสอดแทรกเข้าไปใน chromosome ตรงส่วนของ open reading frame (ORF) และ flanking DNA ซึ่งอยู่บริเวณปลาย 5′ และ 3′ conserved segment เมื่อ gene cassette สอดแทรกเข้าไปก็จะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ส่งผลให้เชื้อมีการพัฒนาความสามารถในการดื้อยาเพิ่มขึ้น (Ebner, 2002; Ploy *et al*., 2000) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 Class 1 integron (Kovalevskaya, 2002)

Integrons ที่ได้มีการศึกษาแล้วแบ่งออกได้เป็น 5 classes โดยแบ่งตามชนิดของเอนไซม์ integrase ที่สร้างซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับลำดับ DNA sequence ได้แก่ class 1, 2, 3, 4 และ unnumbered class integrons (White, *et al*., 2001) class 1 integron นั้นจะพบได้มากในเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae โดยจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาแบบ multi drugs resistance (MDR) (Leverstein-van Hall *et al*., 2002) สำหรับยีนส์ที่พบได้บ่อยใน class 1 integron ได้แก่ *sul*1 ซึ่งพบว่าเชื้อ *E. coli* จะมีรูปแบบการดื้อยาแบบนี้มากที่สุด (Mathai *et al*., 2004) ส่วน class 2 integron จะพบยีนส์ *dfr*1*a*, *sat*1 และ *aadA*1 เป็นต้น ซึ่งมักจะพบอยู่ภายใน transposon เช่น Tn7 (Collis *et al*., 2002) สำหรับ class 3 integron นั้นพบว่าจะมี β-lactamase genes (bla_{GES-1} / bla_{IBC}), *intI*3, *attI*3 และ P_C ซึ่งพบในเชื้อ *Serratia marcescens* (Correia *et al*., 2003) ส่วน class 4 integron หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า super-integron นั้นมักพบได้ใน *V. cholerae* ซึ่งนอกจากจะมีความแตกต่างกับ 3 class แรกในด้าน

ขนาดแล้วยังมีหน้าที่แตกต่างกันด้วย นั่นคือ gene cassette ภายใน super-integron จะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อและ gene cassette ดังกล่าวจะมีส่วนของ promoter ด้วยกันทั้งสิ้น (Rowe-Magnus and Mazel, 1999) ส่วน class สุดท้ายนั้นเป็น class ที่ยังไม่ได้ให้หมายเลข (unnumbered class) (Collis *et al*., 2002) เนื่องจากว่ายังไม่ทราบหน้าที่ และคุณสมบัติของเอนไซม์ integrase ที่พบใน class นี้อย่างแน่ชัด ยีนส์ที่พบใน class นี้ คือ *dfr*18 ซึ่งมีคุณสมบัติดื้อต่อยา Trimethoprim (Hochhut *et al*., 2001)

สำหรับ class 1 integron ในส่วนของ 5′ conserved region จะมียีนส์ *intI*1 ที่ควบคุมการสร้าง DNA intergrase และในส่วนของ 3′ conserved segment จะมียีนส์ดื้อยา sulfonamide (*sul*1) และ disinfectants (*qacE*Δ*1)* (Paulsen *et al.*, 1993) และ ORF5 (Stokes and Hall, 1989) ดังรูปที่ 3 ซึ่ง promoters ที่อยู่ใน 5′conserved region ของ integrons ช่วยทำให้ integron ทำหน้าที่คล้ายกับเป็น natural expession vector สำหรับ gene cassette ต่างๆโดยเฉพาะในการนำและการกระจายยีนส์ดื้อยา เช่น ยีนส์ *sul*1 ซึ่งจะดื้อต่อยา sulfamethoxazole แต่ในบางครั้งภายใน class 1 integron อาจมียีนส์ดื้อยาหลายชนิดอยู่ภายในจึงทำให้เชื้อสามารถดื้อต่อยาตัวอื่นนอกจาก sulfamethoxazole ได้ด้วย แบคทีเรียที่มี integron อยู่อาจจะมีความสามารถที่จะพัฒนาการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้อย่างรวดเร็ว และยังช่วยให้สามารถถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาเหล่านี้ไปยัง species เดียวกัน หรือคนละ species ได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่มี integron ที่มียีนส์ดื้อยาจึงเป็นปัญหาที่สำคัญในการใช้ยาปฏิชีวนะในอนาคต

การศึกษาความสัมพันธ์ของ class 1 integron กับการดื้อยานั้นเริ่มตั้งแต่มีการระบาดของเชื้อ *Salmonella enterica* var. Typhimurium DT104 ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดในสัตว์ และในภายหลังเชื้อ DT104 นี้แพร่มายังคน (Pocurill *et al*., 1971; Giovanoni, 1983; Humphrey, 2001) และต่อมาพบว่า DT104 มี class 1 integron ที่มี gene cassette ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา (Ng *et al*., 1999; Boyd *et al*., 2000; Boyd *et al*., 2001) ทำให้มีผู้สนใจศึกษาความชุกของ class 1 integron ในเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae โดยเฉพาะ *E. coli* ในคนเพิ่มมากขึ้นจนเป็นที่แน่ชัดว่า class 1 integron มีส่วนเกี่ยวข้องเป็นอย่างมากกับการดื้อยาใน *E. coli* ดังรายงานของ Yu และคณะ (2003) ศึกษา gene cassettes ที่พบใน class 1 integron ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปัสสาวะในประเทศเกาหลีในปี ค.ศ. 1980-1985, 1996-1997 และ 2001-2002 พบว่า gene cassettes ที่ตรวจพบมีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงเวลานั้นๆ โดยในช่วงปี ค.ศ. 1980-1985 พบเพียง gene cassette เดียว แต่หลังจากปี ค.ศ. 1990 จะพบมากกว่า 1 gene cassette เนื่องจากมีการได้รับ gene cassette ใหม่เพิ่มเข้าไปทำให้ขนาดของ integron ยาวขึ้น และเชื้อมีการดื้อยาเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Reyes และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาความชุกของ class 1 integron ใน

เชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ดื้อยา aminoglycoside ในโรงพยาบาลต่างๆในประเทศชิลี พบ class 1 integron ในเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* 40 และ 38% ตามลำดับ และเชื้อมีการดื้อยา 6-8 ชนิด ต่อมา Mathai และคณะ (2004) รายงานว่า *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคทางเดินปัสสาวะในประเทศอินเดียมี class 1 integron 36.2% และเชื้อกลุ่มนี้ดื้อยา ampicillin, nalidixic acid, chloramphenicol, tetracycline และ gentamicin มากกว่ากลุ่มที่ไม่มี integron อย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งไปกว่านั้น Nijssen (2005) ได้รายงานการพบเชื้อ Enterobacteriaceae ที่มี class 1 integron ในหออภิบาลผู้ป่วยหนักในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย Utrecht ในประเทศเนเธอร์แลนด์ และเชื้อกลุ่มนี้มีความไวต่อยา cephalosporin ลดลงด้วย (Enterobacteriaceae with reduce susceptibility to cephalosporin, ERSC) และอัตราการถ่ายทอด ERSC ของเชื้อที่มี integron อยู่ระหว่าง 8-10 cases/patient-days

3.5 การถ่ายทอดการดื้อยา (มาลิน, 2540)

3.5.1 Transformation

เป็นกระบวนการถ่ายทอดยีนส์ซึ่งอยู่ในลักษณะที่ไม่มีอะไรห่อหุ้มจากเชื้อตัวให้ไปยังเชื้อตัวรับ ยีนส์ดื้อยาในรูปแบบของ naked DNA จะถูกถ่ายทอดด้วยวิธีนี้ DNA ที่ถูกขนถ่ายโดยวิธีนี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลไม่มากนัก โดยทั่วไปประมาณ 3 x 10^5-10^7 dalton ดังนั้นในการขนถ่ายยีนส์แต่ละครั้งจะขนถ่ายได้ครั้งละ 1-2 ชนิดเท่านั้น และเชื้อตัวรับจะต้องอยู่ในภาวะที่พร้อมจะยอมรับ DNA ใหม่ เช่น ระยะที่มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ วิธีการ transformation นี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบแต่ตัวให้และตัวรับยีนส์ต้องมีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน โดยควรอยู่ในสกุลเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เพราะ DNA ที่เข้ามาใหม่จะเกิดการรวมตัวกับ genomic DNA ของตัวรับได้เมื่อบริเวณที่สอดใส่มีการเรียงตัวของ base ใกล้เคียงกัน ตัวเชื้อที่ได้รับการถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาด้วยกระบวนการนี้เรียกว่า transformant

3.5.2 Transduction

เป็นกระบวนการขนถ่ายยีนส์โดยอาศัยเชื้อไวรัสเป็นตัวนำพาจากเชื้อตัวให้ไปยังเชื้อตัวรับ ยีนส์ดื้อยาในรูปของ phage จึงถูกถ่ายทอดด้วยวิธีนี้ DNA ที่ถูกถ่ายทอดจะมีน้ำหนักโมเลกุลไม่ใหญ่มากและมักไม่คงที่เพราะต้องถูกจำกัดอยู่ภายในของเปลือกเยื่อหุ้มไวรัส โดยทั่วไปยีนส์ที่บงการการดื้อยาเพียง 1-2 ชนิดเท่านั้นที่จะถูกถ่ายทอดในครั้งเดียวกัน ตัวเชื้อที่ได้รับยีนส์ด้วยวิธีนี้เรียกว่า transductant การถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาด้วยวิธีนี้มีความสำคัญในการกระจายยีนส์ดื้อยาเป็นอย่างมาก ทั้งในแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบแต่จะต้องเป็นชนิดที่ไวรัสสามารถเข้าอาศัยและเติบโตได้ ซึ่งมักอยู่ในสกุลเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

3.5.3 Conjugation

เป็นกระบวนการถ่ายทอดยีนส์จากเชื้อตัวให้ ไปยังเชื้อตัวรับ โดยผ่านทาง pili ซึ่งเป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์ทั้งสองซึ่งถูกค้นพบโดย J. Lederberg และ E.L. Tatum ในปี ค.ศ. 1958 (อ้างตาม Willetts, 1993) ดังนั้นยีนส์ดื้อยาในรูปแบบของ plasmid หรือ R-plasmid ชนิดที่เป็น conjugative plasmid ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 4 x 10^7-2 x 10^8 daltons ซึ่งอาจมียีนส์ที่ดื้อยาตั้งแต่ 1 ถึง 10 ชนิด หรือมากกว่าก็ได้ ซึ่งยีนส์เหล่านี้สามารถถูกขนถ่ายไปยังเชื้อตัวรับได้ในคราวเดียวกัน สำหรับการถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาด้วยวิธีนี้เซลล์ตัวให้จะมี DNA ที่อยู่นอก chromosome เรียก F-factor (fertility, sex-factor หรือ F plasmid) ซึ่งจะมีกลุ่มของยีนส์ที่สร้าง pili ยื่นออกจากผิวเซลล์ เซลล์ตัวให้มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มี F-factor ได้แก่ F^+ เซลล์ และ Hfr เซลล์ (high frequency of recombination) ส่วนเซลล์ตัวรับอีกชนิดเนื่องจากว่าไม่มี F-factor จึงเรียกเป็น F^- เซลล์ (Atlas, 1988)

ลักษณะของ F-factor ในเซลล์แบคทีเรียอยู่ใน 2 สภาพ คือ

3.5.3.1 สภาพอิสระ (autonomous state) F-factor ถ้าอยู่ในสภาพนี้สามารถ replicate อิสระจาก chromosome ของแบคทีเรียดังตัวอย่างคือ เซลล์ F^+

3.5.3.2 สภาพอยู่ใน chromosome (integrated state) โดย F-factor จะสอดตัวเข้าอยู่ใน chromosome และเกิด replicate ขึ้นพร้อมกันโดยเหมือนเป็นส่วนหนึ่งของ chromosome ตัวอย่าง คือ เซลล์ Hfr

เมื่อเสร็จสิ้นการถ่ายทอดโดยวิธี conjugation ระหว่าง F^+ และ F^- โดยเซลล์ตัวให้และตัวรับเป็น F^+ เพราะ F^- ได้รับ F-factor จากเซลล์ตัวให้ ส่วนในคู่ Hfr กับ F^- เมื่อเสร็จสิ้นการถ่ายทอดเซลล์ของ F^- ก็จะเป็นเซลล์ F^- ดังเดิม เพราะไม่ได้รับ F-factor จากเซลล์ตัวให้ และเชื้อตัวที่ได้รับยีนส์ด้วยกระบวนการนี้เรียกว่า transconjugant และเรียก plasmid ที่มียีนส์ดื้อยาซึ่งถ่ายทอดโดยวิธีการนี้ว่า conjugative plasmid

ด้วยเหตุนี้กระบวนการ conjugation จึงมีความสำคัญในการถ่ายทอดการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน โดยที่เชื้อตัวให้ และตัวรับจะต้องมีความสามารถในการดื้อยาเหมือนกัน ซึ่งจะพบได้มากในแบคทีเรียกรัมลบรูปแท่งโดยเฉพาะในวงศ์ Enterobacteriaceae เซลล์ของแบคทีเรียอาจมียีนส์ที่บงการการดื้อยาตั้งแต่ 1 ถึง10 ชนิด หรือมากกว่าก็ได้ ซึ่งยีนส์เหล่านี้สามารถถูกขนถ่ายไปยังเชื้อตัวรับได้ในคราวเดียวกัน (มาลิน, 2540)

4. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เทคนิค PCR มีการนำมาใช้เป็นครั้งแรกโดย Kleppe และคณะ (1971) ซึ่งนำมาใช้ในการบ่งชี้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร และเทคนิคนี้ก็ถูกพัฒนาเรื่อยมา ซึ่งวิธี PCR เป็นวิธีการ

เพิ่มจำนวนชุดของชิ้นส่วน DNA สามารถเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดเล็กประมาณ 50-100 คู่เบส ให้ได้จำนวนมากมายเป็นล้านๆ ชิ้นภายในเวลาอันสั้น เทคนิค PCR ได้รับการพัฒนาขึ้นมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ DNA ที่มีปริมาณจำกัดและไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบโดยกรรมวิธีทางชีวเคมีปกติ วิธีการเพิ่ม DNA กระทำได้ในหลอดทดลองโดยจะต้องเลือกชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการและใช้ DNA เริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (primer) ที่มีขนาดสั้นซึ่งสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาโดยมีลำดับเบสสอดคล้องกับ DNA ส่วน 5′ region และ 3′ region ของชิ้นส่วน DNA ที่เราต้องการนั้น การเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR จะทำ 20-30 รอบ ทำให้ได้ DNA จำนวนมากมายหลายพันล้านโมเลกุลภายในเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมงเท่านั้น (วิสุทธิ์, 2535) และทำการตรวจสอบ PCR product โดยการทำ agarose gel electrophoresis

หลักการพื้นฐานของ PCR คือ การเพิ่มจำนวนของ DNA สายคู่ (double stranded DNA) ในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase เร่งปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่อันเป็นที่มาของชื่อเทคนิคนี้ เอนไซม์ *taq* DNA polymerase นี้ต้องการต้นแบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ ซึ่งเป็น DNA สายเดี่ยว (single strand DNA) โดยที่ primer strand เป็น DNA สายสั้นๆ ที่เป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบ ใช้ deoxyribonucleoside 5′-triphosphate (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) เป็น substrate และต้องมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม DNA สายใหม่จะถูกสร้างต่อจากไพรเมอร์ ไปในทิศจาก 5′ region ไปยัง 3′ region และจะเป็นคู่สม (complementary) กับ DNA ที่เป็นต้นแบบ (วสันต์ และคณะ, 2539)

ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA โดยเทคนิค PCR เป็นปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำๆ กันหลาย ๆ รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ระยะ คือ

1. Denaturation เป็นการแยกสายคู่ (double strand) ของ DNA ที่ต้องการศึกษาให้เป็นสายเดี่ยว (single strand) ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 91-95 °C ซึ่งจะทำลายไฮโดรเจนบอนด์ที่ยึด DNA สองสายไว้ด้วยกัน

2. Annealing เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงประมาณ 50-55 °C ไพรเมอร์ที่เติมอยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะจับ (anneal) กับ DNA สายเดี่ยวที่ต้องการศึกษา (target DNA) ตรงบริเวณที่มีลำดับของเบสเป็นคู่สมกันทางด้านปลาย 3′ ของ DNA ต้นแบบแต่ละสาย

3. Primer extension เป็นขั้นตอนสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่โดยอาศัย DNA ต้นแบบเส้นเดี่ยวทั้งสองเส้นเป็นต้นแบบ สร้างต่อออกไปจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ region ไปยัง 3′ region ของไพรเมอร์ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และ dNTP ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อุณหภูมิที่ใช้เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ *taq* DNA polymerase คือ 70-75 °C (โดยทั่วไปนิยมใช้ 72 °C)

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นจะได้ DNA เป็นสองเท่าของจำนวนคู่ที่เริ่มต้น ฉะนั้นในรอบที่ 1 จาก DNA ต้นแบบ 1 คู่จะได้ DNA เพิ่มขึ้นเป็นสองคู่ในรอบต่อมา DNA ทั้งที่มีอยู่เดิมและที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะถูกใช้เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ DNA ที่ถูกสังเคราะห์ จึงมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าทวีคูณแต่ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงเทคนิค PCR ให้มีประสิทธิภาพในการตรวจหายีนส์ที่ต้องการหลายๆ ตัวให้ได้ในคราวเดียวกันโดยทำการเพิ่ม primer เข้าไปหลายๆ ตัวด้วยเช่นกัน (Luca *et al*., 2000) เรียกว่า multiplex PCR (MP-PCR) ซึ่งสะดวกและรวดเร็วกว่า PCR แบบเดิม ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ซึ่งมีการศึกษาหายีนส์ดื้อยาที่มีอยู่หลายชนิดในเชื้อ *E. coli* จึงใช้เทคนิคนี้ด้วยเช่นกัน

ในการตรวจหา class 1 integron นั้น มีผู้ใช้ primer ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 3

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระคน
2. ศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ต่อยาต้านจุลินทรีย์ที่ใช้บ่อย
3. ตรวจหายีนส์ดื้อยาชนิด class1 integron โดยวิธี Multiplex-PCR