การจำแนกลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES ที่แยกได้จากสุกรและประชากรในอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

นายจักรพงษ์ สีนามะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ESBL- PRODUCING *Escherichia coli* ISOLATED FROM SWINE AND HUMAN IN AMPHOE MUEANG, LAMPHUN PROVINCE

Mr. Chakkraphong Seenama

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจำแนกลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES ที่แยกได้จากสุกรและประชากรในอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน
โดย	นายจักรพงษ์ สีนามะ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์วิษณุ ธรรมลิขิตกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลนี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์วิษณุ ธรรมลิขิตกุล)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์สุรภี เทียนกริม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จักรพงษ์ สีนามะ : การจำแนกลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES ที่แยกได้จากสุกรและประชากรในอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน. (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ESBL- PRODUCING *Escherichia coli* ISOLATED FROM SWINE AND HUMAN IN AMPHOE MUEANG, LAMPHUN PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. นพ.วิษณุ ธรรมลิขิตกุล

ปัจจุบันพบเชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) แพร่กระจายในชุมชนอย่างกว้างขวาง เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถพบได้ว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคน และสัตว์ รวมไปถึงสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ซึ่งอาจกลายเป็นแหล่งเก็บกักเชื้อแบคทีเรียดื้อสารต้านจุลชีพ ที่สามารถแพร่กระจายในชุมชนต่างๆ ทั่วโลก การศึกษาครั้งนี้ทำการจำแนกลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งแยกได้จากสุกรในฟาร์มปศุสัตว์และประชากรในชุมชน ในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน เพื่อศึกษารูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL และศึกษาหาความสัมพันธ์ของเชื้อในกลุ่มตัวอย่างทั้งสอง เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งสิ้น 212 สายพันธุ์ แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรที่มีสุขภาพดี และทำการจำแนกยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ได้แก่ ยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค multiplex-PCR และเทคนิค whole genome sequencing และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากทั้งสองกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค multilocus sequence typing ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ส่วนใหญ่เป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน และมักดื้อยากลุ่ม fluoroquinolones ยากลุ่ม aminoglycosides และยา trimethoprim/sulfamethoxazole ในขณะที่เชื้อทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา ampicillin ยา ceftriaxone และยา cefotaxime ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบมากที่สุดได้แก่ ยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ซึ่งพบได้ 95.75% รองลงมาคือยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} พบได้ 62.73% และ 2.40% ตามลำดับ โดย subgroup ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบมากที่สุด ได้แก่ ยีน $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ ทั้งนี้ 56.60% ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL มียีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} ในขณะที่ sequence types (STs) ที่พบทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 66 ST โดย sequence types ที่พบได้บ่อยที่สุดในเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในสุกรประกอบด้วย ST10 ST48 และ ST131 ตามลำดับ ในขณะที่ sequence types ที่พบได้บ่อยที่สุดในเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในประชากร ประกอบด้วย ST131, ST101 และ ST70/ST48 ตามลำดับ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ซึ่งถือเป็นสายพันธุ์ก่อโรคถูกพบมากเป็นอันดับที่หนึ่งในการศึกษาครั้งนี้และทุกสายพันธุ์มียีน $bla_{CTX\text{-}M}$ เป็นที่น่าสังเกตว่า 66.51% ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL แยกได้จากกลุ่มตัวอย่างทั้งสอง มี sequence types ที่เหมือนกันจำนวนทั้งสิ้น 19 ST ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการแพร่กระจายเชื้อระหว่างคนและสัตว์ แต่ยังขาดหลักฐานที่เพียงพอที่อธิบายถึงกลไกการแพร่กระจายดังกล่าว อย่างไรก็ตามการพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในสุกรและประชากรที่มีสุขภาพดี สามารถเป็นพาหะของแบคทีเรียดื้อยาที่แพร่กระจายในชุมชนได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2561	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

5876651237 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD:

Chakkraphong Seenama : MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ESBL- PRODUCING *Escherichia coli* ISOLATED FROM SWINE AND HUMAN IN AMPHOE MUEANG, LAMPHUN PROVINCE. Advisor: Asst. Prof. PANAN RATVONGJIRAKUL, Ph.D. Co-advisor: Prof. VISANU THAMLIKITKUL, M.D.

Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* has widely spread in community settings. This bacterium possibly found as normal flora in a healthy host, including non-hospitalised people, domestic or farm animals and environment, which may become a reservoir of a silent transmission of antimicrobial resistant bacteria in a community worldwide. Here we investigated genotypic characteristics of ESBL-*E. coli* isolated from swine in the livestock and human in the community, in Amphor Mueang, Lamphun Province, Thailand, in order to characterise ESBL encoding genes and investigate a genetic relatedness among the bacteria from these two hosts. Total of 212 ESBL-*E. coli* isolated from healthy swine and human were examined for *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$, and *bla*$_{SHV}$ was examined by multiplex-PCR and whole genome sequencing (WGS). The genetic relatedness of ESBL-*E. coli* was investigated by multilocus sequence typing. In this study, a majority of ESBL-*E. coli* was multidrug resistant and resisted to fluoroquinolones, aminoglycosides and trimethoprim/sulfamethoxazole. In a meanwhile, all of ESBL-*E. coli* was resistant to ampicillin, ceftriaxone , and cefotaxime. *bla*$_{CTX-M}$ was the dominant ESBL-encoding gene found in 95.75% of isolates, followed by *bla*$_{TEM}$ (62.73%) and *bla*$_{SHV}$ (2.40%). While, *bla*$_{CTX-M-55}$ was the most common *bla* subgroup found in this study. Over a half of ESBL-*E. coli* (56.60%) carried *bla*$_{CTX-M}$ co-existing with *bla*$_{TEM}$. Here we found 66 unique sequence types (STs) among those participated isolates. The most sequence types identified from swine isolates were ST10, ST48, and ST131, and from human isolates were ST131, ST101, and ST70/ST48, respectively. A truly pathogenic *E. coli* ST131 was the most predominant strain in this study, and all of them carrying *bla*$_{CTX-M}$. Noticeably, there were 66.51% of ESBL-*E. coli* isolated from both hosts sharing identical 19 STs, suggesting that transmission between between human and swine might be possible. Although, proof for a direct transfer of ESBL-*E. coli* from animal to human, or vice versa, is still inadequate. The ESBL-*E. coli* isolated from both healthy hosts may serve as a reservoir for community-acquired antimicrobial resistance.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study:	Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology	Student's Signature ....
Academic Year:	2018	Advisor's Signature ....
		Co-advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ และความช่วยเหลือด้านต่างๆ ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์วิษณุ ธรรมลิขิตกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่มอบเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรในชุมชม ในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน และอนุญาตให้ใช้สถานที่และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือขณะวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

ขอบคุณทุกคนในครอบครัว และเพื่อนๆ ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจและคำปรึกษาต่างๆ ตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ จนทำให้วิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จักรพงษ์ สีนามะ

สารบัญ

หน้า

.... ค

บทคัดย่อภาษาไทย .... ค

.... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... ง

กิตติกรรมประกาศ .... จ

สารบัญ .... ฉ

สารบัญตาราง .... ฎ

สารบัญรูปภาพ .... ฐ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

3. ขอบเขตของงานวิจัย 3

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 4

บทที่ 2 5

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Escherichia coli* 5

2. ความสำคัญทางคลินิก 5

3. ยากลุ่ม beta-lactam 6

3.1 คุณสมบัติของยากลุ่ม beta-lactam 6

3.1.1 ยากลุ่ม penicillins 7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.2 ยากลุ่ม cephalosporins 7
3.1.3 ยากลุ่ม monobactam 9
3.1.4 ยากลุ่ม carbapenems 9
3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา beta-lactam 9
3.3 กลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 11
3.3.1 กลไกการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย 11
3.3.2 กลไกการดื้อยากลุ่ม beta-lactam 12
4. เอนไซม์ beta-lactamase 13
4.1 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส A 16
4.2 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส B 17
4.3 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส C 17
4.4 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส D 18
5. ชนิดของเอนไซม์ extended spectrum beta-lactamases (ESBL) 18
5.1 เอนไซม์ ESBL วงศ์ SHV 19
5.2 เอนไซม์ ESBL วงศ์ TEM 20
5.3 เอนไซม์ ESBL วงศ์ CTX-M 22
5.4 เอนไซม์ ESBL วงศ์ OXA 23
5.5 เอนไซม์ ESBL วงศ์อื่นๆ 24
6. การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL 24
7. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธีทางฟีโนไทป์ 25
7.1 การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL 25
7.1.1 การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี disk diffusion 25
7.2 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL 27
7.2.1 การตรวจด้วยวิธี double disks diffusion 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7.2.2 การตรวจด้วยวิธี combination disk 28

7.2.3 การตรวจด้วยวิธี broth microdilution 29

7.2.4 การทดสอบด้วยแผ่น Epsilometer test® (E-test®) 30

7.2.5 การทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ 30

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี multilocus sequence typing (MLST) 33

8.1 เทคนิคการวิเคราะห์ MLST 33

8.2 เทคนิคการวิเคราะห์ MLST ของเชื้อแบคทีเรีย 34

บทที่ 3 35

วิธีดำเนินการวิจัย 35

1. สารเคมี วัสดุทางวิทยาศาสตร์และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 35

2. เครื่องมือ 36

3. การออกแบบงานวิจัย 36

4. วิธีการทดลอง 38

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา 38

4.1.1 การเก็บตัวอย่าง 38

4.1.2 การวินิจฉัยจำแนกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ 38

4.1.3 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 39

4.2 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disk 40

4.3 การตรวจหายีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) 40

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* 41

4.3.2 การออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SH}.... 41

4.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค multiplex PCR 42

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3.4 การตรวจสอบผลผลิต multiplex PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ... 43

4.4 การตรวจหายีน bla_{CTX-M} ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค whole genome sequencing (WGS) ... 43

4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multilocus sequence typing (MLST) ... 43

4.5.1 การออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อ house-keeping gene ของเชื้อ *E. coli* ... 44

4.5.2 การเพิ่มปริมาณ house-keeping gene ด้วยเทคนิค PCR ... 46

4.5.3 การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ... 46

4.5.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ house-keeping gene ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing ... 47

4.5.6 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน และการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ... 47

4.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ ... 48

บทที่ 4 ... 49

ผลการทดลอง ... 49

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ... 49

2. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ... 49

3. ผลการทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค combination disk ... 54

4. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ... 54

5. การตรวจหายีน bla_{CTX-M} ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multiplex PCR ... 55

6. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน bla_{CTX-M} ยีน bla_{TEM} และ ยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค whole genome sequencing (WGS) ... 58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multilocus sequence typing (MLST) 60

7.1 ความสัมพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL กับแหล่งที่มาของเชื้อที่แยกได้ 60

7.2 ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL กับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL 68

บทที่ 5 88

อภิปรายผลการทดลอง 88

บรรณานุกรม 98

ประวัติผู้เขียน 110

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางการจัดกลุ่มเอนไซม์ beta-lactamase [ดัดแปลงจาก Bush et al. (38)] 15

ตารางที่ 2 เกณฑ์ที่ใช้ในการแปลผลสำหรับการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อ *E. coli* [ดัดแปลงจาก CLSI ปี 2016 (62)] 26

ตารางที่ 3 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *E. coli*.. 39

ตารางที่ 4 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ในการวิจัยครั้งนี้................. 42

ตารางที่ 5 รายละเอียดของ primer ที่จำเพาะต่อ house-keeping gene ที่ใช้ในการวิเคราะห์ MLST ของเชื้อ *E. coli* ในการวิจัยครั้งนี้ (84) 45

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์ม จำนวน 103 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และแปลผลตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (65) 50

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากรในชุมชน จำนวน 115 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และแปลผลตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (65) 51

ตารางที่ 8 สัดส่วนการดื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน.. 53

ตารางที่ 9 จำนวนและรูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน 58

ตารางที่ 10 ผลการเปรียบเทียบการตรวจหายีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ระหว่างเทคนิค multiplex PCR เทคนิค WGS ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่ถูกสุ่มนำไปวิเคราะห์ จำนวนทั้งสิ้น 42 สายพันธุ์.. 59

ตารางที่ 11 ตารางเปรียบเทียบ clonal complexes (CC) และ sequence types (ST) ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์61

ตารางที่ 12 การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์ม จำนวน 101 สายพันธุ์ 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 13 การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรในชุมชน จำนวน 111 สายพันธุ์ 74

ตารางที่ 14 สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์ 80

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของยา penicillin ประกอบไปด้วยวงแหวน beta-lactam เชื่อมกับวงแหวน thiazolidine และโซ่ข้างที่มีหมู่เอซิล [ดัดแปลงจาก Llarrull IL et al. (16)] 6

รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกันระหว่างยา penicillins และโมเลกุล D-alanyl-D-alanine (25) 10

รูปที่ 3 แสดงอนุพันธ์ของเอนไซม์ในวงศ์ SHV ที่เกิดจากการแทนที่ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (50) 20

รูปที่ 4 แสดงอนุพันธ์ของเอนไซม์ในวงศ์ TEM ที่เกิดจากการแทนที่ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (50) 21

รูปที่ 5 แสดงอนุพันธ์ของเอนไซม์ในวงศ์ TEM ชนิด IRT ที่เกิดจากการแทนที่ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (50) 22

รูปที่ 6 การตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี disk diffusion (Seenama,2017)....... 28

รูปที่ 7 การตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disk (Seenama, 2017) 29

รูปที่ 8 การตรวจสอบผลผลิต multiplex PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} บน 1% agarose gel electrophoresis 56

รูปที่ 9 แผนภาพ minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์ แบ่งตามแหล่งที่มาของอุจจาระที่แยกเชื้อได้ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์ 67

รูปที่ 10 แผนภาพ Minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์ม จำนวน 101 สายพันธุ์ แบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์... 72

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 11 แผนภาพ Minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ E. coli ที่แยกได้จากประชากรในชุมชน จำนวน 111 สายพันธุ์ แบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์ 78

รูปที่ 12 แผนภาพ Minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์ แบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์ 79

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพกำลังเป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสำคัญในการรับมือเฝ้าระวังแก้ไข รวมไปถึงการหามาตรการป้องกันอย่างรัดกุมและเร่งด่วน จากผลการสำรวจขององค์การอนามัยโลกพบอัตราการแพร่กระจายของการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้นในทุกภูมิภาคของโลก และจากการรายงานในปี พ.ศ. 2559 พบว่าทั่วโลกมีอัตราผู้เสียชีวิตเนื่องมาจากติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยามากกว่าปีละ 700,000 คน (1) โดยเชื้อแบคทีเรียที่มักพบว่าเกิดการดื้อยาในอัตราสูง ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* (1) เชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพนอกจากจะเป็นปัญหาต่อสุขภาพของประชากรโลกที่ก่อให้เกิดการเสียชีวิต การควบคุมโรคติดเชื้อที่ทำได้ยากขึ้น และอาจกระทบต่อการรักษาโรคชนิดอื่น นำมาซึ่งความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่มีมูลค่ามหาศาล ข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2553 (2) จากข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาลจำนวน 1,023 แห่ง พบว่ามีการติดเชื้อซึ่งดื้อต่อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาลถึง 87,751 ครั้ง ส่งผลให้มีอัตราการเสียชีวิตจากปัญหานี้สูงถึง 38,481 คน นอกจากนี้ยังทำให้ผู้ป่วยต้องใช้เวลาพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้นรวมประมาณ 3.24 ล้านวัน เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากถึง 2,539-6,084 ล้านบาทจากการที่ไม่สามารถใช้ยาต้านจุลชีพชนิดเดิมที่เคยใช้ได้ผล ในขณะที่สูญเสียต้นทุนทางอ้อมจากการเจ็บป่วยและเสียชีวิตก่อนวัยอันควรคิดเป็นมูลค่าทางเศรษฐกิจมากกว่า 40,000 ล้านบาท ด้วยเหตุนี้กระทรวงสาธารณสุขจึงมีการเสนอจัดทำแผนยุทธศาสตร์การจัดการเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพของประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564 และได้ผ่านการเห็นชอบจากคณะรัฐมนตรีในวันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2559 โดยตั้งเป้าหมายว่าภายในปี พ.ศ. 2564 จำนวนผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้องลดลง 50% และมีการลดปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพในคนลง 20% ลดปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพสำหรับสัตว์ลง 30% รวมไปถึงการส่งเสริมให้ประชาชนมีความรู้เรื่องเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพและตระหนักถึงความสำคัญในการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมเพิ่มขึ้น 20% (3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase (extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli*) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานและพบว่าเป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital-acquired infections) (4, 5) อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ยังเป็นสาเหตุหลักอันดับต้นของการติดเชื้อในชุมชน (community-acquired infection) และมีอัตราความชุกสูงต่อเนื่องตลอดใน 10 ปีที่ผ่านมา (6) หนึ่งในสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพในชุมชนคือการใช้ยาต้านจุลชีพเกินความจำเป็น ทั้งในภาคครัวเรือนและในงานปศุสัตว์ รวมไปถึงการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพจากในฟาร์มปศุสัตว์มาสู่คน เช่น การแพร่กระจายเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากฟาร์มสุกรและสัตว์ปีกมาสู่ผู้เลี้ยงในประเทศเยอรมัน (7) หรือการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แพร่กระจายระหว่างประชากรในชุมชน สัตว์ในฟาร์มปศุสัตว์ และในอาหารสัตว์ ในสหราชอาณาจักร ประเทศเนเธอร์แลนด์ และประเทศเยอรมัน (8) เป็นต้น จากการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยที่สำรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพในอาหาร สิ่งแวดล้อม และในประชากรที่มีสุขภาพดีในชุมชนพื้นที่อำเภอเมืองและอำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน ด้วยวิธีทางฟีโนไทป์พบว่ามีเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL เพาะแยกได้จากอาหารสดที่วางขายในตลาดและแหล่งน้ำในชุมชน 26.4% และจากประชากรในชุมชนมากถึง 66.5% (9) ประกอบกับการศึกษาเบื้องต้น (pilot study) ที่ผ่านมาได้ทำการสำรวจความชุกของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพที่เพาะแยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์มภายในพื้นที่ทั้งสองอำเภอดังกล่าวข้างต้นของจังหวัดลำพูน พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในอัตราที่สูงใกล้เคียงกับที่เพาะแยกได้จากประชากรในชุมชนจากการศึกษาก่อนหน้า อย่างไรก็ดียังไม่มีหลักฐานอธิบายแน่ชัดถึงความสัมพันธ์หรือความเชื่อมโยงของการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพที่พบระหว่างสัตว์ในฟาร์มปศุสัตว์กับประชากรในชุมชนดังกล่าว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา เพื่อจำแนกรูปแบบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์มและอุจจาระของประชากรที่มีสุขภาพดีในชุมชนในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยยีนดังกล่าวประกอบไปด้วยยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย (10) เพื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้าง

เอนไซม์ดังกล่าว และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของยีนแต่ละชนิดกับรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่เพาะแยกได้จากทั้งในสุกรและในประชากรด้วยเทคนิค mutilocus sequence typing (MLST) ทั้งนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อที่เพาะแยกได้จากทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง และหาความเชื่อมโยงของการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพระหว่างสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน โดยข้อมูลที่ได้สามารถช่วยอธิบายความเชื่อมโยงของการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพในชุมชนดังกล่าว และยังสามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นแนวทางสำหรับควบคุมตัดวงจรการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพไปสู่ชุมชนให้เป็นไปตามแผนยุทธศาสตร์การจัดการเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพของประเทศไทยต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1 เพื่อศึกษารูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพซึ่งแยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

2.2 เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งแยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ด้วยเทคนิค MLST

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการยกเว้นการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน (บันทึกข้อความเลขที่ ศธ.0517.071/EC.001281 ลง ณ วันที่ 24 มีนาคม พ.ศ. 2557) โดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ทำการเก็บอุจจาระโดยใช้ rectal swab จากสุกรในฟาร์มและประชากรที่มีสุขภาพดีที่อาศัยในชุมชน พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน จำนวนทั้งสิ้น 409 ตัวอย่าง แบ่งเป็นอุจจาระของสุกรในฟาร์ม จำนวน 186 ตัวอย่าง และอุจจาระของประชากร จำนวน 223 ตัวอย่าง จำแนกเชื้อ *E. coli* ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีได้จำนวนทั้งสิ้น 218 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากสุกร จำนวน 103 สายพันธุ์ และอุจจาระของประชากร จำนวน 115 สายพันธุ์ ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disk

diffusion ทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disk จากนั้นนำเชื้อที่ให้ผลสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งสิ้น 212 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากสุกร จำนวน 101 สายพันธุ์ และเชื้อที่แยกได้จากประชากร จำนวน 111 สายพันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเพื่อทำการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ได้แก่ ยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (multiplexPCR) และเทคนิค whole genome sequencing (WGS) จากนั้นทำการวิเคราะห์หา sequence type (ST) ด้วยเทคนิค mutilocus sequence typing (MLST) เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพที่พบในสุกรและประชากรในพื้นที่ดังกล่าว

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

4.1 ทราบรูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพซึ่งแยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

4.2 ทราบความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แพร่กระจายระหว่างสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน เพื่อหาแนวทางป้องกันการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในชุมชน

4.3 ข้อมูลทั้งหมดดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประกอบการจัดทำแนวทางป้องกันการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในชุมชนได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Escherichia coli*

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแกรมลบรูปแท่ง จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) สายพันธุ์ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วย peri-trichous flagella เชื้อสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสทำให้เกิดกรด และสร้างเอนไซม์ catalase ได้ แต่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ oxidase นอกจากนั้นยังสามารถเปลี่ยนไนเทรตให้เป็นไนไทรต์ได้โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชัน (reduction reaction) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์ รวมไปถึงสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ และอาหาร (11)

2. ความสำคัญทางคลินิก

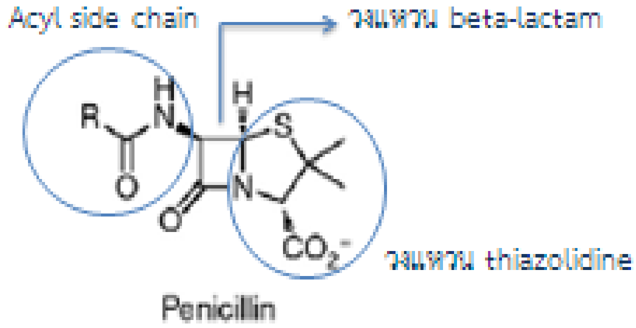
แม้ว่าเชื้อ *E. coli* จะเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ และมักไม่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร แต่เชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารที่พบได้บ่อยในมนุษย์ โดยมักก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อในกระแสเลือด (12) อย่างไรก็ตามเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์อาจก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้โดยสามารถแบ่งตามคุณสมบัติที่ทำให้เกิดโรคประกอบไปด้วย Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ที่สร้างสารที่มีพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้อาการท้องเสีย ปวดท้อง ไข้ต่ำ และคลื่นไส้ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) มักพบการติดเชื้อในเด็ก ทำให้อุจจาระร่วงเป็นน้ำหรือเป็นเลือดคล้ายอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *Shigella* Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เมื่อเกิดการติดเชื้อจะทำให้ท้องร่วงที่มีเลือดหรือมูกปนมากับอุจจาระ เนื่องจากเกิดการรุกรานเซลล์เยื่อบุลำไส้คล้ายอาการของโรคที่มีสาเหตุการติดเชื้อมาจาก *Shigella dysenteriae* หรือบิดมีตัว (bacillary dysentery) และ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ที่สร้างสารพิษประเภท verotoxin ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ shigatoxin ของเชื้อ *S. dysenteriae* ทำให้เยื่อบุของลำไส้เกิดความเสียหาย ส่งผลทำให้เกิดลำไส้ใหญ่อักเสบและตกเลือด (hemorrhagic colitis) อาการเมื่อเกิดการติดเชื้อคือ ปวดท้องรุนแรง อุจจาระร่วงเป็นมูกเลือด อาเจียนและมีไข้ต่ำๆหรืออาจไม่มีไข้ (11, 13)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. ยากลุ่ม beta-lactam

3.1 คุณสมบัติของยากลุ่ม beta-lactam

ยากลุ่ม beta-lactam ประกอบไปด้วยยากลุ่ม penicillins ยากลุ่ม cephalosporins ยา monobactam และยากลุ่ม carbapenems (14) สามารถออกฤทธิ์ฆ่าทำลาย (bactericidal) เชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสมาชิกของยาในกลุ่ม beta-lactam ทั้งหมดมีโครงสร้างพื้นฐานจากโมเลกุลของคาร์บอน 3 อะตอมและโมเลกุลของไนโตรเจน 1 อะตอม เชื่อมกันเป็นวงแหวน beta-lactam ตัวอย่างเช่นยา penicillin ที่โครงสร้างประกอบไปด้วยวงแหวน beta-lactam เป็นโครงสร้างหลักเชื่อมกับวงแหวน thiazolidine และโครงสร้างอีกด้านถูกเชื่อมกับโซ่ข้างที่มีหมู่เอซิล (acyl side chain) (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามยา penicillin เป็นต้นแบบในการพัฒนายาตัวอื่นๆในยากลุ่มนี้ ด้วยการนำโครงสร้างวงแหวน beta-lactam เชื่อมกับอนุพันธ์โซ่ข้างที่มีหมู่เอซิลซึ่งจะแตกต่างกันไปในยาแต่ละชนิด (15)



รูปที่ 1 โครงสร้างของยา penicillin ประกอบไปด้วยวงแหวน beta-lactam เชื่อมกับวงแหวน thiazolidine และโซ่ข้างที่มีหมู่เอซิล [ดัดแปลงจาก Llarrull IL et al. (16)]

3.1.1 ยากลุ่ม penicillins

ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียด้วยการรบกวนการสร้างผนังเซลล์ในกระบวนการ transpeptidation โดยยาจะจับกับ penicillin-binding-proteins หรือ PBPs ของเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์ชั้น peptidoglycan ไม่สมบูรณ์ ทำให้เซลล์แตกในที่สุด (17, 18) ยากลุ่มนี้ประกอบด้วย

ยา penicillin จากธรรมชาติ (natural penicillin) เป็นยาขนานแรกในกลุ่มยา penicillin ออกฤทธิ์แคบและจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยา penicillin G และยา penicillin V

ยา penicillinase resistant penicillins เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดออกฤทธิ์แคบ ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Staphylococci ที่สร้างเอนไซม์ penicillinase เพื่อมาทำลายยา ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยา methicillin ยา oxacillin ยา cloxacillin และยา dicloxacillin เป็นต้น

ยา aminopenicillins ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์กว้างสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมักถูกใช้ในการรักษาการติดเชื้อเบื้องต้นโดยเฉพาะการติดเชื้อทางผิวหนังและระบบทางเดินหายใจ ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น ยา amoxicillin และยา ampicillin เป็นต้น

ยา antipseudomonal penicillins เป็นยาที่ออกฤทธิ์กว้างสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง และเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* ได้ดี ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น ยา piperacillin ยา carbenicillin และ ยา ticarcillin เป็นต้น

3.1.2 ยากลุ่ม cephalosporins

เป็นยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ กลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับยาในกลุ่ม penicillins แต่มีความสามารถทนต่อเอนไซม์ penicillinase ได้ดีกว่า (17-19) ยากลุ่มนี้ประกอบด้วย

ยา cephalosporins รุ่นที่ 1 (first generation cephalosporins) เป็นยาที่ใช้ในการรักษาแบคทีเรียแกรมบวก อาทิเช่น เชื้อ *Streptococcus* และเชื้อ *Staphylococcus* เป็นส่วนใหญ่เนื่องจากสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ในระดับต่ำและไม่ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ที่เชื้อสร้างขึ้นมาทำลายยา ยามักถูกขับออกจากร่างกายช้าเพราะมีการจับกับโปรตีนในเลือด ตัวอย่างยาในรุ่นนี้ เช่น ยา cefazolin ยา cefapirin ยา cefatrizine ยา cefacetrile และยา cefadroxil เป็นต้น (17)

ยา cephalosporins รุ่นที่ 2 (second generation cephalosporins) สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างกว่ายาในรุ่นที่ 1 และทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase สามารถทำลายแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบโดยเฉพาะเชื้อ *Klebsiella spp.* ตัวอย่างยาในรุ่นนี้ เช่น ยา cefprozil ยา cefuroxime ยา cefuzonam ยา cephamycin เป็นต้น (17)

ยา cephalosporins รุ่นที่ 3 (third generation cephalosporins) เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา cephalosporin รุ่นที่ 1 และ 2 อาทิเช่นเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas spp.* ตัวอย่างยาในรุ่นนี้ เช่น ยา cefpodoxime ยา ceftazidime ยา ceftriaxone ยา cefotaxime และยา cefoperazone เป็นต้น (17)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ยา cephalosporins รุ่นที่ 4 (fourth generation cephalosporins) มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีเช่นเดียวกับยารุ่นที่ 1 โดยยาสามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ และยาส่วนใหญ่ผ่าน blood-brain barrier จึงถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบตัวอย่างยาในรุ่นนี้เช่น ยา cefepime และยา cefpirome เป็นต้น (17, 20)

ยา cephalosporins ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ methicillin resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA) เนื่องมาจากกลไกการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยาบนตัวเชื้อ ทำให้ยากลุ่ม beta-lactam ทั้งหมดไม่สามารถเข้าจับได้ โดยยาในกลุ่มนี้ถูกพัฒนาขึ้นให้สามารถเข้าจับกับเป้าหมายที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ ทำให้ยาสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่มีการดื้อยาได้ดีทั้งแกรมบวกและ

แกรมลบถูกนำมาใช้รักษาภาวะการติดเชื้อในช่องท้องและทางเดินปัสสาวะแทรกซ้อน ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยา ceftobiprole และยา ceftaroline เป็นต้น (21)

3.1.3 ยากลุ่ม monobactam

เป็นยาในกลุ่ม beta-lactam ที่มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งชนิดที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ เช่น เชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* แต่จะไม่มีผลในการรักษาเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่ aztreonam (20)

3.1.4 ยากลุ่ม carbapenems

เป็นยาที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ออกฤทธิ์กว้างและทนต่อเอนไซม์ beta-lactamase มากกว่ายากลุ่ม beta-lactam ชนิดอื่น มักใช้ในการรักษาแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อตัวเชื้อเช่นเดียวกับยาในกลุ่ม penicillins และกลุ่ม carbapenems โดยจับกับ penicillin-binding proteins และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยา ertapenem ยา imipenem ยา meropenem ยา doripenem ยา tebipenem และยา biapenem เป็นต้น (17, 20)

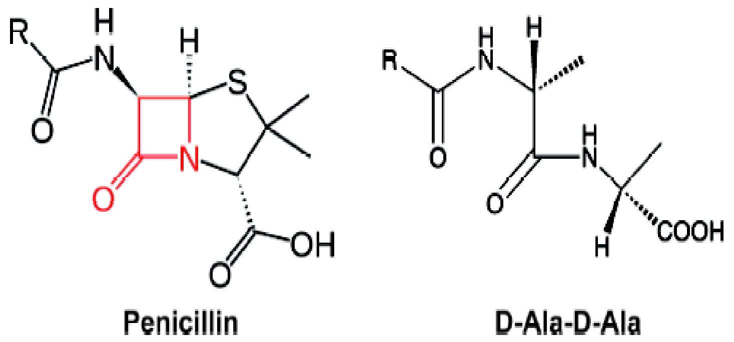
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา beta-lactam

ยาในกลุ่ม beta-lactam ที่กล่าวมาทั้งหมดมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียโดยการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ โดยธรรมชาติผนังเซลล์แบคทีเรียประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญได้แก่สาย peptidoglycan เกิดจากการเชื่อมกันของ N-acetyl glucosamine (NAG) และ N-acetyl muramic acid (NAM) เรียงสลับกันไปโดยกระบวนการที่มีชื่อว่า transglycosylation ที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ transglycosidase เชื่อมต่อหน่วยย่อยทั้งสองเข้าด้วยกัน ในส่วนของหน่วยย่อย NAM นั้นพบว่าจะมีส่วนของโซ่ข้างที่เป็นกรดอะมิโน 5 โมเลกุล (pentapeptide) และปลายสายของกรดอะมิโนในโมเลกุลที่ 4 และ 5 เป็น D-alanyl-D-alanine โดยจะไปเชื่อมกับสาย peptidoglycan อีกเส้นหนึ่งระหว่างโมเลกุล D-alanine กับ D-lysine ในแบคทีเรียแกรมบวก หรือกรด meso-

diaminopimelic ในแบคทีเรียแกรมลบ เกิดเป็นร่างแหของ peptidoglycan ผลของการเชื่อมกันระหว่างสาย peptidoglycan ส่งผลให้โมเลกุลของ D-alanine ที่ปลายสาย pentapeptide นั้นถูกตัดออกไปให้เหลือกรดอะมิโนเพียง 4 โมเลกุลหรือ tetrapeptide โดยเรียกกระบวนการนี้ว่า transpeptidation ซึ่งมีเอนไซม์ transpeptidase หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า penicillin-binding proteins (PBPs) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา (15, 22)

โครงสร้างของยาในกลุ่ม beta-lactam นั้นมีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ D-alanyl-D-alanine ที่เป็นกรดอะมิโนที่ปลายสาย pentapeptide (รูปที่ 2) ซึ่งเชื่อมต่อกับสาย peptidoglycan ในกระบวนการ transpeptidation ของการสร้างร่างแห peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย จากโครงสร้างที่คล้ายกันทำให้ยาสามารถจับกับเอนไซม์ PBPs ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ transpeptidation ทำให้การสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียไม่มีความแข็งแรง ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนได้ และเกิดเซลล์แตก จึงทำให้แบคทีเรียตายได้ในที่สุด (23-25)



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกันระหว่างยา penicillins และโมเลกุล D-alanyl-D-alanine (25)

3.3 กลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ

3.3.1 กลไกการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย

การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียสามารถพบได้ 2 รูปแบบ คือ การดื้อยาที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (natural หรือ intrinsic resistance) (26) ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติตามธรรมชาติของตัวเชื้อแต่ละ genus หรือ species โดยในเชื้อนั้นจะมีการดื้อยาต้านจุลชีพที่เหมือนกันทั้งกลุ่มและสามารถถ่ายทอดลักษณะการดื้อยานี้ไปสู่รุ่นลูกหลานได้ผ่านการถ่ายทอดทางพันธุกรรม เช่น การมี capsule ที่ขัดขวางไม่ให้ยาต้านจุลชีพเข้าไปในเซลล์ของเชื้อ การที่เชื้อแบคทีเรียบางชนิดไม่มีผนังเซลล์ทำให้ยาต้านจุลชีพกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งผนังเซลล์ออกฤทธิ์ไม่ได้ รวมถึงสภาวะที่เชื้อดำรงชีพแบบ persister คือเซลล์ที่กระบวนการเมทาบอลิซึมหยุดทำงานแต่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ ทำให้ยาเข้าไปยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะนี้ไม่ได้ เนื่องจากยาต้านจุลชีพส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่กำลังเจริญเติบโตเท่านั้น (26, 27)

กลไกการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียอีกรูปแบบ คือ การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง (acquired resistance) (26) เป็นการดื้อยาที่มีผลมาจากมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ส่งผลให้เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือคุณสมบัติที่ดื้อยาตามมา การดื้อยาในลักษณะนี้ทำให้เชื้อที่อยู่ใน genus หรือ species เดียวกันมีการดื้อยาแตกต่างกันออกไป การเกิด acquired resistance สามารถเกิดได้จาก 2 สาเหตุ (15, 28) ได้แก่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. การกลายพันธุ์ (genetic mutation) เกิดจากการที่เชื้อมีการกลายพันธุ์ภายในเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงลำดับหรือจำนวนเบส มีผลให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และอาจทำให้ลำดับและชนิดของกรดอะมิโนเปลี่ยนไป ส่งผลให้คุณสมบัติของโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นแตกต่างไปจากเดิม (15) อย่างไรก็ดีการดื้อยาชนิดนี้มักเกิดขึ้นกับยีนเดียว ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่มเดียวเท่านั้น และการถ่ายทอดลักษณะการดื้อยานี้เกิดขึ้นในรูปแบบของ vertical gene transfer คือการถ่ายทอดสารพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูก-หลาน ระหว่างเกิดกระบวนการ DNA replication จึงมักพบการดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียในสายพันธุ์เดียวกัน (26)

2. การถ่ายทอดยีนดื้อยา (resistant gene transfer) เกิดจากเชื้อได้รับยีนหรือชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซม นอกโครโมโซม (เช่น transposon, intergron และพลาสมิด) หรือหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic element) จากแบคทีเรียตัวอื่น (horizontal gene transfer) (27) โดยการถ่ายทอดดังกล่าวสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาได้มากกว่า 1 ยีน และสามารถเกิดขึ้นกับแบคทีเรียที่มี species เดียวกันหรือต่าง species ก็ได้ จึงมักก่อให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน และพบการระบาดในเชื้อแบคทีเรียข้ามสายพันธุ์ การถ่ายทอดสารพันธุกรรมสามารถเกิดได้ผ่านกลไก 3 รูปแบบได้แก่ กระบวนการ conjugation ซึ่งแบคทีเรียผู้ให้มีการถ่ายทอดพลาสมิดผ่านทาง pili ไปสู่แบคมีเรียผู้รับ กระบวนการ transformation ซึ่งเป็นการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ และกระบวนการ transduction ซึ่งเป็นการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่แบคทีเรียผู้รับโดยอาศัยไวรัสของแบคทีเรียที่เรียกว่า bacteriophage (29, 30)

3.3.2 กลไกการดื้อยากลุ่ม beta-lactam

เมื่อแบคทีเรียเกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ไม่ว่าจะมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์หรือการถ่ายทอดยีนดื้อยา ล้วนก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมและทำให้คุณสมบัติของโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นแตกต่างไปจากเดิม ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อตัวเชื้อได้ตามปกติ การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่นำมาซึ่งกลไกการดื้อยากลุ่ม beta-lactam ที่มีความสำคัญและพบได้บ่อยนั้นมีหลากหลายกลไก (15) ประกอบด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายในการจับของยา (drug target alteration) เชื้อแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBPs ได้ 2 ลักษณะ เพื่อยับยั้งกระบวนการ transpeptidation ในขั้นตอนการสร้างผนังเซลล์ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ PBPs ทำให้ยาเข้าจับไม่ได้ หรือ การลดการสร้าง PBPs ลง ทำให้ประสิทธิภาพการจับของยากับเป้าหมายนั้นลดลงส่งผลให้เกิดการดื้อยาในที่สุด (30)
2. การลดการนำยาผ่านเข้าสู่เซลล์ (reduction of drug permeability) ยากลุ่ม beta-lactam ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง และต้องอาศัย porin ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกคอยควบคุมการเข้าออกของยารวมไปถึงสารโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆแบบไม่จำเพาะ การลดปริมาณการสร้างโปรตีน porin หรือการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างโปรตีน porin นั้นทำให้ปริมาณยาที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์นั้นลดลง เป็นสาเหตุทำให้เกิดการดื้อยา (31)

3. การขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) เกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายชนิดในการขับยาออกเพื่อป้องกันไม่ให้ยาผ่านเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์กับเป้าหมายได้ ซึ่งยาแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับระบบขับยาออกในแต่ละระบบที่แตกต่างกัน โดยระบบขับยาออกที่สำคัญที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ คือ resistance nodulation division (RND) (32)
4. การสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อทำลายยากลุ่ม beta-lactam โดยเอนไซม์จะเข้าสลายพันธะเอไมด์ระหว่างโมเลกุลคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวงแหวน beta-lactam ส่งผลให้วงแหวนเปิดออกและโครงสร้างของยาเสียไปในที่สุด เอนไซม์ดังกล่าวเมื่อทำลายวงแหวนของยาตัวหนึ่งแล้วยังสามารถแยกตัวจากยา beta-lactam นั้น เพื่อไปจับและทำลายยา beta-lactam ที่เหลือได้อีกต่อไป (24, 33)

4. เอนไซม์ beta-lactamase

การสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ถือเป็นกลไกหลักที่สำคัญในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม beta-lactam ที่พบในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* (34) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ beta-lactamase ประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่เป็นสมาชิกย่อยจำนวนมาก ประกอบกับการมีการค้นพบเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงมีการตั้งชื่อและจัดกลุ่มชนิดของเอนไซม์ beta-lactamase ตามที่มาของเอนไซม์ ชนิดเชื้อที่สร้างเอนไซม์ สถานที่ที่ค้นพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ โครงสร้างระดับโมเลกุลของเอนไซม์ ความสามารถในการทำลายยากลุ่ม beta-lactam เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการจัดกลุ่มออกเป็นระบบหลัก 2 ระบบประกอบด้วย

1. การจัดกลุ่มตามโครงสร้างระดับโมเลกุลของเอนไซม์ (Molecular classification) ซึ่งเป็นการแบ่งตามระบบของ Ambler (Ambler classification) (35) โดยอาศัยชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 4 คลาส ได้แก่คลาส A, B, C และ D ในส่วนของเอนไซม์ที่อยู่ในคลาส A, C และ D จะมีตำแหน่งออกฤทธิ์ทำลายกลุ่ม beta-lactam บริเวณกรดอะมิโนเซอรีน (serine) แต่จะมีโครงสร้างส่วนอื่นที่แตกต่างกันไปในแต่ละคลาสเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า serine beta-lactamase ส่วนเอนไซม์ในคลาส B นั้นจะใช้ธาตุโลหะที่มีประจุบวก 2 ประจุ (divalent cation) ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็น

ธาตุสังกะสี (Zn^{2+}) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาบริเวณตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ จึงเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า metallo-beta-lactamase (36)

2. การจัดกลุ่มตามความสามารถในการออกฤทธิ์(functional classification) ซึ่งเป็นการแบ่งตามระบบของ Bush และคณะ (Bush-Jacoby-Medeiros classification) (37) เป็นการจำแนกเอนไซม์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ต่อยาชนิดต่างๆ และการยับยั้งเอนไซม์ด้วย beta-lactamase inhibitor แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 โดยกลุ่มที่ 1, 3 และ 4 ส่วนใหญ่จะไม่ถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitor มีเพียงเอนไซม์ในกลุ่ม 2 ที่มักจะถูกยับยั้งด้วยสารดังกล่าว โดยเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ต่อยาในแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไป คือ เอนไซม์ในกลุ่มที่ 1 มีเป้าหมายหลักเป็นยาในกลุ่ม cephalosporin เอนไซม์ในกลุ่มที่ 2 มีเป้าหมายเป็นยาในกลุ่ม penicillin และยากลุ่ม cephalosporin เอนไซม์ในกลุ่มที่ 3 สามารถทำลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้ทั้งหมดรวมไปถึงยา carbapenem โดยอาศัยธาตุโลหะในการเร่งปฏิกิริยาในตำแหน่งที่เอนไซม์ออกฤทธิ์ และเอนไซม์ในกลุ่มที่ 4 จะมีเป้าหมายการทำลายยาในกลุ่ม penicillin เป็นหลัก (ตารางที่ 1) (38)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 1 ตารางการจัดกลุ่มเอนไซม์ beta-lactamase [ดัดแปลงจาก Bush et al. (38)]

Ambler classification	Bush-Jacoby-Medeiros classification	ยากลุ่ม beta-lactam ที่เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์	การถูกต้านด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ beta-lactamase
คลาส A (serine penicillinases)	กลุ่ม 2a	Penicillins	+
	กลุ่ม 2b	penicillins, narrow-spectrum cephalosporins	+
	กลุ่ม 2be	penicillins, narrow-spectrum and extended spectrum cephalosporins	+
	กลุ่ม 2br	penicillins	-
	กลุ่ม 2c	penicillins, carbenicillin	+
	กลุ่ม 2e	extended-spectrum cephalosporins	+
	กลุ่ม 2f	penicillins, cephalosporins, carbapenems	±
คลาส B (metallo beta-lactamases)	กลุ่ม 3	ยากลุ่ม beta-lactams ส่วนมาก รวมไปถึงยา carbapenems	-
คลาส C (cephalosporinases)	กลุ่ม 1	cephalosporins	-
คลาส D (oxacillinases)	กลุ่ม 2d	penicillins, cloxacillin	±
ไม่มีการแบ่งกลุ่ม	กลุ่ม 4		-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.1 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส A

เป็นกลุ่มเอนไซม์ beta-lactamase ที่ใหญ่ที่สุดประกอบด้วยเอนไซม์กลุ่ม 2 ตามการจัดกลุ่มตามความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นส่วนใหญ่ (ยกเว้นกลุ่ม 2d ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในคลาส D) ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มนี้มักมีการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูง ส่งผลให้มีความหลากหลายของชนิดเอนไซม์ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยจำนวน 7 กลุ่ม ดังนี้ (15)

1. กลุ่ม 2a เป็นเอนไซม์ที่ทำลายยากลุ่ม penicillins (penicillinase enzyme) และสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย beta-lactamase inhibitor ส่วนใหญ่พบในแบคทีเรียแกรมบวกเอนไซม์กลุ่มนี้มักไม่มีผลต่อยากลุ่มที่มีฤทธิ์กว้าง ได้แก่ cephalosporins และ carbapenems (39)
2. กลุ่ม 2b เอนไซม์ที่ทำลายยากลุ่ม penicillins และ cephalosporins ที่มีฤทธิ์แคบและสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย beta-lactamase inhibitor มักพบการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ในแบคทีเรียแกรมลบ และสามารถพบการแพร่กระจายได้รวดเร็วเนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์อยู่บนพลาสมิดตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ในวงศ์ TEM และ SHV ซึ่งจะมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* (39)
3. กลุ่ม 2be เป็นเอนไซม์ที่ทำลายยากลุ่ม cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้าง และยา monobactam ซึ่งทำให้เอนไซม์มีคุณสมบัติการทำลายที่มากกว่าเอนไซม์กลุ่ม 2b จึงมีชื่อเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่ากลุ่ม 2be หรือ extended spectrum beta-lactamases (ESBL) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มีฤทธิ์ทำลายยากลุ่ม cephamycin และ carbapenems และถูกยับยั้งได้ด้วยสาร beta-lactamase inhibitor เอนไซม์ในกลุ่ม ESBL มักพบการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วเนื่องมาจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์อยู่บนพลาสมิดและพบในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่พบบ่อย ได้แก่ เอนไซม์ในวงศ์ TEM และ SHV รวมไปถึงเอนไซม์ในวงศ์ CTX-M หรือ cefotaximase ในขณะที่เอนไซม์ VEB, PER, GES มักพบการแพร่กระจายที่น้อยกว่า (39)
4. กลุ่ม 2br เป็นเอนไซม์ที่ไม่ถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitor มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า inhibition-resistant (IR) beta-lactamase สมาชิกส่วนใหญ่ของกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ในวงส์ TEM และ SHV ขณะที่เอนไซม์บางชนิดในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง ESBL และ IR beta-lactamase (40)

5. กลุ่ม 2c เป็นเอนไซม์ที่ทำลายยากลุ่ม carbenicillins (carbenicillinase enzyme) ซึ่งมักพบการกระจายตัวของยีนที่ควรคุมการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณต่ำ เนื่องจากปริมาณการใช้งานยา carbenicillin ยังอยู่ในวงจำกัด (41)
6. กลุ่ม 2e เป็นเอนไซม์ที่ทำลายยากลุ่ม cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้าง และถูกยับยั้งได้ด้วยสาร beta-lactamase inhibitor คุณสมบัติของเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีความคล้ายกับเอนไซม์ ESBL ในกลุ่ม 2be ต่างกันที่เอนไซม์ในกลุ่ม 2be มีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม penicillins และ monobactam ที่ต่ำกว่า ปัจจุบันอัตราการกระจายตัวของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ยังต่ำมากและพบได้ในแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น (38)
7. กลุ่ม 2f เป็นเอนไซม์ที่ทำลายยากลุ่ม penicillins, cephalosporins และ carbapenems และถูกยับยั้งได้ด้วยสาร beta-lactamase inhibitor ในระดับต่ำๆ มีชื่อเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า carbapenemase สามารถพบได้บ่อยในแบคทีเรียแกรมลบ วงศ์ *Enterobacteriaceae* และมีอัตราการกระจายตัวของยีนในปริมาณสูง เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์บางชนิดในกลุ่มนี้อยู่บนพลาสมิด (42)

4.2 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส B

เอนไซม์ในคลาสนี้มีโครงสร้างที่แตกต่างกับเอนไซม์ที่อยู่ในคลาสอื่นๆ เพราะต้องใช้ธาตุโลหะซึ่งมีประจุบวก 2 ประจุ โดยส่วนใหญ่จะเป็นธาตุสังกะสี (Zn^{2+}) เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ จึงเรียกเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวว่า metallo-beta-lactamase (MBL) โดยจัดในอยู่ในกลุ่ม 3 ตามความสามารถในการออกฤทธิ์ เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม beta-lactam ได้แก่ ยากลุ่ม penicillins ยากลุ่ม cephalosporins รวมไปถึงยากลุ่ม carbapenems แต่มีความสามารถในการทำลายยา monobactam ในระดับต่ำ และไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร beta-lactamase inhibitor อย่างไรก็ตามเอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกยังยั้งได้โดยสารที่มีความสามารถในการจับโลหะ (metal chelator) เช่น ethylenediaminetetraacetic (EDTA) และกรดอะซีติก ซึ่งสารดังกล่าวจะไปจับกับสังกะสีที่ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ (38, 43)

4.3 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส C

เอนไซม์คลาสนี้มีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม cephalosporins ได้ดีกว่ายากลุ่ม penicillins จึงถูกเรียกว่า cephalosporinase โดยเอนไซม์ที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มนี้ได้แก่ AmpC

beta-lactamase ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ตามความสามารถในการออกฤทธิ์ ความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้กับเอนไซม์ ESBL คือมีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม cephamycins แต่จะไม่ทำลายยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 4 ยา monobactam และยากลุ่ม carbapenems รวมไปถึงไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร beta-lactamase inhibitor มักพบการสร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยพบว่าเชื้อดังกล่าวส่วนใหญ่มียีน *ampC* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์อยู่บนโครโมโซมและบางส่วนพบยีนอยู่บนพลาสมิด ส่งผลให้เกิดการดื้อยาหลายขนานได้ อย่างไรก็ตามยีน *ampC* ทั้งที่อยู่บนโครโมโซมและพลาสมิดจะมีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายกัน ปัจจุบันมีการรายงานพบเอนไซม์ในกลุ่มนี้หลากหลายวงศ์ อาทิเช่น เอนไซม์ CMY, MIR, MOX และ LAT เป็นต้น (44)

4.4 เอนไซม์ beta-lactamase คลาส D

เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถทำลายยา beta-lactam บริเวณกรดอะมิโนเซอรีนเช่นเดียวกันเอนไซม์คลาส A และคลาส C แต่จะมีโครงสร้างโมเลกุลในส่วนอื่นที่แตกต่างไปจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาจึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 2d ตามความสามารถในการออกฤทธิ์ เอนไซม์สามารถทำลายยา aminopenicillin และ carboxypenicillin เป็นหลัก รวมทั้งยากลุ่ม penicillins ที่ทนต่อต่อเอนไซม์ beta-lactamase หรือ beta-lactamase-resistant penicillins เช่น oxacillin และ cloxacillin จึงมีชื่อเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า oxacillinase หรือ OXA เนื่องจากมีความสามารถในการทำลายกลุ่ม oxacillin ได้ดีกว่ายาอื่น (38) มักพบการสร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ในแบคทีเรียแกรมลบโดยมียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์อยู่บนโครโมโซมโดยกำเนิด จึงทำให้เกิดเป็นการดื้อยาโดยธรรมชาติ เช่นเชื้อ *Aeromonas* เชื้อ *Campylobacter* แต่พบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์มียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวอยู่บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่โดยเฉพาะ class 1 integron บนพลาสมิดทำให้เกิดการดื้อยาแบบได้รับมาในภายหลังได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เชื้อ *Acinetobacter baumannii* และเชื้อ *P. aeruginosa* (45)

5. ชนิดของเอนไซม์ extended spectrum beta-lactamases (ESBL)

เอนไซม์ extended spectrum beta-lactamases หรือ ESBL เป็นเอนไซม์ beta-lactamase ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ในกลุ่ม 2b ทำให้มีความสามารถในการจับกับ

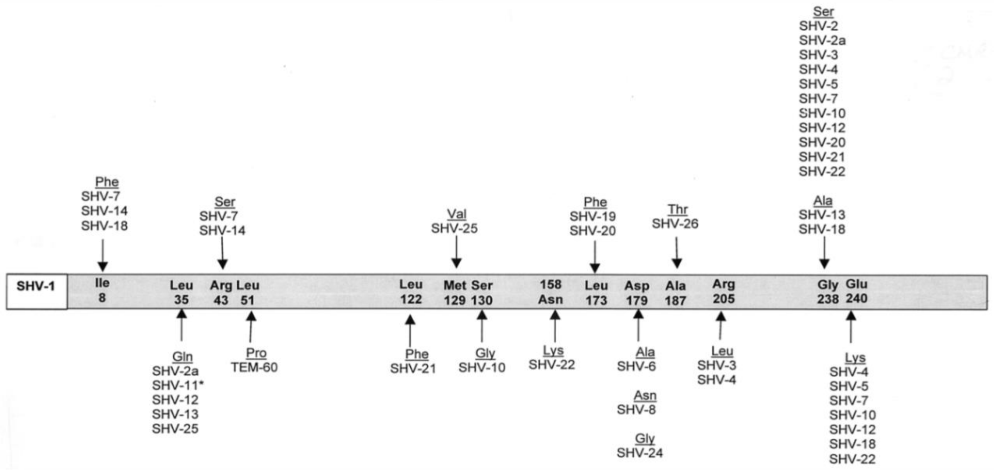
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารประกอบเชิงซ้อนของยากลุ่ม beta-lactam ได้ดีขึ้น จึงมีการเติมตัว e แทนคำว่า extended spectrum หรือการขยายฤทธิ์หลังกลุ่ม 2b เป็น 2be แม้ว่าปัจจุบันจะมีการค้นพบเอนไซม์ ESBL จำนวนมาก แต่มีเพียงเอนไซม์ในบางวงศ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และการระบาดในปริมาณสูง ได้แก่ เอนไซม์ที่เป็นสมาชิกในวงศ์ CTX-M, TEM และ SHV ซึ่งพบได้บ่อยในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ส่งผลต่อการขยายฤทธิ์ในการทำลายยากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 และยา aztreonam และเอนไซม์ที่พบการระบาดในระดับต่ำ ได้แก่ เอนไซม์ในวงศ์ VEB, OXA, PER และ GES เป็นต้น (46, 47)

5.1 เอนไซม์ ESBL วงศ์ SHV

พบการรายงานของเอนไซม์ SHV ครั้งแรกใน พ.ศ. 2528 ในเชื้อ *Klebsiella pneumonia* ที่สร้างเอนไซม์ชนิด native SHV-1 beta-lactamase ซึ่งมีฤทธิ์แคบทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม penicillins และยากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 1 (48) และมีการพบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์อยู่บนโครโมโซม อีกทั้งสามารถถ่ายทอดยีนให้แก่เซลล์อื่นๆได้ผ่านทางพลาสมิดเอนไซม์ SHV ถูกยับยั้งการทำงานด้วยหมู่ sulfhydryl ซึ่งแตกต่างไปจากเอนไซม์ในวงศ์อื่นที่หมู่ sulfhydryl ไม่สามารถยับยั้งการทำงานได้ จึงถูกเรียกว่า sulfhydrylvariable (SHV) ต่อมามีการค้นพบว่ามีการกลายพันธุ์ภายในโครงสร้างยีนของ $bla_{SHV\text{-}1}$ ทำให้ความสามารถในการทำลายยาของเอนไซม์นี้มีมากขึ้นโดยเฉพาะในยากลุ่ม extended spectrum cephalosporins และกลุ่ม monobactam ซึ่งพบว่าอนุพันธุ์ของเอนไซม์ SHV แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอันเกิดจากการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆจำนวน 2-3 ตำแหน่งดังแสดงในรูปที่ 3 ตัวอย่างของเอนไซม์ในวงศ์นี้ เช่นเอนไซม์ SHV-2 ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ SHV-1 โดยมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง 283 จาก glycine เป็น serine ทำให้มีการออกฤทธิ์แบบขยาย และสามารถทำลายยากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 ได้ดีขึ้น (49)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



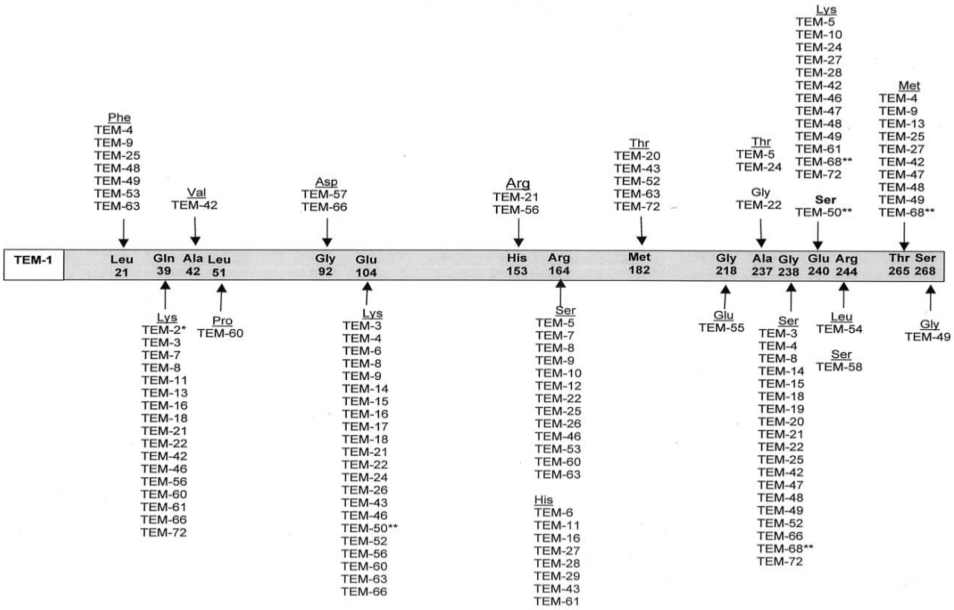
รูปที่ 3 แสดงอนุพันธ์ของเอนไซม์ในวงศ์ SHV ที่เกิดจากการแทนที่ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (50)

5.2 เอนไซม์ ESBL วงศ์ TEM

มีรายงานการพบเอนไซม์ native TEM-1 beta-lactamse ครั้งแรกจากผู้ป่วยที่ชื่อว่า Temoneira ประเทศกรีซ จึงเป็นที่มาของชื่อเอนไซม์ TEM (51) โดยเอนไซม์ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม aminopenicillins และยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 1 และจากการที่มีการใช้ยาเหล่านี้อย่างแพร่หลายส่งผลให้โครงสร้างของยีน $bla_{\text{TEM-1}}$ ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ TEM-1 เกิดการกลายพันธุ์ทำให้เอนไซม์มีฤทธิ์แบบขยายสามารถทำลายยาต้านจุลชีพได้กว้างขึ้น โดยเฉพาะการทำลายยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 การกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ TEM-1 มักเกิดขึ้นที่กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 39 จาก lysine เป็น glutamine ทำให้เกิดเอนไซม์ชนิดใหม่คือ TEM-2 beta-lactamase (รูปที่ 4) แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่เกิดการกลายพันธุ์นี้ยังไม่ถูกจัดเป็นเอนไซม์ ESBL เนื่องจากยังคงมี substrate profile ที่เหมือนกับ TEM-1 ต่อมามีการค้นพบว่ามีการกลายพันธุ์บริเวณโครงสร้างของยีน $bla_{\text{TEM-1}}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่แตกต่างกันออกไปเกิดเป็นเอนไซม์ ESBL ที่เป็นอนุพันธุ์ของเอนไซม์ TEM-1 อีกจำนวนมาก เช่น เอนไซม์ TEM-3 เป็นต้น ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม oxyiminocephalosporins ชนิดต่างๆ ได้ดีขึ้น อาทิเช่น ยา cefotaxime และยา ceftazidime เป็นต้น ตัวอย่างของการแทนที่ของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆ ภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ TEM ที่มีความสำคัญ ได้แก่ การ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 104 จาก glutamate เป็น lysine การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 164 จาก arginine เป็น serine หรือ histidine การเปลี่ยนแปลงกระอะมิโนในตำแหน่งที่ 238 จาก glysine เป็น serine และการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนอื่นๆ (50)



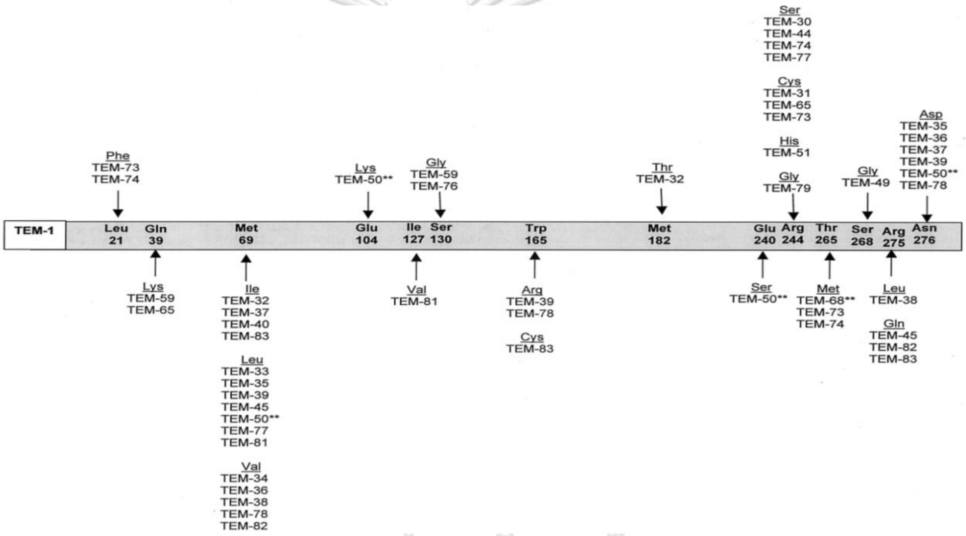
รูปที่ 4 แสดงอนุพันธ์ของเอนไซม์ในวงศ์ TEM ที่เกิดจากการแทนที่ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (50)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์ในวงศ์ TEM มากกว่า 90 ชนิด แต่ในบางกรณีการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ บนยีนไม่สามารถทำให้เกิดเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ESBL ได้ เช่น TEM-33, TEM-55 เป็นต้น รวมไปถึงเอนไซม์ TEM บางชนิดที่มีความสามารถยังยั้งสาร beta-lactamase inhibitor (inhibitor-resistant TEM: IRT) เช่น clavulanic และ sulbactam และไม่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ ESBL จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 2br เมื่อแบ่งเอนไซม์ตามความสามารถในการออกฤทธิ์ เช่น TEM-30 หรือ IRT-2 เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าสร้างจากเชื้อ *E. coli* และสามารถพบการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวนี้จากเชื้อแกรมลบรูปแท่งอื่นได้ เช่น *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* และ *Proteus mirabilis* เป็นต้น ตัวอย่างการแทนที่ของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆ ภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ TEM ชนิด IRT ที่มีความสำคัญ ได้แก่การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง 69 จาก methionine เป็น isoleucine หรือ leucine หรือ

valine เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง 244 จาก arginine เป็น glycine หรือ histidine หรือ cystein หรือ serine เป็นต้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเหล่านี้ทำให้เกิดอนุ-พันธุ์ของเอนไซม์ TEM ชนิด IRT ที่แตกต่างไปจากฟีโนไทป์ของเอนไซม์ ESBL ดังแสดงในรูปที่ 5 (50, 52)

ในขณะที่มีเอนไซม์ TEM ที่มีการกลายพันธุ์เชิงซ้อน หรือ complex mutant of TEM (CMT) เป็นเอนไซม์ที่ทำลายยากลุ่ม cephalosporins ชนิดที่ออกฤทธิ์กว้าง แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitor และไม่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ESBL โดยเอนไซม์เหล่านี้จะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม



2ber เช่น TEM-50 หรือ CMT-1 เป็นต้น (53)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 5 แสดงอนุพันธ์ของเอนไซม์ในวงศ์ TEM ชนิด IRT ที่เกิดจากการแทนที่ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (50)

5.3 เอนไซม์ ESBL วงศ์ CTX-M

เอนไซม์ในวงศ์นี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากเอนไซม์ ESBL ที่อยู่ในวงศ์อื่นๆ คือเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายยา cefotaxime จึงทำให้เกิดการดื้อยาดังกล่าวในระดับสูง ในขณะที่มีความสามารถในการทำลาย ceftazidime ได้น้อยกว่าจึงทำให้เกิดการดื้อยาในระดับต่ำๆ หรืออาจยังมีความไวต่อยา ceftazidime จึงเรียกเอนไซม์ในวงศ์นี้ว่า cefotaximase หรือ CTX-M โดยที่ CTX

เป็นชื่อย่อของยา cefotaxime และ M แทนชื่อเมืองมิวนิค ประเทศเยอรมัน ซึ่งเป็นสถานที่ที่มีการรายงานการพบเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรก เอนไซม์ CTX-M ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ความสามารถในการทำลายยา cefepime ได้ดีกว่าเอนไซม์ ESBL ที่อยู่ในวงศ์อื่นๆ โดยเอนไซม์ชนิดแรกในวงศ์นี้ ที่มีการค้นพบคือ CTX-M-1 หรือ MEN-1 ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์ในวงศ์ CTX-M มากกว่า 128 ชนิดแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มตามการจัดลำดับของกรดอะมิโน (54) ดังนี้

1. กลุ่ม CTX-M-1 ประกอบไปด้วย CTX-M-1, -3, -10, -12, -15, -28, -30, 55 และ FEC-1
2. กลุ่ม CTX-M-2 ประกอบไปด้วย CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20 และ Toho-1
3. กลุ่ม CTX-M-8 ประกอบไปด้วย CTX-M-8, -40, -63
4. กลุ่ม CTX-M-9 ประกอบไปด้วย CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19
5. กลุ่ม CTX-M-25 ประกอบไปด้วย CTX-M-25, -26, -39, -41, 91

5.4 เอนไซม์ ESBL วงศ์ OXA

เอนไซม์ในวงศ์นี้เป็นเอนไซม์ ESBL ที่มีความแตกต่างไปจากเอนไซม์ในวงศ์ TEM และ SHV โดยเอนไซม์วงศ์ OXA ถูกจัดอยู่ในคลาส D ตามลักษณะโครงสร้าง และจัดอยู่ในกลุ่ม 2d ตามกลไกการออกฤทธิ์ (36, 41) เอนไซม์นี้มีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม cephamycins ยา ampicillin ยา oxacillin และยา cloxacillin รวมไปถึงยาในกลุ่ม beta-lactam อื่นๆ แต่จะไม่สามารถทำลายยาในกลุ่ม carbapenems มีการค้นพบว่าเอนไซม์ ESBL ในวงศ์ OXA ส่วนใหญ่มักถูกสร้างในเชื้อกลุ่ม *P. aeruginosa* เป็นหลัก แตกต่างจากเอนไซม์ ESBL ส่วนใหญ่ที่มักพบว่ามีการสร้างจากเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae*

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เอนไซม์ ESBL ในวงศ์ OXA เกิดจากการแทนที่กรดอะมิโนในโครงสร้างยีน bla_{OXA} โดยส่วนใหญ่มักเกิดการแทนที่กรดอะมิโนในโครงสร้างยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิด OXA-10 (15) เช่น เมื่อเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือ การเปลี่ยนจาก arginine เป็น serine ในตำแหน่งที่ 143 และการเปลี่ยนจาก glycine เป็น aspatate ในตำแหน่ง 157 ส่งผลให้เกิดเอนไซม์ OXA-10 นอกจากนี้ยังมีอนุพันธุ์ของเอนไซม์ชนิด OXA-10 อื่นๆ ได้แก่ OXA-13 OXA-14 OXA-16 OXA-17 OXA-19 และ OXA-28 เป็นต้น (45, 55)

5.5 เอนไซม์ ESBL วงศ์อื่นๆ

เอนไซม์ ESBL อื่นๆ ที่นอกเหนือไปจากจากวงศ์ที่พบได้บ่อยดังที่กล่าวมาข้างต้น อาทิเช่น เอนไซม์ PER-1 beta-lactamase ซึ่งสร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa และ A. baumannii* (56) โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้อยู่บนพลาสมิด และเป็นสาเหตุที่ทำให้ *A. baumannii* เกิดการระบาดของเชื้อดื้อยา ceftazidime ในโรงพยาบาลในประเทศตุรกีเป็นวงกว้าง รวมไปถึงเอนไซม์ VEB-1 beta-lactamase ที่พบในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยชาวเวียดนามในประเทศฝรั่งเศส (57) เอนไซม์ CME-1 ที่ถูกสร้างจากเชื้อ *Chryseobacterium meningosepticum* (58) และ TLA-1 ที่พบจากเชื้อ *E. coli* ซึ่งแยกได้ในประเทศเม็กซิโก (19) เป็นต้น

6. การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL

ปัจจุบันพบแนวโน้มการแพร่กระจายเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL เพิ่มสูงขึ้น มีการรายงานความชุกในประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ พ.ศ. 2546 พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL 3.3-4.7% และประเทศในเขตละตินอเมริกาพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL มากกว่า 6.7-25.4% (59) ในขณะที่มีการรายงานความชุกของเชื้อดังกล่าวในเขตประเทศเอเชียแปซิฟิกในปี พ.ศ. 2552-2553 พบความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL สูงถึง 42.2% โดยในประเทศจีน ประเทศเวียดนาม ประเทศสิงคโปร์ และประเทศมาเลเซียพบความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ประมาณ 67%, 61%, 26% และ 24% ตามลำดับ (60)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากการศึกษาความชุกของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2556-2558 พบประชากรที่มีสุขภาพดีในชุมชนเป็นพาหะของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL มากถึง 30-76% ในขณะกลุ่มประชากรที่มีสุขภาพดีซึ่งทำงานในฟาร์มปศุสัตว์ พบว่าเป็นพาหะของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวถึง 43-93% และเมื่อทำการศึกษาความชุกในสัตว์ซึ่งไม่ได้เป็นโรคใดๆ ที่เลี้ยงในฟาร์มปศุสัตว์ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน สามารถเพาะแยกเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากสุกรได้ถึง 80% จากไก่พันธุ์เนื้อ 40% และจากอาหารสดและแหล่งน้ำสาธารณะกว่า 25 % (9) โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งพบในเชื้อ *E. coli* ที่พบได้จากตัวอย่างทั้งหมดข้างต้น ได้แก่ ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ จำนวน 99.6% ยีน bla_{TEM} จำนวน 77.0% และยีน bla_{SHV} จำนวน 3.8% (61)

7. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธีทางฟีโนไทป์

ในปัจจุบันการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL สามารถทำได้โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ เช่น การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBL ผ่านการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละการทดสอบดังต่อไปนี้

7.1 การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL

Clinical Laboratory Standards and Institute (CLSI) ได้กำหนดมาตรฐานการตรวจคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่อาจสร้างเอนไซม์ ESBL ไว้ 2 วิธี ได้แก่การทดสอบด้วยวิธี disk diffusion ซึ่งพิจารณาจากขนาดinhibition zone และวิธี broth microdilution ซึ่งพิจารณาจากค่าความเข้มข้นน้อยสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentrations: MICs) (62, 63)

7.1.1 การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี disk diffusion

การทดสอบด้วยวิธี disk diffusion อาศัยหลักการของ Kerby-Braund method การทดสอบทำได้โดยนำโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในน้ำเกลือและปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ป้ายเชื้อลงบน Meuller Hinton agar จากนั้นวางแผ่นยาที่ต้องการทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่ง ประกอบไปด้วย ยา cefpodoxime ขนาด 10 ไมโครกรัมและ/หรือยา cefotaxime ขนาด 30 ไมโครกรัมและ/หรือยา ceftazidime ขนาด 30 ไมโครกรัมและ/หรือยา ceftriaxone ขนาด 30 ไมโครกรัมและ/หรือยา aztreonam ขนาด 30 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านขนาดของ inhibition zone ที่วัดได้โดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตรและแปลผลตามมาตรฐานที่ CLSI ปี 2016 กำหนดดังตารางที่ 2 (64)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 เกณฑ์ที่ใช้ในการแปลผลสำหรับการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อ *E. coli* [ดัดแปลงจาก CLSI ปี 2016 (62)]

แผ่นยาที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นของยา (ไมโครกรัม)	ขนาด inhibiton zone ที่ให้ผล ESBL เป็นบวกในการคัดกรอง (มิลลิเมตร)	ค่า MICs ที่ให้ผล ESBL เป็นบวกในการคัดกรอง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
cefpodoxime	10	≤17	≥ 8
cefotaxime	30	≤27	≥ 2
ceftazidime	30	≤22	≥ 2
ceftriaxone	30	≤25	≥ 2
aztreonam	30	≤27	≥ 2

7.1.2 การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี broth microdilution

เป็นการทดสอบโดยอาศัยหลักการเจือจางยาต้านจุลชีพเป็นลำดับในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว cation-adjusted Mueller-Hinton broth โดยให้ยามีความเข้มข้นลดลงลำดับละสองเท่า (two-fold serial dilution) ซึ่งยาประกอบไปด้วย cefpodoxime ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ/หรือยา cefotaxime ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ/หรือยา ceftazidime ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ/หรือยา ceftriaxone ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ/หรือยา aztreonam ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในน้ำเกลือและปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland และหยดเชื้อลงในยาให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเท่ากับ $5x10^5$ CFU/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตจากหลุมที่มียาต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ และแปลผลตามมาตรฐานที่ CLSI ปี 2016 กำหนดดังตารางที่ 2 (63)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

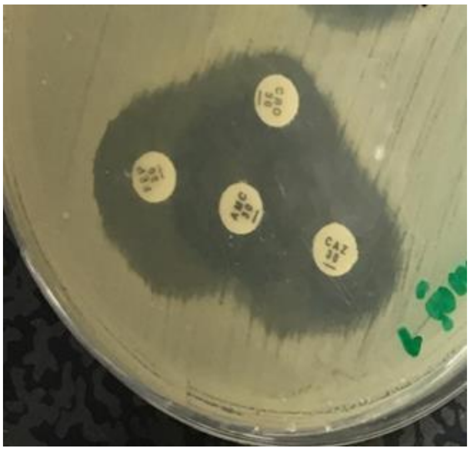
7.2 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL

หากผลการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ให้ผลบวกกับยาตัวใดตัวหนึ่งที่ใช้ในการคัดกรองด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งข้างต้น จำเป็นต้องมีการตรวจเพื่อยืนยันการสร้างเอนไซม์อีกครั้งโดยการทดสอบต่างๆ ตามวิธีทางฟีโนไทป์มีรายละเอียด ดังนี้

7.2.1 การตรวจด้วยวิธี double disks diffusion

เนื่องจากเอนไซม์ ESBL ส่วนใหญ่สามารถถูกยับยั้งด้วยสาร beta-lactamase inhibitor เช่น กรด clavulanic ดังนั้นในการทดสอบจะนำโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในน้ำเกลือและปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ป้ายเชื้อลงบน Mueller Hinton agar จากนั้นวางแผ่นยา amoxicillin/clavulanate ความเข้มข้น 20/10 ไมโครกรัมบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และวางแผ่นยา cefpodoxime ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมและ/หรือยา ceftazidime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมและ/หรือยา ceftriaxone ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมและ/หรือยา cefotaxime ไมโครกรัมและ/หรือยา aztreonam ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม โดยวางให้ระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของแผ่นยา amoxicillin/clavulanic acid ถึงจุดศูนย์กลางของยาอื่นๆ ประมาณ 30 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 6 หาก inhibition zone ของ ของยา beta–lactam ด้านที่ใกล้กับ amoxicillin/clavulanic acid ขยายออกไปจากวงซึ่งเป็น inhibition zone ปกติ หมายถึงเกิดการเสริมฤทธิ์ (synergy) ของกรด clavulanic แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ ESBL อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือยังไม่มีระยะห่างมาตรฐานที่ชัดเจนและเหมาะสมระหว่างแผ่นยา amoxicillin/ clavulanic acid กับยา beta–lactam รวมไปถึงประเภทของเอนไซม์ ESBL ที่มีหลายวงศ์ซึ่งอาจทำให้การวินิจฉัยเอนไซม์ ESBL ไม่ครบทุกประเภทหากใช้แผ่นยาซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ไม่ครบทุกชนิด (62)

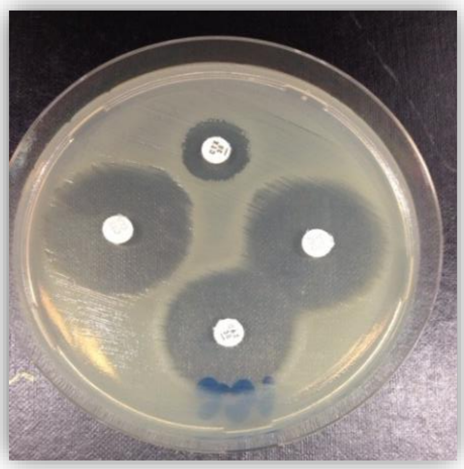
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 6 การตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี disk diffusion (Seenama,2017)

7.2.2 การตรวจด้วยวิธี combination disk

เป็นวิธีการตรวจยืนยันโดยการใช้หลักการของ Kerby-Braund method เช่นเดียวกับวิธี disk diffusion โดยการเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของแผ่นยากลุ่ม extended-spectrum cephalosporins (ESC) เพียงอย่างเดียว ได้แก่ ยา cefotaxime และยา ceftazidime กับแผ่นยา ESC ที่มีสาร beta-lactamase inhibitor ได้แก่ กรด clavulanic รวมอยู่ด้วย ดังนี้ แผ่นยา cefotaxime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมเปรียบเทียบกับแผ่นยา cefotaxime/clavulanic ความเข้มข้น 30/10 ไมโครกรัมและแผ่นยา ceftazidime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมเปรียบเทียบกับแผ่นยา ceftazidime/clavulanic ความเข้มข้น 30/10 ไมโครกรัม อ่านขนาดของ inhibition zone ที่วัดได้และแปลผลตามมาตรฐานที่ CLSI กำหนด หาก inhibition zone ของแผ่นยาที่มีกรด clavulanic ผสมอยู่กว้างกว่าแผ่นยาที่มีเพียงยา ESC ≥ 5 มิลลิเมตรแสดงว่าเชื้อที่ทำการทดสอบมีการสร้างเอนไซม์ ESBL (62)



รูปที่ 7 การตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disk (Seenama, 2017)

7.2.3 การตรวจด้วยวิธี broth microdilution

เป็นการทดสอบโดยเจือจางยาที่มีคุณสมบัติเป็น ESC เพียงอย่างเดียวกับยา ESC ที่มีสาร beta-lactamase inhibitor ผสมอยู่เป็นลำดับใน cation-adjusted Mueller-Hinton broth โดยให้ยามีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นลำดับละสองเท่า ซึ่งยาประกอบไปด้วยยา cefotaxime ความเข้มข้น 64-0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเปรียบเทียบกับยา cefotaxime/clavulanic ความเข้มข้น 0.25/4 - 64/4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและยา ceftazidime ความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับยา ceftazidime/clavulanic ความเข้มข้น 0.25/4 - 128/4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในน้ำเกลือและปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland และหยดเชื้อลงในยา ceftazidime และยา ceftazidime/clavulanic ที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเท่ากับ $5x10^5$ CFU/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นน้อยสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อและแปลผลตามมาตรฐานที่ CLSI กำหนด หากยา ESC ที่มีสาร beta-lactamase inhibitor มีค่าความเข้มข้นน้อยสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อลดลง ≥ 3 ระดับของการเจือจางเมื่อเทียบกับยา ESC เพียงอย่างเดียว แสดงว่าเชื้อที่ทำการทดสอบมีการสร้างเอนไซม์ ESBL (63) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีขั้นตอนยุ่งยากและต้องใช้ผงยามาตรฐานในการทดสอบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7.2.4 การทดสอบด้วยแผ่น Epsilometer test® (E-test®)

E-test® เป็นการทดสอบหาค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยทำการทดสอบเชื้อกับแผ่นยาที่มียาความเข้มข้นหลายความเข้มข้นบรรจุอยู่แบบ exponential gradient ภายหลังการบ่มเชื้อสามารถอ่านค่าความเข้มข้นน้อยสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยสังเกตจากจุดตัดระหว่างวงของเชื้อกับยาที่ระดับความเข้มข้นที่ถูกระบุอยู่บนแผ่นยา ซึ่ง E-test® ที่ใช้ทดสอบหาการสร้างเอนไซม์ ESBL จะบรรจุยาที่แตกต่างกันอยู่ในสองด้านของแผ่นยา โดยด้านหนึ่งจะมีระดับความเข้มข้นของยา ESC เพียงอย่างเดียวที่แตกต่างกันจากมากไปน้อยตามแนวความยาวของแผ่นยาในขณะที่อีกด้านจะมีระดับความเข้มข้นของยา ESC ผสมกับสาร beta-lactamase inhibitor ที่แตกต่างกันจากมากไปน้อยเช่นกัน การอ่านผลทำโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างค่าความเข้มข้นน้อยสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่คนละด้านของแผ่นยาหากยา ESC ที่มีสาร beta-lactamase inhibitor มีค่าความเข้มข้นน้อยสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อลดลง ≥ 3 ระดับของการเจือจางเมื่อเทียบกับยา ESC เพียงอย่างเดียวแสดงว่าเชื้อที่ทำการทดสอบมีการสร้างเอนไซม์ ESBL แม้ว่าการทดสอบด้วยวิธีนี้มีความสะดวก ขั้นตอนไม่ยุ่งยากแต่มีค่าใช้จ่ายในการทดสอบที่สูงกว่าวิธีการทดสอบอื่นๆที่กล่าวมาข้างต้น (65)

7.2.5 การทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปัจจุบันการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL สามารถทดสอบได้ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งส่วนใหญ่อาศัยหลักการ broth microdilution ที่เปรียบเทียบสภาวะที่มียา ceftazidime หรือยา cefotaxime เพียงอย่างเดียวกับสภาวะที่มียาดังกล่าวผสมกับสาร beta-lactamse inhibitor และมีการวิเคราะห์ประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ส่งผลให้มีการรายงานผลการทดสอบที่รวดเร็วกว่าการทดสอบอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ประกอบกับการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวมักให้ผลบวกปลอมที่สูงและมีความจำเพาะที่ต่ำ (66)

7.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธีทางจีโนไทป์

การตรวจหาเอนไซม์ ESBL ในอดีตมีการใช้ค่า isoelectric point (PI) ในการแยกเอนไซม์ ESBL จากเชื้อที่แยกได้ในสิ่งส่งตรวจ อย่างไรก็ดีเมื่อมีการค้นพบชนิดของเอนไซม์ ESBL ที่มากขึ้นการ

ใช้ค่า PI จึงไม่มีความเหมาะสมในแยกเอนไซม์กลุ่มนี้ (50) ต่อมามีการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ด้วย DNA probe ที่จำเพาะต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ TEM และเอนไซม์ SHV อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีความยุ่งยากและไม่สามารถแยกเอนไซม์ ESBL และเอนไซม์ที่ไม่ใช่ ESBL ออกจากกันได้ (67)

ปัจจุบันการตรวจหาเอนไซม์ ESBL ในระดับโมเลกุลที่ใช้กันอย่างแพร่หลายอาศัยหลักการการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนและเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือ PCR machine หรือ thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยา (68) ภายหลังได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆในการตรวจสอบเอนไซม์ ESBL โดยใช้พื้นฐานการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR อาทิเช่น PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในการตรวจหาชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ TEM (69) วิธีนี้ใช้ตัวติดตามดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นๆที่ทราบลำดับเบสและทำการติดฉลากเพื่อใช้ในการติดตามผล นำมาทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่สนใจที่ถูกแยกให้เป็นสายเดี่ยว จากนั้นถูกตัดด้วยเอนไซม์ NheI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้ได้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไป ทำให้ทราบบริเวณที่มีการกลายพันธุ์บนโครงสร้างยีนของ bla_{SHV} ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก G เป็น A ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glycine เป็น serine ในตำแหน่งที่ 238 ทำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ (70)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เทคนิค PCR-single stand conformation polymorphism (PCR-SSCP) เป็นเทคนิคการตรวจหาเอนไซม์ ESBL ระดับโมเลกุลด้วยการหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไปเพียง 1 คู่เบส ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจหายีน bla_{SHV} โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR จากนั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Pst*I แล้วทำการแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วย polyacrylamide gel ซึ่งยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิด SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 และ SHV-7 สามารถแยกออกจากกันด้วยลักษณะรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน (71, 72)

อย่างไรก็ตามเทคนิคการหาลำดับเบส (nucleotide sequencing) ยังถือเป็นวิธีมาตรฐานในการจำแนกชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase การหาลำดับเบสมีหลายเทคนิค อาทิเช่นเทคนิคแซงเกอร์ (Sanger chemistry) ซึ่งใช้หลักการ dideoxynucleotide chain termination

เทคนิคนี้มีข้อจำกัดในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงช่วงสั้นๆ ประมาณ 1000 คู่เบส (73) จึงได้มีการพัฒนาการหาลำดับเบสด้วยเทคนิคใหม่ในปัจจุบัน เช่น เทคนิค next generation sequencing ที่สามารถการอ่านลำดับเบสได้ช่วงที่ยาวขึ้น ด้วยการอ่านแบบสุ่มทั้งจีโนม และตัดสายดีเอ็นเอนั้นมาต่อเข้ากับ adaptor ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอได้พร้อมๆ กัน (74) มีการนำเทคนิคการหาลำดับเบสของเชื้อเพื่อตรวจสอบกลไกการดื้อยาในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อยาหลายขนานซึ่งทำให้ทราบว่าเชื้อมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาใดบ้าง (75) แต่ในทางปฏิบัติเทคนิคดังกล่าวไม่เหมาะสมในการศึกษาเชิงระบาดวิทยาเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายที่สูง

ขณะที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานิยมใช้เทคนิค pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ในการศึกษาเชิงระบาดวิทยาและความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL โดยอาศัยหลักการในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ตั้งแต่ 10 กิโลเบสจนถึงขนาด 10 เมกาเบส ภายหลังจากการนำดีเอ็นเอของเชื้อมาตัดย่อยแบบ rare cutting ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด XbaI แล้วทำการแยกดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า (pulsed electric field) ซึ่งมีการสลับสนามไฟฟ้าสองด้านในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอหลายขนาดและนำมาสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียพิจารณาจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน หากมีจำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่าง 1-3 แถบระหว่างสองเชื้อบ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันสูง หากมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 4-6 แถบบ่งชี้ว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะมีความสัมพันธ์กัน ในกรณีที่มีความแตกต่างของจำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า 6 แถบบ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์หรือมีความแตกต่างกัน (76) แต่เทคนิคดังกล่าวไม่เหมาะสมในการนำไปปรับใช้กับห้องปฏิบัติการทุกแห่งหรือในงานประจำเนื่องจากใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญและมีประสบการณ์ อีกทั้งอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้มีราคาสูง ส่งผลให้เกิดปัญหาเมื่อต้องตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี multilocus sequence typing (MLST)

8.1 เทคนิคการวิเคราะห์ MLST

เทคนิค MLST เป็นการตรวจวิเคราะห์ทางโมเลกุลที่อาศัยหลักในการตรวจหาความแตกต่างของลำดับเบสของสาย DNA ซึ่งอยู่บริเวณกึ่งกลางของยีน (internal fragment) โดยยีนที่นิยมนำมาวิเคราะห์เป็นยีนเจ้าบ้านที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อ (house-keeping genes) ซึ่งทั่วไปมักจะใช้ยีนที่มีขนาด 450-500 คู่เบส ประมาณ 7 ยีน (77) ตามปกติแล้ว house-keeping gene ของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะของ allele ที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามเทคนิค MLST จะพิจารณาเฉพาะตำแหน่งของลำดับเบสโดยไม่คำนึงถึงจำนวนของเบสที่แตกต่างกัน โดยที่การจัดเรียงลำดับเบสนั้นอาจมีความแตกต่างกันเพียงแค่หนึ่งตำแหน่งหรือหลายตำแหน่ง เมื่อนำความแตกต่างของ allele ของ house-keeping gene ทั้ง 7 ยีนมาพิจารณาร่วมกัน จะสามารถกำหนด allelic number ที่เรียงกันตามลำดับ และลำดับเหล่านั้นจะถูกระบุเป็น allelic profile และจะถูกกำหนดเป็น sequence type (ST)

ขั้นตอนของเทคนิค MLST นั้นประกอบด้วย data collection, data analysis และ multilocus sequence analysis ในขั้นตอนของ data collection เป็นขั้นตอนการกำหนดตำแหน่งลำดับเบสและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ house-keeping gene ที่สนใจด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำลำดับเบสมาทำการวิเคราะห์ในขั้นตอน data analysis ซึ่งจะพิจารณาความแตกต่างของ allele number ในแต่ละยีน เพื่อระบุเป็น allelic profile หรือ sequence type หากมีรูปแบบตำแหน่งการจัดเรียงลำดับเบสที่ต่างออกไปที่จำเพาะและไม่ซ้ำกับที่เคยปรากฏมาก่อน จะถูกจัดเก็บเป็น allelic profile แบบใหม่ ซึ่งต้องผ่านการพิสูจน์ก่อนถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล MLST (MLST database) ผ่านระบบอินเตอร์เนท ซึ่งนักวิจัยที่สนใจสามารถเข้าถึงข้อมูลได้ตลอดเวลา และในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการทำ multilocus sequence analysis เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อที่ทำการศึกษาด้วยการเปรียบเทียบ allelic profile หรือ sequence type ว่ามีความใกล้เคียงหรือต่างไปจากกลุ่มของเชื้อ (clonal complex) ที่มีในฐานข้อมูล MLST อย่างไร ความสัมพันธ์ของเชื้อจะถูกแสดงในลักษณะโครงสร้างต้นไม้ (dendrogram) โดยใช้หลัก maxtrix of pairwaise differences ของแต่ละ allelic profile ซึ่งจะปรากฏเป็นแผนภูมิที่แสดงรูปแบบของ sequence type ของเชื้อแต่ละตัวว่ามีความ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ใกล้เคียงหรือแตกต่างกันมากเพียงใด หากเชื้อมี sequence type ที่ใกล้เคียงกันจะบ่งชี้ว่าเชื้อเหล่านั้นอาจมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน (78)

8.2 เทคนิคการวิเคราะห์ MLST ของเชื้อแบคทีเรีย

เทคนิค MLST ถูกนำมาใช้วิเคราะห์จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1998 เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน มีความน่าเชื่อถือ และสามารถวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (79) ประกอบกับค่าใช้จ่ายในการทำ sequencing ที่มีราคาถูกลง และการพัฒนาระบบฐานข้อมูลโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลในอินเตอร์เนท ทำให้เทคนิค MLST ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค รวมไปถึงการศึกษาวิวัฒนาการและกลไกการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์

เมื่อไม่นานมานี้ เทคนิค MLST ได้ถูกนำมาวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพที่ปนเปื้อนมากับเนื้อไก่ที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาเก็ตในกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย พบว่าเนื้อไก่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella enterica* ประมาณ 18.7% เมื่อนำเชื้อมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLST พบว่า allelic profile ของยีน 7 ยีน ประกอบไปด้วย ยีน *thr*A ยีน *pur*E ยีน *suc*A ยีน *aro*C ยีน *his*D ยีน *hem*D และยีน *dna*N มี alleic number เป็นหมายเลข 141, 95, 9, 417, 262, 15 และ 4 ตามลำดับ และมี sequence type เป็น ST1543 (80) การศึกษาในประเทศเยอรมันได้สันนิ-ฐานถึงการแพร่กระจายเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากสัตว์ในฟาร์มสู่คน โดยมีหลักฐานการพบเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวที่มี sequence type แหล่งทั้งสอง (7)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี วัสดุทางวิทยาศาสตร์และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

สารเคมี วัสดุทางวิทยาศาสตร์และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย

สารเคมีและวัสดุทางวิทยาศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ Macconkey agar No.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร และจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ซื้อจากบริษัท Greiner bio-one จำกัด ประเทศไทย

อาหารเลี้ยงเชื้อและแผ่นยาสำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) แผ่นยา cefotaxime แผ่นยา cefotaxime/clavulanic acid แผ่นยา ceftazidime และแผ่นยา ceftazidime/clavulanic acid ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร

สารเคมีและวัสดุทางวิทยาศาสตรสำหรับใช้ในการเพิ่มสารพันธุกรรม เทคนิค multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) และ เทคนิค multilocus sequence typing (MLST) ประกอบด้วยดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) และเอนไซม์ *Taq* polymerase ผลิตภัณฑ์ของบริษัท New England Biolabs จำกัด สหรัฐอเมริกา ไพรเมอร์สั่งจากบริษัท Bioneer จำกัด สาธารณรัฐเกาหลี หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และหลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา

สารเคมีและน้ำยาสำหรับใช้ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ประกอบด้วย วุ้น agarose ผลิตภัณฑ์ของบริษัท 1st Base จำกัด ประเทศสิงคโปร์ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Qiagen จำกัด สหรัฐอเมริกา สีย้อม Diamond™

Nucleic Acid Dye ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Promega จำกัด สหรัฐอเมริกา และ TBE buffer ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Life technologies จำกัด สหรัฐอเมริกา

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC 137 สำหรับใช้เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 สำหรับใช้เป็นตัวควบคุมลบ ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์นายแพทย์เมธี ชยะกุลคีรี หัวหน้าห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

2. เครื่องมือ

กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) บริษัท MS major sciences จำกัด ประเทศไต้หวัน เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Biospectrophotometer) บริษัท Eppendorf จำกัด ประเทศเยอรมนี เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Micro high speed refrigerate centrifuge) บริษัท Eppendorf จำกัด ประเทศเยอรมนี เครื่อง Thermo cycler บริษัท Biorad จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิส (Gel electrophoresis) บริษัท MS major sciences จำกัด ประเทศไต้หวัน เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากบริษัท SynGene จำกัด สหรัฐอเมริกา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. การออกแบบงานวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้แบ่งการทดสอบออกเป็นทั้งหมด 3 ส่วน ประกอบด้วย

3.1 การวินิจฉัยเชื้อและทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธีทางฟีโนไทป์ เพื่อจำแนกวินิจฉัยเชื้อ *E. coli* ด้วยปฏิกิริยาชีวเคมี และวินิจฉัยความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อด้วยการทดสอบ disk diffusion และเพื่อยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี combination disk ตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (62) โดยทำการทดสอบกับแผ่นยา 2 คู่ คือ แผ่นยา cefotaxime กับแผ่นยา cefotaxime/clavulanic acid และแผ่นยา ceftazidime กับแผ่นยา ceftazidime/clavulanic acid

3.2 การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) และเทคนิค whole genome sequencing (WGS)

เพื่อวิเคราะห์หายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่สำคัญและพบได้บ่อยได้แก่ ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยนำเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดที่ให้ผลบวกกับการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disk มาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหายีนดังกล่าว ในขณะที่สุ่มเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL บางสายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดของ inhibition zone ต่อการทดสอบความไวของยา colistin น้อยกว่า 12 มิลลิเมตร ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS จากนั้นเปรียบเทียบความชุกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรและสุกร

3.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multilocus sequence typing (MLST)

เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL และดื้อยาต้านจุลชีพระหว่างสุกรในฟาร์มและประชากร ด้วยเทคนิค MLST โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม house-keeping gene ทั้ง 7 ยีน ซึ่งประกอบไปด้วย ยีน *adk* ยีน *fum*C ยีน *gyr*B ยีน *icd* ยีน *mdh*ยีน *pur*A และยีน *rec*A ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตรวจสอบลำดับเบสแต่ละยีน เพื่อหา sequence type และสร้างแผนภาพ phylogenetic tree สำหรับการวิเคราะห์หาความใกล้เคียงและความเชื่อมโยงของของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แพร่กระจายในชุมชนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

4. วิธีการทดลอง

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาของโครงการวิจัยที่ผ่านมาของ Thamlikitkul et al. (9, 81) ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างและวินิจฉัยเชื้อในโครงการวิจัยที่ผ่านมาตามรายละเอียดต่อไปนี้

4.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด จำนวน 409 ตัวอย่าง เก็บได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ซึ่งถูกเก็บในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 แบ่งเป็นตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้จากสุกรในฟาร์มและตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้จากประชากรในชุมชนจากอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน จำนวน 186 และ 223 ตัวอย่างตามลำดับ ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดถูกเก็บด้วย rectal swab และเก็บรักษาใน cary-blair medium ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำส่งมายังห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ภายใน 24 ชั่วโมง หลังการเก็บตัวอย่าง ตัวอย่างอุจจาระที่ส่งมาถึงห้องปฏิบัติการจะถูกนำมาวินิจฉัยจำแนกเชื้อทันทีตามรายละเอียดในข้อต่อไป

4.1.2 การวินิจฉัยจำแนกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างอุจจาระที่อยู่ใน cary-blair medium ทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงเชื้อบน MacConkey agar ที่ผสมยา ceftriaxone ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีของเชื้อมาทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ประกอบไปด้วย oxidase tese, triple sugar iron (TSI), lysine iron agar (LIA), motility medium, simmons citrate medium, urea agar และ indole test โดยใช้เกณฑ์การอ่านปฏิกิริยาตามตารางที่ 3 เชื้อที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *E. coli* ทั้งหมดจะถูกเก็บใน typtic soy broth ที่ผสมกับ 10% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *E. coli*

ชนิดการทดสอบชีวเคมี	ผลปฏิกิริยา
oxidase test	ลบ
triple sugar iron (TSI)	A/A(G) หรือ K/A(G)
lysine deaminase	ลบ
lysine decarboxylase	บวก
motility medium	บวก หรือ ลบ
simmons citrate medium	ลบ
urea agar	ลบ
indole test	บวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.1.3 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

นำเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดที่จำแนกได้จากข้อ 4.1.2 มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (65) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อบน blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% และปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ป้ายเชื้อลงบน Mueller Hinton agar วางแผ่นยา ampicillin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม แผ่นยา amoxicillin/clavulanic acid ความเข้มข้น 20/10 ไมโครกรัม แผ่นยา ceftriaxone ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม แผ่นยา cefotaxime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม แผ่นยา ceftazidime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม แผ่นยา cefoxitin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม แผ่นยา imipenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม แผ่นยา ertapenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม แผ่น

ยา meropenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม แผ่นยา ciprofloxacin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม แผ่นยา gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม แผ่นยา amikacin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม และแผ่นยา trimethoprim/sulfamethoxazole ความเข้มข้น 1.25/23.75 ไมโครกรัม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดขนาดของ inhibition zone แปลผลตามมาตรฐานที่ CLSI ปี 2016 กำหนด โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม

4.2 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disk

นำเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดที่จำแนกได้จากข้อ 4.1.2 มาตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค combination disk โดยเพาะเลี้ยงเชื้อบน MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในน้ำเกลือและปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ป้ายเชื้อลงบน Mueller Hinton agar จากนั้นวางแผ่นยา cefotaxime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับแผ่นยา cefotaxime/clavulanic acid ความเข้มข้น 30/10 ไมโครกรัม และแผ่นยา ceftazidime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับแผ่นยา ceftazidime/clavulanic acid ความเข้มข้น 30/10 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดขนาดของ inhibition zone และแปลผลตามมาตรฐานที่ CLSI ปี 2016 โดยหากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของแผ่นยาที่มียา clavulanic มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นยาที่ไม่มียา clavulanic มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แปลผลว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL ใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นเชื้อมาตรฐานควบคุมคุณภาพการทดสอบ เชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกในการสร้างเอนไซม์ ESBL จะถูกนำมาศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป

4.3 การตรวจหายีน *bla*$_{\text{CTX-M}}$ ยีน *bla*$_{\text{TEM}}$ และยีน *bla*$_{\text{SHV}}$ ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR)

นำเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งหมดจากวิธี combination disk มาทำการวิเคราะห์หายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่สำคัญและพบได้บ่อยได้แก่ ยีน *bla*$_{\text{CTX-M}}$ ยีน *bla*$_{\text{TEM}}$ และยีน *bla*$_{\text{SHV}}$ ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นตัวควบคุมลบ และเชื้อ *E. coli* รหัส EC137 ที่ได้รับการยืนยันว่ามียีน *bla*$_{\text{CTX-M}}$ ยีน *bla*$_{\text{TEM}}$ และยีน *bla*$_{\text{SHV}}$ จากการทำ whole genome sequencing (WGS) และได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์นายแพทย์เมธี ชยะกุลคีรี หัวหน้าห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เป็นตัวควบคุมบวก

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli*

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL บน MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีของเชื้อมาเจือจางใน tryptic soy broth ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 35องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 200 ไมโครลิตร เจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 800 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บส่วนน้ำใสซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอมาวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ ด้วยเครื่อง BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, USA) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในลำดับถัดไป

4.3.2 การออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV}

primer ที่ใช้ในวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อเป้าหมายต่างๆ ได้แก่ ยีน *usp*A ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control) โดยอ้างอิงมาจากการวิจัยของ Chen et al. (82) ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในวงศ์ CTX-M วงศ์ TEM และวงศ์ SHV ตามลำดับโดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Monstein et al. (83) รายละเอียดของ primer ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ในการวิจัยครั้งนี้

ชื่อยีน	ชื่อ primer	ลำดับเบส (5’-3’)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	ที่มา
*usp*A	uspA-up uspA-down	CCGATACGCTGCCAATCAGT ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	884	(82)
$bla_{CTX\text{-}M}$	CTX-M-U1 CTX-M-U2	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593	(83)
bla_{TEM}	TEM-164.SE TEM-165.AS	TCGCCGCATA CACTATTCTCAGAATGA ACGCTCACCGGCTCCAGATT TAT	455	(83)
bla_{SHV}	SHV.SE SHV.AS	ATGCGTTATATTCGCCTGTG TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	747	(83)

4.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค multiplex PCR

ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 60 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตรประกอบไปด้วย forward primer และ reverse primer ปริมาณอย่างละ 10 พิโคโมล dNTPs ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล standard buffer *Taq* reaction ความเข้มข้น 1 เท่า magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.5 ยูนิต โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 เป็นหลอดควบคุมลบ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* รหัส EC137 เป็นหลอดควบคุมบวก และใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *usp*A เป็นตัวควบคุมภายใน ปฏิกิริยา multiplex PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังต่อไปนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เวลา 2 นาทีจำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.3.4 การตรวจสอบผลผลิต multiplex PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยการนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา multiplex PCR ในแต่ละตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ Diamond™ Nucleic Acid Dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปเคลื่อนผ่านบนกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้วุ้น agarose ที่มีความเข้มข้น 1% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องบันทึกภาพวุ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

4.4 การตรวจหายีน *bla*$_{CTX-M}$ ยีน *bla*$_{TEM}$ และยีน *bla*$_{SHV}$ ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค whole genome sequencing (WGS)

เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ได้ถูกนำไปใช้ในงานวิจัยอื่นด้วย ซึ่งได้มีการสุ่มเชื้อดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 42 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร จำนวน 15 สายพันธุ์ และแยกได้จากประชากร จำนวน 27 สายพันธุ์ โดยใช้เกณฑ์ในการสุ่มคัดเลือกเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผล inhibition zone ต่อยา colistin ที่ต่ำกว่า 12 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค disk diffusion ในงานวิจัยดังกล่าวได้นำดีเอ็นเอของเชื้อที่สุ่มมาทั้งหมดไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS และแปลผลการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) สหรัฐอเมริกา ผู้วิจัยจึงได้นำผลการตรวจหายีน *bla*$_{CTX-M}$ ยีน *bla*$_{TEM}$ และยีน *bla*$_{SHV}$ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS มาใช้ประกอบการศึกษาในครั้งนี้

4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multilocus sequence typing (MLST)

เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งหมด 212 สายพันธุ์ ถูกนำมาเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ และหาความเชื่อมโยงของการแพร่กระจายเชื้อระหว่างสุกรในฟาร์มและ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประชากรในชุมชนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ด้วยเทคนิค MLST โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้ในข้อ 4.3.1 และมีขั้นตอนตามรายละเอียดด้านล่าง

4.5.1 การออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อ house-keeping gene ของเชื้อ *E. coli*

primer ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค MLST ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ house-keeping gene ทั้ง 7 ยีน ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *adk* ยีน *fum*C ยีน *gyr*B ยีน *icd* ยีน *mdh* ยีน *pur*A และยีน *rec*A โดยอ้างอิงมาจากฐานข้อมูล MLST (https://pubmlst.org/databases.shtml) (84) รายละเอียดของ primer ที่จำเพาะต่อ house-keeping gene ที่ใช้ในการวิเคราะห์ MLST ของเชื้อ *E. coli* แสดงในตารางที่ 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 5 รายละเอียดของ primer ที่จำเพาะต่อ house-keeping gene ที่ใช้ในการวิเคราะห์ MLST ของเชื้อ *E. coli* ในการวิจัยครั้งนี้ (84)

ชื่อยีน	ชื่อ primer	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
adk	adkF adkR	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	853
*fum*C	fumCF fumCR	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806
*gyr*B	gyrBF gyrBR	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	911
icd	icdF icdR	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878
mdh	mdhF mdhR	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	932
*pur*A	purAF purAR	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816
*rec*A	recAF recAR	CGCATTCGCTTTACCCTGACC TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	780

4.5.2 การเพิ่มปริมาณ house-keeping gene ด้วยเทคนิค PCR

ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ house-keeping gene ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 170 สายพันธุ์ ในขณะที่เชื้อ *E. coli* อีกจำนวน 42 สายพันธุ์ ได้ถูกทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS ดังที่ได้อธิบายในข้อ 4.4 จึงสามารถนำผลลำดับเบสของ house-keeping gene จากการวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้โดยไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบเพิ่มปริมาณ house-keeping gene ด้วยเทคนิค PCR สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม forward primer และ reverse primer ปริมาณอย่างละ 10 พิโคโมล dNTPs ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล standard buffer Taq reaction ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.5 ยูนิต ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังต่อไปนี้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.5.3 การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยการนำผลผลิตที่ได้จากแต่ละปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ Diamond™ Nucleic Acid Dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเคลื่อนผ่านบนกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้วุ้น agarose ที่มีความเข้มข้น 1% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องบันทึกภาพวุ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

4.5.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ house-keeping gene ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ house-keeping gene แต่ละยีนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ โดยเตรียมผลผลิต PCR ของแต่ละยีนให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และให้มีปริมาตรไม่น้อยกว่า 20 ไมโครลิตร พร้อมทั้ง forward primer ของ house-keeping gene แต่ละยีนส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing โดยบริษัท Bioneer sequencing service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.1.3 และ Chromas Lite version 2.1 (Carolina state University, USA) โดยข้อมูลลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับรูปแบบของ allelic profile ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเชื้อ *E.coli* แต่ละสายพันธุ์ในเว็บไซต์ http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli (84) เพื่อระบุ allelic number ของแต่ละยีนในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นฐานข้อมูลจะทำการวิเคราะห์ allelic number ทั้ง 7 ยีน และประมวลผลออกมาเป็น allelic profile ของเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ เพื่อระบุ sequence types (ST) และ clonal complexes (CC) ตามลำดับ

4.5.6 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน และการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นำผลการวิเคราะห์ allelic number ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งหมดจำนวน 212 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชนจากในการศึกษาครั้งนี้ เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสของเชื้อ โดยนำ allelic profile ที่ถูกระบุเป็น sequence types (ST) และ clonal complexes (CC) ทั้งหมดของเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) เพื่อสร้างแผนภาพ phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์หาความใกล้เคียงทางพันธุกรรม ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

4.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ

ประเมินความสัมพันธ์ทางสถิติของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพและการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธีทางจีโนไทป์ระหว่างเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ด้วยวิธี Fisher’s exact test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (IBM SPSS 17.0 statistical package, Chicago, IL)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมดจำนวน 409 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน พื้นที่อำเภอเมืองจังหวัดลำพูน จำนวน 186 และ 223 ตัวอย่างตามลำดับ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อบน MacConkey agar ที่ผสมยา ceftriaxone ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อคัดกรองเฉพาะเชื้อกลุ่มแกรมลบรูปแท่งที่อาจสร้างเอนไซม์ ESBL พบเชื้อที่ขึ้นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 492 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ 254 สายพันธุ์จากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากสุกรจำนวน 186 ตัวอย่าง และเชื้อ 238 สายพันธุ์จากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากประชากรจำนวน 187 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากประชากรจำนวน 36 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการวินิจฉัยจำแนกเชื้อทั้งหมด 492 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีพบว่าสามารถจำแนกเชื้อ *E. coli* ได้ทั้งสิ้นจำนวน 218 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรจำนวน 103 สายพันธุ์ และแยกได้จากประชากรจำนวน 115 สายพันธุ์

2. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

เมื่อนำเชื้อ *E. coli* ที่จำแนกได้จากสุกรและประชากรจำนวนทั้งสิ้น 218 สายพันธุ์ มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion อ่านผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น และแปลผลผลตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (65) โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบ ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรและประชากรดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์ม จำนวน 103 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และแปลผลตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (65)

ชนิดยาต้านจุลชีพ	ผลทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* (103 สายพันธุ์)		
	S	I	R
ยา ampicillin	0	0	103
ยา amoxicillin/clavulanic acid	52	8	43
ยา ceftriaxone	0	0	103
ยา cefotaxime	0	0	103
ยา ceftazidime	3	4	96
ยา cefoxitin	100	0	3
ยา imipenem	103	0	0
ยา ertapenem	103	0	0
ยา meropenem	103	0	0
ยา ciprofloxacin	68	8	27
ยา gentamicin	15	3	85
ยา amikacin	103	0	0
ยา trimethoprim/sulfamethoxazole	39	2	62

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากรในชุมชน จำนวน 115 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และแปลผลตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (65)

ชนิดยาต้านจุลชีพ	ผลทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* (115 สายพันธุ์)		
	S	I	R
ยา ampicillin	0	0	115
ยา amoxicillin/clavulanic acid	98	0	17
ยา ceftriaxone	0	0	115
ยา cefotaxime	0	0	115
ยา ceftazidime	33	23	59
ยา cefoxitin	109	2	4
ยา imipenem	115	0	0
ยา ertapenem	115	0	0
ยา meropenem	115	0	0
ยา ciprofloxacin	50	2	63
ยา gentamicin	68	6	41
ยา amikacin	111	1	3
ยา trimethoprim/sulfamethoxazole	41	2	72

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากร จำนวนทั้งหมด 218 สายพันธุ์ (100 %) ให้ผลการทดสอบที่ดื้อต่อยา ampicillin ยา ceftriaxone และยา cefotaxime อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งหมดดังกล่าวให้ผลการทดสอบที่ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenem ซึ่งประกอบด้วยยา imipenem ยา ertapenem และยา meropenem (ตารางที่ 8)

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกร พบว่ามีสัดส่วนดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่สูงกว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในยา amoxicillin/clavulanic acid (41.74% เปรียบเทียบกับ 14.78%) ยา ceftazidime (93.20% เปรียบเทียบกับ 51.30%) และยา gentamicin (82.52% เปรียบเทียบกับ 36.65%) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรมีสัดส่วนดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่สูงกว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในยา ciprofloxacin (54.78% เปรียบเทียบกับ 26.21%) อย่างไรก็ตามสัดส่วนการดื้อต่อยา cefoxitin ยา amikacin และยา trimethoprim/sulfamethoxazole รวมไปถึงสัดส่วนการเป็นเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน (multidrug-resistant bacteria, MDR bacteria) ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 3 กลุ่มขึ้นไปที่ทำการทดสอบ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดสัดส่วนการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 8 สัดส่วนการดื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

ชนิดยาต้านจุลชีพ	สัดส่วนการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ (%)	
	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร (103 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ประชากร (115 สายพันธุ์)
ยา ampicillin	100.00	100.00
ยา amoxicillin/clavulanic acid[1]	41.74	14.78
ยา ceftriaxone	100.00	100.00
ยา cefotaxime	100.00	100.00
ยา ceftazidime[1]	93.20	51.30
ยา cefoxitin	2.91	3.48
ยา imipenem	0.00	0.00
ยา ertapenem	0.00	0.00
ยา meropenem	0.00	0.00
ยา ciprofloxacin[1]	26.21	54.78
ยา gentamicin[1]	82.52	35.65
ยา amikacin	0.00	2.61
ยา trimethoprim/sulfamethoxazole	60.19	62.61
MDR[2]	85.44	84.35

หมายเหตุ

[1] หมายถึง ชนิดยาต้านจุลชีพที่มีสัดส่วนการดื้อต่อยาของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[2] หมายถึง เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน ซึ่งดื้อต่อยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 3 กลุ่มขึ้นไป

3. ผลการทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค combination disk

เมื่อนำเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรและประชากร จำนวนทั้งสิ้น 218 สายพันธุ์ มาทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค combination disk และแปลผลตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ปี 2016 (65) เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL พิจารณาจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของแผ่นยาที่มียา clavulanic กว้างกว่าแผ่นยาที่ไม่มียา clavulanic มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งสิ้น 212 จาก 218 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์ม จำนวน 101 จาก 103 สายพันธุ์ (คิดเป็น 98.06% ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร) และเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากประชากรในชุมชน จำนวน 111 จาก 115 สายพันธุ์ (คิดเป็น 96.52% ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากร)

4. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL

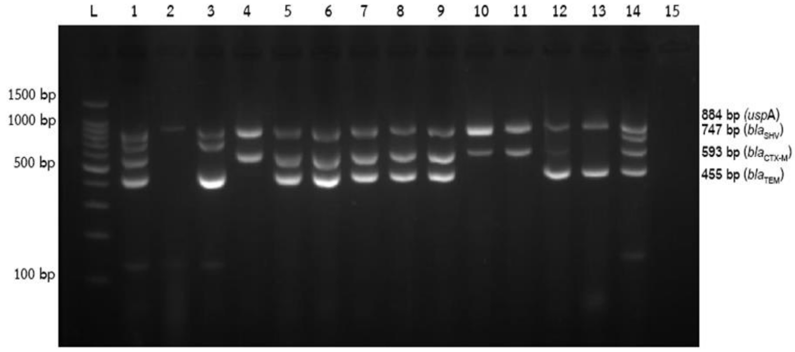
เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งหมด 212 สายพันธุ์ เชื้อ *E. coli* รหัส EC137 ที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวกและเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ใช้เป็นตัวควบคุมลบ ที่ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้มตามขั้นตอนที่อธิบายในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.3.1 ถูกนำมาวัดหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วงระหว่าง 211.8 ถึง 549.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยของดีเอ็นเอเท่ากับ 326.10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอซึ่งวัดจากอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 อยู่ในช่วงระหว่าง 1.58 ถึง 1.91 ดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดมีปริมาณและความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับใช้ในการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. การตรวจหายีน *bla*$_{\text{CTX-M}}$ ยีน *bla*$_{\text{TEM}}$ และยีน *bla*$_{\text{SHV}}$ ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multiplex PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งหมด 212 สายพันธุ์ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* รหัส EC137 :สำหรับควบคุมผลบวก ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และน้ำกลั่นสำหรับควบคุมผลลบ ถูกมาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *bla*$_{\text{CTX-M}}$ ยีน *bla*$_{\text{SHV}}$ และยีน *bla*$_{\text{TEM}}$ ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ยีน *usp*A เป็นยีนควบคุมภายในหลอดทดลอง ร่วมกับไพรเมอร์และปฏิกิริยา multiplex PCR ดังที่อธิบายในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.3.2 และข้อ 4.3.3 นำผลผลิตของปฏิกิริยา multiplex PCR มาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis บนวุ้น agarose ที่มีความเข้มข้น 1% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายของ 1% agarose gel electrophoresis ที่ใช้ตรวจสอบผลผลิต multiplex PCR แถวที่ 1 คือแถวของเชื้อ *E. coli* รหัส EC137 ที่เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบดีเอ็นเอของยีน *usp*A มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส แถบดีเอ็นเอของยีน *bla*$_{CTX\text{-}M}$ มี ขนาดเท่ากับ 593 คู่เบส แถบดีเอ็นเอของยีน *bla*$_{\text{TEM}}$ มีขนาดเท่ากับ 455 คู่เบส และ แถบดีเอ็นเอของยีน *bla*$_{\text{SHV}}$ มีขนาดเท่ากับ 747 คู่เบส แถวที่ 2 คือแถวของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่เป็นตัวควบคุมลบ พบเพียงแถบดีเอ็นเอของยีน *usp*A มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส แถวที่ 15 คือแถวของน้ำกลั่นไม่พบแถบของดีเอ็นเอ ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรและประชากร (แถวที่ 3 ถึง 14) พบแถบดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่แตกต่างกันออกไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 8 การตรวจสอบผลผลิต multiplex PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} บน 1% agarose gel electrophoresis

L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือตัวควบคุมบวก (เชื้อ *E. coli* รหัส EC137) แถวที่ 2 คือตัวควบคุมลบ (เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922) แถวที่ 3 ถึง 14 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรและประชากร แถวที่ 15 คือตัวควบคุมลบ (น้ำกลั่น)

เทคนิค multiplex PCR สามารถตรวจหายีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรและประชากรจำนวนทั้งสิ้น 212 สายพันธุ์ ตารางที่ 9 สรุปจำนวนและรูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนที่แตกต่างกันออกไป โดยตรวจพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ เป็นจำนวนมากที่สุด ในเชื้อจำนวน 203 สายพันธุ์ (95.75%) รองลงได้แก่ยีน bla_{TEM} จำนวน 133 สายพันธุ์ (62.73%) และยีน bla_{SHV} จำนวน 5 สายพันธุ์ (2.40%) รูปแบบของยีนที่พบบนเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 212 สายพันธุ์ พบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ควบคู่กับยีน bla_{TEM} จำนวน 120 สายพันธุ์ (56.60%) รองลงมาคือพบเพียงยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ เท่านั้น จำนวน 78 สายพันธุ์ (36.79%) พบเพียงยีน bla_{TEM} เท่านั้นจำนวน 9 สายพันธุ์ (4.25%) พบทั้ง 3 ยีนจำนวน 4 สายพันธุ์ (1.89%) และพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ควบคู่กับยีน bla_{SHV} จำนวน 1 สายพันธุ์ (0.47%)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อพิจารณาจำนวนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรจำนวน 101 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL อย่างน้อย 1 ยีน ประกอบด้วยยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ เป็นจำนวนมากที่สุด จำนวน 96 สายพันธุ์ (95.05%) รองลงมาคือยีน bla_{TEM} จำนวน 69 สายพันธุ์ (68.32%) และยีน bla_{SHV} จำนวน 1 สายพันธุ์ (0.99%) โดยรูปแบบของยีนที่พบบนเชื้อ *E. coli* กลุ่มดังกล่าว พบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ควบคู่กับยีน bla_{TEM} จำนวน 63 สายพันธุ์ (62.37%) รองลงมาคือพบเพียงยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ เท่านั้น จำนวน 32 สายพันธุ์ (31.68%) พบ

เพียงยีน *bla*$_{TEM}$ เท่านั้น จำนวน 5 สายพันธุ์ (4.95%) พบทั้ง 3 ยีนพร้อมกันจำนวน 1 สายพันธุ์ (0.99%)

เมื่อพิจารณาจำนวนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากร จำนวน 111 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL อย่างน้อย 1 ยีน ประกอบด้วยยีน *bla*$_{CTX-M}$ เป็นจำนวนมากที่สุด จำนวน 107 สายพันธุ์ (96.39%) รองลงมาคือยีน *bla*$_{TEM}$ จำนวน 64 สายพันธุ์ (57.66%) และยีน *bla*$_{SHV}$ จำนวน 4 สายพันธุ์ (3.60%) โดยรูปแบบของยีนที่พบบนเชื้อ *E. coli* กลุ่มดังกล่าว พบยีน *bla*$_{CTX-M}$ ควบคู่กับยีน *bla*$_{TEM}$ จำนวน 57 สายพันธุ์ (51.35%) รองลงมาคือพบเพียงยีน *bla*$_{CTX-M}$ เท่านั้น จำนวน 46 สายพันธุ์ (41.44%) พบเพียงยีน *bla*$_{TEM}$ เท่านั้นจำนวน 4 สายพันธุ์ (3.60%) พบทั้ง 3 ยีนจำนวน 3 สายพันธุ์ (2.70%) และพบยีน *bla*$_{CTX-M}$ ควบคู่กับยีน *bla*$_{SHV}$ จำนวน 1 สายพันธุ์ (0.90%) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 9 จำนวนและรูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

ยีน	จำนวนสายพันธุ์ที่พบยีนที่สร้างเอนไซม์ ESBL		
	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร 101 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 101 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากร 111 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 111 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรและประชากร รวม 212 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 212 สายพันธุ์)
$bla_{CTX\text{-}M}$	32 (31.68%)	46 (41.44%)	78 (36.79%)
$bla_{CTX\text{-}M}$+bla_{SHV}	0 (0%)	1 (0.90%)	1 (0.47%)
$bla_{CTX\text{-}M}$+bla_{TEM}	63 (62.38%)	57 (51.35%)	120 (56.60%)
$bla_{CTX\text{-}M}$+bla_{TEM}+bla_{SHV}	1 (0.99%)	3 (2.70%)	4 (1.89%)
bla_{TEM}	5 (4.95%)	4 (3.60%)	9 (4.25%)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ยีน bla_{TEM} และ ยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค whole genome sequencing (WGS)

ภายหลังวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่ถูกสุ่มจำนวนทั้งสิ้น 42 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร จำนวน 15 สายพันธุ์ และแยกได้จากประชากร จำนวน 27 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์การทดสอบและวิเคราะห์ผลจากห้องปฏิบัติการ Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) สหรัฐอเมริกา พบว่าผลการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค WGS ให้ผลสอดคล้องกับผลที่ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในเชื้อ *E. coli* ทั้ง 42 สายพันธุ์ นอกจากนั้นผลการหาลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS ยังสามารถระบุ subgroup ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ ดังรายละเอียดดังนี้

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่พบเพียงยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ จำนวน 27 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร 13 สายพันธุ์ และแยกได้จากประชากร 14 สายพันธุ์ พบยีน $bla_{\text{CTX-M-55}}$ จำนวน 19 สายพันธุ์ (จากสุกร 10 สายพันธุ์ และจากประชากร 9 สายพันธุ์) และพบยีน $bla_{\text{CTX-M-14}}$ จำนวน 8 สายพันธุ์ (จากสุกร 3 สายพันธุ์ และจากประชากร 5 สายพันธุ์)

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่พบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ คู่กับยีน bla_{TEM} จำนวน 14 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร 2 สายพันธุ์ และแยกได้จากประชากร 12 สายพันธุ์ พบยีน $bla_{\text{CTX-M-55}}$ คู่กับยีน $bla_{\text{TEM1-B}}$ จำนวน 4 สายพันธุ์ (จากประชากร 4 สายพันธุ์) และพบยีน $bla_{\text{CTX-M-14}}$ คู่กับยีน $bla_{\text{TEM-1B}}$ จำนวน 10 สายพันธุ์ (จากสุกร 2 สายพันธุ์ และจากประชากร 8 สายพันธุ์) อย่างไรก็ตามเชื้อ *E. coli* ที่พบเพียงยีน bla_{TEM} มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นยีน $bla_{\text{TEM1-B}}$ เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร ตารางแสดงที่ 10 เป็นตารางสรุปเปรียบเทียบผลการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ระหว่างเทคนิค multiplex PCR และเทคนิค WGS

ตารางที่ 10 ผลการเปรียบเทียบการตรวจหายีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ระหว่างเทคนิค multiplex PCR เทคนิค WGS ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่ถูกสุ่มนำไปวิเคราะห์ จำนวนทั้งสิ้น 42 สายพันธุ์

การวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multiplex PCR			การวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค WGS			เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร (15 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากร (27 สายพันธุ์)	รวม (42 สายพันธุ์)
SHV	TEM	CTX-M						
		+			CTX-M-14	3	5	8
		+			CTX-M-55	10	9	19
	+	+		TEM-1B	CTX-M-14	2	8	10
	+	+		TEM-1B	CTX-M-55	-	4	4
	+			TEM-1B		-	1	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค multilocus sequence typing (MLST)

ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งหมด 170 สายพันธุ์ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณ house-keeping gene ด้วยเทคนิค PCR ดังที่อธิบายใน บทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.5.2 ผลผลิตที่ได้ภายหลังปฏิกิริยาถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสของ house-keeping gene แต่ละยีนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ข้อมูลลำดับเบสที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบรูปแบบของ allelic profile ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเชื้อ *E. coli* ในเว็บไซต์ http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli (84) และประมวลผลเป็น allelic profile ของเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ เพื่อระบุ sequence types (ST) และ clonal complexes (CC) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL อีกจำนวน 42 สายพันธุ์ที่ถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS ได้ถูกระบุ ST และ CC เป็นที่เรียบร้อย โดยห้องปฏิบัติการ Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) สหรัฐอเมริกา

7.1 ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL กับแหล่งที่มาของเชื้อที่แยกได้

รายละเอียดของ sequence types และ clonal complexes ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนรวมทั้งหมด 212 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากร ได้แสดงในตารางที่ 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 11 ตารางเปรียบเทียบ clonal complexes (CC) และ sequence types (ST) ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์

clonal complexes (CC)	sequence types (ST)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร 101 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 101 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาประชากร 111 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 111 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรและประชากร รวม 212 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 212 สายพันธุ์)
ST 10 Complex (48 สายพันธุ์)	ST 10	13 (12.87)	5 (4.50)	18 (8.49)
	ST 218	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 34	5 (4.95)	4 (3.60)	9 (4.25)
	ST 48	11 (10.89)	6 (5.41)	17 (8.02)
	ST 617	-	3 (2.70)	3 (1.42)
ST 131 Complex (24 สายพันธุ์)	ST 131	7 (6.93)	17 (15.32)	24 (11.32)
ST 23 Complex (14 สายพันธุ์)	ST 23	4 (3.96)	4 (3.60)	8 (3.77)
	ST 410	5 (5.95)	1 (0.90)	6 (2.83)
ST 155 Complex (14 สายพันธุ์)	ST 55	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 56	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 58	4 (3.96)	3 (2.70)	7 (2.30)
	ST 155	5 (4.95)	-	5 (2.36)
ST 101 Complex (32 สายพันธุ์)	ST 101	1 (0.99)	8 (7.21)	9 (4.25)
	ST 70	1 (0.99)	6 (5.41)	7 (3.30)
	ST 224	5 (4.95)	1 (0.90)	6 (2.83)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 11 (ต่อ) ตารางเปรียบเทียบ clonal complexes (CC) และ sequence types (ST) ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์

clonal complexes (CC)	sequence types (ST)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร 101 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 101 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาประชากร 111 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 111 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรและประชากร รวม 212 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 212 สายพันธุ์)
	ST 117	1 (0.99)	4 (3.60)	5 (2.36)
	ST 125	1 (0.99)	4 (3.60)	5 (2.36)
ST 38 Complex (12 สายพันธุ์)	ST 38	4 (3.96)	-	4 (1.89)
	ST 871	2 (1.98)	2 (1.80)	4 (1.89)
	ST 685	3 (2.97)	1 (0.90)	4 (1.89)
ST 14 Complex (3 สายพันธุ์)	ST 1193	1 (0.99)	2 (1.80)	3 (1.42)
ST 156 Complex (3 สายพันธุ์)	ST 156	3 (2.97)	-	3 (1.42)
ST 168 Complex (8 สายพันธุ์)	ST 93	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 168	2 (1.98)	-	2 (0.94)
	ST 1602	1 (0.99)	2 (1.80)	3 (1.48)
	ST 160	-	2 (1.80)	2 (0.94)
ST 165 Complex (14 สายพันธุ์)	ST 165	2 (1.98)	-	2 (0.94)
	ST 174	1 (0.99)	1 (0.90)	2 (0.94)
	ST 196	2 (1.98)	-	2 (0.94)
	ST 221	-	2 (1.80)	2 (0.94)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 11 (ต่อ) ตารางเปรียบเทียบ clonal complexes (CC) และ sequence types (ST) ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์

clonal complexes (CC)	sequence types (ST)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร 101 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 101 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาประชากร 111 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 111 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรและประชากร รวม 212 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 212 สายพันธุ์)
	ST 2345	-	2 (1.80)	2 (0.94)
	ST 3054	1 (0.99)	1 (0.90)	2 (0.94)
	ST 3776	-	2 (1.80)	2 (0.94)
ST 46 Complex (12 สายพันธุ์)	ST 46	2 (1.98)	-	2 (0.94)
	ST 64	-	2 (1.80)	2 (0.94)
	ST 746	2 (1.98)	-	2 (0.94)
	ST 7625	-	2 (1.80)	2 (0.94)
	ST 7626	-	2 (1.80)	2 (0.94)
	ST 83	-	2 (1.80)	2 (0.94)
ST 86 Complex (9 สายพันธุ์)	ST 86	1 (0.99)	1 (0.90)	2 (0.94)
	ST 1040	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 1081	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 1084	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 1112	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 1114	-	1 (0.90)	1 (0.47)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 11 (ต่อ) ตารางเปรียบเทียบ clonal complexes (CC) และ sequence types (ST) ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์

clonal complexes (CC)	sequence types (ST)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร 101 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 101 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาประชากร 111 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 111 สายพันธุ์)	เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรและประชากร รวม 212 สายพันธุ์ (% ที่คำนวนได้จาก 212 สายพันธุ์)
	ST 1146	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 132	-	1 (0.90)	1 (0.47)
ST 95 Complex (4 สายพันธุ์)	ST 142	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 164	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 166	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 175	-	1 (0.90)	1 (0.47)
ST 206 Complex (3 สายพันธุ์)	ST 206	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 2165	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 3045	-	1 (0.90)	1 (0.47)
ST 405 Complex (7 สายพันธุ์)	ST 405	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 457	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 4646	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 540	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 5766	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 5873	-	1 (0.90)	1 (0.47)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 11 (ต่อ) ตารางเปรียบเทียบ clonal complexes (CC) และ sequence types (ST) ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์

clonal complexes (CC)	sequence types (ST)	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ประชากร	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้สุกรและประชากร
	ST 60	-	1 (0.90)	1 (0.47)
ST 648 Complex (5 สายพันธุ์)	ST 648	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 671	-	1 (0.90)	1 (0.47)
	ST 7463	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 767	1 (0.99)	-	1 (0.47)
	ST 877	-	1 (0.90)	1 (0.47)

เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งหมด 212 สายพันธุ์ถูกระบุ sequence types ได้เป็นจำนวน 66 ST โดย sequence types ที่พบได้บ่อย 5 อันดับแรกประกอบด้วย ST 131 จำนวน 24 สายพันธุ์ (11.32%) ST 10 จำนวน 18 สายพันธุ์ (8.49%) ST 48 จำนวน 17 สายพันธุ์ (8.02%) ST 101 จำนวน 9 สายพันธุ์ (4.25%) และ ST 34 จำนวน 9 สายพันธุ์ (4.25%) หากแยกตามแหล่งที่มาของเชื้อพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้อุจจาระของสุกรจำนวน 101 สายพันธุ์ถูกระบุ sequence types จำนวน 38 ST โดย sequence types ที่พบได้บ่อยที่สุด คือ ST 10 จำนวน 13 สายพันธุ์ (12.87%) รองลงมาคือ ST 48 จำนวน 11 สายพันธุ์ (10.89%) และ ST 131 จำนวน 7 สายพันธุ์ (6.93%) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้อุจจาระของประชากรจำนวน 111 สายพันธุ์ ถูกระบุ sequence types จำนวน 47 ST โดย sequence types ที่พบได้บ่อยที่สุด คือ ST 131 จำนวน 17 สายพันธุ์ (15.32%) รองลงมาคือ ST 101 จำนวน 8 สายพันธุ์ (7.21%) ST 70 จำนวน 6 สายพันธุ์ (5.41%) และ ST 48 จำนวน 6 สายพันธุ์ (5.41%)

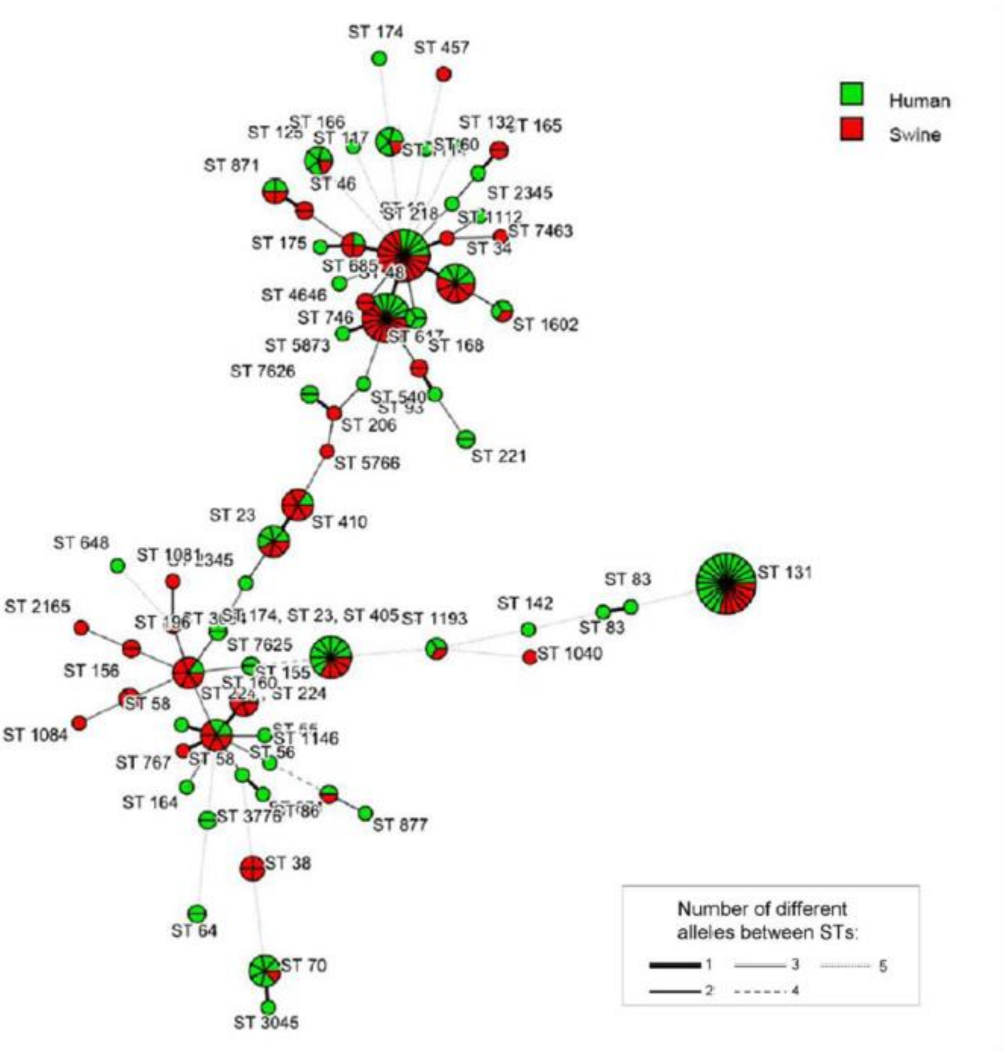
อย่างไรก็ตาม sequence types ทั้งหมด 66 ST มีเพียง 25 ST (จำนวน 132 สายพันธุ์) ที่ถูกจัดเป็น clonal complexes (CC) จำนวน 16 CC โดย clonal complexes ที่พบได้บ่อย 5 อันดับแรกประกอบด้วย CC 10 จำนวน 48 สายพันธุ์ (22.64%) CC 131 จำนวน 24 สายพันธุ์ (11.32%)

CC 23 จำนวน 14 สายพันธุ์ (6.60%) CC 155 จำนวน 14 สายพันธุ์ (6.60%) และ CC 101 จำนวน 9 สายพันธุ์ (4.25%)

พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรที่มี sequence types เดียวกัน มีจำนวนทั้งสิ้น 141 สายพันธุ์ (66.51%) และถูกจัดอยู่ใน19 ST (10 CC) ได้แก่ ST 10 ST34 และ ST48 ซึ่งอยู่ใน CC 10, ST 131 ซึ่งอยู่ใน CC131, ST 23 และ ST 410 ซึ่งอยู่ใน CC 23, ST 58 ซึ่งอยู่ใน CC 155, ST 101, ST 70, ST 224, ST 117 และ ST 125 ซึ่งอยู่ใน CC 101, ST871 และ ST 685 ซึ่งอยู่ใน CC38, ST 1193 ซึ่งอยู่ใน CC 14, ST 1602 ซึ่งอยู่ใน CC 168, ST 174 และ ST 2054 ซึ่งอยู่ใน CC165 และ ST 86 ซึ่งอยู่ใน CC 86

ทั้งนี้พบว่า sequence types ที่ถูกระบุในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรจำนวนทั้งหมด 38 ST มีจำนวน 19 ST ที่ไม่พบในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากร ตัวอย่างเช่น ST 38, ST 58, ST206, ST 457 และ ST 1084 เป็นต้น ในขณะที่ sequence types ที่ถูกระบุในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรจำนวน 47 ST มีจำนวน 28 ST ที่ไม่พบในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกร ตัวอย่างเช่น ST 64, ST 117, ST 174, ST 221 และ ST 877 เป็นต้น รูปที่ 9 แสดงรายละเอียดแผนภาพ minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์ และแบ่งตามแหล่งที่มาของอุจจาระที่แยกเชื้อได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 9 แผนภาพ minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์ แบ่งตามแหล่งที่มาของอุจจาระที่แยกเชื้อได้ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์

หมายเหตุ

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 1 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 2 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 3 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 4 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 5 allele

7.2 ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL กับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL

การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ใน เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์มจำนวนทั้งสิ้น 101 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็น 38 ST (ตารางที่ 12) พบว่าเชื้อในแต่ละ sequence types สามารถพบยีนที่ควบคุมการสร้าง ESBL ได้ตั้งแต่ 1 ยีนขึ้นไป โดยพบยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} จำนวนมากที่สุด ในเชื้อจำนวน 32 ST รองลงมาคือยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ในเชื้อจำนวน 21 ST ยีน bla_{TEM} ในเชื้อจำนวน 4 ST และยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ในเชื้อจำนวน 1 ST

เมื่อพิจารณาจาก sequence types ของ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรที่พบได้บ่อยสุดสามอันดับแรก ได้แก่ ST 10 ST 48 และ ST 131 ตามลำดับ พบว่า ST 10 (13 สายพันธุ์) มียีน $bla_{CTX\text{-}M}$ 6 สายพันธุ์ ยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} 5 สายพันธุ์ และยีน bla_{TEM} 1 สายพันธุ์ ST 48 (11 สายพันธุ์) มียีน $bla_{CTX\text{-}M}$ 1 สายพันธุ์ ยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} 8 สายพันธุ์ ยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} 1 สายพันธุ์ และยีน bla_{TEM} 1 สายพันธุ์ ST 131 (7 สายพันธุ์) มียีน $bla_{CTX\text{-}M}$ 3 สายพันธุ์ และยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} 4 สายพันธุ์

ในขณะที่ sequence types ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่พบจำเฉพาะในสุกรเท่านั้น จำนวน 19 ST อาทิเช่น ST 38, ST 58, ST 206, ST 457 และ ST 1084 เป็นต้น พบยีนที่ควบคุมการสร้าง ESBL ส่วนใหญ่ ได้แก่ ยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ หรือยีน $bla_{CTX\text{-}M}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} ดังแสดงรายละเอียดในแผนภาพ minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งที่แยกได้จากสุกร จำนวน 101 สายพันธุ์ (รูปที่ 10) โดยแบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์

ตารางที่ 12 การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์ม จำนวน 101 สายพันธุ์

CC	ST	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบ	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร
ST 10 Complex	ST 10	TEM	2
		CTX-M	6
		CTX-M, TEM	5
	ST 218	CTX-M, TEM	1
	ST 34	CTX-M, TEM	5
	ST 48	CTX-M	1
		CTX-M, TEM, SHV	1
		TEM	1
		CTX-M, TEM	8
ST 101 Complex	ST 101	CTX-M, TEM	1
ST 131 Complex	ST 131	CTX-M	3
		CTX-M, TEM	4
ST 14 Complex	ST 1193	CTX-M, TEM	1
ST 155 Complex	ST 155	CTX-M, TEM	4
		CTX-M	1
	ST 58	TEM	1
		CTX-M, TEM	2
		CTX-M	1
ST 156 Complex	ST 156	CTX-M, TEM	1
		CTX-M	2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 12 (ต่อ) การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์ม จำนวน 101 สายพันธุ์

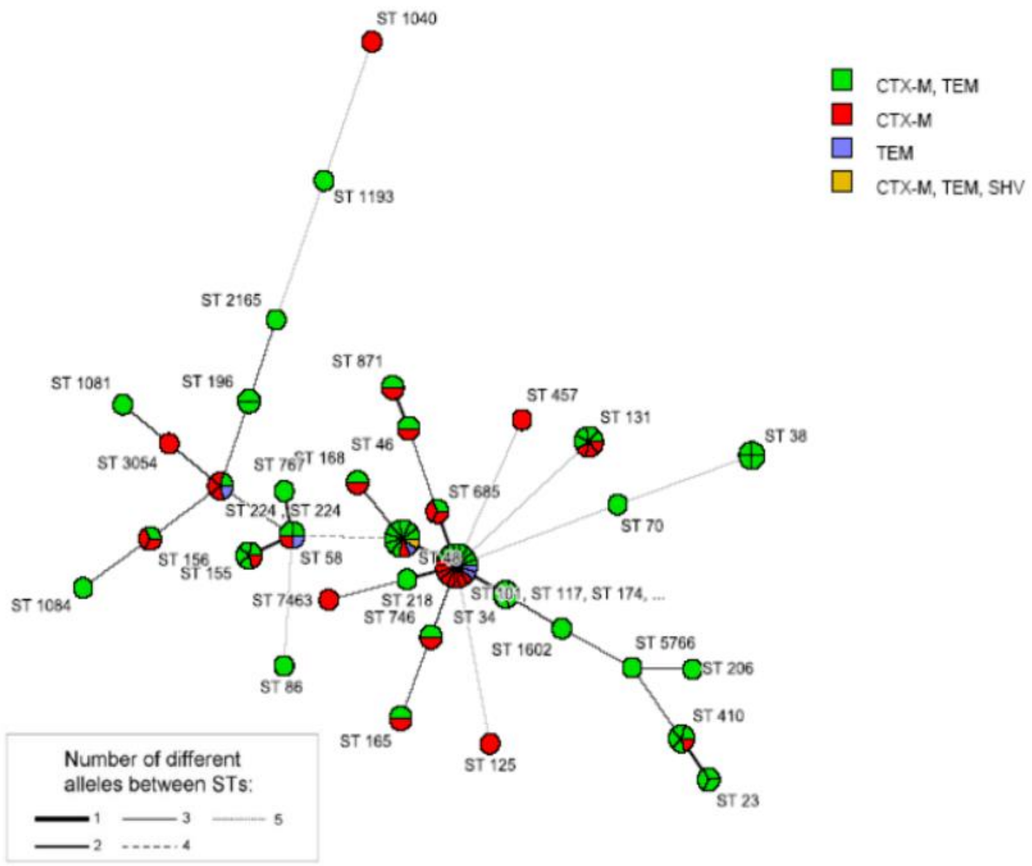
CC	ST	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบ	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร
ST 165 Complex	ST 165	CTX-M, TEM	1
		CTX-M	1
ST 168 Complex	ST 168	CTX-M	1
		CTX-M, TEM	1
ST 206 Complex	ST 206	CTX-M, TEM	1
ST 23 Complex	ST 23	CTX-M, TEM	3
		CTX-M	1
	ST 410	CTX-M	1
		CTX-M, TEM	4
ST 38 Complex	ST 38	CTX-M, TEM	4
ST 405 Complex	ST 405	CTX-M, TEM	1
ST 46 Complex	ST 46	CTX-M, TEM	1
		CTX-M	1
ST 86 Complex	ST 86	CTX-M, TEM	1
	ST 1040	CTX-M	1
	ST 1081	CTX-M, TEM	1
	ST 1084	CTX-M, TEM	1
	ST 117	CTX-M	1
	ST 125	CTX-M	1
	ST 1602	CTX-M, TEM	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 12 (ต่อ) การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรในฟาร์ม จำนวน 101 สายพันธุ์

CC	ST	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบ	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร
	ST 174	CTX-M, TEM	1
	ST 196	CTX-M, TEM	2
	ST 2165	CTX-M, TEM	1
	ST 224	TEM	1
		CTX-M, TEM	1
		CTX-M	3
	ST 3054	CTX-M	1
	ST 457	CTX-M	1
	ST 5766	CTX-M, TEM	1
	ST 685	CTX-M	2
		CTX-M, TEM	1
	ST 70	CTX-M, TEM	1
	ST 746	CTX-M	1
		CTX-M, TEM	1
	ST 7463	CTX-M	1
	ST 767	CTX-M, TEM	1
	ST 871	CTX-M, TEM	1
		CTX-M	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 10 แผนภาพ Minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์ม จำนวน 101 สายพันธุ์ แบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 1 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 2 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 3 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 4 allele

แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 5 allele

การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ใน เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรในชุมชนจำนวนทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็น 47 ST (ตารางที่ 13) พบว่าเชื้อในแต่ละ sequence types สามารถพบยีนที่ควบคุมการสร้าง ESBL ได้ตั้งแต่ 1 ยีนขึ้นไปโดยพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ จำนวนมากที่สุดในเชื้อจำนวน 29 ST รองลงมาคือยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} ในเชื้อจำนวน 21 ST ยีน bla_{TEM} ในเชื้อจำนวน 3 ST ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ในเชื้อจำนวน 3 ST และยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับ ยีน bla_{SHV} ในเชื้อจำนวน 1 ST

เมื่อพิจารณาจาก sequence types ของ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรที่พบได้บ่อยสุดสามอันดับแรก ได้แก่ ST 131 ST 101 และ ST 48 ตามลำดับ พบว่า ST 131 (17 สายพันธุ์) มียีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} 11 สายพันธุ์ และยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ 6 สายพันธุ์ ST 101 (8 สายพันธุ์) มียีน $bla_{\text{CTX-M}}$ 5 สายพันธุ์ และยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} 3 สายพันธุ์ ST 48 (6 สายพันธุ์) มียีน $bla_{\text{CTX-M}}$ 2 สายพันธุ์ ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} 2 สายพันธุ์ ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{SHV} 1 สายพันธุ์ และยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} 1 สายพันธุ์

ในขณะที่ sequence types ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่พบจำเพาะในประชากรเท่านั้นจำนวน 28 ST อาทิเช่น ST 55, ST 56, ST 64, ST 160 และ ST 2345 เป็นต้น พบยีนที่ควบคุมการสร้าง ESBL ส่วนใหญ่ ได้แก่ ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ หรือยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} ดังแสดงรายละเอียดในแผนภาพ minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งที่แยกได้ประชากร จำนวน 111 สายพันธุ์ (รูปที่ 11) โดยแบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 13 การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรในชุมชน จำนวน 111 สายพันธุ์

CC	ST	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบ	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากร
ST 10 Complex	ST 10	CTX-M	2
		CTX-M, TEM	3
	ST 34	CTX-M, TEM	2
		CTX-M	1
	ST 48	CTX-M, TEM, SHV	1
		CTX-M	2
		CTX-M, SHV	1
		CTX-M, TEM	2
	ST 617	CTX-M	1
		CTX-M, TEM	2
ST 23 Complex	ST 23	CTX-M, TEM	3
		CTX-M	1
	ST 410	CTX-M, TEM	1
ST 86 Complex	ST 86	CTX-M, TEM	1
ST 95 Complex	ST 142	CTX-M, TEM	1
ST 101 Complex	ST 101	CTX-M	5
		CTX-M, TEM	3
ST 131 Complex	ST 131	CTX-M, TEM	11
		CTX-M	6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 13 (ต่อ) การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรในชุมชน จำนวน 111 สายพันธุ์

CC	ST	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบ	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากร
ST 155 Complex	ST 55	CTX-M	1
	ST 56	CTX-M, TEM	1
	ST 58	CTX-M, TEM	2
		CTX-M	1
ST 168 Complex	ST 93	CTX-M	1
ST 648 Complex	ST 648	CTX-M	1
	ST 1112	CTX-M	1
	ST 1114	CTX-M, TEM	1
	ST 1146	CTX-M	1
	ST 117	CTX-M	2
		CTX-M, TEM, SHV	2
	ST 1193	TEM	1
		CTX-M, TEM	1
	ST 125	CTX-M	3
		CTX-M, TEM	1
	ST 132	CTX-M	1
	ST 160	CTX-M, TEM	2
	ST 1602	CTX-M	1
		CTX-M, TEM	1
	ST 877	CTX-M	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 13 (ต่อ) การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรในชุมชน จำนวน 111 สายพันธุ์

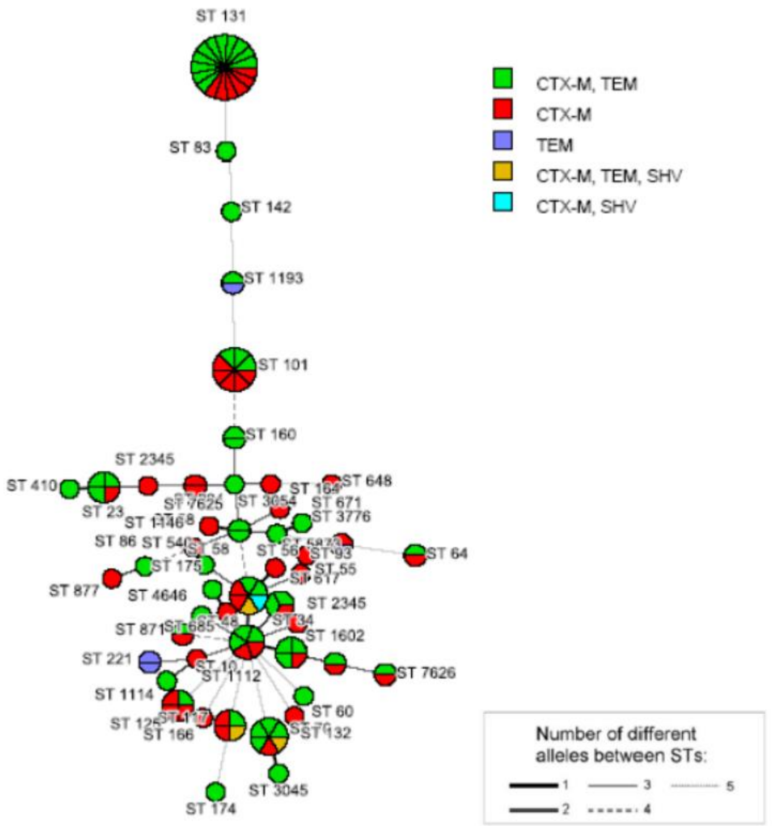
CC	ST	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบ	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากร
	ST 164	CTX-M	1
	ST 166	CTX-M	1
	ST 174	CTX-M, TEM	1
	ST 175	CTX-M, TEM	1
	ST 221	TEM	2
	ST 224	CTX-M, TEM	1
	ST 2345	CTX-M	2
	ST 3045	CTX-M, TEM	1
	ST 3054	CTX-M	1
	ST 3776	CTX-M	1
		TEM	1
	ST 4646	CTX-M, TEM	1
	ST 540	CTX-M, TEM	1
	ST 5873	CTX-M	1
	ST 60	CTX-M, TEM	1
	ST 64	CTX-M, TEM	1
		CTX-M	1
	ST 671	CTX-M, TEM	1
	ST 685	CTX-M	1
	ST 83	CTX-M, TEM	2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 13 (ต่อ) การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในเชื้อ *E. coli* แต่ละ sequence type ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากรในชุมชน จำนวน 111 สายพันธุ์

CC	ST	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบ	จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากร
	ST 70	CTX-M, TEM	4
		CTX-M	1
		CTX-M, TEM, SHV	1
	ST 7625	CTX-M	3
		CTX-M, TEM	1
	ST 871	CTX-M	1
		CTX-M, TEM	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

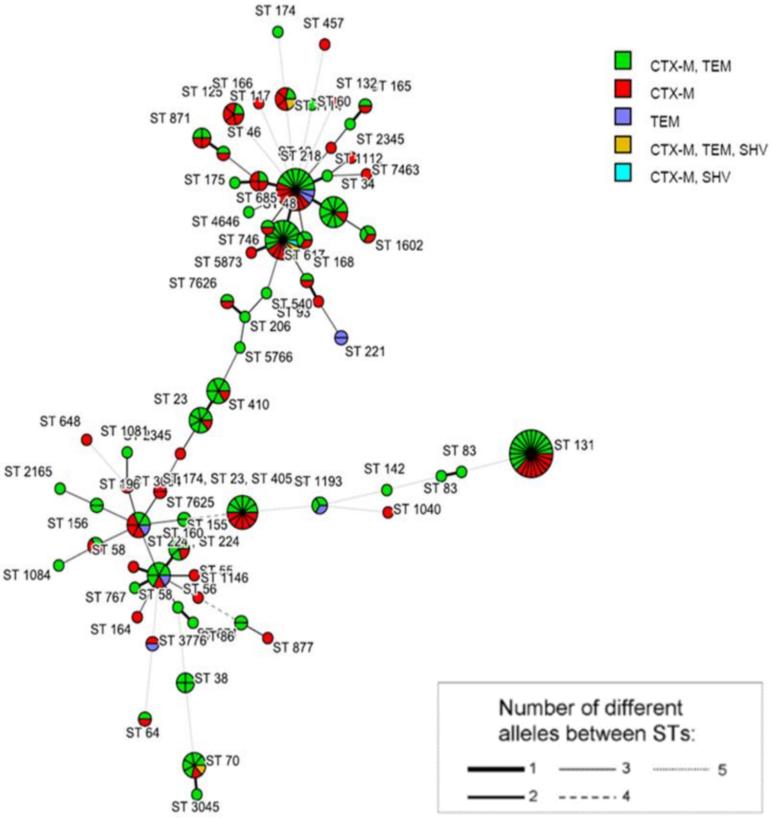


รูปที่ 11 แผนภาพ Minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากรในชุมชน จำนวน 111 สายพันธุ์ แบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ
- ▬▬▬ (เส้นหนา) แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 1 allele
- ──── แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 2 allele
- ─── (เส้นบาง) แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 3 allele
- - · - · - · - แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 4 allele
- .... แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 5 allele

การกระจายตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากร จำนวนรวมทั้งสิ้น 212 สายพันธุ์ โดยแบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้แสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แผนภาพ Minimal spanning tree ที่สร้างจาก sequence types ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มและประชากรในชุมชน จำนวน 212 สายพันธุ์ แบ่งตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และใช้โปรแกรม BioNumerics version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ทำการวิเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ
- แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 1 allele
- แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 2 allele
- แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 3 allele
- แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 4 allele
- แสดง sequence type ที่มีความแตกต่าง 5 allele

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ MLST ของเชื้อ E. coli ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากทั้งสุกรและประชากรทั้งหมด 212 สายพันธุ์ มาสรุปร่วมกับการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ ได้แก่ เทคนิค multiplex PCR และเทคนิค WGS และผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ได้ผลดังที่สรุปในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
human	H 001	ST101/CC101					■		R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 002	ST34/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	H 003	ST23/CC23	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 004	ST70	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 005	ST23/CC23	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 006	ST70	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
	H 007	ST70	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 008	ST7626	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 009	ST70					■	■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 010	ST131/CC131	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 011	ST101/CC101				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 012	ST1602	■						R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	H 013	ST671	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	I	S
	H 014	ST2345				■			R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 015	ST3045	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 016	ST23/CC23	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 017	ST10/CC10	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 018	ST10/CC10				■		■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	I
	H 019	ST871	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 020	ST34/CC10	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	H 021	ST34/CC10	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 022	ST131/CC131				■			R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 023	ST86/CC86	■	■					R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	I	S	R
	H 024	ST877	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 025	ST410/CC23	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 026	ST131/CC131	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 027	ST23/CC23	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 028	ST3776	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 029	ST101/CC101				■		■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R

ตารางที่ 14 (ต่อ) สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
human	H 030	ST4646				■		■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 031	ST131/CC131	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 032	ST48/CC10	■	■	■				R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 033	ST617/CC10	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 034	ST174	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
	H 035	ST131/CC131	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 036	ST7625	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 037	ST101/CC101	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 038	ST1146				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 039	ST10/CC10					■		R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 040	ST131/CC131	■						R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	H 041	ST1602	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 042	ST131/CC131				■		■	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
	H 043	ST58/CC155	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 044	ST540	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 045	ST871	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 046	ST48/CC10	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 047	ST1114					■	■	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	H 048	ST617/CC10					■	■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	H 049	ST1193		■					R	S	R	R	R	I	S	S	S	R	I	S	R
	H 050	ST7625	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 051	ST3776		■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 052	ST617/CC10					■	■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 053	ST224	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 054	ST131/CC131	■	■					R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	H 055	ST160	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
	H 056	ST101/CC101	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 057	ST125	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 058	ST10/CC10					■	■	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 14 (ต่อ) สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
human	H 059	ST83	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 060	ST164	■						R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I	S	S
	H 061	ST48/CC10	■		■				R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 062	ST60	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 063	ST58/CC155	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	H 064	ST131/CC131	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 065	ST131/CC131	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 066	ST56/CC155	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	H 067	ST7626	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	H 068	ST58/CC155	■	■					R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	H 069	ST117				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 070	ST48/CC10	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 071	ST175	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 072	ST125	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	H 073	ST131/CC131	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 074	ST2345					■		R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 075	ST70	■	■	■				R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S
	H 076	ST117	■	■	■				R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 077	ST10/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 078	ST83	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 079	ST131/CC131	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 080	ST221		■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 081	ST34/CC10					■	■	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 082	ST101/CC101	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 083	ST221		■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 084	ST131/CC131	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 085	ST64	■	■					R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 086	ST55/CC155	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 087	ST131/CC131	■	■					R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R

ตารางที่ 14 (ต่อ) สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
human	H 088	ST48/CC10	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	I
	H 089	ST48/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 090	ST132	■						R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	H 091	ST125	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 092	ST166	■						R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 093	ST131/CC131	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 094	ST160	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 095	ST142/CC95	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 096	ST648/CC648					■		R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S
	H 097	ST125	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 098	ST101/CC101	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	H 099	ST117	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 100	ST64	■						R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 101	ST1193	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S
	H 102	ST101/CC101					■	■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 103	ST3054	■						R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 104	ST131/CC131	■						R	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S
	H 105	ST70					■	■	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	H 106	ST5873	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
	H 107	ST93/CC168	■						R	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	H 108	ST117				■			R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	H 109	ST1112				■			R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	H 110	ST131/CC131				■			R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	H 111	ST685					■		R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 14 (ต่อ) สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
swine	S 001	ST10/CC10						■	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	S 002	ST155/CC155	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 003	ST48/CC10				■			R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 004	ST125	■						R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 005	ST155/CC155					■	■	R	I	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 006	ST457				■			R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 007	ST48/CC10	■	■	■				R	I	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S
	S 008	ST5766	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S
	S 009	ST871	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 010	ST767	■	■					R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 011	ST155/CC155	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 012	ST224		■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 013	ST155/CC155	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 014	ST70					■	■	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 015	ST10/CC10					■		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 016	ST871	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 017	ST7463	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 018	ST1040	■						R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 019	ST131/CC131	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S
	S 020	ST685	■						R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 021	ST48/CC10		■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 022	ST48/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 023	ST1081	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 024	ST410/CC23				■			R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 025	ST3054	■						R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
	S 026	ST196	■	■					R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 027	ST746	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	S 028	ST168/CC168	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 029	ST48/CC10	■	■					R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R

ตารางที่ 14 (ต่อ) สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
swine	S 030	ST48/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 031	ST168/CC168	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 032	ST58/CC155		■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 033	ST34/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 034	ST10/CC10		■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	S 035	ST48/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 036	ST34/CC10	■	■					R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
	S 037	ST10/CC10	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 038	ST1084	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 039	ST38/CC38	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 040	ST34/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	S
	S 041	ST1193/CC14	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 042	ST34/CC10	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	S 043	ST34/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	R
	S 044	ST1602	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
	S 045	ST156/CC156	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 046	ST156/CC156	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	R
	S 047	ST38/CC38	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	R
	S 048	ST38/CC38	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	R
	S 049	ST38/CC38	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 050	ST156/CC156	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 051	ST2165	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	S
	S 052	ST155/CC155	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 053	ST10/CC10	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	S 054	ST46/CC46	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 055	ST86/CC86	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 056	ST10/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 057	ST410/CC23	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 058	ST46/CC46	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S

ตารางที่ 14 (ต่อ) สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
swine	S 059	ST410/CC23	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 060	ST410/CC23	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 061	ST165/CC165	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	S 062	ST165/CC165	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 063	ST206/CC206	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	S 064	ST23/CC23	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	S 065	ST48/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 066	ST23/CC23	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 067	ST131/CC131	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 068	ST131/CC131	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 069	ST218/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 070	ST224					■		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 071	ST746	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	S 072	ST58/CC155	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 073	ST23/CC23	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	S 074	ST48/CC10	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 075	ST10/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 076	ST101/CC101	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 077	ST405/CC405	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 078	ST10/CC10	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 079	ST174	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 080	ST196	■	■					R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 081	ST224	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 082	ST131/CC131	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 083	ST224				■			R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
	S 084	ST58/CC155	■						R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 085	ST131/CC131	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 086	ST10/CC10	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 087	ST117				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R

ตารางที่ 14 (ต่อ) สรุปผลการวิเคราะห์ MLST การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเทคนิค disk diffusion ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 212 สายพันธุ์

Host	Sample ID	MLST/CC	ESBLs gene						Antimicrobial susceptibility testing												
			CTX-M*	TEM*	SHV*	CTX-M-55	CTX-M-14	TEM-1B	ampicillin	amoxicillin/clavulanic acid	ceftriaxone	ceftazidime	cefotaxime	cefoxitin	imipenem	ertapenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	trimethoprim/sulfamethoxazole
swine	S 088	ST685	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 089	ST48/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 090	ST58/CC155	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 091	ST10/CC10	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
	S 092	ST23/CC23				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	S 093	ST685					■		R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 094	ST131/CC131	■	■					R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 095	ST48/CC10	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 096	ST131/CC131	■	■					R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 097	ST10/CC10				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	S 098	ST10/CC10				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S
	S 099	ST410/CC23	■	■	■				R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	S 100	ST10/CC10				■			R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
	S 101	ST224	■						R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

<u>หมายเหตุ</u>

แถบสีดำ หมายถึง มีการตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยการทดสอบทางจีโนไทป์

* หมายถึง ผลการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL จากเทคนิค multiplex PCR โดยไม่มีการตรวจหา subgroup ของเอนไซม์ ESBL

**หมายถึง เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL และไม่ได้ทำการทดสอบทางจีโนไทป์

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

แม้ว่าเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่สามารถพบได้ในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ในขณะเดียวกันยังพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และพบได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย รวมไปถึงการเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในภาคการปศุสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานที่เป็นหนึ่งในบรรดาเชื้อก่อโรคหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital-acquired infections) (4) ที่ต้องให้การเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพนั้นส่งผลกระทบทั้งต่อสุขภาพของประชากร เนื่องมาจากความล้มเหลวในการใช้ยาปฏิชีวินะรักษา ทำให้อัตราการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น และยังส่งผลกระทบด้านเศรษฐกิจในแง่กาค่าจ่ายในการรักษาที่สูงขึ้น รวมไปถึงการเจ็บป่วย การใช้เวลาในการรักษาที่เพิ่มขึ้น และเสียชีวิตก่อนวัยอันควร (2) ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้ปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพได้กลายเป็นปัญหาสำคัญระดับโลกที่ต้องรับมือเฝ้าระวัง แก้ไข และหามาตรการป้องกันอย่างรัดกุมและเร่งด่วน

หนึ่งในสาเหตุที่สำคัญของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* คือการสร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ beta-lactamase ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม beta-lactam ได้แก่ ยากลุ่ม penicillins ยากลุ่ม cepholosporins รุ่น 1 ถึง 4 และยากลุ่ม monobactam แต่ยังคงไวต่อยากลุ่ม cephamycins และยากลุ่ม carbapenems (15) ซึ่งเอนไซม์ ESBL ถูกควบคุมด้วยยีนที่อยู่บนพลาสมิด ทำให้สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียภายในสายพันธุ์เดียวกัน หรือข้ามสายพันธุ์ในรูปแบบของ horizontal gene transfer ได้อย่างรวดเร็วในวงกว้าง (85) และพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในชุมชนต่างๆ ทั่วโลกทั้งในสถานพยาบาลและในชุมชน (8, 86, 87) เช่นเดียวกับประเทศไทยที่พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งแยกเป็นเชื้อก่อโรคที่แยกได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาล (3) และยังเป็นเชื้อที่สามารถแยกได้จากประชากรในชุมชน อาหาร คนงานในฟาร์มปศุสัตว์ และสิ่งแวดล้อม (9)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การศึกษาในครั้งนี้ได้เพาะแยกเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระของกลุ่มสุกรที่มีสุขภาพปกติในฟาร์มปศุสัตว์ และประชากรที่มีสุขภาพดีในชุมชน ซึ่งกลุ่มตัวอย่างทั้งสองอาศัยอยู่ในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน เมื่อนำเชื้อ *E. coli* มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา ampicillin ซึ่งเป็นยากลุ่ม penicillins และยา ceftriaxone และยา cefotaxime ซึ่งเป็นยากลุ่ม cepholosporins รุ่น 3 อย่างไรก็ตามเชื้อทุกสายพันธุ์ยังไวต่อยา imipenem ยา ertapenem และยา meropenem ซึ่งเป็นยากลุ่ม carbapenem เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระ

ของสุกรและประชากรส่วนใหญ่ เป็นเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน จากงานวิจัยของ Wu และคณะ (8) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล และยังเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากอุจจาระของ ไก่ โค สุกร และ ไก่งวง ที่อยู่ในฟาร์มปศุสัตว์ การดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานยิ่งส่งผลให้ยาไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียได้เนื่องมาจากคุณสมบัติการดื้อยาที่รุนแรงของเชื้อ ทำให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานทำได้ยากขึ้น มีข้อกำจัดในการใช้ยาต้านจุลชีพมากขึ้น และอาจเกิดผลข้างเคียงของการรักษาที่สูงขึ้นในกรณีที่ต้องเปลี่ยนไปใช้ยาที่ออกฤทธิ์กว้างขวางกว่า (2)

พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร ดื้อต่อยา amoxicillin/clavulanic acid ยา ceftazidime และยา gentamicin มากกว่าเชื้อที่แยกได้จากประชากรอย่างมีนัยสำคัญ ปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในฟาร์มปศุสัตว์ ส่วนใหญ่เกิดจากการใช้ยาต้านจุลชีพแบบ prophylaxis เพื่อป้องการการติดเชื้อในสัตว์อุตสาหกรรมอาหาร รวมไปถึงการผสมยาต้านจุลชีพในอาหารสัตว์เพื่อใช้เร่งการเจริญเติบโต (88, 89) การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา พบเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรดื้อยาต้านจุลชีพ อาทิเช่น ยา ampicillin ยา sulfamethoxazole ยา tetracycline และยา chloramphenicol สูงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับฟาร์มที่ไม่มีการใช้ยาต้านจุลชีพ (90) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากรจากการศึกษาครั้งนี้ ดื้อต่อยา ciprofloxacin มากกว่าเชื้อที่แยกได้จากสุกรอย่างมีนัยสำคัญ ปัจจัยที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่พบได้ในประชากรที่อาศัยในชุมชนส่วนใหญ่ เกิดจากการใช้ยาต้านจุลชีพที่เพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้ยากลุ่ม fluoroquinolone ในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และการใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสม เช่น การใช้ยา กลุ่ม beta-lactam ในการรักษาโรคไข้หวัดที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส (91)

ในการศึกษาครั้งนี้เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรจำนวน 98.06% และประชากรจำนวน 96.52% สร้างเอนไซม์ ESBL ปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์ ESBL มากกว่า 350 ชนิด (92) แต่พบว่ามีเพียงเอนไซม์ ESBL ในบางวงศ์ ได้แก่ วงศ์ CTX-M, TEM และ SHV ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบการกระจายในปริมาณสูงในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ในขณะที่เอนไซม์ ESBL ที่อยู่ในวงศ์ VEB, OXA, PER และ GES พบอัตราการแพร่กระจายที่ต่ำในเชื้อกลุ่มดังกล่าว (46, 47) ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาพบว่ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากคนไข้ส่วนใหญ่เป็นยีน bla_{SHV} และยีน bla_{TEM} แต่ในปัจจุบันพบว่า ยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ มีการแพร่กระจายสูงที่สุดทั่วโลกในบรรดายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว (93) ในการศึกษานี้ได้นำเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL มาทำการตรวจวิเคราะห์หายีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ด้วยเทคนิค multiplex PCR พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ดังกล่าว

อย่างน้อยหนึ่งยีน โดยพบสัดส่วนของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ มากที่สุดทั้งจากเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากร ในขณะที่พบยีน bla_{TEM} มากเป็นอันดับที่สอง และยีน bla_{SHV} เป็นอันดับที่สาม โดยความชุกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้ศึกษาความชุกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากคนไข้ (94) สัตว์ (7) และสิ่งแวดล้อม (95) และพบสัดส่วนของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ มากเป็นอันดับหนึ่ง ตามมาด้วยยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนมากกว่าครึ่งหนึ่ง (56.60%) มียีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} ในขณะที่พบเพียงยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ เท่านั้น จำนวน 36.79% พบเพียงยีน bla_{TEM} เท่านั้น 4.25% พบ $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} จำนวน 1.89% และพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{SHV} จำนวน 0.47% งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากสัตว์ป่า มักพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ทั้งในรูปแบบของการพบแบบยีนเดี่ยวหรือพบร่วมกับยีน bla_{TEM} ในขณะที่สัดส่วนของการพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ชนิดอื่นมีจำนวนเล็กน้อย (86) การพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} ส่งผลให้อัตราการดื้อต่อยากลุ่ม beta lactam เพิ่มสูงขึ้น (96)

ในปี คศ. 2017 Bevan และคณะได้รายงานอุบัติการณ์ของ subgroup ของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ที่พบได้ในเชื้อวงศ์ *Enterbacteriaceae* จากทุกภูมิภาคของโลก พบว่า ยีน $bla_{\text{CTX-M15}}$ เป็น subgroup ที่พบการแพร่กระจายมากที่สุดทั่วโลก ยกเว้นในประเทศจีนและในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มักพบ ยีน $bla_{\text{CTX-M14}}$ แพร่กระจายเป็นสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับยีน $bla_{\text{CTX-M15}}$ (93) ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 42 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค WGS พบว่า subgroup ของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ที่พบมากที่สุดได้แก่ ยีน $bla_{\text{CTX-M55}}$ รองลงมาคือ ยีน $bla_{\text{CTX-M14}}$ และยีน $bla_{\text{TEM-1B}}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสัดส่วนการพบ subgroup ของยีนดังกล่าวในเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากร สอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศไทยของ Runcharoen และคณะ (95) ที่พบยีน $bla_{\text{CTX-M55}}$ มากที่สุด ตามมาด้วยยีน $bla_{\text{CTX-M14}}$ ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจ subgroup ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค WGS ในการศึกษาครั้งนี้ ทดสอบกับเชื้อเพียง 42 สายพันธุ์ ซึ่งสุ่มจากเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากกลุ่มตัวอย่างเพียง 212 สายพันธุ์ จึงอาจมีจำนวนน้อยเกินไปที่จะสะท้อนถึงอุบัติการณ์ที่แท้จริงของ subgroup ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้อุจจาระของสุกรและประชากรในการศึกษาครั้งนี้ ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา กลุ่ม beta-lactam ในขณะที่เชื้อส่วนใหญ่ยังดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolones ยากลุ่ม aminoglycosides และยา trimethoprim/sulfamethoxazole กลไกสำคัญที่เกี่ยวกับการดื้อยากลุ่ม fluoroquinolones ได้แก่ 1. การขับยาออกจากเซลล์เชื้อด้วยการทำงานของโปรตีน QepA ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *qep*A ส่งผลให้ความเข้มข้นของระดับยาภายในเซลล์ลดลงจนไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อตัวเชื้อได้ (97) 2. การที่เชื้อสร้างโปรตีน Qnr ซึ่งควบคุมด้วยยีน *qnr* เพื่อไปป้องกันเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) และ topoisomerase IV ของตัวเชื้อ ไม่ให้ถูกยากลุ่ม fluoroquinolone เข้าจับ หรือเรียกว่ากลไก drug target protection ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อตำแหน่งเป้าหมายและตัวเชื้อได้ (98) 3. การที่เชื้อสร้างเอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase ที่ควบคุมด้วยยีน *aac-6'-Ib-cr* ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนหมู่อะมิโนวงแหวน piperazin ของยากลุ่ม fluoroquinolones โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา ciprofloxacin ทำให้ความสามารถในการออกฤทธิ์ของยาลดต่ำลง นอกจากนั้นยีน *aac-6'-Ib-cr* ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น gentamicin ไปพร้อมกันได้ (98) ทั้งนี้ยีน *qep*A ยีน *qnr* และยีน *aac-6'-Ib-cr* เป็นยีนดื้อยาที่พบอยู่บนพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม fluoroquinolones หรือเรียกว่า plasmid-mediated quinolone resistances (PMQRs) (98) โดยพบว่าพลาสมิดดังกล่าวมักพบร่วมกับพลาสมิดที่มียีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงอาจอธิบายเหตุผลการพบการดื้อยากลุ่ม fluoroquinolones ยากลุ่ม aminoglycosides ในเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในการศึกษาครั้งนี้

กลไกการดื้อต่อยา trimethoprim/sulfamethoxazole ที่พบได้ในเชื้อ *E. coli* ได้แก่ ยีน *sul* ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตำแหน่งเป้าหมาย ส่งผลให้ยาไม่สามารถไปจับกับตำแหน่งเป้าหมายได้ (99) จากงานวิจัยของ Arabi และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 มีรายงานการดื้อยา trimethoprim/sulfamethoxazole ในเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL สูงกว่าเชื้อ *E. coli* ที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ ESBL ส่วนใหญ่พบยีน bla_{TEM} ร่วมกับยีน *sul* ซึ่งบ่งชี้ถึงการพบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL และยีน *sul* อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน (100)

การวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรด้วยเทคนิค MLST สามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 66 ST โดยมีเพียง 25 ST ที่สามารถถูกจัดเป็น clonal complexes โดยเชื้อที่อยู่ภายใน clonal complexes เดียวกันจะมีความคล้ายคลึงกับ alleic profile หรือจีโนไทป์ในฐานข้อมูล ซึ่งจะถูกระบุโดยค่า heuristic means ค่า BURST algorithm และค่า split decomposition ซึ่งได้รับการตอบรับโดยห้องปฏิบัติการสาธารณสุขและนักระบาดวิทยา (77) ขณะที่

เชื้อที่เหลืออีก 41 ST พบว่าไม่ถูกจัดเข้า clonal complexes ใดเนื่องจากมีความแตกต่างของ alleic profile หรือจีโนไทป์ในฐานข้อมูล การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 เป็นจำนวนมากที่สุดเท่ากับ 11.32% ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งหมดที่ถูกนำมาวิเคราะห์ รองลงมาได้แก่ ST10 (8.49%) และ ST48 (8.02%) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกร พบสายพันธุ์ ST10 ST48 และ ST131 เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดสามอันดับแรกตามลำดับ และเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของประชากร พบสายพันธุ์ ST131 ST101 และ ST70/ST48 มากที่สุดสามอันดับแรกตามลำดับ โดย sequence types ที่พบได้บ่อยที่ได้กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น ถูกจัดอยู่ใน clonal complexes เพียง 3 กลุ่ม ได้แก่ CC10 ประกอบไปด้วย ST10 และ ST48 CC 101 ประกอบไปด้วย ST70 และ ST101 และ CC131 ประกอบไปด้วย ST131 อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ sequence type ใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนในเชื้อ *E. coli*

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 เป็นสายพันธุ์ที่พบได้มากที่สุดประมาณ 28-38% ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศสวีเดน (101) ประเทศเยอรมนี (102) และประเทศไทย (95) โดยทั่วไปแล้วเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 มักพบจำกัดอยู่ในคนเท่านั้นและมีอุบัติการณ์การพบเชื้อดังกล่าวในแหล่งอื่นค่อนข้างต่ำ (103) อย่างไรก็ตามมีบางรายงานพบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ในสัตว์ทั้งที่มีสุขภาพดีและสัตว์ที่ป่วย รวมไปถึงการพบในอาหารและสิ่งแวดล้อม (95, 103) เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของเชื้อ *E. coli* ST131 สามารถแพร่กระจายไปยังสัตว์ที่อาศัยอยู่ในฟาร์ม เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทั้งในโรงพยาบาลและชุมชน และมียีนที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของการก่อโรคจำนวนมากจนถูกกำหนดให้เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค (103) งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์ ESBL วงศ์ CTX-M15 และมักจะดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones (103) ในขณะที่ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในวงศ์อื่นๆ การศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL สายพันธุ์ ST 131 ทั้งหมดมียีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ทั้งในรูปแบบที่พบเพียงยีนเดียวหรือพบร่วมกับกับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ชนิดอื่น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ subgroup ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทุกสายพันธุ์ ทำให้ยังไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ที่พบนั้นสัมพันธ์กับ subgroup ใดของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL อย่างรวดเร็วทั่วโลก อาจมีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST 131 ที่ยีน *bla*$_{CTX-M}$ ที่พบอุบัติการสูงในทุกภูมิภาคของโลก อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีหลักฐานที่สามารถระบุได้ว่า เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำให้ความรุนแรงของโรคสูงขึ้น (101) การศึกษาของ Lavigne และคณะ ใช้แบบจำลองปลาม้าลาย (zebrafish model) ในการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 โดยพบว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ทั้งที่สร้างเอนไซม์ CTX-M และไม่สร้างเอนไซม์ CTX-M มีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยลง แต่เชื้อกลับทนทานมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่สายพันธุ์ ST131 (104) sequence type ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบได้บ่อยในลำดับถัดมาของการศึกษานี้คือ ST10 ซึ่งพบได้ทั้งในเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากร งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST10 มีแหล่งกักเก็บที่หลากหลายทั้งในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม (105, 106) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL สายพันธุ์ ST48 เป็น sequence type ที่พบบ่อยเป็นอับดับสามในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบได้ในผู้ป่วยในโรงพยาบาลและประชากรในชุมชน (107) รวมไปถึงพบได้ในสัตว์ปีก (108) เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST70 และ ST101 ซึ่งพบมากเป็นอันดับต้นๆ ในอุจจาระของประชากรในการศึกษาครั้งนี้ งานวิจัยที่ผ่านมาพบสายพันธุ์ ST70 ในหนูบ้าน (109) และสายพันธุ์ ST101 ในผู้ป่วยติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (110) เชื้อดังกล่าวทั้งหมดพบว่าส่วนใหญ่มักพบยีน *bla*$_{CTX-M}$ เพียงยีนเดียวหรือพบยีน *bla*$_{CTX-M}$ ร่วมกับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL อื่นๆ

นอกเหนือจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ST10 ST48 ST70 และ ST101 ที่ได้กล่าวมาข้างต้น ซึ่งถูกพบจำนวนมากเป็นอันดับต้นๆ ของการศึกษาครั้งนี้ ยังพบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ อาทิเช่น ST34 ST224 ST410 ST685 ST871 ST1193 ST1602 และ ST2054 เป็นต้น ซึ่งพบได้ทั้งจากอุจจาระของสุกรและประชากร หรือ ST58 ST206 ST407 และ ST1084 ซึ่งพบในสุกร หรือ ST64 ST174 ST221 และ ST877 ซึ่งพบในประชากร อย่างไรก็ตามเชื้อดังกล่าวพบในปริมาณน้อยในแต่ละสายพันธุ์ และบางสายพันธุ์มีการรายงานพบเชื้อในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมจากการศึกษาที่ผ่านมา (7, 86) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มักพบยีน *bla*$_{CTX-M}$ เพียงยีนเดียวหรือพบยีน *bla*$_{CTX-M}$ ร่วมกับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ชนิดอื่นมากกว่าครึ่งหนึ่งของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรในการศึกษาครั้งนี้ มี sequence types ที่เหมือนกันจำนวนทั้งสิ้น 19 ST อาทิเช่น ST10 ST34 ST48 ST70 ST101 และ ST131 เป็นต้น ในการศึกษาที่ประเทศเดนมาร์คพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่มีสายพันธุ์เหมือนกันในเชื้อที่แยกได้จากสุกรที่เลี้ยงในฟาร์มและคนงานที่ทำงานในฟาร์ม ซึ่งมีข้อสันนิษฐานว่าอาจเกิดแพร่เชื้อจากสุกรไปยังคนโดยสัมผัส (111) อย่างไรก็ตามหลักฐานที่พิสูจน์ว่ามีการแพร่เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ESBL จากสัตว์ไปสู่คนยังมีอยู่อย่างจำกัด การพบ sequence type ที่เหมือนกันของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรในการศึกษาครั้งนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สายพันธุ์ ST 131 ที่พบมากที่สุดและเป็นสายพันธุ์ที่มักพบจำกัดเฉพาะในคน รวมไปถึงสายพันธุ์ ST 48 และ ST 10 ที่มักพบในสัตว์หรือสิ่งแวดล้อมมากกว่าพบในคน แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการแพร่กระจายเชื้อระหว่างกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่ม งานวิจัยของ Bengtsson-Palme และคณะ สันนิษฐานว่ายีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยาต้านจุลชีพในคน สามารถแพร่มาสู่สิ่งแวดล้อมได้ผ่านทางสิ่งปฏิกูลที่ถูกขับถ่ายออก และสัตว์สามารถติดเชื้อเหล่านั้นได้ ในขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยาต้านจุลชีพในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนจากสิ่งปฏิกูลของสัตว์ อาจทำให้คนติดเชื้อเหล่านั้นได้ผ่านการรับประทานอาหาร น้ำ และสิ่งแวดล้อม (112) อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบพิสูจน์ความสัมพันธ์และกลไกการถ่ายทอดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพระหว่างสัตว์และคนเพิ่มเติมในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษารูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพจำนวน 218 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระสุกรในฟาร์มปศุสัตว์จำนวน 103 สายพันธุ์และประชากรในชุมชนจำนวน 115 สายพันธุ์ ในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน พบว่ามีสัดส่วนเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพเป็นจำนวนมาก โดยเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานและเชื้อทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา ampicillin ยา ceftriaxone ยา cefotaxime ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรมีสัดส่วนดื้อต่อยา amoxicillin/clavulanic acid ยา ceftazidime และยา gentamicin ที่สูงกว่าที่พบในประชากรอย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากประชากรมีสัดส่วนดื้อต่อยา ciprofloxacin ที่สูงกว่าที่พบในสุกรอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbarpenems ในการศึกษาครั้งนี้ การพบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพทั้งในสัตว์และประชากรที่มีสุขภาพดี อาจกลายเป็นแหล่งเก็บกักเชื้อแบคทีเรียดื้อสารต้านจุลชีพที่สามารถแพร่กระจายในชุมชนได้

เชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการยืนยันว่าสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยเทคนิค combination disk ในการศึกษาครั้งนี้มีเท่ากับ 212 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระสุกรในฟาร์มปศุสัตว์จำนวน 101 สายพันธุ์และประชากรในชุมชนจำนวน 111 สายพันธุ์ ภายหลังการวิเคราะห์ด้วย multiplex PCR พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ได้แก่ $bla_{\text{CTX-M}}$ ยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} อย่างน้อยหนึ่งยีน โดยพบสัดส่วนของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ เป็นจำนวนมากที่สุดเท่ากับ 95.75% รองลงมาคือยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} เท่ากับ 60.85% และ 2.40% ตามลำดับ มากกว่าครึ่งหนึ่งของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} ในขณะที่เชื้อบางส่วนพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ หรือยีน bla_{TEM} เพียงยีนเดียวเท่านั้น หรือพบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ ร่วมกับยีน bla_{TEM} และยีน bla_{SHV} เป็นลำดับถัดมา และไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่พบยีน bla_{SHV} เพียงยีนเดียวในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของจำนวนยีนและรูปแบบของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ในเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม พบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดได้ผ่านทางพลาสมิด ซึ่งอาจทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียดื้อสารต้านจุลชีพได้อย่างรวดเร็วทั้งในโรงพยาบาลและในชุมชน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค WGS แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 42 สายพันธุ์ ที่ถูกสุ่มนำมาวิเคราะห์ลำดับเบส พบยีน *bla*$_{CTX-M}$ ส่วนใหญ่เป็นยีน *bla*$_{CTX-M-55}$ รองลงมาคือ *bla*$_{CTX-M-14}$ ในขณะที่ยีน *bla*$_{TEM}$ ทั้งหมดเป็นยีน *bla*$_{TEM-1B}$

การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวนทั้งหมด 212 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค MLST พบ sequence types จำนวน 66 ST โดย sequence types ที่พบได้บ่อย 5 อันดับแรกประกอบไปด้วย ST131 เท่ากับ 11.32% ST10 เท่ากับ 8.49% ST48 เท่ากับ 8.02% ST101 และ ST34 อย่างละเท่ากับ 4.25% และไม่พบเชื้อที่มี sequence type ใหม่ที่ไม่เคยมีการพบมาก่อนในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อจำนวน 132 สายพันธุ์ ที่อยู่ใน sequence types จำนวน 25 ST ที่ถูกจัดเป็น clonal complexes (CC) จำนวน 16 CC ในขณะที่เชื้อที่อยู่ใน sequence types ที่เหลือไม่ถูกจัดเป็น clonal complexes หรือเรียกว่า singleton ในการศึกษาครั้งนี้ clonal complexes ที่พบได้บ่อย 5 อันดับแรกประกอบด้วย CC10 เท่ากับ 22.64% CC131 เท่ากับ 11.32% CC23 และ CC155 อย่างละ 14 เท่ากับ 6.60% และ CC101 เท่ากับ 4.25%

sequence types ที่พบได้บ่อยระหว่างเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรมีความแตกต่างกันเล็กน้อย ดังนี้ sequence types ที่พบได้บ่อยในเชื้อที่แยกได้จากสุกร ได้แก่ ST10 เท่ากับ 12.87% รองลงมาคือ ST48 เท่ากับ 10.89% และ ST131 เท่ากับ 6.93% ในขณะที่ sequence types ที่พบได้บ่อยในเชื้อที่แยกได้จากประชากร ได้แก่ ST131 เท่ากับ 15.32% รองลงมาคือ ST101 เท่ากับ 7.21% ST70 และ ST48 อย่างละเท่ากับ 5.41%

มากกว่าครึ่งหนึ่งของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรและประชากรมี sequence types เหมือนกันจำนวนทั้งสิ้น 19 ST การพบ sequence types ที่มักจำกัดอยู่ในคน (ตัวอย่างเช่น ST131) ในสุกรในฟาร์ม หรือการพบ sequence types ที่มักจำกัดอยู่ในสัตว์หรือสิ่งแวดล้อม (ตัวอย่างเช่น ST10 และ ST48) ในประชากรในชุมชน โดยที่ทั้งสองกลุ่มตัวอย่างไม่มีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากการแพร่กระจายเชื้อระหว่างคนสู่สัตว์ หรือสัตว์สู่คน ผ่านทางสิ่งปฏิกูลที่ถูกขับถ่ายออกมาสู่สิ่งแวดล้อม และมีการปนเปื้อนผ่านการรับประทานอาหาร หรือน้ำดื่ม เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานที่เพียงพอต่อการพิสูจน์การแพร่กระจายเชื้อดังกล่าว และควรมีการทดสอบพิสูจน์ความสัมพันธ์และกลไกการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาระหว่างสัตว์และคนเพิ่มเติมในอนาคต

การพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แพร่กระจาย ในสุกรและประชากรที่มีสุขภาพดี นอกจากจะสามารถเป็นพาหะของแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพในชุมชน ข้อมูลบางส่วนยังชี้ให้เห็นถึง

ความน่าจะเป็นในการแพร่กระจายเชื้อระหว่างกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่ม ซึ่งอาจนำไปสู่การแพร่กระจายเชื้อต่อไปได้ในวงกว้างอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการติดตามเฝ้าระวังการเพิ่มขึ้นของเชื้อแบคทีเรียดื้อสารต้านจุลชีพ และการหามาตรการป้องกันหรือลดปัจจัยเสี่ยงในการแพร่กระจายจึงมีความจำเป็นในการแก้ปัญหาดังกล่าว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Organization WH. Antimicrobial resistance : global report on surveillance 2014 [Available from: http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/.

2. ภาณุมาศ ภูมาส, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, ภูษิต ประคองสาย, ตวงรัตน์ โพธะ, อาทร ริ้วไพบูลย์, สุพล ลิมวัฒนานนท์. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย : การศึกษาเบื้องต้น. วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข. 6(กรกฎาคม-กันยายน 2555). p. 352-60.

3. Health NARSCoTNNIo. NARST: National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, THAILAND. 2013 [updated 2013 Mar 24; cited 2014 22 June]. Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/news001.html/.

4. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. The lancet infectious diseases. 2008;8(3):159-66.

5. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2005;56(1):52-9.

6. Wieler LH, Ewers C, Guenther S, Walther B, Lubke-Becker A. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. International journal of medical microbiology. 2011;301(8):635-41.

7. Dahms C, Hubner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. Plos one. 2015;10(11):e0143326.

8. Wu G, Day MJ, Mafura MT, Nunez-Garcia J, Fenner JJ, Sharma M, et al. Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany. Plos one. 2013;8(9):e75392.

9. Khamsarn S, Nampoonsak Y, Busamaro S, Tangkoskul T, Seenama C, Rattanaumpawan P, et al. Epidemiology of antibiotic use and antimicrobial resistance in selected communities in Thailand. Journal of the medical association of Thailand. 2016;99(3):270-5.

10. Pongpech P, Naenna P, Taipobsakul Y, Tribuddharat C, Srifuengfung S. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and class 1 integron integrase gene intl1 in *Escherichia coli*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

from Thai patients and healthy adults. The southeast asian journal of tropical medicine and public health. 2008;39(3):425-33.

11. ภัทรชัย กีรติสิน. วิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพฯ: วี.เจ.พิ้นติ้ง; 2551.

12. Murray PR, Rosental KS, Kobayashi GS, MA P. Medical microbiology. 5th ed. Missouri: Mosby, Inc; 2005.

13. Borriello SP, Murry PR, G F. Topley & Wilson's microbiology and medical infection. 10th ed. London: Hodder Arnold; 2005.

14. O'Grady F, Lambert HP, Finch RG, D G. Antibiotic and chemotherapy. 7th ed. New York: Churchill Livingstone; 1997.

15. ภัทรชัย กีรติสิน, อนุชา อภิสารธนรักษ์. Beta-lactamase ในแบคทีเรียแกรมลบ จากความรู้พื้นฐานสู่เวชปฏิบัติ. กรุงเทพฯ: วี.เจ.พิ้นติ้ง; 2555.

16. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the beta-lactams. Current opinion in microbiology. 2010;13(5):551-7.

17. Brunton LL, Parker K, Blumenthal D, et al. The Goodman and Gilman 's manual of pharmacological therapeutics. USA: McGraw-Hill; 2007.

18. Henry F. Chambers. Beta-Lactam & other cell wall & membrane-active antibiotics. Basic & clinical pharmacology. USA: McGraw Hill; 2007.

19. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, et al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44(4):997-1003.

20. Richard LS, Ronald SG. Infectious Diseases of the female genital tract. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

21. Takeda S, Nakai T, Wakai Y, Ikeda F, Hatano K. In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(3):826-30.

22. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(11):4943-60.

23. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS microbiology reviews. 2008;32(2):234-58.

24. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. Journal of pathology microbiology and immunology Scandinavica. 2010;118(1):1-36.

Chulalongkorn University

25. Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Frontiers in microbiology. 2013;4:128.

26. Hayes JD, Wolf CR. Molecular mechanisms of drug resistance. The biochemical journal. 1990;272(2):281-95.

27. Keeling PJ, Palmer JD. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. Nature reviews genetics. 2008;9(8):605-18.

28. van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Frontiers in microbiology. 2011;2:203.

29. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. American journal of infection control. 2006;34(5 Suppl 1):S3-10; discussion S64-73.

30. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1986;30(1):1-5.

31. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Sciences. 1994;264(5157):382-8.

32. Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. Biochimica et biophysica acta. 2009;1794(5):769-81.

33. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clinical microbiology reviews. 2010;23(1):160-201.

34. Susic E. Mechanisms of resistance in *Enterobacteriaceae* towards beta-lactamase antibiotics. Acta medica Croatica. 2004;58(4):307-12.

35. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Biological sciences. 1980;289(1036):321-31.

36. Hall BG, Barlow M. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2004;7(2):111-23.

37. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1995;39(6):1211-33.

38. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(3):969-76.

39. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1989;33(3):264-70.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

40. Bret L, Chaibi EB, Chanal-Claris C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Inhibitor-resistant TEM (IRT) beta-lactamases with different substitutions at position 244. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1997;41(11):2547-9.

41. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1989;33(3):271-6.

42. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clinical microbiology and infection. 2002;8(6):321-31.

43. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clinical microbiology reviews. 2005;18(2):306-25.

44. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clinical microbiology reviews. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.

45. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(1):24-38.

46. Page MG. Extended-spectrum beta-lactamases: structure and kinetic mechanism. Clinical microbiology and infection. 2008;14 Suppl 1:63-74.

47. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1989;33(8):1131-6.

48. Nugent ME, Hedges RW. The nature of the genetic determinant for the SHV-1 beta-lactamase. Molecular and general genetics. 1979;175(3):239-43.

49. Barthelemy M, Peduzzi J, Ben Yaghlane H, Labia R. Single amino acid substitution between SHV-1 beta-lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme. FEBS letters. 1988;231(1):217-20.

50. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical microbiology reviews. 2001;14(4):933-51.

51. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 1965;208(5007):239-41.

52. Blazquez J, Baquero MR, Canton R, Alos I, Baquero F. Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1993;37(10):2059-63.

53. Poirel L, Mammeri H, Nordmann P. TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type beta-lactamase from *Enterobacter aerogenes*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(12):4528-31.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

54. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(1):1-14.

55. Dale JW, Godwin D, Mossakowska D, Stephenson P, Wall S. Sequence of the OXA2 beta-lactamase: comparison with other penicillin-reactive enzymes. FEBS letters. 1985;191(1):39-44.

56. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1994;38(1):104-14.

57. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1999;43(3):573-81.

58. Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML, Galleni M, et al. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (blaA(CME)) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the cephalosporinases and the VEB-1 and PER beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1999;43(9):2193-9.

59. Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. The journal of infection. 2003;47(4):273-95.

60. Lu PL, Liu YC, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). International journal of antimicrobial agents. 2012;40 Suppl:S37-43.

61. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(8):2818-24.

62. CLSI. Performace standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard document M02-A10. 10th ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2009.

63. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 10th ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2009.

64. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard. 26th ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2016.

65. Brown DF, Andrews J, King A, MacGowan AP. Detection of extended-spectrum beta-lactamases with E test and double-disc potentiation methods. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2000;46(2):327-8.

66. Gagliotti C, Sarti M, Benini F, Cipolloni AP, Testa G, Venturelli C, et al. Laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamase by an automated system. The new microbiologica. 2008;31(4):561-4.

67. Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). FEMS microbiology letters. 1991;66(1):19-25.

68. Mabilat C, Courvalin P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1990;34(11):2210-6.

69. Arlet G, Brami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. FEMS microbiology letters. 1995;134(2-3):203-8.

70. Nuesch-Inderbinen MT, Hachler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. European journal of clinical microbiology and infectious diseases. 1996;15(5):398-402.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

71. M'Zali FH, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Snelling AM, Hawkey PM. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum beta-lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. The journal of antimicrobial chemotherapy. 1998;41(1):123-5.

72. M'Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV beta-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). The journal of antimicrobial chemotherapy. 1996;37(4):797-802.

73. Anderson MW, Schrijver I. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. Genes. 2010;1(1):38-69.

74. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. New biotechnology. 2009;25(4):195-203.

75. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2013;77(3):179-94.

76. Nasonova ES. Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and applications. Tsitologiia. 2008;50(11):927-35.

77. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. the national academy of sciences of the United States of America. 1998;95(6):3140-5.

78. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. Nature reviews Microbiology. 2013;11(10):728-36.

79. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annual review of microbiology. 2006;60:561-88.

80. Chaisatit C, Tribuddharat C, Pulsrikarn C, Dejsirilert S. Molecular characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. Japanese journal of infectious diseases. 2012;65(6):527-34.

81. Boonyasiri A, Tangkoskul T, Seenama C, Saiyarin J, Tiengrim S, Thamlikitkul V. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals, and the environment in selected areas in Thailand. Pathogens and global health. 2014;108(5):235-45.

82. Chen J, Griffiths MW. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. Applied microbiology. 1998;27(6):369-71.

83. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla_{SHV}, bla_{TEM} and $bla_{CTX\text{-}M}$ genes in *Enterobacteriaceae*. Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2007;115(12):1400-8.

84. *Escherichia coli* MLST Database [Internet]. Available from: https://pubmlst.org/databases.shtml.

85. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;64 Suppl 1:i3-10.

86. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? Frontiers in microbiology. 2011;2:246.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

87. Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, et al. Analysis of transmission of MRSA and ESBL-E among pigs and farm personnel. Plos one. 2015;10(9):e0138173.

88. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2004;53(1):28-52.

89. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage WP. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? Evolutionary applications. 2015;8(3):240-7.

90. Bunner CA, Norby B, Bartlett PC, Erskine RJ, Downes FP, Kaneene JB. Prevalence and pattern of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolated from pigs reared under antimicrobial-free and conventional production methods. Journal of the American veterinary medical association. 2007;231(2):275-83.

91. McNulty CA, Boyle P, Nichols T, Clappison P, Davey P. The public's attitudes to and compliance with antibiotics. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;60 Suppl 1:i63-8.

92. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. Saudi journal of biological sciences. 2015;22(1):90-101.

93. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M beta-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2017;72(8):2145-55.

Chulalongkorn University

94. Bubpamala J, Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Montakantikul P, Santanirand P, Chomnawang MT. Phenotypic and genotypic characterizations of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Thailand. Infection and drug resistance. 2018;11:2151-7.

95. Runcharoen C, Raven KE, Reuter S, Kallonen T, Paksanont S, Thammachote J, et al. Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. Genome medicine. 2017;9(1):81.

96. Jena J, Sahoo RK, Debata NK, Subudhi E. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in adults. Three Biotech. 2017;7(4):244.

97. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(9):3354-60.

98. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. Current medicinal chemistry. 2009;16(8):1028-46.

99. Kozak GK, Pearl DL, Parkman J, Reid-Smith RJ, Deckert A, Boerlin P. Distribution of sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from swine and chickens at abattoirs in Ontario and Quebec, Canada. Applied and environmental microbiology. 2009;75(18):5999-6001.

100. Arabi H, Pakzad I, Nasrollahi A, Hosainzadegan H, Azizi Jalilian F, Taherikalani M, et al. Sulfonamide resistance genes (sul) M in extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli* isolated from Iranian hospitals. Jundishapur journal of microbiology. 2015;8(7):e19961.

101. Brolund A, Edquist PJ, Makitalo B, Olsson-Liljequist B, Soderblom T, Wisell KT, et al. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. Clinical microbiology and infection. 2014;20(6):O344-52.

102. Pietsch M, Eller C, Wendt C, Holfelder M, Falgenhauer L, Fruth A, et al. Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. Veterinary microbiology. 2017;200:130-7.

103. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. Clinical microbiology reviews. 2014;27(3):543-74.

104. Lavigne JP, Vergunst AC, Goret L, Sotto A, Combescure C, Blanco J, et al. Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131. Plos one. 2012;7(3):e34294.

105. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clinical microbiology and infection. 2012;18(7):646-55.

106. Day MJ, Rodriguez I, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Kadlec K, Schink AK, et al. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2016;71(5):1178-82.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

107. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Claeys G, et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by *Escherichia coli* isolated from hospitalized and nonhospitalized patients: emergence of CTX-M-15-producing strains causing urinary tract infections. Microbial drug resistance. 2010;16(2):129-34.

108. Blaak H, Hamidjaja RA, van Hoek AH, de Heer L, de Roda Husman AM, Schets FM. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. Applied and environmental microbiology. 2014;80(1):239-46.

109. Guenther S, Bethe A, Fruth A, Semmler T, Ulrich RG, Wieler LH, et al. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (Rattus norvegicus) in Berlin, Germany. Plos one. 2012;7(11):e50331.

110. Peirano G, Mulvey GL, Armstrong GD, Pitout JD. Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM beta-lactamases. Journal of medical microbiology. 2013;62:525-30.

111. Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(10):2650-7.

112. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. FEMS microbiology reviews. 2018;42(1).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

1. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar No. 3 จำนวน 41.2 กรัม และ bacteriological agar (agar No.1) จำนวน 4 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 800 มิลลิลิตร ผสมจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำมาพักไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ปิเปตยา ceftriaxone ความเข้มข้น 25,600 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมยาและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน เทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในจานพลาสติกโดยใช้เครื่องปั๊มอัตโนมัติ ทิ้งไว้จนแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งาน

2. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Typtic soy broth (TSB)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Typtic soya broth จำนวน 15 กรัมเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตรผสมจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีเทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วปราศจากเชื้อที่มีฝาปิดขนาด 15x100 มิลลิเมตรโดยใช้เครื่องปั๊มอัตโนมัติเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth จำนวน 30.4 กรัมเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 800 มิลลิลิตร ผสมจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานพลาสติกเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องปั๊มอัตโนมัติ ทิ้งไว้จนแข็งและผิวหน้าแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการใช้งาน

4. วิธีเตรียม EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ชั่ง EDTA จำนวน 18.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร จน EDTA ละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเป็น 8 (pH 8.0) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. วิธีเตรียม TBE ความเข้มข้น 10 เท่า

ละลาย Tris จำนวน 108 กรัม และกรดบอริก 55 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จนละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน เติม EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเป็น 8 (pH 8.0) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอการใช้งาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จักรพงษ์ สีนามะ
วัน เดือน ปี เกิด	24 พฤษภาคม 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดศรีสะเกษ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	60 หมู่ 13 ตำบลตำแย อำเภอพยุห์ จังหวัดศรีสะเกษ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University