รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวินิจฉัยการสร้างเอน**ไซม์เบต้า**แลคตาเมส ชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ

Burkholderia pseudomallei ที่พบในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์

คณะผู้วิจัย

นางภาวนา พนมเขต
นายสุรศักดิ์ แว่นรัมย์
นาง**จุฑา**รัตน์ จิตติมณี
นาง**สาวนิตยา** ธีระวัฒนสุข
นาง**จิราภรณ์** นิลสกุล
วิทยาลัย**แพทยศาสตร์**และการสาธารณสุข

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุน**การวิจัย**จากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประ**จำปีงบ**ประมาณ 2554

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2554 ได้รับการสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือวิจัยจากวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งเป็นต้นสังกัด ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือวิจัย รศ.ดร.สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยให้คำแนะนำในการออกแบบการทดลอง อภิปรายและแปลผลการทดลอง ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย
ตุลาคม 2555

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญ และที่มาของการวิจัย	1
- วัตถุประสงค์	2
- ขอบเขตของงานวิจัย	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
- เชื้อ *B. pseudomallei*	5
- ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Beta-lactams	7
- การดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactams	8
- ESBL families	10
- Multidrug resistance in ESBL producers	10
- การตรวจหาเอนไซม์และยีนเบต้าแลคตาเมส	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	13
- วิธีดำเนินการวิจัย	13
- การทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาปฏิชีวนะ	13
- การออกแบบไพรเมอร์	15
- การวิเคราะห์ข้อมูล	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	16
- ผลการทดลองโครงการย่อยที่ 1	16
- ผลการทดลองโครงการย่อยที่ 2	25
- ผลการทดลองโครงการย่อยที่ 3	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	30
- สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	30
- สรุปผลการทดลอง	32
- ปัญหาอุปสรรค ข้อเสนอแนะ	32
- การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการจากการวิจัย	32
- เอกสารอ้างอิง	34
- ภาคผนวก	36
- ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในงานวิจัย	37

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
- ประวัตินักวิจัย	38
- สำเนาการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ	45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ Susceptibility test 17
ตารางที่ 2 ผลการทดลอง Combination disc 20
ตารางที่ 3 ผลการทดลอง MIC 22
ตารางที่ 4 Primers ที่ออกแบบโดยชีวสารสนเทศ 29

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

β	Beta
g	Gram
mg	Miligram
mL	Milliliter
µg	Microgram
µL	Microliter
°C	Degree Celsius
CFU	Colony forming unit
MIC	Minimum inhibitory concentration

รายงานการวิจัยเรื่อง การวินิจฉัยการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส ชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่พบในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์

ผู้วิจัย นางภาวนา พนมเขต
นายสุรศักดิ์ แว่นรัมย์
นางสาวจุฑารัตน์ จิตติมณี
นางสาวนิตยา ธีระวัฒนสุข
นางจิราภรณ์ นิลสกุล
วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

คำสำคัญ *Burkholderia pseudomallei* ESBL Ceftazidime

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อโรคเมลิออยโดสีส อาการแสดงพบได้ทั้งโรคติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างเฉียบพลันและการติดเชื้อเรื้อรัง ยา ceftazidime เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาเพื่อกำจัดเชื้อ *B. pseudomallei* แต่ปัจจุบันพบรายงานการเกิดการกลับเป็นซ้ำและการรักษาที่ไม่ได้ผล วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจคัดกรอง การหาอุบัติการณ์และการวินิจฉัยหาเชื้อ Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *B. pseudomallei* โดยทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี standard disc diffusion การทดสอบ minimal inhibitory concentration (MIC) และการทดสอบ Combination disc ในเชื้อจำนวน 85 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึงเดือนพฤษภาคม 2554 พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับบันทึกผลการรักษาของผู้ป่วย ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า *B. pseudomallei* ไวต่อยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะยา ceftazidime ด้วยวิธี standard disc diffusion และมีค่า MIC ต่ำ (1- 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime หายจากโรคเพียงร้อยละ 30.31 และจากการตรวจด้วยเทคนิคโมเลกุลโดย PCR พบว่าเชื้อเหล่านี้มี Oxa และ PenA ยีน ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง beta-lactamase enzyme แต่ยังไม่พบ ESBL producing *B. pseudomallei* การตรวจคัดกรองไม่สามารถตรวจพบยีนเหล่านี้

Title Diagnostics of Extended Spectrum Beta-lactamase producing *Burkholderia pseudomallei* in Sappasithiprasong Hospital

Researcher Ms. Pawana Panomket
Mr Surasak Wanram
Miss Jutharat Jittimanee
Miss Nitaya Teerawatanasuk
Ms. Jiraporn Nilsakul
College of Medicine and Public Health Ubon ratchathani University

Keywords *Burkholderia pseudomallei* ESBL Ceftazidime

Abstract

Burkholderia pseudomallei are the causative agent of melioidosis, a disease that can involve acute septicemia and chronic infection. Ceftazidime is the most popular choice of treatment for the eradication of *B. pseudomallei* but relapse and failure to respond positively to treatment have been reported. The aim of this study was to compare the screening methods and observe the incidence and diagnostics of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *B. pseudomallei* by standard disc diffusion, minimal inhibitory concentration, and combination disc. A total of 85 isolates of *B. pseudomallei* from patients admitted to Sapprasithiprasong Hospital between November 2010 and May 2011 were included in this study and their medical records were reviewed. It was shown that *B. pseudomallei* were susceptible to anti-microbial, especially ceftazidime by standard disc diffusion and had low MICs (1 - 2 µg/ml). However, only 30.31% of patients receiving ceftazidime recovered. Molecular technique by polymerase chain reaction (PCR) found Oxa and PenA gene that were found to produce beta-lactamase enzyme but not ESBL producing *B. pseudomallei*. Screening methods did not detect these genes.

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของการวิจัย

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อก่อโรค Melioidosis ที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดอุบลราชธานี พบเชื้อนี้ได้ในดิน โรคเมลิออยโดสิส มีอาการแสดงทางคลินิกที่หลากหลายทั้งแบบที่เป็น acute subacute และ chronic infection มีรายงานว่าทำให้เกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือดจากชุมชน (Community- Acquired septicemias) มากถึงร้อยละยี่สิบและตายด้วยภาวะ septic shock มากถึงร้อยละหกสิบ

ปัจจุบันมีรายงานการดื้อยาของ *B. pseudomallei* ต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด รวมถึงยาในกลุ่ม aminoglycoside macrolides polymyxins และ ยาในกลุ่ม β-lactam แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันก็มีรายงานการดื้อต่อ ceftazidime ซึ่งเป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส โดยเฉพาะใช้รักษาผู้ป่วยที่เป็น severe melioidosis แต่กลไกการดื้อยายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ในเชื้อ *B. pseudomallei* ถึงแม้ว่ายา carbapenem จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคเมลิออยโดสิส แต่ปัจจุบันนี้ก็มีรายงานถึงการดื้อของเชื้อในกลุ่ม gram negative pathogen หลายชนิดต่อ carbapenem โดยการสร้างเอนไซม์ specific β-lactamase

เอนไซม์ Extended spectrum beta lactamase (ESBL) เป็นเอนไซม์ที่พบมากในแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ มีฤทธิ์ย่อยสลายยากลุ่ม β-lactam หลายชนิด ได้แก่ penicillin oxyimino cephalosporin (3^{rd} generation cephalosporin) และ aztreonam ทำให้มีการดื้อยา β-lactam เกือบทุกกลุ่ม เอนไซม์นี้จึงมีความสำคัญทางคลินิกมาก เพราะหากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้การเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วยจะจำกัด และทำให้ล้มเหลวต่อการรักษา

Godfrey และคณะรายงานการดื้อยาของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาในกลุ่ม β-lactam เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงภายโครโมโซมที่ encode การสร้างเอนไซม์ β-lactamase และจากการศึกษาของ ดร.พรรณนิกา เนียมทรัพย์ และคณะ พบว่าเมื่อนำเชื้อ *B. pseudomallei* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา ceftazidime ในปริมาณสูง พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β-lactamase และจำแนกได้ว่าเป็นยีน class D β-lactamase เหมือนกันกับเอนไซม์ oxacillinase จากเชื้อ *Ralstonia pickettii* ในเวลาใกล้เคียงกันผลการศึกษาของ นพ. ดร.ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ และคณะ พบยีน PenA ที่ encode บน class A β-lactamase ใน clinical isolates ของเชื้อ *B. pseudomallei* จากผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้างเอนไซม์เบต้าแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย และส่งผลต่อการใช้ยาในกลุ่ม β-lactam หลายชนิด

โรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์ เป็นโรงพยาบาลขนาดใหญ่และเป็นโรงเรียนแพทย์ที่มีผู้ป่วยมารับบริการจำนวนมาก การดื้อยาปฏิชีวนะก็มีโอกาสพบได้สูง โดยความรุนแรงและความชุกอัตราการดื้อยาจะมากกว่าโรงพยาบาลชุมชน เนื่องจากระบบในการให้บริการ การเลือกใช้ยา ระยะเวลาในการให้ยาผู้ป่วย การอยู่ในโรงพยาบาล โรคประจำตัวของผู้ป่วย การใส่สายสวนต่างๆและการปนเปื้อน ดังนั้นการศึกษาหาความชุก การตรวจคัดกรองและการตรวจวินิจฉัยเพื่อหาเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีประโยชน์ในทางคลินิกอย่างมาก เพื่อทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL และวิธีที่สะดวก ง่าย และเหมาะต่อการตรวจคัดกรองหา ESBL producing *B. pseudomallei* เพื่อนำไป

ประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนการตรวจยืนยันเพื่อหายีนที่สร้างเอนไซม์ ESBL โดยใช้เทคนิคทางชีวสารสนเทศออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการตรวจหายีนด้วยวิธี PCR

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจคัดกรองหา ESBL producing *B. pseudomallei*
2. เพื่อทราบอุบัติการณ์ของ ESBL producing *B. pseudomallei* ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์
3. เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจยืนยันยีน ESBL producing *B. pseudomallei*
4. เพื่อตรวจหายีน ESBL producing *B. pseudomallei* โดยเทคนิค PCR

โครงการประกอบด้วยโครงการย่อย 3 โครงการดังนี้

โครงการที่1 **(ภาษาไทย)** การตรวจคัดกรองและการหาความชุกของการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส ชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์

(ภาษาอังกฤษ) Screening detection and prevalence of *Burkholderia pseudomallei* in Sappasithiprasong Hospital

โครงการที่2 **(ภาษาไทย)** การใช้ชีวสารสนเทศเพื่อทำนายการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส ชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

(ภาษาอังกฤษ) Use of bioinformatics to predict ESBL producing genes in *Burkholderia pseudomallei*

โครงการที่3 **(ภาษาไทย)** การวินิจฉัยหายีนสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส ชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยวิธี PCR

(ภาษาอังกฤษ) Diagnostics of Extended Spectrum Beta-lactamase producing *Burkholderia pseudomallei* by PCR

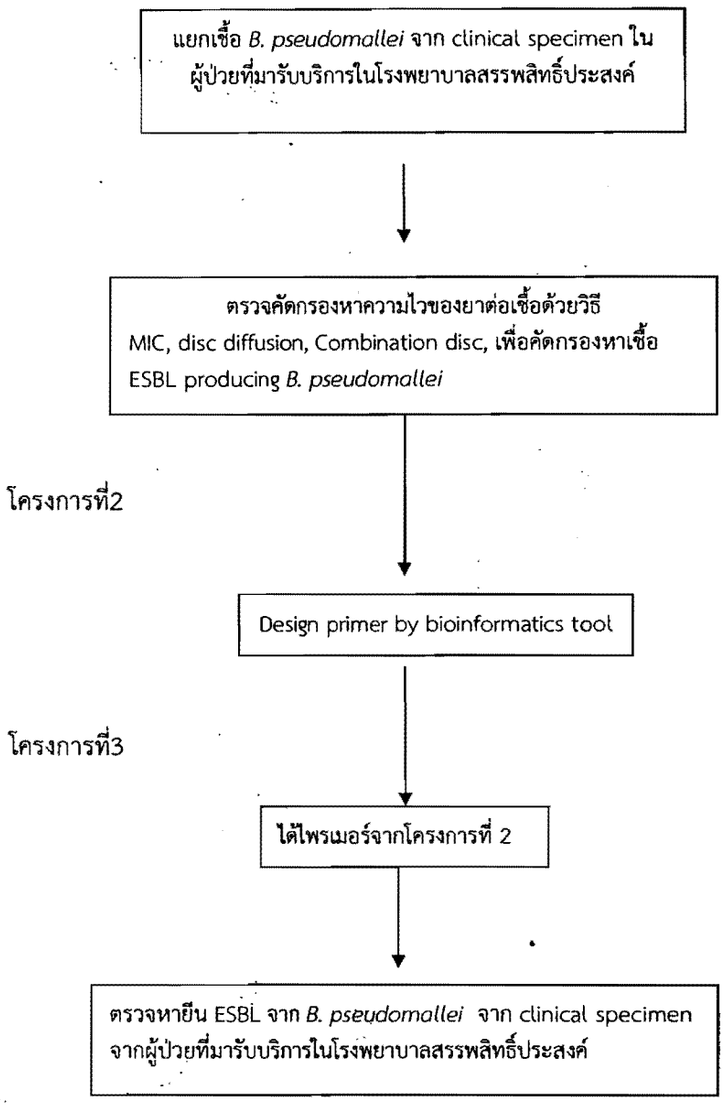
ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทดสอบ MIC standard disc diffusion ด้วยยาปฏิชีวนะดังนี้ ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, cefoparazone, cefoparazone+sulbactam, cefotaxime, aztreonam, ออกแบบไพรเมอร์เพื่อทดสอบหา ESBL ด้วยวิธี PCR

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

กรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

โครงการที่1



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติและระดับชาติได้
2. สามารถนำวิธีการตรวจคัดกรองหา ESBL producing *B. pseudomallei* มาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยหายีนดื้อยากลุ่ม β-lactam
3. ได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหายีน ESBL producing *B. pseudomallei*

4. ข้อมูลความชุกของ ESBL producing *B. pseudomallei* จะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการระมัดระวังการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วย

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่พบมากในดินแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเมลิออยโดสิส เชื้อนี้เป็น Saprophytic bacteria พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินและน้ำ ในพื้นที่ระบาดเชื้อนี้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีมาก สามารถแยกเชื้อได้จากดินที่อยู่ลึกลงไปถึง 90 ซม. การแยกเชื้อจากผิวดินนาข้าวอยู่ในระดับต่ำเป็นไปได้ว่าเชื้อสามารถหลบซ่อนอยู่ใต้ดินตลอดทั้งปี และในช่วงที่ฝนตกชุกน้ำได้ดินจะนำเอาเชื้อมาอยู่ที่ผิวดิน ชาวนาชาวสวนสัมผัสกับดินและน้ำในฤดูฝนจึงมีโอกาสรับเชื้อมาก จึงมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อและเกิดโรคสูงในฤดูฝน นอกจากนั้นเชื้อนี้สามารถทนอุณหภูมิต่ำในตู้เย็นได้เป็นเวลาหลายเดือน แม้กระทั่งทิ้งไว้ในน้ำกลั่นนานๆ เชื้อก็ไม่ตาย สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเลี้ยงที่มีความเป็นกรด (pH 4.5) และที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส เชื้อ *B. pseudomallei* ที่พบในสิ่งแวดล้อม มีทั้งพวกที่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสได้ (Arabinose positive) และ ที่ใช้น้ำตาลอะราบิโนสไม่ได้ (Arabinose negative) แต่เชื้อที่แยกจากผู้ป่วยเป็นชนิดที่ใช้น้ำตาลอะราบิโนสไม่ได้ โรคนี้พบบ่อยในประเทศที่อยู่ในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย เวียดนาม เขมร ลาว มาเลเซีย และทางภาคเหนือของประเทศออสเตรเลีย ซึ่งจัดว่าเป็นเขตเมืองร้อนเช่นกัน สำหรับประเทศไทยพบเชื้อในดินและน้ำทั่วประเทศ แต่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบโรคนี้มากที่สุด มีรายงานผู้ป่วย community acquired septicaemia เกิดจากโรคเมลิออยโดสิส ร้อยละ 20 และมีอาการรุนแรง อัตราการตายสูง ร้อยละ 70-80% หลังจากวันที่ 9 กันยายน พ.ศ. 2544 ประเทศสหรัฐอเมริกาได้จัดเชื้อนี้ให้อยู่ในกลุ่ม ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ ทำให้เชื้อนี้มีความสำคัญมาก

ลักษณะทางคลินิกและอาการแสดง

อาการและอาการแสดงของโรคคล้ายคลึงกับโรคอื่นๆ เกิดขึ้นได้กับอวัยวะทุกระบบในร่างกาย ทำให้โรคนี้ได้รับฉายาว่าเป็น "ยอดนักเลียนแบบ" มีความหลากหลาย ทางคลินิกมาก ตั้งแต่การติดเชื้อโดยไม่มีอาการ การติดเชื้อเฉพาะที่ในอวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง หรืออาจเป็นเรื้อรังจนถึงรุนแรง การติดเชื้อเฉียบพลันในกระแสเลือด คล้ายกับการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตในเวลาเพียง 1-3 วัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ ร้อยละ 88 จะมีอาการไข้ และพบร่วมกับอาการสั่นถึงร้อยละ 35.3 นอกจากนั้นจะมีอาการเหมือนอาการติดเชื้อทั่วไป เช่น อ่อนเพลีย ไอแห้งๆ หรือไอมีเสมหะ ในรายที่มีอาการรุนแรงจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับความรู้สึกตัวได้ การติดเชื้อในกระแสเลือด พบได้ร้อยละ 65 ของผู้ป่วยทั้งหมด และอาจพบร่วมกับการติดเชื้อของอวัยวะอื่นๆ ในกรณีของ disseminated septicaemia จะพบการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 ตำแหน่ง พบได้ ร้อยละ 46 สำหรับ non-disseminated septicaemia จะพบการติดเชื้อร่วม 1 ตำแหน่ง และพบได้ ร้อยละ 10 ส่วน primary infection ที่ไม่พบแหล่งติดเชื้อ จากอวัยวะอื่นพบได้ ร้อยละ 9 ผู้ป่วยอาจมีอาการช็อกร่วมด้วย และเสียชีวิตในเวลารวดเร็ว อัตราการตายจากภาวะนี้สูงถึงร้อยละ 60-80 และสูงกว่าการติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญ ปอดอักเสบ เป็นอาการที่พบได้บ่อยที่สุดประมาณ ร้อยละ 50 อาจเป็น primary infection หรือพบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือดก็ได้ ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 70 การติดเชื้อในปอดเป็น community acquired pneumonia ที่พบบ่อยที่สุดในผู้ใหญ่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

สำหรับผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคเมลิออยโดสิส พบว่าทำให้เกิดภาวะต่อมน้ำลาย parotid อักเสบเป็นฝีได้บ่อยมากและจัดเป็นเชื้อสาเหตุของการอักเสบของต่อมน้ำลาย parotid ที่พบได้บ่อยที่สุดถึงร้อยละ 30 ของผู้ป่วยเด็กเมลิออยโดสิส สามารถใช้อาการทางคลินิกนี้เป็นการวินิจฉัยเบื้องต้นสำหรับผู้ป่วยเมลิออยโด

สิสทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในกลุ่มอาชีพที่ต้องสัมผัสกับดิน หรือน้ำ เช่น ชาวนา และชาวสวน เมื่อเกิดต่อมน้ำลาย parotid อักเสบเป็นฝี มักเป็นข้างเดียว บวมและเจ็บร่วมกับมีไข้ มักเกิดในช่วงฤดูฝน พบผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่มากกว่าเด็ก และพบว่าเพศชาย เป็นโรคนี้มากกว่าเพศหญิง

การวินิจฉัยโรคทางคลินิกทำได้ยาก เนื่องจากมีอาการและอาการแสดงที่คล้ายคลึง กับโรคอื่นๆ มากมาย จำเป็นต้องอาศัยลักษณะทางคลินิกข้างต้นและพิสูจน์ว่าเกิดจากเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น เสมหะ หนอง หรือเลือด การย้อมสีแกรมเชื้อ *B. pseudomallei* จะติดสีแกรมลบรูปแท่ง โดยจะติดสีเข้ม ที่ปลายทั้งสองข้าง (bipolar staining) แต่ลักษณะการติดสีดังกล่าวไม่จำเพาะต่อเชื้อนี้ อาจพบ ได้ในพวก *Enterobacteriaceae, Klebsiella, Escherichia coli และ Pasteurella pestis* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องเพาะเชื้อว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* การย้อมสีแกรมมีความไวเพียงร้อยละ 55 การตรวจเพาะเชื้อ โดยทั่วไปต้องใช้เวลาอย่างน้อย 48-72 ชั่วโมงจึงจะทราบผล เชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะโคโลนีที่เหี่ยวย่นเมื่อบ่มไว้ 48 ชั่วโมงขึ้นไป และมีกลิ่นของไอระเหยของดินหลังฝนตก การใช้ Ashdown' selective media จะให้ผลดีกว่า blood agar และ MacConky agar การตรวจทางชีวเคมีด้วย API 20 NE Kit สามารถใช้สำหรับเชื้อได้ สำหรับการตรวจ *B. pseudomallei* ทาง serology ให้ผลรวดเร็วกว่าการเพาะเชื้อ และวิธีที่ใช้กันแพร่หลายในคือ Indirect Haemagglutination test (IHA) แต่การแปลผลค่อยข้างยาก เนื่องจากเนื่องจากพบในคนปกติที่ไม่มีอาการของโรคแต่มีภูมิลำเนาอยู่ในถิ่นที่พบโรคได้บ่อย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

การรักษาโรคเมลิออยโดสิสด้วยยาปฏิชีวนะให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจทั้งๆที่เชื้อไวต่อยาในหลอดทดลอง การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาในหลอดทดลองทั้งการทดสอบด้วยวิธีเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพ ไม่สอดคล้องกับผลการรักษาเสมอไป ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกที่น่าจะมีผลต่อการรักษา เช่น จำนวนของเชื้อรอยโรค การที่ยาออกฤทธิ์เป็นเพียง bacteristatic เป็นต้น นอกจากนั้น การใช้ยารวมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าจะให้ประโยชน์ เพราะผลในหลอดทดลองพบว่ามียาหลายคู่ที่มีฤทธิ์เป็นเพียง indifferent และบางคู่ก็เป็น antagonistic ปัจจุบันมีมีการศึกษาทางคลินิกเรื่องการรักษาด้วยยาร่วมเทียบกับยาเดี่ยว แต่อย่างไรก็ตามการรักษาโรคติดเชื้อในเลือดมีอัตราตายสูงมากนั้น ไม่ได้อาศัยเฉพาะยาต้านจุลชีพเพียงอย่างเดียว เนื่องจากสภาวะพื้นฐานเดิมของร่างกายผู้ป่วยที่แตกต่างกัน การต้องการอุปกรณ์ที่ช่วยในการรักษา และความรวดเร็วในการให้การรักษา ก็มีส่วนสำคัญที่จะช่วยให้การรักษาได้ผลดี ยาที่ใช้ในการักาได้แก่ ยา ceftazidime carbapenem Imipenem และสามารถให้ยา Amoxycillin/cluvalanic acid เป็นยาทางเลือกได้ในรายที่ไม่สามารถใช้ยาอื่นได้หรือในหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อ

เชื้อว่าสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 4 ทางดังนี้

1. ทางผิวหนัง เชื้อเข้าทางบาดแผลที่มากับดิน และน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน
2. ทางเดินหายใจ เกิดจากการหายใจเอาเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในฝุ่นละอองจากดิน ที่ถูกพัดกระจายขึ้นมา นอกจานี้มีรายงานถึงการติดเชื้อจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งเชื่อว่าเชื้อเข้าทางอากาศหายใจเป็นผลเนื่องจากการปั่นเตรียมเชื้อนี้ โดยเชื้อกระจายออกมาจากเครื่อง ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ได้
3. ทางการกิน พบได้ในแพะ และแกะ ที่มีการติดเชื้อบริเวณเต้านม ทำให้เชื้อผ่านออกมาทางน้ำนมได้ แต่จากการทดลองในสัตว์ ยังไม่เป็นที่สรุปแน่ชัด
4. ทางเพศสัมพันธ์ มีรายงานพบเชื้อได้จากต่อมลูกหมากของชายที่เป็น prostatitis และพบว่าภรรยาของผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* สูงมาก โดยไม่มีอาการ

การป้องกัน โรคนี้สามารถป้องกันได้โดยหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับดิน น้ำที่อาจมีเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามถ้าหลีกเลี่ยงไม่ได้ อาจต้องสวมถุงมือ รองเท้ายาง ป้องกัน หรือล้างมือให้สะอาดทันทีทุกครั้งที่มีการสัมผัส ในกรณีที่มีแผลและต้องสัมผัสกับดิน น้ำที่สงสัยควรปิดแผลให้สนิท หรือสวมถุงมือ รองเท้าป้องกัน

ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Beta-lactams

เป็นยาปฏิชีวนะที่มีความสำคัญในการทำลายเชื้อของโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ มีส่วนประกอบของโครงสร้างเป็น four membered beta-lactam ring ซึ่งโครงสร้างนี้มีบทบาทในการทำลายเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างผนังเซลล์ ที่เรียกว่า penicillin binding proteins (PBPs) ทำให้เชื้อจุลชีพถูกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่

1. **Penicillin** จัดเป็นสารที่มี Beta-lactamsm ring เป็นโครงสร้างพื้นฐาน ออกฤทธิ์โดยห้ามการสร้างผนังเซลล์ โดยจับกับ Penicillin-binding-protein ชนิด 1-3 ทำให้ไม่เกิด Transpeptidation จึงไม่มีการสร้าง Peptidoglycan ทำให้มี autolysis ทำให้เซลล์แตก แบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

1.1 Natural penicillins ได้แก่ Penicillin G, Penicillin V ซึ่งยากลุ่มนี้ไม่ทนต่อ Penicillinase แต่จะมีประสิทธิภาพสูงต่อเชื้อแกรมบวกและ Spirochete

1.2 Penicillinase resistant penicillin เช่น Methicillin, Oxacillin ใช้ในแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้าง Penicillinase

1.3 Aminopenicillin ไม่ทนต่อ Penicillinase ได้แก่ Ampicillin และ Amoxicillin ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด

1.4 Extended spectrum penicillins ใช้ได้ผลกับ gram negative โดยรวมถึง *Pseudomonas aeruginosa* เช่น Piperacillin

2. **Cepalosporins** เป็นยาในกลุ่ม Beta-lactam ที่ออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ชนิด PBP1-3 ยาในกลุ่มนี้ทนต่อเอ็นไซม์ Penicillinase ใช้ได้ดีในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ยาในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 4 รุ่น ตามความกว้างในการออกฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบและความทนต่อเอนไซม์ Beta-lactamases ดังนี้

2.1 Frist generation cephalosporins เช่น Cephalothin, Cefazolin ใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมบวกทรงกลมและแกรมลบบางชนิด เช่น *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ Cephalosporinase

2.2 Second generation cephalosporins เช่น Cefuroxime มีประสิทธิภาพดีกว่า Frist generation cephalosporins คือ ทนต่อเอนไซม์ Cephalosporinase ทำให้มีการออกฤทธิ์กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มขึ้น ส่วน Cefoxitin ซึ่งเป็นยาในรุ่น 2 ซึ่งทนต่อ Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) เพราะเป็นยากลุ่ม Cephamycins

2.3 Third generation cephalosporins เช่น Cefpodoxime, Ceftriazone มีประสิทธิภาพดี ใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

2.4 Fourth generation cephalosporins เช่น Cefepime มีฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบกว้างกว่าและทนต่อเอนไซม์ Cephalosporinase ได้ดี

3. **Monobactams** เป็นยาในกลุ่ม Beta-lactams ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแกรมลบทรงแท่งที่ PBP3 ทำให้เซลล์ยืดยาวและตายในที่สุด โดยยากลุ่มนี้ทนต่อการทำลายด้วย Beta-

lactamases เช่น Azteronam การดื้อยา Aztreonam อาจพบในเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่สามารถสร้าง K1 beta-lactamases ไปทำลายยาได้

4. Carbapenems เป็นสารที่มี Beta lactam ring ที่ออกฤทธิ์กว้างโดยยานี้สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีและทนต่อเอ็นไซม์ Beta-lactamases รวมทั้ง ESBLs เช่น Imipenem และ Meropenem

ปัจจุบันมีการพัฒนาสารยับยั้งเอ็นไซม์ Beta-lactamases เรียกว่า Beta-lactamases inhibitor เช่น clavulanic acid, sulbactam ซึ่งมีคุณสมบัติคือเป็นสารที่ทนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ Beta-lactamases โดยจะใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม Beta lactams เนื่องจากสารนี้มีโครงสร้างคล้ายยาในกลุ่ม Beta-lactams สารนี้จึงไปจับกับเอ็นไซม์ Beta-lactamases ทำให้ยา Beta-lactams ออกฤทธิ์ได้

การดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactams (Poole, 2004)

กลไกการดื้อยาในกลุ่มนี้มีหลายสาเหตุ ดังนี้

1. การสร้าง beta-lactamases ส่วนใหญ่พบในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบอื่นๆ เช่น *Acinetobacter spp. Pseudomonas spp.* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์นี้เป็น hydrolytic enzymes ที่ทำลาย amide bond ของ four membered beta-lactam ring แล้วส่งผลให้ยานั้นหมดประสิทธิภาพ โดยแบ่งคุณสมบัติของ beta-lactamases ตามลำดับ amino acid ดังนี้

1.1 Class A enzyme มีความหลากหลายของเอนไซม์ ดังนี้

- Penicillinase พบในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก และเป็นเอนไซม์ที่ย่อยยา Penicillins สามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ด้วย Clavulanic acid
- TEM-1, TEM-2, SHV-1 จัดเป็น restricted spectrum beta-lactamases สามารถย่อยยากลุ่ม Penicillins และ Cephalosporins, และ cephalosporinase สามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ด้วย Clavulanic acid
- Numerous SHV and TEM variants, CTX-M-1 to -28, PER-1 & -2, VEB-1, GES-1, IBC-1, several chromosomal enzymes พบในแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ จัดเป็น extended spectrum beta-lactamases มีคุณสมบัติย่อยยาในกลุ่ม Penicillins, narrow-spectrum and extended –sprectrum cephalosporins, monobactams โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid
- TEM-30 to -41, -44, -45, -51, -54 จัดเป็น inhibitor resistant beta-lactamases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยยาในกลุ่ม Penicillins และ Cephalosporins ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid
- TEM-50, -68, -80 จัดเป็น inhibitor resistant extended sprectrum beta-lactamases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยยาในกลุ่ม Penicillins และ Narrow sprectrum cephalosporins และ extended spectrum cephalosporins กลุ่มที่ low level ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid
- NMC-A, SME-1 to -3, IMI-1, KPC-1 to -3, GES-2, SHV-38 จัดเป็นเอนไซม์กลุ่ม Carbapenemase ย่อยยาในกลุ่ม Penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams และบางครั้งสามารถย่อย extended spectrum beta-lactams ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid

1.2 Class B enzyme ได้แก่ IMP-1 to -13, VIM-1 to -7, SPM-1, และอีกหลายชนิดที่เป็น chromosomal enzymes ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยยาในกลุ่ม beta-lactams ทั้งหมด รวมทั้ง carbapenems และ extended spectrum beta-lactams และ cephalosporins รุ่นที่ 4 เอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid แต่ยับยั้งได้ด้วย EDTA

1.3 Class C enzyme ได้แก่ CMY-2, to -13, LAT-1, MOX-1 & -2, FOX-1 to -6, ACT-1, MIR-1, DHA-1 & -2, ACC-1, CFE-1, และอีกหลายชนิดที่เป็น chromosomal enzymes ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ จัดเป็น expanded spectrum cephalosporinase เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยยาในกลุ่ม penicillins, narrow and extended spectrum cephalosporins, cephamycins และ monobactams เอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid และ EDTA

1.4 Class D enzyme มีหลายชนิด ดังนี้

1.4.1 Numerous OXA variants จัดเป็น narrow spectrum penicillinase สามารถย่อยยา penicillins และ cloxacillin เอนไซม์เหล่านี้อาจจะยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid หรือไม่ก็ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย EDTA

1.4.2 Several OXA-2 & -10 derivatives, OXA-18, -29, -30, -31, -32, -45 จัดเป็น extended spectrum beta-lactamase ซึ่งสามารถย่อยยากลุ่ม penicillins, cloxacillin, extended spectrum beta lactams, และยากลุ่ม monobactams บางตัว หรือ cephalosporins รุ่นที่ 4 เอนไซม์เหล่านี้อาจจะยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid หรือไม่ก็ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย EDTA

1.4.3 OXA-23 to -27, -40, -48, -54 จัดเป็น carbapenemase สามารถย่อยยาในกลุ่ม penicillins, oxacillin และ carbapenems เอนไซม์เหล่านี้ถูกยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid แต่ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA

2. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) เป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์กว้างในการ hydrolyze ยาที่เป็น extended spectrum และ cephalosporins รุ่นที่ 3 เกิดจาก plasmid encode อยู่บน chromosomes บ่อยครั้งที่พบร่วมใน integrons ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นอนุพันธุ์ของ Class A และ Class D beta lactamases และสามารถยับยั้งได้ด้วย beta –lactamases inhibitors โดยทั่วไปได้ พบมากในแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะในวงศ์ Enterobacteriaceae เอนไซม์เหล่านี้มีรายงานพบได้บ่อยในเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* เชื้อที่สามารถสร้าง ESBL จะดื้อต่อยากลุ่ม penicillins, cephalosporins รุ่นที่ 1 และ 2 และ cephalosporins รุ่นที่ 3 กลุ่มที่เป็น oxyimino cephalosporins เช่น cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone และกลุ่ม monobactams เช่น aztreonam เชื้อเหล่านี้ยังคงไวเพียงยา cephamycins, cephalosporins รุ่นที่ 4 เช่น cefepime, cefpirome และ carbapenems แต่อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้ก็รักษาเชื้อที่สร้าง ESBL ได้ประสิทธิภาพได้ผลไม่สม่ำเสมอ หรือมีประสิทธิภาพน้อย และนำมาสู่การรักษาที่ล้มเหลว

ESBL families

ในอดีต Classical ESBL พัฒนามาจากเอนไซม์ class A TEM (จาก TEM-1 หรือ TEM-2) และ SHV (จาก SHV-1) และเป็นชนิดที่พบได้บ่อยในกลุ่มของ ESBL ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบในกลุ่มเอนไซม์ class D ESBL เช่น OXA family ได้บ้าง ปัจจุบันมีรายงานการพบ non-TEM, non-SHV, non-OXA ESBL ในแบคทีเรียหลายชนิดทั่วโลก เช่น families BES, GES, PER, TLA, VEB และ CTX-M กลุ่มที่เป็นอนุพันธุ์ของ TEM, SHV และ OXA ESBLมักเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ในส่วน narrow spectrum counterparts ซึ่งเอนไซม์ ESBL เหล่านี้มักเป็นลักษณะของ plasmid encoded หรือไม่ก็ mobile ทำให้เกิดการดื้อยาอย่างกว้างตามธรรมชาติ ปัจจุบันพบ ESBL families ดังนี้

1. TEM-/SHV-derived ESBLs

TEM- derived type ESBL พัฒนามาจาก TEM-1 และ TEM-2 มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Glu 104, Arg164, Gly238 และ Glu240

SHV- derived type ESBL พบได้บ่อยในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย มีความแตกต่างจาก SHV-1 โดยการแทนที่ glycine ที่ตำแหน่งที่ 238 ด้วย serine และตำแหน่ง Glu240 พบได้ใน Enterobacteriaceae และการระบาดของ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* spp.

ซึ่งการแทนที่ที่ตำแหน่ง Arg164 ใน TEM มักพบร่วมกับการดื้อต่อยา ceftazidime และการแทนที่ที่ตำแหน่ง Gly238 มักดื้อต่อ cefotaxime ในขณะที่การกลายพันธุ์เกิดที่การแทนที่ที่ตำแหน่ง Gly238 และ Glu240 ของ SHV-1 จะพบร่วมกับการดื้อต่อceftazidime และ cefotaxime

2. OXA-type ESBLs

กลุ่มนี้มีการกลายพันธุ์หลายแบบ เช่น OXA-10 derived ESBLs พบบ่อยว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Gly167 ซึ่งจะทำให้ดื้อต่อยา ceftazidime และ ESBL แบบนี้สามารถพบได้ทั้ง plasmid หรือ chromosomal แต่มักไม่พบร่วมใน classical integrons

3. CTX-M ESBLs

กลุ่มนี้เป็น plasmid encoded CTX-M series ปัจจุบันมีไม่น้อยกว่า 37 variants ที่พบทั่วโลกและมักพบในแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

4. Other ESBLs เช่น PER-1, PER-2, VEB-1

Multidrug resistance in ESBL producers

แบคทีเรียที่สามารถสร้าง ESBL ได้สามารถดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam ตั้งแต่ narrow ถึง broad spectrum เป็นผลมาจาก

1. การที่แบคทีเรียมีการสร้าง AmpC หรือ class C cephalosporinase ซึ่งเป็นสำคัญต่อต่อการดื้อยากลุ่ม beta-lactamในแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ มีทั้ง chromosolmal และ plasmid encoded โดย AmpC beta-lactamases พบว่ามีฤทธิ์ต้านต่อ penicillins และ cephalosporins รวมทั้งยาหลายตัวในกลุ่ม oxyiminocephalosporins เช่น cefotaxime, ceftazidime และ cefotetan และยากลุ่ม monobactams แต่ยังคงไวต่อ carbapenems และยาบางตัวใน cephalosporins รุ่นที่ 4 เช่น cefepime, cefpirome

1.1 Chromosomal AmpC beta-lactamases: พบอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceaeและแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่นๆ เกิดจากการใช้ยาในกลุ่ม beta lactam หลายชนิด โดยเฉพาะยาในกลุ่ม cephalosporins และ carbapenems ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC แต่เอนไซม์นี้จะไม่ hydrolyze ยาในกลุ่ม oxyiminocephalosporins และการแสดงออกของ *ampC* ยีนก็มีอิทธิพลต่อ AmpR regulator และ *ampD* ยีน ทำให้เกิดกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว

1.2 Plasmid encoded AmpC beta-lactamases: การที่แบคทีเรียมี plasmid encoded AmpC beta lactamases ทำให้เพิ่มการดื้อต่อยากลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ beta-lactam แบ่งตามลำดับกรดอะมิโน ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1.2.1 Families of plasmid borne AmpC beta-lactamases

1.2.2 Carbapenemases

1.2.3 Class A carbapenemases

1.2.3 Class B metallo- beta-lactamases

1.2.4 Class D oxacillinases with carbapenemase activity

ในส่วนของเชื้อ *B. pseudomallei* ปัจจุบันพบว่าความสามารถในการดื้อยากลุ่ม beta-lactam โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา Ceftazidime มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิด mutation ในยีน beta-latamsae ทั้ง Class A และ Class D beta-lactamase (Sarovich et al. 2012)

การตรวจหาเอนไซม์และยีนเบต้าแลคตาเมส

ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจหา ESBL หลายวิธี ส่วนใหญ่เป็นการตรวจหา ESBL ที่สร้างจาก *Klebsiella* ซึ่งเป็น genus ที่พบ ESBL มากที่สุด และสามารถที่จะนำมาใช้ตรวจ ESBL จากเชื้ออื่นๆ ใน Family Enterobacteriaceae ที่ไม่สร้าง chromosomal beta-lactamase หรือสร้างได้น้อยมาก เช่น *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* วิธีการตรวจหาเอนไซม์ชนิดนี้มีหลายวิธี ได้แก่

1. วิธี Double disc โดยอาศัยหลักว่า ESBL ถูกยับยั้งด้วยสารต้านเบต้าแลคทาเมส

2. วิธี Combination disc ใช้หลักการเดียวกับวิธี disc diffusion โดยเปรียบเทียบ inhibition zone ของแผ่นยาที่มี extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียว กับแผ่นยาที่มี ESC ร่วมกับ clavulanic acid ซึ่งเป็น beta-lactamase inhibitor

3. วิธี dilution ตามวิธีมาตรฐาน broth dilution ของ National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) โดยเปรียบเทียบ MIC ระหว่างหลอดที่ใส่ extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียว กับ MIC ของหลอดที่ใส่ ESC ร่วมกับ clavulanic acid โดยหลักการเช่นเดียวกับวิธี combination disc

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่วันที่ 1 เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง วันที่ 31 เดือนพฤษภาคม 2554 วินิจฉัยเป็น *B. pseudomallei* โดยการทดสอบทางชีวเคมีและทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันกับ polyclonal และ monoclonal antibodies

เลือก Antimicrobial Agents สำหรับทดสอบ MIC และ standard disc diffusion ดังนี้ ceftazidime, ceftazidime+clavulanic acid, ceftriaxone, imipenem, cefoparazone, cefoparazone+sulbactam, cefotaxime และ aztreonam

การทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาปฏิชีวนะ

วิธี Standard disc diffusion

เตรียมเชื้อโดยเพาะเลี้ยงบน Ashdown's agar และเลือก 1 โคโลนี เลี้ยงใน Tryticase soy broth (Hardy Diagnostics Criterion, Santa Maria, USA,) แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ 37 °C 24 ชั่วโมง และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเตรียมเชื้อให้เป็น mid-log phase โดยดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร (ml) ลงใน TSB 50 ml และนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อ และป้ายลงบนอาหาร Mueller Hinton agar (Hardy Diagnostics) จากนั้นวาง paper disc ของยาปฏิชีวนะ (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) นำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ paper disc (inhibition zone) ควบคุมคุณภาพการทดลองโดยทดสอบยากับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 วัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ paper disc สำหรับยา ceftazidime (30 µg) อยู่ในช่วง 25-32 มิลลิเมตร (mm) ยา Cefoperazone (75 µg) อยู่ในช่วง 28-34 มิลลิเมตร ยา Imipenem (10 µg) อยู่ในช่วง 26-32 มิลลิเมตร ยา Ceftriaxone (30 µg) อยู่ในช่วง 29-35 มิลลิเมตร ยา Aztreonam (30 µg) อยู่ในช่วง 28-36 มิลลิเมตรโดย และยา Cefotaxime (30 µg) อยู่ในช่วง 29-35 มิลลิเมตร โดยใช้เกณฑ์การแปลผลตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement ดังนี้

เกณฑ์	Resistant	Intermediately susceptible	Susceptible
Ceftazidime	≤ 14 mm	15-17 mm	≥18 mm
Cefoperazone	≤ 15 mm	16-20 mm	≥21 mm
Imipenem	≤ 13 mm	14-15 mm	≥16 mm
Ceftriaxone	≤ 13 mm	14-20 mm	≥21mm
Aztreonam	≤ 15 mm	16-21 mm	≥22 mm
Cefotaxime	≤ 14 mm	15-22 mm	≥23 mm

วิธี MIC

ทดสอบ MIC โดยใช้ชุดทดสอบของ Sensititre Non-Fermenter plate (TREK Diagnostic systems, Biosciences Inc., Magellan, USA) ที่มีความเข้มข้นของยา ceftazidime ที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 1-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบโดยเลี้ยงใน Ashdown's agar และเลือก 3-5 โคโลนีเขี่ยลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ml แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นดูดมา 10 ไมโครลิตร (µL) ใส่ลงไปในหลอดที่มี Mueller Hinton broth with N-tris(hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid; 2-(2-[hydroxy-1,1-bis (hydroxymethyl)ethyl]amino)ethane sulfonic acid, $C_6H_{15}NO_6S$ (TES) buffer 11 ml ผสมให้เข้ากันดี ดูดเชื้อมา 50 µL ใส่ลงไปใน Sensititre Non-Fermenter plate แล้วนำไปบ่ม 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผล ถ้าหลุมที่มีเชื้อขึ้นจะเห็นการตกตะกอนของเซลล์เป็นกระดุมอยู่ก้นหลุม อ่าน MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการตกตะกอน โดยมีหลุม positive ซึ่งพบตะกอนเซลล์ในหลุม และ negative control ซึ่งไม่พบตะกอนเซลล์ในหลุม Reference strain เป็น *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยมีค่า Ceftazidime MIC 1-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Cefoperazone MIC 2-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Imipenem MIC 1-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Ceftriaxone MIC 8-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Aztreonam MIC 2-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Cefotaxime MIC 8-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เกณฑ์การแปลผลตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement ดังนี้

เกณฑ์	Resistant	Susceptible
Ceftazidime	≥ 32 µg/ml	≤ 8 µg/ml
Cefoperazone	≥ 64 µg/ml	≤ 16 µg/ml
Imipenem	≥ 16 µg/ml	≤ 4 µg/ml
Ceftriaxone	≥ 64 µg/ml	≤ 8 µg/ml
Aztreonam	≥ 32 µg/ml	≤ 8 µg/ml
Cefotaxime	≥ 64 µg/ml	≤ 8 µg/ml

วิธีทดสอบ Combination disc

การทดสอบ: นำเชื้อที่เจือจางแล้วประมาณ 10^5 CFU/ml อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryticase soy broth มาป้ายลงบน Muller Hinton agar plate โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปใน Tryticase soy broth บิดมาดแล้วป้ายให้ทั่ว Muller Hinton agar plate แล้ววางแผ่นยาดังนี้

Ceftazidime และ ceftazidime+clavulanate สำหรับทดสอบ Combination disc ของ ceftazidime และ ceftazidime+ betalactam inhibitor

Cefoparazone และ cefoparazone+sulbactam สำหรับทดสอบ Combination disc ของ cefoparazone และ cefoparazone + betalactam inhibitor

และนำไปบ่มที่ 37^{o}C 24 ชั่วโมง อ่านผล inhibition zone ของแผ่นยาโดยแผ่นยาที่มี betalactam inhibitor กว้างกว่าที่ไม่มี betalactam inhibitor ≥ 5 mm แสดงว่าเชื้อสร้าง ESBL

การออกแบบไพรเมอร์

1.1. Mapping ลำดับเบสของยีน ESBL กลุ่ม A B C และ D จาก NCBI database ของ *B. pseudomallei* โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* spp. ชนิดอื่น ๆที่มีรายงานวิจัยมาก่อนโดยเป็นข้อมูลแบบ plasmid encoding database เช่น *Klebsiella pneumonia, Escherichia coli* ดังนี้

1.1.1. ตรวจหายีน ESBL ที่เป็นเป้าหมายได้แก่ Class A-D ซึ่งเป็น ESBL producing genes จากจีโนมของ *B. pseudomallei*

1.1.1.1. ยีน ESBL เป้าหมายถูกเริ่มกระบวนการผ่าน accession number ของ Swiss-Prot

1.1.1.2. ค้นหา accession number จาก Entrez Protein website

1.1.1.3. ลำดับของกรดอะมิโนถูกกระจายออกมาด้วย tBLASTn ซึ่งเป็นเครื่องมือหนึ่งใน BLAST tool search

1.1.1.4. ตำแหน่งเริ่มและหยุดของยีน ESBL ที่สนใจจากจีโนมของ *B. pseudomallei* ถูกกระจายออกมาด้วย VIVEX's EXTRACTSEQ

1.1.1.5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกกระจายออกดังกล่าวถูกแปลรหัสด้วย EMBOSS และทราบ Genbank accession number ของ ESBL ที่ต้องการ

1.1.1.6. ใช้ CLUSTALW สำหรับ multiple sequence alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ใส่เข้าไปซึ่งเป็น ESBL ที่สนใจกับ *Enterobacteriaciae*spp. ตัวอื่น ๆ

1.1.2. ตรวจวัดตำแหน่งของยีนที่ยังไม่เคยถูกศึกษาใน *B. pseudomallei* (กรณีไม่เคยพบจากข้อมูลแบคทีเรียตัวอื่น)

1.1.2.1. ใส่ keyword ค้นหาสำหรับยีนที่สนใจจาก Entrez, Genbank/ Swiss-Prot/ TrEMBL (ExPASY website)

1.1.3. ศึกษาตามลำดับแบบขั้นตอนที่1.1.1

1.1.3.1. บ่งบอกและวิเคราะห์ผลการศึกษาในการศึกษายีนที่สนใจ (Gene of interest) ได้แก่ ESBLs ของกลุ่มต่าง ๆ (A-D)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

Mann-Whitney test

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการทดลองโครงการย่อยที่ 1

ผลการทดลองยา Ceftazidime ด้วย Standard disc diffusion และข้อมูลผู้ป่วย

จากการเก็บข้อมูลผู้ป่วยที่ผลการเพาะเชื้อพบ *B. pseudomallei* ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนพฤษภาคม 2554 มีจำนวน 85 isolates จากผู้ป่วย 78 ราย แหล่งที่พบส่วนใหญ่มาจากเลือด ร้อยละ 71 รองลงมาเป็นหนองที่ได้จากอวัยวะต่างๆเช่น ตับ ไต ปอด (ร้อยละ15) เสมหะ (ร้อยละ11) และปัสสาวะ (ร้อยละ 3) ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยา ceftazidime ด้วยวิธี standard disc diffusion พบว่า *B. pseudomallei* ร้อยละ 97.64 ไวต่อยา ceftazidime และ intermediately susceptible ร้อยละ 2.35 โดยมีช่วงของโซนใสรอบๆแผ่นยา ตั้งแต่ 15-33 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 90) มีขนาดโซนใสรอบๆแผ่นยามากกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร ผลการทดสอบ MIC ด้วยยา ceftazidime ไว ร้อยละ 98.82 มีค่า MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 isolates MIC 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 58 isolates MIC 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 isolates MIC 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 isolates และ MIC 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 isolate จากการทดสอบผลของวิธี MIC และวิธี standard disc diffusion ด้วย Mann-Whitney test พบว่าผลการทดสอบของทั้งสองวิธีไม่สัมพันธ์กัน ($p = 0.125$)

ในจำนวนผู้ป่วย 78 รายได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จำนวน 66 ราย และไม่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จำนวน 12 ราย ประกอบด้วย ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อนให้ยาจำนวน 3 รายและผลการทดสอบ MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แพทย์ส่งตัวไปรักษาต่อที่โรงพยาบาลชุมชน จำนวน 2 ราย ไม่สมัครใจรับบริการขอกลับบ้าน จำนวน 6 ราย และได้รับยา cotrimoxazole และ doxyclycline กลับไปรับประทานต่อที่บ้าน จำนวน 1 ราย ในจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับยา ceftazidime ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ทั้ง 66 รายพบว่า หลังจากที่ได้รับ ceftazidime แล้ว เสียชีวิต จำนวน 9 ราย ผลการทดสอบ MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 7 isolates และ MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 isolates ในจำนวนนี้เสียชีวิตหลังให้ยา ceftazidime ไปเพียง 1 วัน โดยได้รับยาขนาด 2 กรัมวันละครั้ง จำนวน 6 ราย มีผู้ป่วยตอบสนองต่อยาดี หายจากโรคและแพทย์อนุญาตให้กลับบ้านได้ จำนวน 20 ราย (ร้อยละ 30.31) กลุ่มนี้เชื้อมีค่า MIC 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 isolates และ MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 isolates และหลังจากได้รับยา ceftazidime แล้วอาการไม่ดีขึ้นจำนวน 46 ราย (ร้อยละ 69.69) ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้ไม่สมัครใจอยู่ต่อขอกลับบ้าน จำนวน 16 ราย (ร้อยละ 24.24) และเสียชีวิต จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 4.54) (ตารางที่ 1) และแพทย์เปลี่ยนยาเป็นยา imipenem หรือ meropenem จำนวน 27 ราย (ร้อยละ 40.91) หลังจากเปลี่ยนยาแล้วผู้ป่วยอาการดีขึ้น จำนวน 8 ราย แพทย์ส่งกลับไปรักษาต่อที่โรงพยาบาลชุมชน 5 ราย เสียชีวิต 5 ราย และปฏิเสธการรักษา 9 ราย โดยผลการทดลองต่อยาอื่นแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่1 ผลการทดสอบ Susceptibility test ด้วย standard disc diffusion ของยา Ceftazidime, Cefoperazone, Imipenem, Ceftriazone, Aztreonam และ Cefotaxime

รหัสเชื้อ	Ceftazidime	Cefoperazone	Imipenem	Ceftriazone	Aztreonam	Cefotaxime
B 023	27	21	31	20	20	22
B 038	25	20	30	19	16	28
B 040	25	20	30	19	15	25
B 043	24	20	30	13	15	22
B 044	21	20	32	21	19	22
B 046	25	21	30	18	16	25
B 048	26	21	31	19	18	25
B 049	26	20	30	20	18	25
B 050	26	23	32	22	20	29
B 051	24	15	30	19	15	25
B 056	20	15	31	20	18	18
B 057	23	18	29	19	17	25
B 058	24	20	30	18	17	20
B 059	15	15	33	16	13	20
B 060	22	20	32	20	18	21
B 061	25	22	25	18	16	25
B 063	28	25	28	18	14	23
B 064	19	11	8	20	0	27
B 065	26	23	40	15	17	25
B 066	24	23	28	15	14	19
B 067	22	24	28	17	17	25
B 074	27	21	33	20	18	22
B 076	25	20	31	20	18	23
B 081	25	22	30	18	16	25
B 082	26	22	32	17	10	24
B 083	28	25	22	20	18	25
B 085	24	15	30	13	8	17
B 087	27	22	30	18	13	22
B 088	25	23	28	17	14	25
B 089	24	22	30	16	13	21
B 095	22	22	28	19	16	29
B 097	23	23	30	19	17	24
B 098	21	20	30	20	19	26

B 101	23	20	31	17	15	21
B 102	21	21	26	16	15	26
B 103	22	19	27	18	15	25
B 104	23	19	25	18	12	23
B 105	23	19	25	14	12	23
B 111	22	16	28	20	18	23
B 113	21	17	30	17	11	27
B 114	21	20	25	17	15	22
B 116	21	19	28	20	18	27
B 117	21	20	28	20	18	27
B 119	21	20	28	14	15	25
B 120	20	20	26	18	14	26
B 121	21	20	32	17	15	27
B 123	23	19	19	0	0	24
B 126	20	19	37	20	17	22
B 128	22	20	40	18	17	26
B 129	20	19	33	20	20	24
B 130	20	17	32	19	15	22
B 131	23	20	32	21	15	24
B 132	21	20	30	22	18	24
B 133	19	19	32	18	15	20
B 137	22	18	34	16	12	23
B 138	21	20	28	15	13	25
B 139	18	18	30	19	12	22
B 141	23	19	32	18	16	22
B 142	20	18	32	18	15	23
B 143	20	0	15	0	0	20
B 145	21	19	19	31	16	25
B 146	21	20	30	20	18	26
B 147	22	20	32	18	15	25
B 148	20	18	32	17	13	26
B 149	21	20	30	18	17	23
B 152	27	20	30	17	14	20
B 157	25	21	31	20	16	24
B 158	27	20	32	23	19	26
B 165	26	21	38	21	19	24
B 168	22	18	33	17	12	18

B 170	20	18	38	25	26	21
B 171	22	19	35	25	20	27
B 172	22	17	37	28	26	27
B 175	25	20	37	21	20	23
B 176	24	20	38	23	18	25
B 177	17	12	35	22	13	21
B 179	23	20	33	20	14	20
B 180	22	20	33	20	13	20
B 182	24	19	35	20	14	22
B 186	25	21	39	24	22	26
B 188	21	22	36	21	20	25
B 189	25	20	35	22	17	22
B 255	19	24	32	18	20	22
B 265	30	24	40	21	22	24
B 273	33	25	35	22	17	23

Ceftazidime ให้ผล Intermediately susceptible (I) จำนวน 2 isolates และ Susceptible (S) จำนวน 83 isolates

Cefoperazone ให้ผล Resistant (R) จำนวน 7 isolates, Intermediately susceptible (I) จำนวน 52 isolates และ Susceptible (S) จำนวน 26 isolates

Imipenem ให้ผล Resistant (R) จำนวน 1 isolates, Intermediately susceptible (I) จำนวน 1 isolates และ Susceptible (S) จำนวน 83 isolates

Ceftriaxone ให้ผล Resistant (R) จำนวน 4 isolates, Intermediately susceptible (I) จำนวน 63 isolates และ Susceptible (S) จำนวน 18 isolates

Aztreonam ให้ผล Resistant (R) จำนวน 39 isolates, Intermediately susceptible (I) จำนวน 42 isolates และ Susceptible (S) จำนวน 4 isolates

Cefotaxime ให้ผล Intermediately susceptible (I) จำนวน 29 isolates และ Susceptible (S) จำนวน 56 isolates

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง Combination disc ของ ceftazidime, Cefoperazone และ betalactam inhibitor

รหัสเชื้อ	CTZ	CTZ+inhibitor	ผลต่าง	CFP	CFP+inhibitor	ผลต่าง
B 023	27	30	3	21	26	5
B 038	25	30	5	20	23	3
B 040	25	27	2	20	23	3
B 043	24	28	3	20	23	3
B 044	21	23	2	20	23	3
B 046	25	29	3	21	25	4
B 048	26	31	5	21	26	5
B 049	26	29	3	20	26	6
B 050	26	26	0	23	28	5
B 051	24	25	1	15	18	3
B 056	20	24	4	15	18	3
B 057	23	23	0	18	22	4
B 058	24	26	2	20	24	4
B 059	15	20	5	15	23	8
B 060	22	25	3	20	23	3
B 061	25	29	4	22	29	7
B 063	28	30	2	25	28	3
B 064	19	22	3	11	19	8
B 065	26	30	4	23	29	6
B 066	24	26	2	23	29	6
B 067	22	29	7	24	29	5
B 074	27	30	3	21	28	7
B 076	25	30	5	20	25	5
B 081	25	30	5	22	28	6
B 082	26	30	4	22	28	6
B 083	28	29	1	25	31	6
B 085	24	30	6	15	24	9
B 087	27	29	2	22	28	6
B 088	25	29	4	23	28	5
B 089	24	27	3	22	26	4
B 095	22	22	0	22	26	4
B 097	23	24	1	23	30	7
B 098	21	25	4	20	28	8
B 101	23	25	2	20	23	3

B 102	21	23	2	21	25	4
B 103	22	23	1	19	22	3
B 104	23	23	0	19	24	5
B 105	23	25	2	19	23	4
B 111	22	24	2	16	22	6
B 113	21	23	2	17	23	5
B 114	21	25	4	20	22	2
B 116	21	25	4	19	22	3
B 117	21	22	1	20	24	4
B 119	21	21	0	20	25	5
B 120	20	21	1	20	23	3
B 121	21	23	2	20	25	5
B 123	23	24	1	19	25	6
B 126	20	22	2	19	25	6
B 128	22	23	1	20	24	4
B 129	20	23	3	19	24	5
B 130	20	22	2	17	22	5
B 131	23	25	2	20	25	5
B 132	21	23	2	20	23	3
B 133	19	20	1	19	21	2
B 137	22	23	1	18	24	6
B 138	21	23	2	20	25	5
B 139	18	20	2	18	22	4
B 141	23	26	3	19	24	5
B 142	20	23	3	18	23	5
B 143	20	24	4	0	14	5
B 145	21	24	3	19	25	6
B 146	21	24	3	20	24	4
B 147	22	24	2	20	23	3
B 148	20	21	1	18	23	5
B 149	21	22	1	20	25	5
B 152	27	28	1	20	27	7
B 157	25	30	5	21	29	8
B 158	27	30	3	20	26	6
B 165	26	30	4	21	26	5
B 168	22	24	2	18	25	7
B 170	20	24	4	18	22	4

B 171	22	23	1	19	23	4
B 172	22	26	4	17	24	7
B 175	25	28	3	20	25	5
B 176	24	25	1	20	26	6
B 177	17	18	1	12	17	5
B 179	23	25	2	20	26	6
B 180	22	25	3	20	25	5
B 182	24	26	2	19	26	7
B 186	25	27	2	21	26	5
B 188	21	23	2	22	26	4
B 189	25	26	1	20	24	4
B 255	19	30	1	24	28	4
B 265	30	31	1	24	30	6
B 273	33	34	1	25	30	5

CTZ: Ceftazidime, CTZ+inhibitor: Ceftazidime+Clavulanic acid, CFP: Cefoparazone, CFP+inhibitor: Cefoperazone+Sulbactam

Ceftazidime +Betalactam inhibitor **ที่มี inhibition zone มากกว่า** Ceftazidime เกินกว่า 5 mm **มีจำนวน** 8 isolates

Cefoperazone +Betalactam inhibitor **ที่มี inhibition zone มากกว่า** Cefoperazone เกินกว่า 5 mm **มีจำนวน** 52 isolates

ตารางที่ 3 ผลการทดลอง MIC ของยา Ceftazidime, Cefoperazone, Imipenem, Ceftriazone, Aztreonam และ Cefotaxime

รหัสเชื้อ	Ceftazidime	Cefoperazone	Imipenem	Cefotaxime	Ceftriaxone	Aztreonam
B 023	2	32	≤1	≤4	≤4	16
B 038	≤ 1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 040	≤ 1	16	4	≤4	≤4	16
B 043	2	≤4	4	≤4	≤4	16
B 044	2	32	≤1	32	32	16
B 046	2	32	≤1	≤4	32	16
B 048	2	≤4	4	≤4	8	≤2
B 049	≤ 1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 050	≤ 1	16	≤1	≤4	32	16
B 051	16	16	≤1	≤4	≤4	16
B 056	2	16	≤1	≤4	8	≥16

B 057	≤ 1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 058	2	16	≤1	≤4	8	≥16
B 059	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 060	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 061	2	16	≤1	32	≤4	16
B 063	2	32	≤1	≤4	8	16
B 064	8	≥32	≤1	32	8	≥16
B 065	2	16	≤1	32	≤4	16
B 066	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 067	4	16	≤1	≤4	≤4	16
B 074	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 076	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 081	2	32	≤1	≤4	8	16
B 082	2	≥32	≤1	8	8	16
B 083	≤1	≥32	≤1	≤4	≤4	16
B 085	4	32	≤1	8	8	≥16
B 087	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 088	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 089	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 095	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 097	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 098	≤1	8	≤1	8	4	8
B 101	2	32	≤1	8	8	≥16
B 102	2	32	≤1	≤4	≤4	≥16
B 103	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 104	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 105	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 111	2	16	≤1	≤4	≤4	8
B 113	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 114	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 116	2	32	≤1	8	≤4	≥16
B 117	2	16	≤1	≤4	8	16
B 119	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 120	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 121	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 123	≤1	16	≤1	≤4	8	16
B 126	2	16	1	≤4	≤4	16

B 128	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 129	2	32	≤1	≤4	8	16
B 130	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 131	2	16	≤1	≤4	8	16
B 132	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 133	≤1	16	≤1	4	≤4	16
B 137	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 138	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 139	2	16	≤1	≤4	≤4	≥16
B 141	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 142	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 143	8	≥32	≤1	32	16	≥16
B 145	2	16	≤1	≤4	≤4	8
B 146	2	32	≤1	≤4	8	16
B 147	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 148	2	16	≤1	≤4	8	16
B 149	≤1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 152	2	32	≤1	≤4	8	≥16
B 157	2	8	≤1	≤4	≤4	8
B 158	2	16	≤1	≤4	≤4	8
B 165	≤1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 168	2	16	≤1	≤4	8	≥16
B 170	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 171	≤1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 172	≤1	32	≤1	≤4	8	≥16
B 175	≤1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 176	2	16	≤1	≤4	32	8
B 177	4	≥32	≤1	32	≥32	≥16
B 179	2	16	≤1	≤4	≤4	16
B 180	≤1	16	≤1	≤4	≤4	8
B 182	≤1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 186	≤1	16	≤1	≤4	≤4	8
B 188	≤1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 189	≤1	16	≤1	≤4	≤4	16
B 255	8	≥32	≤1	≥32	≥32	≥16
B 265	≤1	16	≤1	≤4	≤4	8
B 273	2	16	≤1	≤4	8	16

Ceftazidime ให้ผล Susceptible (S) จำนวน 84 isolates และ MIC 16 µg/ml จำนวน 1 isolate
Cefoperazone ให้ผล Susceptible (S) จำนวน 58 isolates MIC 32 µg/ml จำนวน 21 isolates และ MIC ≥32 µg/ml จำนวน 6 isolates
Imipenem ให้ผล Susceptible (S) จำนวน 85 isolates
Ceftriaxone ให้ผล Susceptible (S) จำนวน 78 isolates MIC 16 µg/ml จำนวน 1 isolate MIC 32 µg/ml จำนวน 4 isolates และ MIC ≥32 µg/ml จำนวน 2 isolates
Aztreonam ให้ผล Susceptible (S) จำนวน 10 isolates MIC 16 µg/ml จำนวน 53 isolates และ MIC ≥16 µg/ml จำนวน 22 isolates
Cefotaxime ให้ผล Susceptible (S) จำนวน 78 isolates MIC 32 µg/ml จำนวน 6 isolates และ MIC ≥32 µg/ml จำนวน 1 isolate

ผลการทดลองโครงการย่อยที่ 2
การออกแบบไพรเมอร์
ESBL producing *B. pseudomallei* : Using bioinformatic tools
Class A:
For ESBL penA Burkholderia only

1. Retreive FASTA format from NCBI by search for **ESBL penA Burkholderia**

   NC_006349.2_Burkholderia mallei ATCC 23344 chromosome 2
   NC_006351.1_Burkholderia pseudomallei K96243 chromosome 2
   NC_011001.1_Burkholderia cenocepacia J2315 chromosome chromosome 2

2. Use available **Multalin version 5.4.1** and load all three FASTA format to **get consensus conserve** region by clicks Alignment and tree description (rfd)
3. Copy the conserve sequence and paste into available tool for primer design called **Primer3**
4. Select the first primer predicting as shown below

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR ESBL penA Burkholderia:
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm      gc%    any    3'  seq
LEFT PRIMER        271   19   60.61    57.89   8.00  0.00  GTTCTGCAGCACGTCCAAG
RIGHT PRIMER       469   21   59.92    57.14   4.00  2.00  GGAGTTGTCGCTGTACTGGAG
SEQUENCE SIZE: 941
INCLUDED REGION SIZE: 941

PRODUCT SIZE: 199, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

    1 ATGACCTACTCATCGATGCGTCGTTCCCCGTTGCTGGCCGCCGCGACGGCGCCGCTCGTT

   61 CTCACCGCCGCCGCGTCCGCCCCGCGGCTGGCCGCGGCGCCGGCCCCGGCCGCGGCGGCA

  121 GCGGCGGCCGCCGCGGATGCCGTCGCCCCCGCCGCGGCGGCAGCGGCGCTCGCCGATCTC

  181 GAGCGCGACGCGCGGCGGCCGCCTCGGCGTCGGCGCGCTCGACACCGCGACCGGCCCGCG

  241 CATCGCGCATCGCGCCGGCGAGCGCTTCCCGTTCTGCAGCACGTCCAAGGCGATGCTGTG
                                      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>

  301 CGCGGCGGTCCTCGCGCGCAGCGCCGGCCGGCCGGCCCTGCTGCAGCGGCGCGTGGCGTA

  361 CGCCAAGGCCGACCTCGTCCGCTATTCGCCGGTCTCCGAGCAGCACGTCGGCGCCGGCAT

  421 GACCGTGGCCGCGCTGTGCGCGGCGACGCTCCAGTACAGCGACAACTCCGCCGCGAACCT
                                  <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

Class D:

For ESBL Oxa Burkholderia pseudomallei

1. Retreive FASTA format from NCBI by search for **ESBL SHV Burkholderia**

   NC_006351.1_Burkholderia pseudomallei K96243 chromosome 2, complete sequence
   NC_007435.1_Burkholderia pseudomallei 1710b chromosome chromosome II
   NC_009078.1_Burkholderia pseudomallei 1106a chromosome chromosome II
2. Use available **Multalin version 5.4.1** and load all three FASTA format to **get consensus conserve** region by clicks Alignment and tree description (rfd)
3. Copy the conserve sequence and paste into available tool for primer design called **Primer3**

   Select the first primer predicting as shown below

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR ESBL Oxa Burkholderia pseudomallei:

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm      gc%    any    3'  seq
LEFT PRIMER        305   20   60.14    50.00   6.00  1.00  TCGCGATGTTCAAGAGTCAG
RIGHT PRIMER       527   20   60.61    50.00   4.00  0.00  GCTCGACGGATACGATTTTG
SEQUENCE SIZE: 1422
INCLUDED REGION SIZE: 1422

PRODUCT SIZE: 223, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

   1 GTGCCGGCAGCCGGCGCGGGAAGGACGAGAGCGGATCGGCTGCTAGCCGATCCGTTTTGC

  61 TTTTCGGGCCTCGCCCGCGGCGCGGCGACGATCGTTCTCGTCGCCCGCGTACTTGTTCGC

 121 AAGCTTTCCGTTTGCCATAATGCCTCGCCGATCACGCGAGCCCGCGCCATGCCTTTTTCG

 181 GATCGACCGGCGTTTCAGGCGCATGCGTTCGATCCCGATCGCGCGAATGCCGTGTGCCGC

 241 GCCGTCGCGTTTGTGGGGAGAAAGCGCTCGCGGGCGGCTTCCTGGCTTGACGACCCTTCC

 301 CGATTCGCGATGTTCAAGAGTCAGCAGTTCATCGCCGCGATGTGGCTCTCGCCGGGCTGC
     >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

 361 TGCATCGTTTTCGCCGCCGCGCGTCGCTCAATTCGCCGCTGCCGCCGAGACAGGACGCATG

 421 GGCCAACAAGACGGGCTCGACGAACGGCTTCTCGGCGTATGTGGCGTTCGTGCCGTCGAA

 481 GAGGATCGGCGTCGTGATTCCGGCGAACAAAATCGTATCCGTCGAGCGAACGAGTGGCGG
                                  <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

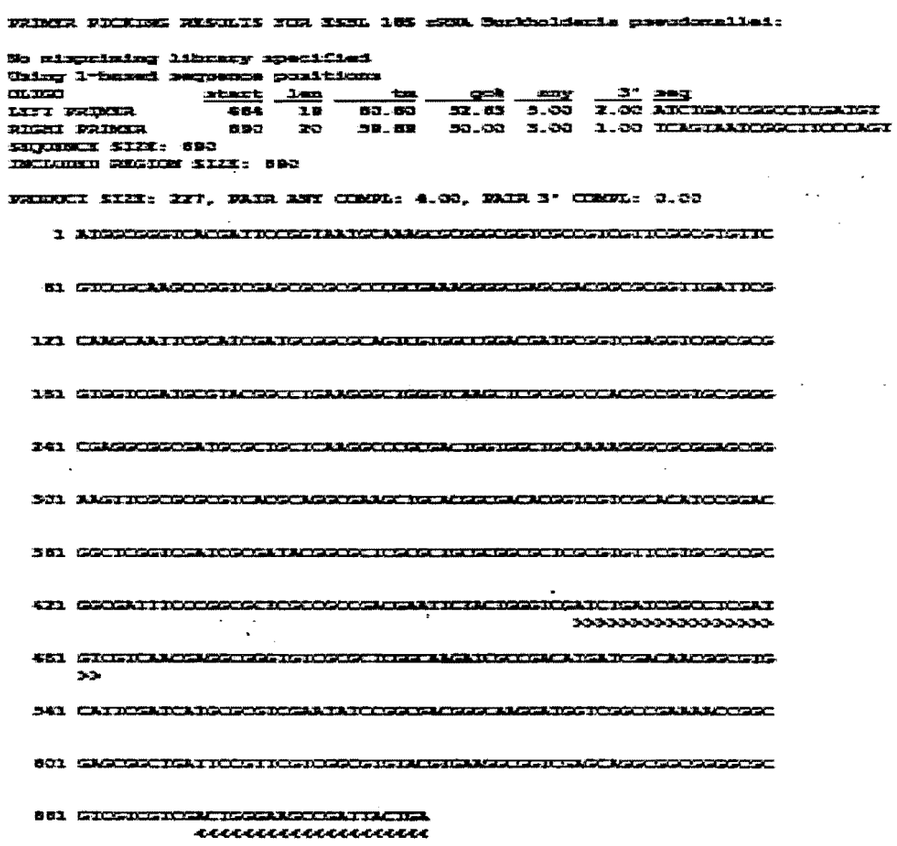
16S rRNA *Burkholderia pseudomaalei:*

For ESBL Bacterial positive control strain

1. Retreive FASTA format from NCBI by search for 16S rRNA Burkholderia pseudomallei

   NC_006350.1_Burkholderia pseudomallei K96243 chromosome chromosome 1
   NC_007434.1_Burkholderia pseudomallei 1710b chromosome chromosome I
   NC_009074.1_Burkholderia pseudomallei 668 chromosome I
   NC_009076.1_Burkholderia pseudomallei 1106a chromosome I
   NC_012695.1_Burkholderia pseudomallei MSHR346 chromosome I
2. Use available Multalin version 5.4.1 and load all five FASTA format to get consensus conserve region by clicks Alignment and tree description (rfd)
3. Copy the conserve sequence and paste into available tool for primer design called Primer3

Select the first primer predicting as shown below



ตารางที่ 4 Primers ที่ออกแบบโดยชีวสารสนเทศ

Gene	3'→ 5' sequence	Tm (°C)	Product Size (bp)
ESBL penA F	GTT CTG CAG CAC GTC CAA G	60.61	199
ESBL penA R	GGA GTT GTC GCT GTA CTG GAG	59.92	
ESBL Oxa F	TCG CGA TGT TCA AGA GTC AG	60.14	223
ESBL Oxa R	GCT CGA CGG ATA CGA TTT TG	60.61	
16s rRNA F	ATC TGA TCG GCC TCG ATG T	60.60	227
16s rRNA R	TCA GTA ATC GGC TTC CCA GT	59.69	

ผลการทดลองโครงการย่อยที่ 3

ผลการตรวจหายีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ K584 และ K386 เป็น positive control และ E908 เป็น negative control ผลการทดลองในแต่ละไพรเมอร์เป็นดังนี้

ไพรเมอร์

ESBL Oxa F	TCG CGA TGT TCA AGA GTC AG
ESBL Oxa R	GCT CGA CGG ATA CGA TTT TG

พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 85 isolates มียีน Oxa (oxacillinase) group of beta-lactamases (Class D) มีค่า Crossing points (CP) อยู่ระหว่าง 11.62-16.82

ไพรเมอร์

ESBL penA F	GTT CTG CAG CAC GTC CAA G
ESBL penA R	GGA GTT GTC GCT GTA CTG GAG

พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 79 isolates มียีน penA มีค่า Crossing points (CP) อยู่ระหว่าง 15.26-24.93 โดยเชื้อ 6 isolates ที่ไม่พบ penA ได้แก่ B088, B101, B102, B103, B105, B111

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนพฤษภาคม 2554 จำนวน 85 isolates จากผู้ป่วยจำนวน 78 ราย ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Standard disc diffusion พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมีความไวต่อยา ceftazidime ร้อยละ 97.44 และมีค่า MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 23.52 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 68.23 ในจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 78 รายได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime จำนวน 66 ราย ผู้ป่วยหายจากโรคและแพทย์อนุญาตให้กลับบ้านได้ จำนวน 20 ราย และผู้ป่วยจำนวน 46 ราย ที่ได้รับยา ceftazidime แล้วอาการไม่ดีขึ้น แพทย์เปลี่ยนยารักษาเป็นยาในกลุ่มที่แรงขึ้น บางส่วนไม่สมัครใจรับการรักษาต่อและบางส่วนเสียชีวิต จากข้อมูลเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าแม้ว่าผลการทดสอบความไวของยา ceftazidime ในหลอดทดลองทั้งการทดสอบด้วย Standard disc diffusion และการศึกษา MIC จะเห็นว่ายาสามารถยับยั้งเชื้อได้ดี แต่ผู้ป่วยร้อยละ 69.69 ที่พบว่าผลการรักษาไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบความไวทางห้องปฏิบัติการ ถึงแม้ว่า ceftazidime จัดเป็นยา third generation cephalosporin ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้กว้างในการต่อต้านแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และมีฤทธิ์ต่อต้าน *Pseudomonas aeruginosa* ยามีฤทธิ์ bactericidal และออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจับกับ penicillin-binding protein (PBP) และการกระตุ้นเอนไซม์ autolysin ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายตัวเอง[7] อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษา Minimum bactericidal concentration (MBC) เพื่อดูว่ายาสามารถฆ่าเชื้อได้ดีหรือไม่ต่อไป ปัจจัยที่มีผลต่อการให้ ceftazidime แล้วไม่ได้ผลน่าจะมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเมื่อนำมาทดสอบความไวให้ผลการทดสอบที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่ในร่างกายผู้ป่วยอาจมีเพียงบางเซลล์ที่ดื้อ[8] ต่อ ceftazidime ที่รอดจากการถูกฆ่าด้วยยาแล้วมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบ binary fission นำมาสู่การตอบสนองต่อยาไม่ดี และการรักษาด้วย ceftazidime มีผลข้างเคียงหลายประการ เช่น มีผลต่อระบบประสาท ระบบเลือด หรือมีปฏิกิริยาภูมิไวเกินเกิดขึ้น ผู้ป่วยบางกลุ่มอาจไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงของยาไม่ได้[9] ทำให้ไม่สมัครใจรับการรักษาต่อ ยาจึงไม่สามารถเข้าไปกำจัดเชื้อได้หมด ทำให้เชื้อที่เหลืออยู่ดื้อยาและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การดื้อต่อยา ceftazidime เพียงบาง subpopulation อาจทำให้การทดสอบความไวด้วยวิธี Standard disc diffusion และการศึกษา MIC ไม่สามารถตรวจพบได้[10] จากการรายงานของ Niumsup *et al.* พบว่าเมื่อนำเชื้อ *B. pseudomallei* มีค่า MIC เท่ากับ 1-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา ceftazidime ในปริมาณสูง พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบ MIC พบว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วง 4-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจำแนกได้ว่าเป็นยีน class D β-lactamase เหมือนกันกับเอนไซม์ oxacillinase จากเชื้อ *Ralstonia pickettii*[11] ในเวลาใกล้เคียงกันผลการศึกษาของ Tribuddharat *et al.* พบยีน *penA* ที่ encode บน class A β-lactamase ใน clinical isolates ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 64 ถึงมากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้างเอนไซม์ β-lactamase ชนิดฤทธิ์ขยาย และส่งผลต่อการใช้ยาในกลุ่ม β-lactam หลาย

ชนิด[12] ซึ่งเป็นได้ว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อยา ceftazidime ไม่ดีอาจจะมีการสร้างเอนไซม์ β-lactamase เนื่องจากในการศึกษานี้ในผู้ป่วยกลุ่มที่รักษาด้วยยา ceftazidime ไม่ได้ผลส่วนใหญ่มีค่า MIC 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Niumsup *et al.* ดังนั้นการทดสอบความไวด้วยวิธี standard disc diffusion และ MIC อาจไม่เพียงพอต่อการสนับสนุนว่ายาสามารถกำจัดเชื้อได้ดี และจากผลการทดสอบด้วยเทคนิค PCR เพื่อหายีนที่สร้าง Beta-lactamases ด้วยไพรเมอร์ Oxa และ PenA พบว่าเชื้อส่วยใหญ่มียีนเหล่านี้ โดยเฉพาะ Oxa พบว่าเชื้อทั้ง 85 isolates มียีนเหล่านี้อยู่ เนื่องจากเป็น chromosome-encoded จึงถือว่าเชื้อเหล่านี้ สามารถสร้าง beta-lactamase ซึ่งสัมพันธ์กับการทดสอบ MIC ที่ไม่สูง แต่อย่างไรก็ตามหากทำการ sequence เชื้อเหล่านี้แล้วพบมีการ mutate ที่ตำแหน่งบางตำแหน่งของ oxa gene อาจทำให้ MIC สูงขึ้น ซึ่งถือว่า oxa gene ที่ mutate นี้ทำให้เชื้อสามารถสร้าง Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) อย่างไรก็ตามควรมีการนำเชื้อเหล่านี้มาทำการ sequencing เพื่อดูการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวต่อไป

นอกจากนี้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* การให้ supplement treatment ร่วมกับยาปฏิชีวนะจะทำให้การรักษาได้ผลดี การควบคุมภาวะ metabolic acidosis, ketosis, การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วย และการให้เครื่องช่วยหายใจ[13] ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะช่วยให้การทำงานของ phagocytic cells ทั้งหลายทำงานได้ดีขึ้น และน่าจะมีผลต่อการรักษาผู้ป่วย ดังนั้นถึงแม้ว่ายา ceftazidime จะให้ผลดีต่อการต้าน *B. pseudomallei* แต่การให้ supplement treatment ร่วมกับยาปฏิชีวนะก็มีผลให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยสูงขึ้น

ผู้ป่วยที่ได้รับยา ceftazidime อาการไม่ดีขึ้น แพทย์เปลี่ยนการรักษาด้วยยา imipenem หรือ meropenem จำนวน 27 ราย พบว่า ผู้ป่วยอาการดีขึ้น ร้อยละ 29.63 และเสียชีวิต ร้อยละ 18.52 ที่เหลือเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ส่งตัวไปรักษาต่อที่โรงพยาบาลชุมชนและปฏิเสธการรักษา ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng *et al.* พบว่าผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีสที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime และ meropenem ให้ผลไม่แตกต่างกัน พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา meropenem มีอัตราการเสียชีวิต ร้อยละ 19 ซึ่งการรักษาด้วยยา meropenem ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาแทนยา ceftazidime[15] ในการศึกษาเปรียบความไวของ *B. pseudomallei* ต่อยา meropenem และ ceftazidime ของ Inglis *et al.* พบว่าการทดสอบ standard disc diffusion ด้วยยา meropenem มีช่วงโซนใสรอบๆแผ่นยา ตั้งแต่ 22-31 มิลลิเมตร และเมื่อเปรียบเทียบการทดสอบความไวด้วยวิธี intracellular MIC และ Conventional MIC พบว่า MIC ของยาทั้ง meropenem และ ceftazidime มีค่าสูงขึ้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี intracellular MIC อย่างมีนัยสำคัญ[16] ส่วนผลการทดสอบความไวด้วยวิธี standard disc diffusion ของยา ceftazidime ส่วนใหญ่ร้อยละ 90 มีช่วงของโซนใสรอบๆแผ่นยา 24-30 มิลลิเมตร[16] ในขณะที่การศึกษานี้พบว่าผลการทดสอบความไวด้วยยา ceftazidime ลดลงโดยร้อยละ 90 มีขนาดโซนใสรอบๆแผ่นยา ceftazidime มากกว่าหรือเท่ากับ 20-28 มิลลิเมตร

ในการศึกษา Time killing assays ของ Vorachit *et al.* พบว่าผลการทดสอบของยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxyclycline ให้ผลเป็น antagonism เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *B. pseudo*mallei ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยา ceftazidime [17] แต่อย่างไรก็ตามสำหรับการรักษา maintenance phase ในผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีส การรักษาด้วยยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxyclycline เป็นเวลา 20 สัปดาห์ มีอัตราการกลับเป็นซ้ำ (relapse) เพียงร้อยละ 3 ในขณะที่การให้การรักษาด้วยยา ciprofloxacin และ azithromycin มีอัตราการกลับเป็นซ้ำถึงร้อยละ 22 ดังนั้นการรักษาด้วยยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxyclycline ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาเพื่อป้องการ

กลับเป็นซ้ำ[18] และในการศึกษาครั้งนี้มีผู้ป่วย 1 รายที่ผลเพาะเชื้อพบ *B. pseudo*mallei แพทย์ให้ยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxyclycline ในขณะที่ผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลเป็นเวลา 6 วันและรับยากลับไปรับประทานต่อที่บ้าน ซึ่งผลการทดสอบ standard disc diffusion ของยา ceftazidime ให้บริเวณโซนใสรอบๆแผ่นยา 24 มิลลิเมตรและมีค่า MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ceftazidime แล้วอาการดีขึ้น แพทย์ให้ยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxyclycline กลับไปรับประทานต่อที่บ้านเพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำทั้ง 20 ราย

จากการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าจะไม่พบ ESBL producing *B. pseudomallei* แต่พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มี Oxa และ penA ยีน แสดงให้เห็นว่ามี chromosome-encoded ที่สามารถสร้าง beta-lactamase ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam ซึ่งทำให้เชื้อ *B. pseudomallei* มีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยาโดยเฉพาะยา ceftazidime ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเมลลิออยโดสีส และควรทำการศึกษา sequencing ต่อเพื่อดูตำแหน่งของยีนดังกล่าวว่ามีการกลายพันธุ์หรือไม่ ทำให้เราทราบพัฒนาการดื้อยาของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. การตรวจคัดกรองด้วย Standard disc diffusion, MIC, Combination disc ไม่สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สามารถสร้าง enzyme ESBL ได้
2. จากการศึกษายังไม่พบอุบัติการณ์ของ ESBL producing *B. pseudomallei* ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์ พบเพียง beta-lactamase producing *B. pseudomallei* กลุ่ม Oxa ร้อยละ 100 และ PenA ร้อยละ 92.94 ตามลำดับ แต่หากพบว่ายีนทั้ง 2 มีการกลายพันธุ์เชื้อเหล่านี้จะสามารถสร้าง enzyme ESBL ได้
3. ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจยีนยันยีน ESBL producing *B. pseudomallei* แสดงดังตารางที่4
4. พบยีน beta-lactamase producing *B. pseudomallei* โดยเทคนิค PCR แต่หากต้องการหา ESBL producing *B. pseudomallei* ควรนำเชื้อเหล่านี้มาทำ sequencing เพื่อดูการกลายพันธุ์ของยีนทั้ง2

ปัญหาอุปสรรค

มีอุปสรรคในเรื่องการสั่งซื้อน้ำยาและสารเคมีหลายชนิดเพราะต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้ใช้เวลานานในการจัดส่งสินค้า จึงไม่สามารถดำเนินการได้ทันตามกำหนดเวลาที่คาดการไว้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการนำเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีค่า MIC > 4 µg/ml มาทำการ sequencing เพื่อดูว่ามีการกลายพันธุ์ของยีนกลุ่มที่เป็น chromosome-encoded หรือไม่ และควรทำการศึกษากลุ่มที่เป็น plasmid mediated ด้วย เช่น TEM หรือ SHV เป็นต้น

การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการจากการวิจัย

1. Pawana Panomket, Surasak Wanrum, Jutharat Jittimanee, Nitaya Teerawatanasuk, Jiraporn Nilsakul, Somboon Nuntalohit. "Susceptibility of ceftazidime to *Burkholderia pseudomallei* found in patients in Sappasitprasong Hospital". J Med Tech Phy Ther. 23(3) : 265-273; September-December, 2011.
2. Pawana Panomket, Surasak Wanrum, Jutharat Jittimanee, Sitthinee Trirodporn. "Susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* found in patients in Sappasitprasong

Hospital to antibiotics." Poster presentation; 15 th International Society for Infectious Diseases 2011 at Bangkok ,Thailand (12-17 June 2011)

เอกสารอ้างอิง

1. Vuddhakul V, Tharavichikul P, Na-Ngam N, Jitsurong S, Kunthawa B, Noimay P, et al. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1999; 60:458-61.

2. Wuthiekanun V, Smith MD, White NJ. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89:491.

3. Chawagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, et al. Melioidosis: a major course of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. J Infect Dis 1989; 159:890-9.

4. White NJ. Melioidosis. Lancet 2003; 361:1715-22.

5. Sookpranee M, Boonma P, Susaengrat W, Bhuripanyo K, Punyagupta S. Multicenter prospective randomized trial comparing ceftazidime plus co-trimoxazole with chloramphenicol plus doxycycline and co-trimoxazole for treatment of severe melioidosis. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:158-62.

6. Anuntagool N, Naigowit P, Petkanchanapong V, Aramsri P, Panichakul T, Sirisinha S. Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicaemia. J Med Microbiol 2000; 49:1075-8.

7. Rains CP, Bryson HM, Peters DH. Ceftazidime. An update of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs 1995; 49:577-617.

8. Pierre V, Patrice F, Brigitte B, Daniel L. In vivo emergence of subpopulations expressing teicoplanin or vancomycin resistance phenotype in a glycopeptides susceptible, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2000; 4:163-70.

9. Neu HC. The efficacy of ceftazidime in treating infections due to organisms resistant to other antibiotics. J Antimicrob Chemother 1982; 10:193-9.

10. Xuan Q, Scott JW, Mary FC, Bei Z, Lisong S. Kirby-Bauer disc approximation to detect inducible third-generation cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae. Ann Clin Microbiol Antmicrob 2004; 3:13.

11. Niumsup P, Wuthiekanun V. Cloning of the class D β-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains. J Antimicrob Chemother 2002; 50:445-55.

12. Tribuddharat C, Richard A. Moore, Patricia Baker, Wood DE. *Burkholderia pseudomallei* classA β-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2082-7.

13. Cheng AC, Stephens DP, Anstey NM, Currie BJ. Adjunctive granulocyte colony-stimulating factor treatment of septic shock due to melioidosis. Clin Infect Dis 2004; 38:32-7.

14. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved standards. 6th ed. CLSI Document M100-S16. Wayne Pa: Clinical and laboratory standards Institute; 2006.

15. Cheng AC, Fisher DA, Anstey NM, Stephens DP, Jacups SP, Currie BJ. Outcomes of patients with melioidosis treated with meropenem. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:1763-5.

16. Inglis TJJ, Rodrigues F, Rigby P, Norton R, Currie BJ. Comparison of the susceptibilities of *Burkholderia pseudomallei* to meropenem and ceftazidime by conventional and intracellular methods. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:2999-3005.

17. Vorachit M, Chongtrakool P, Arkomsean S, Boonsong S. Antimicrobial resistance in Burkholderia pseudomallei. Acta Tropica 2000; 74:139-44.

18. Chetchotisakd P, Chaowagul W, Mootsikapun P, Budhsarawong D, Thinkamrop B. Maintenance therapy of melioidosis with ciprofloxacin plus azithromycin compared with cotrimoxazole plus doxycycline. Am J Trop Med Hyg 2001; 64:24-7.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Ashdown's mediun

TSB	10 g
Agar	15 g
1% Neutral red	5 mL
0.1% Crystal violet	5 mL
DW to	960 mL

Autoclave 121° C 15 **นาที** แล้วนำมาอุ่นที่ water bath 40-50°C เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงขนาดหลังมือสัมผัสได้เติม

Glycerol (sterile)	40 mL
Gentamycin (40 mg/mL)	125 µL

2. Muller Hinton Agar (MHA)

MHA	38 g
DW	1000 ml

Autoclave 121° C 15 **นาที** แล้วเทลงบนจานอาหารปลอดเชื้อ

3. Muller Hinton Broth (MHB)

MHB	30 g
DW	1000 ml

ละลายให้เข้ากันดี Autoclave 121° C 15 นาที

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ/ผู้อำนวยการแผน

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย): นางภาวนา **พนมเขต**
   ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ): Ms. Pawana Panomket
2. เลขบัตรประจำตัวประชาชน: 3459900019432
3. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร: วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190 โทรศัพท์ 045-353900 โทรสาร 045-353901
   Email: panomketp@yahoo.com
   Tel: (+66) 865798791
5. ประวัติการศึกษา:

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2552	เอก	ปร.ด	ชีวเวชศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2545	โท	วท.ม	พยาธิวิทยาคลินิก	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2541	ตรี	วท.บ	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

6. **สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**
   - Microbiology
     - Microbiology and antibiotic resistance, nosocomial infections
     - Molecular immunology
     - Immunology of bacterial infection
     - Melioidosis
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการการทำวิจัยว่าเป็น ผู้อำนวยการ หัวหน้า หรือผู้ร่วมวิจัย**

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย:
   ชื่อแผนงานวิจัย
   1. เรื่องการวินิจฉัยการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส ชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่พบในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย:
   ชื่อโครงการวิจัย
   1. เรื่องฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
   2. การศึกษาฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดฮ่วนง้อกในหนูที่เป็นเบาหวาน
   3. การตรวจคัดกรองและการหาความชุกของการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*ที่พบในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์
   4. การตรวจหาชนิดของไวรัสเอชพีวีกลุ่มเสี่ยงสูงด้วยเทคนิค E6/E7 nested multiplex PCR เสมือนตัวบ่งชี้พยากรณ์โรคผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

5. พยาธิวิทยาภูมิคุ้มกันและการเกิดการกลับเป็นซ้ำที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไบโอฟิลม์ของการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

ผู้ร่วมวิจัย

1. การใช้ชีวสารสนเทศเพื่อทำนายการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
2. การวินิจฉัยหายีนสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสชนิดฤทธิ์ขยายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยวิธี multiplex PCR
3. การแสดงออกของครอบครัวโปรตีน p53 ไอโซฟอร์ม เพื่อบ่งชี้พยากรณ์โรคผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ด้วยการย้อมอิมมิวโนฮีสโตเคมมิสทรี
4. การแสดงออกของ MHC class I เสมือนตัวบ่งชี้ถึงพยากรณ์โรคผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกด้วยการย้อมอิมมิวโนฮีสโตเคมมิสทรี

7.3 งานวิจัยเกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว:

ผลงานวิจัย:

1. Panomket P, Chetchotisakd P, Pannangpetch P, Sermswan R W. and WongratanacheewinS. (2006, March 30-31). Study of low dose steroids on adjunct to standard treatment for septic shock due to Burkholderia pseudomallei infection in murine model. The 22nd National Congress on Allergy and Immunology, Bankok, Thailand (Oral presentation).
2. Panomket P, Splitter G, Harms J, Chetchotisakd P, Pannangpetch P, Sermswan R W. and Wongratanacheewin S. (2007, March 29-30). The role of TBK1 gene to control bacterial growth. The 23rd National Congress on Allergy and Immunology, Bankok, Thailand (Oral presentation).
3. Panomket P, Splitter G, Harms J, Chetchotisakd P, Pannangpetch P, Sermswan R W. and Wongratanacheewin S. 2007. TBK1 gene does not play role in control of in vitro *Burkholderia pseudomallei growth.* The 5th World Melioidosis Congress at Sofitel Raja Orchid, Khon Kaen, Thailand.
4. Panomket P, Splitter G, Harms, J, Chetchotisakd P, Pannangpetch P, Sermswan R W. and Wongratanacheewin S. 2008. TBK1 gene does not play role in control of in vitro *Burkholderia pseudomallei growth.* The transaction of royal society of tropical medicine and hygiene. 102; S95-S100.
5. Panomket P, Chetchotisakd P, Pannangpetch P, Sermswan R W. and WongratanacheewinS. 2009. Use of a low dose steroid as an adjunct in the treatment, in mice of severe sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei.* Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 103(7): 635-46.
6. Panomket P, Wanrum S, Srivoramas T. 2011. Antimicrobial activity of extracts of Thai plant to *Burkholderia pseudomallei.* J Med Tech Phy Ther. 23(2): 151-158.
7. Panomket P, Wanrum S. 2011. Hoan Ngoc activity in streptozotocin induced diabetic mic. IJPS. 7(2): 22-28.

8. Panomket P, Wanrum S, Jittimanee J, Teerawatanasuk N, Nilsakul J, Nuntalohit. S. 2011. Susceptibility of ceftazidime to *Burkholderia pseudomallei* found in patients in Sappasitprasong Hospital. J Med Tech Phy Ther. 23(3): 265-273.
9. Panomket P. 2011. Immune response to *Burkholderia pseudomallei*. J Med Assoc Thai. 94(11): 1410-1417.
10. Panomket P, Wanrum S, Srivoramas T. 2012. Bioactivity of plant extracts against *Burkholderia pseudomallei*. Asian Biomed. 6(4): 1-5.

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย): นายสุรศักดิ์ แว่นรัมย์
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ): Mr. Surasak Wanram
เลขบัตรประจำตัวประชาชน: 3310200094515
ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์
หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร:วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190 โทรศัพท์ 045-353900 โทรสาร 045-353901
Email: kasaruspn@yahoo.com Tel: (+66) 81545731

ประวัติการศึกษา:

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2551	เอก	ปร.ด	ชีวเวชศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2546	โท	วท.ม	พยาธิวิทยาคลินิก	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2541	ตรี	วท.บ	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

- Hematology
- Molecular immunology
- Cancer immunology

งานวิจัยที่กำลังทำอยู่:

Human papillomavirus and host interaction in cervical cancer patients

งานวิจัยที่ผ่านมา:

1. Wanram S, Limpaiboon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Luanratanakorn S, and Jearanaikoon P*. (2006, March 28-31). Establishment of integrated HPV16 DNA in cervical cancer by qPCR. The 30th annual congress on medical technology: integrative mission for health promotion and quality of life, Udon Thanee, Thailand (Poster presentation).
2. Jearanaikoon P*, Kongmuangpuk N, Yodpratoom U, Wanram S, Leelayuwat C, Paupairoj A, and Limpaiboon T. (2006, July 8-12). Impaired MHC Class I antigen surface expression demonstrated as the major event for loss of immune surveillance in cervical

cancer is unlikely due to down regulation of heavy chain and β_2M expression. The 19th UICC world cancer congress, Washington, USA (**Poster presentation**).

3. Wanram S, Limpaiboon T, Leelayuwat C, Barusrux S, Lulitanond V, Paupairoj A, Yuenyao P, Luanratanakorn S, and Jearanaikoon P*. (2007, January 18-19). Cervical cancer project and future directions: Research and Development. The KKU innovations 2007, Khon Kaen, Thailand (**Poster presentation**).

4. Wanram S, Limpaiboon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Luanratanakorn S, and Jearanaikoon P*. (2007, April 21-22). The usage of human papillomavirus type 16 physical status in precancerous lesion and invasive cervical carcinoma of northern-east Thai women as prognostic marker in cervical cancer treatment. The Lancet Asia Medical Forum 2007, Suntec, Singapore (**Poster presentation**).

5. Wanram S, Limpaiboon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Luanratanakorn S, and Jearanaikoon P*. 2007. Development of method for integrated HPV16 detection in cervical carcinoma using multiplex quantitative PCR. **Journal of Medical Technology and Physical Therapy** 19 (1) 6-15 (Original article).

6. Jearanaikoon P*, Nattasirikul N, Kaepo W, Wanram S, Leelayuwat C, Paupairoj A, Limpaiboon T. 2007. Tapasin expression in cervical carcinoma. **Journal of Medical Technology and Physical Therapy** 19 (1) 55-63 (Original article).

7. Jearanaikoon P*, Kongmuangpuk N, Yodpratoom U, Wanram S, Leelayuwat C, Paupairoj A, and Pimpaiboon T. The alteration of MHC class I expression in cervical cancer. **Journal of Medical Technology and Physical Therapy** 19 (2) 108-117 (Original article).

8. Pengjam Y*, Hemhorm P, Wanram S, Semsri S, Amarasakulsab T, Nateewaranart S, et al. 2005. A simplified diagnosis of α-thalassemia 1 (SEA-type) using a direct PCR on whole blood lysate. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci.** 38 (2) 116-123.

9. Butthep P*, Wanram S, Pattanapanyasat K, Vattanaviboon P, Fucharoen S, Wilairat P. 2006. Cytoadherence between endothelial cells and *P. falciparum* infected and noninfected normal and thalassemic red blood cells. **Cytometry B Clin Cytom.** 70 (6):432-42.

รางวัลและประสบการณ์ต่างประเทศ:

Scholarship received:

2004	Centre for Research and development in Medical Diagnostic Laboratory (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
2005-2008	Commission on Higher Education Ph. D. Scholar, Ministry of Education, Thailand

Scholar Visits experiences:

2007-2008	Research scholar visits at School of Medicine,

University of California San Diego (UCSD),

California, USA.

Title: Breaking tolerance model using LM-E6E7 as a therapeutic vaccination of cervical cancer

Title: A study of immune responses due to γ-irradiated LM-OVA in various growths of interested conditions.

2. **ชื่อ (ภาษาไทย)** : นางสาว จุฑารัตน์ จิตติมณี

(ภาษาอังกฤษ) : Miss Jutharat Jittimanee

หมายเลขบัตรประชาชน : 3-3002-00736-50-9

ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร :

วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190 **โทรศัพท์** 045-353900 (3952) โทรสาร 045-353901

E:mail : jutharat_manee@yahoo.com

ประวัติการศึกษา :

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2549	โท-เอก	ปร.ด	ชีวเคมีทางการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2544	ตรี	วท.บ	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

- ภูมิคุ้มกันวิทยา และชีววิทยาระดับโมเลกุล

งานวิจัยที่กำลังทำอยู่ :

- การศึกษาการตอบสนองของ cytokine ในหนู Hamster ที่ถูก immunized ด้วย crude somatic antigen ของพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) (อยู่ในขั้นตอนส่งเพื่อการตีพิมพ์ในวารสาร)

- การศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของยางโมกและโมกบ้านในเซลล์ RAW mouse macrophage (หัวหน้าโครงการวิจัย)

3. **ชื่อ** (ภาษาไทย) นางสาว นิตยา **นามสกุล** ธีระวัฒนสุข

(ภาษาอังกฤษ): Miss Nitaya Teerawatanasuk

หมายเลขที่บัตรประชาชน 3349700010912

ตำแหน่งปัจจุบันนักเทคนิคการแพทย์ ชำนาญการพิเศษ

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร:

กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ถน**น สรรพสิทธิ์** อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000

โทร**ศัพท์** 045-243804 โทรสาร 045-243226 โทรศัพท์มือถือ 08-6877-1394

E-mail: nidteera@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2527	ตรี	วท.บ	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2537	โท	วท.ม	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

จุลชีววิทยาคลินิก

ผลงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์:

Mahvanakul W, Limmathurotsakul D, **Teerawattanasuk N**, Peacock SJ. Invasive *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in Northeast Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007, 38: 478-81.

Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Wongsuvan G. Chierakul W, **Teerawattanasook N**, Teparrukkul P, Day NP and Peacock SJ. Quantitative of *B. pseudomallei* in clinical samples. Am J Trop Med Hyg 2007, 5: 812-3.

นิตยา ธีระวัฒนสุข. การตรวจวินิจฉัยและทดสอบความไว**ของเชื้อ**แบคทีเรียจากอาหารเพาะเชื้อจาก**เลือด**. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2551. 36: 2299-2305.

นิตยา ธีระวัฒนสุข. การเพาะเชื้อจากเลือดโดยเครื่อง**อัตโนมัติ** BacT/Alert system. สรรพสิทธิเวชสาร 2541, 19: 233-8.

4. ชื่อ (ภาษาไทย) : นางจิราภรณ์ นิลสกุล

(ภาษาอังกฤษ) : Ms. Jiraporn Nilsakul

หมายเลขบัตรประชาชน : 3349005163**48**

ตำแหน่งปัจจุบัน : นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ (หัวหน้างานจุลชีววิทยา)
หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร :
กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ห้องจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์
จังหวัดอุบลราชธานี 34000 โทรศัพท์ 086-7197793
E:mail : jiranil53@yahoo.com

ประวัติการศึกษา :

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2537	ตรี	วท.บ	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)
จุลชีววิทยา

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

ความไวต่อยา ceftazidime ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์

ภาวนา พนมยงค์[1*] สรรัตน์ แอบรัมย์[2] อุทารศน์ จิตต์เมือง[3] ปิยะ [illegible] ศิริรัตน์ มีสกุล[3]
สมบูรณ์ พนมโสภาต[3]

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อโรคเมลิออยโดสิส **เป็นโรคที่**เกี่ยวข้องกับอาการแสดงทั้งแบบเกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างเฉียบพลันและการติดเชื้อเรื้อรัง ยา ceftazi**dime เป็นยาที่**นิยมใช้ในการรักษาเพื่อกำจัดเชื้อ *B. pseudomallei* วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อทดสอบความไวของยา **ceftazidime** ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี standard disc diffusion และการทดสอบ minimal inhibitory concen**tration (MIC)** ในเชื้อจำนวน 78 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ตั้งแต่เดือน**พฤศจิกายน** 2553 ถึงเดือนพฤษภาคม 2554 และเปรียบเทียบกับบันทึกผลการรักษาของผู้ป่วย ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ***B. pseudomallei*** ไวต่อยา ceftazidime ด้วยวิธี standard disc diffusion และมีค่า MIC ≤ 1-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิต**ร อย่างไรก็ตาม**ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime หายจากโรคเพียงร้อยละ 30.3

คำสำคัญ: *B. pseudomallei*, MIC, Standard disc diffusion

[1]วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
85 ถนนสถลมาร์ค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190
[2] หน่วยจุลชีววิทยา [3]หน่วยควบคุมและเฝ้าระวังโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์
จังหวัดอุบลราชธานี 34190
* ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Susceptibility of ceftazidime for *Burkholderia pseudomallei* in patients at Sapprasithiprasong Hospital

Pawana Panomket[1]*, Surasak Wanitchakorn[2], Suthara Chinnapeev[3],
Nitaya Teerawatanasuk[2], Jiraporn Nilsakul[2], Somboon Nuntaloha[3]

Abstract

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a disease that can involve acute septicemia and chronic infection. Ceftazidime is the most popular choice of therapy for the eradication of *B. pseudomallei*. The aim of this study was to test the antimicrobial activity of ceftazidime applied to *B. pseudomallei* by standard disc diffusion and minimal inhibitory concentration (MIC). A total of 78 isolates of *B. pseudomallei* from patients admitted to Sapprasithiprasong Hospital between November 2010 to May 2011 were included in this study. Medical records of the patients were reviewed. It was shown that *B. pseudomallei* was susceptible to ceftazidime by standard disc diffusion with MICs of $\leq 1 - 2$ μg/ml. However, only 30.3 % of the patients receiving ceftazidime were recovered.

Keywords: *B. pseudomallei*, MIC, Standard disc diffusion

[1]College of Medicine and Public Health, Ubon-Ratchathani University
85 Sathollamark Rd. Warin Chamrap Distinct, Ubon Ratchathani Province 34190, Thailand
[2]Microbiology Laboratory, [3]Infectious disease control Department, Sapprasithiprasong Hospital,
Ubon Ratchathani 34190, Thailand
* Corresponding author: (e-mail: panomketp@yahoo.com)

บทนำ

โรคเมลิออยโดสีสเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง จากการศึกษาพบว่าความชุกของโรคเมลิออยโดสีสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือสูงกว่าภาคอื่นๆของประเทศอย่างมีนัยสำคัญคือ ประมาณ 8-10 เท่า[1] โดยเฉพาะจังหวัดอุบลราชธานี พบว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาเนื่องจากติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โดยเฉลี่ยปีละ 150-170 คน และผู้ป่วยส่วนใหญ่เสียชีวิตด้วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเจริญได้ดีในดินและน้ำ[2] และพบว่าผู้ป่วยมักเป็นโรคในช่วงฤดูฝน เนื่องจากติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ซ่อนตัวอยู่ในดินเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในชุมชนมากถึงร้อยละ 20 และมีความรุนแรง โดยมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 60-80[3] ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีสส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวอยู่ก่อนแล้ว เช่น เบาหวาน โลหิตจาง เป็นต้น ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มักเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ระบบภูมิคุ้มกันไม่ดี จึงง่ายต่อการติดเชื้อในสิ่งแวดล้อม ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีสที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่ไม่ได้รับการรักษา จะเสียชีวิตภายใน 24-48 ชั่วโมง หลังจากมีอาการแสดงและเสียชีวิตร้อยละ 80-90[4] ปัจจุบันยา ceftazidime จัดเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการฉีดเป็นเวลา 10-14 วัน มีการศึกษาพบว่าการให้ยา ceftazidime แต่เนิ่นๆจะลดอัตราการตายได้ถึงร้อยละ 50[5] และยังไม่มีการรายงานผลการทดสอบความไวของยา ceftazidime ที่ดื้อต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี standard disc diffusion อย่างไรก็ตาม แม้ไม่พบการรายงานการดื้อต่อยา ceftazidime ด้วยการทดสอบด้วยวิธี standard disc diffusion ก็ยังพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime ยังคงมีอัตราการตาย และพบรายงานการกำเริบใหม่ของโรคในอัตราที่สูง[4] การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวของยา ceftazidime ด้วยวิธี standard disc diffusion และทดสอบ minimal inhibitory concentration (MIC) เปรียบเทียบกับผลการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนพฤษภาคม 2554

วัสดุและวิธีการศึกษา

แบคทีเรีย

เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนพฤษภาคม 2554 วินิจฉัยเป็น *B. pseudomallei* โดยการทดสอบทางชีวเคมีและทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันกับ polyclonal และ monoclonal antibodies[6]

การทดสอบความไวด้วยวิธี Standard disc diffusion

เตรียมเชื้อโดยเพาะเลี้ยงบน Ashdown's agar และเลือก 1 โคโลนี เลี้ยงใน trypticase soy broth (Hardy Diagnostics Criterion, Santa Maria, USA) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเตรียมเชื้อให้เป็น mid-log phase โดยดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงใน TSB 50 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อ และป้ายลงบนอาหาร Mueller Hinton agar (Hardy Diagnostics) จากนั้นวาง paper disc ของยา ceftazidime ขนาด 30 μg/disc (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) นำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณโซนใส รอบๆ paper disc (inhibition zone) ควบคุมคุณภาพการทดลองโดยทดสอบยา ceftazidime กับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 วัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ paper disc อยู่ในช่วง 25-32 มิลลิเมตร (mm) โดยใช้เกณฑ์การแปลผลตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement สำหรับยา ceftazidime ดังนี้ Resistant (R) ≤ 14 mm, Intermediately susceptible (I) 15-17 mm และ Susceptible (S) ≥ 18 mm[14]

การทดสอบความไวด้วยวิธี MIC

ทดสอบ MIC โดยใช้ชุดทดสอบของ Sensititre Non-Fermenter plate (TREK Diagnostic systems, Biosciences Inc., Magellan, USA) ที่มีความเข้มข้นของยา ceftazidime ที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 1-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบโดยเลี้ยงใน Ashdown's agar และเลือก 3-5 โคโลนีเขี่ยลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland

No. 0.5 จากนั้นดูดมา 10 ไมโครลิตร (μL) ใส่ลงไปในหลอดที่มี Mueller Hinton broth with N-tris(hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid; 2-(2-[hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl] amino) ethane sulfonic acid, $C_6H_{15}NO_6S$ (TES) buffer 11 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ดูดเชื้อมา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน Sensititre Non-Fermenter plate แล้วนำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผล ถ้าหลุมที่มีเชื้อขึ้นจะเห็นการตกตะกอนของเซลล์เป็นกระดุมอยู่ก้นหลุม อ่าน MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการตกตะกอน โดยมีหลุม positive ซึ่งพบตะกอนเซลล์ในหลุม และ negative control ซึ่งไม่พบตะกอนเซลล์ในหลุม โดยใช้เกณฑ์การแปลผลตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement สำหรับยา ceftazidime ดังนี้ R ≥ 32 μg/ml, S ≤ 8 μg/ml[14] Reference strain เป็น *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยมีค่า MIC 1-4 μg/ml

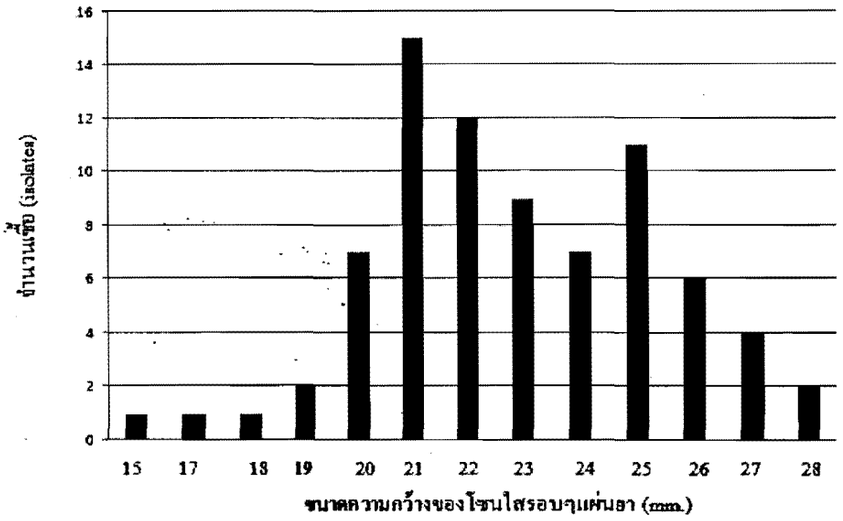
ข้อมูลการรักษาผู้ป่วย

เก็บข้อมูลการรักษาผู้ป่วยที่ผลการเพาะเชื้อพบ *B. pseudomallei* จากบันทึกผลการรักษาของผู้ป่วย (medical record)

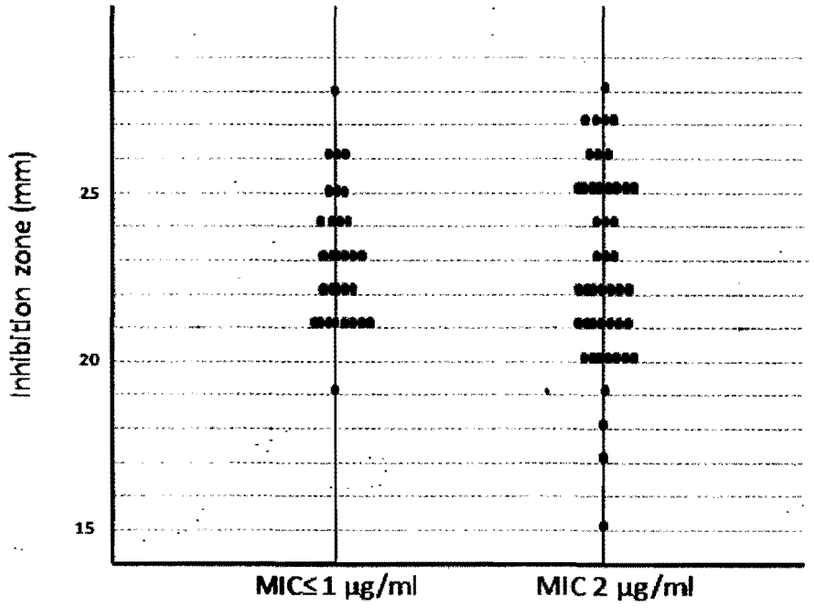
ผลการศึกษา

จากการเก็บข้อมูลผู้ป่วยที่ผลการเพาะเชื้อพบ *B. pseudomallei* ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนพฤษภาคม 2554 มีจำนวน 78 ราย แหล่งที่พบส่วนใหญ่มาจากเลือด (ร้อยละ 71) รองลงมาเป็นหนองที่ได้จากอวัยวะต่างๆเช่น ตับ ไต ปอด (ร้อยละ 15) เสมหะ (ร้อยละ 11) และปัสสาวะ (ร้อยละ 3) ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยา ceftazidime ด้วยวิธี standard disc diffusion พบว่า *B. pseudomallei* ร้อยละ 97.4 ไวต่อยา ceftazidime และ intermediately susceptible ร้อยละ 2.6 โดยมีช่วงของโซนใสรอบๆแผ่นยา ตั้งแต่ 15-28 มิลลิเมตร (รูปที่ 1) มากกว่าร้อยละ 90 มีขนาดโซนใสรอบๆแผ่นยามากกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร ผลการทดสอบ MIC ด้วยยา ceftazidime มีค่า MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 31 isolates (ร้อยละ 39.2) ให้ค่า inhibition zone ในช่วง 15-28 mm และ MIC 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 47 isolates (ร้อยละ 60.2) ให้ค่า inhibition zone ในช่วง 19-28 mm (รูปที่ 2) จากการทดสอบผลของวิธี MIC และวิธี standard disc diffusion ด้วย Mann-Whitney test พบว่าผลการทดสอบของทั้งสองวิธีไม่สัมพันธ์กัน ($P = 0.125$)

ในจำนวนผู้ป่วย 78 รายได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime จำนวน 66 ราย และไม่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime จำนวน 12 ราย ประกอบด้วย ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อนให้ยาจำนวน 3 รายและผลการทดสอบ MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แพทย์ส่งตัวไปรักษาต่อที่โรงพยาบาลชุมชน จำนวน 2 ราย ไม่สมัครใจรับบริการขอกลับบ้านจำนวน 6 ราย และได้รับยา cotrimoxazole และ doxyclycline กลับไปรับประทานต่อที่บ้าน 1 ราย ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา ceftazidime ทั้ง 66 ราย พบว่าหลังจากที่ได้รับยาแล้ว เสียชีวิต จำนวน 9 ราย ผลการทดสอบ MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 7 isolates และ MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 isolates ในจำนวนนี้เสียชีวิตหลังให้ยา ceftazidime ไปเพียง 1 วัน โดยได้รับยาขนาด 2 กรัม วันละครั้ง จำนวน 6 ราย มีผู้ป่วยตอบสนองต่อยาดี หายจากโรคและแพทย์อนุญาตให้กลับบ้านได้จำนวน 20 ราย (ร้อยละ 30.3) กลุ่มนี้เชื้อมีค่า MIC 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 isolates และ MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 isolates และหลังจากได้รับยา ceftazidime แล้วอาการไม่ดีขึ้นจำนวน 46 ราย (ร้อยละ 69.7) ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้ไม่สมัครใจอยู่ต่อ ขอกลับบ้าน จำนวน 16 ราย (ร้อยละ 24.2) และเสียชีวิต จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 4.5) (ตารางที่ 1) และแพทย์เปลี่ยนยาเป็นยา imipenem หรือ meropenem จำนวน 27 ราย (ร้อยละ 40.9) หลังจากเปลี่ยนยาแล้วผู้ป่วยอาการดีขึ้น จำนวน 8 ราย แพทย์ส่งกลับไปรักษาต่อที่โรงพยาบาลชุมชน 5 ราย เสียชีวิต 5 ราย และปฏิเสธการรักษา 9 ราย



รูปที่ 1 ผลการทดสอบความไวต่อยา ceftazidime ของ *B. pseudomallei* จำนวน 78 isolates โดยวิธี standard disc diffusion



รูปที่ 2 แสดงค่า inhibition zone กับค่า MIC ของเชื้อแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ข้อมูลผู้ป่วยที่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 78 ราย

MIC (μg/ml)	ไม่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime 12 ราย (ร้อยละ 15.4)				ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime 66 ราย (ร้อยละ 84.6)			
	ได้รับยา cotrimoxazole + doxycycline (1)	เสียชีวิต (3)	ไม่สมัครใจอยู่ รพ. (6)	ส่งต่อ	ตอบสนองดี หายป่วย (20)	ได้รับยาอาการไม่ดีขึ้น 46 ราย		
						เปลี่ยนยา (27)	ไม่สมัครใจอยู่ รพ. (16)	เสียชีวิต (3)
< 1	0	0	2	0	5	24	0	0
2	1	3	4	2	15	3	16	3

หมายเหตุ: เปลี่ยนยา = เปลี่ยนยาเป็น Imipenem หรือ Meropenem

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนพฤษภาคม 2554 จำนวน 78 ราย ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี standard disc diffusion พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมีความไวต่อยา ceftazidime ร้อยละ 97.4 และมีค่า MIC ≤ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 39.2 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 60.2 ในจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 78 รายได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime จำนวน 66 ราย ผู้ป่วยหายจากโรคและแพทย์อนุญาตให้กลับบ้านได้ จำนวน 20 ราย และผู้ป่วยจำนวน 46 ราย ที่ได้รับยา ceftazidime แล้วอาการไม่ดีขึ้น แพทย์เปลี่ยนยารักษาเป็นยาในกลุ่มที่แรงขึ้น บางส่วนไม่สมัครใจรับการรักษาต่อและบางส่วนเสียชีวิต จากข้อมูลเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าแม้ว่าผลการทดสอบความไวของยา ceftazidime ในหลอดทดลองทั้งการทดสอบด้วย standard disc diffusion และการศึกษา MIC จะเห็นว่ายาสามารถยับยั้งเชื้อได้ดี แต่ผู้ป่วยร้อยละ 69.7 ที่พบว่าผลการรักษาไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบความไวทางห้องปฏิบัติการ ถึงแม้ว่า ceftazidime จัดเป็นยา third generation cephalosporin ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้กว้างในการต่อต้านแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และมีฤทธิ์ต่อต้าน *Pseudomonas aeruginosa* ยามีฤทธิ์ bactericidal และออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจับกับ penicillin-binding protein (PBP) และการกระตุ้นเอนไซม์ autolysin ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายตัวเอง[7] อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษา minimum bactericidal concentration (MBC) เพื่อดูว่ายาสามารถฆ่าเชื้อได้ดีหรือไม่ต่อไป ปัจจัยที่มีผลต่อการให้ ceftazidime แล้วไม่ได้ผลน่าจะมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่นเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเมื่อนำมาทดสอบความไวให้ผลการทดสอบที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่ในร่างกายผู้ป่วยอาจมีเพียงบางเซลล์ที่ดื้อ ต่อ ceftazidime ที่รอดจากการถูกฆ่าด้วยยาแล้วมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบ binary fission นำมาสู่การตอบสนองต่อยาไม่ดี [8] และการรักษาด้วย ceftazidime มีผลข้างเคียงหลายประการ เช่น มีผลต่อระบบประสาท ระบบเลือดหรือมีปฏิกิริยาภูมิไวเกินเกิดขึ้น ผู้ป่วยบางกลุ่มอาจไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงของยาไม่ได้[9] ทำให้ไม่สมัครใจรับการรักษาต่อ ยาจึงไม่สามารถเข้าไปกำจัดเชื้อได้หมด ทำให้เชื้อที่เหลืออยู่ดื้อยาและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การดื้อต่อยา ceftazidime เพียงบาง sub-population อาจทำให้การทดสอบความไวด้วยวิธี standard disc diffusion และการศึกษา MIC ไม่สามารถตรวจพบได้[10] จากการรายงานของ Niumsup *et al.* พบว่าเมื่อนำเชื้อ *B. pseudomallei* มีค่า MIC เท่ากับ 1-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา ceftazidime ในปริมาณสูง พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบ MIC พบว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วง 4-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจำแนกได้ว่าเป็น

ยีน class D β-lactamase เหมือนกันกับเอนไซม์ oxacillinase จากเชื้อ *Ralstonia pickettii*[11] ในเวลาใกล้เคียงกันผลการศึกษาของ Tribuddharat *et al.* พบยีน *penA* ที่ encode บน class A β-lactamase ใน clinical isolates ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 64 ถึงมากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้างเอนไซม์ β-lactamase ชนิดฤทธิ์ขยาย และส่งผลต่อการใช้ยาในกลุ่ม β-lactam หลายชนิด[12] ซึ่งเป็นได้ว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อยา ceftazidime ไม่ดีอาจจะมีการสร้างเอนไซม์ β-lactamase อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อของเชื้อกลุ่มนี้ว่ามียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-lactamase หรือไม่ เนื่องจากในการศึกษานี้ในผู้ป่วยกลุ่มที่รักษาด้วยยา ceftazidime ไม่ได้ผลส่วนใหญ่มีค่า MIC 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Niumsup *et al.* ดังนั้นการทดสอบความไวด้วยวิธี standard disc diffusion และ MIC อาจไม่เพียงพอต่อการสนับสนุนว่ายาสามารถกำจัดเชื้อได้ดี นอกจากนี้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* การให้ supplement treatment ร่วมกับยาปฏิชีวนะจะทำให้การรักษาได้ผลดี การควบคุมภาวะ metabolic acidosis, ketosis, การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วย และการให้เครื่องช่วยหายใจ[13] ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะช่วยให้การทำงานของ phagocytic cells ทั้งหลายทำงานได้ดีขึ้น และน่าจะมีผลต่อการรักษาผู้ป่วย ดังนั้นถึงแม้ว่ายา ceftazidime จะให้ผลดีต่อการต้าน *B. pseudomallei* แต่การให้ supplement treatment ร่วมกับยาปฏิชีวนะก็มีผลให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยสูงขึ้น

ผู้ป่วยที่ได้รับยา ceftazidime อาการไม่ดีขึ้น แพทย์เปลี่ยนการรักษาด้วยยา imipenem หรือ meropenem จำนวน 27 ราย พบว่า ผู้ป่วยอาการดีขึ้น ร้อยละ 29.6 และเสียชีวิต ร้อยละ 18.5 ที่เหลือเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ส่งตัวไปรักษาต่อที่โรงพยาบาลชุมชนและปฏิเสธการรักษา ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng *et al.* พบว่าผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีสที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime และ meropenem ให้ผลไม่แตกต่างกัน พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา meropenem มีอัตราการเสียชีวิต ร้อยละ 19 ซึ่งการรักษาด้วยยา meropenem ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาแทนยา ceftazidime[15] ในการศึกษาเปรียบความไวของ *B. pseudomallei* ต่อยา meropenem และ ceftazidime ของ Inglis *et al.* พบว่าการทดสอบ standard disc diffusion ด้วยยา meropenem มีช่วงโซนใสรอบๆแผ่นยา ตั้งแต่ 22-31 มิลลิเมตร และเมื่อเปรียบเทียบการทดสอบความไวด้วยวิธี intracellular MIC และ conventional MIC พบว่า MIC ของยาทั้ง meropenem และ ceftazidime มีค่าสูงขึ้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี intracellular MIC อย่างมีนัยสำคัญ[16] ส่วนผลการทดสอบความไวด้วยวิธี standard disc diffusion ของยา ceftazidime ส่วนใหญ่ร้อยละ 90 มีช่วงของโซนใสรอบๆแผ่นยา 24-30 มิลลิเมตร[16] ในขณะที่การศึกษานี้พบว่าผลการทดสอบความไวด้วยยา ceftazidime ลดลงโดยร้อยละ 90 มีขนาดโซนใสรอบๆแผ่นยา ceftazidime มากกว่าหรือเท่ากับ 20-28 มิลลิเมตร

ในการศึกษา time killing assays ของ Vorachit *et al.* พบว่าผลการทดสอบของยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxyclycline ให้ผลเป็น antagonism เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *B. pseudo*mallei ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยา ceftazidime [17] แต่อย่างไรก็ตามสำหรับการรักษา maintenance phase ในผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีส การรักษาด้วยยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxycycine เป็นเวลา 20 สัปดาห์ มีอัตราการกลับเป็นซ้ำเพียงร้อยละ 3 ในขณะที่การให้การรักษาด้วยยา ciprofloxacin และ azithromycin มีอัตราการกลับเป็นซ้ำถึงร้อยละ 22 ดังนั้นการรักษาด้วยยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxycycine ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาเพื่อป้องการกลับเป็นซ้ำ[18] ในการศึกษาครั้งนี้มีผู้ป่วย 1 รายที่ผลเพาะเชื้อพบ *B. pseudo*mallei แพทย์ให้ยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxycycine ในขณะที่ผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลเป็นเวลา 6 วันและรับยากลับไปรับประทานต่อที่บ้าน ซึ่งผลการทดสอบ standard disc diffusion ของยา ceftazidime ให้บริเวณโซนใสรอบๆ แผ่นยา 24 มิลลิเมตร และมีค่า MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา ceftazidime แล้วอาการดีขึ้น แพทย์ให้ยา cotrimoxazole ร่วมกับ doxycycine กลับไปรับประทานต่อที่บ้านเพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำทั้ง 20 ราย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในการสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปี 2554 วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สนับสนุนอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย และเจ้าหน้าที่หน่วยงานโรคติดเชื้อ

ในโรงพยาบาลและหน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องข้อมูลผู้ป่วยและการเก็บเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารอ้างอิง

1. Vuddhakul V, Tharavichikul P, Na-Ngam N, Jitsurong S, Kunthawa B, Noimay P, et al. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 458-61.
2. Wuthiekanun V, Smith MD, White NJ. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 491.
3. Chawagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, et al. Melioidosis: a major course of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. J Infect Dis 1989; 159: 890-9.
4. White NJ. Melioidosis. Lancet 2003; 361: 1715-22.
5. Sookpranee M, Boonma P, Susaengrat W, Bhuripanyo K, Punyagupta S. Multicenter prospective randomized trial comparing ceftazidime plus co-trimoxazole with chloramphenicol plus doxycycline and co-trimoxazole for treatment of severe melioidosis. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 158-62.
6. Anuntagool N, Naigowit P, Petkanchanapong V, Aramsri P, Panichakul T, Sirisinha S. Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicaemia. J Med Microbiol 2000; 49: 1075-8.
7. Rains CP, Bryson HM, Peters DH. Ceftazidime. An update of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs 1995; 49: 577-617.
8. Pierre V, Patrice F, Brigitte B, Daniel L. *In vivo* emergence of subpopulations expressing teicoplanin or vancomycin resistance phenotype in a glycopeptides susceptible, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2000; 4: 163-70.
9. Neu HC. The efficacy of ceftazidime in treating infections due to organisms resistant to other antibiotics. J Antimicrob Chemother 1982; 10: 193-9.
10. Xuan Q, Scott JW, Mary FC, Bei Z, Lisong S. Kirby-Bauer disc approximation to detect inducible third-generation cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae. Ann Clin Microbiol Antmicrob 2004; 3: 13.
11. Niumsup P, Wuthiekanun V. Cloning of the class D β-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 445-55.
12. Tribuddharat C, Richard A. Moore, Patricia Baker, Wood DE. *Burkholderia pseudomallei* classA β-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2082-7.
13. Cheng AC, Stephens DP, Anstey NM, Currie BJ. Adjunctive granulocyte colony-stimulating factor treatment of septic shock due to melioidosis. Clin Infect Dis 2004; 38: 32-7.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved standards. 6th ed. CLSI Document M100-S16. Wayne Pa: Clinical and laboratory standards Institute; 2006.
15. Cheng AC, Fisher DA, Anstey NM, Stephens DP, Jacups SP, Currie BJ. Outcomes of patients with melioidosis treated with meropenem. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1763-5.
16. Inglis TJJ, Rodrigues F, Rigby P, Norton R, Currie BJ. Comparison of the susceptibilities of

Burkholderia pseudomallei to meropenem and ceftazidime by conventional and intracellular methods. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2999-3005.

17. Vorachit M, Chongtrakool P, Arkomsean S, Boonsong S. Antimicrobial resistance in *Burkholderia pseudomallei*. Acta Tropica 2000; 74: 139-44.
18. Chetchotisakd P, Chaowagul W, Mootsikapun P, Budhsarawong D, Thinkamrop B. Maintenance therapy of melioidosis with ciprofloxacin plus azithromycin compared with cotrimoxazole plus doxycycline. Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 24-7.