



ความชุกของยีน *mgrB* ที่กลายพันธุ์ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสติน

PREVALENCE OF MUTATION IN THE *mgrB* GENE AMONG CLINICAL
ISOLATES OF COLISTIN - RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
IN THAILAND

กนกนาฏ	จันทิพลัง
กัลยา	บุรสิทธิ์
เกษราภรณ์	ทองเที่ยง
ชญชนก	รักษามบุญ
มธุรส	สุนราณี
โสภิตา	นันทา

ภาคนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยรังสิต

พ.ศ. 2567



**PREVALENCE OF MUTATION IN THE *mgrB* GENE AMONG CLINICAL
ISOLATES OF COLISTIN - RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
IN THAILAND**

KANOKNAT	JANTHOPHALANG
KANLAYA	BOORASIT
KETSARAPHON	THONGTHIANG
THANCHANOK	RAKSABUN
MATHUROT	LUNRASI
SOPIDA	NANTA

**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

ภาคนิพนธ์เรื่อง

ความชุกของยีน *mgrB* ที่กลายพันธุ์ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสติน

โดย

กนกนาฏ	จันโทพลัง
กัลยา	บุรสิทธิ์
เกษราภรณ์	ทองเที่ยง
รัชชนก	รักษานุกูล
มธุรส	สุนราณี
โสภิตา	นันทา

ได้รับพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์
เมื่อวันที่ 18 ตุลาคม 2568

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิภาพร เทาวงศ์)
กรรมการ

ศิริพร โควบุตร

(ดร. ศิริพร โควบุตร)
ประธานกรรมการภาคนิพนธ์

สุตาภรณ์ เก่งการ

(ดร. สุตาภรณ์ เก่งการ)
กรรมการ

วราภรณ์

(อาจารย์วราภรณ์ เล็กตระกูล)
กรรมการ

ณัฏฐ์ พุทธิพงษ์

(ดร.ณัฏฐ์ พุทธิพงษ์)
หัวหน้าสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

ก.ณ

(รองศาสตราจารย์เยาวลักษณ์ พิมานอก)
คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและการสนับสนุนจากหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ศิริพร โควบุตร ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะอันทรงคุณค่า ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ด้านวิชาการอย่างต่อเนื่อง งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์กรรมการที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะทางวิชาการอันมีประโยชน์และตรวจทานเนื้อหาด้วยความละเอียด จนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้อง และมีคุณค่าทางวิชาการ รวมไปถึงขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ รวมถึงให้การสนับสนุนในทุกขั้นตอนของการดำเนินงานวิจัย

นอกจากนี้ ขอขอบคุณ เพื่อนผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในทุกขั้นตอนของการดำเนินงาน รวมถึง ครอบครัวที่เป็นกำลังใจและแรงสนับสนุนสำคัญให้ผู้วิจัยสามารถผ่านพ้นอุปสรรคต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยในอนาคตและขอขอบความสำเร็จนี้แด่คณาจารย์ผู้ให้ความรู้และให้คำแนะนำอันทรงคุณค่า ตลอดจนบิดามารดาผู้เป็นกำลังใจและแรงสนับสนุนอันประเมินค่ามิได้ ทั้งนี้ หากมีข้อบกพร่องประการใด คณะผู้วิจัยขอน้อมรับไว้และขอภัยมา ณ โอกาสนี้

กนกนาฏ	จันทิพล
กัลยา	บุรสิทธิ์
เกษราภรณ์	ทองเที่ยง
ธัญชนก	รักษานุก
มธุรส	สุนรายี
โสภิตา	นันดา

บทคัดย่อ

6502496, 6502504, 6502829, 6502831

: สาขาวิชา: เทคนิคการแพทย์

6502832 และ 6502859

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

คำสำคัญ : *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, COLISTIN RESISTANCE, POLYMERASE CHAIN REACTION, MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION
 กนกนาฏ จันทโพธิ์, กัลยา บุรสิทธิ์, เกษราภรณ์ ทองเที่ยง, ธัญชนก รักษาบุญ, มธุรส ลุนราชิ, และ โสภิตา นันทา

ความชุกของยีน *mgrB* ที่กลายพันธุ์ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสติน
 (PREVALENCE OF MUTATION IN THE *mgrB* GENE AMONG CLINICAL ISOLATES
 OF COLISTIN - RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN THAILAND)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.ศิริพร โควบุตร, 45 หน้า

การดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญ เนื่องจากโคลิสตินเป็นยาทางเลือกสุดท้ายสำหรับการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาหลายชนิด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวกับระดับความดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี ปี พ.ศ.2566 การศึกษาใช้วิธี broth microdilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของยาโคลิสติน และตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 24 isolates มีค่า MIC ระหว่าง 16–64 µg/mL โดยตรวจพบการกลายพันธุ์แบบ deletion จำนวน 21 isolates (ร้อยละ 87.50) แบบ insertion 1 isolate (ร้อยละ 4.17) และไม่พบการกลายพันธุ์ 2 isolate (ร้อยละ 8.33) การวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Kruskal–Wallis test พบว่า ลักษณะการกลายพันธุ์ของ *mgrB* ไม่ส่งผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าระดับ MIC ($p=0.722$) สรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของ *mgrB* เป็นหนึ่งในกลไกสำคัญของการดื้อโคลิสติน แม้อาจมีปัจจัยอื่นร่วม เช่น ระบบ *PhoPQ/PmrAB* หรือ plasmid-mediated *mcr* โดยข้อเสนอแนะคือควรเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของ *mgrB* และยีนที่เกี่ยวข้องเพื่อสนับสนุนการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะและลดการแพร่เชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล

ABSTRACT

6502496, 6502504, 6502829, 6502831, : MAJOR: MEDICAL TECHNOLOGY
 6502832 AND 6502859 B.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)
KEY WORD : *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, COLISTIN RESISTANCE, POLYMERASE CHAIN REACTION, MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION
KANOKNAT JANTHOPHALANG, KANLAYA BOORASIT, KETSARAPHON THONGTHIANG, THANCHANOK RAKSABUN, MATHUROT LUNRASI AND SOPIDA NANTA
PREVALENCE OF MUTATION IN THE *mgrB* GENE AMONG CLINICAL ISOLATES OF COLISTIN - RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN THAILAND
THESIS ADVISOR : Dr. SIRIPORN KOWABOOT, 45 p.

Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* has become a major public health concern, as colistin is regarded as the last-resort antibiotic for treating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. This study aimed to determine the prevalence and types of *mgrB* gene mutations and to investigate their association with the level of colistin resistance among *K. pneumoniae* isolates obtained from patients at Nopparat Rajathanee Hospital in 2023. Colistin susceptibility was determined by the broth microdilution method, while the presence and mutation patterns of the *mgrB* gene were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequencing. A total of 24 *K. pneumoniae* isolates were tested, with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 16 to 64 µg/mL. Among these, 21 isolates (87.5%) exhibited *mgrB* deletions, one isolate (4.17%) showed an insertion mutation, and two isolates (8.33%) displayed no mutation. Statistical analysis using the Kruskal-Wallis test revealed no significant difference between *mgrB* mutation types and MIC levels ($p = 0.722$).

In conclusion, *mgrB* mutations play an important role in colistin resistance in *K. pneumoniae*, although additional mechanisms—such as alterations in the *PhoPQ/PmrAB* regulatory systems or plasmid-mediated *mcr* genes—may also contribute. Continuous molecular surveillance of *mgrB* and related resistance genes is recommended to support appropriate antibiotic use and to help prevent the spread of colistin-resistant pathogens in healthcare settings.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูปภาพ	ณ
คำอธิบายลักษณะและคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
2.2 Colistin	6
2.3 วิจัยที่เกี่ยวข้อง	10

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย	13
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	13
3.3 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ	14
3.4 วิธีการทดลอง	15
3.5 การทดสอบความไวต่อยา colistin ด้วยวิธี broth microdilution	18
3.6 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล	18

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 กลุ่มตัวอย่าง	19
4.2 ผลการทดสอบความไวต่อยา colistin ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ด้วยวิธี broth microdilution	20
4.3 การตรวจหาการกลายพันธุ์ยีน <i>mgrB</i> ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i>	21
4.4 ผล sequencing ของยีน <i>mgrB</i>	22
4.5 การเปรียบเทียบผล sequencing	25
4.6 การตรวจหา insertion ด้วย The ISfinder database	26
4.7 การตรวจหาลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน <i>mgrB</i> และค่า MIC ของแต่ละตัวอย่าง	26
4.8 เปรียบเทียบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน <i>mgrB</i> กับค่า (MIC 16-64 $\mu\text{g/mL}$)	28

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	29
บรรณานุกรม	33
ภาคผนวก ก	36
ประวัติผู้วิจัย	40

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 Primer sequence สำหรับการตรวจหา ยีน <i>WaaQ</i> และ <i>mgrB</i> และ PCR product (bp)	16
3.2 สภาวะการทำปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับการตรวจหา ยีน <i>WaaQ</i>	16
3.3 ส่วนประกอบของ mPCR สำหรับตรวจยืนยัน <i>mgrB</i>	17
3.4 สภาวะการทำปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับการตรวจหา ยีน <i>mgrB</i>	17
4.1 แสดงลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างและจำนวน (ร้อยละ)	19
4.2 แสดงร้อยละผลการทดสอบความไวต่อยา colistin ด้วยวิธี broth microdilution	20
4.3 แสดงผลการตรวจลักษณะการกลายพันธุ์ของ ยีน <i>mgrB</i> และค่า MIC ($\mu\text{g/mL}$) ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> แต่ละตัวอย่าง	27
4.4 เปรียบเทียบลักษณะการกลายพันธุ์ของ ยีน <i>mgrB</i> กับค่า MIC (16-64 $\mu\text{g/mL}$)	28

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
4.1 แสดงผลการดื้อยาต้านจุลชีพของ colistin resistant <i>K. pneumoniae</i>	20
4.2 ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>mgrB</i> ในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i>	21
4.3 Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.101	22
4.4 Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.137	23
4.5 Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.156	23
4.6 Colistin susceptible <i>K. pneumoniae</i> no.1	24
4.7 <i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603	24
4.8A Colistin susceptible <i>K. pneumoniae</i> no.1	25
เปรียบเทียบ กับ <i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603	
4.8B Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.101	25
เปรียบเทียบ กับ <i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603	
4.8C Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.137	25
เปรียบเทียบ กับ <i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603	
4.8D Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.156	25
เปรียบเทียบ กับ <i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603	
4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย The ISfinder database	26

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Blast = Basic Local Alignment Search Tool โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลของ NCBI

bp = Base Pair หน่วยวัดความยาวของสายดีเอ็นเอ หมายถึงคู่เบสของนิวคลีโอไทด์ (A–T, G–C)

DNA = Deoxyribonucleic Acid สารพันธุกรรมหลักของสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วยหน่วยนิวคลีโอไทด์เรียงต่อกัน

DL = deletion การกลายพันธุ์แบบการลบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนออกจากยีน ซึ่งอาจส่งผลให้โปรตีนที่ได้ขาดหรือลดหน้าที่

IS = Insertion Sequence ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นที่สามารถเคลื่อนย้ายและแทรกเข้าสู่ยีนอื่น ทำให้ยีนนั้นสูญเสียหน้าที่ได้

ISfinder = ฐานข้อมูลออนไลน์ที่ใช้สำหรับจำแนกลำดับ Insertion Sequence ชนิดต่าง ๆ

K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล

mPCR = Multiplex Polymerase Chain Reaction การทำ PCR หลายยีนพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์

MIC = Minimum Inhibitory Concentration ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ

NCBI = National Center for Biotechnology Information ฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบลำดับยีนและโปรตีน

PCR = Polymerase Chain Reaction เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA) เฉพาะส่วนให้มีจำนวนมากขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase

μg/mL = ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หน่วยความเข้มข้นของสารละลาย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหา

ปัจจุบันการติดเชื้อแบคทีเรียคือยาถือเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลกและในประเทศไทย โดยเฉพาะเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลหลายรูปแบบ เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และปอดอักเสบ เป็นต้น ปัญหาที่สำคัญคือเชื้อ *K. pneumoniae* ได้พัฒนากลไกการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การรักษาผู้ป่วยติดเชื้อซับซ้อนและมีข้อจำกัดมากขึ้น

ในระยะหลังเชื้อ *K. pneumoniae* ได้พัฒนาความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม carbapenem ซึ่งเป็นยาสำคัญสำหรับการรักษา ส่งผลให้ต้องใช้อยาโคลิสตินเป็นทางเลือกสุดท้าย อย่างไรก็ตาม การใช้ยาโคลิสตินในวงกว้างนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของเชื้อที่ดื้อยาโคลิสติน ซึ่งการดื้อยาดังกล่าวสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมความไวต่อยาโคลิสติน

โคลิสตินเป็นยาที่ออกฤทธิ์โดยการจับกับ lipopolysaccharide (LPS) บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียโครงสร้างและเกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ จนนำไปสู่การตายของแบคทีเรีย แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียคือยา แต่การใช้โคลิสตินในการรักษาก็มีผลข้างเคียงสูง โดยเฉพาะการเป็นพิษต่อไต (nephrotoxicity) และเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity)

นอกจากนี้การใช้ยาโคลิสตินอย่างแพร่หลายทั้งในโรงพยาบาลและอุตสาหกรรมปศุสัตว์นำไปสู่การคัดเลือกเชื้อที่มีการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เพิ่มขึ้น โดยสถานการณ์ของการพบเชื้อคือยาโคลิสตินในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae* จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อประเมินความรุนแรงของการแพร่ระบาดและพัฒนามาตรการป้องกันและการควบคุม

จากปัญหาที่กล่าวมานี้ จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาความชุกของยีน *mgrB* ที่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสติน โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งจะช่วยเพิ่มความเข้าใจในกลไกการดื้อยาและพัฒนาวิธีการตรวจเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อหาความชุกของการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสตินจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี

1.2.2 เพื่อจำแนกชนิดของการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae* เช่น การแทรกของ insertion sequence หรือการกลายพันธุ์แบบ point mutation

1.2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae* กับระดับการดื้อยาโคลิสติน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

การศึกษานี้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินที่ได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี เพื่อทำการศึกษายีน *mgrB* ที่กลายพันธุ์ในเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธีการ polymerase chain reaction

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 ถ้าพบการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ใน *K. pneumoniae* จะส่งผลให้เกิดการดื้อยาโคลิสติน

1.4.2 ถ้า *K. pneumoniae* คือโคลิสติน ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* จะพบการกลายพันธุ์แบบ insertion หรือ point mutation

1.4.3 ถ้าพบการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ใน *K. pneumoniae* จะมีผลต่อระดับการดื้อโคลิสติน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ข้อมูลความชุกของยีน *mgrB* ที่มีการกลายพันธุ์ ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสตินจากผู้ป่วยโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี

1.5.2 ทราบความสัมพันธ์ของยีน *mgrB* ที่มีการกลายพันธุ์ ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสติน

1.5.3 ข้อมูลความรู้ที่เกี่ยวข้องนี้ สามารถใช้ในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี

1.5.4 เพื่อให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาโคลิสติน ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งอาจช่วยในการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัย หาแนวทางการรักษาและแนวทางการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพในอนาคต

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ซึ่งอยู่ในวงศ์ของ *Enterobacteriaceae* จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้สูงอายุ และผู้ป่วยในโรงพยาบาล เชื้อแบคทีเรีย *K. pneumoniae* มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งสั้น (short rod-shaped) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) และไม่เคลื่อนที่ (non-motile) เชื้อสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เช่น blood agar และ MacConkey agar ซึ่งเมื่อเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถพบลักษณะโคโลนีขนาดใหญ่ มันวาวหรือเยิ้ม (mucoid) ได้ ซึ่งเกิดจากที่เชื้อมีการสร้างแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide capsule) โดยกลไกการก่อโรคของเชื้อ *K. pneumoniae* เกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อโรค (virulence factors) หลายชนิด ซึ่งจะช่วยให้เชื้อสามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและเพิ่มความสามารถในการติดเชื้อ ซึ่งได้แก่ แคปซูล (capsule) ที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ล้อมรอบผนังเซลล์ของเชื้อ ทำหน้าที่สำคัญในการป้องกันการถูกทำลายโดยเม็ดเลือดขาวและระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) รวมถึงช่วยป้องกันการถูกจับกินโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis), ลิปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) และก่อให้เกิดการอักเสบได้ ฟิมบริอา (fimbriae) หรือ พิลัส (pili) ซึ่งจะช่วยให้เชื้อสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อของระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญของการติดเชื้อ เอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส (beta-lactamase) ซึ่งเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ beta-lactamase เพื่อมาทำลายยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบต้าแลคแทม (beta-lactam antibiotics) ส่งผลให้เชื้อมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ยีนดื้อยา (antibiotic resistance genes) เชื้อ *K. pneumoniae* สามารถมีการกลายพันธุ์ของยีนได้หลายยีน เช่น *mgrB*, *bla-KPC*, *bla-NDM* ซึ่ง

ช่วยเพิ่มความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่ม โดยเฉพาะโคลิสติน (colistin) ที่เป็นยาทางเลือกสุดท้ายในการรักษาการติดเชื้อ *K. pneumoniae* และตัวเชื้อสามารถก่อให้เกิดโรคในหลายระบบของร่างกายได้ โดยมีลักษณะพยาธิสภาพที่สำคัญ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคปอดอักเสบ (pneumonia) โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาล (hospital-acquired pneumonia; HAP) และเชื้ออาจก่อให้เกิดการอักเสบรุนแรงในถุงลม (alveoli) ทำให้มีการสะสมของหนอง เม็ดเลือดขาวและสารคัดหลั่งได้ ลักษณะเด่นของการติดเชื้อแบคทีเรีย *K. pneumoniae* ที่ปอด คือ การมีเสมหะเหนียวข้น สีแดงคล้ายเยลลี่ (currant jelly sputum) การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract Infection; UTI) ก่อให้เกิดกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) และกรวยไตอักเสบ (pyelonephritis) ได้ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ใช้สายสวนปัสสาวะ (catheter-associated UTI), การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) คือการที่มีเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งเป็นภาวะที่มีความรุนแรงสูงและอาจมีการแพร่กระจายของการติดเชื้อที่อวัยวะอื่นๆ เพิ่มเติมได้นอกจากนี้เชื้อยังสามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบทั่วร่างกาย (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) และนำไปสู่ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (septic shock) ได้ การติดเชื้อในเนื้อเยื่อและอวัยวะอื่น ๆ โดยเชื้อ *K. pneumoniae* ยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในเนื้อเยื่อลึก เช่น ฝีในตับ (liver abscess) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) และการติดเชื้อในแผลเรื้อรัง (chronic wound infections) โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวาน

2.1.1 การรักษา

การรักษาการติดเชื้อ *K. pneumoniae* จำเป็นต้องเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial agents) ที่มีความเหมาะสมตามความไวต่อยาของเชื้อ (antibiotic susceptibility) โดยคำนึงถึงระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ, ชนิดของเชื้อที่ก่อโรค และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อในผู้ป่วยแต่ละราย เนื่องจาก *K. pneumoniae* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ที่สามารถพัฒนาและถ่ายทอดยีนดื้อยาได้หลากหลายรูปแบบ ทั้งยังเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในโรงพยาบาลได้มากและยังสามารถก่อโรคติดเชื้อได้ในหลายระบบ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะและกระแสเลือด โดยในการรักษาการติดเชื้อ *K. pneumoniae* สามารถแบ่งการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพตามระดับของการดื้อยาได้ คือ กรณีเชื้อที่ไม่ดื้อยา (non-resistant strains) ในกรณีที่เชื้อ *K. pneumoniae* ไม่มีการสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เชื่อดื้อยาหรือยังคงไวต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ยาต้านจุลชีพที่ใช้เป็นยารักษาอันดับแรก (first-line drugs) ได้แก่ ceftriaxone และ cefotaxime ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3, piperacillin-tazobactam ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม penicillin

ร่วมกับ beta-lactamase inhibitor ยากลุ่ม fluoroquinolones เช่น levofloxacin และ ciprofloxacin ซึ่งอาจใช้ในกรณีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะหรือกรณีที่เชื้อแสดงความไวต่อยาเหล่านี้ ในกรณีที่เชื้อ *K. pneumoniae* สามารถสร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) ซึ่งย่อยสลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้ ยาที่แนะนำให้ใช้เป็นยารักษาหลัก ได้แก่ carbapenems เช่น imipenem, meropenem และ ertapenem ซึ่งมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งเชื้อคือยา ESBL และในกรณีที่เชื้อคือยา carbapenem (carbapenem-resistant *K. pneumoniae*: CRKP) กรณีที่เชื้อ *K. pneumoniae* คือต่อยากลุ่ม carbapenem ซึ่งถือเป็นเชื้อคือยาในระดับสูง (extensively drug-resistant: XDR) ต้องใช้ยาทางเลือกสุดท้าย (last resort drugs) ดังนี้ colistin (โกลิสติน) ซึ่งเป็นยากลุ่ม polymyxins ที่มีประสิทธิภาพสูง tigecycline ยากลุ่ม glycylcycline ที่สามารถยับยั้งเชื้อคือยา ceftazidime-avibactam ซึ่งเป็นยาร่วมระหว่าง cephalosporin และ beta-lactamase inhibitor ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ carbapenemase เช่น KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), fosfomycin สามารถใช้ในบางกรณี โดยเฉพาะการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ

2.2 Colistin

Colistin หรือที่อาจรู้จักกันในชื่อ polymyxin E เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่คือยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการติดเชื้อที่คือยาต่อ carbapenems และ cephalosporins เป็นยาทางเลือกสุดท้ายสำหรับเชื้อคือยาแกรมลบ โครงสร้างของ colistin เป็นลักษณะของ polymyxins ring ซึ่งเป็นกลุ่มของยาปฏิชีวนะที่มีลักษณะเฉพาะที่ช่วยให้มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย โดย colistin เป็น polypeptide antibiotic ที่มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายตัวและกลุ่มไขมัน ซึ่งทำให้สามารถยึดติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ โดยโครงสร้างของโกลิสตินประกอบด้วย polypeptide chain ที่มี 7-8 กรดอะมิโน ที่รวมทั้ง L-alpha-amino acid และ D-amino acid และมีส่วนHydrophobic tail (ส่วนไขมัน) ทำหน้าที่ในการยึดติดกับ phospholipids ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะ lipopolysaccharides (LPS) ของแบคทีเรียแกรมลบ และส่วน hydrophilic head (ส่วนที่มีความชอบน้ำ) ช่วยให้ colistin สามารถละลายและเข้าไปในกระบวนการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียได้

2.2.1 กลไกการออกฤทธิ์

การจับกับ lipopolysaccharide และรบกวน โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane disruption) โดย colistin ที่มีประจุบวก (cationic) ซึ่งสามารถจับกับ lipopolysaccharide ที่มีประจุลบ (anionic) บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ ซึ่งการจับกันนี้จะรบกวนพันธะระหว่าง LPS กับ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ทำให้เกิดการสูญเสียเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์

การแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดรูรั่ว (membrane permeabilization & leakage) โดยส่วน fatty acid tail ของ colistin สามารถแทรกตัวเข้าไปใน phospholipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียได้ ทำให้เกิดรูรั่ว (pores) บนเยื่อหุ้มเซลล์ คล้ายกลไกของ detergent (self-promoted uptake mechanism) ส่งผลให้ไอออนและสารสำคัญภายในเซลล์รั่วออกมา เช่น K^+ , Mg^{2+} , ATP, เอนไซม์ภายในเซลล์ เป็นต้น

การรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในและทำให้เซลล์ตาย (inner membrane disruption & cell death) โดย colistin สามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner membrane) ของเชื้อแบคทีเรียมีการเสื่อมสภาพ ส่งผลให้เกิดการสูญเสีย homeostasis ของเซลล์ เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและทำให้เซลล์แตกสลาย (cell lysis)

2.2.2 กลไกการดื้อยา Colistin

Colistin เป็นยาปฏิชีวนะลำดับท้ายๆ สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่พบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกขนาน โดยการพบการดื้อยาโคลิสตินเกิดจากที่มีการใช้โคลิสตินบ่อยครั้งในสัตว์แพทย์และร่วมกับการที่มียีนหรือโปรตีนอื่นๆ ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

โคลิสตินเป็นยาที่จะทำลายโครงสร้างของ phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์และเพิ่มการซึมผ่านของเซลล์ด้วย คล้ายกับ detergent ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการตาย โดยการดื้อยาโคลิสตินส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการลดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าระหว่างตัวยาโคลิสตินและเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ โดยเกิดจากการที่มีการเพิ่มขึ้นของ phosphoethanolamine ที่มีประจุบวกหรือการเพิ่มขึ้นของ 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) ให้กับกลุ่มฟอสเฟตบนส่วนประกอบ lipid-A ของ lipopolysaccharides และลดประจุลบสุทธิบนพื้นผิวเซลล์ นำไปสู่การเพิ่มกลุ่มประจุบวกให้กับส่วน lipid-A ซึ่งจะ ทำให้การจับกันของโพลีเมกซอินอ่อนลง โดยองค์ประกอบทางพันธุกรรมแบบ transposable (ส่วนใหญ่เป็นพลาสมิดที่มียีน *mcr*) เป็นสาเหตุหลักของการดื้อยาโคลิสตินของเชื้อ

แบคทีเรีย ในปัจจุบันมีการระบุยีนดื้อยาโคลิสตินที่เคลื่อนที่ได้ (*mcr*) จำนวน 10 ยีน ได้แก่ *mcr* 1-10 นอกจาก *mcr* (ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยาโคลิสตินในพลาสมิด) แล้ว ยังมียีนโครโมโซมอื่นๆ อีก เช่นยีน *mgrB*, *PhoP-PhoQ*, *PmrA-PmrB*, การกลายพันธุ์ของไบโอฟิล์มและปั๊มขับออก ล้วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยาโคลิสตินเนื่องมาจากการทำงานที่ลดลงหรือสูญเสียการทำงาน โดยกลไกการดื้อยาโคลิสตินยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดสำหรับแบคทีเรียบางชนิด แต่มีการเสนอกลไกระดับโมเลกุลหลายอย่างเพื่ออธิบายกลไกของการดื้อยาโคลิสติน

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae*

1. ***mgrB*** *mgrB* (multiple gene regulator B) เป็นชื่อของยีนที่ทำหน้าที่เป็น negative regulator ในระบบของ *PhoP/PhoQ* ซึ่งควบคุมการตอบสนองของแบคทีเรียต่อความเครียดจากสภาพแวดล้อม เช่น แรงดันออสโมติกและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ lipopolysaccharide บนผนังเซลล์ โดยยีน *mgrB* จะมีบทบาทสำคัญใน *K. pneumoniae* และแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ โดยทำหน้าที่ ควบคุมการทำงานของ *PhoP/PhoQ* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุม ความไวต่อยาปฏิชีวนะ polymyxins เช่น colistin โดยการกลายพันธุ์หรือการหยุดการทำงานของ *mgrB* ซึ่งสามารถนำไปสู่การดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* ส่วนใหญ่เกิดจากการ insertion sequence (IS) ที่รบกวนยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาคาร์บาเพนิม (CRKp) พบว่ามีลำดับ IS ที่พบมากที่สุดคือกลุ่ม IS5 โดยเฉพาะ IS903 และ IS903B นอกจากนี้ ยังมีการค้นพบลำดับ ISSen4 ซึ่งเป็น IS จากกลุ่ม IS3 ที่แทรกใน *mgrB* ของ *K. pneumoniae* เป็นครั้งแรก กลไกการแทรกนี้ไม่ส่งผลต่อความสามารถในการดำรงชีวิตของเชื้อ แต่สามารถคงสภาพการดื้อยาไว้ได้แม้ในกรณีที่ไม่มีแรงกดดันจากยา ทำให้กลไกนี้มีบทบาทสำคัญในบริบทของการดื้อยาในโรงพยาบาล และจำเป็นต้องเฝ้าระวังอย่างยิ่ง
2. ***PmrA-PmrB*** ระบบ *PmrA-PmrB* เป็น Two-Component Regulatory System (TCS) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลง lipopolysaccharide บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อป้องกันการทำลายจากโคลิสติน โดยมี *PmrB* เป็น sensor kinase ที่ตรวจจับสภาวะแวดล้อม เช่น pH ต่ำ, ความเข้มข้นของ Fe^{3+} สูง, หรือการสัมผัสกับโคลิสตินและ *PmrA* เป็น response regulator ที่ถูกฟอสโฟรีเลตโดย *PmrB* และควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา โดยเชื้อ *K. pneumoniae* สามารถดื้อยาโคลิสตินผ่าน *PmrA-PmrB* โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Lipid A บน lipopolysaccharides เกิดจากการที่ *PmrA* ที่ถูกกระตุ้นโดย *PmrB* ไปเพิ่มการ

แสดงออกของยีน *pmrC*, *arnBCADTEF* และ *pmrE* ที่ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มของ phosphoethanolamine (PEtN) ในตำแหน่งของส่วน Lipid A และเพิ่ม 4-aminoarabinose (L-Ara4N) ที่ LPS ทำให้โครงสร้าง lipopolysaccharide มีประจุลบลดลง ซึ่งเป็นจุดที่โคลิสตินจับกับเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้โคลิสตินจับได้ยากขึ้นและการกลายพันธุ์ใน *PmrA* หรือ *PmrB* หากมีการกลายพันธุ์ของ *PmrB* อาจทำให้ *PmrA* ถูกกระตุ้นแบบถาวร (constitutive activation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง LPS ตลอดเวลาและทำให้ดื้อโคลิสตินแม้ไม่มีสิ่งกระตุ้นและการกลายพันธุ์ใน *PmrA* อาจส่งผลให้มีการกระตุ้นยีนดื้อยาเพิ่มขึ้นและการที่ *PmrA*-*PmrB* ทำงานร่วมกับระบบ *PhoP*-*PhoQ* โดยมี *PmrD* เป็นโปรตีนที่เชื่อมโยงการทำงานของ *PhoP*-*PhoQ* และ *Pmr-A*, *Pmr-B* ซึ่ง *PhoP*-*PhoQ* สามารถกระตุ้นการทำงานของ *Pmr-A*, *Pmr-B* ผ่าน *PmrD* ได้ ทำให้เกิดการดื้อโคลิสตินแบบถาวร โดยเชื้อ *K. pneumoniae* ที่พบว่าการกลายพันธุ์ของ *PmrA* หรือ *PmrB* สามารถพบได้ในโรงพยาบาลที่มีการใช้โคลิสตินเป็นหลัก ซึ่งการกลายพันธุ์ของ *PmrB* ทำให้เกิดการควบคุม *PmrA* ที่ผิดปกติ ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยาโคลิสตินได้ และเชื้อที่ดื้อโคลิสตินจากกลไกนี้มักจะมีระดับการดื้อยาสูงและอาจพบร่วมกับ *mcr-1* ซึ่งเป็นพลาสมิดที่แพร่กระจายได้

3. ***PhoP*-*PhoQ*** เป็นระบบส่งสัญญาณแบบ Two-component regulatory system (TCS) ที่ควบคุมการตอบสนองของแบคทีเรียต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเป็นกรดต่ำ (low Mg^{2+} , Ca^{2+}) และการสัมผัสกับสารต้านจุลชีพ รวมถึงโคลิสติน ระบบนี้ประกอบด้วย *PhoQ* ทำหน้าที่เป็น sensor kinase ที่ตรวจจับสัญญาณภายนอก เช่น การปรากฏของโคลิสตินหรือการมีความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต่ำ แล้วไปกระตุ้นให้มีการเกิดฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) และ *PhoP* ทำหน้าที่เป็น response regulator ที่ถูกฟอสโฟรีเลชันโดย *PhoQ* และไปควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา โดยเชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน *PhoP*-*PhoQ* สามารถดื้อยาโคลิสตินได้โดยดัดแปลงโครงสร้างของ Lipid A บน lipopolysaccharides โดย *PhoP*-*PhoQ* กระตุ้นการแสดงออกของยีน *pmrHFIJKLM* (*pmr* operon) และ *arnBCADTEF* ได้ผลลัพธ์คือ การเพิ่มหมู่ phosphoethanolamine (PEtN) และ 4-aminoarabinose (L-Ara4N) เข้าไปที่ Lipid A บน lipopolysaccharides ทำให้มีการลดประจุลบลง และโคลิสตินจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยากขึ้น ต่อมาได้มีการกระตุ้นยีน *pmrD* และส่งผลต่อ *Pmr-A*, *Pmr-B* โดยระบบ *PhoP*-*PhoQ* ยังทำงานร่วมกับ *Pmr-A*, *Pmr-B* TCS ผ่านการกระตุ้น *pmrD* ที่ทำหน้าที่ยืดยาวการทำงานของ *PmrA*, ส่งผลให้เกิดการดัดแปลง lipopolysaccharides ต่อเนื่อง และมี

การเพิ่มการแสดงออกของ *PhoP* ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และเกิดการทำงานของ *PhoQ* อย่างต่อเนื่อง (constitutive activation) ส่งผลให้เกิดการดัดแปลง LPS อย่างถาวรและคือโคลิสติน เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มีการกลายพันธุ์ใน *PhoP-PhoQ* สามารถพัฒนาเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาโคลิสตินในระดับสูง โดยกลไกนี้ทำงานร่วมกับการดื้อยาแบบ plasmid-mediated (เช่น *mcr-1*) ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาหลายกลไก (multimodal resistance) และยังมีรายงานว่า *K. pneumoniae* ที่คือโคลิสตินจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลหลายแห่งทั่วโลก มีการกลายพันธุ์ของ *PhoQ* และการควบคุมของ *PhoP-PhoQ* ผิดปกติ

2.3 วิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยของ Cannatelli et al. (2013). ศึกษากลไกที่ทำให้ *K. pneumoniae* ที่ผลิตเอนไซม์ KPC (KPC-KP) คือดื้อยาโคลิสติน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะทางเลือกสุดท้ายที่ยังคงใช้ได้กับเชื้อนี้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการดื้อยาโคลิสตินใน KPC-KP เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ นักวิจัยได้เปรียบเทียบ KPC-KP ที่แยกได้จากผู้ป่วยรายเดียวกันก่อนและหลังได้รับโคลิสติน พบว่าเชื้อที่ดื้อต่อโคลิสตินมีการกลายพันธุ์ที่ ยีน *mgrB* ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของระบบส่งสัญญาณ *PhoQ/PhoP* โดยการแทรกยีนอื่นเข้ามาหรือการตัดยีนออกไป การเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้เชื้อสามารถดื้อต่อโคลิสตินได้ การทดลองเพิ่มเติมพบว่า เมื่อเติม *mgrB* ชนิดปกติกลับเข้าไปในเชื้อที่ดื้อยา ก็ทำให้เชื้อกลับมาไวต่อโคลิสตินอีกครั้ง ในทางกลับกัน เมื่อมีการตัดยีน *mgrB* ออกจากเชื้อที่เคยไวต่อโคลิสติน เชื้อนั้นก็กลายเป็นดื้อยา ซึ่งเป็นหลักฐานยืนยันว่า *mgrB* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมความไวต่อโคลิสติน นอกจากนี้ ในเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ที่ *mgrB* พบว่ามีการเพิ่มระดับการแสดงออกของ *phoP*, *phoQ* และ *pmrK* ซึ่งเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ ทำให้โคลิสตินไม่สามารถจับกับเซลล์แบคทีเรียได้ ส่งผลให้เกิดภาวะดื้อยา โดยสรุป งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การกลายพันธุ์ที่ *mgrB* ทำให้ระบบ *PhoQ/PhoP* ถูกกระตุ้นมากขึ้น นำไปสู่การดื้อต่อโคลิสตินใน *K. pneumoniae*

จากงานวิจัยของ Nicola Petrosillo. (2019). ได้ทำการศึกษาทางเลือกในการรักษา *K. pneumoniae* ที่คือดื้อโคลิสติน ในปัจจุบันและอนาคต โดยพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่พบว่ามี การดื้อยาหลายขนาน (MDR) อาจเป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพของมนุษย์ที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการติดเชื้อที่รักษาได้ยากและมีอัตราการเสียชีวิตสูง เนื่องจากโคลิสตินเป็นหนึ่งในไม่กี่ทางเลือกของยาปฏิชีวนะที่ถูกใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือดื้อคาร์บาเพนัม โดยการดื้อต่อโคลิสตินจึงเป็นความท้าทายเนื่องจากยาด้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพที่มีอยู่จำกัด ได้แก่ Tigecycline,

Gentamicin, Fosfomycin, Ceftazidime/Avibactam และนอกจากนี้ การเลือกใช้ยาต้านจุลชีพยังขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์ บริเวณที่ติดเชื้อ และโปรไฟล์ความไวของสายพันธุ์ที่แยกออกมา และบางครั้งอาจเกิดผลข้างเคียงได้ บทความนี้บรรยายถึงลักษณะของการติดเชื้อโคลิสตินใน *K. pneumoniae* และลักษณะเฉพาะของยาต้านจุลชีพที่มีอยู่ในปัจจุบันสำหรับ *K. pneumoniae* ที่ติดเชื้อโคลิสติน รวมถึงลักษณะเฉพาะของทางเลือกยาต้านจุลชีพใหม่ๆ เช่น พลาโซไมซินและเซฟิเดอโรคอลที่กำลังจะวางจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ในเร็ว ๆ นี้ และได้มีการพิจารณาการใช้กลยุทธ์การรักษาที่สร้างสรรค์ในอนาคตที่กำลังพัฒนา ซึ่งรวมถึงการบำบัดด้วยแบคทีเรียฟาจและแอนติบอดีโมโนโคลนัล

จากวิจัยของ Nik Yusnoraini Yusof. (2022). ได้ทำการศึกษาการเกิดการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรมในยีนบนโครโมโซมรวมถึงยีนคือโคลิสตินที่ถ่ายทอดได้บนพลาสมิด ซึ่งอาจมีส่วนช่วยให้ภาวะติดเชื้อโคลิสตินแพร่กระจายไปในเชื้อ *K. pneumoniae* หลายสายพันธุ์และในแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการประเมินความชุกของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่พบการติดเชื้อโคลิสตินจากการกลายพันธุ์ทั่วโลก โดยใช้วิธีการ systematic review และ meta-analysis และมีการสืบค้นอย่างเป็นระบบในฐานข้อมูล PubMed, ScienceDirect, Scopus และ Google Scholar จากนั้นวิเคราะห์ความชุกโดยรวมของการติดเชื้อโคลิสตินแบบกลายพันธุ์ใน *K. pneumoniae* ด้วยโปรแกรม Comprehensive Meta-Analysis (CMA) โดยรวบรวมบทความได้ทั้งหมด 50 เรื่อง ซึ่งความชุกโดยรวมของการติดเชื้อโคลิสตินแบบกลายพันธุ์ในเชื้อ *K. pneumoniae* อยู่ที่ 75.4% (95% CI = 67.2-82.1) โดยมีค่าความไม่เป็นเนื้อเดียวกันสูง (high heterogeneity) ($I^2 = 81.742\%$, $p < 0.001$) การวิเคราะห์แบบจำแนกย่อย (subgroup) พบว่าในประเทศซาอุดีอาระเบียมีความชุกสูงสุดที่ 97.9% (95% CI = 74.1-99.9%) ขณะที่อียิปต์ต่ำสุดที่ 4.5% (95% CI = 0.6-26.1%) ยีนที่พบการกลายพันธุ์มากที่สุด ได้แก่ *mgrB* (88%) *pmrB* (54%) และ *phoQ* (44%) ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงความชุกสูงของการกลายพันธุ์ในยีนคือโคลิสตินของ *K. pneumoniae* จึงแนะนำให้มีการเฝ้าระวังอย่างสม่ำเสมอเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของภาวะติดเชื้อโคลิสติน

จากงานวิจัยของ Polly Soo-Xi Yap. (2022). ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของ *mgrB* และการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของเซลล์ที่ก่อให้เกิดภาวะติดเชื้อโคลิสตินใน *K. pneumoniae* พบว่าปัจจุบันมีการหันกลับมาใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มโพลิมิกซิน เช่น โคลิสติน เพิ่มขึ้นในทางคลินิก เนื่องจากทางเลือกในการรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มที่คือคาร์บาเพนิม (CRE) มีจำกัด แต่อย่างไรก็ตาม ยาตัวสุดท้ายที่กำลังเผชิญปัญหาใหม่ โดยพบการติดเชื้อโคลิสตินที่เกิดได้ทั้งจากยีนบนโครโมโซมและบนพลาสมิดใน *K. pneumoniae* การติดเชื้อโคลิสตินมักเกิดจากการ

กลายพันธุ์ของยีนโครโมโซม *mgrB* โปรตีน โดย *mgrB* ฝังอยู่ในเยื่อชั้นในและทำหน้าที่ควบคุมการฟอสโฟริเลตของ *PhoP* ในเชิงลบ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ลิพิดของเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรีย ซึ่งในวิจัยฉบับนี้มุ่งเน้นบทบาทของการกลายพันธุ์ *mgrB* ที่ส่งผลต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ใน *K. pneumoniae* ซึ่งนำไปสู่การดื้อโคลิสติน ในท่ามกลางความกังวลเกี่ยวกับการดื้อโคลิสตินที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก การทำความเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากการหยุดการทำงานของ *mgrB* นี้ อาจช่วยเปิดช่องทางสู่การค้นพบสารต้านจุลชีพใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งช่วยหาวิธีบรรเทาปัญหาการดื้อยาที่กำลังทวีความรุนแรงนี้ได้ในอนาคต

จากการศึกษาของ Amin Kochbayan. (2022). ได้ทำการศึกษาอุบัติการณ์ทั่วโลกของการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* ในกลุ่มตัวอย่างของ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อโคลิสติน โดยการทำเป็นระบบรวมกับการวิเคราะห์ (systematic review and meta-analysis) เพื่อทำการประเมินความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อโคลิสตินในระดับโลก โดยทำการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล Scopus, Medline (ผ่าน PubMed) และ Web of Science จนถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2566 โดยจากผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อโคลิสตินร้อยละ 65 มีการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* โดยชนิดของการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุด คือ การแทรกยีน (Insertional inactivation) คิดเป็นร้อยละ 69 ของการกลายพันธุ์ทั้งหมด นอกจากนี้ ยังพบว่าแนวโน้มการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* มีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากร้อยละ 46 ในปี พ.ศ. 2557 (ค.ศ. 2014) เป็นร้อยละ 61 ในปี พ.ศ. 2565 (ค.ศ. 2022) และเมื่อพิจารณาตามทวีป พบว่า ทวีปยุโรป มีอัตราการกลายพันธุ์สูงที่สุด (73%) ขณะที่ ทวีปแอฟริกา มีอัตราต่ำที่สุดที่ (54%) โดยการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* เป็นหนึ่งในกลไกที่พบบ่อยที่สุดของการดื้อโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* และยังมีการเน้นย้ำถึงความจำเป็นในการเฝ้าระวังกลไกการดื้อยาอย่างต่อเนื่อง เพื่อช่วยสนับสนุนการเลือกยาที่เหมาะสมและวางแผนการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในระดับโรงพยาบาลและระดับสาธารณสุข

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยประยุกต์ในสาขาจุลชีววิทยาโดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเชิงสำรวจ และทดลอง เพื่อศึกษาความชุกและความสัมพันธ์ของยีน *mgrB* ที่กลายพันธุ์ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสติน จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี ในปี พ.ศ. 2566

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

- | | |
|--|--|
| 1.) Microcentrifuge | DLAB Scientific Co., Ltd. /China |
| 2.) Vortex Mixer (Scientific Industries) | NY11716 / USA. |
| 3.) PCR (Polymerase Chain Reaction) | Bio-Rad Laboratories / USA. |
| 4.) Gel Electrophoresis | Hangzhou Allsheng Instruments Co.,
Ltd. / china |
| 5.) Gel Documentation system | Bio-Rad Laboratories / USA |

3.2.2 อุปกรณ์

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1.) Autopipette (Finnpipette F2) | FI-01621 / Vantaa Finland |
| 2.) Micropipette | Biohit / Finland |
| 3.) Microcentrifuge tube | Tarsons Product / India |
| 4.) ถังมือยาง (Powdered-free) | Sritrang groves / Thailand |
| 5.) ขวดรูปชมพู่ | (Erlenmeyer flask)PYREX / Germany |

3.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

3.3.1 สารเคมีในการทดสอบ PCR

- | | |
|------------------------|-----------------------------------|
| 1.) Agarose gel | BIOLINE / USA. |
| 2.) 10x buffe | SERVA / Germany |
| 3.) 10x buffer Taq | Quanta Bioscience / USA. |
| 4.) dNTPs | Quanta Bioscience / USA. |
| 5.) Ethidium bromide | Loba Chemie TM / India |
| 6.) Magnesium chloride | Quanta Bioscience / USA. |
| 7.) Primers | Macrogen / South Korea |

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

- | | |
|---|------------------|
| 1.) blood agar | HIMEDIA / India |
| 2.) tryptic Soy Agar | HIMEDIA / India |
| 3.) cation adjusted Muller – Hinton Broth (CAMHB) | Thermo Fisher |
| | Scietific / USA. |

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างใช้ปฏิบัติการของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่คือยาโคลิสตินจากโรงพยาบาลพระนครศรีธานี ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนกันยายน พ.ศ.2566 โดยมีจำนวน 24 ตัวอย่าง

3.4.2 เก็บตัวอย่างเชื้อ

ตัวอย่างเชื้อในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือยาโคลิสติน ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ผ่านการทดสอบวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อด้วยการทดสอบทางด้านชีวเคมี (biochemical) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลพระนครศรีธานี และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในปี พ.ศ.2566 จำนวน 24 ตัวอย่าง

3.4.3 การเพาะเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*

นำตัวอย่างเชื้อที่ถูกเก็บรักษาใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยทำการเพาะเชื้อบน blood agar และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.4 การสกัด DNA

สกัด DNA ด้วยวิธีการต้มเพื่อทำลายผนังเซลล์ นำเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 1-2 โคโลนี ต้มในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 700 μ L ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากปั่นตกเก็บส่วนใสไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

3.4.5 การตรวจหาเชื้อด้วย PCR (polymerase chain reaction) method

1. การตรวจยืนยันเชื้อ *K. Pneumoniae* ด้วยยีน *WaaQ* โดยวิธี PCR (polymerase chain reaction) ส่วนผสมสำหรับ PCR reaction และ PCR condition ดังแสดงในตารางที่ 3.2 สำหรับการตรวจหา *WaaQ* Primer และ PCR product ขนาด 217 bp. ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 Primer sequences สำหรับการตรวจหาเชื้อ *WaaQ* และ *mgrB* และ PCR product (bp)

Genes	Primer	Sequence	PCR product (bp)
<i>WaaQ</i>	<i>WaaQ</i> - F	5' - CGGATCCTGGTCATTAAGCTG - 3'	217
	<i>WaaQ</i> - R	5' - ATTGCATCTTCAGCTGATACCTTT- 3'	
<i>mgrB</i>	<i>mgrB</i> - F	5' - AAGGCGTTCATTCTACCACC - 3'	529
	<i>mgrB</i> - R	5' - TTAAGAAGGCCGTGCTATCC - 3'	

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทำปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *WaaQ*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1.Pre-denature	94	5	1
2.Denature	94	15 วินาที	
3.Annealing	60	15 วินาที	35
4.Extension	72	10 วินาที	
5.Final extension	72	7	1

2. ตรวจหาเชื้อ *mgrB* ด้วยวิธี PCR:mPCR ส่วนผสมในการทำ mPCR 12.5 μ L ประกอบด้วย 1x Green PCR mix kit (Biotech rabbit, Germany) primer 6.25 μ L ของแต่ละ forward primer และ reverse primer, 0.25 μ L ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *K. pneumoniae* ดังแสดงในตาราง 3.3 , primer *mgrB* และขนาดของ PCR product ดังแสดงในตารางที่ 3.1, สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และทำการเพิ่มจำนวน DNA 40 รอบ โดย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที, extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน

60 วินาที และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และทำการตรวจหา PCR product ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แนะนำไปดูผลได้ UV transilluminator ตัด gel บริเวณที่มีขนาดเทียบเท่ากับ PCR product ที่ต้องการทำให้ gel บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR kit เพื่อทำ DNA sequencing (Macrogen, South Korea) นำผล DNA sequences ของแต่ละยีนตรวจสอบความคล้ายคลึงของ ลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบ mPCR สำหรับตรวจยีน *mgrB*

Reagent	Volume for 1 sample
1x Green PCR Mix kit primer	6.25 μ L
<i>mgrB</i> Forward primer	0.25 μ L
<i>mgrB</i> Reverse primer	0.25 μ L
DW	0.75 μ L
DNA	5 μ L
Total	12.5 μ L

ตารางที่ 3.4 สภาวะการทำปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับตรวจหา *mgrB*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ
1.Pre-denature	94	3	1
2.Denature	94	30 วินาที	
3.Annealing	58	90 วินาที	40
4.Extension	72	60 วินาที	
5.Final extension	72	5	1

3.5 การทดสอบความไวต่อยา colistin ด้วยวิธี broth microdilution

นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ทำการเพาะเลี้ยง มาทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution ปรับระดับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland 0.5 ซึ่งจะมีเชื้อ $1-1.2 \times 10^8$ CFU/mL นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้วมาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 ใน Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (CaMHB) และใช้ระดับความเข้มข้นของยาโคลิสติน ตั้งแต่ 1-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยทำวิธี two-fold dilution ใน Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (CaMHB) และควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วยเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 จากนั้นนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำค่า MIC ที่ได้มา แปลผลการทดสอบตามที่กำหนด โดยมาตรฐานของ The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ซึ่งแปลผลการดื้อยาโดยใช้ค่า MIC break-point มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

3.6 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

3.6.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI

3.6.2 วิเคราะห์ Insertion gene ด้วย The ISfinder database

3.6.3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง phenotype และ genotype ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาต่อโคลิสติน

3.6.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของ *mgrB* กับค่า MIC ด้วย

Kruskal - Wallis test

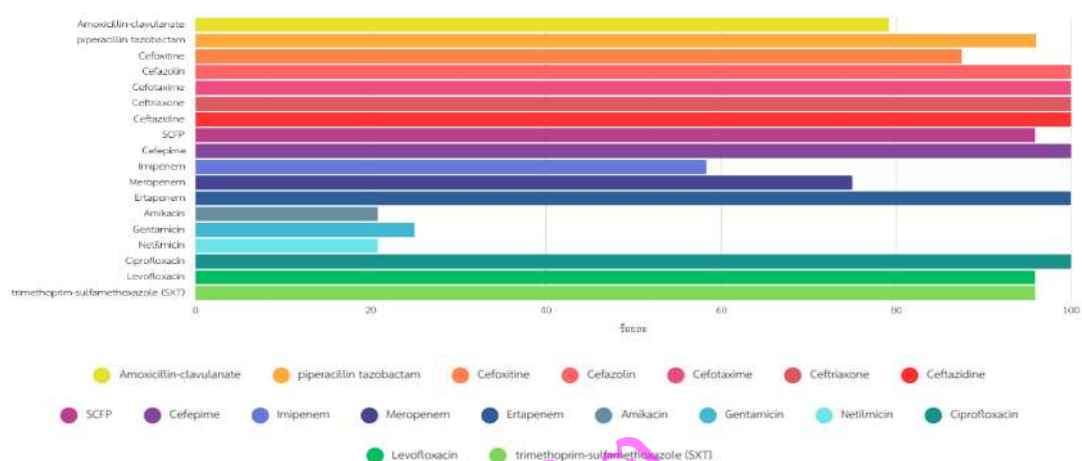
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 กลุ่มตัวอย่าง

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างและจำนวน (ร้อยละ)

ลักษณะกลุ่มตัวอย่าง		จำนวน (ร้อยละ)
เพศ	ชาย	11 (45.83)
	หญิง	13 (54.17)
อายุ	40-50 ปี	2 (8.33)
	51-60 ปี	1 (4.17)
	>60	21 (87.50)
แผนกที่เข้ารับการรักษา	อายุรกรรม	12 (50.00)
	ศัลยกรรม	2 (8.33)
	วิกฤต	8 (33.33)
	ห้องฉุกเฉิน	2 (8.33)
ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	เสมหะ	14 (58.33)
	ปัสสาวะ	14 (4.17)
	หนอง	2 (8.33)
	ปลายสายสวนปัสสาวะ	7 (29.17)



รูปที่ 4.1 แสดงผลการดื้อยาต้านจุลชีพของ colistin resistant *K. pneumoniae*

ผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือโคลิสตินจากผู้ป่วยในโรงพยาบาล นพรัตน์ราชธานี มีลักษณะเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน โดยมีอัตราการดื้อยาสูงต่อยาหลายกลุ่มสำคัญ รวมถึงยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งถือเป็นยาทางเลือกในการรักษา

4.2 ผลการทดสอบหาค่าความไวต่อยา colistin (MIC) ของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ด้วยวิธี broth microdilution

จากการศึกษาเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ผลการทดสอบพบว่า เชื้อ ทั้งหมดจำนวน 24 ตัวอย่าง มีค่า MIC 16 $\mu\text{g/mL}$ จำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 45.83) มีค่า MIC 32 $\mu\text{g/mL}$ จำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 41.67) และ มีค่า MIC 64 $\mu\text{g/mL}$ จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.50) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ในการจำแนกระดับความไวของเชื้อตามมาตรฐาน EUCAST กำหนดให้เชื้อที่มีค่า MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ จัดอยู่ในกลุ่มที่ ไวต่อยาแบบ intermediate ขณะที่เชื้อที่มีค่า MIC $> 2 \mu\text{g/mL}$ แปลผลเป็นดื้อยา (resistance) ในการทดสอบความไวต่อยา colistin ได้ควบคุมคุณภาพด้วยเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (ช่วงค่า MIC 0.5 – 2 $\mu\text{g/mL}$)

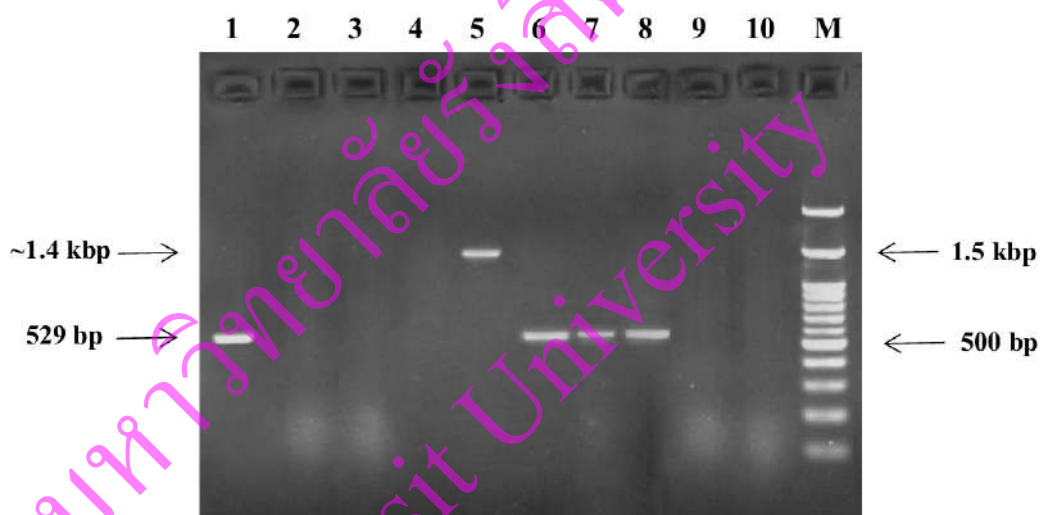
ตารางที่ 4.2 แสดงร้อยละผลการทดสอบความไวต่อยา colistin ด้วยวิธี broth microdilution

	ระดับการดื้อยา MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	16	32	64
<i>K. pneumoniae</i>	11 (45.83%)	10 (41.67%)	3 (12.50%)

4.3 การตรวจหายีน *mgrB* ของเชื้อ *K. pneumoniae*

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยา colistin จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี พ.ศ. 2566 จำนวน 24 ตัวอย่าง ได้ทำการตรวจหายีน *K. pneumoniae* ด้วยยีน *WaaQ* (ภัทรวดี, 2566)

เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ด้วยวิธี PCR จากการศึกษพบว่า ตรวจพบยีน *mgrB* ขนาด 1.4 kb จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.17) คือ no.101, ตรวจพบยีน *mgrB* ขนาด 529 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.33) คือ no.137 และ 156 และตรวจไม่พบยีน *mgrB* จำนวน 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 87.50) โดยผลการตรวจหายีน *mgrB* ดังแสดงในรูป 4.2



รูปที่ 4.2 ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ในเชื้อ *K. pneumoniae*

lane 1	Colistin susceptible <i>K. pneumoniae</i> no.1
lane 2-4	Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.24, no.37 และ no.84
lane 5	Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.101
lane 6-7	Colistin resistant <i>K. pneumoniae</i> no.137 และ 156
lane 8	<i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603
lane 9	Negative control (<i>E. coli</i> ATCC 25922)
lane 10	Negative control (น้ำกลั่น)
lane M	DNA ladder 100 bp + 3 Kbp

Klebsiella pneumoniae strain 2018-01-4639 chromosome, complete genome

 Sequence ID: [CP153498.1](#) Length: 5207981 Number of Matches: 1

Range 1: 1857851 to 1858345 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
902 bits(488)	0.0	493/495(99%)	1/495(0%)	Plus/Plus
CDS: Putative 1	10	G S I T R I I L R M		
Query	3	ACCCAGAT-ATAGTACGAATGATTAAATCGCATTGATGCCCTCATTATTTGTATGATCCCTG		61
Sbjct	1857851	ACCAAGATAATAGTACGAATGATTAAATCGCATTGATGCCCTCATTATTTGTATGATCCCTG		1857
CDS:YobH family prot	11	V L I I T R I I L R M		
Query	62	GCCTGATTTTGACACGAACACGTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTACCTTCG		121
Sbjct	1857911	GCCTGATTTTGACACGAACACGTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTACCTTCG		1857
Query	122	TAATACAGTTAGCCGCGTTTAAGAAGGCCGTGCTATCCTGGCGACATTGCGTACTGATG		181
Sbjct	1857971	TAATACAGTTAGCCGCGTTTAAGAAGGCCGTGCTATCCTGGCGACATTGCGTACTGATG		1858
CDS: Putative 2	1	V K K L R W V L L I V I I A G C		
Query	182	CGGAGAGTGGAGTGAAAAATTACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCAGCAGGCTGCC		241
Sbjct	1858031	CGGAGAGTGGAGTGAAAAATTACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCAGCAGGCTGCC		1858
CDS:PhoP/PhoQ regula	1	M K K L R W V L L I V I I A G C		
CDS: Putative 2	17	L L L W T Q M L N V M C D Q D V Q F F S		
Query	242	TGTTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACAGGATGTTCAAGTTCACGCG		301
Sbjct	1858091	TGTTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACAGGATGTTCAAGTTCACGCG		1858
CDS:PhoP/PhoQ regula	17	L L L W T Q M L N V M C D Q D V Q F F S		
CDS: Putative 2	37	G I C T I N K F I P W		
Query	302	GCATTGCACTATTAAATAATTATTCGGTGAAGACATTTTCTGCCGACTGATTTC		361
Sbjct	1858151	GCATTGCACTATTAAATAATTATTCGGTGAAGACATTTTCTGCCGACTGATTTC		1858
CDS:PhoP/PhoQ regula	37	G I C T I N K F I P W		
CDS: Putative 3	1	M S E L		
Query	362	TTCTGCCCGCGGTGGAATGAACGCCCTTCTCTTTGAGGTGGTGAATGAGTGAGTT		421
Sbjct	1858211	TTCTGCCCGCGGTGGAATGAACGCCCTTCTCTTTGAGGTGGTGAATGAGTGAGTT		1858
CDS:YebO family prot	1	M S E L		
CDS: Putative 3	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L L V		
Query	422	ACTGAATCTGGGATTTTAAATCTGGCATCGCTGGCTGTGCTCCGTGGCGTCTGCTGT		481
Sbjct	1858271	ACTGAATCTGGGATTTTAAATCTGGCATCGCTGGCTGTGCTCCGTGGCGTCTGCTGT		1858
CDS:YebO family prot	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L L V		
CDS: Putative 3	25	G L L L		
Query	482	CGGTCTGTTGTTATG 496		
Sbjct	1858331	CGGTCTGTTGTTATG 1858345		
CDS:YebO family prot	25	G L L L W		

 រូប 4.4 Colistin resistant *K. pneumoniae* no.137

Klebsiella pneumoniae strain 2018-01-4639 chromosome, complete genome

 Sequence ID: [CP153498.1](#) Length: 5207981 Number of Matches: 1

Range 1: 1857854 to 1858345 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
904 bits(489)	0.0	492/493(99%)	1/493(0%)	Plus/Plus
CDS: Putative 1	10	I I T R I I L R M		
Query	4	AGGTATAATAGTACGAATGATTAAATCGCATTGATGCCCTCATTATTTGTATGATCCCTGGC		63
Sbjct	1857854	AGC-AATAGTACGAATGATTAAATCGCATTGATGCCCTCATTATTTGTATGATCCCTGGC		1857
CDS:YobH family prot	10	I I T R I I L R M		
Query	64	GTGATTTTGACACGAACACGTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTACCTTCGTA		123
Sbjct	1857913	GTGATTTTGACACGAACACGTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTACCTTCGTA		1857
Query	124	ATACAGTTAGCCGCGTTTAAGAAGGCCGTGCTATCCTGGCGACATTGCGTACTGATGCG		183
Sbjct	1857973	ATACAGTTAGCCGCGTTTAAGAAGGCCGTGCTATCCTGGCGACATTGCGTACTGATGCG		1858
CDS: Putative 2	1	V K K L R W V L L I V I I A G C		
Query	184	GAGAGTGGAGTGAAAAATTACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCAGCAGGCTGCCCTG		243
Sbjct	1858033	GAGAGTGGAGTGAAAAATTACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCAGCAGGCTGCCCTG		1858
CDS:PhoP/PhoQ regula	1	M K K L R W V L L I V I I A G C		
CDS: Putative 2	18	L L L W T Q M L N V M C D Q D V Q F F S		
Query	244	TTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACAGGATGTTCAAGTTCACGCGC		303
Sbjct	1858093	TTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACAGGATGTTCAAGTTCACGCGC		1858
CDS:PhoP/PhoQ regula	18	L L L W T Q M L N V M C D Q D V Q F F S		
CDS: Putative 2	38	I C T I N K F I P W		
Query	304	ATTTGCACTATTAAATAATTATTCGGTGAAGACATTTTCTGCCGACTGATTTCCTT		363
Sbjct	1858153	ATTTGCACTATTAAATAATTATTCGGTGAAGACATTTTCTGCCGACTGATTTCCTT		1858
CDS:PhoP/PhoQ regula	38	I C T I N K F I P W		
CDS: Putative 3	1	M S E L		
Query	364	CTGCGCCGCGGTGGAATGAACGCCCTTCTCTTTGAGGTGGTGAATGAGTGAGTTAC		423
Sbjct	1858213	CTGCGCCGCGGTGGAATGAACGCCCTTCTCTTTGAGGTGGTGAATGAGTGAGTTAC		1858
CDS:YebO family prot	1	M S E L		
CDS: Putative 3	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L L V		
Query	424	TAAATCTGGGATTTTAAATCTGGCATCGCTGGCTGTGCTCCGTGGCGTCTGCTGTG		483
Sbjct	1858273	TAAATCTGGGATTTTAAATCTGGCATCGCTGGCTGTGCTCCGTGGCGTCTGCTGTG		1858
CDS:YebO family prot	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L L V		
CDS: Putative 3	25	G L L L		
Query	484	GTCTGTGTTATG 496		
Sbjct	1858333	GTCTGTGTTATG 1858345		
CDS:YebO family prot	25	G L L L W		

 រូប 4.5 Colistin resistant *K. pneumoniae* no.156

Klebsiella pneumoniae strain SWHIN_108 chromosome, complete genome

 Sequence ID: [CP055096.1](#) Length: 5228368 Number of Matches: 1

 Range 1: 1918752 to 1919245 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score 900 bits(487)	Expect 0.0	Identities 492/494(99%)	Gaps 2/494(0%)	Strand Plus/Plus
CDS: Putative 1	9	L F L V I I L R M		
Query	6	CCAAGA-AATAGTACG-ATGATTAATCGCATTGATGCCTCATTATTTGTATGATCCCTGG		63
Sbjct	1918752	CCAAGATAATAGTACGAATGATTAATCGCATTGATGCCTCATTATTTGTATGATCCCTGG		1918:
CDS:hypothetical pro	10	L I I T R I I L R M		
Query	64	CGTGATTTTGACACGAACACGTTTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTACCTTTCGT		123
Sbjct	1918812	CGTGATTTTGACACGAACACGTTTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTACCTTTCGT		1918:
Query	124	AATACAGTTAGCCGCGGTTTAAAGAAGCCGCTATCTCGCGACATTGCGTACTGATGC		183
Sbjct	1918872	AATACAGTTAGCCGCGGTTTAAAGAAGCCGCTATCTCGCGACATTGCGTACTGATGC		1918:
CDS: Putative 2	1	V K K L R W V L L I V I I A G C L		
Query	184	GGAGAGTGGAGTGAATAATACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCCT		243
Sbjct	1918932	GGAGAGTGGAGTGAATAATACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCCT		1918:
CDS:PhoP/PhoQ regula	1	M K K L R W V L L I V I I A G C L		
CDS: Putative 2	18	L L W T Q N L N V M C D Q D V Q F F S G		
Query	244	GTTCGTGTGGACTCAGATGCTTAACTAATGTGCGACAGGATGTTCACTTTTTCAGCGG		303
Sbjct	1918992	GTTCGTGTGGACTCAGATGCTTAACTAATGTGCGACAGGATGTTCACTTTTTCAGCGG		1919:
CDS:PhoP/PhoQ regula	18	L L W T Q M L N V M C D Q D V Q F F S G		
CDS: Putative 2	38	I C T I N K F I P N *		
Query	304	CATTTCACATTAATAAATTTATTCCTGGTAAGACATTTTCTGCGACTGATTTCT		363
Sbjct	1919052	CATTTCACATTAATAAATTTATTCCTGGTAAGACATTTTCTGCGACTGATTTCT		1919:
CDS:PhoP/PhoQ regula	38	I C T I N K F I P N *		
CDS: Putative 3	1	M S E L		
Query	364	TCTGCGCCCGGTTGTAATGAACGCCTTCTCTTGAGGTGGTGAATGAGTGAAGTTA		423
Sbjct	1919112	TCTGCGCCCGGTTGTAATGAACGCCTTCTCTTGAGGTGGTGAATGAGTGAAGTTA		1919:
CDS:YebO family prot	1	M S E L		
CDS: Putative 3	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L V		
Query	424	CTAAATCCTGGGATTTAAATCTGGCATCGCTGGTGTGTCCGTGGCTGCTGCTGTC		483
Sbjct	1919172	CTAAATCCTGGGATTTAAATCTGGCATCGCTGGTGTGTCCGTGGCTGCTGCTGTC		1919:
CDS:YebO family prot	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L V		
CDS: Putative 3	25	G L L L L		
Query	484	GGTCTGTGTTATG 497		
Sbjct	1919232	GGTCTGTGTTATG 1919245		
CDS:YebO family prot	25	G L L L W		

 รูปที่ 4.6 Colistin susceptible *K. pneumoniae* no.1

Klebsiella quasipneumoniae strain NKP7 chromosome

 Sequence ID: [CP091825.1](#) Length: 5158670 Number of Matches: 1

 Range 1: 3146353 to 3146847 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score 880 bits(476)	Expect 0.0	Identities 490/496(99%)	Gaps 4/496(0%)	Strand Plus/Minus
CDS: Putative 3	9	V C L V I I L R M		
Query	2	ACGA-CAC-ATAGTACG-ATGATTAATCGCATTGATGCCTCATTATTTGTATGATCCCTTG		58
Sbjct	3146847	ACGACCAATAGTACGAATGATTAATCGCATTGATGCCTCATTATTTGTATGATCCCTTG		3146:
CDS:YobH family prot	11	V V I T R I I L R M		
Query	59	CCGTGATTTTGACACGAACACGTTTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTGCCTTTCG		118
Sbjct	3146787	CCGTGATTTTGACACGAACACGTTTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTGCCTTTCG		3146:
Query	119	TATTACAGTTAGCCGCGGTTTAAAGAAGCCGCTGTTATCCTTGGCGACATAAAGTACTGATG		178
Sbjct	3146727	TATTACAGTTAGCCGCGGTTTAAAGAAGCCGCTGTTATCCTTGGCGACATAAAGTACTGATG		3146:
CDS: Putative 2	1	V K K L R W V L L I V I I A G C		
Query	179	CGGAGAGTGGAGTGAATAATACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCC		238
Sbjct	3146667	CGGAGAGTGGAGTGAATAATACGGTGGGTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCC		3146:
CDS:PhoP/PhoQ regula	1	M K K L R W V L L I V I I A G C		
CDS: Putative 2	17	L L L W T Q M L N V M C D Q D V Q F F S		
Query	239	TGTTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACTAATGTGCGACACAGGATGTTCACTTTTTCAGCG		298
Sbjct	3146607	TGTTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACTAATGTGCGACACAGGATGTTCACTTTTTCAGCG		3146:
CDS:PhoP/PhoQ regula	17	L L L W T Q M L N V M C D Q D V Q F F S		
CDS: Putative 2	37	G I C T I N K F I P N *		
Query	299	GCATTTCACATCAATAAATTTATCCCGTGGTAAGACATTTTCTGACGACTGATTTCC		358
Sbjct	3146547	GCATTTCACATCAATAAATTTATCCCGTGGTAAGACATTTTCTGACGACTGATTTCC		3146:
CDS:PhoP/PhoQ regula	37	G I C T I N K F I P N *		
CDS: Putative 1	1	M S E L		
Query	359	TTCGCGCCCGGTTGTAATGAACGCCTTCTCTTGAGGTGGTGAATGAGTGAAGTT		418
Sbjct	3146487	TTCGCGCCCGGTTGTAATGAACGCCTTCTCTTGAGGTGGTGAATGAGTGAAGTT		3146:
CDS:YebO family prot	1	M S E L		
CDS: Putative 1	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L L V		
Query	419	ACTAAATCCTGGGATCTTAAATCTGGCATCGCTGGCGGTGTCTGTGGCGCTGCTGCTGT		478
Sbjct	3146427	ACTAAATCCTGGGATCTTAAATCTGGCATCGCTGGCGGTGTCTGTGGCGCTGCTGCTGT		3146:
CDS:YebO family prot	5	L N P G I L N L A S L A V S V A L L L V		
CDS: Putative 1	25	G W F V M		
Query	479	CGGTTGGTTTGTATG 494		
Sbjct	3146367	CGGTTGGTTTGTATG 3146353		
CDS:YebO family prot	25	G L L L W		

 รูปที่ 4.7 *K. quasipneumoniae* ATCC 700603

4.5 เปรียบเทียบผล sequencing

ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ได้จากการศึกษาทำการ blast เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง *K. quasipneumoniae* ATCC700603 พบว่า no.1 (colistin intermediate *K. pneumoniae*) มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง ขณะที่ตัวอย่าง no.101 (colistin resistant *K. pneumoniae*) มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์บางช่วงที่ไม่ตรงกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งอาจเกิดการกลายพันธุ์แบบ insertion และตัวอย่าง no.137 และ 156 (colistin resistant *K. pneumoniae*) มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งอาจไม่พบการกลายพันธุ์และการดื้อยาอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่น โดยไม่เกี่ยวข้องกับยีน *mcrB* ดังแสดงในรูปที่ 4.8A, 4.8B, 4.8C และ 4.8D ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ได้จากการศึกษาทำการ blast เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง *K. quasipneumoniae* ATCC700603 โดยที่ 4.8A คือ ตัวอย่าง no.1 (colistin intermediate *K. pneumoniae*), 4.8B no.101 (colistin resistant *K. pneumoniae*), 4.8C no.137 (colistin resistant *K. pneumoniae*) และ 4.8D no.156 (colistin resistant *K. pneumoniae*)

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการตรวจลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* และค่า MIC ($\mu\text{g/mL}$) ของเชื้อ *K. pneumoniae* แต่ละตัวอย่าง

no.	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Mutation
24	64	Deletion
35	16	Deletion
36	32	Deletion
37	32	Deletion
63	16	Deletion
68	32	Deletion
70	32	Deletion
84	16	Deletion
99	32	Deletion
101	32	Insertion
122	16	Deletion
137	16	No mutation
146	32	Deletion
155	16	Deletion
156	64	No mutation
163	16	Deletion
164	16	Deletion
165	32	Deletion
166	32	Deletion
174	16	Deletion
178	32	Deletion
180	16	Deletion
181	16	Deletion
183	64	Deletion

4.8 เปรียบเทียบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* กับค่า MIC (16-64 $\mu\text{g/mL}$)

การเปรียบเทียบลักษณะของการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* กับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ในช่วง 16-64 $\mu\text{g/mL}$ โดยจำแนกลักษณะของการกลายพันธุ์ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ การกลายพันธุ์แบบ deletion จำนวน 21 ตัวอย่าง, insertion จำนวน 1 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ไม่พบการกลายพันธุ์ (no mutation) จำนวน 2 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* กับค่า MIC (16-64 mg/ml)

Mutation	จำนวน isolate (MIC 16-64 $\mu\text{g/mL}$)	Mean rank	Kruskal-Wallis test
Deletion	21	12.12	P value 0.722
Insertion	1	16.50	
No mutation	2	14.50	
รวม	24		

จากผลการวิเคราะห์ด้วย Kruskal-Wallis test พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* ทั้งแบบ deletion และ insertion ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า MIC แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของ *mgrB* และค่า MIC แม้จะพบการกลายพันธุ์แบบ deletion และ insertion แต่ผลลัพธ์ของ MIC ไม่พบความแตกต่างจากตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ (no mutation) ของยีน *mgrB* อย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของค่า MIC อาจไม่ได้ขึ้นกับการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* เพียงอย่างเดียว อาจมีกลไกอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น การแสดงออกของยีน *PmrA/PmrB*, *PhoP/PhoQ* หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ lipid A ใน LPS

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการสำรวจความชุกของการกลายพันธุ์ในยีน *mgrB* ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาโคลิสตินจากผู้ป่วยโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี พ.ศ. 2566 โดยผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี broth microdilution พบว่าเชื้อทั้งหมด 24 ตัวอย่าง มีค่า MIC ระหว่าง 16-64 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยพบว่า *K. pneumoniae* ส่วนใหญ่มีค่า MIC อยู่ในช่วง 4-32 $\mu\text{g/mL}$ และมีค่าสูงสุด 32 $\mu\text{g/mL}$ (Cannatelli et al., 2014) แสดงให้เห็นว่าผลการศึกษาค้นคว้านี้พบการดื้อยาโคลิสติน มีค่า MIC สูงกว่า อาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อหรือกลไกการดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับโครโมโซมหรือประวัติการใช้ยาโคลิสตินในพื้นที่ที่ศึกษา หากเชื้อได้รับการสัมผัสกับโคลิสติน มาก่อนหรือในระยะยาว อาจทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีการดื้อยาสูงขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ค่า MIC สูงขึ้น

การดื้อยาโคลิสตินใน *K. pneumoniae* พบว่าส่วนใหญ่สัมพันธ์กับการสูญเสียหน้าที่ของยีน *mgrB* ซึ่งปกติทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบ *PhoP/PhoQ* เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ระบบดังกล่าวถูกกระตุ้นการทำงานต่อเนื่อง ส่งผลให้โครงสร้างของผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง การจับของโคลิสตินเกิดได้ลดลงและก่อให้เกิดการดื้อยา จากการพบการระบาดครั้งใหญ่ในโรงพยาบาลอิตาลี โดยมีผู้ป่วยติดเชื้อกระแสเลือดจาก *K. pneumoniae* ดื้อยาโคลิสตินรวม 93 ราย ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อที่มียีน *mgrB* เกิดการหายไป (deletion) (Giani et al., 2015) และการศึกษาแบบ meta-analysis พบว่าสัดส่วนของการกลายพันธุ์ชนิด insertion อยู่ที่ประมาณร้อยละ 69 ในขณะที่ complete deletion และ partial deletion พบร้อยละ 19 และ 14 ตามลำดับ (Khoshbayan et al., 2024) นอกจากนี้ยังพบ colistin-resistant *K. pneumoniae* ในประเทศจีนแสดงให้เห็นว่า isolate ส่วนใหญ่มีการดื้อจาก insertional inactivation โดยพบการกลายพันธุ์แบบ deletion เพียงตัวอย่างเดียวในกลุ่มที่ศึกษา (Chen et al., 2022) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ได้มีการพบการหายไปของยีน *mgrB*

แบบ complete deletion หรือ partial deletion ร้อยละ 87.5 ในขณะที่พบการกลายพันธุ์แบบ insertion เพียง 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.2) ซึ่งควรทำการยืนยันการหายไปของยีน *mgrB* ด้วยวิธี whole genome sequencing (WGS) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาลักษณะนี้สอดคล้องกับรายงานการระบาดครั้งใหญ่ของสายพันธุ์ ST512 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* ในยุโรป และพบว่ามี deletion 11 bp ภายในยีน *mgrB* ใน isolates ถึงร้อยละ 85.0 ในขณะที่ insertion sequence พบเพียง isolate เดียวเท่านั้น (Giani et al., 2015) ซึ่งอาจสะท้อนถึงลักษณะการแพร่ระบาดของ clone เฉพาะที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion อยู่แล้วในโรงพยาบาลหรือชุมชนที่ศึกษา

การเกิด *mgrB* deletion ทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่สามารถก่อให้เกิดค่า MIC ในระดับสูงได้เทียบเท่ากับการเกิด insertion ดังนั้น ความแตกต่างของชนิดการกลายพันธุ์อาจไม่ได้ส่งผลโดยตรงต่อระดับ MIC แต่สะท้อนถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ (clonal variation) และผลกระทบจากการใช้ยาปฏิชีวนะในแต่ละพื้นที่ รวมถึงความแตกต่างของวิธีการที่ใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งอาจมีผลต่อการจำแนกชนิดการกลายพันธุ์ได้แตกต่างกัน (Giani et al., 2015 และ Song et al., 2021) และจากการศึกษาเชิงระบบและระบาดวิทยามีรายงานว่า point mutation (รวมทั้ง missense และ nonsense substitutions) ใน *mgrB* พบบ่อยและมีความหลากหลายของตำแหน่ง ซึ่งทำให้การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแบบ insertion/deletion อาจไม่เพียงพอ (Khoshbayan et al., 2024; Yusof et al., 2022). การเกิด point mutation เพียงหนึ่งตำแหน่งทำให้ *mgrB* สูญเสียหน้าที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้เพิ่มระดับการแสดงออกของยีนในระบบ PhoPQ หรือ PmrAB ทั้งหมดเปลี่ยนไปและ MIC ของโคลิสตินเพิ่มขึ้น (Janssen et al., 2020).

การตรวจพบ insertion กลุ่ม IS1 family โดยเฉพาะ ISKpn14 ในบางตัวอย่างของ *K. pneumoniae* ที่คือต่อ โคลิสตินในการศึกษาลักษณะนี้ ซึ่งมีค่า MIC ประมาณ 32 µg/mL การค้นพบนี้สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ระบุว่า ISKpn14 เป็นกลไกสำคัญในการทำให้ *mgrB* สูญเสียหน้าที่และก่อให้เกิดการดื้อต่อยาโคลิสติน โดยมีการพบ ISKpn14 แทรกใน *mgrB* ของเชื้อที่มีค่า MIC อยู่ในช่วง 16-64 µg/mL (Poirel et al., 2015, Kumar et al., 2018, และ Li et al., 2024) ผลลัพธ์ดังกล่าวชี้ว่าการแทรกของ IS1 family สามารถเพิ่มระดับการดื้อยาของเชื้อได้เทียบเท่ากับการกลายพันธุ์แบบ deletion ในบางกรณี ความแตกต่างของชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละงานอาจสะท้อนถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์และอิทธิพลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในแต่ละพื้นที่

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่คือ colistin 2 ตัวอย่าง ในการศึกษาลักษณะนี้พบว่าไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* และการที่เชื้อยังคงดื้อยาได้แม้ *mgrB* ไม่พบการกลายพันธุ์ อาจอธิบายได้ว่ากลไกคือยาอาจไม่ได้ขึ้นกับ *mgrB* เพียงอย่างเดียว การเปลี่ยนแปลงใน *phoP* สามารถกระตุ้นระบบ PhoPQ และ

นำไปสู่การดัดแปลง LPS ทำให้เชื้อคือโคลิสติน แม้ *mgrB* ปกติ (Jayol et al., 2015) การกระตุ้น *PhoPQ* หรือ *PmrAB* สามารถเพิ่มการแสดงออกของ *arn* operon ทำให้ Lipid A ถูกปรับโครงสร้างและส่งผลให้ colistin จับได้ยากขึ้น (Cheung et al., 2020) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของ *PhoPQ* และ *PmrAB* ในเชื้อที่มีการคือโคลิสติน โดยบางสายพันธุ์ไม่พบความผิดปกติใน *mgrB* เลย (Cheong et al., 2020) ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ว่า แม้ *mgrB* จะเป็นกลไกหลักที่พบได้บ่อย แต่การกลายพันธุ์หรือความผิดปกติในระบบ *PhoPQ* และ *PmrAB* ก็สามารถทำให้เกิด colistin resistance ได้เช่นกัน อีกทั้งยังอาจมีกลไกอื่นร่วม เช่น plasmid-mediated *mcr*, efflux pump หรือการสร้าง biofilm ซึ่งสะท้อนว่ากลไกการคือโคลิสติน มีความซับซ้อนและควรมีการตรวจสอบยีนและระบบอื่น ๆ ควบคู่กับ *mgrB* เพื่อทำความเข้าใจการคือยาของเชื้อให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

การเปรียบเทียบผลการวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า สัดส่วนของกลไกการกลายพันธุ์ใน *mgrB* อาจแตกต่างกันไปตาม clone ของเชื้อ สภาพภูมิศาสตร์ ประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะ รวมถึงวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ เช่น PCR, long-PCR หรือการหาลำดับทั้งจีโนม (WGS) ซึ่งอาจมีอิทธิพลต่อการตรวจพบ insertion หรือ deletion ในแต่ละรายงาน

ในด้านของผลกระทบทางคลินิกและการรักษาพบว่าการใช้โคลิสตินซึ่งเป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่ยังใช้รักษาเชื้อ carbapenem resistant *K. pneumoniae* ได้ แต่กลับพบแนวโน้มการคือยาโคลิสตินเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ต้องพิจารณาทางเลือกอื่น เช่น tigecycline, ceftazidime-avibactam, plazomicin และ cefiderocol (Petrosillo et al., 2019) อย่างไรก็ตาม ยาทางเลือกเหล่านี้ยังคงมีข้อจำกัดทั้งด้านประสิทธิภาพ ผลข้างเคียง และยามีราคาสูงเน้นย้ำถึงความจำเป็นในการเฝ้าระวังและควบคุมการใช้โคลิสตินอย่างเข้มงวดเพื่อชะลออายุการใช้นี้ให้นานที่สุด

ผลการศึกษาครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* เพื่อทำความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างยีนและการแสดงออกของเชื้อที่คือยา ซึ่งมีความจำเป็นในการคาดการณ์แนวโน้มการแพร่ระบาด รวมถึงการเลือกแนวทางการรักษาที่เหมาะสมต่อผู้ป่วยในแต่ละราย อีกทั้งยังสะท้อนความจำเป็นของการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำสำหรับการตรวจหายีน *mgrB* และยีนที่เกี่ยวข้อง เช่น *pmrA/pmrB* และ *phoP/phoQ* เพื่อนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกในการคัดกรองผู้ป่วยได้ทันทั่วถึง

โดยสรุป การศึกษานี้ยืนยันว่า การกลายพันธุ์ของยีน *mgrB* เป็นกลไกหลักที่ทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* คือโคลิสติน ซึ่งกำลังเป็นปัญหาที่มีความรุนแรงและควรได้รับการเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด เนื่องจากโคลิสตินถือเป็นยาทางเลือกสุดท้ายในการรักษาการติดเชื้อแกรมลบที่คือยาหลายขนาน (MDR/XDR) การพบอัตราการคือยาโคลิสตินที่สูงขึ้น สะท้อนให้เห็นถึงความสำคัญและมี

ความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการกำหนดมาตรการควบคุมการใช้ยา เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ควรมีการติดตามการกลายพันธุ์เชิงโมเลกุลอย่างสม่ำเสมอและพัฒนาทางเลือกใหม่ในการรักษา เช่น การใช้ phage therapy เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อลดปัญหาการดื้อยาที่กำลังทวีความรุนแรงขึ้นในระดับประเทศและระดับโลก

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บรรณานุกรม

- Chen, X., et al. (2022). Role of the ISKpn element in mediating *mgrB* gene inactivation in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1277320>
- Cannatelli, A. (2014). Molecular mechanisms of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: *mgrB* inactivation is a common phenomenon. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(3), 316–319. <https://doi.org/10.1128/aac.01480-13>
- Cheong, H. S., Kim, S. Y., Seo, J., Wi, Y. M., Peck, K. R., & Ko, K. S. (2020). Colistin Resistance and Extensive Genetic Variations in *PmrAB* and *PhoPQ* in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from South Korea. *Current Microbiology*, 77(9), 2307–2311.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02074-4>
- Cheung, C. H. P., Dulyayangkul, P., Heesom, K. J., & Avison, M. B. (2020). Proteomic investigation of the signal transduction pathways controlling colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00790-20>
- Gharaibeh, M. H., & Shatnawi, S. Q. (2019). An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review. *Veterinary World*, 12(11), 1735–1746.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1735-1746>
- Giani, T., Arena, F., Vaggelli, G., Conte, V., Chiarelli, A., De Angelis, L. H., Fornaini, R., Grazzini, M., Niccolini, F., Pecile, P., & Rossolini, G. M. (2015). Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an *mgrB* Deletion Mutant. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(10), 3341–3344. <https://doi.org/10.1128/jcm.01017-15>
- Jayol, A., Nordmann, P., Brink, A., & Poirel, L. (2015). Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the *PhoPQ* regulatory system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(5), 2780–2784.
<https://doi.org/10.1128/AAC.05055-14>

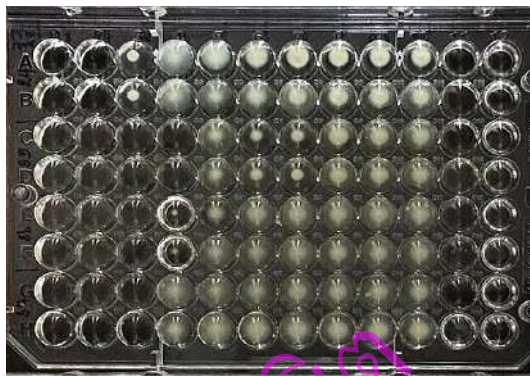
- Khoshbayan, A., Narimisa, N., Elahi, Z., Bostanghadiri, N., Razavi, S., & Shariati, A. (2024). Global prevalence of mutation in the *mgrB* gene among clinical isolates of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1386478>
- Kumar, A., Biswas, L., Omgy, N., Mohan, K., Vinod, V., Sajeev, A., Nair, P., Singh, S., & Biswas, R. (2018). Colistin resistance due to insertional inactivation of the *mgrB* in *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin: First report from India. *Revista Española De Quimioterapia. Suplemento*, 31(5), 406. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6194868/>
- Li, Z., Lei, Z., Liu, X., Zhang, F., Yang, X., Wu, Y., Li, C., Zhao, J., Zhang, Y., Hua, Y., & Lu, B. (2024). Disruption of *mgrB* gene by ISkpn14 sourced from a bla KPC-2-carrying plasmid mediating polymyxin resistance against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* during treatment. *BMC Microbiology*, 24, Article 422. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03572-2>
- Mao, M., He, L., & Yan, Q. (2025). An updated overview on the bacterial *PhoP/PhoQ* two-component signal transduction system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1509037>
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00078-15>
- Petrosillo, N., Taglietti, F., & Granata, G. (2019). Treatment Options for Colistin Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Present and Future. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 934. <https://doi.org/10.3390/jcm8070934>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.58>

- Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M., Ozdamar, M., Turkoglu, S., & Nordmann, P. (2014). The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1), 75–80.
<https://doi.org/10.1093/jac/dku323>
- Shein, Aye Mya Sithu. (2021). Mechanisms of colistin resistance and the antimicrobial effects of antibiotic and adjuvant combination on colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Chulalongkorn University Theses and Dissertations*, 4786.
https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/4786/?utm_source=chatgpt.com
- Song, Y., Yang, J., Ju, Y., Liu, D., Wang, Y., Sun, X., & Lv, Y. (2021). Genomic insights into a complete deletion of the *mgrB* locus in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST2268 isolated from a human infection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 75–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.07.004>
- Stojowska-Swędryńska, K., Łupkowska, A., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Laskowska, E. (2021). Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 44. <https://doi.org/10.3390/ijms23010449>
- Yap, P. S., Cheng, W., Chang, S., Lim, S. E., & Lai, K. (2022). *MgrB* Mutations and Altered Cell Permeability in Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Cells*, 11(19), 2995.
<https://doi.org/10.3390/cells11192995>
- Yusof, N. Y., Norazzman, N. I. I., Hakim, S. N. W. A., Azlan, M. M., Anthony, A. A., Mustafa, F. H., Ahmed, N., Rabaan, A. A., Almuthree, S. A., Alawfi, A., Alshengeti, A., Alwarthan, S., Garout, M., Alawad, E., & Yean, C. Y. (2022). Prevalence of Mutated Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(12), 414.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed7120414>

ภาคผนวก ก

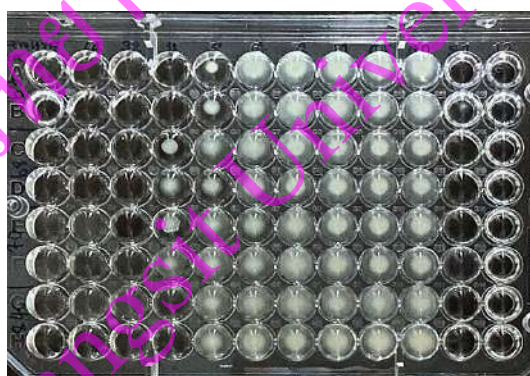
รายละเอียดรูปภาพ

ผลการทดสอบ MIC แสดงไว้ดังต่อไปนี้



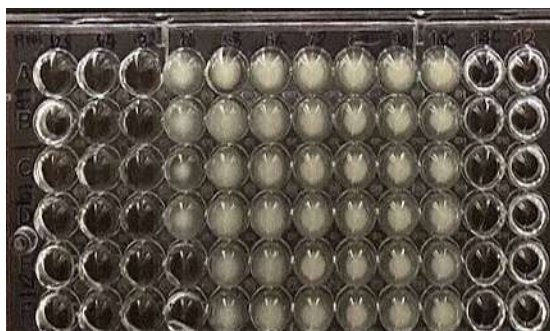
รูปที่ 1 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *K. pneumoniae*.

4 ตัวอย่าง ได้แก่หมายเลข 24, 35, 36 และ 37 ต่อยา colistin



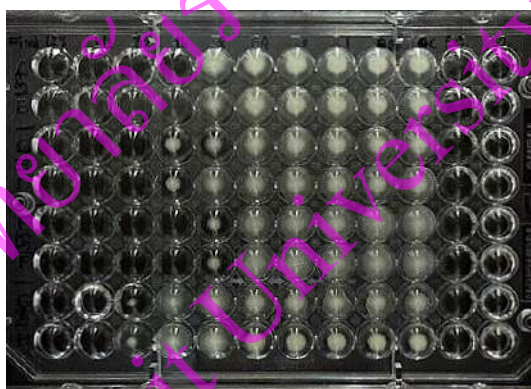
รูปที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *K. pneumoniae*.

4 ตัวอย่าง ได้แก่หมายเลข 63, 68, 70 และ 84 ต่อยา colistin



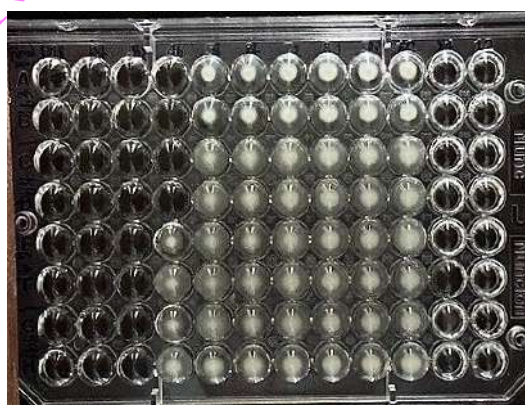
รูปที่ 3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *K. pneumoniae*.

4 ตัวอย่าง ได้แก่หมายเลข 99,101 และ 122 ต่อยา colistin



รูปที่ 3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *K. pneumoniae*.

4 ตัวอย่าง ได้แก่หมายเลข 137,146,155 และ 156 ต่อยา colistin



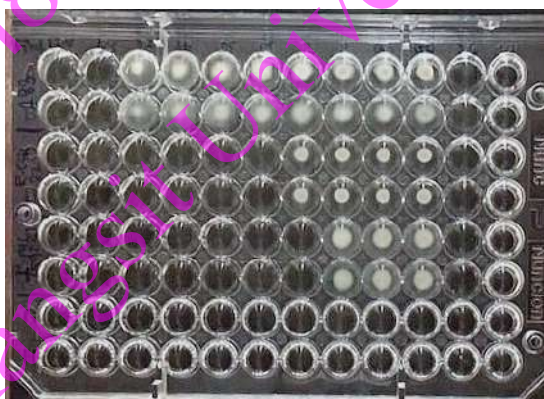
รูปที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *K. pneumoniae*.

4 ตัวอย่าง ได้แก่หมายเลข 163, 164, 165 และ 166 ต่อยา colistin



รูปที่ 6 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *K. pneumoniae*.

4 ตัวอย่าง ได้แก่หมายเลข 174,178,180 และ 181 คอลิสติน



รูปที่ 7 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *K. pneumoniae*.

1 ตัวอย่าง ได้แก่หมายเลข 183, และ Quality Control ในการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อยา

โคลิสติน *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 22

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	กนกนาฏ จันโทพลัง
วัน เดือน ปี เกิด	30 มิถุนายน 2546
สถานที่เกิด	อุดรธานี
ที่อยู่ปัจจุบัน	1 ม.18 ต.พันดอน อ.กุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2562 จากโรงเรียนสตรีราชินูทิศ จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2565 จากโรงเรียนสตรีราชินูทิศ จังหวัดอุดรธานี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	กัลยา บุรลิตธี
วัน เดือน ปี เกิด	13 กันยายน 2546
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	99/347 หมู่บ้านลิลิตทาวน์ รังสิต-คลองสอง หมู่ 2 ต.คลองสอง อ.คลองหลวง จ. ปทุมธานี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2562 จากโรงเรียนธรรมศาสตร์คลองหลวงวิทยาคม สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2565 จากโรงเรียนธรรมศาสตร์คลองหลวงวิทยาคม
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	เกษราภรณ์ ทองเที่ยง
วัน เดือน ปี เกิด	10 เมษายน 2547
สถานที่เกิด	นครสวรรค์
ที่อยู่ปัจจุบัน	99/48 หมู่บ้านดีพร้อม 2 หมู่ 4 ต.นครสวรรค์ตก อ.เมือง จ.นครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2562 จากโรงเรียนลาซาลโชติรวินนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2565 จากโรงเรียนลาซาลโชติรวินนครสวรรค์
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	รัชชนก รักษาบุญ
วัน เดือน ปี เกิด	8 กรกฎาคม 2546
สถานที่เกิด	บึงกาฬ
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 31 หมู่ที่ 11 ตำบล พรเจริญ อำเภอพรเจริญ จังหวัดบึงกาฬ
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2562 จากโรงเรียนปราชญ์ราษฎร์อารุง สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2565 จากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	มธุรส ลุนรายี
วัน เดือน ปี เกิด	21 กรกฎาคม 2546
สถานที่เกิด	มหาสารคาม
ที่อยู่ปัจจุบัน	176/17 ต.แคน อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2562 จากโรงเรียนวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2565 จากโรงเรียนวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	โสภิตา นันตา
วัน เดือน ปี เกิด	16 มกราคม 2547
สถานที่เกิด	แพร่
ที่อยู่ปัจจุบัน	303/43 ม.7 ต.นาจักร อ.เมือง จังหวัดแพร่
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2562 จากโรงเรียนนารีรัตน์ จังหวัดแพร่ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2565 จากโรงเรียนนารีรัตน์ จังหวัดแพร่
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต