



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การตรวจการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *Escherichia coli* ที่ก่อโรคทางเดินปัสสาวะที่ดื้อยา
กลุ่ม third generation cephalosporin หรือ carbapenem

Detection of colistin resistance among third generation cephalosporin or
carbapenem-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates

โดย

ดร.ศิริพร โควบุตร

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิต

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ต้องขอขอบคุณ ดร.นิภาพร เทาวงศ์ โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อ *Escherichia coli* ในการทำวิจัย รวมถึงได้รับคำแนะนำทั้งด้านทฤษฎีและปฏิบัติ ตลอดจนความช่วยเหลือทุกด้านเพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้

ขอขอบคุณ ทนพญ.นัยนา วัฒนกุล หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลนพรัตนราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *E. coli* ที่คือยา colistin เพื่อใช้เป็น positive control ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ผศ.อดุลย์ บุญเฉลิมชัย และ ดร.อุษณีย์ ทรัพย์เจริญกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำยาเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานอณูชีววิทยา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนายวิวัฒน์ วีระปัด นางสาวกัญญาพัชร ชื่นจอหอ นางสาวจันจิราพร ชนะกิจ นางสาวอินทิรา จันธรรม และนางสาวจิรนนท์ จันทรโชติ นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงการเตรียมน้ำยา และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ดร.ศิริพร โควบุตร



บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง: การตรวจการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *Escherichia coli* ที่ก่อโรคนิ่วในปัสสาวะที่ดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporin หรือ carbapenem

ผู้วิจัย: ดร.ศิริพร ไควบุตร

สถาบัน: คณะเทคนิคการแพทย์

ปีที่พิมพ์: 2566

สถานที่พิมพ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: มหาวิทยาลัยรังสิต **จำนวนหน้างานวิจัย:** 42 หน้า

คำสำคัญ: *mcr-1*, *int-1*, โคลิสติน, third generation cephalosporins, carbapenems

ลิขสิทธิ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

ปัจจุบันมีรายงานการดื้อยาคอลิสตินที่เพิ่มมากขึ้น สาเหตุสำคัญมาจากการใช้ยาต้านจุลชีพที่มากเกินไปจนทำให้เกิดการดื้อยาคอลิสติน โดยมีการพบการดื้อยาคอลิสตินในเชื้อวงศ์ Enterobacterales ที่ดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporins, carbapenems งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและความสัมพันธ์ของยีน *mcr-1* และ *int-1* ในเชื้อ uropathogenic *E. coli* (UPEC) ที่ดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporins และ carbapenems ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานีปี 2560 จำนวน 83 ตัวอย่าง มาทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อยาคอลิสติน โดยใช้วิธี broth microdilution และตรวจหายีน *mcr-1* และ *int-1* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากการศึกษาพบว่า ในเชื้อ uropathogenic *E. coli* มีค่า MIC = 1 µg/ml ร้อยละ 4.8 และเชื้อที่มีค่า MIC = 2 µg/ml ร้อยละ 95.2 ซึ่งแปลผลได้ว่ามีความไวต่อยาคอลิสติน ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบยีน *mcr-1* แต่พบยีน *int-1* ร้อยละ 67.5 โดยยีน *int-1* พบในเชื้อ UPEC ที่มีการดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance) ซึ่งยีน *int-1* มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายยีนดื้อยา

ABSTRACT

Title: Detection of colistin resistance among third generation cephalosporin or carbapenem-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates

Researcher: Siriporn Kowaboot, Ph.D.

Affiliation: Faculty of Medical Technology

Year of publication: 2023

Publisher: Rangsit University

Source: Rangsit University

No. of pages: 42 pages

Keywords: *mcr-1*, *int-1*, colistin, third generation cephalosporins, carbapenems

Currently, there are increasing reports of drug-resistant infections. This is mainly due to the overuse of antimicrobials that cause bacteria to develop drug resistance. Gram-negative bacteria resistant to colistin were found, especially *Enterobacterales*, from 1% in 2016 and increased to 4.4% in 2021. The purpose of this research was to study the prevalence and association of *mcr-1* and

int-1 genes in drug resistant uropathogenic *E. coli* among third generation cephalosporins and carbapenems isolated from patients in Nopparat Rajathanee Hospital in 2017. All 83 samples were tested for minimal inhibitory concentration (MIC) to colistin by broth microdilution and detection of *mcr-1* and *int-1* genes by polymerase chain reaction (PCR). 4.8% of coli had MIC = 1 mg/ml and 95.2% of coli had MIC = 2 mg/ml, which could be interpreted as colistin-susceptible. The *mcr-1* gene was not detected whereas the *int-1* gene was detected 67.5% from total samples used in this study. Furthermore, in the present study, *int-1* gene was found in multidrug-resistant UPEC. The class 1 integron gene plays a major role in disseminated of antibiotic resistance.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
สมมติฐานของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 Antibiotic	4
2.3 การดื้อยาต้านจุลชีพของ uropathogenic <i>E. coli</i>	6
2.4 กลไกการดื้อยา colistin	8
2.5 อุบัติการณ์ดื้อยา colistin	10
2.6 วิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 แบบที่เรียนที่ใช้ในการศึกษา	14
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	14
3.3 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี broth microdilution	15

	หน้า
3.4 ตรวจยืนยันเชื้อ <i>E. coli</i>	16
3.5 การสกัด plasmid	17
3.6 ตรวจหาชิ้น <i>mcr</i> และ <i>Int1</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i> โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)	17
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล	20
4.1 รูปแบบการดื้อยาของกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem ของเชื้อ <i>E. coli</i>	20
4.2 การตรวจหาชิ้น <i>16S rRNA</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i>	20
4.3 ผลการตรวจเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน และผลตรวจยืนยันด้วย MIC	21
4.4 การตรวจหาชิ้น <i>mcr</i> -(1-10) และ <i>int-1</i> ด้วยวิธี PCR	22
4.5 ผลการทดสอบ DNA sequencing	23
4.6 การตรวจหาชิ้น <i>mcr-1</i> และ <i>int-1</i> การจัดรูปแบบการดื้อยาของกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem ร่วมกับการตรวจพบชิ้น <i>int-1</i>	25
บทที่ 5 สรุป วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	37
การเตรียมสารเคมี	38
ผล sequencing <i>mcr-1</i>	39
ประวัติผู้วิจัย	40

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	Primer sequences และ PCR product	18
4.1	รูปแบบการดื้อยาของกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem ของเชื้อ <i>E. coli</i>	20
4.2	ผลการทดสอบ MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution	22
4.3	รูปแบบการดื้อยาของกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem กับการตรวจพบยีน <i>int-1</i>	25
4.4	ตารางรูปแบบการดื้อยาและการตรวจพบ <i>int-1</i>	26
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาหลายขนานกับการตรวจพบยีน <i>int-1</i>	26



สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	ผลการตรวจหายีน <i>16S rRNA</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i>	21
4.2	ผลการทดสอบ MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution	22
4.3	ผลการตรวจหายีน <i>mcr-1</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i>	23
4.4	ผลการตรวจหายีน <i>int-1</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i>	23
4.5	Sequencing Chromatograms ของยีน <i>int-1</i>	24
4.6	ผล sequencing	24



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ARGs	Antibiotic resistance genes
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>int</i>	Integron
LPS	Lipopolysaccharide
<i>mcr</i>	Plasmid mediated colistin resistance
MIC	Minimum inhibitory concentration
mg	Milligram
ml	Milliliter
mg	Microgram
ml	Microliter
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความชุกของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (UTI) ที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาหลายชนิดเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก เนื่องจากแบคทีเรียที่ดื้อยาเหล่านี้มีการพัฒนาความสามารถในการต้านทานยาเพิ่มมากขึ้น เช่น ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone cephalosporin และ carbapenems (Loho et.al., 2015) แบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *Enterobacterales* มักพบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะ *Escherichia coli* (*E. coli*) พบเป็นสาเหตุของ UTI ร้อยละ 70-80 (Pirkani et.al., 2020) การดื้อยาต่อ fluoroquinolones, β -lactams, aminoglycosides และ carbapenems และการขาดการพัฒนาต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ทำให้แพทย์มีการพิจารณาการใช้ยา โคลิสติน (colistin) สำหรับการรักษาแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (Li et.al., 2006)

ยาโคลิสติน มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งส่วนใหญ่ใช้รักษาแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacterales* และ non-fermentative Gram-negative bacteria บางชนิด เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* (Tan et.al., 2006) ยาโคลิสติน หรือ polymyxin E เป็นยาในกลุ่ม polymyxins มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดย cationic polypeptide ของยาโคลิสตินทำปฏิกิริยากับ anionic lipopolysaccharide ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้เกิดการรั่วของของเหลวภายในเซลล์ออกนอกเซลล์ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตาย อย่างไรก็ตามการใช้โคลิสตินที่เพิ่มขึ้นทำให้พบการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อแกรมลบเพิ่มขึ้นทั่วโลก และมีอัตราการดื้อยาเพิ่มอย่างต่อเนื่องขึ้นเรื่อยๆ (Gales et.al., 2011)

กลไกทั่วไปของการดื้อยาโคลิสตินที่สำคัญคือการเปลี่ยนแปลง lipopolysaccharide (LPS) จากการกลายพันธุ์ของ two-component regulatory system (TCS) ได้แก่ PmrA/PmrB และ PhoP/PhoQ การกลายพันธุ์เหล่านี้ทำให้มีการเพิ่มของโมเลกุล 4 amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) และ phosphoethanolamine (PEtN) ซึ่งมีประจุบวกบน lipid A ทำให้ไปลดประจุลบบน outer membrane ส่งผลให้ลดปฏิกิริยาระหว่าง cationic polypeptide ของโคลิสติน กับ anionic lipopolysaccharide (LPS) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน (Poirel et.al., 2017; Trent et.al., 2004) นอกจากนี้ยังพบกลไกเพื่อขับยาโคลิสตินออกนอกเซลล์ (efflux pump) ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* โดยถูกควบคุมโดยยีน *acrAB* และ *kpnEF* กลไกการดื้อต่อยาโคลิสตินเหล่านี้เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในโครโมโซม (chromosomally-mediated) (Olaitan et.al., 2014; Pragasa et.al., 2016) ในปี พ.ศ. 2558 มีการรายงานการตรวจพบยีน *mcr-1* ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาโคลิสตินที่แยกได้

จากเนื่อสุกรในประเทศจีน ซึ่งเป็นการรายงานยีนดื้อยาโคลิสตินที่อยู่บนพลาสมิดของแบคทีเรียเป็นครั้งแรก (plasmid-mediated colistin resistance) ซึ่งพลาสมิดที่มียีนดื้อยานี้สามารถถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Liu et.al., 2015) และได้มีการรายงานการพบยีน *mcr-2* บนพลาสมิดจากเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาโคลิสติน (Xavier et.al., 2016) การพบยีนดื้อยาโคลิสตินพบพลาสมิดได้รับความสนใจอย่างมาก ต่อมาเริ่มมีการรายงานการค้นพบยีน *mcr* อื่นๆ ได้แก่ *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* และ *mcr-5* ในภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน (Duggett et.al., 2018) ล่าสุดมีการค้นพบอีก 4 ยีน ที่ควบคุมการดื้อยาโคลิสติน (*mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* และ *mcr-9*) ซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จากเชื้อในกลุ่ม *Enterobacterales* (AbuOun et.al., 2018; Yang et.al., 2018; Wang et.al., 2018; Carroll et.al., 2019) อย่างไรก็ตามในหมู่ *mcr* family ยีน *mcr-1* เป็นยีนที่ถูกตรวจพบได้บ่อยที่สุดในฟาร์มสัตว์และจากการติดเชื้อ *Enterobacteriaceae* ในมนุษย์ (Skov et.al., 2016) ในประเทศไทยเริ่มมีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2559 โดยตรวจพบ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินและมียีนดื้อยา *mcr-1* จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้ารับรักษาตัวที่โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ และในปี พ.ศ. 2563 มีการรายงานความชุกยีน *mcr-1* พบร้อยละ 15 จากตัวอย่างเชื้อที่ดื้อยาโคลิสติน โดยเชื้อที่พบยีน *mcr-1* เป็นเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด (Puncharat et.al., 2020)

ปัจจุบันพบว่าเชื้อ *E. coli* ซึ่งมักพบเป็นสาเหตุของ UTI มีการดื้อยา fluoroquinolone cephalosporin และ carbapemems เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษาการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ทำให้แพทย์จำเป็นต้องใช้ยาโคลิสตินมากขึ้น และทำให้มีโอกาพบเชื้อดื้อยาโคลิสตินมากขึ้น ข้อจำกัดในการทดสอบการดื้อต่อยาโคลิสติน คือไม่สามารถใช้วิธี disk diffusion หรือการทดสอบด้วย E-test ต้องใช้วิธี broth dilution เท่านั้น เป็นเหตุให้ไม่มีข้อมูลผลการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อยาโคลิสติน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาความชุกของการดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือ carbapemems และศึกษาหายีน *mcr-1* และ *int1* ในตัวอย่างจากผู้ป่วย UTI

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อหาความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคทางเดินปัสสาวะที่ดื้อยาโคลิสติน
2. เพื่อหาความชุกของยีน *mcr-1* และ *Int1* ที่ควบคุมการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคทางเดินปัสสาวะ

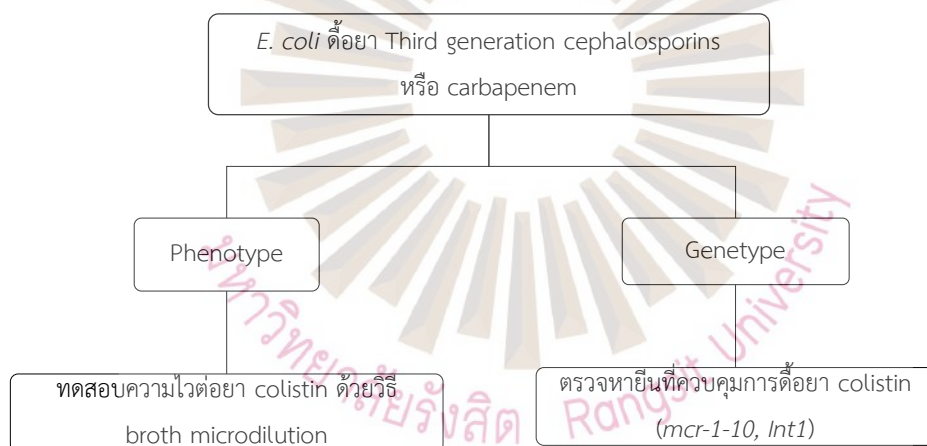
สมมติฐานของการวิจัย

1. เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาโคลิสติน จะตรวจพบยีน *mcr*
2. เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนานมีความสัมพันธ์กับการพบยีน *int1*

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษครั้งนี้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ uropathogenic *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานีในปี 2560 เพื่อศึกษาหายีน *mcr-1* ถึง *mcr-10* และ *int-1* ในเชื้อ uropathogenic *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporins หรือ carbapenems ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และหาค่า MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลในการศึกษาทางระบาดวิทยาเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพในโรงพยาบาล การทราบถึงข้อมูลอุบัติการณ์หรือความชุกการดื้อยาโคลิสตินของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคนทางเดินปัสสาวะ ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ตระหนักในการเลือกใช้ในการรักษา ทั้งนี้ผลทดสอบอนุชีววิทยาทำให้ทราบถึงกลไกการดื้อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีนดื้อยาชนิด *mcr-1* และ *Int1* ซึ่งจะเป็นความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการดื้อยา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Uropathogenic *Escherichia coli*

เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุพบบ่อยมากที่สุดในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยร้อยละ 85 เป็นการติดเชื้อภายนอกโรงพยาบาล และร้อยละ 50 เป็นการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล *E. coli* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ หรือ uropathogen *E. coli* (UPEC) มาจากแบคทีเรียในทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract flora) โดยมีปัจจัยความรุนแรงที่สามารถเกาะติดหรือรวมตัวกันที่ฝีเย็บ (perineum) และท่อปัสสาวะแล้วเคลื่อนย้ายมาที่ระบบทางเดินปัสสาวะ เชื้อ UPEC ที่มี capsular acidic polysaccharide antigens มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกรวยไตอักเสบ

แบคทีเรียจะยึดติดเกาะกับเยื่อบุผิว (vaginal and urothelial epithelial cells) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเกาะติดคือ P fimbriae โดยมีบทบาทในการก่อโรคแบบ ascending UTI ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการยึดเกาะอีกชนิดคือ Afa adhesion ซึ่งสามารถยึดเกาะกับเซลล์ uroepithelium โดยใช้ AfaD และ AfaE adhesin นอกจากนี้ adhesion นี้ยังมีหน้าที่ช่วยหลีกเลี่ยงการตรวจจับของระบบภูมิคุ้มกันและยาต้านจุลชีพได้ ด้วยสาเหตุนี้สามารถอธิบายการเกิดการติดเชื้อซ้ำและการก่อโรคแบบเรื้อรังของ UPEC ได้ ในส่วนของปัจจัยก่อโรคนิคม secreted virulence factor ของ uropathogens ในส่วนของปัจจัยก่อโรคนิคม secreted virulence factor ของ uropathogens คือโปรตีน α -haemolysin ทำหน้าที่เป็น pore-forming toxin ซึ่งจัดเป็นสมาชิกของ RTX toxin family โดยสารพิษชนิดนี้มีการพบได้อย่างแพร่หลายในแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถก่อโรคได้ จากการศึกษานี้ของ Jonas และคณะ พบว่าความเข้มข้นของสารพิษต่ำๆ สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ของ neutrophils, T lymphocyte และเซลล์ไตได้ จึงทำให้เกิดการหลุดลอก (exfoliation) ของเซลล์ uroepithelium (Jonas et al., 1993) ในขณะที่สารพิษความเข้มข้นสูงเป็นสาเหตุให้เกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้เชื้อสามารถข้ามผนังเยื่อเมือกและก่อให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ (Johnson et al., 1991)

2.2 Antibiotic

2.2.1 Third generation cephalosporins

เป็นยาที่ถูกพัฒนาต่อจาก second-generation cephalosporins โดยการดัดแปลงหมู่แทนที่เป็นวงอะโรมาติกที่ตำแหน่ง R7 เป็นหมู่อะมิโนไทอะโซล (aminothiazole) ซึ่งมีผลทำให้ได้ยาที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียกว้างขึ้น สามารถผ่านเข้าสมองได้ จึงใช้เป็นยารักษาโรคสมอง

อีกเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pneumococci*, *Meningococci*, *Hemophilus influenzae* ได้ผลดีกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม *Enterobacterales* เช่น *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis* ยกเว้น *Enterobacter* spp. โดย third-generation cephalosporins เป็นยาที่ทนต่อเอนไซม์ beta-lactamases ได้ดีมากขึ้น แต่ไม่ทนต่อ AmpC beta-lactamases, extended spectrum beta-lactamases และ carbapenemases

1) Third generation cephalosporins ที่ใช้เป็นยาฉีด ได้แก่ cefotaxime, ceftriaxone และ ceftazidime ซึ่งเป็นยาที่ใช้ได้ผลกับ *P. aeruginosa*

2) Third generation cephalosporins ที่ใช้เป็นยารับประทาน ได้แก่ cefdinir, cefibuten, cefditoren, cefixime

กลไกการออกฤทธิ์ cephalosporin เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม beta-lactam มีกลไกการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยจับกับ PBP's และยับยั้งกระบวนการ transpeptidation ของการสังเคราะห์ peptidoglycan ทำให้โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียไม่สมบูรณ์และไม่สามารถดำรงชีพต่อไปได้ third-generation cephalosporins เป็นยาที่มีหมู่ฟังก์ชันในตำแหน่งที่ 7 เป็นหมู่ amino thiazolyl-oxyimino มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ กว้างมากกว่า second-generation cephalosporins และมีความทนต่อเอนไซม์ beta-lactamases ดีมาก ยกเว้นเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ในกลุ่ม ESBLs

2.2.2 Carbapenems

เป็นยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม beta-lactams ออกฤทธิ์ครอบคลุมทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ในปัจจุบันใช้ในรูปแบบยาฉีด สำหรับการรักษาอาการติดเชื้อรุนแรงในโรงพยาบาล ยา carbapenems รุ่นใหม่มีการพัฒนาโครงสร้างทางเคมีให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีขึ้น มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียกว้างขึ้น ในอนาคตจะมีรูปแบบรับประทานซึ่งอยู่ในรูป ester prodrug

การรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ กลุ่มยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างเคมีที่เรียกว่า beta-lactam antibiotics สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด carbapenems เป็นอนุพันธ์ทางธรรมชาติที่พัฒนามาจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces cattleya* ในทางคลินิกจัดให้ยากลุ่มนี้เป็นทางเลือกสุดท้ายหลังจากใช้ยาต้านแบคทีเรียกลุ่มอื่นแล้วไม่ได้ผล

กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม carbapenems คือ ตัวยาจะยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยตัวยาจะเข้าจับกับเอนไซม์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ มีชื่อเรียกว่า penicillin-binding protein enzymes ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและตายลงในที่สุด

2.2.3 โคลิสติน (Colistin) หรือ โพลีมัยซิน อี (Polymyxin E)

เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่ม polymyxins ซึ่งถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1947 ใช้สำหรับรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่เนื่องจากยานี้ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้สูง โดยเฉพาะพิษต่อไตและพิษต่อระบบประสาท ดังนั้นเมื่อมีการค้นพบยาต้านจุลชีพชนิดอื่นที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีและมีความเป็นพิษต่ำ การใช้ยาโคลิสตินในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียจึงลดลง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากปัจจุบันอุบัติการณ์ดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *A. baumannii*, *P. aeruginosa* และ เชื้อกลุ่ม Enterobacterales ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล จึงทำให้มีการนำยาโคลิสตินกลับมาใช้อีกครั้ง

ยาโคลิสตินเป็นยาต้านจุลชีพประเภท polypeptide cationic ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีโครงสร้างเป็นสารโพลีเปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับกรดไขมัน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal) โดย cationic polypeptide ของยาโคลิสตินทำปฏิกิริยากับ anionic lipopolysaccharide (LPS) ที่ outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้ยาเข้าแทนที่แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ทำให้เกิดการเพิ่ม permeability ของผนังเซลล์ ทำให้ cytoplasmic membrane แยกออกจากกัน ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตาย (Koomanachai et al., 2015)

ยาโคลิสตินใช้รักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่รุนแรง, การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ และอาจใช้รักษาโรคอื่นๆ ตามดุลพินิจของแพทย์ รูปแบบของยาโคลิสตินมี 2 รูปแบบ ได้แก่

1) Colistin sulphate เป็นยาเฉพาะที่ เช่น ยาหยอดตา, ยาหยอดหู, ยาทาผิวหนัง และยารับประทาน มีฤทธิ์ทำลายเชื้อในลำไส้ เนื่องจากยานี้ไม่ถูกดูดซึมจากกระเพาะอาหารและลำไส้ ไม่สามารถให้โดยการฉีดเพื่อรักษาโรคติดเชื้อตามระบบได้เนื่องจากมีพิษมาก

2) Sodium colistin methanesulfonate หรือ colistin methanesulfonate หรือ colistin sulfomethate หรือ colistimethate (CMS) เป็นยาดูดซึมเข้าหลอดเลือดดำ, ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, พ่นเข้าหลอดลม หรือฉีดเข้าน้ำไขสันหลัง เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นโคลิสตินซึ่งมีฤทธิ์มากกว่า CMS ประมาณ 2 ถึง 4 เท่า ดังนั้น CMS จึงเปรียบเสมือน prodrug ของโคลิสติน

2.3 การดื้อยาต้านจุลชีพของ uropathogenic *E. coli*

การรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะส่วนล่างแบบไม่ซับซ้อนสามารถใช้ยาต้านจุลชีพแบบครั้งเดียวหรือระยะสั้นได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาแบบครั้งเดียวมักจะมีอัตราการกลับเป็นซ้ำที่สูง จากแนวทางการรักษาตาม International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women ของสมาคมโรคติดเชื้อประเทศ

สหรัฐอเมริกา (Infectious Disease Society of America; IDSA) ในปี ค.ศ. 2011 (Gupta et al., 2011) ระบุว่ายาที่ควรพิจารณาเลือกใช้ได้แก่ nitrofurantoin, cotrimoxazole (TMP/SMZ), fosfomycin และ pivmecillinam สำหรับโรคกรวยไตอักเสบเฉียบพลัน (acute pyelonephritis) จัดเป็นการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะส่วนบน ซึ่งเป็นการติดเชื้อที่มีความรุนแรงผู้ป่วยอาจมีภาวะ sepsis ได้ ดังนั้นในการรักษาการติดเชื้อดังกล่าวต้องให้ยาที่มีความเข้มข้นของยาในกระแสเลือดและในเนื้อไตที่สูงเพียงพอในการกำจัดเชื้อ โดยยาที่ใช้ในการรักษาโรคกรวยไตอักเสบเฉียบพลันได้แก่ยาในกลุ่ม quinolones เช่น ofloxacin, ciprofloxacin หรือ levofloxacin

ปัจจุบันประเทศไทยกำลังประสบปัญหาของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ ในชุมชนคือดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิดที่เคยใช้ได้ผลในการรักษา จากรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อคือยาด้านจุลชีพแห่งชาติในปี พ.ศ. 2556 พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยนอกคือดื้อยา TMP/SMZ และ ampicillin ที่เคยถูกแนะนำในแนวทางการรักษาให้เป็นยาที่ควรเลือกใช้รักษาเป็นอันดับแรก (first line drug) เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 60.6 และ 86.9 ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นในแนวทางการรักษาตามสมาคมโรคติดเชื้อของประเทศสหรัฐอเมริกา (IDSA) ในปี ค.ศ. 2011 ได้แนะนำว่าในกรณีที่มีอุบัติการณ์ของเชื้อคือดื้อยา TMP/SMZ สูงเกินร้อยละ 20 ควรพิจารณาเปลี่ยนการรักษามาใช้ยาในกลุ่ม quinolones แทนจึงส่งผลให้ในปัจจุบันยาในกลุ่ม quinolones ถูกแนะนำให้พิจารณาใช้เป็นอันดับแรกในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและมีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น สถานการณ์ในปัจจุบัน ประเทศไทยกำลังประสบปัญหาการคือดื้อยาในกลุ่ม quinolones ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยในชุมชน มีการรายงานพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยในชุมชนคือดื้อยาในกลุ่ม quinolones มากกว่าร้อยละ 50 จากการศึกษาของ Karlowsky และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ประเมินความไวของยาในกลุ่มผู้ป่วยนอกที่ผลเพาะเชื้อเป็น *E. coli* ที่คือดื้อยาในกลุ่ม quinolones ทั้งหมด ผลการศึกษาพบว่า third generation cephalosporins (cefdinir, ertapenem และ nitrofurantoin เป็นยาที่มีความไวเกินร้อยละ 85 ต่อเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น ciprofloxacin resistant *E. coli* (Karlowsky et al., 2006) โดยเฉพาะยา nitrofurantoin ซึ่งให้ผลความไวต่อเชื้อ *E. coli* สูงถึงร้อยละ 93.71 ซึ่งต่อมาได้มีการแนะนำแนวทางการพิจารณา ยาทางเลือก (drug of choice) สำหรับ *E. coli* ที่คือดื้อยาในกลุ่ม quinolone ให้ใช้ยา amoxicillin/clavulanic acid, third generation cephalosporins และ nitrofurantoin ปัจจุบันพบการคือดื้อยาจากการสร้างเอนไซม์ Beta-Lactamases ชนิด ESBLs และ AmpC cephalosporinases แนวทางการเลือกใชยาด้านจุลชีพในการรักษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือดื้อยามีค่อนข้างจำกัด เชื้อ *K. pneumonia* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs สามารถใช้ยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งถือว่าเป็นยาที่มีฤทธิ์กว้างที่สุด จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อคือยาด้านจุลชีพแห่งชาติสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (NARST)

ในปี พ.ศ. 2560 พบการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ในเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* คิดเป็นร้อยละ 1 และ 13 ตามลำดับ และในปี พ.ศ. 2561 มีรายงานการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ใน *E. coli* และ *K. pneumoniae* ร้อยละ 6.10 และ 22.86 ตามลำดับ (ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. 2562) จะเห็นได้ว่าแนวโน้มการพบเชื้อ carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) เพิ่มขึ้น แต่กรณีที่เป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (multi-drug resistance, MDR) เช่น เชื้อสร้างเอนไซม์ New Delhi metallo-beta-lactamases (NDM-1) ซึ่งทำลายยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactam เหลือเพียงยากลุ่ม polymyxin และ tigecycline เท่านั้นที่ยังสามารถใช้รักษาได้ ทำให้แพทย์มีความจำเป็นต้องใช้ยาที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ เช่น ยาโคลิสติน ในกลุ่มของ polymyxin

2.4 กลไกการดื้อยา colistin

2.4.1 Intrinsic Resistance

การดื้อยาโคลิสตินติดแบบเกิดขึ้นตามธรรมชาติพบใน *Serratia marcescens* และ *Proteus mirabilis* จากการแสดงออกของยีน *arnBCADTEF* และ *eptB* ทำให้เกิดการเติม phosphoethanolamine (pEtN) และ 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) ที่มีประจุบวกบน LPS การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทำให้เพิ่มประจุบวกบน LPS ซึ่งเป็นเป้าหมายเริ่มต้นของ colistin ทำให้ยาเข้าจับกับเป้าหมายได้น้อยลงส่งผลให้ความไวของเชื้อต่อยาลดลง

2.4.2 Acquired Resistance

2.4.2.1 Chromosomal Modulation of PmrAB and PhoPQ Two-Component Systems

Salmonella และ *E. coli* สามารถดัดแปลง LPS โดยการเปลี่ยน lipid A ผ่านการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) และ / หรือ phosphoethanolamine (PEtn) การสังเคราะห์นี้เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในโครโมโซม (chromosomally-mediated) เช่นเดียวกับการดื้อยาโคลิสตินแบบเกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยอาศัย two-component systems (TCS) PmrA/PmrB และ PhoP/PhoQ ระบบแรก PmrA/PmrB ทำหน้าที่ควบคุม PMrHIJKLM operon ซึ่งส่งเสริมการสังเคราะห์ N4-aminoarabinitol เมื่อเกิดพันธะเคมีกับชิ้นส่วนของไขมัน A จะเปลี่ยนประจุลบของ cell membrane โดยการทำให้ phospholipid ที่มีประจุลบเป็นกลาง ซึ่งกลไกนี้พบได้ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* กลไกการดื้อโคลิสตินใน *K. pneumoniae* ผ่านการกลายพันธุ์ของ phoP/phoQ TCS และตัวควบคุม mgrB นำไปสู่การดัดแปลงหรือการสูญเสียชั้นเมมเบรนของ LPS

2.4.2.2 Mutation in LPS Synthesis Genes

การสังเคราะห์ LPS ควบคุมโดยยีน *ramA* ที่มียีนย่อยสามยีน คือ *ramA*, *romA*, และ *ramR* มีรายงานว่าระดับ *ramA* ที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนการสังเคราะห์ lipid A ที่ควบคุมอุปสรรคการซึมผ่าน LPS ส่งผลให้เพิ่มความต้านทาน colistin การสูญเสียผลลัพท์ LPS (De Majumdar S, 2016) นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่ *lpxA*, *lpxC* และ *lpxD* ที่ควบคุมกับการสังเคราะห์ไขมันทำให้สูญเสียการผลิต LPS ส่งผลให้ไม่เกิดการจับตัวของ colistin กับเมมเบรน (Saleh et al., 2020)

2.4.2.2 แคปซูล (capsular polysaccharide; CPS)

แคปซูลในแบคทีเรียทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากภายนอกจนถึงโคลิสติน มีรายงานว่ารูปแบบความต้านทานขึ้นอยู่กับจำนวนชั้นของแคปซูลที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้ เช่น เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มีแคปซูลหลายชั้นมีความต้านทานได้ดีกว่าแบคทีเรียที่มีแคปซูลเพียงไม่กี่ชั้น (Formosa C, 2015) นอกจากนี้ การแสดงออกของ CPS สังเคราะห์ที่ไม่มีการควบคุม มีรายงานว่า two-component PhoPQ และการเกิด efflux pump ถูกกระตุ้นด้วย Cpx (conjugative pilus expression) and Rcs (regulator of capsule synthesis) ที่ควบคุมการสร้างแคปซูล (Zhai et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบยีน *ugd* ในการสังเคราะห์ CPS และ L-Ara4N ในขบวนการฟอสโฟริเลชันทำให้เกิดการรวมตัวเป็นแคปซูลในแบคทีเรียซึ่งทำให้ดื้อต่อโคลิสติน (Lacour et al., 2006)

2.4.2.3 Efflux pump

ยีน *KpnEF*, *AcrAB* และ *Sap* ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ทำให้เกิดการปั๊มยาออกจากเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้ดื้อโคลิสติน นอกจากนี้ยังมีสังเกตพบว่า PhoPQ TCS ขึ้นอยู่กับการแสดงออกของ *AcrAB* (Parra-Lopez et al., 1993)

2.4.2.4 Plasmid-mediated *mcr*-like genes

Plasmid-mediated colistin resistance gene (*mcr*) ควบคุมการสร้าง lipid A phosphoethanolamine transferase ซึ่งทำให้สามารถความต้านทานต่อยาโคลิสตินโดยการถ่ายโอน phosphoethanolamine ให้กับ lipid A ในช่วงเวลาสั้น ๆ ทั่วโลกพบการดื้อยาโคลิสตินใน *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ซึ่งมียีน *mcr-1* ตั้งแต่สัตว์ที่นำมาผลิตเป็นอาหาร มนุษย์ และสภาพแวดล้อม ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ามีการส่งผ่านยีนดื้อยาโคลิสตินแบบ horizontal transmission ปัจจุบันมีการค้นพบยีน *mcr* family ตั้งแต่ *mcr 1* ถึง *mcr 10* บน plasmid ของแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae*

2.4.2.5 Class 1 integron-integrase gene (*int 1*)

Integrons จัดเป็น genetic elements ที่มีคุณสมบัติสามารถในการคัดเลือกและรวมส่วนของ gene cassettes เข้าไปแทรกในส่วนของ operon โดยใช้กลไก site-specific recombination โดย integron นี้อาจพบบน transposon หรือ conjugative plasmid ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพสามารถแพร่กระจายได้ง่าย ปัจจุบันสามารถแบ่ง integron ออกเป็น 8 class โดยแบ่งตามความแตกต่างของลำดับเบส integrase gene เฉพาะ class 1, 2 และ 3 ที่เกี่ยวข้องกับ gene cassettes ที่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยเฉพาะ class 1 (*int 1*) พบเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายยีนดื้อยา (Vásquez-Ponce et al., 2019)

2.5 อุบัติการณ์ดื้อยา colistin

จากรายงานของ European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ในปี พ.ศ. 2560 พบเชื้อดื้อยา colistin ร้อยละ 8.5 (ร้อยละ 2.4 พบใน *K. pneumoniae* ส่วนใน *E. coli* พบเพียงเล็กน้อย) ประเทศไทยปัญหาการดื้อยาที่สำคัญ คือ การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในโรงพยาบาล เช่น *Acinetobacter* spp. และ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาในชุมชน เช่น *E. coli* และ *Klebsiella* spp. มีการรายงานเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยากลุ่ม จำนวน 243 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลราชบุรี ในช่วงเวลา 2559-2560 พบเชื้อดื้อยาโคลิสติน ร้อยละ 16.5 และตรวจพบยีน *mcr-1* ร้อยละ 2.46 โดยพบมากในสิ่งส่งตรวจ ปัสสาวะ คิดเป็นร้อยละ 42.5 (Wongut-sa et al., 2020)

2.6 วิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Nwai Oo Khine, et al., 2020 ได้ศึกษาความถี่ของยีน *mcr-1* ในเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างอุจจาระของสุกรที่มีสุขภาพดีในระบบเกษตรกรรมทั่วประเทศไทยทั้งหมด 696 ตัวอย่าง จากฟาร์ม 80 แห่ง ใน 49 จังหวัดของประเทศไทยที่ดื้อยาโคลิสตินจากสุกรขุนอายุ 18 ถึง 20 สัปดาห์ แต่ละตัวที่มีลักษณะปกติและไม่มีประวัติโรคถ่ายไส้หรือการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ พบว่าการแพร่กระจายของการดื้อยาโคลิสติน ในเชื้อ *E. coli* ที่มียีน *mcr-1* ดื้อต่อยาโคลิสตินทั้งหมด 105 จาก 696 ตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* ที่ถูกแยกโดยใช้สี eosin methylene blue จาก broth microdilution method และจากการตรวจ PCR พบว่ามียีน *mcr-1* และ *mcr-3* ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ 31 ใน 105 ชนิด ที่ดื้อยาโคลิสติน จึงสรุปได้ว่าการตรวจหา ยีน *mcr-1* และ *mcr-3* ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิดในตัวอย่างจากสุกรทั้งหมด 696 ตัวอย่าง พบเชื้อ *E. coli* ที่มียีน *mcr-1* ร้อยละ 4.45 และพบเชื้อ *E. coli* ที่มีทั้งยีน *mcr-1* และ *mcr-3* ร่วมกันร้อยละ 0.43

จากงานวิจัยของวิญญู ธรรมลิขิตกุล (2551) ได้ศึกษาความชุกของการติดเชื้อในโรงพยาบาล 20 แห่งทั่วประเทศไทย พบความชุกเฉลี่ยของการติดเชื้อร้อยละ 6.5 มีอัตราการติดเชื้อในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ร้อยละ 7.6 และหอผู้ป่วยร้อยละ 22.6 ซึ่งมากกว่าอัตราการติดเชื้อในโรงพยาบาลขนาดเล็กร้อยละ 4.9 และหอผู้ป่วยทั่วไปร้อยละ 1.1-6.8 การติดเชื้อในโรงพยาบาลมักเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบร้อยละ 70 และ methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA ร้อยละ 5 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. และ *Klebsiella pneumoniae* เชื้อแบคทีเรียมักคือยาต้านจุลชีพหลายขนาน เช่น *P. aeruginosa*, *A. baumannii* การทดสอบความไวของแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลศิริราช พ.ศ. 2550 พบว่า *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* คือยาในกลุ่ม beta-lactams, aminoglycosides และ fluoroquinolones ซึ่งยานี้เป็นยาหลักสำหรับรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อทุกสายพันธุ์ได้รับการทดสอบความไวกับยาโคลิสติน ดังนั้นยาโคลิสตินจะเป็นยาต้านจุลชีพที่มีบทบาทสำคัญสำหรับรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ความชุกของ *A. baumannii* ที่คือยาต้านจุลชีพ ทุกขนาน ในกลุ่ม beta-lactams, aminoglycosides และ fluoroquinolones ในโรงพยาบาลศิริราช ผู้ป่วยเหล่านี้มักได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพหลายขนานร่วมกัน (เช่น meropenem ร่วมกับ netilmicin ร่วมกับ cefoperazone/sulbactam) ปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยาต้านจุลชีพ คือ การมีสายหรือท่อต่างๆ ในร่างกายและการได้รับยาต้านจุลชีพมาก่อน ยาในกลุ่มโพลีมัยซินถูกนำมาใช้รักษาการติดเชื้อคือยา ผู้วิจัยทดสอบฤทธิ์ของยาโพลีมัยซิน บี และยาโคลิสติน ต่อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่คือยาต้านจุลชีพทุกขนาน พบว่าทุกสายพันธุ์ไวต่อยาโพลีมัยซิน บี และยาโคลิสติน

จากงานวิจัยของนิตยา สิงห์พลทัน (2563) ได้ศึกษาการคือยาในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ปัญหาอุบัติใหม่และน่ากลัวมากที่สุดปัญหาหนึ่ง คือ การระบาดของเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriales* ที่คือยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์กว้างที่สุด ในปัจจุบันมีรายงานการพบ *Enterobacteriales* ที่คือยาในกลุ่ม carbapenems การคือยานี้จะส่งผลกระทบต่อการรักษา แต่โคลิสตินเป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่จะใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือยาหลายขนาน รวมทั้งเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriales* ที่คือยาในกลุ่ม carbapenems ในปัจจุบันพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการนำยาโคลิสตินมารักษาการติดเชื้อในผู้ป่วย จึงทำให้พบเชื้อคือยานี้เพิ่มขึ้น ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่สัมพันธ์กับการคือยาโคลิสตินคือ การได้รับยาโคลิสตินเป็นเวลานาน มีรายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่คือยาโคลิสตินสามารถส่งต่อยีนคือยาข้ามสายพันธุ์ได้ง่ายขึ้นและเร็วขึ้น (*mcr-1*) ในการศึกษาตรวจหายีน *mcr-1* ที่คือยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriales* ที่คือยาในกลุ่ม carbapenems ในโรงพยาบาลต่างๆ ในประเทศจีนช่วงเดือนมกราคม พ.ศ.2557 พบ

ยีน *mcr-1* ในผู้ป่วย 3 รายใน 2 จังหวัด ปัจจุบันพบเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา *mcr-1* ในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย โดยมีรายงานการดื้อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีน *mcr-1* และอาจเป็นปัญหาในอนาคต งานวิจัยนี้ศึกษาอุบัติการณ์การดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriales* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems พบการดื้อยาร้อยละ 18.8 และยังตรวจไม่พบยีนดื้อยาชนิด *mcr-1* ที่ทำให้เชื้อดื้อยาโคลิสตินในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวัง และมีมาตรการควบคุมไม่ให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้น

จากงานวิจัยของปญชรธรรมี วงษ์อุตสาห (2563) ได้ศึกษาหาความชุกของการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriales* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือ carbapenems และศึกษาหา ยีน *mcr-1* ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยติดเชื้อไม่ซ้ำรายในโรงพยาบาลราชบุรี วิจัยยืนยันเชื้อด้วยการทำ biochemical test โดยเชื้อที่ใช้ไม่ใช่เชื้อที่ดื้อยาโคลิสตินโดยกำเนิด ทำการเพาะเลี้ยงบน MacConkey agar และ Mueller-Hinton agar (MHA) ที่มียาโคลิสตินผสมอยู่ จากนั้นนำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution และวิธี Polymerase chain reaction เพื่อตรวจหา ยีน *mcr-1* พบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriales* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือ carbapenems จำนวน 243 ตัวอย่าง เมื่อนำมาหาค่า MIC พบว่ามีเชื้อ 40 ตัวอย่างที่ดื้อยาโคลิสติน โดยเป็นเชื้อ *E. coli* 21 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* 19 ตัวอย่าง และในเชื้อ 40 ตัวอย่างพบว่าเป็นเชื้อที่มาจากสิ่งส่งตรวจจากปัสสาวะ 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.5 และจากการทำ PCR พบว่าใน 40 ตัวอย่างที่ดื้อยาโคลิสติน มี 6 ตัวอย่างที่พบยีนดื้อยา *mcr-1* ซึ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา third generation cephalosporins ทั้งหมด โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 4-16 ug/ml จากข้อมูลแสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของยีนดื้อยา *mcr-1* ที่เพิ่มมากขึ้นจึงเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อควบคุมการระบาดของยีนดื้อยาต่อไป

จากงานวิจัยของ Fouzia, et al., 2018 ได้ศึกษา Class 1 integrons ในผู้ป่วย uropathogenic *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนานจากโรงพยาบาล Karachi โดยนำเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Kirby Bauer disc diffusion method ตาม CLSI ทดสอบกับยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ampicillin, aztreonam, amoxicillin/clavulanic acid, imipenem, amikacin, ceftriaxone, cefepime, cefuroxime, ciprofloxacin, nalidixic acid, piperacillin-tazobactam, cotrimoxazole จากผลการศึกษาพบว่า 500 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนาน 105 ตัวอย่าง และเมื่อนำเชื้อมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า มากกว่าร้อยละ 50 ของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ สามารถต้านทานต่อยา aztreonam, amoxil/clav acid, ampicillin, cotrimoxazole, ceftriaxone, cefepime, cefuroxime และประมาณร้อยละ 40 ของเชื้อที่แยกได้สามารถต้านทานต่อ imipenem, mikacin, กรด nalidixic ซึ่งเชื้อที่แยกได้เหล่านี้ได้รับการยืนยันเพิ่มเติมว่าเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน โดย

amplification 16srRNA และยังพบอีกว่า 105 ตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนาน มียีน ESBL จากการศึกษาค้นคว้า Integrations พบยีน Class 1 integrase ร้อยละ 79 ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนาน เป็นยีน *intI1*, *qacEΔ1* และ *sul1* ร่วมกันร้อยละ 58 เป็นยีน *qacEΔ1*, *sul1* ร้อยละ 5 และเป็นยีน *intI*, *sul1*, *qacEΔ1* ร้อยละ 10, 10, 6 ตามลำดับ ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าการแพร่กระจายของยีนต่างๆ ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ และยังเกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางพันธุกรรมที่เรียกว่า Integrations ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา Integrations มีบทบาทสำคัญในการส่งผ่านยีนแบบ Horizontal transmission ของยีนต้านทานยาปฏิชีวนะในแบคทีเรีย Integrations มี site เฉพาะคือ *attI1* ซึ่ง cassettes ของยีนสามารถรวมเข้าด้วยกันโดยการรวมตัวกันใหม่เฉพาะ site ซึ่ง encoded โดยยีน *intI1* และ *int-1* ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายขนานอีก

จากงานวิจัยของ Mahboobe และคณะ ได้ศึกษาความชุกการดื้อยาและ class 1 และ 2 Integron ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ จากโรงพยาบาลในอิหร่าน โดยเก็บตัวอย่าง 100 ตัวอย่าง มายืนยันเชื้อด้วยการทำการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *E. coli* แล้วนำเชื้อไปทดสอบการดื้อยาด้วยการ Disk diffusion method ตามมาตรฐานของ CLSI โดยทดสอบกับยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Ampicillin, amikacin, gentamicin, ceftazidime, cefotaxime, ciprofloxacin, co-trimoxazole และ nalidixic acid จากนั้นนำมาทำ PCR เพื่อตรวจหา class 1 และ 2 Integron ผลการศึกษาพบว่า 100 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็น *E. coli* ทั้งหมด และเป็นเชื้อ *E. coli* ดื้อยาหลายขนาน (MDR) 80% การวิเคราะห์ระดับโมเลกุล แสดงให้เห็นว่า 70% ของเชื้อที่แยกได้พบ class 1 integron ในขณะที่ class 2 integron พบเพียง 3% นอกจากนี้ class 1 integron มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin, co-trimoxazole และ nalidixic acid ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญมากในการติดตามการดื้อยาที่เกิดจาก integron โดยเฉพาะ class 1 integron เพื่อควบคุมการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะที่เกิดจาก *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนาน

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 แบบที่เรีที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1. เชื้อ *E. coli*

คำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรการคำนวณเชื้อ *Escherichia coli* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ ที่ดื้อยาโคลิสติน และพบ *mcr-1* ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 ซึ่งพบความชุกประมาณร้อยละ 2.46 ($P = 0.0246$) (Wongut-sa et al., 2020)

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร} \quad n &= \frac{Z^2 \alpha P(1-P)}{e^2} \\ \text{กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95\% หรือ } \alpha &= 0.05 \\ Z_{\alpha/2} &= 1.96 \\ \text{กำหนดให้ } e = 0.05 \text{ (ยอมรับให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ 5\%)} \\ N &= \frac{1.96^2 \times 0.0246(1-0.0246)}{(0.05)^2} \\ &= 36.8 \end{aligned}$$

ดังนั้น จำนวนเชื้อที่เหมาะสมในการทำวิจัยคือ 37 ตัวอย่าง

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจาก Tewawong (2020) โดยพบเชื้อ *E. coli* ก่อโรคทางเดินปัสสาวะดื้อยา Third generation cephalosporins หรือ carbapenem จำนวน 83 สายพันธุ์ (ร้อยละ 40) ผู้วิจัยจึงจะใช้ตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 83 สายพันธุ์ มาศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยเชื่อดังกล่าวถูกเก็บไว้ที่ -20°C คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

3.1.2. เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน

Escherichia coli ATCC25922 สำหรับการทดสอบความไวต่อยา การหาค่า MIC ของยาโคลิสติน

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องมือ

1) Palm Micro Centrifuge (D1008)	DLAB Scientific Co., Ltd. / China
2) Vortex Mixer (MX-s)	Scilogex / USA.
3) Thermal Cyclers (T100)	Bio-Rad Laboratories / USA.
4) Mini Electrophoresis System (Mini-ES2)	Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. / China
5) Gel Documentation System (GelDoc Go)	Bio-Rad Laboratories / USA.
6) Hot air oven	Memmert / Germany
7) Autoclave	Hirayama / Japan
8) Water bath	GFL / Germany

3.2.2 อุปกรณ์

1) Pipette Tips, 1,000 μ l	Tarsons Product / India
2) Pipette Tips, 1-200 μ l	Kirgen Bioscience Co., Ltd. / China
3) Pipette Tips, 5-10 μ l	ABDOS / India
4) Microcentrifuge tube, 1.5 ml	Tarsons Product / India
5) Automatic pipette, 100-1,000 μ l	Eppendorf / Germany
6) Automatic pipette, 20-200 μ l	Biohit / Finland
7) Microtiter plate	Thermo Fisher Scientific / USA.
8) Eppendorf tube	Tarsons Product / India
9) PCR Tubes, 0.2 ml	BIOFIL / China
10) Loop	Unitasin / USA.
11) Needle	Unitasin / USA.
12) Glass tube	PYREX / USA.
13) ถุงมือยาง	SRITRANG GLOVES / Thailand

3.2.3 สารเคมีในการทดสอบ PCR

1) Agarose gel	BIOLINE / USA.
2) TBE buffer 10X	SERVA / Germany
3) 10X buffer taq	Quanta Bioscience / USA.
4) dNTPs	Quanta Bioscience / USA.
5) Magnesium chloride	Quanta Bioscience / USA.
6) Oligonucleotide primer	Macrogen / South Korea
7) Taq DNA polymerase	Quanta Bioscience / USA.

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

1) Tryptic Soy Agar	HIMEDIA / India
2) Cation adjusted Mueller - Hinton Broth (CAMHB)	Thermo Fisher Scientific / USA.

3.2.3 สารเคมีในการทดสอบ broth microdilution

1) Colistin Sulphate	Sigma-Aldrich / USA.
----------------------	----------------------

3.3 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี broth microdilution

3.3.1 การตรวจคัดกรองเชื้อดื้อยาโคลิสติน โดยวิธี agar screening

เจือจางเชื้อตัวอย่างใน normal saline solution (NSS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นให้เทียบเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 จากนั้น นำเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) ที่มียาโคลิสติน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) หลังจาก บ่มที่อุณหภูมิ 33-37 °C นาน 16-20 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่า MIC และนำไปสกัด plasmid DNA เพื่อตรวจหายีนดื้อยาต่อไป

3.3.2 การทดสอบความไวแบบปริมาณวิเคราะห์ของเชื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี broth microdilution

ทดสอบความไวต่อยาโคลิสตินสำหรับเชื้อ *E. coli* เป็นไปตามข้อกำหนดของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2022) นำเชื้อที่ขึ้นบน screening agar มาทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution ที่ระดับความเข้มข้นของยาโคลิสติน เท่ากับ 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32 และ 64 µg/ml และควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วยเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* NCTC 13846 (colistin resistant strain)

นำค่า MIC ที่ได้มาแปลผลการทดสอบตามที่กำหนดโดยมาตรฐานของ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2022) ซึ่งแปลผลการดื้อยาโดยใช้ค่า MIC breakpoint ≤ 2 และ ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ แปลผลเป็น intermediate และ resistance ตามลำดับ

3.4 ตรวจยืนยันเชื้อ *E. coli*

นำเชื้อ *E. coli* จาก stock ซึ่งเก็บไว้ที่ -20°C มาเพาะเลี้ยงบน tryptic soy agar บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง สกัด DNA ของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธีการต้ม ทำได้โดยการเขี่ยโคโลนีของเชื้อจาก tryptic soy agar 3-5 โคโลนี ใส่ลงไปใน microtube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 20 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสไว้ใน microtube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ หาคความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้ NanoDrop 1000 spectrophotometer ซึ่ง DNA ที่สกัดได้นี้จะใช้เป็น template ในขั้นตอนการทำ polymerase chain reaction (PCR) ตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อ *E. coli* โดยการตรวจหาชิ้น 16srRNA ด้วยวิธี PCR (Momtaz et al. , 2013)

3.5 การสกัด plasmid

นำเชื้อ *E. coli* จากข้อ 7.2.1 เพิ่มจำนวนใน Luria-Bertani (LB) broth บ่มที่ 37°C ที่ shaker incubator นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการสกัด plasmid ด้วยชุดสกัด (GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA) หาคความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้ NanoDrop 1000 spectrophotometer และทำการเก็บ plasmid ที่ -20°C

3.6 ตรวจหาชิ้น *mcr* และ *Int1* ในเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

3.6.1 ตรวจหาชิ้น *mcr* (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* และ *mcr-10*) ด้วยวิธี multiplex PCR; mPCR (Nguyet LTY, 2022)

ส่วนผสมในการทำ mPCR (20 μl) ประกอบด้วย 0.04 μM ของแต่ละ forward primer และ reverse primer, ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *E. coli* 20 ng และ 1x Green PCR mix kit (Biotech rabbit, Germany) primer และ ขนาดของ PCR product ดังแสดงในตารางที่ 1 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ pre-denaturation ที่ 94°C นาน 3 นาที ทำการเพิ่มจำนวน DNA 25 รอบ (denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 58°C นาน 90 วินาที, extension ที่ 72°C นาน 60 วินาที, และ final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที ตรวจหา PCR product ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis และนำไปดูผลภายใต้ UV transilluminator ตัด gel บริเวณที่มีขนาดเทียบเท่ากับ PCR product ที่ต้องการ

ทำให้ gel บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Kit เพื่อทำ DNA sequencing (Macrogen, South Korea) นำผล DNA sequences ของแต่ละยีนตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST

3.6.2 การตรวจหา class 1 integron-integrase gene (*Int1*) ด้วยวิธี PCR

ส่วนผสมสำหรับ PCR reaction และ PCR condition สำหรับตรวจหา *Int1* ใช้สภาวะเดียวกับข้อ 7.5.1 primer และ ขนาดของ PCR product ของ *Int1* ดังแสดงในตารางที่ 3.1

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.7.1 วิเคราะห์หาความชุกของยีน *mcr-1* และ *int-1* ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา third generation cephalosporins หรือ carbapenems ในรูปแบบของร้อยละ

3.7.2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง phenotype และ genotype ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาโคลิสตินและตรวจพบยีนดื้อยาด้วย Cohen's kappa coefficient in SPSS version 23 (IBM Corp. in Armonk, NY) กำหนด P value < 0.05

ตารางที่ 3.1 Primer sequences และ PCR product (Nguyet LTY, 2022)

Genes	F/R primer	Sequence	PCR product (bp)
<i>mcr-1</i>	MCR1F	5'-AGT CCG TTT GTT CTT GTG GC-3'	320
	MCR1R	5'-AGA TCC TTG GTC TCG GCT TG-3'	
<i>mcr-2</i>	MCR2F	5'-CAA GTG TGT TGG TCG CAG TT-3'	715
	MCR2R	5'-TCT AGC CCG ACA AGC ATA CC-3'	
<i>mcr-3</i>	MCR3F	5'-AAA TAA AAA TTG TTC CGC TTA TG-3'	929
	MCR3R	5'-AAT GGA GAT CCC CGT TTT T-3'	
<i>mcr-4</i>	MCR4F	5'-TCA CTT TCA TCA CTG CGT TG-3'	1116
	MCR4R	5'-TTG GTC CAT GAC TAC CAA TG-3'	
<i>mcr-5</i>	MCR5F	5'-ATG CGG TTG TCT GCA TTT ATC-3'	1644
	MCR5R	5'-TAC TTG TGG TTG TCC TTT TCT G-3'	
<i>mcr-6</i>	MCR6F	5'-GTC CGG TCA ATC CCT ATC TGT-3'	556
	MCR6R	5'-ATC CGG GAT TGA CAA GTA C-3'	

Genes	F/R primer	Sequence	PCR product (bp)
<i>mcr-7</i>	MCR7F	5'-TGC TAC AGC CCT TTT CGT-3'	892
	MCR7R	5'-TTC ATC TGC GCC ACC TCG T-3'	
<i>mcr-8</i>	MCR8F	5'-AAC CGC CAG AGC ACA GAA TT-3'	667
	MCR8R	5'-TTC CCC CAG CGA TTC TCC AT-3'	
<i>mcr-9</i>	MCR9F	5'-AGA ACA TGC ACG GAA CGG AT-3'	183
	MCR9R	5'-CTC ACG AAA AAC CCA CGC TG-3'	
<i>mcr-10</i>	MCR10F	5'-AGC CGT CTT GAA CAT GTG AG-3'	744
	MCR10R	5'-CAT ACA GGG CAC CGA GAC TG-3'	
<i>int1</i>	INT1-F	5'-CTC CCG CAC GAT GAT CGT-3'	450
	INT1-R	5'-TTG CGT GAG CGC ATA CGC-3'	
<i>16srRNA</i>	<i>16srRNAF</i>	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	919
	<i>16srRNAR</i>	5'-CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT-3'	



บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผล

4.1 รูปแบบการดื้อยาของกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem ของเชื้อ *E. coli*

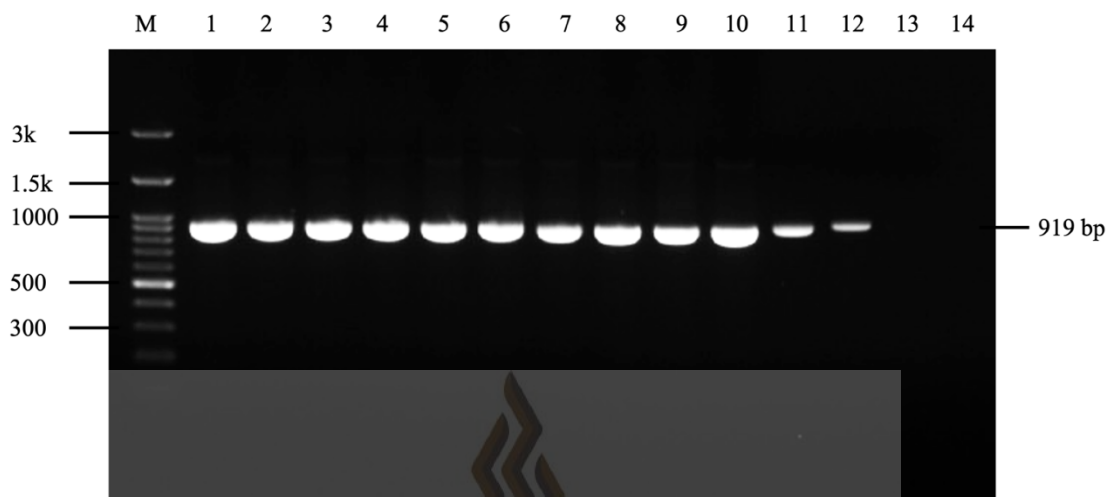
เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี ปี 2560 จำนวน 83 ตัวอย่าง จากข้อมูลการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* (Nipaporn, 2560) ซึ่งนำมาจัดรูปแบบการดื้อยา ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, ertapenem, meropenem และ imipenem สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ รูปแบบที่ 1 คือ เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporin ที่มียา ceftazidime ให้ผลการทดสอบเป็น intermediate จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.4 รูปแบบที่ 2 คือ เชื้อ *E. coli* ดื้อเฉพาะยาในกลุ่ม third generation cephalosporin จำนวน 73 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 88.0 และรูปแบบที่ 3 คือ เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.6 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 รูปแบบการดื้อยาของกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem ของเชื้อ *E. coli*

รูปแบบการดื้อยา	Ceftriaxone	Cefotaxime	Ceftazidime	Ertapenem	Meropenem	Imipenem	จำนวน (ร้อยละ)
1	R	R	I	S	S	S	7 (8.4)
2	R	R	R	S	S	S	73 (88.0)
3	R	R	R	R	R	R	3 (3.6)

4.2 การตรวจหายีน *16S rRNA* ในเชื้อ *E. coli*

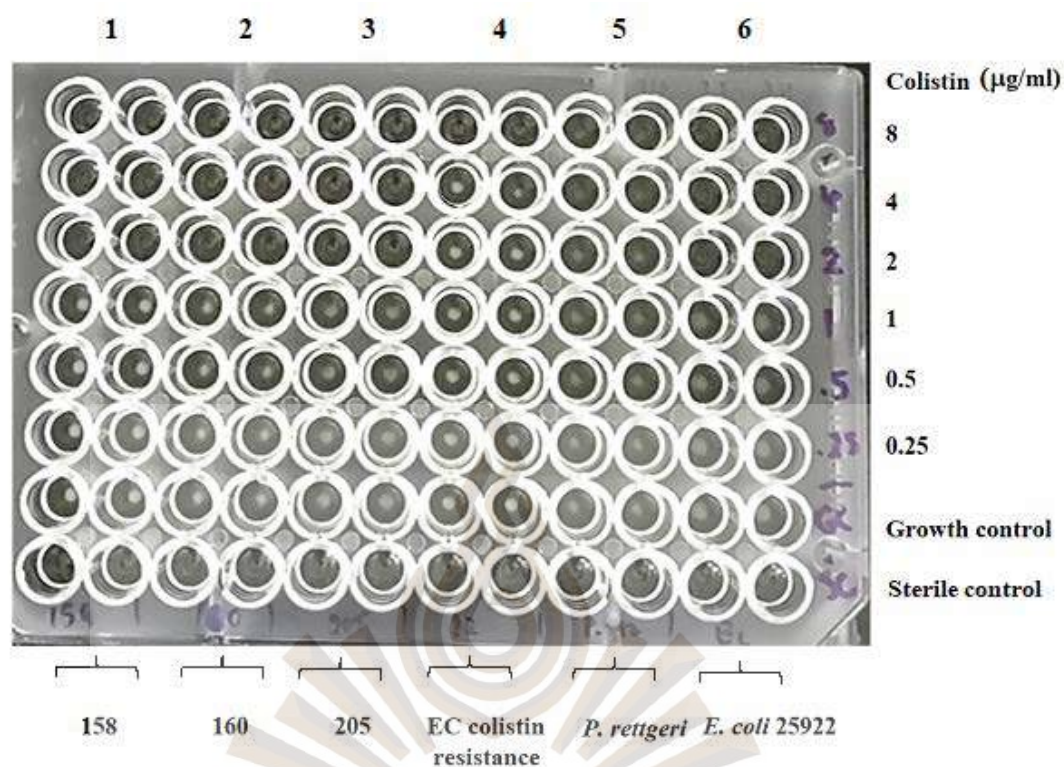
เชื้อ *E. coli* ทั้ง 83 ตัวอย่าง ตรวจพบยีน *16S rRNA* ซึ่งมีขนาดของ PCR product 919 bp ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และจากผล sequencing ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *E. coli*



รูปที่ 4.1 ผลการตรวจหาชิ้น *16S rRNA* ในเชื้อ *E. coli* ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้แสดงใน lane 1-11 สำหรับ positive control คือ *E. coli* ATCC 25922 แสดงใน lane ที่ 12 เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ น้ำกลั่นเป็น negative control ดังแสดงใน lane ที่ 13 และ 14 ตามลำดับ lane M คือ DNA ladder 100bp + 3Kb

4.3 ผลการตรวจเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน และผลตรวจยืนยันด้วย MIC

เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem จำนวน 8 ตัวอย่าง เมื่อนำไปหาค่า MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution พบว่าเชื้อที่มีค่า MIC = 1 $\mu\text{g/ml}$ มี 4 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 4.8 และเชื้อที่มีค่า MIC = 2 mg/ml มี 79 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 95.2 ซึ่งทั้งหมดแปลผลได้เป็นเชื้อไวต่อยาโคลิสตินระดับปานกลาง ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.2 ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อที่มีค่า MIC $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ในการทดสอบนี้ใช้เชื้อ *E. coli* 25922 เป็น control ซึ่งต้องมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25-2 $\mu\text{g/ml}$ และใช้เชื้อ *P. rettgeri* ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อยา colistin แบบ intrinsically resistance เป็น positive control



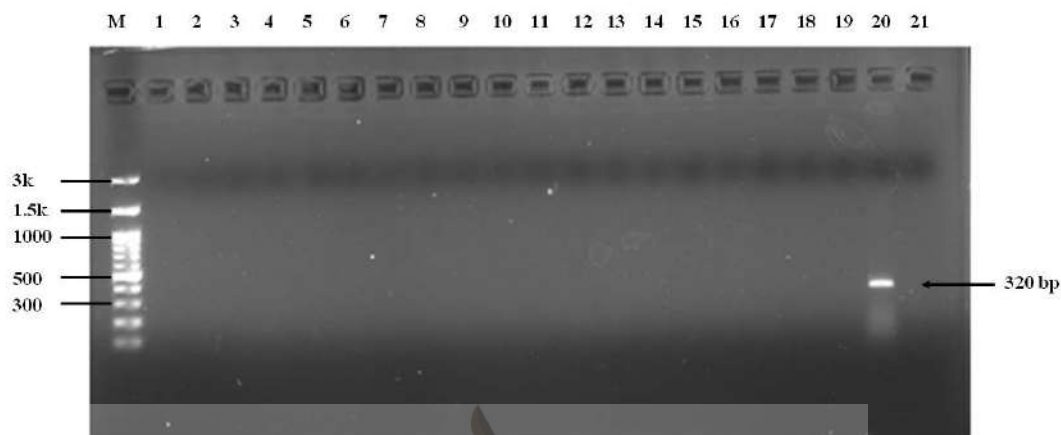
รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบ MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution แถวที่ 1-3 คือ ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการศึกษา ผล MIC ของเชื้อ *E. coli* ที่คือยาโคลิสติน (แยกได้จากผู้ป่วยปี 2566), *P. rettgeri* (MIC $\geq 8 \mu\text{g/ml}$) และ *E. coli* 25922 (MIC = $2 \mu\text{g/ml}$) แสดงในแถวที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบ MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution

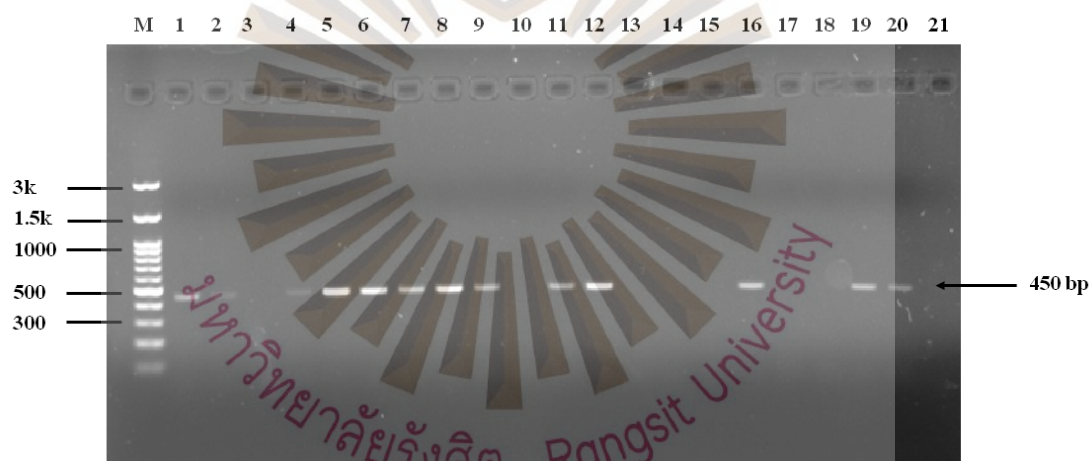
เชื้อ <i>E. coli</i>	จำนวน (ร้อยละ)	
	1 mg/ml	2 mg/ml
คือต่อยา กลุ่ม third generation cephalosporin	4 (4.8)	76 (91.6)
คือต่อยา กลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem	0	3 (3.6)

4.4 การตรวจหายีน *mcr*-(1-10) และ *int-1* ด้วยวิธี PCR

เชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา กลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem นำมาตรวจหา ยีน *mcr* และ *int-1* ด้วยวิธี PCR พบว่าจากการศึกษาจากเชื้อทั้งหมด 83 ตัวอย่าง ไม่พบยีน *mcr* แต่พบยีน *int-1* จำนวน 56 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 67.5 และไม่มียีน *int-1* จำนวน 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32.5 ดังรูปที่ 4.3 และ 4.4



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจหา *mcr-1* ในเชื้อ *E. coli* ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้แสดงใน lane 1-19 สำหรับ positive และ negative control คือ เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาโคลิสตินแยกได้จากผู้ป่วยปี 2566 และน้ำกลั่น ดังแสดงใน lane ที่ 20 และ 21 ตามลำดับ lane M คือ DNA ladder 100bp+ 3Kb

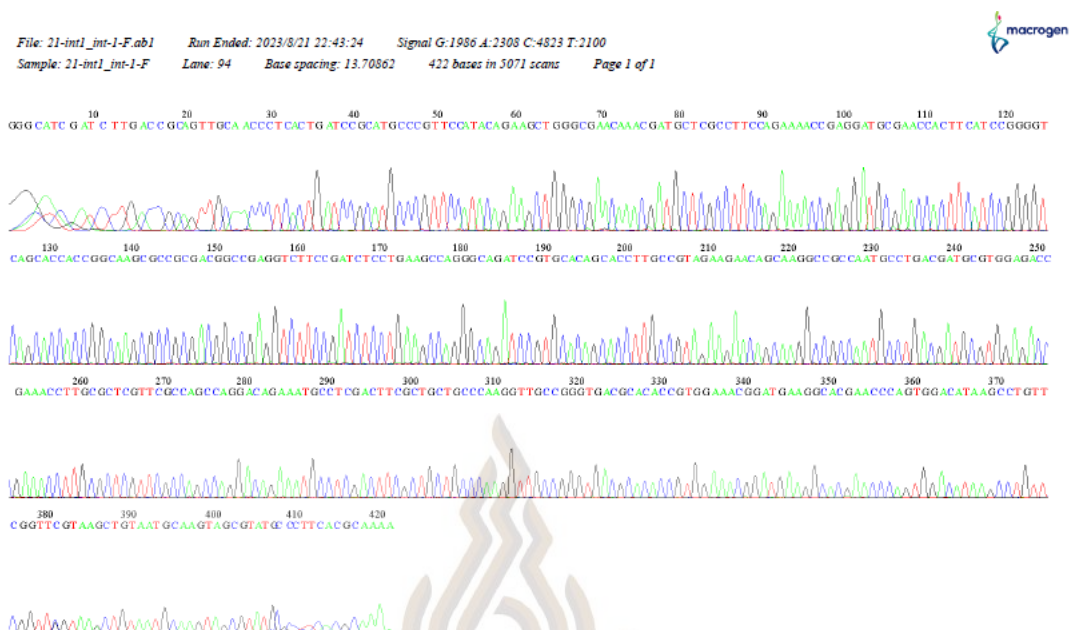


รูปที่ 4.4 ผลการตรวจหา *int-1* ในเชื้อ *E. coli*

Lane M	DNA ladder 100bp + 3Kb
Lane 1-20	ตัวอย่างเชื้อ <i>E. coli</i>
Lane 21	น้ำกลั่น

4.5 ผลการทดสอบ DNA sequencing

เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem ที่พบยีน *int-1* เมื่อนำไปทำ sequencing ได้ผลดังรูป 4.5 และเมื่อทำการ blast ใน NCBI มีความเหมือนกับ *E. coli* strain F29 class I integron ร้อยละ 99 ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.5 Sequencing Chromatograms ของยีน *int-1*

Escherichia coli strain F29 class 1 integron, partial sequence

Sequence ID: [KF921538.1](#) Length: 1422 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 414 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
717 bits(794)	0.0	407/411(99%)	2/411(0%)	Plus/Plus
Query 11	CTTGACCGCAGTTGCAA-CCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAACTGGGCG	69		
Sbjct 5	CTTGACCGCAGTTGCAAACCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAACTGGGCG	64		
Query 70	AACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACCTTCATCCGGGGTCAGC	129		
Sbjct 65	AACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACCTTCATCCGGGGTCAGC	124		
Query 130	ACCACCGGCAAGCGCGCGACGGCCGAGGTCCTTCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCC	189		
Sbjct 125	ACCACCGGCAAGCGCGCGACGGCCGAGGTCCTTCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCC	184		
Query 190	GTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGTGGAG	249		
Sbjct 185	GTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGTGGAG	244		
Query 250	ACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCC	309		
Sbjct 245	ACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCC	304		
Query 310	AAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGACATAA	369		
Sbjct 305	AAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGACATAA	364		
Query 370	GCCTGTTCCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCCCTTCACGCAA	420		
Sbjct 365	GCCTGTTCCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGC-TCACGCAA	414		

รูปที่ 4.6 ผล sequencing เมื่อนำไปทำการ blast ใน NCBI พบว่า ผลตรงกับ class 1 integron ของ *E. coli* strain F29 ร้อย 99

4.6 การตรวจหายีน *mcr-1* และ *int-1* การจัดรูปแบบการดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem ร่วมกับการตรวจพบยีน *int-1*

รูปแบบการดื้อยา ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, ertapenem, meropenem และ imipenem ในการตรวจพบยีน *int-1* สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ รูปแบบการดื้อยาที่ 1 ตรวจพบยีน *int-1* จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 57 ไม่พบยีน *int-1* จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43 รูปแบบการดื้อยาที่ 2 ตรวจพบยีน *int-1* จำนวน 52 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 68 ไม่พบยีน *int-1* จำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32 และรูปแบบการดื้อยาที่ 3 ตรวจพบยีน *int-1* จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 รูปแบบการดื้อยาในกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem กับ การตรวจพบยีน *int-1*

รูปแบบการดื้อยา	<i>Int-1</i> positive	<i>Int-1</i> Negative
รูปแบบการดื้อยาที่ 1	4(57 %)	3 (43%)
รูปแบบการดื้อยาที่ 2	52(68%)	24(32%)
รูปแบบการดื้อยาที่ 3	3(100%)	0

รูปแบบการดื้อยา ampicillin, amoxicillin clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, gentamicin, amikacin, netilmycin, ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, carbapenem, fosfomycin, cefazolin สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 14 รูปแบบ ดังตารางที่ 4.4 จากตัวอย่างเชื้อ 83 ตัวอย่าง เป็นเชื้อ multidrug resistance (MDR) ร้อยละ 82 และเชื้อที่เป็น non multidrug resistance (Non-MDR) ร้อยละ 18 ซึ่งนิยาม MDR เป็นข้อมูลที่ได้จากการแปลผลของโรงพยาบาลนพรัตน์ราชธานี ในปี พ.ศ.2560

เมื่อหาความสัมพันธ์พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance) มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบยีน *int-1* อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% CI (p -value < 0.05) ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ตารางรูปแบบการดื้อยาและการตรวจพบ *int-1*

รูปแบบการดื้อยา	Multidrug										Resistance	int-1 positive	int-1 negative
	Amp	AMC, Pip/tazo, SCF	Cefazolin	CTX, CRO, CAZ	Carbapenem	CN, AK, NET	CIP, NOR, LEV	SXT	Fosfomycin	(MDR)			
1	R	S	R	R	S	S	S	S	S	Non-MDR		1	0
2	R	S	R	R	S	S	R	R	S	Non-MDR		2	4
3	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MDR		13	1
4	R	S	R	R	S	R	S	R	S	MDR		2	1
5	R	S	R	R	S	R	R	S	S	MDR		0	4
6	R	S	R	R	S	R	R	R	S	MDR		4	0
7	R	R	R	R	S	S	S	S	S	Non-MDR		2	0
8	R	R	R	R	S	S	S	S	R	Non-MDR		0	1
9	R	R	R	R	S	S	R	S	S	Non-MDR		0	5
10	R	R	R	R	S	S	R	R	S	MDR		8	1
11	R	R	R	R	S	R	S	R	S	MDR		1	1
12	R	R	R	R	S	R	R	S	S	MDR		0	6
13	R	R	R	R	S	R	R	R	S	MDR		20	3
14	R	R	R	R	R	R	R	R	S	MDR		3	0

Amp; Ampicillin, AMC; Amoxicillin clavulanic acid, Pip/tazo; piperacillin/tazobactam, CTX; Cefotaxime, CRO; Ceftriaxone, CAZ; Ceftazidime, CN; gentamicin, AK; Amikacin, Net; Netilmycin, CIP; Ciprofloxacin, Nor; Norfloxacin, LEV; Levofloxacin, SXT; trimethoprim/sulfamethoxazole

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาหลายขนานกับการตรวจพบ *int-1*

	<i>Int-1</i> positive	<i>Int-1</i> negative	Total	chi-square	<i>p</i> value
MDR	51 (45.88%)	17 (22.12%)	68		
Non-MDR	5 (10.12%)	10 (4.88%)	15	9.7208	0.001822
Total	57	27	83		

บทที่ 5

สรุปวิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้เลือกศึกษาเฉพาะเชื้อ uropathogenic *E. coli* ที่คือยาในกลุ่ม third generation cephalosporin และ carbapenem จำนวน 83 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี ปี 2560 นำมาตรวจยืนยันโดยการตรวจหาชิ้น *16S rRNA* ให้ผลบวกทั้ง 83 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบความไวต่อยาโคลิสตินพบว่าทุกตัวอย่างมีค่า MIC < 2 ดังนั้น เชื้อ *E. coli* ที่นำมาศึกษาไม่พบการคือยาโคลิสติน และไม่พบยีน *mcr-1* เมื่อทำการยืนยันด้วยวิธี PCR แต่ตรวจพบยีน *int-1* ร้อยละ 67.5 อาจเนื่องจากเชื้อ *E. coli* ที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อที่คือยาหลายขนาน โดยเชื้อ *E. coli* ที่นำมาศึกษาเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ สายพันธุ์หลักที่ก่อให้เกิดโรคคือ uropathogenic *E. coli* (UPEC) โดยการใช้ยาในการรักษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะใช้ยาในกลุ่ม third generation cephalosporins และ carbapenems ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ในวงกว้างและมีประสิทธิภาพสูง

ในปี 2011 มีรายงานของ Daryl J. Hoban พบเอนไซม์ extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) ในเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากผู้ป่วย UTI โดยเอนไซม์นี้สามารถทำลายยาในกลุ่ม third generation cephalosporins และ carbapenems ได้แก่ ceftriaxone, ceftazidime, ertapenem และ imipenem ได้ และในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเชื้อ *E. coli* ในปี 2560 ส่วนใหญ่เป็นเชื้อชนิด ESBL producing *E. coli* ดังนั้นก็จะมีการคือยาในกลุ่ม third generation cephalosporins ร้อยละ 100 และ carbapenems ร้อยละ 3.70 สอดคล้องกับการศึกษาของ กิจจา จิตรมัย และ ปิยะรัตน์ จิตรมัย ศึกษาความชุกของการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* พบความชุกของการคือต่อ ESBLs สูง โดยเฉพาะยาในกลุ่ม third generation cephalosporins คือ ceftazidime, cefpodoxime และ ceftriaxone ร้อยละ 28.3

การศึกษาครั้งนี้เชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 83 ตัวอย่าง ที่คือต่อยาในกลุ่ม third generation cephalosporins และ carbapenems ได้ผลการทำ MIC ต่อยาโคลิสตินโดยเชื้อทั้งหมดไม่คือยา และตรวจไม่พบยีน *mcr-1* จากการศึกษาของ Eiamphungporn W. และคณะ ในปี 2018 เชื้อ *E. coli* ที่มีค่า MIC ต่อยาโคลิสติน < 4 mg/L ตรวจไม่พบยีน *mcr-1* แต่พบยีน *mcr-1* ในเชื้อที่มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 4-32 mg/L แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบยีน *mcr-1* กับการคือยาโคลิสติน แต่ในการศึกษาของ นิตยา สิงห์พลทัน ปี 2563 ซึ่งตรวจไม่พบยีน *mcr-1* ในเชื้อที่คือต่อยาโคลิสติน โดยมีค่า MIC > 4 mg/L และยังมีรายงานของบุญขันธ์ วังษ์อุตสาห์ และคณะ ในปี 2019 ที่ตรวจพบยีน *mcr-1* ในเชื้อ *E. coli* ที่คือยาโคลิสติน ร้อยละ 28.57 มีการศึกษาของ Nwai Oo Khine และคณะ ในปี 2020 เป็นการศึกษาในสุกรพบยีน *mcr-1* ในเชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยาโคลิสติน ร้อยละ 4.45 และ

mcr-3 ร้อยละ 0.43 และรายงานของ Luong ThiYen Nguyet และคณะ ในปี 2022 ศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงจากฟาร์มหมู โดยทั้งหมดเป็นเชื้อที่เกิดการดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistance ; MDR) โดยพบยีน *mcr-1* ร้อยละ 48.6 *mcr-3* ร้อยละ 51.4 *mcr-1* รวมกับ *mcr-3* ร้อยละ 75.7 *int-1* ร้อยละ 75.7 และ *int-1* รวมกับ *mobile colistin resistance (mcr)* ร้อยละ 85.7 ซึ่งจะเห็นว่ามีความชุกของยีน *mcr-1* ใน *E.coli* ที่แยกได้จากสุกร มากกว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วย เมื่อเทียบกับการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น คาดว่าอาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะในปศุสัตว์ เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ มีการใช้ยาหลายรูปแบบ เช่น ผสมในน้ำหรืออาหารสัตว์ อาจเป็นการไปกระตุ้นการดื้อยาเพิ่มขึ้น และส่งผลให้มีการดื้อยามากกว่าในคน นอกจากการดื้อยาโคลิสตินจะถูกควบคุมโดยยีน *mcr-1* แล้วอาจจะถูกควบคุมด้วยยีน *mcr-2* ถึง *mcr-10* จึงควรทำการศึกษาต่อไป

ในการศึกษาของ Fluit และ Schmitz ในปี 2004 พบว่ายีน *integrons* สามารถแพร่กระจายยีนดื้อยาได้แบบ horizontal ที่มีบทบาทสำคัญต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาหลายขนาน และรายงานของ Peter A. White และคณะ ในปี 2001 ที่ทำการศึกษาในคนพบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบ *integrons* และการดื้อยาหลายขนานในเชื้อ *Enterobacteriales* สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนานแต่ไม่ดื้อยาโคลิสติน ตรวจพบยีน *int-1* ร้อยละ 67.5 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Mohammad Kargar และคณะ ในปี 2014 เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนาน ตรวจพบยีน *int-1* ร้อยละ 78.26 *int-2* ร้อยละ 76.81 และพบยีน *int-3* เป็นครั้งแรกในอิหร่าน ร้อยละ 26.09 และจากการศึกษาของ Fouzia Zeeshan Khan และคณะ ในปี 2018 พบยีน *int-1* ร้อยละ 79 ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายขนานที่มีอัตราการตรวจพบใกล้เคียงกัน แสดงว่าการตรวจพบยีน *int-1* อาจจะเกี่ยวข้องกับเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน โดยจากการศึกษาของ Levesque และคณะ ในปี 1995 พบว่า *int-1* สามารถที่จะจับกับยีนดื้อยาเกือบทุกชนิด เช่น β -lactams, aminoglycosides, phenicols, sulphonamides, macrolides, rifampicins และ trimethoprim แล้วนำมาสอดแทรกเข้าไปใน *gene cassette* และมีการแสดงสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ทั้งหมด ซึ่งเป็นการศึกษาของ Canton และคณะ ในปี 2003 ทำให้มีการแพร่กระจายการดื้อยาแบบ MDR ได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้มีการศึกษาของ Cathy Goldstein และคณะ ในปี 2001 พบ *int-1* ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปศุสัตว์, สัตว์เลี้ยง, และสัตว์หายาก และการศึกษาของ มณฑล เลิศคนาวนิษฐกุล ในปี 2559 ในทำการศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins ในตัวอย่างเนื้อไก่ และเนื้อวัว ตรวจพบยีน *int-1* ร้อยละ 7.76

จะเห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเชื้อ uropathogenic *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins และ carbapenem แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี ปี 2560

แสดงให้เห็นถึงความชุกของยีน *int-1* ในเชื้อ uropathogenic *E. coli* และทราบถึงความสัมพันธ์ของยีน *int-1* ของเชื้อ uropathogenic *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins และ carbapenems เพื่อเป็นประโยชน์แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ตระหนักในการเลือกใช้ยารักษา และเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไป แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบยีน *mcr-1* ในเชื้อ uropathogenic *E. coli* ดังนั้นเพื่อเฝ้าติดตามสถานการณ์การดื้อยา colistin ในเชื้อ *E. coli* จึงควรทำการเก็บตัวอย่างเชื้อเพิ่มเติมในปัจจุบัน



เอกสารอ้างอิง

- ความชุกของการดื้อยาโคลิสตินของแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม *third generation cephalosporins* หรือคาร์บาเพนิมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี | วารสารเทคนิคการแพทย์. (ม.ป.ป.). สืบค้น 1 กุมภาพันธ์ 2023, จาก <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt/article/view/244199>
- จันทนา บุรณะโอสถ & คณาภรณ์ พจนาคม. (ม.ป.ป.). เกสซ์เคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems Pharmaceutical Chemistry of Antibiotics: Carbapenems. ไทยโกยชัยนิพนธ์, 2(7), 155–166.
- เพชรรัตน์ ศักดินันท์, นิรมล ศรีวงษา, & ศิริจันทร์ วงษ์มุข. (2018). การตรวจสอบการดื้อยาโคลิสติน และยีน *mcr-1* ในเชื้อซัลโมเนลลาที่แยกได้จากมูลสัตว์ปีก ในภาคตะวันตกของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2556-2559. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข., 28(1), 1–10.
- สริมา สติระรุโน & วชิรย์ สันต์มัลลวิกุล. (2018). ประสิทธิภาพและความปลอดภัย ของการใช้โคลิสตินในทางปฏิบัติ. Thai Journal of Pharmacy Practice, 10(2), 505–516.
- Colistin* (โคลิสติน)—รายละเอียดของยา—พบแพทย์. (ม.ป.ป.). สืบค้น 17 กุมภาพันธ์ 2023, จาก <https://www.pobpad.com/colistin->
- AbuOun, M., Stubberfield, E. J., Duggett, N. A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., Randall, L. P., Lemma, F., Crook, D. W., Teale, C., Smith, R. P., & Anjum, M. F. (2017). *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 72(10), 2745–2749. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx286>
- Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert review of anti-infective therapy, 10(8), 917–934. <https://doi.org/10.1586/eri.12.78>
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. mBio, 10(3), e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- De Majumdar, S., Yu, J., Fookes, M., McAteer, S. P., Llobet, E., Spence, S. F., Monaghan, A., Kissenpfennig, A., Ingram, R. J., Bengoechea, J., Gally, D. L., Fanning, S., Elborn, J. S.,

- & Schneiders, T. (2016). Correction: Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. *PLoS pathogens*, 12(5), e1005649. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005649>
- Duggett, N. A., Randall, L. P., Horton, R. A., Lemma, F., Kirchner, M., Nunez-Garcia, J., Brena, C., Williamson, S. M., Teale, C., & Anjum, M. F. (2018). Molecular epidemiology of isolates with multiple mcr plasmids from a pig farm in Great Britain: the effects of colistin withdrawal in the short and long term. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(11), 3025–3033. <https://doi.org/10.1093/jac/dky292>
- Formosa, C., Herold, M., Vidaillac, C., Duval, R. E., & Dague, E. (2015). Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 70(8), 2261–2270. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv118>
- Fluit, A. C., & Schmitz, F.-J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(4), 272–288. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x>
- Gales, A. C., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2011). Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 2070–2074. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr239>
- Gupta, K., Hooton, T. M., Naber, K. G., Wullt, B., Colgan, R., Miller, L. G., Moran, G. J., Nicolle, L. E., Raz, R., Schaeffer, A. J., Soper, D. E., Infectious Diseases Society of America, & European Society for Microbiology and Infectious Diseases (2011). International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(5), e103–e120. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>

- Gogry, F. A., Siddiqui, M. T., Sultan, I., & Haq, Q. Mohd. R. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in Medicine*, 8, 677720. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>
- Goldstein, C., Lee, M. D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A. O., White, D. G., & Maurer, J. J. (2001). Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 723–726. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.723-726.2001>
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular microbiology*, 15(4), 593–600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x>
- Hoban, D. J., Nicolle, L. E., Hawser, S., Bouchillon, S., & Badal, R. (2011). Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(4), 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.021>
- Kargar, M., Mohammadipour, Z., Doosti, A., Lorzadeh, S., & Japoni-Nejad, A. (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5(4), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.06.003>
- Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Decorby, M. R., Laing, N. M., & Zhanel, G. G. (2006). Fluoroquinolone-resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatients are frequently multidrug resistant: results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance-Quinolone Resistance study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(6), 2251–2254. <https://doi.org/10.1128/AAC.00123-06>
- Khan, S., & Raza, Y. (2018). Study of class 1 integrons in multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different hospitals in Karachi. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(10), 1079–1082. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.28807.6966>
- Khine, N. O., Lugsomya, K., Kaewgun, B., Honhanrob, L., Pairojrit, P., Jermprasert, S., & Prapasarakul, N. (2020). Multidrug Resistance and Virulence Factors of *Escherichia coli*

- Harboring Plasmid-Mediated Colistin Resistance: *mcr-1* and *mcr-3* Genes in Contracted Pig Farms in Thailand. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 582899. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.582899MCR->
- Koomanachai, P., Colistin. In: Asavabhokhi N, Tantawichien T, Phiboon T, editors. Important Antimicrobial Agents1. Bangkok: VG printing; 2015. p. 601-8. (in Thai).
- Lacour, S., Doublet, P., Obadia, B., Cozzone, A. J., & Grangeasse, C. (2006). A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Research in microbiology*, 157(7), 637–641. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.01.003>
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(9), 589–601. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70580-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70580-1)
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Loho, T., & Dharmayanti, A. (2015). Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta medica Indonesiana*, 47(2), 157–168.
- Mirnezami, M., Ranjbar, R., Niakan, M., & Ahmadi, M. H. (2020). Frequency of Antimicrobial Resistance and Class 1 and 2 Integrons in *Escherichia coli* Strains Isolated from Urinary Tract Infections. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 19(3), 282–287. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.1101148>
- NARST: National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Retrieved March 29, 2019, from <http://narst.dmsc.moph.go.th/data/map2561.pdf> (in Thai).
- Nguyet, L. T. Y., Keeratikunakorn, K., Kaeoket, K., & Ngamwongsatit, N. (2022). Antibiotic resistant *Escherichia coli* from diarrheic piglets from pig farms in Thailand that harbor colistin-resistant *mcr* genes. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13192-3>

- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Parra-Lopez, C., Baer, M. T., & Groisman, E. A. (1993). Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO journal*, 12(11), 4053–4062. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06089.x>
- Pirkani, G. S., Awan, M. A., Abbas, F., & Din, M. (2020). Culture and PCR based detection of bacteria causing urinary tract infection in urine specimen. *Pakistan journal of medical sciences*, 36(3), 391–395. <https://doi.org/10.12669/pjms.36.3.1577>
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical microbiology reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Pragasam, A. K., Shankar, C., Veeraraghavan, B., Biswas, I., Nabarro, L. E., Inbanathan, F. Y., George, B., & Verghese, S. (2017). Molecular Mechanisms of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Causing Bacteremia from India-A First Report. *Frontiers in microbiology*, 7, 2135. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02135>
- Prapasawat, W., & Intarapuk, A. (2021). Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* isolated from feces of dairy goats in Nong Chok, Bangkok, Thailand: <https://doi.org/10.12982/VIS.2021.020>. *Veterinary Integrative Sciences*, 19(2), Article 2.
- Puncharat, W., Pradchama, K., Worada, S., Jiraporn, Y., Seksun, S. (2020). Prevalence of colistin resistance among third generation cephalosporins- or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens in Ratchaburi Hospital, Thailand. *J Med Tech Assoc Thailand*, 48:1
- Radwan, I., Abd El-Halim, M., & Abed, A. (2020). Molecular characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Journal of Veterinary Medical Research*, 27(2), 128–142. <https://doi.org/10.21608/jymr.2020.31870.1009>
- Rousseau, M., Goh, H. M. S., Holec, S., Albert, M. L., Williams, R. B. H., Ingersoll, M. A., & Kline, K. A. (2016). Bladder catheterization increases susceptibility to infection that can be prevented by prophylactic antibiotic treatment. *JCI Insight*, 1(15). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88178>

- Saleh, N. M., Hesham, M. S., Amin, M. A., & Samir Mohamed, R. (2020). Acquisition of Colistin Resistance Links Cell Membrane Thickness Alteration with a Point Mutation in the *lpxD* Gene in *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(4), 164. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040164>
- Skov, R. L., & Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(9), 30155. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
- Tan, T. Y., & Ng, S. Y. (2006). The in-vitro activity of colistin in gram-negative bacteria. *Singapore medical journal*, 47(7), 621–624.
- Trent M. S. (2004). Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 82(1), 71–86. <https://doi.org/10.1139/o03-070>
- Vásquez-Ponce, F., Higuera-Llantén, S., Cortés, J., Zimin-Veselkoff, N., Marshall, S. H., Mardones, F. O., & Olivares-Pacheco, J. (2019). High prevalence of class 1 integrase and characterization of class 1 integron gene cassettes in multiresistant bacteria isolated from the gut microbiota of extended antibiotic treated *Salmo salar* fish farms. *bioRxiv*. Retrieved September 25, 2022, from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/532663v1>
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., & Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 122. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>
- White, P. A., McIver, C. J., & Rawlinson, W. D. (2001). Integrons and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2658–2661. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2658-2661.2001>
- Wongut-sa, P., Khumdee, P., Samosornsuk, W., Yansombat, J., & Samosornsuk, S. (2020). Prevalence of Colistin Resistance among Third Generation Cephalosporins- or Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens in Ratchaburi Hospital, Thailand. 48(1), 7240–7252.
- Wongut-sa, P., Khumdee, P., Samosornsuk, W., Yansombat, J., and Samosornsuk, S. (2020). Prevalence of Colistin Resistance among Third Generation Cephalosporins- or

- Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens in Ratchaburi Hospital, Thailand. *J Med Tech Assoc Thailand*, 48(1). (in Thai)
- Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(27), 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>
- Yang, Y. Q., Li, Y. X., Lei, C. W., Zhang, A. Y., & Wang, H. N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(7), 1791–1795. <https://doi.org/10.1093/jac/dky111>
- Zhai, Y. J., Huang, H., Liu, J., Sun, H. R., He, D., Pan, Y. S., & Hu, G. (2018). CpxR overexpression increases the susceptibility of *acrB* and *cpxR* double-deleted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to colistin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(11), 3016–3024. <https://doi.org/10.1093/jac/dky320>



การเตรียมน้ำยาและสารเคมี

Agarose gel 1.5 %

1xTBE 100 ml

Agarose 1.5 g

เตรียมส่วนผสมต่าง ๆ ดังกล่าว นำไปละลายพอเข้ากัน จากนั้นนำไปอุ่นด้วยไมโครเวฟ เพื่อให้สารละลายเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำ เจลที่ละลาย 30 ml ผสมกับ Safe view dye 15 μ l จากนั้นนำไปใช้ในการทำ Gel electrophoresis

Cation adjusted Mueller - Hinton Broth (CaMHB) 1000 ml.

CaMHB 21 g

Distilled water 1000 ml.

นำส่วนผสมต่าง ๆ ผสมให้เข้ากัน โดยนำไปละลายที่เครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาทีเพื่อทำการ Sterilize

Colistin 1 mg/ml

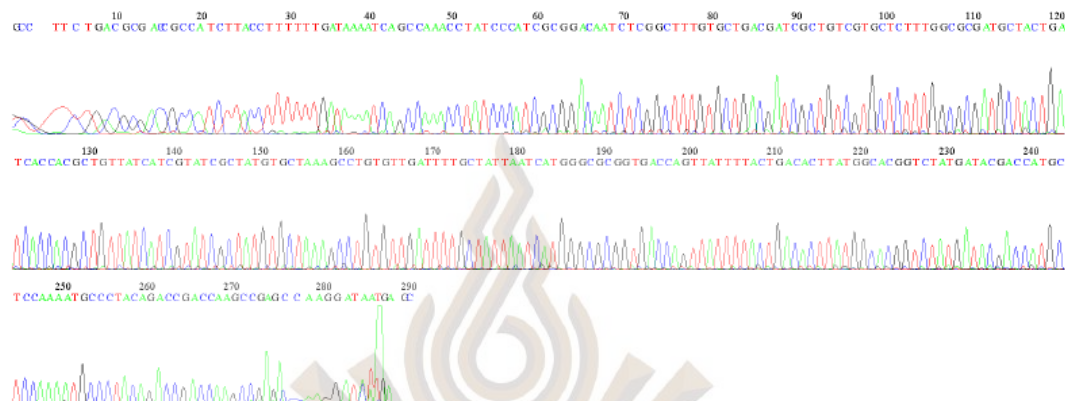
Colistin sulphate 10 mg

Distilled water 7.76 ml

ก่อนการเตรียมจะต้องทำการคำนวณค่า potency ของยาตาม CLSI จากนั้นนำส่วนผสมต่าง ๆ ดังกล่าว นำไปละลายให้เข้ากัน โดยการเตรียมความเข้มข้นของยาที่ใช้จะเจือจางแบบ two-fold dilution และต้องเตรียมความเข้มข้นให้เป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้เพื่อนำไปเจือจาง

WGA sequencing *mcr-1*

File: 22-mcr1_mcr-1-F.ab1 Run Ended: 2023/8/21 22:43:24 Signal G:3682 A:4821 C:8893 T:6391
Sample: 22-mcr1_mcr-1-F Lane: 90 Base spacing: 13.589037 291 bases in 3568 scans Page 1 of 1



Escherichia coli strain 5417_MCA plasmid p5417_MCA, complete sequence

Sequence ID: [OQ078087.1](#) Length: 197991 Number of Matches: 1

Range 1: 66668 to 66944 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
484 bits(536)	4e-132	275/277(99%)	2/277(0%)	Plus/Plus
Query 10	CGCGACCGCCA-TCTTACCTTTTTTGTATAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAA	68		
Sbjct 66668	CGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGTATAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAA	66727		
Query 69	TCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGCTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCAC	128		
Sbjct 66728	TCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGCTGCTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCAC	66787		
Query 129	GCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGTATTAATCATGGG	188		
Sbjct 66788	GCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGTATTAATCATGGG	66847		
Query 189	CGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCA	248		
Sbjct 66848	CGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCA	66907		
Query 249	AAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAG-CCAAGGAT	284		
Sbjct 66908	AAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGGAT	66944		

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า	☐ นาย	☐ นาง	☒ นางสาว	
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ.	☐ รศ.	☐ ผศ.	☒ อาจารย์
ชื่อผู้วิจัย	ศิริพร			
นามสกุลผู้วิจัย	โควบุตร			
ชื่อภาษาอังกฤษ	Siriporn			
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Kowaboot			
วัน/เดือน/ปี เกิด	29 ตุลาคม 2519			
ที่อยู่ (บ้าน)	127/14 ถ.รังสิต-ปทุม ต.บ้านกลาง อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12130			
หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่	081-904-5507			
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 เมืองเอก ถ.พหลโยธิน ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ 12000			
หมายเลขโทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1433			
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1512			
E-mail Address	siriporn.ko@rsu.ac.th			
ปริญญาตรี				
สาขา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)			
ปีที่จบ	2542			
สถาบัน	มหาวิทยาลัยรังสิต			
ประเทศ	ไทย			
ปริญญาโท				
สาขา	วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์)			
ปีที่จบ	2546			
สถาบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล			
ประเทศ	ไทย			

4. Tewawong, N., Kowaboot, S., Pimainog, Y., Watanagul, N., Thongmee, T., & Poovorawan, Y. (2020). Distribution of phylogenetic groups, adhesin genes, biofilm formation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand. *PeerJ*, 8, e10453.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ:

5th European Congress of Immunology: entitle “Characterization of human monoclonal antibodies against dengue virus ns1 protein”, September 2 – 5 September 2018, Amsterdam, The Netherlands

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

Medical microbiology, Virology, Immunology

