



การวินิจฉัยแยกชนิดแคปซูลในเชื้อ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* สายพันธุ์ดื้อยา
คาร์บาเพนิมโดยใช้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

**IDENTIFICATION OF CAPSULAR TYPES IN CARBAPENEM-RESISTANT
KLEBSIELLA PNEUMONIAE STRAINS USING BY MULTIPLEX PCR ASSAY**

กรรณิการ์	ปัญญาไว
ชนภรณ์	พรหมวงศ์
ยศวดี	อุดมสิรินวกุล
วรรษยา	พลราศรี
อารดา	ชันถม
อภิชา	พลอยหิน

ภาคนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยรังสิต

พ.ศ. 2567



**IDENTIFICATION OF CAPSULAR TYPES IN CARBAPENEM-RESISTANT
KLEBSIELLA PNEUMONIAE STRAINS USING BY MULTIPLEX PCR ASSAY**

Apicha

Ployhin

Arada

Khanthom

Kannika

Panyawai

Thanaphorn

Promwong

Waratchaya

Pholrasri

Yodsawadee

Udomsirinawakul

**A TERM PAPER SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE IN MEDICAL TECHNOLOGY
MEDICAL TECHNOLOGY**

RANGSIT UNIVERSITY

2024

ภาคินพนธ์เรื่อง

การวินิจฉัยแยกชนิดแคปซูลในเชื้อ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* สายพันธุ์ด้อยยา
การบำบัดเนมโดยใช้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

โดย

กรรมธิการ	ปัญญาไว
ชนภรณ์	พรหมวงศ์
ยศวดี	อุดมสิรินวกุล
วรรษยา	พลราศรี
อารดา	ชั้นดม
อภิษา	พลอยหิน

ได้รับพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์
เมื่อวันที่ 18 ตุลาคม 2568

นิภาพร เทาวงศ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิภาพร เทาวงศ์)
กรรมการและที่ปรึกษาร่วมภาคินพนธ์

ศิริพร โควบุตร

(ดร.ศิริพร โควบุตร)
กรรมการและที่ปรึกษาร่วมภาคินพนธ์

กฤษณ์ พุทธิผลวงวิพล

(ดร.กฤษณ์ พุทธิผลวงวิพล)
หัวหน้าสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

สุดาภรณ์ เก่งการ

(ดร.สุดาภรณ์ เก่งการ)
ประธานและที่ปรึกษาภาคินพนธ์

อรารัตนา

(อาจารย์อรารัตนา เล็กตระกูล)
กรรมการและที่ปรึกษาร่วมภาคินพนธ์

ค.น.

(รองศาสตราจารย์เยาวลักษณ์ พิมายนอก)
คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

ภาคนิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้เลย หากปราศจากบุคคลเหล่านี้ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้รับความกรุณาจาก ดร.สุดาภรณ์ เก่งการ ได้ให้เกียรติเป็น อาจารย์ที่ปรึกษา และสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาถือเป็นบุคคลที่สำคัญที่สุดในการให้ คำแนะนำทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติอย่างใกล้ชิด ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิภาพร เทาวางค์, ดร.ศิริพร โควบุตร และ อาจารย์วรางคณา เล็กตระกูล ที่ได้สละเวลาในการให้ความรู้และ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือทุกๆ ด้านในการทำภาคนิพนธ์ฉบับนี้ จน สำเร็จด้วยดี คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ทนพญ.นัยนา วัฒนกุล หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลนพรัตน- ราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ทุกท่านที่ ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์ และเครื่องมือเครื่องใช้ในการทำการวิจัย ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า เล่มภาคนิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจ หากมี ข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอรับไว้และขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

กรรมการ	ปัญญาไว
ชนภรณ์	พรหมวงศ์
ยศวดี	อุดมสิรินวกุล
วรรษยา	พลราศรี
อารดา	ชั้นถม
อภิชา	พลอยหิน

ABSTRACT

6502474, 6500477, 6500307, 6500476, : MAJOR: MEDICAL TECHNOLOGY
6500308, 6500471 B.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

KEY WORD : *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, CARBAPENEMASE, MULTIPLEX PCR

**KANNIKA PANYAWAI, THANAPHORN PROMWONG, YODSAWADEE
UDOMSIRINAWAKUL, WARATCHAYA PHOLRASRI, ARADA KHANTHOM,
APICHA PLOYHIN**

**IDENTIFICATION OF CAPSULAR TYPES IN CARBAPENEM-RESISTANT
KLEBSIELLA PNEUMONIAE STRAINS USING BY MULTIPLEX PCR ASSAY THESIS
ADVISOR : SUDAPORN KENGKARN, Ph.D., 47 p.**

Antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*, particularly carbapenem-resistant strains (carbapenem-resistant *K. pneumoniae*; CRKP), is a major global public health concern due to their ability to transfer resistance genes and cause severe hospital-acquired infections. This study aimed to identify the capsular types of CRKP, investigate the association between capsular types and carbapenem resistance genes, and examine the relationship between capsular serotypes and infection sites in patients. A total of 112 CRKP isolates were collected from clinical specimens at Nopparat Rajathanee Hospital between March to June 2023. Multiplex PCR was performed to detect the genes *WzyK1*, *WzyK2*, *WzyK3*, *WzxK5*, *WzyK20*, *WzxK54* and *WzyK57*. The most prevalent capsular serotype identified was K2 (15.18%), followed by K20 (1.79%). Serotypes K1, K3, K5, K54, and K57 were not detected. Analysis of the relationship between capsular serotypes and infection sites showed that K2 CRKP was mainly associated with urinary tract infections and respiratory tract infections, though no statistically significant difference was observed ($p > 0.05$). K20 CRKP, on the other hand, was found in skin, soft tissue, and bloodstream infections. In conclusion, multiplex PCR proved to be an effective method for differentiating CRKP capsular types, providing a useful tool for tracing infection sources, monitoring hospital and community outbreaks, and tracking the spread of drug-resistant strains. This method may support infection control measures at both hospital and public health levels.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ฉุ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของปัญหา	3
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 สมมติฐานการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	5
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.2 ชนิดของแคปซูล	6
2.3 กลุ่มยา carbapenems	10
2.4 เทคนิคและหลักการ ในการจำแนกชนิดของแคปซูล	11
2.5 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	16
3.1 การออกแบบงานวิจัย	16
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ	17
3.4 วิธีการทดลอง	17
3.5 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
4.1 ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง	21
4.2 ผลการตรวจหาขึ้น <i>WzyK1</i> , <i>WzyK2</i> , <i>WzyK3</i> , <i>WzxK5</i> , <i>WzyK20</i> , <i>WzxK54</i> และ <i>WzyK57</i> ที่พบในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> คือยากลุ่ม carbapenem	24
4.3 ความชุกของชนิดแคปซูลในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่คือต่อยา carbapenem	28
4.4 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่สัมพันธ์กับ capsular serotype และ เชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่คือยากลุ่ม carbapenem	28
4.5 ความสัมพันธ์ของ capsular serotype K2 ที่พบในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> คือยากลุ่ม carbapenem และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย	30
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	34
บรรณานุกรม	37
ภาคผนวก ก	40
ประวัติผู้วิจัย	42

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาหาซีโรไทป์แคปซูล ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ด้วยวิธี multiplex PCR	18
4.1 จำนวนและร้อยละข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง	21
4.2 ข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> Capsular serotype K2 จำนวน 17 คน	29
4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศของผู้ป่วยและ Capsular serotype K2	30
4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงค่าอายุของผู้ป่วยและ Capsular serotype K2	30
4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอผู้ป่วยใน (Ward) และ Capsular serotype K2	31
4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของการติดเชื้อและ Capsular serotype K2	32
4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>bla_{NDM}</i> และ Capsular serotype K2	32
4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>bla_{OXA-48}</i> และ Capsular serotype K2	32

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
4.1	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK1</i> , <i>WzyK2</i> , <i>WzxK5</i> , และ <i>WzxK54</i>	23
4.2	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK1</i> , <i>WzyK2</i> , <i>WzxK5</i> , และ <i>WzxK54</i>	23
4.3	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK1</i> , <i>WzyK2</i> , <i>WzxK5</i> , และ <i>WzxK54</i>	24
4.4	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK1</i> , <i>WzyK2</i> , <i>WzxK5</i> , และ <i>WzxK54</i>	24
4.5	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK1</i> , <i>WzyK2</i> , <i>WzxK5</i> , และ <i>WzxK54</i>	25
4.6	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK1</i> , <i>WzyK2</i> , <i>WzxK5</i> , และ <i>WzxK54</i>	25
4.7	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK3</i> , <i>WzyK20</i> , และ <i>WzyK57</i>	26
4.8	Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น <i>WzyK3</i> , <i>WzyK20</i> , และ <i>WzyK57</i>	26
4.9	แผนภูมิแสดงความซุกของชนิดแคปซูลในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่คือต่อ ยากลุ่ม carbapenem	27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	Percentage
ATCC	=	American type culture collection
<i>bla</i> _{IMP}	=	Beta-lactamase Imipenemase
<i>bla</i> _{KPC}	=	Beta-lactamase <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<i>bla</i> _{NDM-1}	=	New Delhi Metallo-beta-lactamase
<i>bla</i> _{OXA-48}	=	Oxacillinase-48 beta-lactamase
<i>bla</i> _{VIM}	=	Verona Integron- encoded Metallo-beta-lactamase
bp	=	base pair
CPS	=	Capsular Polysaccharide
CPS locus	=	Capsule Polysaccharide synthesis locus
CRPK	=	Carbapenem-Resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i>
dNTP	=	Deoxyribonucleotide Triphosphate
<i>E.coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
ER- Med	=	Emergency Room Medicine
ER- Trauma	=	Emergency Room Trauma
ESBL	=	Extended-Spectrum Beta-Lactamase
ESKAPE	=	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i>
GP	=	General Practitioner
h/c	=	Hemoculture
hv	=	hypervirulent
hvkp	=	hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i>
ICU	=	Intensive Care Unit
ICU-sur	=	Intensive Care Unit Surgical
K-loci	=	Capsule biosynthesis loci
<i>K.pneumoniae</i>	=	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

<i>K. quasipneumoniae</i>	=	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>
MALDI- TOF MS	=	Matrix Assisted Laser Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer
MDR	=	Multidrug Resistant
MDR- kp	=	Multidrug-Resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i>
MDRhv	=	Multidrug hypervirulent
MDR-hvKP	=	Multidrug-Resistant hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i>
MED	=	Medicine
Med- ICU	=	Medicine Intensive Care Unit
MSU	=	Midstream Urine
Multiplex PCR	=	Multiplex Polymerase Chain Reaction
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
obs- ER	=	Observation unit Emergency Room
PBP	=	Penicillin-Binding Proteins
pc	=	Positive control
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PDR	=	Pan-Drug-Resistant
rmpA	=	Regulator of mucoid phenotype
ST	=	Sequence type
sur	=	Surgical
Tm	=	Optimal Melting Temperature
USA	=	United States of America
UTI	=	Urinary tract infection
VNTR	=	Variable number tandem repeat
XDR	=	Extensively Drug-Resistant

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

α	=	Alpha
β	=	Beta
$^{\circ}\text{C}$	=	Degrees Celsius

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

การระบาดของเชื้อแบคทีเรียคือยาต้านจุลชีพที่เพิ่มขึ้น เป็นปัญหาทางระบบสาธารณสุขระดับโลกที่สำคัญที่สุดประการหนึ่ง (Ferri et al., 2017) การทำความเข้าใจปัจจัยทางพันธุกรรมของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อหยุดการแพร่กระจายของแบคทีเรียคือยาหลายขนาน (multidrug resistance; MDR) (Bassetti et al., 2018) ในเชื้อแบคทีเรียคือยาหลายขนานเหล่านี้ *K. pneumoniae* เป็นหนึ่งในกลุ่มเชื้อที่ได้รับการระบุเรียกรวมกันว่า ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterobacter*) เชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาล เนื่องจากเชื้อสามารถ "หลบหนี (escape)" การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ โดยเกิดการดื้อยา และนำไปสู่การรักษาที่ล้มเหลว (Pendleton et al., 2013) *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในวงศ์ Enterobacteriales ซึ่งส่วนใหญ่ส่งผลกระทบต่อผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล เชื้อนี้สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อรุนแรง เช่น ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ปอดบวม และการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (Bengoechea et al., 2019) ผู้ป่วยส่วนใหญ่พบการติดเชื้อจาก *Klebsiella* spp. ก่อโรคที่สำคัญสองกลุ่ม (2 pathotypes) ได้แก่ กลุ่มที่ดื้อต่อยาหลายขนาน และกลุ่มที่มีความรุนแรงในการก่อโรครุนแรงกว่าปกติ (hypervirulent; hv) ซึ่งในที่สุดจะเกิดการสร้างสำเนาทางพันธุกรรมที่มาบรรจบกัน เรียกว่า multidrug hypervirulent (MDR_{hv}) *Klebsiella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติคือยาหลายขนานและมีความรุนแรงในการก่อโรครุนแรง (Chen & Kreiswirth 2018) ยีนคือยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ถูกค้นพบครั้งแรกใน *K. pneumoniae* และต่อมาได้แพร่กระจายไปยังเชื้อก่อโรคอื่น ๆ เช่น ยีนคือยาคาร์บาพีเนม ซึ่งใน *K. pneumoniae* ที่คือยาคาร์บาพีเนม (carbapenem-resistant *K. pneumoniae*; CRKP) โดยส่วนใหญ่จะพบยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} และ *bla*_{NDM-1} เป็นต้น (Wyres & Holt 2018)

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคของเชื้อ *K. pneumoniae* คือ แคปซูล ซึ่งเป็นโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ภายนอกเซลล์ที่ช่วยป้องกันการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และป้องกันการถูกกลืนกินโดยเม็ดเลือดขาว ส่งผลให้มีอัตราการเสียชีวิตและอัตราการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อ *K. pneumoniae* สูงขึ้น (Kang et al., 2015) *Klebsiella* spp. มีความหลากหลายของแคปซูล (K antigen) อย่างน้อย 79 ชนิด โดยแต่ละชนิดแสดงถึงโครงสร้างโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แคปซูล (CPS) ที่แตกต่างกัน serotype ของแคปซูลมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคและชนิดของการติดเชื้อ (Cortés et al., 2002) ซึ่งบาง serotype เช่น K1, K2, K5, K20, K54 และ K57 เชื่อมโยงกับการติดเชื้อรุนแรงในชุมชน เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด ปอดบวม และฝีที่ตับ serotype K3 มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรค rhinoscleroma และมีรายงานว่า serotype K1 อาจเป็นพาหะของยีนดื้อยาคาร์บาเพนิม ซึ่งบ่งชี้ถึงความเสี่ยงในการแพร่กระจายของสายพันธุ์ที่ดื้อยาและมีความรุนแรงสูง (Taha et al., 2023)

ข้อมูลเกี่ยวกับจีโนมของแคปซูลสามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลลำดับจีโนมของเชื้อ (whole genome sequencing; WGS) โดยการระบุชนิดของบริเวณ capsule biosynthesis loci (หรือ K-loci) (Wyres et al., 2016) K locus อยู่บนโครโมโซม ประกอบด้วยยีน 10-30 ยีน และมีขนาดประมาณ 10-30 kilo base pairs พบว่ามีความหลากหลายของ K-loci มากกว่า 100 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดกำหนดการสร้างแคปซูลที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน ยีนอนุรักษ์สำหรับการสังเคราะห์แคปซูลจะพบได้ในบริเวณปลาย 5' (*galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*) และปลาย 3' (*ugd*) เป็นส่วนใหญ่ และล้อมรอบยีนที่เข้ารหัสสำหรับการสังเคราะห์น้ำตาลของแคปซูล ได้แก่ เอนไซม์ Wzy repeat-unit polymerase และเอนไซม์ Wzx capsule-specific flippase (Pan et al., 2015) การจำแนกชนิดของแคปซูลระดับโมเลกุลเป็นเทคนิคหลักที่มีความเที่ยงตรงสำหรับใช้ในการจัดหมวดหมู่เชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Siu et al., 2011) Multiplex PCR ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจหายีน *Wzy* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมเอนไซม์ capsule repeat-unit polymerase (Siu et al., 2011) พบการศึกษาเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับการจำแนกชนิดของแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ในประเทศไทย (Leangapichart et al., 2021)

คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวินิจฉัยแยกจีโนมของแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ดื้อยาคาร์บาเพนิมโดยใช้วิธี multiplex PCR การศึกษานี้จะครอบคลุมถึงจีโนมของเชื้อ การพบยีนดื้อยาคาร์บาเพนิม และตำแหน่งของการติดเชื้อในผู้ป่วย เพื่อทำความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเหล่านี้ในบริบทของการติดเชื้อ *K. pneumoniae* และการเพิ่มขึ้นของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อวินิจฉัยแยกซีโรไทป์ของแคปซูลในเชื้อ carbapenem-resistant *K. Pneumoniae*

1.2.2 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างซีโรไทป์ของแคปซูล และยีนคือยาคาร์บาพีเนมในเชื้อ carbapenem-resistant *K. Pneumoniae*

1.2.3 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างซีโรไทป์ของแคปซูลในเชื้อ carbapenem-resistant *K. pneumoniae* และตำแหน่งการติดเชื้อของผู้ป่วย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เพื่อวินิจฉัยแยกซีโรไทป์ของแคปซูลในเชื้อ carbapenem-resistant *K. pneumoniae* โดยใช้วิธี multiplex PCR ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี จังหวัด กรุงเทพมหานคร เดือนมีนาคม-มิถุนายน 2566 จำนวน 112 ตัวอย่าง

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 Serotype K1 มีความชุกสูงในเชื้อ carbapenem-resistant *K. pneumoniae*

1.4.2 มีความสัมพันธ์ระหว่างซีโรไทป์ของแคปซูลกับการมีอยู่ของยีนคือยาคาร์บาพีเนมในเชื้อ carbapenem-resistant *K. Pneumoniae*

1.4.3 มีความสัมพันธ์ระหว่างซีโรไทป์ของแคปซูลกับตำแหน่งของการติดเชื้อ carbapenem-resistant *K. pneumoniae* ในผู้ป่วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลเกี่ยวกับซีโรไทป์ของแคปซูล ยีนคือยาคาร์บาพีแนม ที่สัมพันธ์กับตัวอย่างทางคลินิกและหอผู้ป่วย จะสามารถช่วยแพทย์ในการเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วย และสามารถใช้ในการเฝ้าระวัง และควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในชุมชนหรือโรงพยาบาลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น (bacilli) ไม่สร้าง spore และไม่เคลื่อนที่ (non-motile) เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe (สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มียอกซิเจน) เชื้อยังสามารถสร้างแคปซูลที่ช่วยในการป้องกันระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำลายยาปฏิชีวนะ ทำให้มีศักยภาพสูงในการก่อโรค และคือตัวยาปฏิชีวนะ เชื้อจึงมีคุณสมบัติเด่นในด้านการก่อโรคซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่สำคัญ (nosocomial pathogen) และเป็นหนึ่งในเชื้อที่พบมากในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบต่างๆ เช่น ปอดอักเสบ (pneumonia) ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia/sepsis) การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infections, UTI) แผลติดเชื้อ และหนอง (wound infections and abscesses) (Taha et al., 2023)

2.1.1 ความรุนแรงของ *K. pneumoniae* ในการก่อโรค

K. pneumoniae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีศักยภาพสูงในการก่อโรคและคือยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะเชื้อที่มีความรุนแรงสูง (Hypervirulent *K. pneumoniae*, hvKp) และเชื้อที่คือตัวยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม (Multidrug-Resistant *K. pneumoniae*, MDR-Kp) (Taha et al., 2023) ปัจจัยความรุนแรงของ *K. pneumoniae* ที่สำคัญ ได้แก่

- แคปซูล (Capsular Polysaccharide, CPS) ช่วยป้องกันเชื้อจากการถูกจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยแคปซูลชนิดรุนแรง (เช่น K1, K2, K5, K20, K54, K57) มีความสัมพันธ์กับการทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรง เช่น ฝีในตับ และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Taha et al., 2023)

- เอนไซม์ carbapenemases และ Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) ทำให้เชื้อคือตัวยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactams เช่น cephalosporins และ carbapenems โดยยีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* เป็นต้น (Soltani et al., 2022) เชื้อที่มียีนเหล่านี้สามารถคือยาระดับ

Multidrug-Resistant (MDR), Extensively Drug-Resistant (XDR) หรือ Pan-Drug-Resistant (PDR) (Taha et al., 2023)

- Mucoïd Phenotype และไบโอฟิล์ม (Biofilm Formation) เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มีคุณสมบัตินี้สามารถสร้างสารเมือกจำนวนมาก ช่วยให้เชื้อสามารถหลบหนีระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความสามารถในการก่อโรครุนแรงมากขึ้น (Soltani et al., 2022)

2.1.2 สถิติของการติดเชื้อ และอัตราการเสียชีวิต

- พบการติดเชื้อในสัดส่วน 13-32% ของตัวอย่างที่ศึกษา ในบางงาน ศึกษาเก็บเชื้อ *K. pneumoniae* มาทั้งหมด (Taha et al., 2023, Ssekatawa et al., 2021, Soltani et al., 2022)

อัตราการเสียชีวิต

- ไม่มีรายงานตัวเลขอัตราการเสียชีวิต จากทั้ง 3 งานวิจัย แต่ข้อมูลชี้ว่าการติดเชื้อโดยเชื้อคือยามักนำไปสู่ การล้มเหลวในการรักษา บ่งชี้ว่ามีอัตราเสียชีวิตสูง (Taha et al., 2023, Ssekatawa et al., 2021, Soltani et al., 2022)

2.2 ชนิดของแคปซูล

แคปซูล เป็น extracellular polysaccharide structure ที่ขัดขวางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และป้องกันเชื้อก่อโรคที่บุกรุกจากการ Phagocytosis ซึ่งเป็นสาเหตุของอัตราการเสียชีวิตและการเจ็บป่วยที่เพิ่มขึ้นโดยเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *K. pneumoniae* (Taha et al., 2023)

K. pneumoniae มีชนิดของแคปซูลอย่างน้อย 79 ชนิด แต่ละชนิดจะแสดงโครงสร้างโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ของแคปซูล (CPS; แอนติเจน K) ที่แตกต่างกันไป ชนิดเหล่านี้เชื่อมโยงกับความรุนแรงของโรคและประเภทของการติดเชื้อ ชนิดของแคปซูล (K) หลายชนิด โดยเฉพาะ K1, K2, K5, K20, K54 และ K57 จะสัมพันธ์กับ septicemia, pneumonia, and liver abscesses นอกจากนี้แคปซูลชนิด K3 ยังมีความเกี่ยวข้องกับโรค rhinoscleroma (Taha et al., 2023)

2.2.1 ประเภทของแคปซูล

แคปซูลของแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้หลายชนิดตามลักษณะและส่วนประกอบที่ต่างกัน โดยทั่วไปแล้วแคปซูลที่พบจะเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันแบคทีเรียจากการโจมตีของระบบภูมิคุ้มกันและจากยาปฏิชีวนะ (Oregon State University., 2025) บางชนิดของ

แคปซูลก็อาจมีส่วนประกอบเป็นโปรตีนหรือผสมกันระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแคปซูลแบคทีเรียสามารถจำแนกตามชนิดต่าง ๆ ได้ดังนี้

- Capsules Polysaccharide (Polysaccharide Capsule) แคปซูลชนิดนี้ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (เช่น กลูโคส, กาแลคโตส) ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันแบคทีเรียจากการถูกทำลายโดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*

- Capsules Polypeptide (Polypeptide Capsule) แคปซูลที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน เช่น ในกรณีของ *Bacillus anthracis* ที่มีแคปซูลจากกรดกลูตามิก (glutamic acid)

- Capsules Mixed (Polysaccharide-Polypeptide Capsule) แคปซูลมีส่วนประกอบผสมระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีน เช่น *K. pneumoniae*

- Capsule with Protein Component (Capsule with a Protein Coat) แคปซูลที่มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์ โดยที่โปรตีนมักทำหน้าที่ในการยึดเกาะและป้องกันจากการโจมตีของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น *Neisseria meningitidis* ที่มีแคปซูลโปรตีน แคปซูลของเชื้อ *K. pneumoniae*

แคปซูลของเชื้อ *K. pneumoniae* มีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมากระหว่างความรุนแรง จะถูกแยกได้เฉพาะแคปซูลของเชื้อ K1, K2, K5, K16, K20, K28, K54, K57, K58 และ K63 โดยพบ K1 มากสุดใน ไอโซเลทของผู้ติดเชื้อ

2.2.2 โครงสร้างและการจำแนกชนิดของ capsular polysaccharide (CPS) (Xu et al., 2024)

แคปซูลของแบคทีเรีย *K. pneumoniae* เป็นชั้นเมือกที่จัดเรียงอย่างหลวม ๆ อยู่ภายนอกของตัวแบคทีเรีย โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ไกลแคนที่เกิดซ้ำ ซึ่งช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหลายรูปแบบและช่วยให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ ตัวกำหนดความรุนแรงหลักของ *K. pneumoniae* คือ CPS (capsular polysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของแคปซูลและมีบทบาทสำคัญในการจำกัดการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน การปรับตัวของ *K. pneumoniae* ต่อสภาพแวดล้อมใหม่ๆ เกิดจากการปรับการแสดงออกของ *cps* และการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง [11] แบคทีเรีย *K. pneumoniae* ที่มีแคปซูลสามารถเพิ่มความหนืดของตนเองหรือแสดงลักษณะไฮเปอร์มิวโควิสคัส (hypermucoviscous phenotype) เพื่อปรับตัว ในขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่มีแคปซูลจะเพิ่มการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์บนผิวและสร้างไบโอฟิล์มผ่านกลไกที่ต่างออกไป

แอนติเจนของแคปซูลหรือที่เรียกว่า K-antigens ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์ 3 ถึง 6 ชนิดในโครงสร้างหลักและแขนง เช่น แมนโนส กลูโคส กาแลคโตส ฟิวโคส และแรมโนส การมีอยู่ของกรดกลูคูโรนิกและกรดกาแลคทูโรนิกสามารถทำให้ K-antigens มีประจุลบ ส่วนโพรเวต O-acetyl และ O-formyl เข้ามามีบทบาทในการตัดแปลงพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้เกิดความหลากหลายในโครงสร้างแคปซูลและส่งผลต่อระดับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความรุนแรงของ *K. pneumoniae* ในแคปซูลประเภท K1 การมีโพรเวตและ O-acetyl ช่วยกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น interleukin-6 (IL-6) ขณะที่ใน K57 การเติมหมู่ acetyl ช่วยลดความสามารถในการต้านเชอร์มของแบคทีเรียและเพิ่มการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ จึงเพิ่มความเป็นโรค อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษามากขึ้นเพื่อเข้าใจกลไกการก่อโรคจากการเปลี่ยนแปลงของแคปซูลใน K-type ต่าง ๆ ของ *K. pneumoniae*

วิธีการซีโรไทป์แบบดั้งเดิมแบ่ง *K. pneumoniae* ได้อย่างน้อย 79 ซีโรไทป์ตามองค์ประกอบและโครงสร้างของแคปซูล โดยมีการสรุปโครงสร้างน้ำตาลของแอนติเจน K ทั้ง 79 ชนิดไว้แล้ว อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก *K. pneumoniae* มีการถ่ายทอดยีนแคปซูลระหว่างกันอยู่บ่อยครั้งถึงประมาณ 70% จึงสามารถสร้างแคปซูลใหม่หรือไม่สามารถสร้างแคปซูลเลย ซึ่งทำให้ไม่สามารถจำแนกด้วยซีโรไทป์แบบเดิมได้ ปัจจุบันจึงมีวิธีการจำแนกใหม่ เรียกว่า KL types ซึ่งอ้างอิงจากลำดับเบสของยีน *wzi*, *wzy*, หรือ *wzc* ของ *cps locus* หรือจากข้อมูลจีโนมทั้งหมด ซึ่งแม่นยำกว่า ขณะนี้มี KL type ถูกระบุแล้วถึง 186 ชนิด โดย KL1–KL81 ตรงกับ K1–K81 และคาดว่าจะพบ KL ใหม่อีกในอนาคตจากการศึกษาจีโนมเพิ่มขึ้น

ซีโรไทป์ต่างๆ มีความหลากหลายในลักษณะความรุนแรง โดย hvKP มักพบในซีโรไทป์เฉพาะ เช่น K1, K2, K16, K28, K54, K57 และ K63 ซีโรไทป์ K1, K2, K5, K20, K54 และ K57 มักเชื่อมโยงกับฝีในตับแบบเป็นหนอง (pyogenic liver abscess) ขณะที่ K2, K1, K57, K5, K20 และ K54 มักเกี่ยวข้องกับเชื้อหุ้มสมองอักเสบ จากการศึกษาพบว่า hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKP) ซีโรไทป์ K1, K2, K16 และ K20 แสดงความรุนแรงสูงมากในแบบจำลองหนู ทั้งจากอาการทางคลินิกและผลทดสอบในห้องปฏิบัติการยืนยันว่าซีโรไทป์บางชนิดสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความรุนแรงของ *K. pneumoniae* ได้ โดยเฉพาะซีโรไทป์ K1 และ K2 ซึ่งมีความรุนแรงสูงกว่าซีโรไทป์อื่นๆ พบว่าคิดเป็นมากกว่า 70% ของกรณี hvKP ที่พบทั่วโลก การศึกษา Multilocus sequence types พบว่า K2 มีความหลากหลายทางลำดับพันธุกรรมมากกว่า K1 โดย K1 มักเชื่อมโยงกับ ST23 ขณะที่ K2 เชื่อมโยงกับ ST25, ST86, ST375 และ ST380 นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างด้านภูมิภาค โดยในเอเชีย K1 พบได้บ่อยที่

สุด ขณะที่ในอเมริกาเหนือและยุโรปมักพบ K2 สำหรับสายพันธุ์ MDR-hvKp ที่มีการรวมตัวของความดื้อยาและความรุนแรง พบว่าซีโรไทป์ K64 และ K47 ที่เชื่อมโยงกับ ST11 พบได้บ่อยในจีน การรวมยีนในบริเวณ *cps* ถือเป็นตัวผลักดันหลักของความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยสายพันธุ์ย่อย ST11-KL47 ได้ถูกแทนที่โดย ST11-KL64 ซึ่งมีความสามารถในการก่อโรคสูงขึ้นและมีอัตราการเสียชีวิตภายใน 30 วันสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ความสำเร็จของ ST11-KL64 มาจากความสามารถในการต้านออกซิแดนซ์ที่เพิ่มขึ้น ช่วยให้ออกจากการทำลายโดยแมคโครฟาจ

โครงสร้างของแคปซูลแตกต่างกันไปตามซีโรไทป์ ส่งผลต่อความสามารถในการก่อโรค Zhang et al. แสดงให้เห็นว่าประเภทของแคปซูลมีอิทธิพลต่อความสามารถในการก่อโรคของ *K. pneumoniae* โดยตรง โดยการเปลี่ยนการแสดงออกของยีน *cps* ในสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรีย K23 ถูกกำจัดได้เร็วกว่า K3 ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างของแคปซูลมีผลต่อการที่โฮสต์สามารถกำจัดแบคทีเรียได้

การศึกษาแสดงให้เห็นว่า *K. pneumoniae* ซีโรไทป์ K1 และ K2 มีความรุนแรงสูงกว่าซีโรไทป์อื่น ซึ่งเกิดจากความสามารถในการต้านการจับกินและการทำลายภายในเซลล์ของเซลล์ภูมิคุ้มกัน เช่น แมคโครฟาจในปอด โดยไม่ขึ้นกับการเป็นสายพันธุ์ที่มีแคปซูลมากหรือไม่ ในกรณีนี้สืบมาจาก *K. pneumoniae* พบว่าซีโรไทป์ K1 และ K2 มีผลมากกว่ายีน *magA* และ *rmpA* ซีโรไทป์จึงถือว่าเป็นตัวบ่งชี้ความรุนแรงอย่างหนึ่ง ซึ่งอาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของแคปซูลที่ให้ข้อได้เปรียบในการอยู่รอด เช่น แคปซูลของสายพันธุ์ K1 และ K2 ไม่มีแมนโนส ซึ่งในสายพันธุ์ความรุนแรงต่ำจะมี แมนโนสนี้ช่วยให้แมคโครฟาจสามารถจดจำแคปซูลและจับกินแบคทีเรียได้ดี กรดไซลิอาลิกใน CPS ของ K1 และ K2 สามารถเลียนแบบกรดไซลิอาลิกในเซลล์มนุษย์ ช่วยให้หลบเลี่ยงการตรวจจับของภูมิคุ้มกัน หรือขัดขวางนิวโทรฟิลผ่านการจับกับตัวรับ Siglec-9 บนผิวเซลล์นิวโทร นอกจากนี้ โปรตีน *fructose-1,6-bisphosphate aldolase* ที่อยู่บนผิวแบคทีเรีย พบว่ามีการผลิตในระดับสูงในสายพันธุ์ K1 ซึ่งช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินและทำลายโดยนิวโทรฟิลในสภาวะที่มีน้ำตาลสูง

อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่สายพันธุ์ทั้งหมดภายในซีโรไทป์เดียวกันจะแสดงความรุนแรงเท่ากัน สายพันธุ์ K1/K2 ที่ไม่มีความหนืดสูง หรือไม่มีปัจจัยความรุนแรงอื่น จะไม่แสดงลักษณะ hvKP การศึกษาสายพันธุ์ K47 พบว่ามีทั้งสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงและต่ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากความแตกต่างในลำดับยีน *cps* การระบุ hvKP ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นมีความสำคัญทางคลินิก เช่น การตรวจหาแหล่งติดเชื้อที่ซ่อนอยู่และการเฝ้าระวังการเกิดโรคแทรกซ้อนอย่าง endophthalmitis

2.3 กลุ่มยา carbapenems

คาร์บาเพนิม (carbapenems) เป็นยาต้านแบคทีเรียกึ่งสังเคราะห์ในกลุ่มของ β -lactam เป็นยาปฏิชีวนะที่มี β -lactam ring อยู่ในโครงสร้างหลัก (β -lactam antimicrobial agents) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal) โดยออกฤทธิ์ได้กว้าง ครอบคลุมทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ (รวมทั้ง *Enterobacteriaceae*) แบคทีเรียแกรมบวกชนิดใช้ และไม่ใช้ออกซิเจน (จันคณา บุรณะ โอสถ และ คณวรรช พจนาคม, 2548) อีกทั้งจากสูตรโครงสร้างทนต่อเอนไซม์ β -lactamase ได้ดีกว่ายาในกลุ่ม β -lactam ตัวอื่นๆ จึงได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง การออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม carbapenems โดยส่วนของวงแหวน β -lactam จับกับ penicillinbinding proteins (PBPs) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์จึงไม่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ตาย โดย carbapenems แต่ละชนิดสามารถจับกับ PBPs ได้แตกต่างกัน (ภูริต ธนะรังสฤษฎ์, 2566)

2.3.1 การดื้อยา

การดื้อยา คือ ความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา หรือปรสิตในการอยู่รอดและเติบโตได้แม้ได้รับยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Agents) เคยมีประสิทธิภาพในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื่อนั้น ส่งผลให้การรักษาไม่ได้ผล และอาจทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา จนอาจนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนหรือการเสียชีวิต

2.3.2 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenem ใน *K. pneumoniae*

กลไกการดื้อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* มักเกิดจากการผลิตเอนไซม์ carbapenemase ซึ่งสามารถทำลายยา carbapenem ได้ อาจมีหลายกลไกเกิดร่วมกัน เช่น เชื้อทำให้เกิดการบดพ่นองในการซึมผ่านเข้าออกเซลล์ร่วมกับการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ขึ้นมาทำลายยา carbapenem ที่เรียกว่า carbapenem-hydrolysing β -lactamase หรือ carbapenemase ซึ่งพบได้บ่อย และสามารถจำแนกได้หลายชนิด โดยจัดกลุ่มเอนไซม์ carbapenemase ตามโครงสร้างโมเลกุล จะประกอบด้วยเอนไซม์ใน Amber class A class B และ class D ยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase นี้จะอยู่บน plasmid สามารถถ่ายโอนไปยังเชื้ออื่นได้ นอกจากนี้แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBLs หรือ AmpC ร่วมกับการสูญเสีย porin หรือมี efflux pump ก็สามารถทำให้เชื้อดื้อยา carbapenem ได้เช่นกัน

2.3.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ใน *K. pneumoniae*

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ใน *K. pneumoniae* ได้แก่ carbapenemase-encoding genes ซึ่งจะเข้ารหัสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา carbapenem ใน *K. pneumoniae* ได้แก่

- *bla_{KPC}* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) เป็นเอนไซม์ Class A beta-lactamase สามารถย่อยสลายยา imipenem, meropenem และ ertapenem มักพบใน *K. pneumoniae* ที่แพร่ระบาดในโรงพยาบาล

- *bla_{NDM}* (New Delhi metallo- β -lactamase) เป็นเอนไซม์ Metallo- β -lactamase (MBL) สามารถย่อยสลายยา carbapenems, cephalosporins และ penicillins ไม่ถูกยับยั้งโดย β -lactamase inhibitors (เช่น clavulanic acid, tazobactam)

- *bla_{OXA-48}* (Oxacillinase-48-like enzymes) เป็นเอนไซม์ Class D β -lactamase สามารถย่อยสลายยา imipenem และ penicillins ได้ดี แต่ไม่ค่อยมีผลกับ cephalosporins

- *bla_{VIM}* (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase) เป็นเอนไซม์ Metallo- β -lactamase (MBL) สามารถย่อยสลายยา carbapenems, cephalosporins และ penicillins

- *bla_{IMP}* (Imipenemase metallo- β -lactamase) เป็นเอนไซม์ Metallo- β -lactamase (MBL) มักพบในเชื้อดื้อยาหลายชนิด เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii*

2.4 เทคนิคและหลักการในการจำแนกชนิดของแคปซูล

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA amplification) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแคปซูลใน *K. pneumoniae* โดยการจำลองกระบวนการจำลองตัวเองของ DNA ตามธรรมชาติ เทคนิคนี้ใช้เอนไซม์ DNA polymerase เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่จากดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA) โดยอาศัยไพรเมอร์ (Primers) ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย โดยเทคนิค PCR ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแคปซูลจะอาศัยการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแคปซูล เช่น *wzy* และ *wzx* ซึ่งเป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อแคปซูลแต่ละชนิดของเชื้อ (Ssekatawa et al., 2021) กระบวนการทำงานของ PCR แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก โดยทำซ้ำกันหลายรอบ (Cycles) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

- Denaturation (การแยกสาย DNA) คือการทำให้สายดีเอ็นเอเป้าหมายแยกออกเป็นสายเดี่ยว (~94–98°C)
- Annealing (การจับคู่ไพรเมอร์) คือการที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแคปซูลเข้าจับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย (~50–65°C)
- Extension (การสังเคราะห์สาย DNA) โดยเอนไซม์ DNA polymerase จะเติมนิวคลีโอไทด์ (dNTPs) เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ (~72°C)

Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหลายชิ้นส่วนพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว โดยใช้ไพรเมอร์หลายชุดที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายทำให้สามารถจำแนกชนิดของแคปซูลได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยอาศัยหลักการเดียวกับ PCR ปกติ แต่สามารถตรวจหาดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะหลายชุด ที่ออกแบบให้จับกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแคปซูลแต่ละชนิด (Ssekatawa et al., 2021)

การสกัด DNA จาก *K. pneumoniae* เป็นขั้นตอนสำคัญที่ใช้เพื่อเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการทำ PCR-based capsular typing โดยกระบวนการสกัด ต้องสามารถแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์ออกจากเซลล์แบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอสามารถใช้วิธี DNA boiling extraction เป็นเทคนิคง่าย ๆ ในการสกัด DNA โดยใช้ความร้อนสูง (boiling) ประมาณ 95–100°C เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมา โดยไม่ต้องใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ที่ซับซ้อนเหมือนวิธีอื่น ๆ โดยมีข้อดีคือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก เหมาะสมกับการเตรียม template สำหรับ PCR ข้อเสียคือ คุณภาพ DNA ไม่สูง (ไม่เหมาะกับการนำไปทำ DNA sequencing) และอาจมีสิ่งปนเปื้อนที่รบกวน PCR หากไม่ปั่นให้ดี

การออกแบบไพรเมอร์ (Primer Design) เป็นขั้นตอนสำคัญใน Multiplex PCR ซึ่งใช้ในการจำแนกชนิดของแคปซูลของ *K. pneumoniae* ไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างเหมาะสมจะช่วยให้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) มีความจำเพาะ (Specificity) และประสิทธิภาพ (Efficiency) สูง โดยไพรเมอร์ที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

- ความจำเพาะสูง (High Specificity) ไพรเมอร์ต้องจับกับยีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อชนิดของแคปซูล (เช่น *wzyK1*, *wzxK5*) และต้องไม่มีการจับกับดีเอ็นเออื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้อง (Non-specific binding)

- อุณหภูมิหลอมตัวเหมาะสม (Optimal Melting Temperature, Tm) อุณหภูมิ Tm ของไพรเมอร์ ควรอยู่ที่ 55–65°C หากทำ Multiplex PCR ไพรเมอร์ทุกตัวควรมี Tm ใกล้เคียงกัน (ต่างกันไม่เกิน 2–3°C)
- ความยาวของไพรเมอร์ (Primer Length) โดยทั่วไปควรอยู่ที่ 18–25 คู่เบส (bp) ไพรเมอร์ที่สั้นเกินไปอาจทำให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะ (Non-specific binding) และไพรเมอร์ที่ยาวเกินไปอาจทำให้ลดประสิทธิภาพของ PCR
- ปริมาณ GC (GC Content) เหมาะสมควรอยู่ที่ 40–60% เพื่อให้การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับ ดีเอ็นเอมีเสถียรภาพ ไพรเมอร์ที่มี GC สูงเกินไป อาจทำให้เกิดโครงสร้างรอง (Secondary Structure)
- ไม่มีโครงสร้างรอง (Avoid Secondary Structures) หลีกเลี่ยงการเกิด Hairpin Loop, Self-dimer และ Cross-dimer ซึ่งอาจรบกวนปฏิกิริยา PCR
- ไม่มี ความคล้ายคลึงกับดีเอ็นเออื่น ๆ (Avoid Homology with Other Sequences) ไพรเมอร์ ต้องไม่สามารถจับกับยีนอื่น ๆ หรือดีเอ็นเอของแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ (Taha et al., 2023)
- ขนาดผลิตภัณฑ์ (amplicon size) แต่ละผลิตภัณฑ์ควรมีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน (เช่น 100, 200, 300 bp) เพื่อให้แยกบนเจลได้ง่าย

2.5 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 ความสัมพันธ์ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา carbapenem ที่มีชนิดแคปซูลจำเพาะ และปัจจัยทางคลินิก : ความเสี่ยงในสภาพแวดล้อมโรงพยาบาล

งานวิจัยของ Soltani et al.(2022) ศึกษาเกี่ยวกับการดื้อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา carbapenem (carbapenem) มีความสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาและชนิดของแคปซูลของเชื้อ รวมถึงปัจจัยทางคลินิกต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อการติดเชื้อและการดื้อยา งานวิจัยนี้พบว่าชนิดแคปซูล K20 ของเชื้อ *K. pneumoniae* มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา carbapenem โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะและแผล การศึกษาข้างนี้ชี้ให้เห็นว่า การรักษาด้วยยาหลายชนิดร่วมกันมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ยาชนิดเดียวในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากเชื้อดื้อยา การศึกษานี้เชื่อมโยงกับการระบาดของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพที่กำลังเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก และเป็นปัญหาหลักในโรงพยาบาล โดยเฉพาะในเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มเชื้อที่ต้านทานต่อการรักษา

ด้วยยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ การศึกษายังสามารถเชื่อมโยงกับการค้นพบว่าการดื้อยามีความสัมพันธ์กับชนิดแคปซูลของเชื้อ และวิธีการทางพันธุกรรม เช่น PCR ที่ใช้ในการระบุชนิดแคปซูล และการตรวจหายีนดื้อยา ซึ่งมีความสำคัญในการติดตามและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาในระบบสาธารณสุข ในส่วนของการพัฒนาเทคนิคการตรวจจับที่มีความแม่นยำเช่นการใช้ multiplex PCR เพื่อระบุชนิดแคปซูล ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการใช้วิธีการทางพันธุกรรมเพื่อให้สามารถระบุและควบคุมเชื้อที่มีความดื้อยาและความรุนแรงในการก่อโรครุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับการทำความเข้าใจปัจจัยพันธุกรรมของการดื้อยาด้านจุลชีพเพื่อหยุดการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยา

2.5.2 การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาคาร์บาเพนิมซึ่งแยกได้จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในประเทศอียิปต์

งานวิจัยของ Marwa et al.(2023) ได้ทำการตรวจสอบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug-resistant, MDR) พบได้บ่อยแค่ไหนในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยตันตา เมืองกาห์ร์เบีย ประเทศอียิปต์ โดยมุ่งเน้นที่การตรวจสอบการดื้อยาของกลุ่มคาร์บาเพนิมและการวิเคราะห์ชนิดของแคปซูล (capsular serotypes) ของเชื้อ โดยที่นักวิจัยได้เก็บตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 500 ตัวอย่างจากผู้ป่วย แล้วแยกเชื้อ *K. pneumoniae* ได้จำนวน 160 ตัวอย่าง (คิดเป็น 32%) นำตัวอย่างมาทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial susceptibility testing) เพื่อประเมินระดับการดื้อยา โดยใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ได้แก่ *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, และ *bla_{NDM}* จากนั้นตรวจหา capsular serotypes ได้แก่ K1, K2, K3, K5, K20, K54, และ K57 โดยพบว่าเชื้อ 31.3% (50 จาก 160 ตัวอย่าง) มีการดื้อยาคาร์บาเพนิมในระดับ phenotypic (ทดสอบจากการตอบสนองต่อยา) การวิเคราะห์ทาง molecular พบว่ามี 38.75% (62 จาก 160 ตัวอย่าง) ที่มียีนดื้อยาคาร์บาเพนิม โดยยีนที่พบมากที่สุดคือ *bla_{OXA-48}* (15.5%) รองลงมาคือ *bla_{VIM}* (15%) อื่น ๆ เช่น *bla_{IMP}* (7.5%), *bla_{KPC}* (4%) และ *bla_{NDM}* (3.8%) พบความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยากับการดื้อยาที่แสดงออกทาง phenotype *bla_{VIM}* แสดงการดื้อยาร่วมใน 91.67% ของตัวอย่าง *bla_{OXA-48}* ใน 88% Capsular typing (ชนิดของแคปซูล) พบว่า Serotype ที่พบมากที่สุดคือ K1 (30.6%) รองลงมาคือ K57 (24.2%), K54 (19.35%), K20 (9.67%) และ K2 (6.45%) แสดงให้เห็นว่าการพบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ทั้งดื้อยาหลายชนิดและมีความรุนแรงสูง (hypervirulent) เป็นภัยต่อสาธารณสุขของชุมชน โดยเฉพาะในบริบทของโรงพยาบาล งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมการ

แพร่กระจายของเชื้อ *K. pneumoniae* การแยกชนิดของแคปซูลด้วยวิธี Multiplex PCR เพื่อให้ทราบถึงความรุนแรงของเชื้อตามชนิดของแคปซูล เพื่อจัดการกับเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ

2.5.3 การวิเคราะห์ลักษณะและการจำแนกชนิดของเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีนจำเพาะต่อชนิดของแคปซูล ลำดับดีเอ็นเอซ้ำที่มีจำนวนแตกต่างกัน (VNTR) และยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ

งานวิจัยของ Turton JF et al. (2010) อธิบายการใช้เทคนิค multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจพบชนิดของแคปซูล (capsular types) K1, K2, K5, K54 และ K57 ซึ่งเป็นชนิดที่เกี่ยวข้องมากที่สุดกับโรคที่รุนแรงหรือความสามารถในการก่อโรค รวมทั้งชนิดของแคปซูลเพิ่มเติม K20 ปัจจัยก่อโรคที่คาดว่าเกี่ยวข้อง 2 ชนิด (rmpA และ wcaG) และส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน 16S–23S ของ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งช่วยให้สามารถระบุเชื้อชนิดนี้ได้ ยีน wcaG ควบคุมการผลิต fucose ที่อยู่ในแคปซูล และพบว่ามีความสัมพันธ์กับชนิดแคปซูล K1 และ K54 แต่ก็ตรวจพบในสายพันธุ์อื่นๆ ด้วย โดยพบว่ามี 18 จาก 543 ตัวอย่างที่ตรวจด้วย PCR ให้ผลเป็นบวกสำหรับยีนนี้ นอกจากนี้ยังออกแบบแผนการตรวจแบบ VNTR (variable number tandem repeat) ที่ประกอบด้วย 8 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถแยกแยะสายพันธุ์ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกับวิธี PFGE ในกลุ่มตัวอย่าง 36 ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของชนิด PFGE จำนวน 29 ชนิด ตัวอย่างทั้งหมดที่ทดสอบจากสายพันธุ์ K1 ที่มีความรุนแรงของ clone CC23 ซึ่งเกี่ยวข้องกับฟีตบชนิดมีหนอง มีลักษณะ VNTR แบบเดียวกัน ซึ่งอาจช่วยระบุ clone นี้ได้ โดยสายพันธุ์เหล่านี้ยังตรวจพบว่ามี aIIIS เป็นบวกด้วยการตรวจ PCR วิธีเหล่านี้จึงให้แนวทางที่รวดเร็วในการจำแนกและจัดประเภทของเชื้อชนิดนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อทั้งในชุมชนและในโรงพยาบาล

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยประยุกต์ในสาขาวิชาจุลชีววิทยา โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเชิงสำรวจและทดลอง เพื่อวินิจฉัยแยกซีโรไทป์ของแคปซูลในเชื้อ carbapenem-resistant *K. pneumoniae*

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

- | | |
|--|---------------------------|
| 1) Incubator | Memmert / Germany |
| 2) Autoclave | Tomy kogyo / Japan |
| 3) Hot air oven | Memmert / Germany |
| 4) Analytical balance | Mettler-Toledo / Thailand |
| 5) Microwave | Sharp / Japan |
| 6) Thermocycler Bio Plus | Medical / Thailand |
| 7) UV light transilluminator | Biogenomed / Thailand |
| 8) Electrophoresis และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า | Bio-Rad / USA |
| 9) Microcentrifuge | Hsingtai / TAIWAN |

3.2.2 อุปกรณ์

1) Pipette tips 1,000 μ l	Scientific Co., / USA.
2) Microcentrifuge tube 0.2 mL, 1.5 mL	Pacific Science Co.,LTD / Poland
3) Loop	Unitaxin
4) Autopipette 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1,000	Eppendorf research plus / Germany

3.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

3.3.1 สารเคมีในการทดสอบ PCR และ sequencing

1) Agarose gel	EMD Chemicals / USA
2) Accustart TM II Geltrack TM PCR Supermix (2X)	Quantabio / USA
3) oligonucleotide primer	Macrogen / South Korea
4) ExcelBand 100 bp+3K DNA Ladder	SMOBIO / TAIWAN
5) GeneAll Expin Combo GP – Gel and PCR	GeneAll®/ Korea

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 กลุ่มตัวอย่าง

1) จำนวนกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้อุบัติการณ์จากการศึกษาของ Taha และคณะในปี 2023 โดยการตรวจหาซีโรไทป์แคปซูลของเชื้อ carbapenem-resistant *K. pneumoniae* โดยวิธี multiplex-PCR พบว่าเป็นชนิด K1, K57, K54, K20 และ K2 คิดเป็น 90.27% (P = 0.90) โดยไม่พบซีโรไทป์แคปซูล K3 และ K5

$$\text{จากสูตร } n = \frac{Z^2 \alpha / 2p(1-p)}{e^2}$$

กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ = 0.05

$$Z \frac{\alpha}{2} = 1.96$$

กำหนดให้ $e = 0.05$ (ยอมรับให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ 5 %)

$$n = \frac{1.96^2(0.90)(1-0.90)}{0.05^2}$$

$$= 138 \text{ ตัวอย่าง}$$

2) การเก็บตัวอย่าง เชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาล นพรัตนราชธานี จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เดือนมีนาคม - มิถุนายน 2566 จำนวน 112 ตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์คัดเข้าของกลุ่มตัวอย่างคือ เชื้อ *K. pneumoniae* วินิจฉัยเชื้อด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOFMS) และเชื้อมีการดื้อยา imipenem หรือ meropenem หรือ ertapenem อย่างน้อย 1 ชนิด โดยใช้เครื่อง Sensititre™ Complete Automated AST System

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการขอการรับรองเชิงจริยธรรมแบบยกเว้นจากมหาวิทยาลัยรังสิต

3.4.2 การทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย

1) การสกัด DNA

นำเชื้อ *K. pneumoniae* จาก stock ซึ่งเก็บไว้ที่ -20°C มาเพาะเลี้ยงบน tryptic soy agar บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง สกัด DNA ของเชื้อด้วยวิธีการต้ม ทำได้โดยการเขี่ยโคโลนีของเชื้อจาก tryptic soy agar 3-5 โคโลนี ใส่ลงไปใน microtube ขนาด 1.5 mL ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 mL จากนั้นนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 15 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสใสใน microtube ขนาด 1.5 mL หลอดใหม่ หาความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้ NanoDrop 1000 spectrophotometer จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ซึ่ง DNA ที่สกัดได้นี้จะใช้เป็น template ในขั้นตอนการทำ polymerase chain reaction (PCR)

2) การตรวจหาซีโรไทป์แคปซูลด้วยวิธี multiplex PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ใช้ในการจำแนกซีโรไทป์ของแคปซูลด้วยเครื่อง thermocycler ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T100 ด้วยโปรแกรม ดังแสดงในตาราง 3.1 โดยแยกเป็น 2 หลอด หลอดที่ 1 ตรวจหายีนชนิด *WzyK1*, *WzyK2*, *WzxK5* และ *WzxK54* การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดที่ 1 ประกอบด้วยขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C องศาเซลเซียส นาน 15 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58°C องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C

องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จำนวน 35 รอบ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และหลอดที่ 2 ตรวจสอบชนิด *WzyK3*, *WzyK20* และอื่น *WzyK57* การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดที่ 2 ประกอบด้วยขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จำนวน 35 รอบ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตของ PCR (PCR product) ที่ได้โดยกระบวนการแยก DNA ด้วยไฟฟ้าโดยใช้เจลความเข้มข้น 1.5% (1.5% agarose gel electrophoresis) ใน 1X TBE buffer ที่เติม fluorescent dye โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 30 นาที และใช้ 100 base pairs DNA ladder เป็น DNA marker ดูด้วยเครื่อง BIO RAD geldoc go imaging system และถ่ายภาพเก็บไว้ ทำการเปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของเชื้อควบคุม โดยยืนยันยืนยันเป้าหมาย PCR product โดยการส่ง DNA sequencing และนำ DNA ของเชื้อสายพันธุ์นั้นมาเป็น positive control และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *K. quasipneumoniae* ATCC700603

ตารางที่ 3.1 โพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาซีโรไทป์แคปซูลของเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธี multiplex PCR (Jane F. Turton et al., 2010)

Target Genes	Primer sequences (5'–3')	Amplicon Size (bp)
WzyK1	F : GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC R : GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG	1283
WzyK2	F : GAC CCG ATA TTC ATA CTT GAC AGA G R : CCT GAA GTA AAA TCG TAA ATA GAT GGC	641
WzxK5	F : TGG TAG TGA TGC TCG CGA R : CCT GAA CCC ACC CCA ATC	280
WzyK20	F : CGG TGC TAC AGT GCA TCA TT R : GTT ATA CGA TGC TCA GTC GC	741
WzxK54	F : CAT TAG CTC AGT GGT TGG CT R : GCT TGA CAA ACA CCA TAG CAG	881

ตารางที่ 3.1 โพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาซีโรไทป์แคปซูลของเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธี multiplex PCR (ต่อ) (Jane F. Turton et al., 2010)

Target Genes	Primer sequences (5'–3')	Amplicon Size (bp)
WzyK57	F : CTC AGG GCT AGA AGT GTC AT	1037
	R : CAC TAA CCC AGA AAG TCG AG	
WzyK3	F : TAG GCA ATT GAC TTT AGG TG	549
	R : AGT GAA TCA GCC TTC ACC T	

4) ข้อมูลการแยกชนิดของยีนคือยาคาร์บาพีเนมที่ได้จากงานวิจัยของผศ.ดร.นิภาพร ปี 2566 ข้อมูลชนิดของสิ่งส่งตรวจ หอผู้ป่วย และความไวต่อยาต้านจุลชีพได้รับการอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี

3.5 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 เก็บรวบรวมผลการศึกษา และนำผลมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนาเพื่อหาความชุกของชนิดแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือยาคาร์บาพีเนม โดยใช้ร้อยละด้วยโปรแกรม Microsoft excel

3.5.2 ทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนคือยาคาร์บาพีเนม และตำแหน่งของการติดเชื้อ กับชนิดแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือยาคาร์บาพีเนม โดยใช้สถิติทดสอบ Chi-square test หรือ Fisher's exact test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS statistics (version 20) (IBM Corporation)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างคือผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือต่อยา carbapenem ที่แยกได้จากโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี จังหวัด กรุงเทพมหานคร จำนวน 112 ราย พบว่ามีผู้ป่วยเพศชายจำนวน 65 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.5 และเพศหญิงจำนวน 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.5 ของผู้ป่วยทั้งหมด

โดยมีช่วงอายุระหว่าง < 5 ถึง > 60 ปี เมื่อพิจารณาตามช่วงอายุพบว่ากลุ่มที่มีอายุระหว่าง > 60 ปี มีจำนวนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 80.4 รองลงมาคือกลุ่มอายุ 18 – 60 ปี คิดเป็นร้อยละ 16.1 ส่วนกลุ่มอายุต่ำกว่า 5 ถึง <18 ปี มีจำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.6

เมื่อพิจารณาตามหอผู้ป่วยใน (Ward) ที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาพบมากสุดในแผนกอายุรกรรม (Med) จำนวน 39 ราย (ร้อยละ 34.8) รองลงมาคือ ICU 15 ราย (ร้อยละ 13.4) ขณะที่แผนกอื่นๆ พบในสัดส่วนที่น้อยกว่า เช่น ER-med 9 ราย (ร้อยละ 8.0) ER-trauma 9 ราย (ร้อยละ 8.0) และศัลยกรรม (Surg) 8 ราย (ร้อยละ 7.1) เป็นต้น

เมื่อพิจารณาตามชนิดสิ่งส่งตรวจ (Specimen) พบว่า Sputum (เสมหะ) เป็นตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมากที่สุด จำนวน 51 ตัวอย่าง (ร้อยละ 45.5) รองลงมาคือ Catheterized urine จำนวน 38 ตัวอย่าง (ร้อยละ 33.9) และ MSU 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.5) นอกจากนี้ยังพบเชื้อจาก Blood 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.0) และ Pus (หนอง) 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.6)

เมื่อพิจารณายีน *bla_{NDM}* พบว่ามีผล positive 37 ราย (ร้อยละ 33.0) negative 75 ราย (ร้อยละ 67.0) และเมื่อพิจารณายีน *bla_{OXA-48}* พบว่ามีผล positive 90 ราย (ร้อยละ 80.4) negative 22 ราย (ร้อยละ 19.6)

สรุปได้ว่า การติดเชื้อ *K. pneumoniae* พบมากในเพศชาย กลุ่มอายุ 65-79 ปี โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่รักษาในแผนกอายุรกรรม และตรวจพบเชื้อจากสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะและปัสสาวะจากสายสวนเป็นหลักอีกทั้งยังตรวจพบยีน *bla_{NDM}* และ *bla_{OXA-48}* อีกด้วย

ตารางที่ 4.1 จำนวนและร้อยละข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง (n = 112)

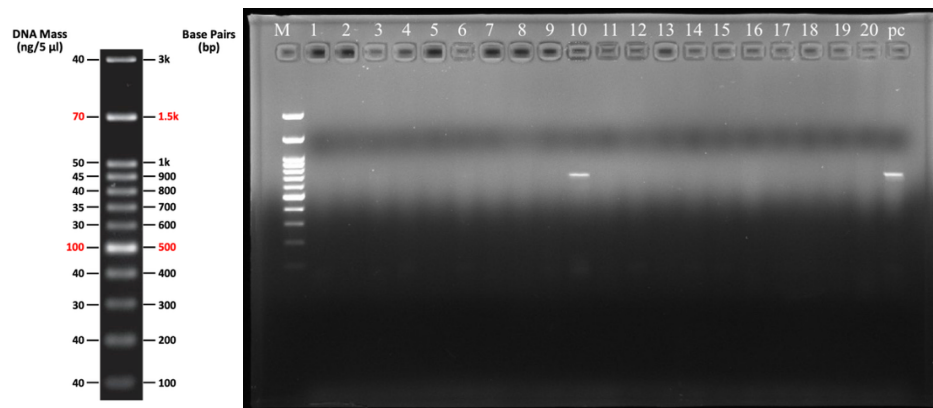
ลักษณะส่วนบุคคล	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
เพศ		
ชาย	61	54.5
หญิง	51	45.5
อายุ		
< 5	0	0.0
5 to < 18	4	3.6
18 to 60	18	16.1
> 60	90	80.4
Specimen		
MSU	5	4.5
Cath urine	38	33.9
h/c	9	8.0
Sputum	51	45.5
Pus-abdomen	1	0.9
Penis	1	0.9
Pus-bed sore	1	0.9
Pus (ก้นกบ)	1	0.9
Pus	4	3.6
Blood	1	0.9

ตารางที่ 4.1 จำนวนและร้อยละข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง (n = 112) (ต่อ)

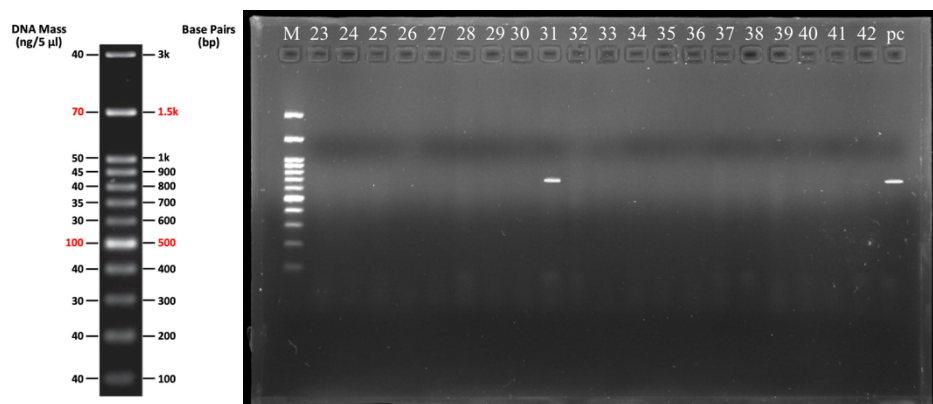
ลักษณะส่วนบุคคล	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
Ward		
ER-Med	9	8.0
Med	39	34.8
ER-Trauma	9	8.0
ICU	15	13.4
Sur	8	7.1
Med-ICU	7	6.3
ประกันสังคม	1	0.9
Obs-ER	8	7.1
Stroke	4	3.6
ICU-sur	2	1.8
GP	1	0.9
ER-obs	2	1.8
ICU-ด	1	0.9
Semi-ICU	4	3.6
Bone	2	1.8
<i>bla</i>_{NDM}		
Positive	37	33.0
Negative	75	67.0
<i>bla</i>_{OXA-48}		
Positive	90	80.4
Negative	22	19.6

4.2 ผลการตรวจหายีน *WzyK1*, *WzyK2*, *WzyK3*, *WzxK5*, *WzyK20*, *WzxK54* และ *WzyK57* ที่พบในเชื้อ *K. pneumoniae* ต่อยากลุ่ม carbapenem

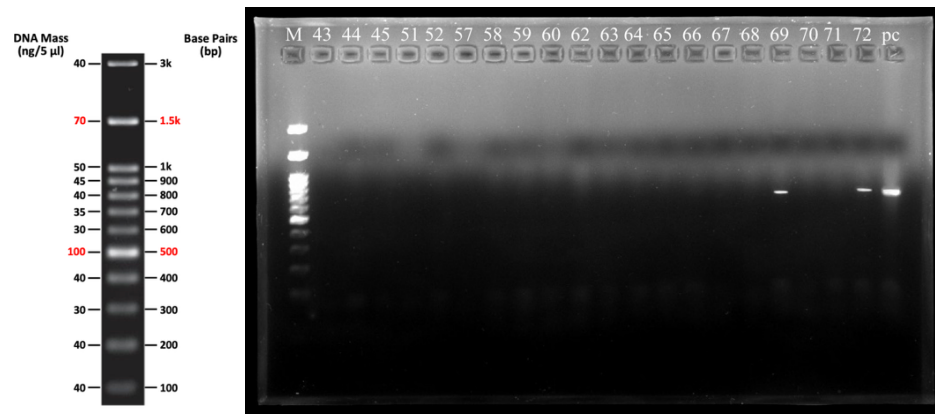
ตรวจหายีน *WzyK1*, *WzyK2*, *WzyK3*, *WzxK5*, *WzyK20*, *WzxK54* และ *WzyK57* ของเชื้อจำนวน 112 ตัวอย่าง ด้วยวิธี multiplex-PCR โดยยีนเป้าหมายมีขนาด 1283 bp, 641 bp, 280 bp และ 881 bp (รูปที่ 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 และ 4.6) 549 bp, 741 bp และ 1037 bp (รูปที่ 4.7 และ 4.8) ตามลำดับ



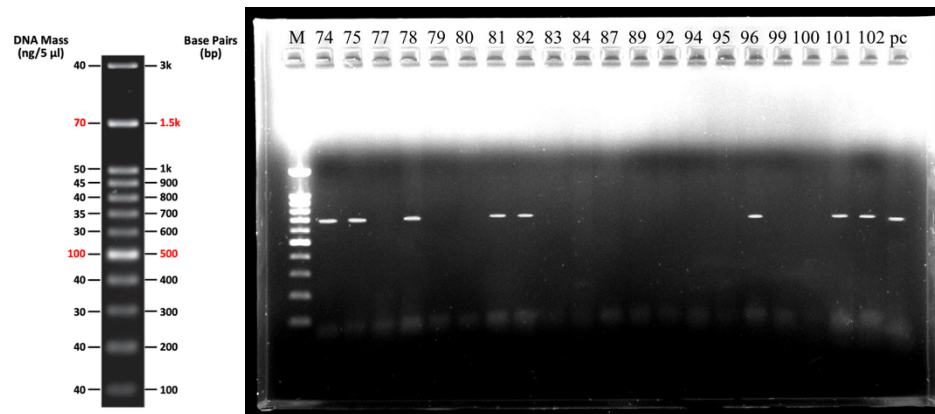
รูปที่ 4.1 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหายีน *WzyK1*, *WzyK2*, *WzxK5*, และ *WzxK54*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK2* gene : 641 bp คือ Lane 10 ; pc : Positive control



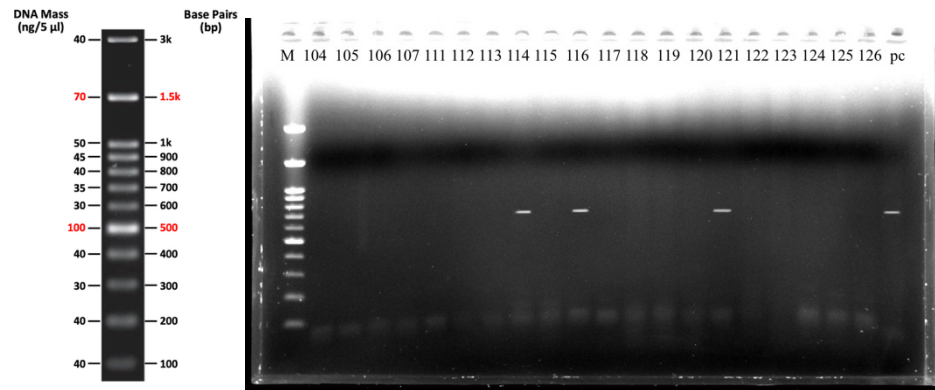
รูปที่ 4.2 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหายีน *WzyK1*, *WzyK2*, *WzxK5*, และ *WzxK54*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK2* gene : 641 bp คือ Lane 31 ; pc : Positive control



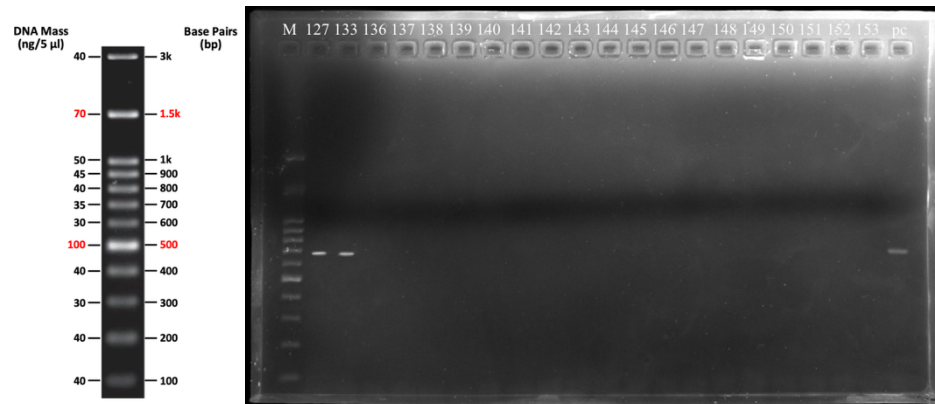
รูปที่ 4.3 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น *WzyK1*, *WzyK2*, *WzxK5*, และ *WzxK54*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK2* gene : 641 bp คือ Lane 69 และ 72 ; pc : Positive control



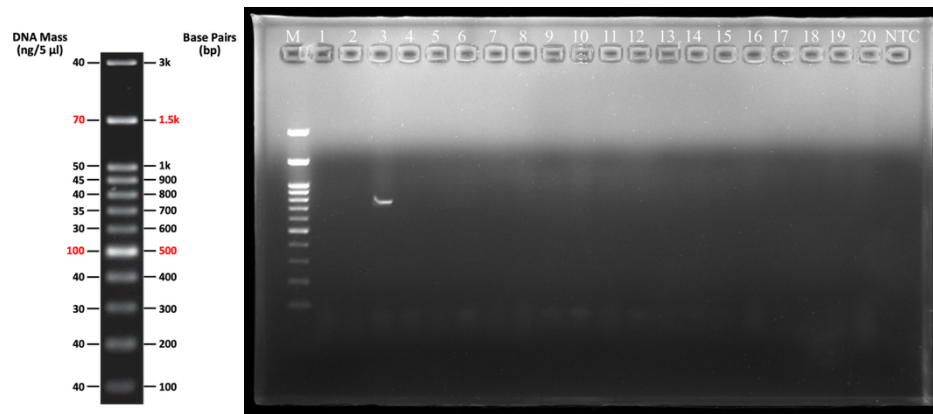
รูปที่ 4.4 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น *WzyK1*, *WzyK2*, *WzxK5*, และ *WzxK54*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK2* gene : 641 bp คือ Lane 74, 75, 78, 81, 82, 96, 101 และ 102 ; pc : Positive control



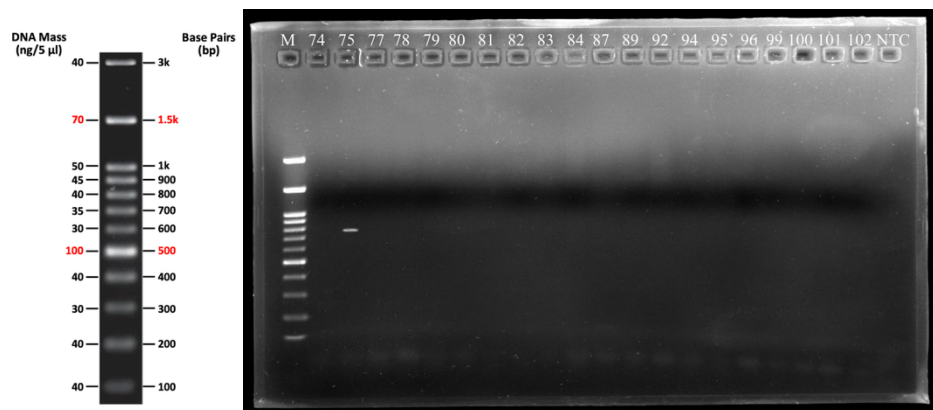
รูปที่ 4.5 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น *WzyK1*, *WzyK2*, *WzxK5*, และ *WzxK54*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK2* gene : 641 bp คือ Lane 114, 116 และ 121 ; pc : Positive control



รูปที่ 4.6 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหาชิ้น *WzyK1*, *WzyK2*, *WzxK5*, และ *WzxK54*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK2* gene : 641 bp คือ Lane 127 และ 133 ; pc : Positive control



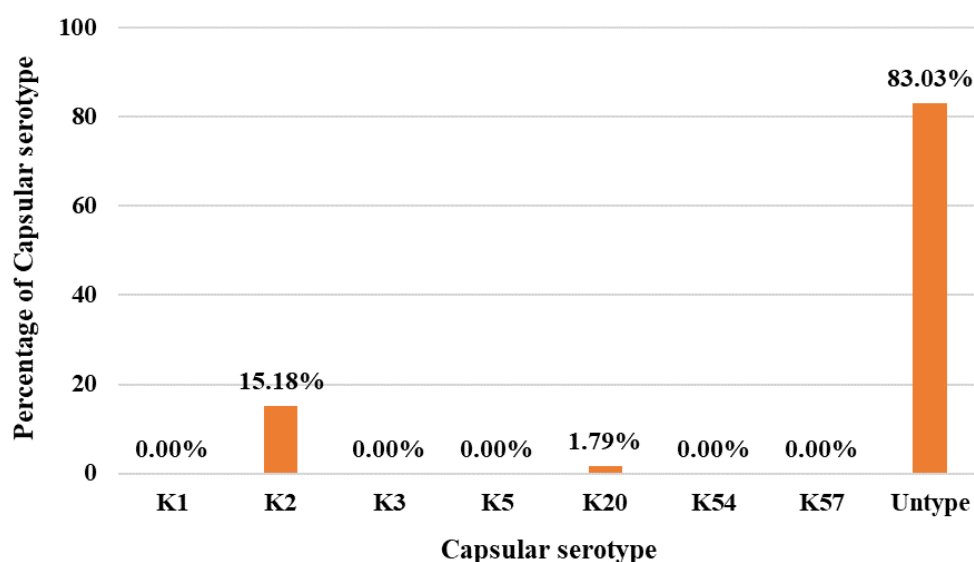
รูปที่ 4.7 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหายีน *WzyK3*, *WzyK20*, และ *WzyK57*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK20* gene : 741 bp คือ Lane 3 ; NTC : No Template Control



รูปที่ 4.8 Agarose gel electrophoresis ของการตรวจหายีน *WzyK3*, *WzyK20*, และ *WzyK57*; Lane M : DNA Ladder (100 bp) ; *WzyK20* gene : 741 bp คือ Lane 75 ; NTC : No Template Control

4.3 ความชุกของชนิดแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา carbapenem

จากการศึกษาความชุกของชนิดแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem จำนวน 112 ตัวอย่าง ได้แก่ serotype K1, K2, K3, K5, K20, K54 และ K57 ซึ่งพบความชุกของ serotype K2 จำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.18) K20 จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.79) และ Untypeable serotype จำนวน 93 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.03) แต่ไม่พบเชื้อที่มียีน K1, K3, K5, K54 และ K57 ดังแสดงรูปที่ 4.9



*Untype = Untypeable serotype

รูปที่ 4.9 แผนภูมิแสดงความชุกของชนิดแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem (n=112)

4.4 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่สัมพันธ์กับ capsular serotype และ เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem

Capsular serotype K2

จากการศึกษา capsule serotype K2 พบจำนวน 17 ตัวอย่าง หมายเลข 10, 31, 69, 72, 74, 75, 78, 81, 96, 101, 102, 114, 116, 121, 127, 133 พบว่ามีผู้ป่วยเป็นเพศชาย จำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.06 และเพศหญิง จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.94 ของ capsular serotype K2 ทั้งหมด

เมื่อพิจารณาตามอายุของจำนวน 17 ตัวอย่างที่ศึกษา Capsular serotype K2 พบว่ามีอายุ 64, 74 และ 82 จำนวนละ 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.76 ตามลำดับ และมีอายุ 19, 59, 66, 73, 75, 77, 80, 81, 88, 89, 92 จำนวนละ 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.9 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาตามชนิดสิ่งส่งตรวจ พบว่า Catheterized urine และ Sputum (เสมหะ) พบมากที่สุด จำนวนละ 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.18 ตามลำดับ รองลงมาคือ Pus จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.76 และ MSU จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.9

เมื่อพิจารณาตามหอผู้ป่วยใน (ward) จาก 17 ตัวอย่าง พบว่าแผนกอายุรกรรม (Med) มากที่สุด จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.18 รองลงมาคือ Stroke จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.65 ขณะที่แผนกอื่นๆ พบในสัดส่วนน้อยกว่า เช่น ER-med 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.76 ICU 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.76 ER-trauma 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.9 GP 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.9 และ Obs-ER 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.9 เป็นต้น

เมื่อพิจารณาตามชนิดยีนจาก 17 ตัวอย่าง พบว่ายีน bla_{OXA-48} มีจำนวน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 76.5 รองลงมาคือ ยีน bla_{NDM} 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.1 และบางรายพบ bla_{NDM} ร่วมกับ bla_{OXA-48} จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.5

Capsular serotype K20

พบจำนวน 2 ตัวอย่าง หมายเลข 3, 75 โดย Specimen ของทั้งสองตัวอย่างคือ Catheterized urine และพบในวอร์ดผู้ป่วย ER-trauma ชนิดยีนที่พบเป็นยีน bla_{OXA-48}

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *K. pneumoniae* Capsular serotype K2 จำนวน 17 คน

No.	Age	Gender	Ward	Specimen	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>
10	74	Female	Med	Cath urine	Negative	Positive
31	74	Female	Med	Sputum	Positive	Negative
69	64	Female	Med	Pus (ก้อนกบ)	Positive	Negative
72	77	Female	ER-med	Cath urine	Negative	Positive
74	75	Male	Stroke	Cath urine	Positive	Negative
75	59	Male	ER-trauma	Cath urine	Positive	Positive
78	73	Male	ICU	Sputum	Negative	Positive
81	92	Female	ER-med	Sputum	Positive	Positive
82	82	Male	Med	Sputum	Negative	Positive
96	89	Male	GP	Pus	Positive	Positive
101	81	Female	Med	Cath urine	Negative	Positive
102	82	Male	Med	MSU	Negative	Positive
114	88	Female	Stroke	Sputum	Positive	Positive
116	19	Male	ICU	Sputum	Negative	Positive
121	80	Female	Obs-ER	Cath urine	Negative	Positive
127	66	Female	Med	Cath urine	Positive	Negative
133	64	Male	Stroke	Sputum	Negative	Positive

4.5 ความสัมพันธ์ของ capsular serotype K2 ที่พบในเชื้อ *K. pneumoniae* ด้อยากลุ่ม carbapenem และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง capsular serotype K2 ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยจาก 112 ตัวอย่าง พบว่าจำแนกตามเพศพบในเพศหญิง (n=9) มากกว่าเพศชาย (n=8) จำแนกตามอายุพบในช่วงอายุมากกว่า 60 (n=15) มากที่สุด รองลงมาคือ ช่วงอายุ 18 ถึง 60 (n=2) จำแนกตามตำแหน่งการติดเชื้อพบมีใน Urinary tract (n=8) มากที่สุด รองลงมาคือ Lung (n=7) Skin and soft tissue (n=2) และไม่พบตำแหน่งการติดเชื้อที่ Blood (n=0) จำแนกตามหอผู้ป่วยในพบใน med (n=7) มาก

ที่สุด พบใน Stroke (n=3) รองลงมา พบใน ER-Med, ICU (n=2) และพบใน ER-trauma, Obs-ER, GP (n=1) ตามลำดับ จำแนกตามยีน *bla_{NDM}* (n=8) และจำแนกตามยีน *bla_{OXA-48}* (n=13) จากการพบ capsule serotype K2 ในเชื้อ *K. pneumoniae* ไม่มีความสัมพันธ์กับข้อมูลของเพศ อายุ ประเภทของหอผู้ป่วย ชนิดสิ่งส่งตรวจ ยีน *bla_{NDM}* และยีน *bla_{OXA-48}* (P -value > 0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4.3-4.8

ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศของผู้ป่วยและ capsular serotype K2

Characteristics	Total (n=112)	K2 Positive	K2 Negative	χ^2	p-value
Gender					
Male	61 (54.5%)	8 (7.1%)	53 (47.3%)	0.433	0.506
Female	51 (45.5%)	9 (8.1%)	42 (37.5%)		
Total	112 (100%)	17 (15.2%)	95 (84.8%)		

ตารางที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงค่าอายุของผู้ป่วยและ capsular serotype K2

Characteristics	Total (n=112)	K2 Positive	K2 Negative	χ^2	p-value
Age					
> 5	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.102	0.576
5 to < 18	4 (3.6%)	0 (0.0%)	4 (3.6%)		
18 to 60	18 (16.1%)	2 (1.8%)	16 (14.3%)		
> 60	90 (80.4%)	15 (13.4%)	75 (67.0%)		
Total	112 (100%)	17 (15.2%)	95 (84.8%)		

ตารางที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอผู้ป่วยใน (ward) และ capsular serotype K2

Characteristics	Total (n=112)	K2 Positive	K2 Negative	χ^2	p-value
Ward					
ER-Med	9 (8.0%)	2 (1.8%)	7 (6.3%)		
Med	39 (34.8%)	7 (6.3%)	32 (28.4%)		
ER-Trauma	9 (8.0%)	1 (0.9%)	8 (7.1%)		
ICU	15 (13.4%)	2 (1.8%)	13 (11.6%)		
Sur	8 (7.1%)	0 (0.0%)	8 (7.1%)		
Med-ICU	7 (6.3%)	0 (0.0%)	7 (6.3%)		
ประกันสังคม	1 (0.9%)	0 (0.0%)	1 (0.9%)		
Obs-ER	8 (7.1%)	1 (0.9%)	7 (6.3%)	22.317	0.072
Stroke	4 (3.6%)	3 (2.7%)	3 (2.7%)		
ICU-sur	2 (1.8%)	0 (0.0%)	2 (1.8%)		
GP	1 (0.9%)	1 (0.9%)	0 (0.0%)		
ER-obs	2 (1.8%)	0 (0.0%)	2 (1.8%)		
ICU-ด	1 (0.9%)	0 (0.0%)	1 (0.9%)		
Semi-ICU	4 (3.6%)	0 (0.0%)	4 (3.6%)		
Bone	2 (1.8%)	0 (0.0%)	2 (1.8%)		
Total	112 (100%)	17 (15.2%)	95 (84.8%)		

ตารางที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของการติดเชื้อและ capsular serotype K2

Characteristics	Total (n=112)	K2 Positive	K2 Negative	χ^2	p-value
Specimen					
Blood	10 (8.9%)	0 (0.0%)	10 (8.9%)	2.865	0.413
Lung	51 (45.5%)	7 (6.3%)	44 (39.3%)		
Urinary tract	43 (38.4%)	8 (7.1%)	35 (31.3%)		
Skin & soft tissue	8 (7.1%)	2 (1.8%)	6 (5.4%)		
Total	112 (100%)	17 (15.2%)	95 (84.8%)		

ตารางที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *bla_{NDM}* และ capsular serotype K2

Characteristics	Total (n=112)	K2 Positive	K2 Negative	χ^2	p-value
<i>bla_{NDM}</i>					
Positive	37 (33.0%)	8 (7.1%)	29 (25.9%)	1.782	0.182
Negative	75 (67.0%)	9 (8.1%)	66 (58.9%)		
Total	112 (100%)	17 (15.2%)	95 (84.8%)		

ตารางที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *bla_{OXA-48}* และ capsular serotype K2

Characteristics	Total (n=112)	K2 Positive	K2 Negative	χ^2	p-value
<i>bla_{OXA-48}</i>					
Positive	90 (80.4%)	13 (11.6%)	77 (68.7%)	0.192	0.661
Negative	22 (19.6%)	4 (3.6%)	18 (16.1%)		
Total	112 (100%)	17 (15.2%)	95 (84.8%)		

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของแคปซูล (capsular serotype) ในเชื้อ Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR รวมถึงเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างซีโรไทป์ของแคปซูลกับยีนคือยาคาร์บาพีเนมที่ตรวจพบในเชื้อและเพื่อให้เข้าใจการแพร่กระจายของสายพันธุ์ที่คือยาในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี กรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2566 จากตัวอย่างส่งตรวจทางคลินิกจำนวน 112 ตัวอย่างทางโรงพยาบาลได้วินิจฉัยเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธี MALDI-TOF MS กัญญาพร เพลงปานและคณะ (2023) ได้ทำการตรวจยืนยันเชื้อ *K. pneumoniae* พบเชื้อที่ไม่มียีน *WaaQ* จำนวน 2 สายพันธุ์ และเชื้อที่มียีน *WaaQ* 112 สายพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันได้จัดกลุ่มเชื้อ *K. pneumoniae* เป็น *K. pneumoniae* species complex

จากการศึกษาความชุกของชนิดแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือต่อยากลุ่ม Carbapenem จำนวน 112 ตัวอย่าง ได้แก่ Serotype K1, K2, K3, K5, K20, K54 และ K57 ซึ่งพบความชุกของ Serotype K2 จำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.18) และ K20 จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.79) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Taha และคณะ (2023) ที่พบ Capsular serotype K20 ร้อยละ 15.1 และ Capsular Serotype K2 ร้อยละ 3.1 เป็นชนิดที่พบมากในผู้ป่วยติดเชื้อมะเร็งในโรงพยาบาลก้นดา จากความชุกดังกล่าวสันนิษฐานได้ว่า Capsular Serotype ทั้งสองชนิดของเชื้อ CRKP มีแนวโน้มเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงและคือยาหลายขนาน (Multidrug Resistance) เช่น ยากลุ่ม Penicilins, Cephalosporins, Carbapenem และ Fluoroquinolone เป็นต้น และจากผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบเชื้อที่มียีน K1, K3, K5, K54 และ K57

ในด้านลักษณะทางคลินิกจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ CRKP ส่วนใหญ่เป็นเพศชาย (ร้อยละ 54.5) ช่วงค่าอายุมากกว่า 60 ปี เมื่อพิจารณาจากหอผู้ป่วยใน (Ward) พบว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาพบมากสุดในแผนกอายุรกรรม (Med) จำนวน 39 ราย (ร้อยละ 34.8) รองลงมาคือ ICU 15 ราย (ร้อยละ 13.4) ขณะที่แผนกอื่นๆ พบในสัดส่วนที่น้อยกว่า เช่น ER-med 9 ราย (ร้อยละ 8.0) ER-trauma 9 ราย (ร้อยละ 8.0) และศัลยกรรม (Surg) 8 ราย (ร้อยละ 7.1) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัย-

สำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีแนวโน้มพบการติดเชื้อ *K. pneumoniae* Capsular Serotype K2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงในกลุ่มผู้สูงอายุและผู้ป่วยอายุรกรรมใกล้เคียงกับรายงานของ Ssekatawa และคณะ (Ssekatawa et al., 2021) ที่พบว่า การติดเชื้อ *K. pneumoniae* มักเกิดในผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล (inpatients) โดยเฉพาะในหอผู้ป่วยอายุรกรรมและ ICU อาจเนื่องมาจากในผู้ป่วยสูงอายุจะมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำและโรคประจำตัวร่วมหลายชนิด ส่งผลให้เชื้อ *K. pneumoniae* สามารถก่อโรคได้ง่าย พบอัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนและอัตราการเสียชีวิตสูงกว่ากลุ่มอายุน้อย (Wang et al., 2025) และยังสอดคล้องกับรายงานของ Podchun และ Ullman (1998) ที่กล่าวว่า *K. pneumoniae* เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญ โดยเฉพาะในโรงพยาบาล โดยเชื้อนี้มักพบในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยง เช่น นอนโรงพยาบาลเป็นระยะยาว เป็นต้น

เมื่อพิจารณาตามชนิดของแคปซูลกับตำแหน่งของการติดเชื้อจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract) มีความชุกของการติดเชื้อ *K. pneumoniae* มากที่สุด โดยคิดเป็นร้อยละ 7.1 รองลงมาคือ ปอด (Lung) คิดเป็นร้อยละ 6.3 แม้จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีแนวโน้มพบการติดเชื้อ *K. pneumoniae* Capsular Serotype K2 มากที่สุดในตำแหน่งทางเดินปัสสาวะและปอดซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Bingjie และคณะ (2020) ที่ได้ทำการตรวจหาเชื้อ CRKP จำนวน 172 ตัวอย่าง จากประเทศจีน พบเชื้อ CRKP จาก Sputum (เสมหะ) จำนวน 68 ตัวอย่าง (ร้อยละ 39.5) รองลงมาคือ Catheterized urine จำนวน 37 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21.5) นอกจากนี้ยังพบเชื้อจาก Blood จำนวน 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.7)

จากงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยากับชนิดของแคปซูล โดย Capsular Serotype K2 พบยีน *bla_{OXA-48}* มีจำนวน 13 ราย (ร้อยละ 11.6) และ ยีน *bla_{NDM}* 8 ราย (ร้อยละ 7.1) และ Capsule serotype K20 พบยีน *bla_{OXA-48}* จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.7) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sotani และคณะ (2022) ที่รายงานว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาคาร์บาเพนิมมักพบยีน *bla_{OXA-48}* และ *bla_{NDM}* เป็นหลัก โดยเฉพาะในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้การพบยีนดื้อยาเหล่านี้จัดเป็นชนิดที่มีความรุนแรงสูงและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในปัจจุบัน แนวโน้มที่พบยังสนับสนุนสมมติฐานว่า Capsular Serotype บางชนิดของ *K. pneumoniae* มีแนวโน้มจะพบยีนดื้อยาบางชนิดมากกว่า ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Wu และคณะ (Wu et al., 2023) ที่ระบุว่าซีโรไทป์ K2 มีการพบยีน *bla_{OXA-48}* สูงที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อดื้อยาในประเทศจีน

ในขณะที่ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชนิดของแคปซูลและยีนดื้อยา อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (112 ตัวอย่าง) ยังมีจำกัด ทำให้การวิเคราะห์

ผลทางสถิติไม่เพียงพอในการตรวจจับความแตกต่างดังกล่าว ควรต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการศึกษาให้เพียงพอในอนาคต อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบ Capsular serotype K2 มากที่สุด (15.18%) รองลงมาคือ Capsular serotype K20 มี (1.79%) สนับสนุนสมมติฐานว่า K2 เป็นสายพันธุ์เด่นของ CRKP ที่มีแนวโน้มก่อโรครุนแรงและดื้อยาสูง พบยีนดื้อยา bla_{OXA-48} และ bla_{NDM} ในซีโรไทป์ K2 เป็นส่วนใหญ่ยืนยันสมมติฐานว่า Capsular serotype K2 มีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ Carbapenemase หลายชนิด บ่งชี้ถึงสัญญาณการระบาดของเชื้อสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงในโรงพยาบาลและตำแหน่งการติดเชื้อที่พบมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือ ทางเดินปัสสาวะและปอด แสดงว่า *K. pneumoniae* Capsular serotype K2 เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในระบบเหล่านี้ ผลการศึกษานี้ยังยืนยันว่าการใช้ Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการจำแนกยีนชนิดแคปซูลในเชื้อ *K. pneumoniae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากสามารถติดตามแหล่งที่มาของเชื้อ การระบาดในโรงพยาบาลหรือชุมชนรวมถึงการใช้ติดตามการแพร่ระบาดของสายพันธุ์ดื้อยา และเป็นเครื่องมือสำคัญในการควบคุมเชื้อดื้อยาในระดับโรงพยาบาลและสาธารณสุข

บรรณานุกรม

- นคณา บูรณะไอสถ และ คณวรรช พจนาคม. (2548). เกสซ์เคมีของยาปฏิชีวนะ กลุ่ม Carbapenems
Pharmaceutical Chemistry of Antibiotics : Carbapenems. ค้นจาก
http://www.prachanath.su.ac.th/tbps/tbps2005_1/tbps2005_1_155-165.pdf
- ภูริต ฐนะรังสภยกุล. (2566). ยาปฏิชีวนะกลุ่มคาร์บาเพนิม : สรุปประเด็นสำคัญด้าน โครงสร้างเคมี.
ค้นจาก <https://ccpe.pharmacycouncil.org/showfile.php?file=1429>
- Bassetti, M., Righi, E., Carnelutti, A., Graziano, E., & Russo, A. (2018). Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert review of anti-infective therapy*, 16(10), 749–761. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1522249>
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, 43(2), 123–144.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>
- Chen, L., & Kreiswirth, B. N. (2018). Convergence of carbapenem-resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(1), 2–3.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30517-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30517-0)
- Cortés, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gómez, C., Sauleda, J., & Albertí, S. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infection and immunity*, 70(5), 2583–2590. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2583-2590.2002>
- Elghar Soltani, Alka Hasani, Mohammad Ahangarzadeh Rezaee, Maryam Zaare Nahandi, Akbar Hasani, & Pourya Gholizadeh. (2022). An Alliance of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Precise Capsular Serotypes and Clinical Determinants: A Disquietude in Hospital Setting. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology Volume*, 2022, 6086979. <https://doi.org/10.1155/2022/6086979>
- Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., & Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13), 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>

- Jane F. Turton, Claire Perry, Suzanne Elgohari, & Catherine V. Hampton. (2010). PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 541– 547. <http://jmm.sgmjournals.org>
- Kang, Y., Tian, P., & Tan, T. (2015). *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 55(10), 1245–1252.
- Leangapichart, T., Lunha, K., Jiwakanon, J., Angkititrakul, S., Järhult, J. D., Magnusson, U., & Sunde, M. (2021). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* complex isolates from pigs and humans in farms in Thailand: population genomic structure, antibiotic resistance and virulence genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76(8) , 2012– 2016. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab118>
- Marwa S. Taha, Maha M. Hagrass, Marwa M. Shalaby, Yosra Abdelmonem Zamzam, Reham M. Elkolaly, Marwa A. Abdelwahab, & Sara Youssef Maxwell. (2023) . Genotypic Characterization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from an Egyptian University Hospital. *Pathogens* 2023, 12, 121. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010121>
- Pajand, O., Darabi, N., Arab, M., Ghorbani, R., Bameri, Z., Ebrahimi, A., & Hojabri, Z. (2020). The emergence of the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) strains among circulating clonal complex 147 (CC147) harbouring bla_{NDM}/OXA-48 carbapenemases in a tertiary care center of Iran. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 19(1) , 12. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00349-z>
- Pan, Y. J., Lin, T. L., Chen, C. T., Chen, Y. Y., Hsieh, P. F., Hsu, C. R., Wu, M. C., & Wang, J. T. (2015). Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Scientific reports*, 5, 15573. <https://doi.org/10.1038/srep15573>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>

- Soltani, E., Hasani, A., Rezaee, M. A., Nahandi, M. Z., Hasani, A., & Gholizadeh, P. (2022). An Alliance of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Precise Capsular Serotypes and Clinical Determinants: A Disquietude in Hospital Setting. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2022, 6086979. <https://doi.org/10.1155/2022/6086979>
- Taha, M. S., Hagra, M. M., Shalaby, M. M., Zamzam, Y. A., Elkolaly, R. M., Abdelwahab, M. A., & Maxwell, S. Y. (2023). Genotypic Characterization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from an Egyptian University Hospital. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010121>
- Turton, J. F., Perry, C., Elgohari, S., & Hampton, C. V. (2007). Investigation of outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in England. Health Protection Agency. https://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/123456789
- Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current opinion in microbiology*, 45, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>
- Wyres, K. L., Wick, R. R., Gorrie, C., Jenney, A., Follador, R., Thomson, N. R., & Holt, K. E. (2016). Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial genomics*, 2(12), e000102. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000102>
- Xu, L., Li, J., Wu, W., Wu, X., & Ren, J. (2024). *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide: Mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity. *Virulence*, 15(1), 2439509. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2439509>

ภาคผนวก ก
รายละเอียดการเตรียมสารเคมี

การเตรียมน้ำยาและสารเคมี

การเตรียมทำ 1.5 % Agarose gel

Agarose gel	1.5 g
1x TBE	100 mL

เมื่อเตรียมส่วนผสมเรียบร้อยแล้ว นำไปเข้า microwave ประมาณ 5 นาที ระวังอย่าให้เดือดจน
สิ้นภาชนะ เมื่อครบเวลา หรือสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้นำไปเทลงในถาดเซตเจล หลังจากนั้น
สามารถนำไปใช้ในการทำ Electrophoresis

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	กรรณิการ์ ปัญญาไว
วัน เดือน ปีเกิด	5 มิถุนายน 2546
สถานที่เกิด	แพร่
ที่อยู่ปัจจุบัน	60 ซ.รามคำแหง 2 ซอย 23 แยก 2 แขวงดอกไม้ เขตประเวศ กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ. 2562 จากโรงเรียนเทพพิทักษ์วิทยา จังหวัดแพร่ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ. 2565 จากโรงเรียนราชดำริ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ธนภรณ์ พรหมวงศ์
วัน เดือน ปีเกิด	5 พฤศจิกายน 2546
สถานที่เกิด	ชลบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	58/4 หมู่ 2 ต.เกาะจันทร์ อ.เกาะจันทร์ จ.ชลบุรี 20240
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ. 2562 โรงเรียนบ่อทองวงษ์จันทร์วิทยา จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ. 2565 โรงเรียนบ่อทองวงษ์จันทร์วิทยา จังหวัดชลบุรี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ยศวดี อุดมสิรินวกุล
วัน เดือน ปีเกิด	1 กุมภาพันธ์ 2546
สถานที่เกิด	ชัยภูมิ
ที่อยู่ปัจจุบัน	101/23 หมู่ที่ 7 ซ.เอกประจิม2/2 ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2562 จาก โรงเรียนสตรีชัยภูมิ จังหวัดชัยภูมิ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2565 จาก โรงเรียนสตรีชัยภูมิ จังหวัดชัยภูมิ
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	วรรษยา พลราศรี
วัน เดือน ปีเกิด	20 พฤศจิกายน 2545
สถานที่เกิด	พระนครศรีอยุธยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	Elysiem ต.หลักหก อ.เมืองปทุมธานี จ.ปทุมธานี 12000
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียนเสนา “เสนาประสิทธิ์” จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 โรงเรียนเสนา “เสนาประสิทธิ์” จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	อารดา ชันถม
วัน เดือน ปีเกิด	25 กันยายน 2546
สถานที่เกิด	สุรินทร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	17/214 ต.ประชาธิปไตย อ.รัษฎบุรี จ.ปทุมธานี 12130
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 โรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 โรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	อภิชา พลอยหิน
วัน เดือน ปีเกิด	13 พฤษภาคม 2567
สถานที่เกิด	จันทบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	52/175-4 ซอย เอกประจิม 2 ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ. 2562 จากโรงเรียนประดิษฐ์ศึกษา จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ. 2565 จากโรงเรียนท่าใหม่ "พลสวัสดิ์ราษฎร์นุกูล" จังหวัดจันทบุรี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต