

การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้ออีโคไล
สำหรับการตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อจากโรงพยาบาลพะเยาราม
จังหวัดพะเยา ประเทศไทย



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้ออีโคไล
สำหรับการตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อจากโรงพยาบาลพะเยาราม
จังหวัดพะเยา ประเทศไทย



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2567
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* FOR THE INVESTIGATION OF ITS
DISTRIBUTION FROM PHAYAO RAM HOSPITAL, PHAYAO PROVINCE, THAILAND



A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Biotechnology
May 2024

Copyright 2024 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้ออีโคไล
สำหรับการตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อจากโรงพยาบาลพะเยาราม
จังหวัดพะเยา ประเทศไทย

ของ รุ่งทิภา ศรีโมรา

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุริวัลย์ บำรุงไทย)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤษชัย พูลเจริญ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภััสสร)

..... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ เนื่องเม็ก)

- เรื่อง:** การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้ออีโคไล สำหรับการตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อจากโรงพยาบาลพะเยาราม จังหวัดพะเยา ประเทศไทย
- ผู้วิจัย:** รุ่งทิศา ศรีโมรา, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566
- อาจารย์ที่ปรึกษา:** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤษชัย พูลเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภััสสร
- คำสำคัญ:** Escherichia coli, Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis หรือ MLVA, ST131 subtype, Virulence gene

บทคัดย่อ

Escherichia coli จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรค เช่น โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน หรือ การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection; UTI) จากการศึกษารูปแบบกระจายของเชื้อ *Escherichia coli* จากผู้ป่วยใน (Clinical samples) ของโรงพยาบาลพะเยาจำนวน 76 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนตุลาคม ค.ศ.2017 ถึงเดือนมกราคม ค.ศ.2018 โดยใช้เทคนิค multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) พร้อมทั้งการตรวจสอบปัจจัย Virulence gene ที่สัมพันธ์กับการเกิดกลุ่มเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค Urinary tract infection (UTI) และการติดเชื้อในไก่ Pathogenic *E. coli* (APEC) ผลการศึกษาพบว่าการติดเชื้อ *E. coli* พบได้จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยผู้หญิงอายุมากกว่า 40 ปี 38% จัดอยู่ในกลุ่ม B2 ของระบบ Clermont ประมาณ 36.8% มีการดื้อยาตั้งแต่สี่ชนิดขึ้นไป 77.68% การแบ่งความรุนแรงของการดื้อยาแบบ ESBL พร้อมกับยาในกลุ่ม Quinolone จำนวน 76 ตัวอย่าง พบเชื้อดื้อยาทั้งสองกลุ่ม จำนวน 30 ตัวอย่างถูกจัดอยู่ใน clade 1 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 การศึกษารูปแบบการกระจายของเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค MLVA พบการกระจายสูงของเชื้อ *E. coli* จำนวน 4 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่ง (clade X) จัดอยู่ในกลุ่ม B2 สัมพันธ์กับการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI) และกลุ่มที่สอง (clade Y) จัดอยู่ในกลุ่ม B2 และสัมพันธ์กับ UTI และการติดเชื้อในไก่ Pathogenic *E. coli* (APEC) กลุ่มที่ 3 และ 4 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 อยู่ใน subtype C (clade131_A) ซึ่งแบ่งเป็น subtype C1M27, C1nM27 และ C2 และ subtype A (clade131_A) *E. coli* สายพันธุ์ ST131 มักพบยีน *CTXm1* หรือ *CTXm9* เป็นสาเหตุของการดื้อยาแบบ ESBL และพบการเกิดมิวเทชันที่ตำแหน่ง *gyrA83* และ *gyrA87* ส่งผลให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม Quinolone และพบว่า clade131_B ดื้อยากลับกลุ่ม Quinolone น้อยกว่า clade131_A เนื่องจากในบาง isolate ไม่พบการเกิดมิวเทชันที่ตำแหน่ง *gyrA83* ทำให้เกิดการดื้อยา ciprofloxacin เพียงชนิดเดียว และข้อมูลการกระจายของเชื้อ *E. coli* ทั้ง 4 กลุ่ม ในปี ค.ศ.2016 ถึงปี ค.ศ.2018 พบว่า clade 131_A มีการระบาดทั้งปี โดยในช่วงปี ค.ศ.2016 (n=4) และลดลงในปี ค.ศ.2017 (n=3) และใน clade131_B มีการกระจายในช่วงของปี เดือนมกราคม ธันวาคม และกรกฎาคม (n=6) นอกจากนี้ยังพบการกระจายของ clade X (n=9) มีระบาดในช่วงต้นปีของทุกปีตั้งแต่เดือนมกราคม ค.ศ.2015 ถึงเดือนมกราคม ค.ศ.2018 ส่วน clade Y (n=4) มีการระบาดในช่วงเดือนตุลาคม ค.ศ.2017 ถึงเดือนมกราคม ค.ศ.2018 สรุปงานวิจัยนี้สามารถใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาคือ Clermont ST131 typing และ MLVA เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ถึงกลุ่มสายพันธุ์ที่ต่างกัน รวมถึงการระบาดของกลุ่มสายพันธุ์ ที่ต่างกันเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับจากโรงพยาบาลพะเยาราม ได้อย่างรวดเร็ว

Title: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* FOR THE INVESTIGATION OF ITS DISTRIBUTION FROM PHAYAO RAM HOSPITAL, PHAYAO PROVINCE, THAILAND

Author: Rungthiwa Srimora, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2023

Advisor: Assistant Professor Kritchai Poonchareon Co–advisor Assistant Professor Supaporn Passorn

Keywords: *Escherichia coli* Multiple–locus Variable–Number Tandem Repeat Analysis and MLVA ST131 subtype Virulence gene

ABSTRACT

Escherichia coli is a normal flora that lives in the intestines of humans and most animals. Most strains do not harm humans, but some strains cause infection. such as urinary tract infection (Urinary tract infection; UTI). The study aimed to characterize different strains, antibiotic resistance, some virulent profiles, and their distribution pattern of 76 clinical isolated of *Escherichia coli* derived from Phayao Hospital from October 2017 to January 2018. Clemont method, ST131 multiplex analysis and multiple–locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) was performed to rapid type the isolated *E. coli*. Virulent gene multiplex assay was performed to characterize those causing either Urinary tract infection (UTI) or pathogenic *E. coli* (APEC) in chickens. Results showed that most *E. coli* infection was from urine samples of female patients over 40 years of age. They were identified as group B2 (38%) of the clemont system with approximately 36.8% resistant to at least one drug and 77.68% to four or more types of drugs. From 76 samples, 30 samples classified as clade 1, were classified as *E. coli* strain ST131 and resistant to both ESBL along with three types of quinolones. Different strains were characterized using the MLVA technique with an interesting prevalence of 4 groups (strains). Both group one and two (clade X and y) were identified as group B2 and causing UTI while clade X was additionally assigned to pathogenic *E. coli* (APEC) causing infections in chickens. Groups 3 and 4 were *E. coli* strain ST131 belonging to subtype C (clade131_A), which is divided into subtypes C1M27, C1nM27 and C2 and subtype A (clade131_A). Often, *E. coli* strain ST131 harbored both *CTXm1* or *CTXm9* genes as the cause of ESBL drug resistance and mutated *gyrA83* and *gyrA87* which cause resistance to quinolone drugs. However, often found with no mutation at the *gyrA83* position, *E. coli* strain ST131 subtype A was resistant to only ciprofloxacin.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษชัย พูลเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่งที่กรุณามอบทุนการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ซึ่งแนะแนวทางในการเรียนรู้ ให้คำแนะนำ ตลอดจนตรวจรอบแก้ไขข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภััสสร คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุริวัณย์ บำรุงไทย ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง และคำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และนักวิทยาศาสตร์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และสาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย สถานที่เครื่องมือและอุปกรณ์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการขับเคลื่อนงานวิจัยจน สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และตา ที่สนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบคุณเพื่อนร่วมชั้นที่คอยให้คำปรึกษา รวมถึงขอขอบคุณตัวข้าพเจ้า และขอขอบคุณทุกท่านที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจเสมอมา จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจนำองค์ความรู้ไปต่อยอดในอนาคต

รุ่งทิวา ศรีโมรา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐาน.....	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora).....	5
2.2 โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonoses).....	5
2.3 จุลชีววิทยาของ <i>Escherichia coli</i>	6
2.4 ระบาดวิทยาและการติดเชื้อของ <i>E. coli</i> (Epidemiology and <i>E. coli</i> Infection).....	7
2.5 กลไกการติดเชื้อโดยทั่วไปของเชื้อ <i>E. coli</i> (pathogenicity of <i>E. coli</i> infection).....	8
2.6 โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ <i>E. coli</i>	9
2.7 การจัดกลุ่มเชื้อ <i>E. coli</i> ตามลักษณะอาการและกลไกของเชื้อ (Classification of <i>E. coli</i>).....	9
2.7.1 กลุ่มเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร (Intestinal infection).....	11

2.7.2	กลุ่มเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหาร (extra-intestinal infection) . เชื้อ <i>E. coli</i> ที่ก่อให้เกิดโรคนอกระบบทางอาหาร เกิดจากเชื้อที่มีการเคลื่อนที่จากลำไส้ใหญ่เข้าสู่อวัยวะอื่น ๆ ภายในร่างกายทำให้เกิดการติดเชื้อ ดังนี้.....	15
2.8	การจัดกลุ่มของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ตามความแตกต่างของเชื้อ.....	18
2.8.1	การแบ่งกลุ่มของเชื้อ <i>E. coli</i> ตามความแตกต่างของแอนติเจน (phenotyping classification)	18
2.8.2	การแบ่งของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา (Genotyping classification)	19
2.9	ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคและ Virulence gene	23
2.10	แนวทางการรักษาการติดเชื้อ <i>E. coli</i> (Treatment <i>E. coli</i> infection).....	24
2.11	การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic treatment).....	26
2.12	การเกิดขึ้นและการถ่ายทอดยีนดื้อยา (Antibiotic resistance gene).....	28
2.13	รูปแบบกลไกของการดื้อยาปฏิชีวนะ	30
2.13.1	รูปแบบกลไกการดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactam.....	31
2.13.2	รูปแบบการดื้อยาในกลุ่ม quinolone.....	32
2.14	การป้องกันการติดเชื้อ <i>E. coli</i> (Prevention of <i>E. coli</i> infection).....	32
2.15	การแพร่กระจายของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่มีคุณสมบัติการดื้อยาหลายขนาน	32
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
3.1	วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	34
3.1.1.	อาหารเลี้ยงเชื้อ	34
3.1.2.	สารเคมี	34
1)	สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	34
2)	สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ESBL	34
3)	สารเคมีสำหรับการทำ PCR	35
4)	สารเคมีสำหรับ run Agarose Electrophoresis.....	35

3.1.3. เครื่องมือ และอุปกรณ์.....	35
1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเลี้ยงเชื้อ	35
2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	35
3) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR.....	35
4) อุปกรณ์ที่ทั่วไป	35
3.2 การเตรียมตัวอย่างและการทำดีเอ็นเอบริสุทธิ์	36
3.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.2.2 การเตรียมเชื้อเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ	36
3.2.3 การทำทดสอบ Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) (NDP test).....	36
3.2.4 การสกัดดีเอ็นเอ	37
3.3 การตรวจหายีนดื้อยา.....	37
3.3.1 การตรวจสอบยีนดื้อยา <i>bla</i> CTX, <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> OXA	37
3.3.2 การตรวจสอบยีนดื้อยา Quinolone (<i>gyrA</i> 83, <i>gyrA</i> 87).....	38
3.4 การจัดกลุ่มของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	38
3.4.1 เทคนิค Clermont.....	38
3.4.2 เทคนิค Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)	39
3.4.3 การ PCR subtyping ของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ST131.....	39
3.4.4 การตรวจสอบ virulence gene.....	39
3.5 การวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Gel J.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง	46
ผลการทดลองที่ 1 ผลการวิเคราะห์กลุ่มประชากรของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ใช้ในการศึกษา	46
ผลการทดลองที่ 2 การแบ่งเชื้อ <i>E. coli</i> ตามช่วงอายุและกลุ่มตัวอย่าง (Specimen type) ของเชื้อ <i>E. coli</i> ทั้งหมด	47

ผลการทดลองที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างของเชื้อ <i>E. coli</i> กับการแบ่งกลุ่ม โดยเทคนิค Clermont.....	48
ผลการทดลองที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติการดื้อยาแบบ Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) หรือ (NDP test).....	49
ผลการทดลองที่ 5 การศึกษาเชื้อ <i>E. coli</i> ที่มีการดื้อยาสองกลุ่มพร้อมกัน คือ ESBL และกลุ่ม quinolone.....	50
ผลการทดลองที่ 6 รูปแบบความรุนแรงของการดื้อยาที่แตกต่างกัน (Antibiotic resistance pattern)	51
ผลการทดลองที่ 7 การ subtype ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ ST131	53
ผลการทดลองที่ 8 การสร้าง phylogenetic tree ของกลุ่ม <i>E. coli</i> จำนวน 76 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค MLVA และ Virulence gene (Molecular typing and Subtyping).....	54
ผลการทดลองที่ 9 ศึกษาารูปแบบของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่มีการกระจายสูง และลักษณะของยีนดื้อยา	57
ผลการทดลองที่ 10 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>E. coli</i> ตามการจัดกลุ่มของ Clermont และ virulence gene ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI)	59
ผลการทดลองที่ 11 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <i>E. coli</i> ตามการจัดกลุ่มของ Clermont และ virulence gene ที่ก่อโรคในไก่	60
ผลการทดลองที่ 12 การแพร่กระจายของเชื้อ <i>E. coli</i> ในกลุ่มที่มีการแพร่กระจายสูง.....	61
บทที่ 5 สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง.....	64
บรรณานุกรม	67
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างเชื้อ <i>E. coli</i> จำนวน 76 ตัวอย่างจากโรงพยาบาลพะเยาราม จังหวัดพะเยา ประเทศไทย	78
79	
ประวัติผู้วิจัย.....	80

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 กลไกการเกิดโรคและลักษณะความรุนแรงเชื้อ E. coli 5 กลุ่ม	15
ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของกลุ่ม E. coli ที่แบ่งตามอาการและความแตกต่างของแอนติเจน.....	19
ตารางที่ 3 การจำแนกกลุ่มยา Quinolone	28
ตารางที่ 4 การแบ่ง clade การดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactam	31
ตารางที่ 5 แสดงกลุ่มตัวอย่างของเชื้อ E. coli ต่างๆ จำนวน 76 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาล พะเยาราม ปี ค.ศ.2015-ค.ศ.2018	46
ตารางที่ 6 การศึกษาคุณลักษณะการดื้อยาของเชื้อ E. coli	52
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความรุนแรงของการดื้อยาแบบ ESBL และกลุ่มยา Quinolone กับ เชื้อ E. coli สายพันธุ์ ST131.....	53
ตารางที่ 8 การจัดกลุ่มของเชื้อ E. coli โดยใช้เทคนิค MLVA	56
ตารางที่ 9 การศึกษาคุณสมบัติยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการดื้อยาของเชื้อ E. coli	58
ตารางที่ 10 แสดงคุณลักษณะของยีนดื้อยา และการดื้อยาของเชื้อ E. coli	59
ตารางที่ 11 การแสดงคุณสมบัติของเชื้อ E. coli ที่เกี่ยวกับ virulence UTI	60
ตารางที่ 12 การแสดงคุณสมบัติของเชื้อ E. coli ที่เกี่ยวกับ virulence gene ที่ก่อโรคไก่	61

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์สู่คน	6
ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อ Escherichia coli	6
ภาพที่ 3 การแพร่กระจายและการระบาดของเชื้อ E. coli	7
ภาพที่ 4 กลไกการติดเชื้อมากโดยทั่วไปของ Escherichia coli	8
ภาพที่ 5 การแบ่งกลุ่มของเชื้อ E. coli	10
ภาพที่ 6 กลไกการเกิดโรค Enterotoxigenic E. coli (ETEC).....	11
ภาพที่ 7 กลไกการเกิดโรค Enteropathogenic E. coli (EPEC)	12
ภาพที่ 8 กลไกการเกิดโรค Enterohemorrhagic E. coli (EHEC)	13
ภาพที่ 9 กลไกการเกิดโรค Enteroinvasive E. coli (EIEC).....	14
ภาพที่ 10 กลไกการเกิดโรค Enteraggregative E. coli (EAEC).....	14
ภาพที่ 11 กลไกการติดเชื้อมากระบบทางเดินปัสสาวะ	16
ภาพที่ 12 กลไกการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็ก.....	17
ภาพที่ 13 กลไกการติดเชื้อมากในสัตว์ปีก	17
ภาพที่ 14 การแบ่งกลุ่มเชื้อ Escherichia coli ตามคุณสมบัติของแอนติเจน	18
ภาพที่ 15 การจัดกลุ่มของเชื้อ Escherichia coli โดยใช้เทคนิค Clermont.....	20
ภาพที่ 16 ความแตกต่างของแบคทีเรียที่มี sequence type ต่างกัน.....	20
ภาพที่ 17 ความแตกต่างของแบคทีเรียที่มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน.....	21
ภาพที่ 18 ลักษณะรูปแบบของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เทคนิค MLVA	22
ภาพที่ 19 phylogenetic tree ที่ได้จากการทำ Whole genome sequencing (WGS) ของเชื้อ E. coli	22
ภาพที่ 20 แนวทางการรักษาโรคติดเชื้อมาก Escherichia coli.....	25
ภาพที่ 21 โครงสร้างของยาในกลุ่ม Beta-lactams	26

ภาพที่ 22 โครงสร้าง fluoroquinolone	27
ภาพที่ 23 การดื้อยาแบบ intrinsic resistance	29
ภาพที่ 24 กลไกของการดื้อยาปฏิชีวนะ	30
ภาพที่ 25 การเสียชีวิตจากการติดเชื้อ E. coli ของประเทศในภูมิภาคต่างๆ ของโลก.....	33
ภาพที่ 26 หน้าต่างหลักของโปรแกรม Gel j และรูปแบบของ Dendrogram.....	41
ภาพที่ 27 กลุ่มตัวอย่างประชากรของเชื้อ E. coli.....	47
ภาพที่ 28 เชื้อ E. coli แบ่งตามช่วงอายุ และกลุ่มตัวอย่าง (Specimen type)	48
ภาพที่ 29 การแบ่งกลุ่มตัวอย่างของเชื้อ E. coli โดยใช้เทคนิค Clermont	49
ภาพที่ 30 ผลของการทดสอบ NDP test ที่มีต่อเชื้อที่มีการดื้อยาและไม่ดื้อยาแบบ ESBL	50
ภาพที่ 31 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ E. coli ที่ดื้อยาในกลุ่ม ESBL และกลุ่ม quinolone	51
ภาพที่ 32 แสดงลักษณะรูปแบบแบนดิเอ็นที่แตกต่างกันที่บ่งชี้ subtype ของเชื้อ E. coli สายพันธุ์ ST131 เทียบกับ 100 bp DNA marker (Solis BioDyne)	54
ภาพที่ 33 การแพร่กระจายของเชื้อ E. coli ที่มีการกระจายสูง 4 clade ในแต่ละช่วงเวลา.....	63



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เชื้อ *Escherichia coli* หรือ *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ส่วนล่างของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งโดยปกติเชื้อชนิดนี้ไม่ก่อให้เกิดอันตราย แต่จะมีบางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในระบบทางเดินอาหาร (intestinal infection) เช่น อุจจาระร่วง อาหารเป็นพิษ เป็นต้น และเกิดโรคนอกระบบทางเดินอาหาร (extra-intestinal infection) เช่น ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารกแรกเกิด เป็นต้น ซึ่งมนุษย์สามารถได้รับเชื้อจากการที่มีสัตว์เป็นพาหะ และเกิดการแพร่กระจายไปสู่มนุษย์ในรูปแบบการปนเปื้อนในอาหาร และสิ่งแวดล้อม โดยอาจได้รับเชื้อจากการทานอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ

การติดเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรค (Diarrheagenic *Escherichia coli*) พบได้มากขึ้นในปัจจุบันแพทย์จะทำการรักษาโดยให้ยาต้านจุลชีพ หรือยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ และยาที่ใช้ในการรักษาส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มเบต้า-แลคแตม (Beta-lactams) และกลุ่มควิโนโลน (Quinolone) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง และทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Kim, et al., 2009) แต่เมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เชื้อมีแนวโน้มที่จะเกิดอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มสูงขึ้น

ในปัจจุบันเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อยาที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสม หรือใช้เกินความจำเป็น (พีรพัฒน์ ปัญญาดี และคณะ, 2561) ซึ่งพบว่าเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งในโรงพยาบาลไปจนถึงการติดเชื้อในชุมชน จากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในปี พ.ศ. 2561 จากข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาลจำนวน 92 แห่ง ในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* เป็นจำนวน 98,720 ราย และมีการติดเชื้อ *E. coli* ในโรงพยาบาลจังหวัดพะเยา ปี พ.ศ. 2560 พบที่มีการติดเชื้อจำนวน 1,921 ราย (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2019) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบที่มีการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ โดยสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ คือ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ซึ่งพบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ จึงทำให้เป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพ และการรักษาของมนุษย์ เมื่อเกิดการติดเชื้อจะทำให้ใช้เวลานานในการรักษาจนถึงอาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ (Yasufumi, et al., 2017)

กระบวนการตรวจสอบเชื้อโดยวิธีมาตรฐาน Disk diffusion เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล องค์การพัฒนาระหว่างประเทศ (international development research center :IDRC. 2557) เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาประมาณ 4-6 วันในการตรวจสอบจึงหาวิธีที่รวดเร็วกว่า และใช้เวลาน้อยกว่าในการตรวจสอบจึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาการตรวจเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากโรงพยาบาลจังหวัดพะเยา โดยใช้เทคนิค Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis หรือ MLVA และการตรวจสอบ Virulence gene เพื่อศึกษาการแพร่กระจายและความรุนแรงของเชื้อ *E. coli* ในโรงพยาบาลพะเยาราม จังหวัดพะเยา

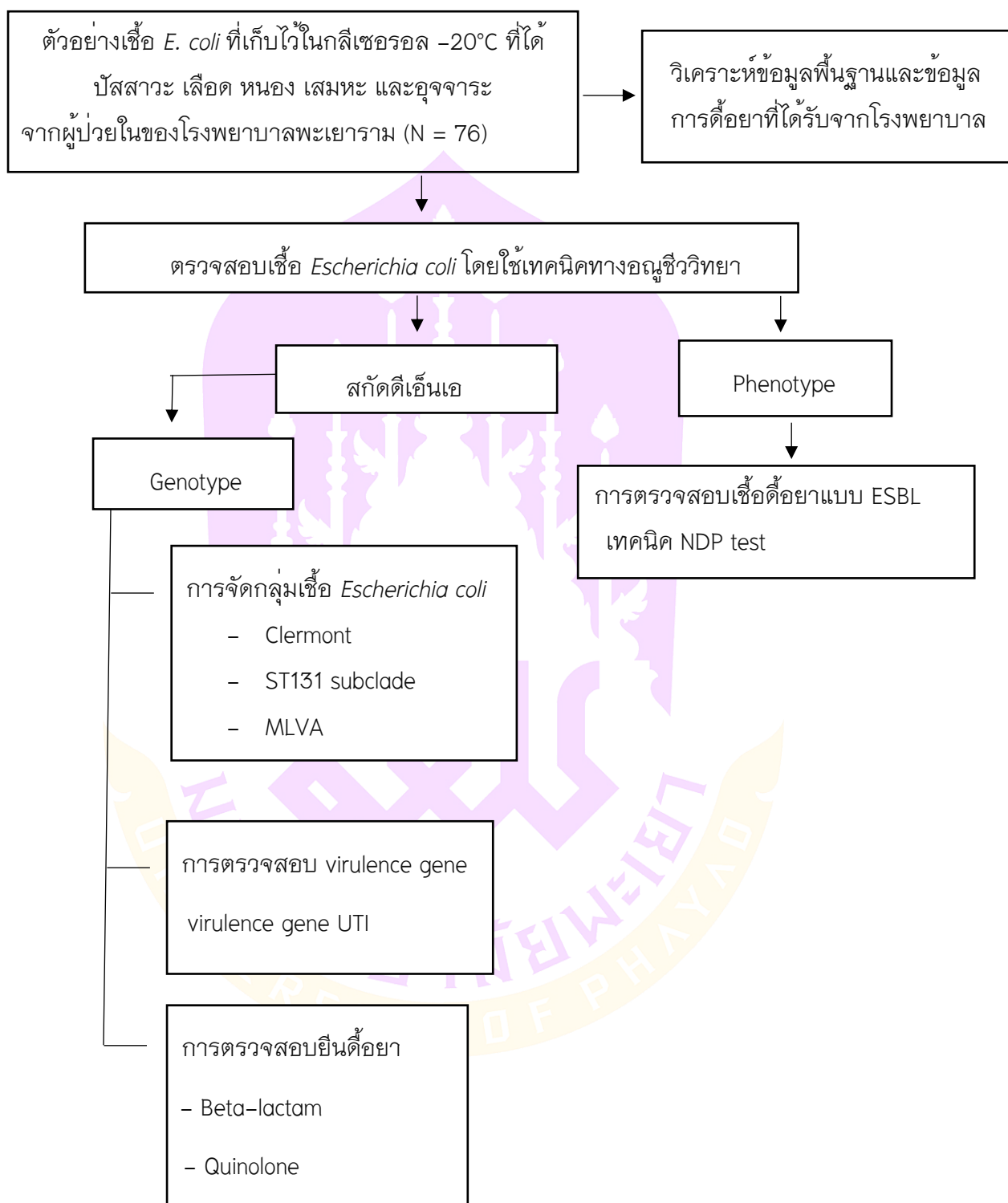
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. การจัดกลุ่มของเชื้อ *Escherichia coli* โดยใช้เทคนิค Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis หรือ MLVA
2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ และ Virulence gene ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI) และการก่อโรคในไก่
3. ตรวจสอบความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI) ของจังหวัดพะเยา ประเทศไทย

1.3 สมมติฐาน

1. เทคนิค Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis หรือ MLVA สามารถการจัดกลุ่มของเชื้อ *E. coli* ได้
2. เชื้อ *E. coli* ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ และการเกิดโรคในไก่ สามารถบ่งชี้โดย Virulence gene ได้
3. เทคนิคทางอณูชีววิทยาสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความชุกของเชื้อ *E. coli* กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะของจังหวัดพะเยา ประเทศไทย

1.4 ขอบเขตงานวิจัย



1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

สามารถจัดกลุ่มของเชื้อ *Escherichia coli* โดยเทคนิค Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) และศึกษาการกระจายของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ จำนวน 76 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยในของโรงพยาบาลพะเยาราม จังหวัดพะเยา ประเทศไทย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora)

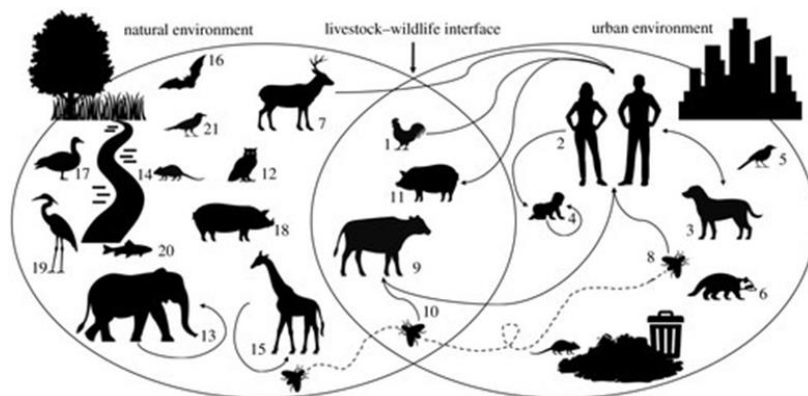
เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น คือเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดโรค เมื่ออยู่ในลำไส้ใหญ่จะเป็นตัวช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) ช่วยย่อยอาหารที่มนุษย์ย่อยไม่ได้หรือย่อยได้ไม่หมด ช่วยดูดซึมสารอาหารและสร้างวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., เป็นต้น ซึ่งเชื้อ *E. coli* เป็นส่วนหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น แต่เมื่อเชื้อชนิดนี้มีการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มจะก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (Acute Diarrhea) นอกจากนี้เมื่อมีการติดเชื้อที่อวัยวะอื่นๆ ของร่างกายจะก่อให้เกิดได้ เช่น การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infections) โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) และการติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) เป็นต้น

2.2 โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonoses)

โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน คือโรคที่เกิดจากการติดเชื้อระหว่างคนและสัตว์ได้ ซึ่งเชื่อนั้นอาจเป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส รวมทั้งปรสิตของสัตว์ ผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อผ่านการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อน เช่น สุกกร โค กระบือ ไก่ เป็ด เป็นต้น หรือมาจากสัตว์เลี้ยงโดยสัมผัสกับสัตว์เลี้ยง จึงมีความเสี่ยงที่จะได้รับ ผ่านการสัมผัส การหายใจ ตัวอย่างของโรค เช่น โรคไข้เลือดออก โรคเชื้อราจากผิวหนังแมว โรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น (Lagerstrom K. et al., 2021)

การแพร่กระจายลงสิ่งแวดล้อมเกิดจากสัตว์ที่มีเชื้อที่อาจก่อให้เกิดโรคหรือได้รับเชื้อจากสัตว์ชนิดอื่นๆ จะสามารถแพร่กระจายเชื้อลงสู่สภาพแวดล้อม และมนุษย์ได้

กระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ทางเศรษฐกิจสามารถกระตุ้นการแพร่เชื้อเป็นวงกว้างได้ เช่น ไก่ หมู การปนเปื้อนของเชื้อเพียงชนิดเดียวสามารถกระจายเชื้อเป็นวงกว้างได้ ซึ่งอาจก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 1) เช่น โรคท้องร่วงเฉียบพลันจากการปนเปื้อนของเนื้อสด

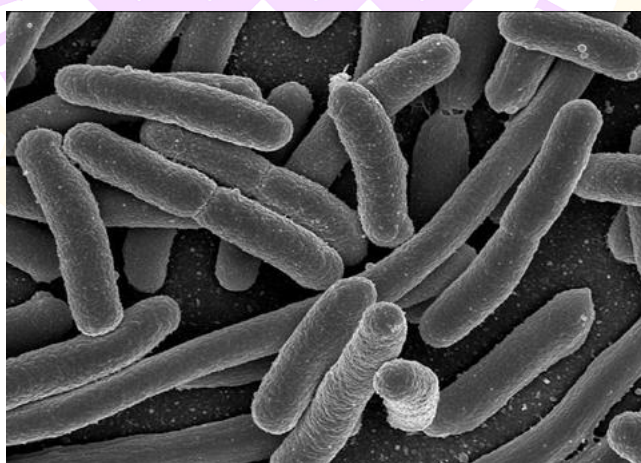


ภาพที่ 1 การแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์สู่คน

ที่มา: Lagerstrom KM and Hadly EA. 2021

2.3 จุลชีววิทยาของ *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E. coli* ถูกค้นพบโดยชาวกุมารแพทย์ชาวเยอรมัน-ออสเตรีย ที่โอดอร์ เอสเชอริช (Theodor Escherich) เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) (ภาพที่ 2) สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่มีการสร้างสปอร์ (non-spore forming) สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้ Peri-thichous flagella สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือที่อุณหภูมิ 35–37 °C ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นทั้ง normal micro biota และ pathogen (Hammadi, et al., 2021)

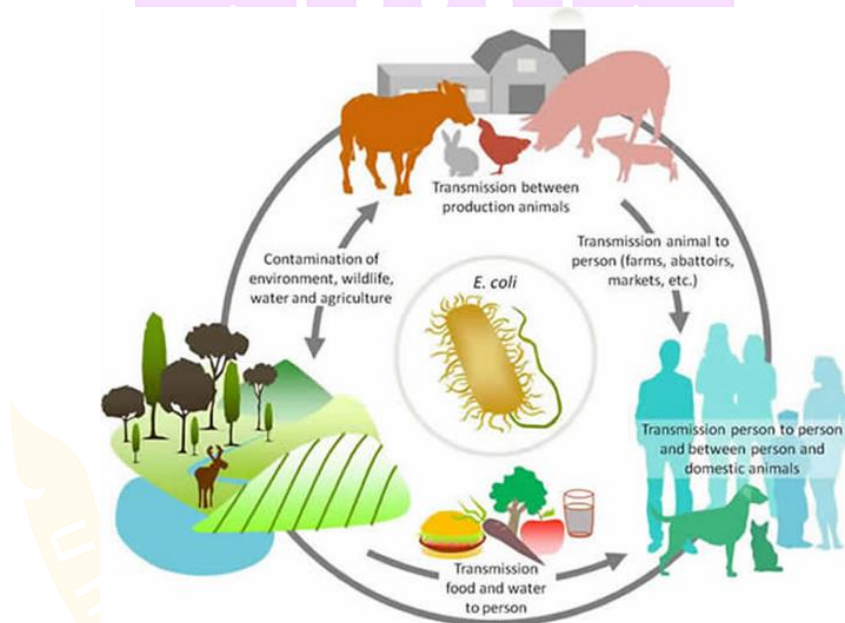


ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อ *Escherichia coli*

ที่มา: Hammadi, et al., 2021

2.4 ระบาดวิทยาและการติดเชื้อของ *E. coli* (Epidemiology and *E. coli* Infection)

สัตว์และคนเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ผ่านทางการบริโภคอาหารหรือน้ำเชื้อจะเข้าไปอาศัยอยู่บริเวณของลำไส้ใหญ่ เชื้อ *E. coli* ที่สามารถทำให้เกิดโรคจะสามารถแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อมรวมถึงน้ำดื่มและอาหารผ่านทางอุจจาระของสัตว์ จึงมีผลทำให้มีการปนเปื้อนและเกิดการติดเชื้อของผู้ป่วย (Charactera. 2004) เนื่องจากการกินอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงสุก หรือเครื่องดื่มที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ เช่น ผัก ผลไม้ นมดิบ น้ำผลไม้ เนือบด หรือคนที่สัมผัสกับสัตว์ที่ได้รับเชื้อก่อโรค (ภาพที่ 3) ซึ่งเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวทำให้เกิดโรคท้องเสีย (acute diarrhea) ซึ่งจะมีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ อาเจียนหรืออาเจมิใช้ ซึ่งการกระจายของเชือดังกล่าวอาจทำให้เกิดการระบาดในประชากรได้อย่างรวดเร็ว (Ganesh Adhikari. 2016)

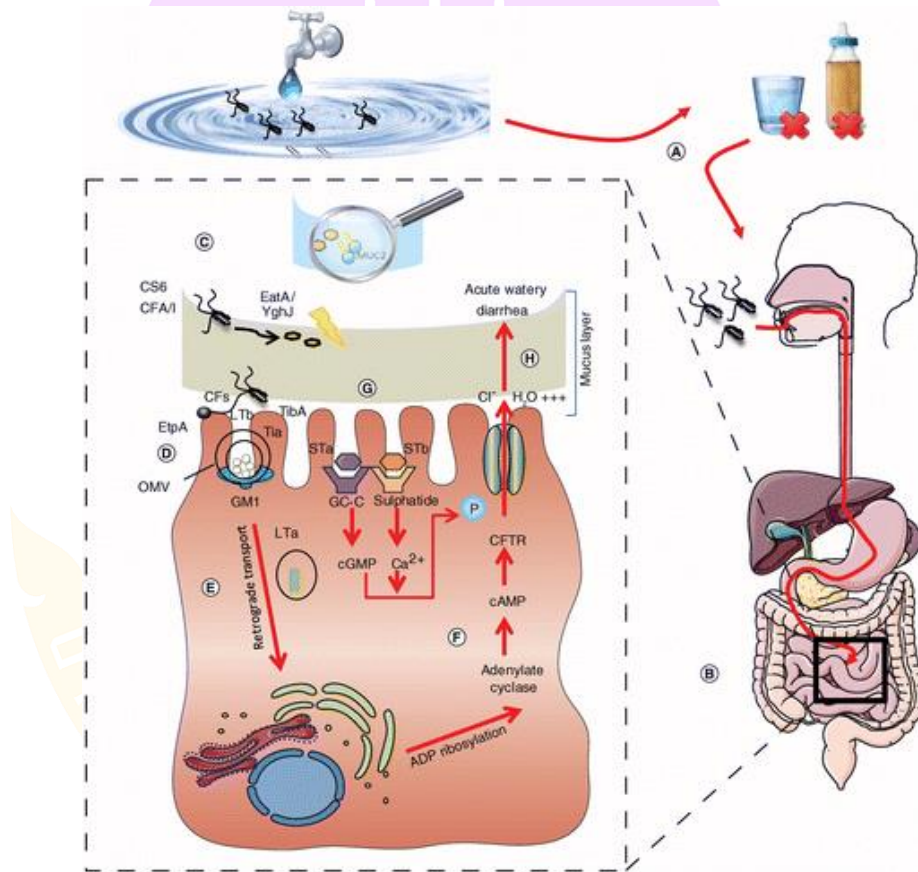


ภาพที่ 3 การแพร่กระจายและการระบาดของเชื้อ *E. coli*

ที่มา: Ganesh Adhikari. 2016

2.5 กลไกการติดเชื้อโดยทั่วไปของเชื้อ *E. coli* (pathogenicity of *E. coli* infection)

การติดเชื้อของเชื้อ *E. coli* ของคนหรือสัตว์สามารถทำให้เกิดการท้องเสีย (acute diarrhea) และเชื้อจะเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะเข้าไปอาศัยอยู่บริเวณลำไส้ใหญ่ และเข้าไปเกาะติดกับผนังเซลล์ของลำไส้ใหญ่ จากนั้นแบคทีเรียจะใช้สารแอดฮีซิน (Adhesin) ไปจับกับรีเซพเตอร์ (Receptor) ของลำไส้ใหญ่ และทำการปล่อยสารที่ออกซิน (Toxins) ทำให้เซลล์เยื่อบุลำไส้เกิดการขับน้ำมากกว่าปกติ ร่างกายเกิดภาวะขาดน้ำ (Dehydration) (ภาพที่ 4) และในบางกรณีเชื้ออาจเข้าสู่กระแสเลือดได้ทำให้อาจก่อให้เกิดความรุนแรงมากขึ้น (Roussel C. et al., 2017)



ภาพที่ 4 กลไกการติดเชื้อโดยทั่วไปของ *Escherichia coli*

ที่มา: Roussel C. et al., 2017

2.6 โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *E. coli*

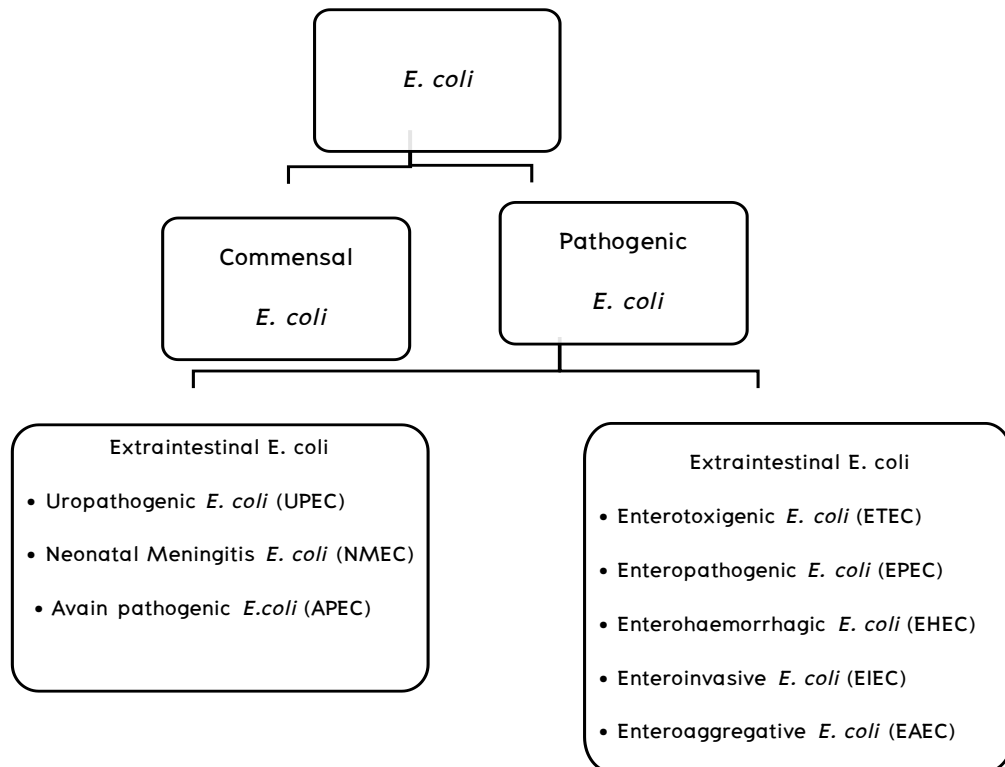
โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่มักทำให้เกิดโรคท้องเสียเฉียบพลัน (Acute diarrhea) คือ กลุ่มอาการที่มีการถ่ายอุจจาระเหลวหรือเป็นน้ำ อาจมีอาการอาเจียนหรือใช้ร่วมด้วย เชื้อ *E. coli* ปกติจะพบได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ และไม่ก่อให้เกิดโรค (normal flora) แต่เชื้อ *E. coli* บางประเภททำให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงมากขึ้น ผู้ที่ได้รับเชื้อจะก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ต่ำร่วมด้วย และอาจรุนแรงถึงขั้นมีอาการปวดบิด ถ่ายเป็นมูกเลือด และมีอาการแทรกซ้อน หรือเมื่อมีการติดเชื้อที่ส่วนอื่นๆ ของร่างกาย เช่น เกิดโรคติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary Tract Infection: UTI) และที่เยื่อหุ้มสมองของทารกทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารกแรกเกิด (Neonatal meningitis *E. coli* : NMEC) เป็นต้น

นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* ยังก่อให้เกิดโรคในสัตว์ได้ เช่น สุกร ไก่ เป็ด นก เป็นต้น โดยเมื่อมีการติดเชื้อในสุกรจะมีอาการท้องเสียถ่ายเป็นน้ำ เปื่อยอาหาร ซึมและตาย ส่วนในสัตว์ปีก จะมีอาการตาอักเสบ กระจกตาอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ถ้ามีการติดเชื้อเฉพาะแห่งจะทำให้เกิดอาการเยื่อหุ้มข้ออักเสบ กระดูกและไขกระดูกอักเสบ ติดเชื้อในลำไส้ เป็นต้น

2.7 การจัดกลุ่มเชื้อ *E. coli* ตามลักษณะอาการและกลไกของเชื้อ (Classification of *E. coli*)

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) หรือ commensal *E. coli* ที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรค แต่บางสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ก่อให้เกิดโรค (pathogenic *E. coli*) แบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร (intestinal infection) ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงเฉียบพลัน และเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหาร (extra-intestinal infection) ก่อให้เกิดติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (UPEC) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็ก (NMEC) ดังแสดงในภาพที่ 5

Escherichia coli pathotypes



ภาพที่ 5 การแบ่งกลุ่มของเชื้อ *E. coli*

ดัดแปลงมาจาก: Nishant Nandanwar. 2013

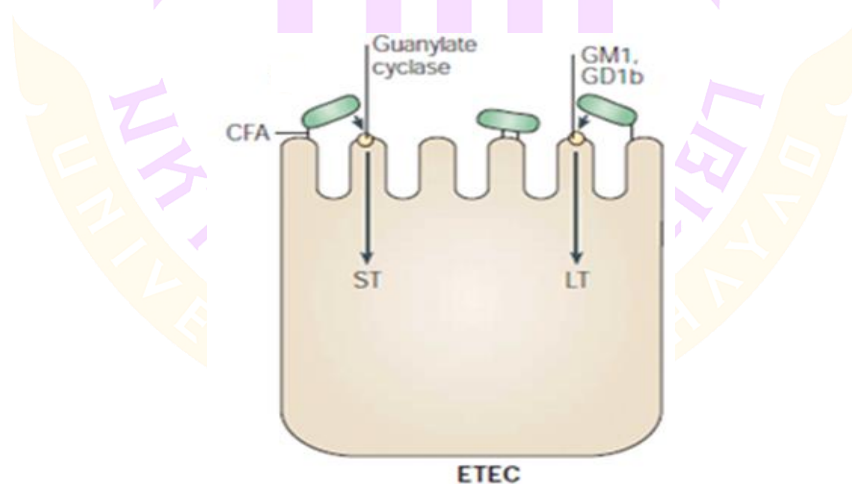
2.7.1 กลุ่มเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร (Intestinal infection)

Pathogenic *E. coli* สามารถแบ่งตามลักษณะอาการและกลไกการเกิดโรค แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

1) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

ETEC เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในมนุษย์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) และการมีพิมเบรีย (Fimbria) ตัวอย่างซีโรไทป์ ได้แก่ O6:H16, O8:H9, O15:H11, O85:H7, O63:H12 ฯลฯ

กลไกการเกิดโรคของเชื้อ *E. coli* ชนิด ETEC จะมีการสร้างสารพิษที่ชื่อว่า เอนเทอโรทอกซิน 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดทนความร้อน (heat-stable toxin : ST) และชนิดไม่ทนความร้อน (heat-labile toxin : LT) เชื้อจะมีพิมเบรียชนิด mannose-resistance (MR fimbriae) เกาะติดกับผนังลำไส้ (colonization factor) และหลัง ST กระตุ้นเอนไซม์กัวนิเลตไซเคเลส (guanylate cyclase) ให้สร้าง cyclic guanosine monophosphate (cGMP) (Mariaulta, et al., 2019) ทำให้มีการขับสารเกลือแร่และน้ำเข้าสู่ลำไส้ และ LT-I จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กัวนิเลตไซเคเลส ทำให้เกิดการเปลี่ยน adenosine triphosphate (ATP) เป็น cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ส่งผลให้เกิด การขับสารเกลือแร่ และน้ำออกสู่ลำไส้ใหญ่ในปริมาณมาก (ภาพที่ 6) ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วงเป็นน้ำคล้ายอหิวาตกโรค ปวดท้องรุนแรง และมีไข้ต่ำ อาการอาจจะรุนแรงแต่ไม่ถึงกับเสียชีวิต (Chattaway, Marie. 2015)



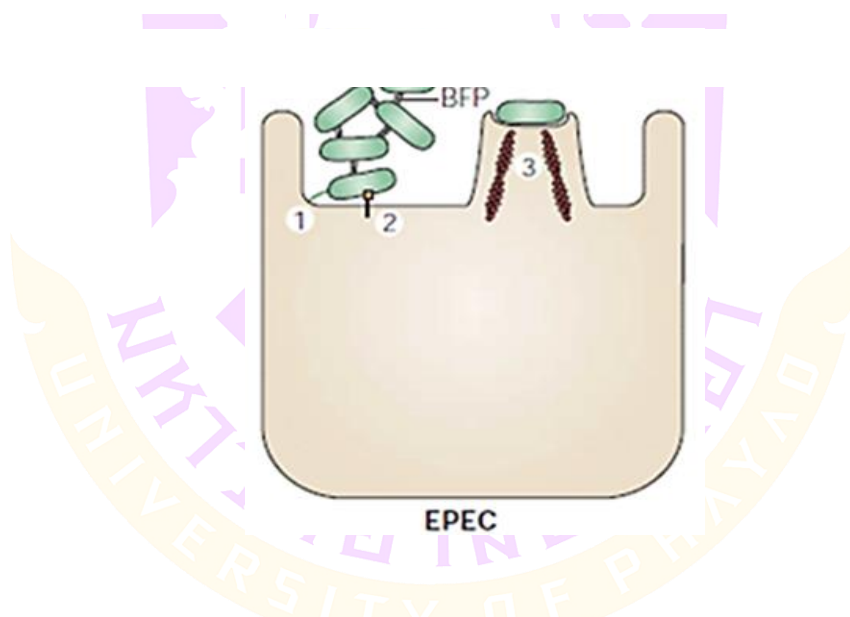
ภาพที่ 6 กลไกการเกิดโรค Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

ดัดแปลงมาจาก: Chattaway, Marie. 2015

2) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

EPEC เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในเด็กทารก (infantile diarrhea) เป็นสายพันธุ์ที่เกาะติดเซลล์เยื่อเมือกลำไส้ใหญ่โดยใช้พิลไล (pili) และมีการสร้างอินทิมีน (intimin) ตัวอย่างซีโรไทป์ เช่น O26:H11, O55:H6, O88:H25, O157:H8, O127:H2 ฯลฯ

กลไกการเกิดโรคเกิดจาก EPEC adherence factor (EAF) เกาะติด Hep-2 cells ยีน *eae* บนโครโมโซมที่ควบคุมการสร้างโปรตีนอินทิมีน (intimin) ทำให้เซลล์สามารถเกาะติดผนังของลำไส้ใหญ่ และเกิดการเรียงตัวใหม่ของไซโทสเกเลตัน (cytoskeleton) และสายแอกทิน (filamentous actin) ภายใต้อบริเวณที่แบคทีเรียเกาะอยู่ ทำให้เกิดการทำลายไมโครวิลไล (microvilli) จนเกิดรอยร้าวเรียกว่า attaching and effacing lesion เรียกกลไกนี้ว่า attachment and effacement (ภาพที่ 7) (Mariaulfa, et al., 2019) ผู้ป่วยเกิดอาการ มีไข้ หนาวสั่น ปวดศีรษะ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วงเป็นน้ำมีมูกปน มีอาการขาดน้ำ และช็อค เนื่องจากเซลล์ชั้นน้ำออกในปริมาณมาก อาจทำให้เกิดการเสียชีวิตเนื่องจากภาวะขาดน้ำ (Chattaway, Marie. 2015)



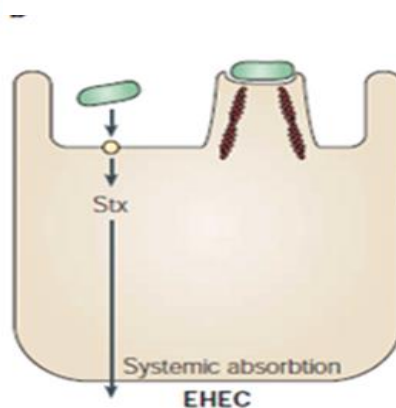
ภาพที่ 7 กลไกการเกิดโรค Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

ดัดแปลงมาจาก: Chattaway, Marie. 2015

3) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

EHEC หรือ Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) เป็นเชื้อที่มีการสร้าง Verotoxin ที่สามารถทำลาย Vero cell ซึ่งจะคล้ายกับสารพิษของเชื้อ *Shigella* spp. ตัวอย่างซีโรไทป์ เช่น O113:H21, O118:H12, O128:H2 และ O157:H7

กลไกการเกิดโรคเกิดจากสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นคล้ายกับสารพิษที่สร้างจากเชื้อ *Shigella* spp. (ภาพที่ 8) (Mariaulfa, et al., 2019) ทำให้เกิดความเสียหายให้แก่เยื่อของลำไส้ อูจจาระร่วงเป็นน้ำจนถึงถ่ายเป็นเลือด (hemorrhagic colitis) มีอาการปวดท้องอย่างรุนแรง อาเจียน มีไข้ แต่บางรายสารพิษอาจไปทำลายไตจะมีอาการ hemolytic uremic syndrome (HUS) แพทย์ช้อน คือ โลหิตจาง (hemolytic anemia) เกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) และไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) (Chattaway, Marie. 2015)



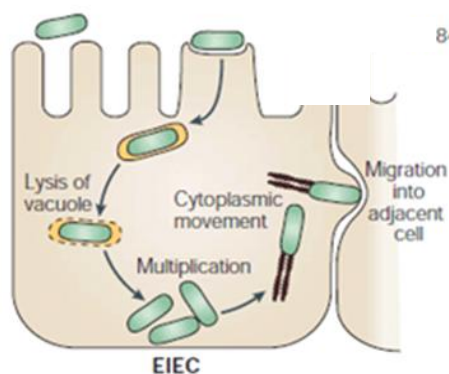
ภาพที่ 8 กลไกการเกิดโรค Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

ดัดแปลงมาจาก: Chattaway, Marie. 2015

4) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

EIEC เป็นกลุ่มเชื้อ *E. coli* ที่สามารถเข้าสู่เซลล์เยื่อลำไส้ใหญ่และหลบเลี่ยงการถูกทำลายโดย phagosome จึงทำให้สามารถแบ่งตัวและกระจายไปยังเซลล์อื่น ๆ ตัวอย่างซีโรไทป์ได้แก่ O115, O121, O135, O136 O143, O144 ฯลฯ

กลไกการเกิดโรคเกิดจากเชื้อสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของผนังลำไส้ใหญ่ทำให้มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนที่ชั้นเยื่อเมือก (mucosa, submucosa) ทำลายเซลล์จนตายและบุกรุกไปยังเซลล์ข้างเคียง (ภาพที่ 9) (Mariaulfa et al. 2019) ผู้ป่วยมักเป็นเด็กทำให้มีอาการมีไข้ ปวดท้อง อูจจาระมีมูกและเลือดปน (Chattaway, Marie. 2015)



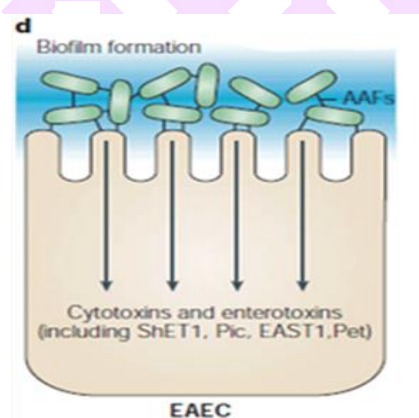
ภาพที่ 9 กลไกการเกิดโรค Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

ดัดแปลงมาจาก: Chattaway, Marie. 2015

5) Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

EAEC คือ เชื้อที่สามารถเกาะติดเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้โดยใช้ fimbriae ทำให้เชื้อเรียงต่อกันคล้ายกับก้อนอิฐ (biofilm) ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเรื้อรังในเด็กและผู้ใหญ่ ตัวอย่างซีโรไทป์ ได้แก่ O3:H2, O15:H8, O44:H18, O86, O111:H12 และ O125:H9

กลไกการเกิดโรคเกิดจากการจับกับเซลล์แบบ (aggregative adherence pattern) เชื้อมีการปล่อยสารพิษและกระตุ้นการอักเสบของลำไส้เป็นพิษต่อเยื่อเมือกในลำไส้ โดยมี พลาสมิดควบคุมการสร้างพิมเบรียชนิด aggregative adherence fimbriae I และมีการสร้าง ShET1, Pic, EAST1 และ Pet (ภาพที่ 10) (Chattaway, Marie. 2015)



ภาพที่ 10 กลไกการเกิดโรค Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

ดัดแปลงมาจาก: Chattaway, Marie. 2015

เชื้อ *E. coli* สามารถแบ่งตามคุณสมบัติที่ทำให้เกิดโรคเป็น 5 กลุ่ม มีกลไกที่ก่อให้เกิดโรคและอาการที่แตกต่างกัน และมีลักษณะของความรุนแรง ที่แตกต่างกันดัง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 กลไกการเกิดโรคและลักษณะความรุนแรงเชื้อ *E. coli* 5 กลุ่ม

Strain	Lesion	Signs	Virulence Characteristic
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	Adhere using fimbria and produce heat-labile (LT) and/or heat - stable (ST) toxins	Diarrhea	LT and ST production
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	Lesion Attaching and effacing lesions (effacement of microvilli and pedestal formation)	Watery diarrhea	<i>eaeA</i> gene (encodes intimin)
Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)	Produce Shiga-like toxins (verotoxin) that cause vascular endothelial damage also produce attaching and effacing lesions	Diarrhea, hemorrhagic colitis, hemolytic-uremic syndrom	Shiga-like toxin production, see also EPEC
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Actively invade colonie epithelial cells	Large bowel diarrhea	Plasmid-encoded invasion genes such as <i>ipaH</i>
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (EAEC)	Adhere to intestinal epithelium via fimbriae and aggregate in bricklike fashion	Presistant watery diarrhea in humans	<i>aggR</i> gene

ดัดแปลงมาจาก: Jane, et al., 1885

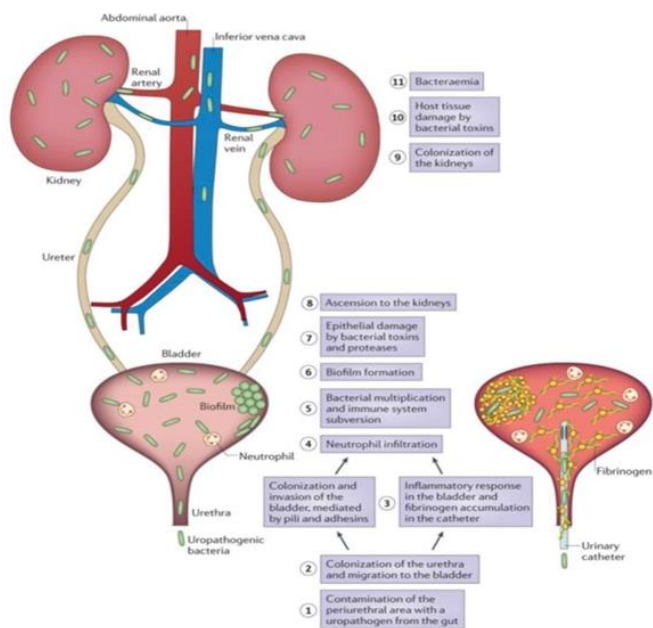
2.7.2 กลุ่มเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหาร (extra-intestinal infection)

เชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคนอกระบบทางอาหาร เกิดจากเชื้อมีการเคลื่อนที่จากลำไส้ใหญ่เข้าสู่อวัยวะอื่น ๆ ภายในร่างกายทำให้เกิดการติดเชื้อ ดังนี้

1) การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary Tract Infection: UTI)

Urinary Tract Infection (UTI) คือ การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *E. coli* ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ และอุจจาระ เกิดการเคลื่อนที่ไปยังทางเดินปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะ จากนั้นเชื้อจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ตรวจพบเชื้อในปัสสาวะ (Bacteriuria) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถเคลื่อนที่ไปยังไตและเข้าสู่ระบบเลือดได้ (Balayneh Regasa, 2018)

กลไกการติดเชื้อคือกลุ่มเชื้อ *E. coli* จะมีการสร้างแอดฮีซินพีพีไล สำหรับเกาะเซลล์เยื่อบุทางเดินปัสสาวะ (uroepithelial cell) และมีแอลฟาฮีโมไลซิน (alpha hemolysin) ทำลายเม็ดเลือดแดงและแอโรแบคทีน (aerobactin) เป็นตัวแย่งจับกับธาตุเหล็กจากเซลล์เจ้าบ้าน (ภาพที่ 11) ซึ่งเมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อจะทำให้เกิดอาการกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (Flores-Mireles, et al., 2015)



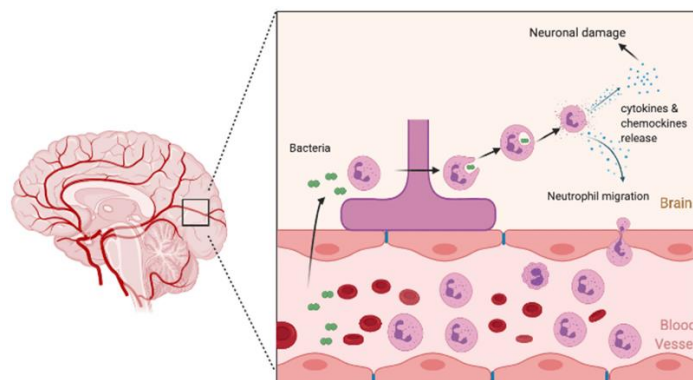
ภาพที่ 11 กลไกการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ

ที่มา: Flores–Mireles, A. 2015

2) การติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมองของเด็กทารกจากเชื้อ *E. coli* หรือ Neonatal meningitis *E. coli* (NMEC)

NMEC ทำให้เกิดการติดเชื้อของเยื่อหุ้มสมองในเด็กแรกเกิดทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งเด็กทารกแรกเกิดได้รับจากมารดาเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจหรือทางเดินอาหารของทารก

NMEC สามารถสร้างแอนติเจนชนิดเค 1 (K1 capsule antigen) ที่ช่วยป้องกันการถูกกินจากเซลล์เม็ดเลือดขาว และการถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย จากนั้นจะผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดไปยังเยื่อหุ้มสมอง (ภาพที่ 12) อาการไข้สูง คอแข็ง คลื่นไส้อาเจียน ความดันต่ำ การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าแลกแทมส์ (Beta-lactams) แต่หลังจากการรักษาอาจเกิดอาการแทรกซ้อน เช่น หูหนวก ชัก หรือตาบอด (Zaniel, et al., 2021)

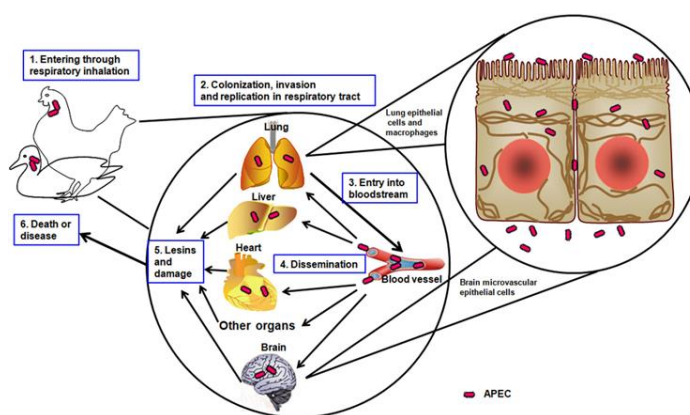


ภาพที่ 12 กลไกการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็ก

ที่มา: Zainel Abdulwahed, et al., 2021

3) การติดเชื้อของสัตว์ปีกจากเชื้อ *E.coli* (Avian Pathogenic *Escherichia coli* :APEC)

Avian Pathogenic *Escherichia coli*: APEC เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ปีก และสามารถติดเชื้อได้ทางระบบทางเดินหายใจกระจายเข้าสู่ ปอด เส้นเลือดและกระจายไปยัง ตับ หัวใจ สมอง ทำให้สัตว์ที่มีการติดเชื้อตายในที่สุด (ภาพที่ 13) (Jiangang Hu, et al., 2022)



ภาพที่ 13 กลไกการติดเชื้อในสัตว์ปีก

ที่มา: Jiangang Hu, et al., 2022

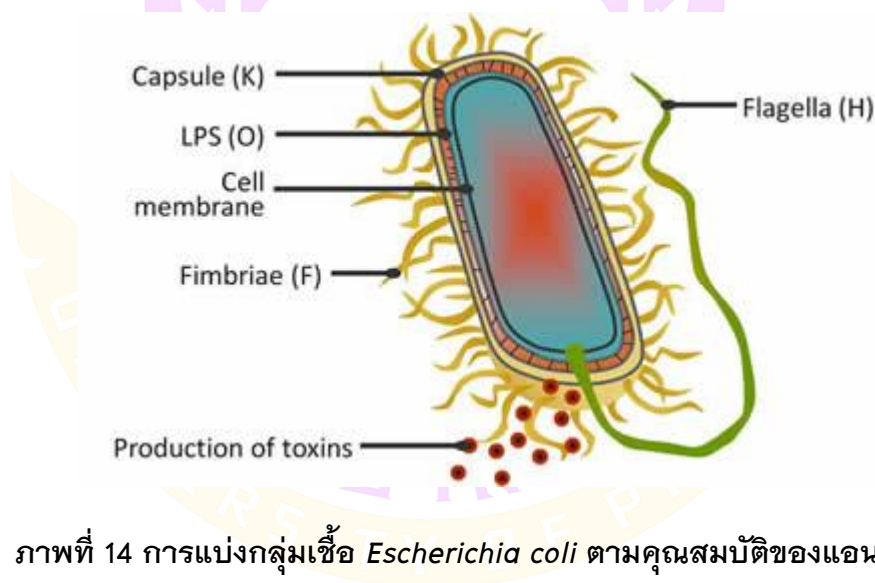
2.8 การจัดกลุ่มของเชื้อ *Escherichia coli* ตามความแตกต่างของเชื้อ

การจัดกลุ่มของเชื้อ *Escherichia coli* สามารถแบ่งตามความแตกต่างของเชื้อ เช่น ความแตกต่างของแอนติเจนหรือลักษณะความแตกต่างของดีเอ็นเอ

2.8.1 การแบ่งกลุ่มของเชื้อ *E. coli* ตามความแตกต่างของแอนติเจน (phenotyping classification)

แอนติเจน คือ สารชีวโมเลกุลที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบ lipopolysaccharide พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์, Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบ polysaccharide มักพบห่อหุ้มเซลล์ เช่น capsule, envelope และ Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของ flagella ประกอบด้วย protein ที่เรียกว่า flagellin (ภาพที่ 14) เชื้อที่แตกต่างกันจะมีลักษณะของแอนติเจน O, H และ K ที่แตกต่างกัน (กฤติกา ดำมณี, 2558)

ตัวอย่างการเรียกชื่อ *E. coli* ตามรูปแบบที่แตกต่างต่างกันของแอนติเจน เขียนได้ ดังนี้ O1:K13:H1, O2:K1:H4, O1:K1:H7, O6:K5:H1



ภาพที่ 14 การแบ่งกลุ่มเชื้อ *Escherichia coli* ตามคุณสมบัติของแอนติเจน

ที่มา: Caractéra, et al., 2004

ตารางแสดงความสัมพันธ์ของการเรียกชื่อเชื้อ *E. coli* ตามความแตกต่างของแอนติเจน และการเรียกชื่อตามกลไกของการเกิดโรค ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของกลุ่ม *E. coli* ที่แบ่งตามอาการและความแตกต่างของแอนติเจน

DEC category ^a	O subgroup	Serotypes
t-EPEC, EAEC	O111ab	H2, H10
EHEC, a-EPEC	O111ac	H8, H9
EAEC	O125ab	H9, H21
a-EPEC	O125ac	H6
a-EPEC, EAEC	O128ab	H2, H35
EPEC	O128ac	H12, H7

^a: see text

ที่มา: Leila C Campos, et al., 2004

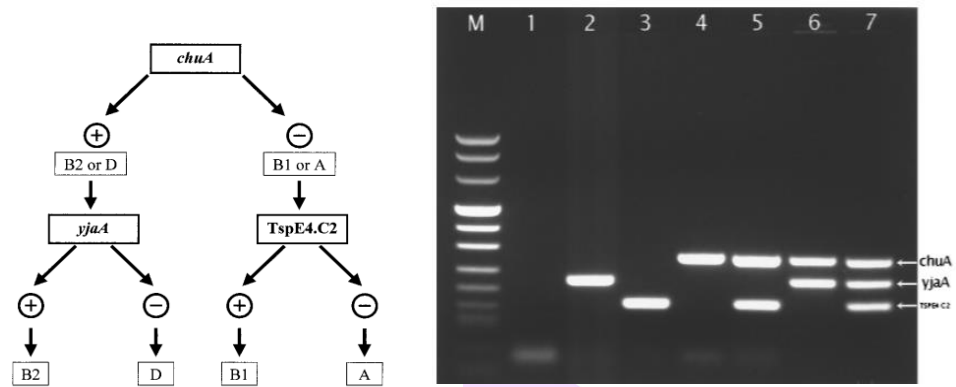
2.8.2 การแบ่งของเชื้อ *Escherichia coli* โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา (Genotyping classification)

เชื้อ *E. coli* มีความหลากหลายหลายทางดีเอ็นเอสามารถใช้เทคนิคทางอณูวิทยาเพื่อใช้ในการจัดกลุ่มของเชื้ออีโคไล เช่น เทคนิค Clermont, Multilocus Sequence Type (MLST), Pulsed-field gel Electrophoresis (PFGE), Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) และ Whole genome sequencing (WGS)

1) เทคนิค Clermont

เทคนิค Clermont เป็นการตรวจวิเคราะห์ทางอณูวิทยา ที่อาศัยความแตกต่างของยีน 3 ชนิด คือ *chuA*, *yjaA* และ DNA fragment TSPE4.C2 โดยยีน *chuA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง heme ใน enterohemorrhagic O157: H7 *E. coli* ส่วน *yjaA* เป็นยีนที่ระบุอยู่ในจีโนมของ *E. coli* K-12 และ TSPE4.C2 เป็น DNA fragment (Clermont, et al., 2000)

ซึ่งเทคนิคนี้จะสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อ *E. coli* โดยใช้ไพรเมอร์ (specific primer) 3 คู่ ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อ *E. coli* ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ A, B1, B2 และ D (ภาพที่ 15)

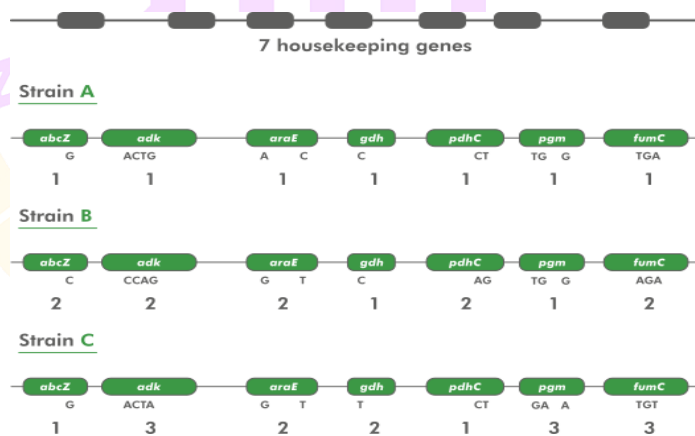


ภาพที่ 15 การจัดกลุ่มของเชื้อ *Escherichia coli* โดยใช้เทคนิค Clermont

ที่มา: Clermont, et al., 2000

2) เทคนิค Multilocus Sequence Type หรือ MLST

เทคนิค Multilocus Sequence Type หรือ MLST เป็นวิธีทางอณูวิทยาศาสตร์ที่แบ่งกลุ่ม *E. coli* ออกเป็น sequence type หรือ ST อาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของ 7 ยีน (housekeeping gene) ขนาด 450–500 คู่เบส ซึ่งในแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรียจะมีอัลลีลที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ซึ่งจะถูกระบุเป็น allelic profile และกำหนดเป็น sequence type, ST (BioMérieux SA, et al., 2024) ดังแสดงในภาพที่ 16

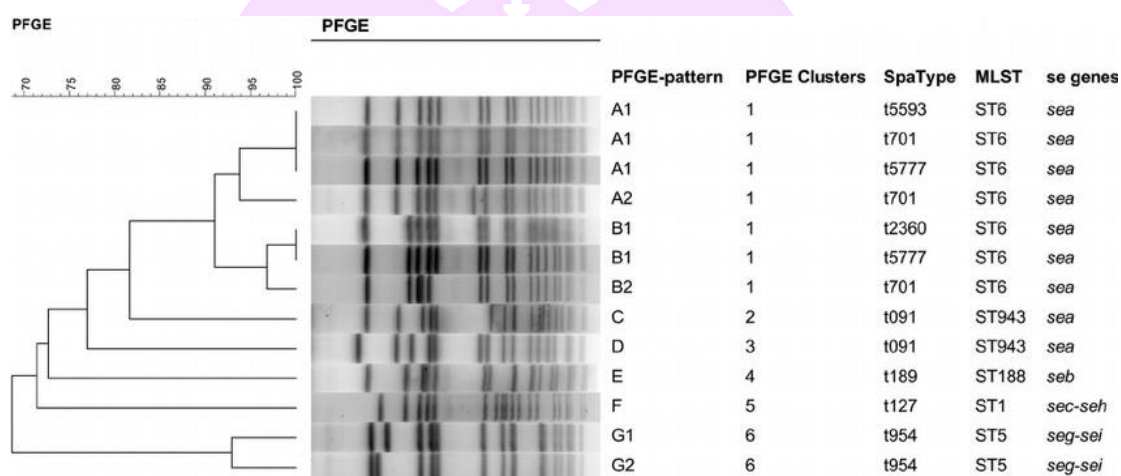


ภาพที่ 16 ความแตกต่างของแบคทีเรียที่มี sequence type ต่างกัน

ที่มา: BioMérieux SA, et al., 2024

3) เทคนิค Pulsed-field Gel Electrophoresis หรือ PFGE

เทคนิค Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงใช้ในการแยกและวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยจะอาศัยการทำงานของ restriction enzyme ในการตัดย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียในตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งทำให้เกิดดีเอ็นเอหลายขนาด โดยการแยกขนาดของดีเอ็นเอจะอาศัยการสลับขั้วของสนามไฟฟ้าทั้งสองด้าน จากนั้นจึงนำมาสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอเฉพาะของเชื้อ (PFGE-pattern) (Yan, et al., 2012) ดังแสดงในภาพที่ 17 แต่เทคนิคนี้ใช้เวลาาน และค่าวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง

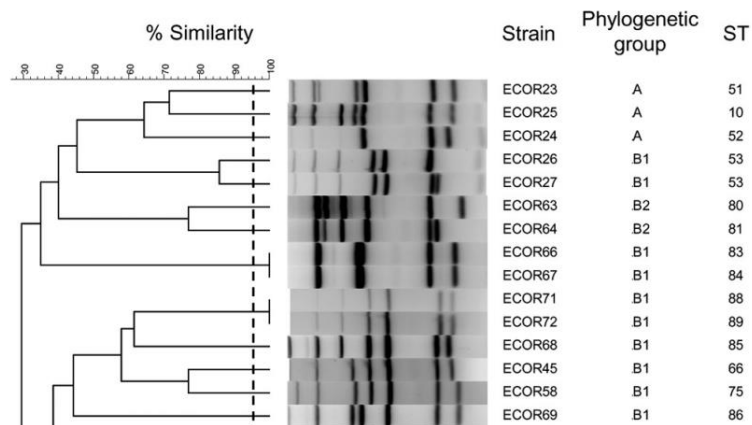


ภาพที่ 17 ความแตกต่างของแบคทีเรียที่มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

ที่มา: Yan, et al., 2012

4) เทคนิค Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

เทคนิค Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยวิเคราะห์จากความแตกต่างของจำนวน variable number tandem repeat (VNTR) คือบริเวณ DNA ที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสจำนวนสั้นๆ ซึ่งมีลักษณะความแตกต่างของก๊อบปีในจีโนมของแบคทีเรีย (Caméléna, et al., 2019) ตัวอย่างเทคนิคที่วิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวและจำนวนของ VNTR 7 ตำแหน่งที่แตกต่างกันซึ่งสามารถทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 18 ซึ่งเทคนิคนี้จะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อมีการวิเคราะห์ VNTR หลายตำแหน่ง

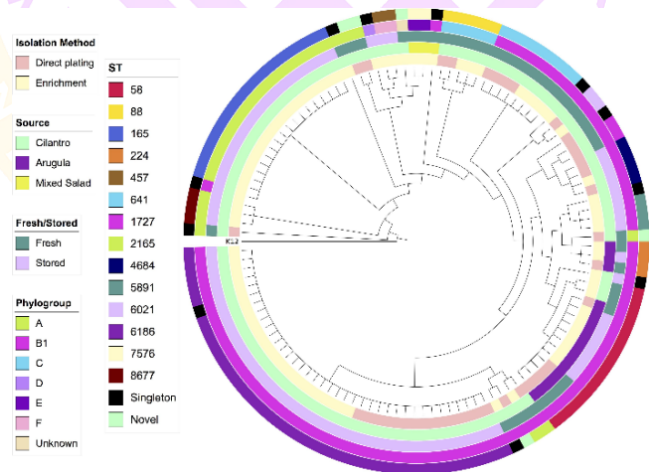


ภาพที่ 18 ลักษณะรูปแบบของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค MLVA

ที่มา: Caméléna, et al., 2019

5) เทคนิค Whole genome sequencing (WGS)

เทคนิค Whole genome sequencing (WGS) เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของ DNA ทั้งจีโนม (genome) ซึ่งมีความยาวถึง 5 ล้านลำดับเบส วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำให้ได้ข้อมูลยีนทั้งหมดของดีเอ็นเอ (Reid, et al., 2020) เช่น ยีนก่อโรค Virulence gene และ พลาสมิด ซึ่งวิธีนี้เป็น การ typing ของแบคทีเรียที่ดีที่สุดในปัจจุบัน และสามารถนำมาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ปัจจุบันนี้เริ่มเป็นที่นิยม เนื่องจากราคาที่ถูกลง และได้ข้อมูลครบถ้วน ดังแสดงใน ภาพที่ 19



ภาพที่ 19 phylogenetic tree ที่ได้จากการทำ Whole genome sequencing (WGS) ของเชื้อ *E. coli*

ที่มา: Cameron J. Reid J. C. et al., 2020

2.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคและ Virulence gene

Virulence gene เป็นยีนที่ทำให้เชื้อ *E. coli* สามารถก่อให้เกิดโรคได้ การแบ่งของ virulence gene สามารถแบ่งได้ตามหน้าที่ของโปรตีน ได้ดังนี้

- 1) Adhesion เป็นโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์โฮสต์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *papC*, *fimH*, *tsh* (Oliveira S. E. et al., 2019)
- 2) Protectins /capsule เป็นโปรตีนที่ช่วยในการปกป้องเชื้อแบคทีเรียจากการถูกกินของเซลล์เม็ดเลือดขาว (anti phagocytosis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *kpsMTII*, *kpsMTIII* (Hasan N. R. et al., 2022)
- 3) Serum resistance เป็นโปรตีนที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้โดยไม่ถูกทำลาย ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *iss*, *traT* (Oliveira S. E. et al., 2019)
- 4) Iron-related เป็นโปรตีนที่ในการแย่งจับกับธาตุเหล็กกับ heme หรือ iron chelating protein ของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *iucC*, *iron*, *fyuA*, *i*, *iucD*, *irp2*, *iutA*, *sitA* (AvilaOliveira ESI, et al., 2019)
- 5) Toxins เป็นโปรตีนที่มีทำหน้าที่ทำลายเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *vat*, *astA* (AvilaOliveira ESI, et al., 2019)
- 6) Colicins เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *cvaA*, *cvaB* (AvilaOliveira ESI, et al., 2019)
- 7) Miscellaneous เป็นโปรตีนที่ผลิตมาเพื่อทำหน้าที่อื่น ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *ompT*, *cvaC* (Oliveira S. E. et al., 2019) (AvilaOliveira ESI, et al., 2019)
- 8) Hemolysin เป็นโปรตีนที่มีการสร้างรูพรุน ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีน *hlyF* (Kanokporn Pantong. 2021)

โดย virulence gene จำนวน 4 ยีน คือ *yfcV*, *vat*, *fyuA* และ *chuA* มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *E. coli* กลุ่ม UPEC ที่ได้จากผู้ป่วยติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ และเชื้อ *E. coli* กลุ่มอื่นๆ จำนวน 458 ตัวอย่าง และได้มีการพัฒนาวิธี multiplex PCR เพื่อทำการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* กลุ่ม UPEC ซึ่งพบ 4 ยีนดังกล่าว (Rachel R Spurberk, et al., 2012)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษา virulence gene จำนวน 5 ยีน คือ *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, และ *ompT* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในสัตว์ปีก โดยศึกษาเชื้อ *E. coli* กลุ่ม APEC จำนวน 124 ตัวอย่าง โดย 5 ยีนดังกล่าวถูกนำมาพัฒนาวิธี multiplex PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบ (Stromberg ZR. 2017)

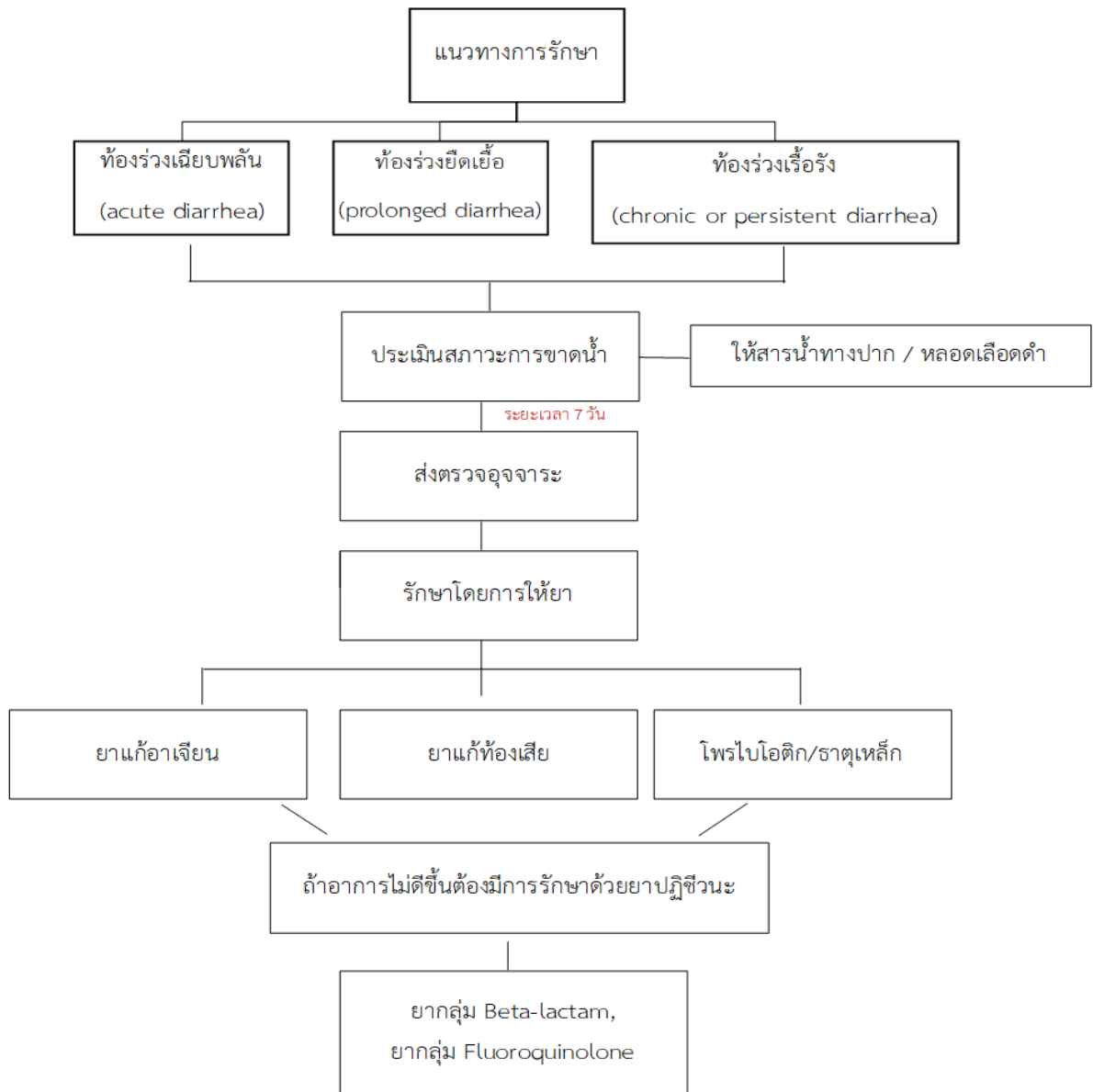
2.10 แนวทางการรักษาการติดเชื้อ *E. coli* (Treatment *E. coli* infection)

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้เมื่อมีการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม หรือมีการติดเชื้อที่ส่วนอื่นๆของร่างกาย

การติดเชื้อ *E. coli* มักเกิดในระบบทางเดินอาหารจะทำให้เกิดอาการท้องเสีย โดยจะแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ ท้องร่วงเฉียบพลัน (acute diarrhea) หมายถึงท้องร่วงที่เป็นมาไม่เกิน 7 วัน ท้องร่วงยืดเยื้อ (prolonged diarrhea) หมายถึงท้องร่วงที่เป็นนาน 8-13 วัน ท้องร่วงเรื้อรัง (chronic or persistent diarrhea) หมายถึงท้องร่วงที่เป็นนานตั้งแต่ 14 วันขึ้นไป

ขั้นตอนการรักษาจะประเมินสภาวะการขาดน้ำ ในกรณีที่มีอาการรุนแรง ในระยะเวลา 7 วัน อาการไม่ดีขึ้น หลังจากนั้นจะส่งตรวจจุลจากระเพื่อหาเชื้อที่เป็นสาเหตุ และจะรักษาอาการขาดน้ำโดยให้สารน้ำทางปาก หรือให้สารน้ำผ่านทางหลอดเลือดดำ

การรักษาโดยให้ยาแก้อาเจียน ยาแก้ท้องเสีย เช่น Racecadotril, Diosmectite (ในเด็กอายุ 2 ปีขึ้นไป) Kaolin, Activated charcoal เป็นต้น หรือการใช้โพรไบโอติก หรือธาตุสังกะสีในการรักษา แต่ถ้าวินิจฉัยการขาดน้ำอาการยังไม่ดีขึ้นจึงต้องมีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะร่วมด้วย คือ ยากลุ่ม quinolones หรือยากลุ่ม Beta-lactam (ภาพที่ 20)(สมาคมกุมารเวชศาสตร์ทางเดินอาหาร และตับ. 2562)



ภาพที่ 20 แนวทางการรักษาโรคติดเชื้อ *Escherichia coli*

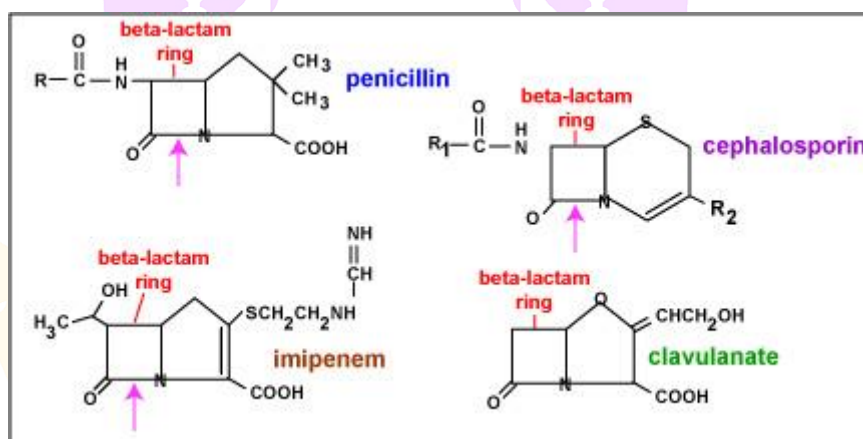
ดัดแปลงมาจาก: สมาคมกุมารเวชศาสตร์ทางเดินอาหารและตับ. 2562

2.11 การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic treatment)

ยาปฏิชีวนะ เป็นกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือป้องกันการติดเชื้อของแบคทีเรีย เช่น ยากลุ่ม Beta-lactam, ยากลุ่ม Quinolone เป็นต้น

ยากลุ่ม Beta-lactam เป็นยาปฏิชีวนะที่มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน beta-lactam ring และ thiazolidine ring ซึ่งเป็นโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันตรงที่ side chain group เป็น ยากลุ่มหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย สามารถแบ่งย่อยเป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ penicillin, cephalosporins, imipenem และ clavulanate ดังแสดงในภาพที่ 21

การออกฤทธิ์ของยากลุ่ม Beta-lactams ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์ (Peptidoglycan) โดยยาจะเข้าไปจับกับ binding-protein ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ transpeptidase และ carboxypeptidase ที่ทำหน้าที่สร้าง peptide cross-bridge ในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ peptidoglycan เมื่อเอนไซม์นี้ไม่สามารถทำงานได้จึงทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง และเซลล์แตกในที่สุด (ณรงค์ นวลเมือง และ อักษรากร คำมาสุข, 2561)



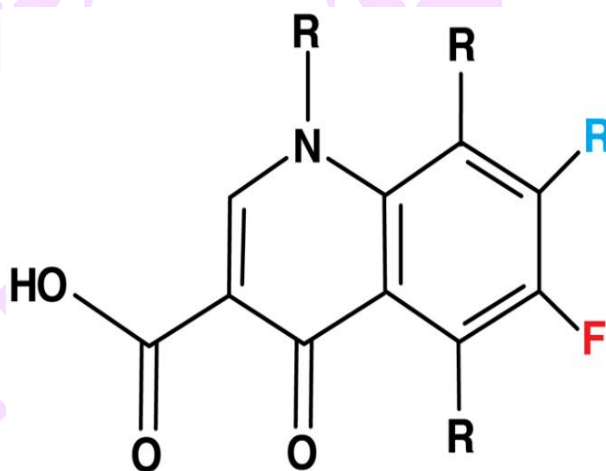
ภาพที่ 21 โครงสร้างของยากลุ่ม Beta-lactams

ที่มา: Gurudas Khilnani and Ajeet Kumar Khilnani. 2019

ยากลุ่ม Quinolone และ Fluoroquinolone ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์

ยา Fluoroquinolone โดยเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการปรับปรุงโดยใส่อะตอม fluorine (F) ในตำแหน่งที่ 6 ของโครงสร้างวงแหวน (ภาพที่ 22) เพื่อให้มีฤทธิ์กว้างขวางขึ้นโดยกลไกการทำงานจะยับยั้งกระบวนการ DNA replication โดยไปขัดขวางการสังเคราะห์เอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) และ topoisomerase IV ของแบคทีเรีย (Bhanot, et al., 2001)

การออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้จะฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือยับยั้งการเจริญเติบโต โดยยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase I) และ topoisomerase IV ของแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) เป็น tetrameric enzyme ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (sub unit) 4 หน่วยประกอบกัน คือ gyrA และ gyrB อย่างละ 2 หน่วย ซึ่งถูกสร้างจากยีน gyrA และ gyrB ตามลำดับ เอนไซม์ topoisomerase IV ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย (tetrameric enzyme) ได้แก่ ParC และ ParE อย่างละ 2 หน่วยซึ่งสร้างจากยีน parC และ parE เอนไซม์สองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญ และการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย (Drlica, et al., 1997)



ภาพที่ 22 โครงสร้าง fluoroquinolone

ที่มา: Maria Maslinska. 2013

ยากลุ่ม Quinolone สามารถแบ่งออกเป็นแต่ละรุ่น (generation) (Girish Bilagi. 2020) ดังตารางที่ 3 โดยปัจจุบันแพทย์จะนิยมใช้ยา Norfloxacin และยา levofloxacin เพื่อการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคท้องร่วงเฉียบพลัน โรคติดเชื้อในทางเดินระบบปัสสาวะและอวัยวะสืบพันธุ์

ตารางที่ 3 การจำแนกกลุ่มยา Quinolone

Generation	Drugs	Antibacterial spectrum
First	Nalidixic acid Cinoxacin	Gram -ve bacteria Aerobic
Second	Norfloxacin Ciprofloxacin Ofloxacin Lomefloxacin Enoxacin	Gram +ve bacteria Aerobic Improved activity against Gram -ve bacteria
Third	Levofloxacin Sparfloxacin Gatifloxacin Gemifloxacin	Good activity against Anaerobic Gram +ve bacteria particularly pneumococci

ดัดแปลงมาจาก: Girish Bilagi. 2020

2.12 การเกิดขึ้นและการถ่ายทอดยีนดื้อยา (Antibiotic resistance gene)

การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย คือ ปรากฏการณ์ที่เชื้อสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจเกิดจากยีนหรือการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำให้ยาไม่สามารถทำงานได้ โดยยีนจะสร้างโปรตีนที่ส่งผลให้เชื้อมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจอยู่บนโครโมโซม หรือพลาสมิด เพื่อเป็นปัจจัยเสริมในการอยู่รอดของแบคทีเรีย และถ่ายทอดลักษณะไปยังรุ่นต่อ ๆ ไป ซึ่งกลไกการเกิดขึ้นของเชื้อดื้อยาของแบคทีเรียที่ดื้อยาสามารถพบได้ 2 รูปแบบ คือ

การดื้อยาในรูปแบบ intrinsic resistance เป็นแบคทีเรียเกิดยีนดื้อยาที่เกิดจากการมิวเทชัน (mutation) ของแบคทีเรียเอง และการดื้อยาในรูปแบบ acquired resistance สามารถเกิดได้จากแบคทีเรียได้รับยีนดื้อยามาจากแบคทีเรียเซลล์อื่น (horizontal gene transfer) ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกัน ต่างสปีชีส์ (species) หรือต่างจีนัสกัน โดยแบคทีเรียสามารถรับยีนดื้อยาในรูปแบบ horizontal gene transfer 3 รูปแบบ คือ

1) ทรานสฟอร์เมชัน (transformation)

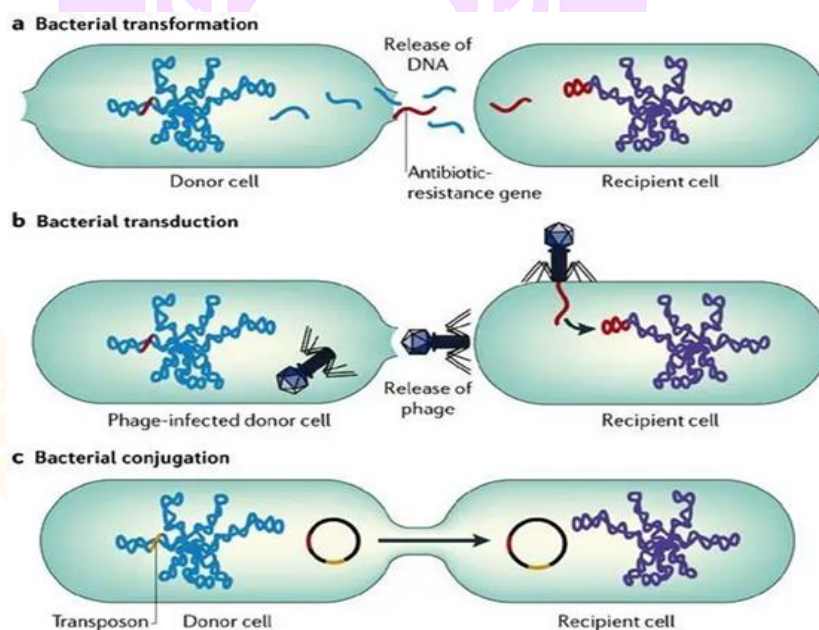
เป็นการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมหรือ DNA จากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่งในสภาวะที่เหมาะสม และเซลล์ผู้รับที่เหมาะสม เรียกว่า competent cell

2) ทรานสดักชัน (transduction)

เป็นการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมหรือ DNA จากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่งโดยอาศัยไวรัสที่เรียกว่าแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage)

3) คอนจูเกชัน (conjugation)

เป็นการถ่ายลักษณะพันธุกรรมจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งเซลล์ผู้รับ และเซลล์ผู้ให้จะต้องอยู่ใกล้กันหรือติดกันโดยจะทำการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมผ่านท่อเล็ก ๆ ที่ออกมาจากเซลล์ผู้ให้ที่เรียกว่า sex pili หรือ F pili (ดร.สุนัดดา โยมญาติ. 2556; จักรพงษ์ สีนามะ, 2561)



ภาพที่ 23 การดื้อยาแบบ intrinsic resistance

ที่มา: Kulengowski, et al., 2016

2.13 รูปแบบกลไกของการดื้อยาปฏิชีวนะ

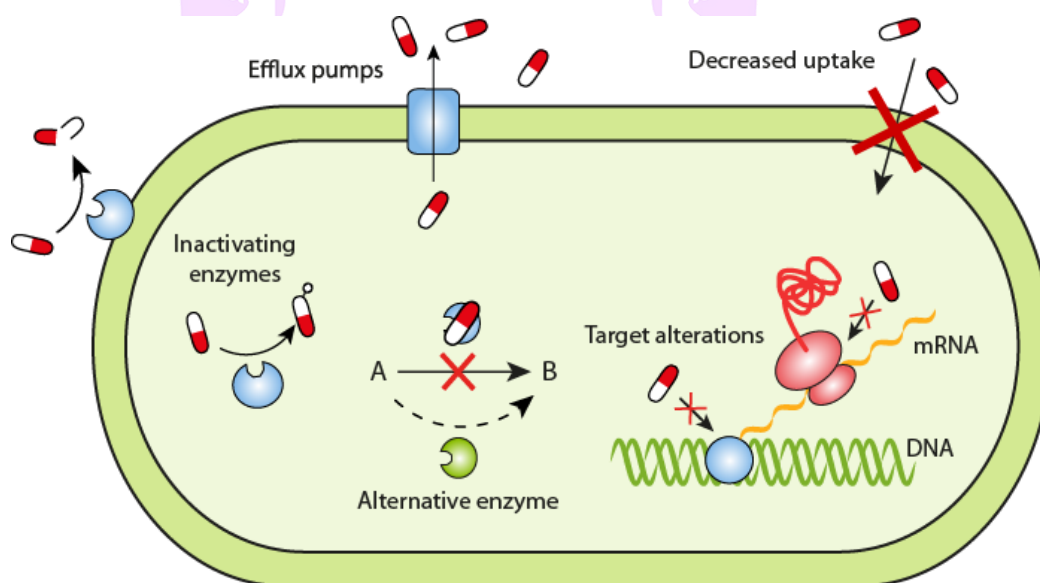
การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย เกิดจากกระบวนการได้หลายรูปแบบ ดังนี้

1) การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยาปฏิชีวนะ (drug target alteration) โดยแบคทีเรีย มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ หรือโครงสร้างของเป้าหมาย เพื่อไม่ให้ยาปฏิชีวนะสามารถจับและออกฤทธิ์ได้ เช่น การดื้อยาในกลุ่ม Quinolone

2) การลดการนำผ่านยาเข้าสู่เซลล์ (reduction of drug permeability) ลดการซึมผ่านของเมมเบรนที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรีย จึงทำให้ยาปฏิชีวนะผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง

3) การขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) เกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายชนิด เพื่อทำการขับยาออกภายนอกเซลล์ เพื่อป้องกันไม่ให้ยาผ่านเข้าภายในเซลล์ ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ซึ่งเป็นการลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย

4) การสร้างเอนไซม์มาทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยา (Enzymatic inactivation or modification of antibiotic) แบคทีเรียจะทำการสร้างเอนไซม์เพื่อทำการย่อยหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะ ทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เช่น การดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactam (ภาพที่ 24) (Gowda, et al., 2023)



ภาพที่ 24 กลไกของการดื้อยาปฏิชีวนะ

ที่มา: Gowda, et al., 2023

2.13.1 รูปแบบกลไกการดื้อยาของกลุ่ม Beta-lactam

เชื้อแบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์ beta-lactamases มาทำลายโครงสร้างของยาในกลุ่ม Beta-lactam โดยเอนไซม์จะเข้าสลายพันธะเอไมด์ระหว่างโมเลกุลคาร์บอน และไนโตรเจนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวงแหวน beta-lactam ส่งผลให้วงแหวนเปิดออก และโครงสร้างของยาเสีย จึงทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ การจัดกลุ่มของออกเป็น 2 ระบบหลัก ประกอบด้วยระบบของ Amber (Amber classification) และตามระบบของ Bush และคณะ (Bush-Jacoby-Medeiros classification) รูปแบบที่น่าสนใจ คือ แบคทีเรียที่มีการดื้อยาแบบ ESBL ซึ่งพบมาในประเทศไทย โดยเกิดจากยีนที่มีการสร้างเอนไซม์ Beta-lactamase จัดอยู่ในกลุ่ม 2be ของ Bush-Jacoby Medeiros และกลุ่ม A ของ Amber (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การแบ่ง clade การดื้อยาของกลุ่ม Beta-lactam

Amber class	Bush-Jacoby Medeiros group	Active site	Enzyme type	Host organisms	Substrates
A	2b, 2be, 2br, 2c, 2e, 2f	Serine	Broad-spectrum β -lactamases (TEM, SHV) ESBL (TEM, SHV, CTX-M) Carbapenemases (KPC, GES, SME)	Enterobacteriaceae and nonfermenters	Ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins All β -lactams
B	3	Zinc-binding thiol group	Carbapenemases (VIM, IMP)	Enterobacteriaceae and nonfermenters	All β -lactams
C	1	Serine	AmpC cephamycinases (AmpC)	<i>Enterobacter</i> species <i>Citrobacter</i> species	Cephamecins, 3rd-generation cephalosporins
D	2d	Serine	AmpC cephamycinases (CMY, DHA, MOX FOX, ACC) Broad-spectrum β -lactamases (OXA) ESBL (OXA) Carbapenemases (OXA)	Enterobacteriaceae Enterobacteriaceae and nonfermenters	Cephamecins, 3rd-generation cephalosporins Oxacillin, ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins All β -lactams

ที่มา: Avneet Saini, et al., 2012

2.13.2 รูปแบบการดื้อยาของกลุ่ม quinolone

เชื้อแบคทีเรียเกิดการระบวนการมิวเทชัน (mutation) ที่ตำแหน่งของยีนที่สร้าง เอนไซม์ DNA gyrase หรือ topoisomerase IV ทำให้ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่ง quinolone resistance determining region (QRDR) เปลี่ยนไปจากเดิม หรือการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน เป้าหมาย เช่น QnrA, QnrB, QnrS, gyrA, gyrB และ ParC ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนดื้อยา สามารถถ่ายทอดแบบ horizontal ผ่านทางพลาสมิดได้

2.14 การป้องกันการติดเชื้อ *E. coli* (Prevention of *E. coli* infection)

โรคติดเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น การทานอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงสุก หรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ อาหารที่หมดอายุ อาหารที่ปนเปื้อน และน้ำที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงควรรับประทานอาหารที่ผ่านการปรุงสุก และผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์และไม่ปะปนกันระหว่างอาหารที่ปรุงสุกและวัตถุดิบ นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบอื่นๆของร่างกาย ควรล้างมือทุกครั้ง เมื่อมีการสัมผัสสัตว์จำพวก โค แมว สุนัข ไก่ เป็ด และมีสุขอนามัยที่ดีในการใช้ห้องส้วม เป็นต้น (CỘp nhật lúc. 2021)

2.15 การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่มีคุณสมบัติการดื้อยาหลายขนาน

ปัจจุบันการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมีอัตราเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหาร และระบบอื่น ๆ นอกจากนี้ยังเป็นปัญหาในการรักษาผู้ป่วยในของโรงพยาบาล

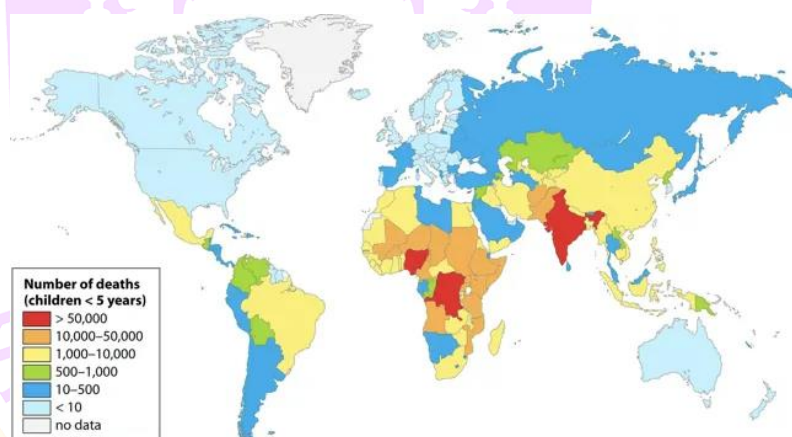
การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ทั่วโลก พบว่ามีการเชื้อ *E. coli* ประมาณ 57 ล้านคน และในบางกรณีทำให้เกิดเสียชีวิต ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ที่มีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะ เช่น Fluroquinolone, carbapenem และ cephalosporin เป็นต้น ซึ่งเป็นปัญหาในการรักษาทางการแพทย์ในปัจจุบัน (Mohsen Naghavi. 2022)

การระบาดของเชื้อ *E. coli* ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1998 ถึง 2007 พบว่าเชื้อ *E. coli* มีอัตราการระบาดสูงสุดประมาณ 69% ซึ่งมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนในอาหารประมาณ 18%, น้ำและการติดเชื้อจากสัตว์สู่คนหรือคนสู่คนประมาณ 14% โดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (CDC) ประเมินการติดเชื้อ *E. coli* มีประมาณ 265,000 รายต่อปี และมีการติดเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ Urinary Tract Infection: UTI ประมาณ 95,400 รายต่อปี (ภาพที่ 25) (Matthew A. Croxen, et al., 2013)

การแพร่ระบาดของเชื้อ *E. coli* ในโรงพยาบาล 92 แห่งของประเทศไทย ปี พ.ศ.2561 ระหว่างเดือน มกราคม-ธันวาคม พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ 98,720 ราย มีอัตราการดื้อยา cefotaxime 55.0%, Amoxicillin clavulanic acid 68.2%, imipenem 96.3%, ertapenem 96.4%, meropenem 96.7%, levofloxacin 44.7% และ ciprofloxacin 39.6%

การติดเชื้อ *E. coli* ในโรงพยาบาลพะเยา ปี 2560 ระหว่างเดือน มกราคม-มิถุนายน พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ 1,921 ราย มีอัตราการดื้อยา cefotaxime 64.2%, Amoxicillin clavulanic acid 79.3%, imipenem 97.4%, ertapenem 94.9 %, meropenem 97.0%, levofloxacin 65.1% และ ciprofloxacin 43.9% (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2562)

การศึกษาการระบาดของเชื้อ *E. coli* ที่มีอัตราการดื้อยาที่เพิ่มสูงขึ้น เกิดจากการปนเปื้อนในอาหาร น้ำดื่ม สภาพแวดล้อม และการติดต่อจากสัตว์สู่มนุษย์ นอกจากนี้ยังพบอัตราการเสียชีวิตของเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี จากการติดเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อยาสูงในประเทศแอฟริกาและอเมริกาใต้



ภาพที่ 25 การเสียชีวิตจากการติดเชื้อ *E. coli* ของประเทศในภูมิภาคต่างๆ ของโลก

ที่มา: Matthew A. Croxen, et al., 2013

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Nutrient Broth (OXOID)
- 2) MacConkey Agar (HIMEDIA)

3.1.2. สารเคมี

1) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 1.1) 10X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer pH 8.3
- 1.2) CTAB/NaCl solution
- 1.3) Lysozyme
- 1.4) 10% SDS/proteinase K
- 1.5) NaCl
- 1.6) Chloroform/isoamyl alcohol
- 1.7) Isopropanol
- 1.8) Ethanol

2) สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ESBL

- 2.1) Phenol red powder
- 2.2) Cefotaxime
- 2.3) NaCl pH 7.8
- 2.4) Solution R
- 2.5) B-PER
- 2.6) 1X TE buffer
- 2.7) น้ำกลั่น

3) สารเคมีสำหรับการทำ PCR

- 3.1) 5x Blend master mix buffer (solid biodyne)
- 3.2) น้ำปราศจาก DNase (Invitrogen)

4) สารเคมีสำหรับ run Agarose Electrophoresis

- 4.1) Agarose gel
- 4.2) 6X loading dye
- 4.3) Red safe
- 4.4) 1X TAE buffer
- 4.5) 100 bp DNA marker (Solis BioDyne)
- 4.6) ViSafe Red Gel Stain (Vivantis)
- 4.7) 6x Loading dye (Vivantis)

3.1.3. เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเลี้ยงเชื้อ

- 1.1) Erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml และ 500 ml
- 1.2) จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (NEST®)
- 1.3) ไม้จิ้มฟัน
- 1.4) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (Mettler)

2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 2.1) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Mettler)
- 2.2) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Eppendorf รุ่น 5430)
- 2.3) เครื่องเขย่าผสม (Vortex) (Bionen)

3) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR

- 3.1) เครื่อง PCR (BIO-RAD)
- 3.2) Microcentrifuge tube (NEST®)
- 3.3) น้ำที่ปราศจาก DANase (invitrogen)
- 3.4) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo)
- 3.5) เครื่องถ่ายภาพเจล (BIO-RAD รุ่น XR+)

4) อุปกรณ์ที่ทั่วไป

- 4.1) Microcentrifuge tube (NEST®)
- 4.2) ไมโครปิเปต ขนาด 10 µl 200 µl และ 1000 µl (DISCOVERY COMFORT)

4.3) ทิป (ขนาด 10 µl 200 µl และ 1000 µl) (NEST®)

4.4) Centrifuge tube ขนาด 50 ml (NEST®)

3.2 การเตรียมตัวอย่างและการทำดีเอ็นเอบริสุทธิ์

3.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ทำการคัดแยกเชื้อแล้ว จำนวน 76 ตัวอย่าง คือ ปัสสาวะ จำนวน 43 ตัวอย่าง อุจจาระจำนวน 10 ตัวอย่าง น้ำหนองจำนวน 11 ตัวอย่าง เสมหะจำนวน 2 ตัวอย่าง และเลือดจำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยในของโรงพยาบาลพะเยาราม ในปี พ.ศ. 2558–2561 โดยทางโรงพยาบาลทำการคัดแยกเชื้อ *Escherichia coli* และทำการทดสอบการดื้อยาหลายชนิด ตัวอย่างที่ได้จึงเป็นเชื้อ *Escherichia coli* ทั้งหมด

เชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างที่เหลือเก็บมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ได้รับการตีพิมพ์ในหัวข้อ The complete analysis of Salmonella serotype and the current occurrence of drug resistant situation of Salmonella spp. in Amphoe Mueang Phayao District ซึ่งได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา อนุมัติเลขที่ 57 02 04 0020

3.2.2 การเตรียมเชื้อเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ทราบพีโนไทป์ที่มีการเก็บในอาหาร NB broth ที่มี 20% กลีเซอรอล ในตู้ -20°C นำมาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ปริมาณ 1000 µl จากนั้นนำมา streak ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร MacConkey agar นำไปบ่มที่ ตู้ incubator 37°C นาน 16–18 ชั่วโมง (overnight) และจากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ปริมาณ 1,000 µl ในหลอด microcentrifuge tube 1.5 µl (เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่จะนำไปสกัดดีเอ็นเอ) แล้วนำไปบ่มที่ ตู้ incubator 37°C นาน 16–18 ชั่วโมง (overnight)

3.2.3 การทำทดสอบ Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) (NDP test)

เอนไซม์ ESBL เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ มีฤทธิ์ย่อยสลายยาก ลุ่ม beta-lactam ได้หลายชนิด เช่น penicillin, oxyimino cephalosporin (3rd generation cephalosporin) และ aztreonam เชื้อถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร NB broth และบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสออก (supernatant) ลงด้วย 1XTE buffer ประมาณ 700 µl ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก (supernatant) จากนั้นทำการเติม B-PERII ปริมาตร 100 µl ทำการ vortex และเติม Solution R + Cefotaxime 100 µl และอ่านผล (ผลบวก คือ สารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลือง)

1.2.4 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อที่ได้จากการเตรียมเชื้อ มาทำการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 9,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนเซลล์ซ้ำสองครั้ง โดยใช้ 1XTE Buffer ปริมาณ 600 μ l และทำการ vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 rpm นาน 3 นาที และเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการแตกเซลล์ โดยเติม 1XTE Buffer ปริมาณ 400 μ l บ่มที่ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 10 mg/ml lysozyme ปริมาณ 50 μ l ทำการ vortex และ shaking ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10% SDS/proteinase K ปริมาณ 75 μ l ทำการ vortex และ incubate ที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนเพื่อแยกดีเอ็นเอ โดยการเติม 5M NaCl ปริมาณ 100 μ l และ CTAB/NaCl solution ปริมาณ 100 μ l ทำการ vortex และ incubate ที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1) ทำการ vortex 10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสด้านบนย้ายไปที่ microcentrifuge tube และเติม isopropanol 650 μ l ทำการพลิกหลอดขึ้นลงอย่างระวัง และนำไปเก็บที่ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที ถูนำมาแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง (supernatant) และเติม 70% ethanol ที่เย็น หมุนหลอด 2-3 ครั้ง เพื่อล้างดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง (supernatant) นำหลอดไปไว้ในตู้ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บไว้ที่ -20 °C

3.3 การตรวจหายีนดี้อยา

3.3.1 การตรวจยีนดี้อยา *bla*CTX, *bla*TEM, *bla*OXA

การวิเคราะห์ PCR ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 μ l ประกอบด้วย DNA ปริมาณ 1 μ l ไพรเมอร์ สำหรับ *bla*CTX, *bla*TEM, *bla*OXA (ตารางที่ 5) ready-to-use PCR mix ปริมาณ 0.2 μ l และปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation	ที่ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที	จำนวน 1 รอบ
ขั้นที่สอง: Denaturation	ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่ 62 °C เป็นเวลา 60 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที	
ขั้นที่สาม: Final extension	ที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที	จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 1% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+)

3.3.2 การตรวจสอบยีนดื้อยา Quinolone (*gyrA83*, *gyrA87*)

การวิเคราะห์ PCR ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 μ l ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 μ l โพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบยีนดื้อยาในกลุ่ม Quinolone (ตารางที่ 5) ready-to-use PCR mix ปริมาตร 0.4 μ l และ ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation	ที่ 92 °C เป็นเวลา 25 วินาที	} จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่ 64 °C เป็นเวลา 60 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C เป็นเวลา 150 วินาที	

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 2% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+)

3.4 การจัดกลุ่มของเชื้อ *Escherichia coli*

3.4.1 เทคนิค Clermont

ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 μ l ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 μ l โพรเมอร์สำหรับการจัดกลุ่มเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค Clermont (ตารางที่ 5) ready-to-use PCR mix ปริมาตร 1 μ l และปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation	ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที	

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 2.5% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+)

3.4.2 เทคนิค Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 μ l ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 μ l ไพร์เมอร์สำหรับการจัดกลุ่มเชื้อ E. coli โดยใช้เทคนิค MLVA (ตารางที่ 5) ready-to-use PCR mix โดยไพร์เมอร์แต่ละคู่ใส่ปริมาตรที่ต่างกันคือ 0.05 μ l และ 0.8 μ l ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation	ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่ 55 °C เป็นเวลา 90 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที	

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 3% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+) จากนั้นทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม gel J

3.4.3 การ PCR subtyping ของเชื้อ *Escherichia coli* ST131

ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 μ l ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 μ l ไพร์เมอร์สำหรับ subtype เชื้อ E. coli สายพันธุ์ ST131 (ตารางที่ 5) ready-to-use PCR mix โดยไพร์เมอร์แต่ละคู่ใส่ปริมาตรที่ต่างกันคือ 0.2, 0.15, 0.08, 0.1, 0.25 และ 0.2 μ l ตามลำดับ ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation	ที่ 98 °C เป็นเวลา 10 วินาที	} จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่ 57 °C เป็นเวลา 20 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที	

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 2.5% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+)

3.4.4 การตรวจสอบ virulence gene

การวิเคราะห์ PCR ซึ่งส่วนผสมของ PCR 10 μ l ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1 μ l ไพร์เมอร์สำหรับการตรวจสอบ virulence gene (ดังตารางที่ 5) ready-to-use PCR mix ปริมาตร 0.1 μ l ปรับด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ประกอบด้วย

ขั้นแรก: Pre-denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่สอง: Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที	}	จำนวน 25 รอบ
Annealing ที่ 63 °C เป็นเวลา 30 วินาที		
Extension ที่ 68 °C เป็นเวลา 180 วินาที		

ขั้นที่สาม: Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นเมื่อได้ PCR product แล้วให้นำไปรัน 2% agarose gel electrophoresis 70 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลที่รันเสร็จแล้วไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-RAO รุ่น XR+)

3.5 การวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Gel J

การวิเคราะห์ผลโดยการทำ DNA fingerprint เป็นการเปรียบเทียบรูปแบบของ ดีเอ็นเอ ในการวิเคราะห์นี้เราใช้โปรแกรม Gel J เนื่องจากเป็นโปรแกรมวิเคราะห์ DNA fingerprint โดยคุณสมบัติของโปรแกรม Gel J คือกลไกการจับ lane และ band ของดีเอ็นเอที่แม่นยำ โปรแกรม Gel J ได้รับการพัฒนาจากแอปพลิเคชัน JAVA อาศัย JAVA Library เป็นโปรแกรมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ ซึ่งมีฟังก์ชันการประมวลผล และการวิเคราะห์ผลลัพธ์

ขั้นตอนการใช้โปรแกรม Gel j แบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน

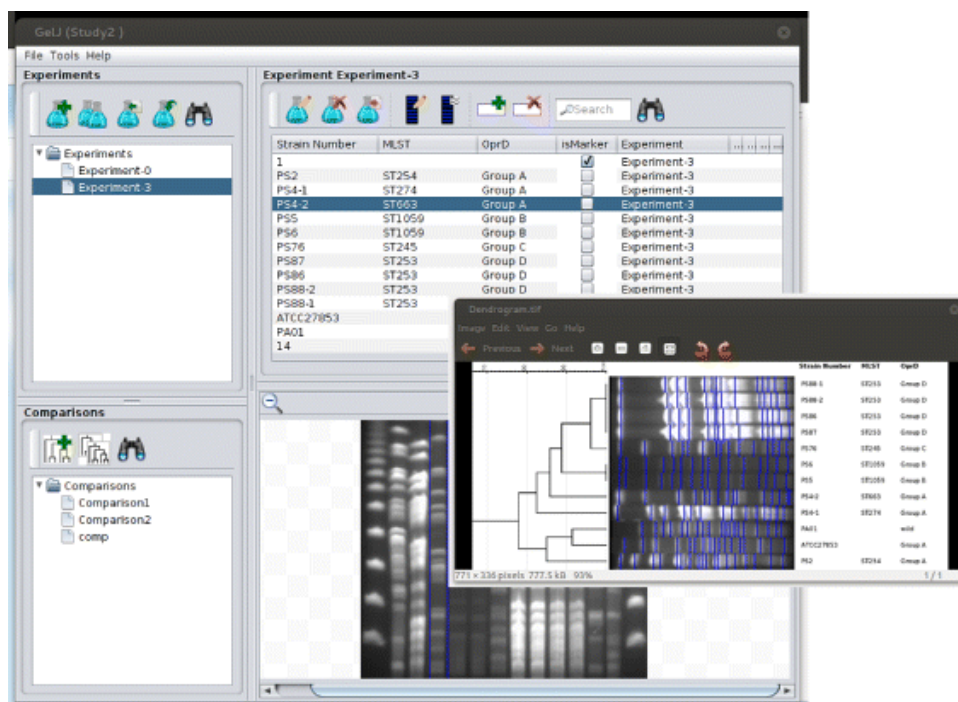
ขั้นตอนที่ 1 ทำการอัปโหลดรูปภาพเจลโดยโปรแกรมจะรองรับแบบภาพมาตรฐานทั่วไป รวมถึง tiff, jpeg, PNG, gif และ bmp จากนั้นทำการครอบรูปภาพในส่วนที่ต้องการ และสามารถปรับความสว่างหรือความเข้มของรูปภาพเจล

ขั้นตอนที่ 2 ตรวจสอบเส้นของโปรแกรม Gel j จะทำการแบ่งเส้นอัตโนมัติ แต่ในบางกรณี โปรแกรมอาจมีความคลาดเคลื่อนของการตัดแบ่งเส้น เนื่องจากความสว่างและความเข้มของรูปภาพเจล โดยเมื่อมีการตัดแบ่งเส้นคลาดเคลื่อนสามารถปรับแต่งการแบ่งเส้นได้

ขั้นตอนที่ 3 ทำการเลือกเส้นของ DNA Marker และระบุขนาดของ DNA Marker

ขั้นตอนที่ 4 ภาตรวจจับแบนด์ของโปรแกรม จะทำการตรวจจับแบนด์อัตโนมัติของภาพเจล แต่ในขั้นตอนนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนของการตรวจจับแบนด์ แต่สามารถใช้วิธี Manual เพื่อเพิ่มแบนด์ที่โปรแกรมไม่สามารถตรวจจับได้ จากนั้นทำการบันทึกรูปภาพและถูกจัดเก็บลงในฐานข้อมูลของโปรแกรม (ภาพที่ 26)

ขั้นตอนที่ 5 การสร้าง Dendrogram ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถเลือกหลายรูปภาพที่ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลมาทำการสร้าง Phylogenetic tree ได้ ซึ่งในโปรแกรมนี้สามารถใส่ข้อมูลพื้นฐานของแต่ละตัวอย่างได้ เช่น เพศ, อายุ, สายพันธุ์, การตั้งถิ่นอาศัย ฯ (Heras J. et al., 2015)



ภาพที่ 26 หน้าต่างหลักของโปรแกรม Gel j และรูปแบบของ Dendrogram

ที่มา: Heras J. et al., 2015



ตารางที่ 5 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

primer	Gene	sequence (5'—3')	Amplicon size (bps)	primer conc.(μ M)	Reference
<i>Escherichia coli</i> typing					
Multiplex 1 (phylogenetic group)					
fliB_f	<i>ChuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	1	
fliB_r		TGCCGCCAGTACCAAAGACA		1	Clermont et al
gyrB_f	<i>YjaA</i>	TGAAGTGCAGGAGACGCTG	211	1	(2000)
gyrB_r		ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		1	
ycfQ_f	<i>tsp4.c2</i>	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	1	
ycfQ_r		CGCGCCAACAAAGTATTACG		1	
Monoplex 1 (ST131)					
ST131_f		GACTGCATTTGTCGCCATA	310	0.2	Doumith et al
ST131_r		CCGGCGGCATCATAATGAAA		0.2	(2015)
Multiplex 2 (ST131 clade)					
A_f	Clade A	TGACGGGACGTGAGCAAATTA	707	0.15	
A_r		AGTCAGACCTAGCCACCCTT		0.15	
ST131M_f		AGCAACGATATTTGCCATT	580	0.15	
ST131M_r		GGCGATAACAGTACGCCATT		0.15	
B_f	clade B	CAACGTTGAAGCAGTGTATGAG	442	0.08	
B_r		TGACAATCGACGGCTTTAGA		0.08	Matsumura
C1_f	Clade C1	GGCCCCACAAATTGCTT	337	0.1	et al (2017)
C1_r		CGCACCTCCGATACCAAA		0.1	
C1-M27_f	Clade C1-M27	TGAATCAAAGGTCCGAGCTG	232	0.08	
C1-M27_r		TATGGCTGGCAGATGCTTTA		0.08	
C2_f	Clade C2	ACGGATTCAGGTAGACGATT	164	0.25	

ตารางที่ 5 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

primer	Gene	sequence (5'—3')	Amplicon size (bps)	Primer Conc.(µM)	Reference
C2_r		CCTCACCAAAGTTGCGATTAC		0.25	
C_f	Clade C	CGCTGGCCAGTTATCTGAAAT	103	0.2	
C_r		CCTTTCACCAACTGGGTACT		0.2	
<u>Antibiotic resistance gene</u>					
Multiplex 3 (beta – lactam)					
TEM_f	<i>blaTEM</i>	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	0.2	
TEM_r		CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		0.2	Nelson et al (2006)
OXA_f	<i>blaOXA</i>	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564	0.2	
OXA_r		GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		0.2	
Multiplex 4 (CTXm1, CTXm9)					
CTX 1_f	<i>blaCTX-M1</i>	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	668	0.2	
CTX 1_r		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		0.2	Ogutu O James
CTX 9_f	<i>blaCTX-M9</i>	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561	0.2	et al (2015)
CTX 9_r		TGATTCTCGCCGCTGAAG		0.2	
Momoplex 2					
CMY_f	<i>blaCMY</i>	G TTCAGGAGAAAACGCTCCA	87	0.2	Geyer N. C and
CMY_r		CCAGCCTAATCCCTGGTACA		0.2	Hanson D. N (2020)
Multiplex 5 (fluoroquinolone)					
gyrA_f	<i>gyrA</i>	TACACCGGTCAACATTGAGG	647	0.4	
gyrA_r		TTAATGATTGCCCGCTCGG		0.4	Onseedang
gyrA83_f	<i>gyrA83</i>	TACCATCCCCATGGTGACTC	440	0.4	et al (2016)
gyrA87_r	<i>gyrA87</i>	GCCATGCGGACAATCGTGTC	255	0.4	
Multiplex 6 Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis					
ECMLV1-f	ECMLV1	TCCCTGGACAAACCAGGACTG	162–1,597	0.1	

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

primer	Gene	Sequence (5'—3')	Amplicon size (bps)	Primer Conc.(μ M)	Reference
ECMLV1-r1		CGTGCGGACTTATGAGAAAG		0.1	
ECMLV1-r2		CGTGCGGGCTTATGAAAAAG		0.5	
ECMLV2-f	ECMLV2	GAAACAGGCCAGGCTACAC	575–869	0.05	
ECMLV2-r		CTGGCGCTGGTTATGGGTAT		0.05	Dahyot S.
ECMLV3-f	ECMLV3	TTCAGGAAATGGATAAAGTAGT	616–1,157	0.8	et al (2018)
ECMLV3-r		GGGAGTATGCGGTCAAAGC		0.8	
ECMLV4-f	ECMLV4	ACAACCGGCTGGGGCGAATCC	413–539	0.05	
ECMLV4-r		GTCAGCAAATCCAGAGAAGGCA		0.05	
ECMLV5-f	ECMLV5	GCGGCGCTGAAGAAGAAAGC	375–438	0.05	
Multiplex 7 Virulence gene Urinary Tract Infection					
Vat - f	<i>vat</i>	TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT	1100	0.1	
Vat - r		GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT		0.1	
fyuA - f	<i>fyuA</i>	GTAACAATCTCCCGCTCGGCAT	850	0.1	
fyuA - r		TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA		0.1	Rachel et al
chuA - f	<i>chuA</i>	CTGAAACCATGACCGTTACG	652	0.1	(2012)
chuA - r		TTGTAGTAACGCACTAAACC		0.1	
yfcV - f	<i>yfcV</i>	ACATGGAGACCACGTTACCC	292	0.1	
yfcV - r		GTAATCTGGAATGTGGTCAGG		0.1	
Multiplex 8 Virulence gene in chickens					
R8-f	<i>iron</i>	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT	553	0.3	
R8-r		GTTCCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT		0.3	
R9-f	<i>OmpT</i>	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	495	0.3	
R9-r		TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC		0.3	
R10-f	<i>hlyF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	450	0.3	
R10-r		GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG		0.3	

ตารางที่ 5 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

primer	Gene	Sequence (5'—3')	Amplicon size (bps)	Primer Conc.(μ M)	Reference
R11-f	<i>iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	0.3	
R11-r		AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA		0.3	
R12-f	<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	302	0.3	
R12-r		CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		0.3	



บทที่ 4

ผลการทดลอง

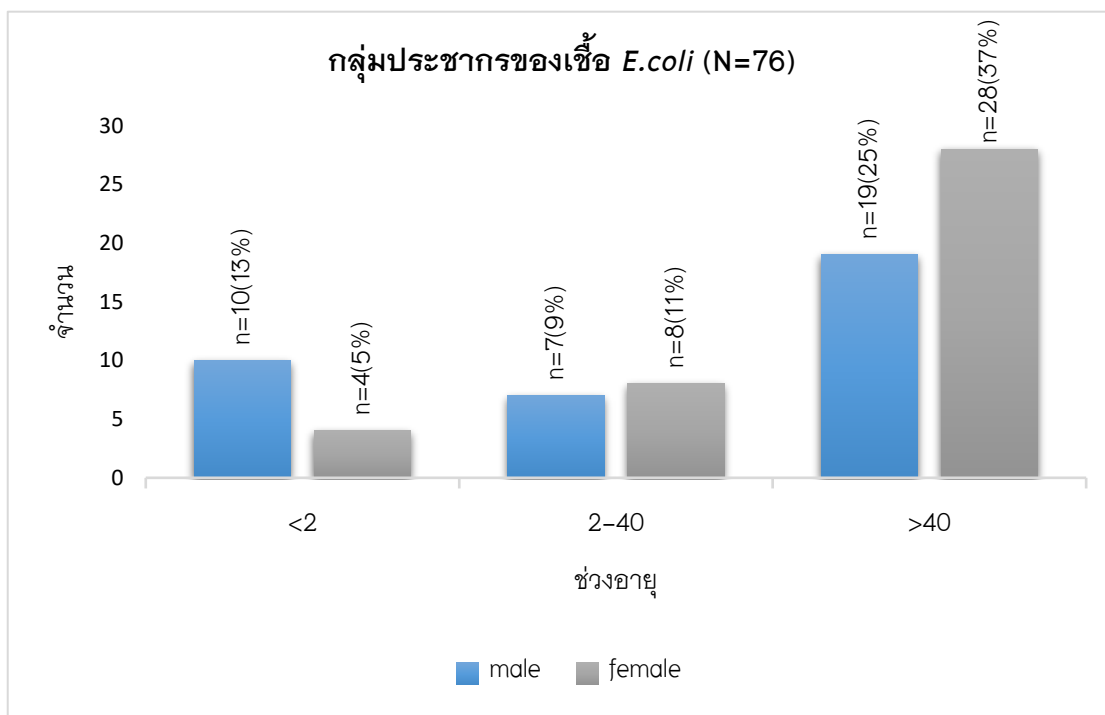
ผลการทดลองที่ 1 ผลการวิเคราะห์กลุ่มประชากรของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมดจำนวน 76 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่าง (Specimen type) ที่เก็บได้จากผู้ป่วยในของโรงพยาบาลจังหวัดพะเยา ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2015–มกราคม 2018 คือ ปัสสาวะ (urine) จำนวน 43 ตัวอย่าง อุจจาระ (stool) จำนวน 10 ตัวอย่าง น้ำหนอง (pus) จำนวน 11 ตัวอย่าง เสมหะ (sputum) จำนวน 2 ตัวอย่าง และเลือด (blood) จำนวน 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) และข้อมูลพื้นฐาน เช่น อายุ, เพศของผู้ป่วย, ปีที่ได้รับการรักษา รวมไปถึงรูปแบบการตั้งถิ่นฐานของเชื้อดังแสดงใน (แสดงในภาคผนวก)

ตารางที่ 5 แสดงกลุ่มตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* ต่างๆ จำนวน 76 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลพะเยาราม ปี ค.ศ.2015–ค.ศ.2018

specimen	Number of Isolate
ปัสสาวะ (urine)	43
เลือด (blood)	10
น้ำหนอง (pus)	12
อุจจาระ (stool)	9
เสมหะ (sputum)	2
รวม(Total)	76

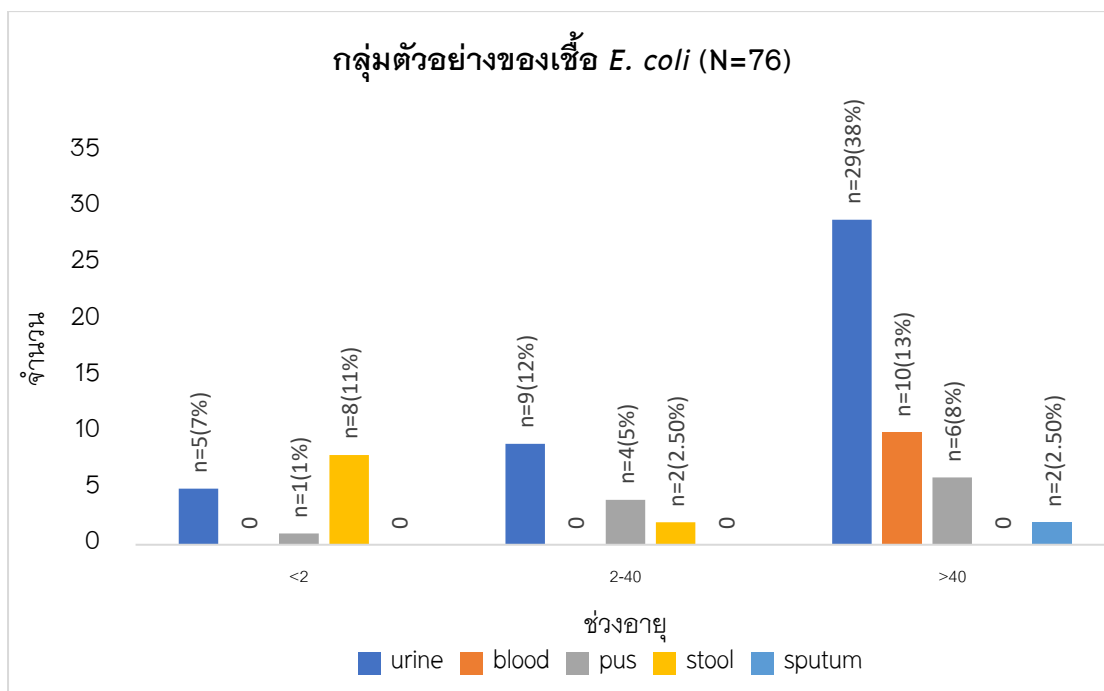
เชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างจำนวน 76 ตัวอย่าง จากการเก็บข้อมูลพบว่าส่วนใหญ่ตัวอย่างที่ได้จะมาจากผู้ป่วยที่มีอายุ > 40 ปี ประมาณ 62% และในกลุ่มตัวอย่างที่พบมากที่สุดคือผู้ป่วยที่มีอายุ > 40 ปีและเป็นเพศหญิงประมาณ 37% ดังแสดงใน (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 กลุ่มตัวอย่างประชากรของเชื้อ *E. coli*

ผลการทดลองที่ 2 การแบ่งเชื้อ *E. coli* ตามช่วงอายุและกลุ่มตัวอย่าง (Specimen type) ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด

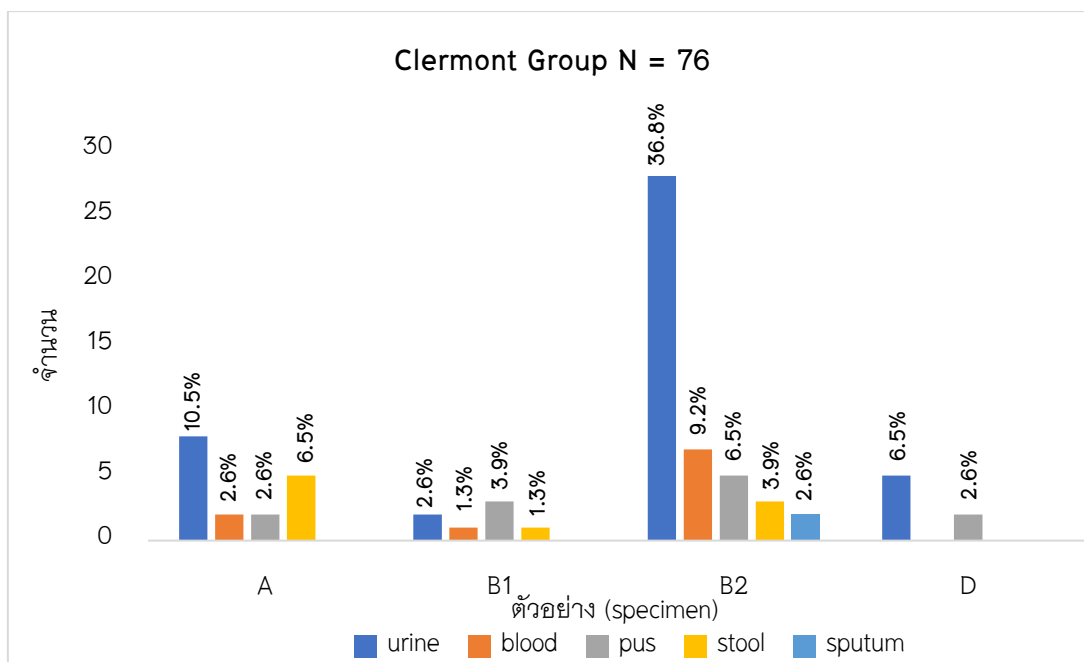
ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างและช่วงอายุ พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในของโรงพยาบาลจังหวัดพะเยา เมื่อทำการแบ่งช่วงอายุออกเป็น 3 ช่วง คือ อายุ <2 ปี อายุ 2-40 ปี และอายุ >40 ปี พบว่าตัวอย่างที่ได้รับส่วนใหญ่มากจากปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 40 ปี ประมาณ 38% ตามมาด้วยตัวอย่างจากเลือดประมาณ 10% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างทั้งหมด และนอกจากนี้ยังพบตัวอย่างจากอุจจาระในผู้ป่วยที่มีอายุ < 2 ปี ประมาณ 11% ในขณะที่ไม่พบตัวอย่างของอุจจาระในผู้ป่วยที่มี อายุ > 40 ปีขึ้นไป ดังแสดงในภาพที่ 28



ภาพที่ 28 เชื้อ *E. coli* แบ่งตามช่วงอายุ และกลุ่มตัวอย่าง (Specimen type)

ผลการทดลองที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* กับการแบ่งกลุ่มโดยเทคนิค Clermont

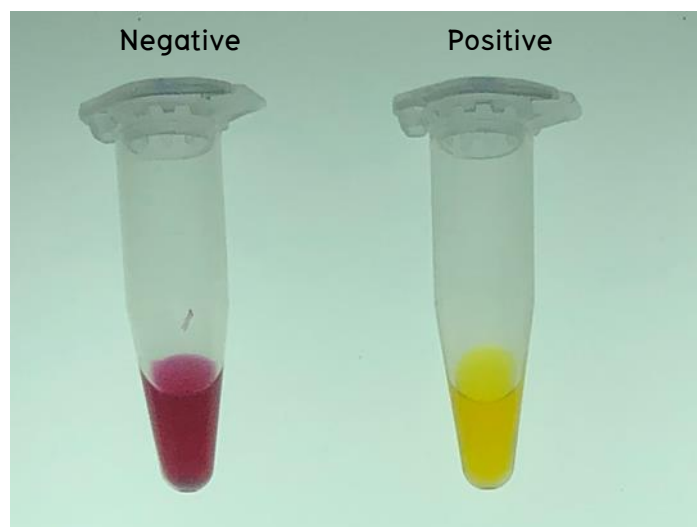
ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างกับการแบ่งกลุ่มโดยวิธี Clermont พบว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 76 ตัวอย่าง เมื่อถูกจัดกลุ่มโดยวิธี Clermont ซึ่งวิธีนี้ทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยยีน *chuA*, *yjaA* และ DNA fragment TspE4.c2 (Clermont, et al., 2000) พบว่าเชื้อ *E. coli* ดังกล่าว จำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม A จำนวน 15 ตัวอย่าง กลุ่ม B1 จำนวน 8 ตัวอย่าง กลุ่ม B2 จำนวน 43 ตัวอย่าง และกลุ่ม D จำนวน 7 ตัวอย่าง (ภาพที่ 29) ผลแสดงให้เห็นถึงเชื้อ *E. coli* ในกลุ่ม B2 พบในตัวอย่างของปัสสาวะประมาณ 36.8% และพบในตัวอย่างเลือดประมาณ 9.2% ส่วนในตัวอย่างอุจจาระจะพบในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 2 ปี ประมาณ 6.5% และเป็นเชื้อ *E. coli* กลุ่ม A เป็นหลัก



ภาพที่ 29 การแบ่งกลุ่มตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค Clermont

ผลการทดลองที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติการดื้อยาแบบ Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) หรือ (NDP test)

การตรวจสอบการดื้อยาแบบ ESBL โดยใช้วิธี NDP test ซึ่งอาศัยหลักการของเชื้อที่มีการดื้อยาแบบ ESBL จะมีการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase เพื่อมาทำลายโครงสร้างของยา จากตัวอย่างของเชื้อ *E. Coli* จำนวน 76 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบคุณสมบัติการดื้อยาแบบ ESBL โดยวิธี NDP test กระบวนการคือ เชื้อที่มีการดื้อยาแบบ ESBL จะมีการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายยา cefotaxime เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสทำให้สารมีความเป็นกรดเปลี่ยนจากสารสีแดงเป็นสารสีเหลือง ดังแสดงใน (ภาพที่ 30) จากการศึกษพบว่าตัวอย่างของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 76 ตัวอย่าง มีการดื้อยาแบบ ESBL คือดื้อต่อยา Cefotaxime, Ceftriaxone และ Ceftazidime จำนวน 36 ตัวอย่าง ประมาณ 47.3%



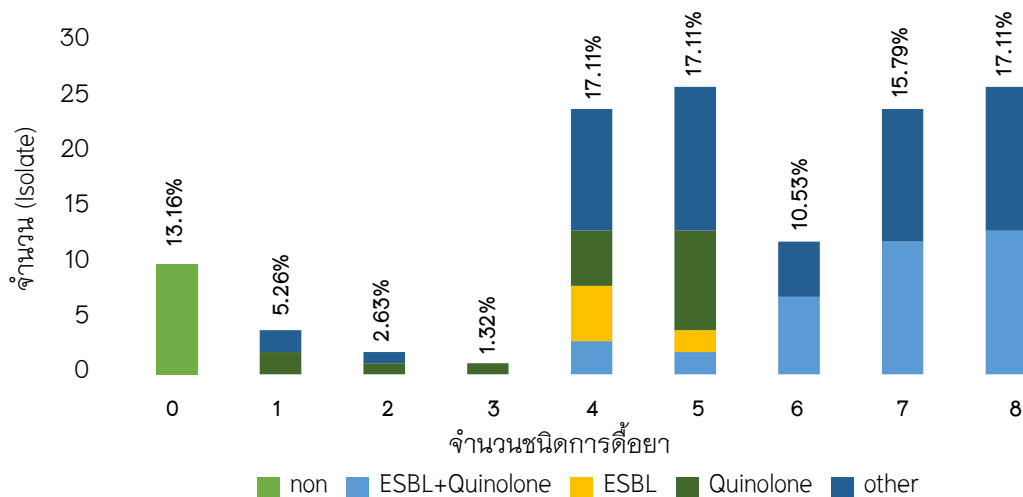
ภาพที่ 30 ผลของการทดสอบ NDP test ที่มีต่อเชื้อที่มีการดื้อยาและไม่ดื้อยาแบบ ESBL

ผลการทดลองที่ 5 การศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อยาสองกลุ่มพร้อมกัน คือ ESBL และกลุ่ม quinolone

การตรวจสอบที่มีรูปแบบการดื้อยาหลายเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการจำแนกจากตัวอย่างของผู้ป่วยของโรงพยาบาลจังหวัดพะเยา ถูกทดสอบคุณลักษณะการดื้อยาด้วยวิธี disk diffusion จำนวน 9 ชนิด กลุ่มยา Beta-lactams 4 ชนิด คือ Ampicillin, Cefotaxime, Ceftazidime และ Ceftriaxone กลุ่มยา Quinolone 3 ชนิด คือ Norfloxacin, Ciprofloxacin และ Levofloxacin นอกจากนี้ยังมียา trimethoprim และ Gentamicin

ในกลุ่มประชากรที่เราศึกษาพบว่าเชื้อ *E. coli* มีการดื้อยาตั้งแต่ 4 ชนิดขึ้นไปประมาณ 77.65% สังเกตได้ว่าในเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อยาตั้งแต่ 6 ชนิดขึ้นไปมีลักษณะการดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactams และกลุ่มยา Quinolone มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้จะสังเกตได้ว่าในกลุ่มที่มีการดื้อยาตั้งแต่ 4 ชนิดขึ้นไปยังมีการดื้อยา trimethoprim และ gentamicin สูง ดังแสดงใน (ภาพที่ 31)

คุณสมบัติการดื้อยาในกลุ่ม ESBL และยาในกลุ่ม Quinolone



*Other: เชื้อมีการดื้อยา Trimethoprim หรือยา Gentamicin และดื้อทั้งใน Trimethoprim และ Gentamicin

ภาพที่ 31 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ E. coli ที่ดื้อยาในกลุ่ม ESBL และกลุ่ม quinolone

ผลการทดลองที่ 6 รูปแบบความรุนแรงของการดื้อยาที่แตกต่างกัน (Antibiotic resistance pattern)

ผลการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกัน โดยทำการตรวจสอบลักษณะการดื้อยา 9 ชนิด ด้วยวิธี disk diffusion จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *E. coli* มีรูปแบบการดื้อยา จำนวน 31 รูปแบบ แบ่งได้เป็น 4 clade ตามลักษณะความรุนแรงของการดื้อยา คือ Clade1 ประเมินจากการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactams และ Quinolone พร้อมกันโดย จำนวน 10 รูปแบบ Clade2 คือ clade ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactams เป็นหลัก จำนวน 5 รูปแบบ Clade 3 คือ clade ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolone เป็นหลัก จำนวน 10 รูปแบบ และ Clade 4 คือ clade ที่ไม่ดื้อต่อยาทั้งกลุ่มยา beta-lactams และยาในกลุ่ม Quinolone จำนวน 6 รูปแบบ

พบว่าในกลุ่มเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการศึกษา ประมาณ 39.65% มีการดื้อยาทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน ใน clade 1 จำนวน 30 ตัวอย่าง ต่อมา clade 3 จำนวน 19 ตัวอย่าง มีการดื้อยาในกลุ่ม Quinolone เพียงอย่างเดียว และมีการดื้อยาแบบ ESBL เพียงอย่างเดียวใน clade 2 จำนวน 13 ตัวอย่าง ส่วนใน clade 4 จำนวน 15 ตัวอย่าง ไม่มีการดื้อยาในทั้งสองกลุ่ม ดังแสดงใน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การศึกษาคุณลักษณะการดื้อยาของเชื้อ *E. coli*

pattern	Antibiotic resistant								ESBL (%)	Number of Isolate	clade
	Ampicillin	Cefotaxime	Ceftazidime	Ceftriaxone	Norfloxacin	ciprofloxacin	Levofloxacin	trimethoprim			
pattern-1	■	■	■	■	■	■	■	■	100%	13	clade 1
pattern-2	■	■	■	■	■	■	■	■	80%	5	
pattern-3	■	■	■	■	■	■	■	■	100%	1	
pattern-4	■	■	■	■	■	■	■	■	100%	1	
pattern-5	■	■		■	■	■	■	■	50%	2	
pattern-6	■	■	■		■	■	■	■	50%	2	
pattern-7	■	■	■	■	■	■	■	■	50%	2	
pattern-8	■	■	■		■	■	■	■	100%	1	
pattern-9	■		■		■	■	■	■	100%	1	
pattern-10	■		■	■		■	■		100%	1	
pattern-11	■	■	■	■		■		■	100%	4	clade 2
pattern-12	■	■	■	■				■	100%	2	
pattern-13	■	■	■	■				■	50%	4	
pattern-14	■	■	■	■					100%	1	
pattern-15	■	■	■			■		■	100%	2	
pattern-16	■				■	■	■	■	13%	9	
pattern-17		■	■		■	■	■	■	0%	1	
pattern-18	■	■			■	■	■	■	0%	1	
pattern-19	■				■	■	■	■	0%	2	
pattern-20	■				■	■		■	0%	1	
pattern-21	■				■	■	■		0%	1	
pattern-22	■			■	■	■	■		0%	1	
pattern-23					■	■		■	0%	1	
pattern-24					■	■	■		0%	1	
pattern-25						■	■		0%	1	
pattern-26								■	0%	1	clade 4
pattern-27	■					■			0%	2	
pattern-28	■							■	0%	1	
pattern-29								■	0%	1	
pattern-30	■								0%	5	
pattern-31									0%	5	

หมายเหตุ: ■ หมายถึง มีลักษณะการดื้อยา

* ยากลุ่ม Beta-lactam คือ Ampicillin, Cefotaxime, Ceftazidime, และ Ceftriaxone

* ยากลุ่ม Quinolone คือ Norfloxacin, Ciprofloxacin และ Levofloxacin

จากการศึกษาตัวอย่างประชากรพบว่าในแต่ละ clade เราจะพบเชื้อ *E. coli* พบว่า ใน clade 1 มีการดื้อยาทั้งแบบ ESBL และยากลุ่ม Quinolone สูงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบใน clade 1 จำนวน 30 ตัว เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 จำนวน 14 ตัว (47%) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ใน clade 2 จำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งมีการดื้อยาแบบ ESBL clade 2 จำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งมีการดื้อยาแบบ ESBL แต่ไม่มีการดื้อ Quinolone ดังแสดงใน (ตารางที่ 7)

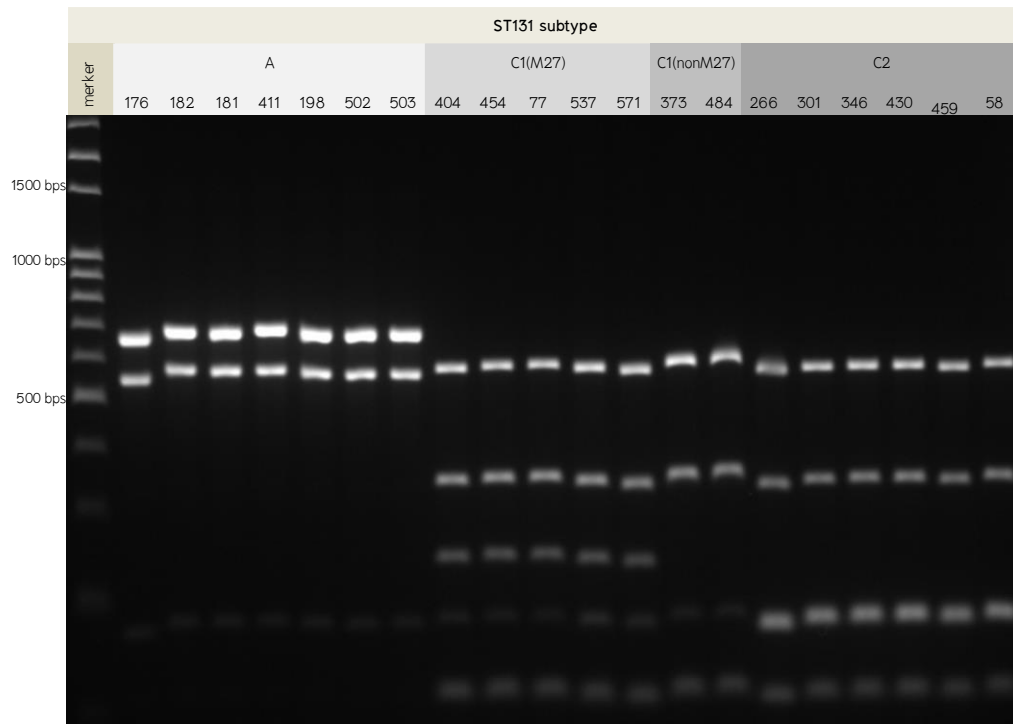
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความรุนแรงของการดื้อยาแบบ ESBL และกลุ่มยา Quinolone กับ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131

ตารางแสดงลักษณะการแบ่งกลุ่มตาม clemont และลักษณะการดื้อยาของแต่ละ clade

clade	clemont group				ST131	ESBL+Quinolone	ESBL	Quinolone	trimetroprim	gentamicin
	A	B1	B2	D						
clade 1 (n=30)	7	5	15	3	14(46.7%)	30	0	0	7	6
clade 2 (n=13)	5	0	6	2	4(30.7%)	1	4	0	3	4
clade 3 (n=19)	3	2	12	2	2(10.5%)	7	0	3	6	5
clade 4 (n=14)	2	0	12	0	0	1	2	0	2	2
Totol	17	7	45	7	0	39	6	3	18	17

ผลการทดลองที่ 7 การ subtype ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131

จากการศึกษาในกลุ่มเชื้อ *E. coli* เราพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม B2 มาทำการวิเคราะห์หาเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 โดยใช้วิธี multiplex PCR ซึ่งแบ่งสายพันธุ์ 131 เป็น subtype ได้เป็น 4 กลุ่มคือ A C1M27 C1nonM27 และ C2 จากตัวอย่างทั้งหมด 76 ตัวอย่าง พบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยพบใน subtype A จำนวน 7 ตัวอย่าง subtype C1M27 จำนวน 5 ตัวอย่าง subtype C1nonM27 จำนวน 2 ตัวอย่าง และ subtype C2 จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยในกลุ่ม A มีขนาดแบน 707 bps กลุ่ม C1M27 มีขนาดแบน 337 bps และ 232 bps กลุ่ม C1nonM27 มีขนาดแบน 337 bps และกลุ่ม C2 มีขนาดแบน 164 bps ดังแสดงใน (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 แสดงลักษณะรูปแบบแบนดิเอ็นที่แตกต่างกันที่บ่งชี้ subtype ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 เทียบกับ 100 bp DNA marker (Solis BioDyne)

ผลการทดลองที่ 8 การสร้าง phylogenetic tree ของกลุ่ม *E. coli* จำนวน 76 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค MLVA และ Virulence gene (Molecular typing and Subtyping)

จากการศึกษาเชื้อ *E. coli* จำนวน 76 ตัวอย่าง มาทำการศึกษาการแพร่กระจายและความรุนแรงของเชื้อ *E. coli* โดยเทคนิค MLVA ได้ 7 fragment บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) ในรูปแบบที่แตกต่างกันแบ่งเป็น cluster ได้จำนวน 50 รูปแบบ และการตรวจสอบ virulence gene โดยมีการกระจายที่สนใจอยู่ 4 รูปแบบโดยทุกเซลล์มีรูปแบบการกระจายของแบนด์ที่เหมือนกันและมีการกระจายตัวของรูปแบบสูง คือ clade X, clade Y, clade131_A และ clade131_3 โดย 2 รูปแบบแรกยังไม่ได้มีการวิเคราะห์ว่าอยู่ใน ST ไต และอีก 2 รูปแบบเป็นรูปแบบของ ST131 แต่ในทั้ง 4 รูปแบบนี้อยู่ในกลุ่มของ B2

จากการศึกษาพบว่าใน clade X จำนวน 9 ตัวอย่าง และ clade Y จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับ UTI ถึง 4 ยีน เราเลยคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ UTI โดย clade Y น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่พบในไก่เป็นโรค ส่วน ST131 จำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 2 clade คือ clade131_A จำนวน 13 ตัวอย่าง และ clade131_B จำนวน 7 ตัวอย่าง เป็น clade ที่วิเคราะห์และว่าเป็น ST131 พบว่ามีการดื้อยาทั้ง

แบบ ESBL และยาในกลุ่ม Quinolone ใน 2 clade พบ virulence gene ที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ ประมาณ 3 ยีน ชาติ vat และพบ virulence gene ที่เกี่ยวข้องกับไก่อ 1 ยีน คือ IRON

ดังนั้นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ในการศึกษานี้จะถูกจัดเป็น UTI และไม่มี ความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในไก่ และใน 2 clade ดังกล่าวสามารถถูกแบ่งเป็น subtype แตกต่างกันสามารถก่อให้เกิดรูปแบบของ MLVA ที่แตกต่างกันได้ 2 clade ใน clade131_A พบ subtype กลุ่ม C1 และ C2 ส่วนใน clade131_B พบ subtype กลุ่ม A ดังแสดงใน (ตารางที่ 8)



ตารางที่ 8 การจัดกลุ่มของเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค MLVA

	stian number	Cluster	Group	ST type	clade	Subclade ST131	virulence gene UTI	virulence gene chicken
	34	E1	A					
	250	E2	A					IRON
	183		A					IRON
	171	E3	A				fyuA	IRON
	564	E4	B2				Vat, fyuA	lutA
	12	E5	A				fyuA	IRON, ompT, HlyF, ISS, lutA
	101	E6	A				fyuA	
	556	E7	B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	30	E8	B2				fyuA, chuA, yfcV	IRON
	460	E9	D				fyuA, chuA	IRON
	59	E10	D				fyuA, chuA, yfcV	
	233		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	569		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	Iss
	574		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	Iss
	247		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	245	E11	B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	174		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	
	173		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	lutA
	170		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	159		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	197	E12	B1				fyuA	IRON
	175	E13	D				fyuA, chuA	lutA
	97	E14	B2				Vat, fyuA, chuA, yfcV	
	186	E15	A					
	100	E16	B2				Vat, chuA, yfcV	lutA
	522	E17	B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	544		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON, ompT, HlyF, ISS, lutA
	543		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON, ompT, HlyF, ISS, lutA
	584	E19	B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON, ompT, HlyF, ISS, lutA
	534		B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	531	E20	B2				fyuA, chuA, yfcV, Vat	IRON
	373	E21	B2	ST131		C1M27	fyuA, chuA, yfcV	Iss
	58		B2	ST131		C2	fyuA, chuA, yfcV	IRON
	77	E22	B2	ST131		C1M27	fyuA, chuA, yfcV	IRON
	571		B2	ST131		C1M27	fyuA, chuA, yfcV	Iss
	346	E23	B2	ST131		C2	fyuA, chuA, yfcV	IRON
	198	E24	B2	ST131		A	fyuA, chuA, yfcV	ompT, Iss
	438		B2	ST131		C1NM27	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	456		B2	ST131		c2	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	430		B2	ST131		C2	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	455	E25	B2	ST131		C1M27	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	459		B2	ST131		C2	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	404		B2	ST131		C1M27	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	301		B2	ST131		C2	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	537	E26	B2				fyuA, chuA, yfcV	IRON
	530		B2				fyuA, chuA	
	524	E27	B2				fyuA, chuA	
	274	E28	B1				fyuA	IRON
	303	E29	B1				fyuA	IRON
	202	E30	B1				fyuA	IRON
	8	E31	B1				fyuA, yfcV	
	117	E32	B1				fyuA	IRON
	57	E33	B1					
	555	E34	B2				chuA, yfcV	
	14	E35	A				fyuA	
	304	E36	D				chuA, yfcV	IRON
	266	E37	B2	ST131		C2	fyuA, chuA, yfcV	IRON
	196	E38	B2				Vat, fyuA, chuA, yfcV	
	109	E39	D				chuA	
	285	E40	A				fyuA	
	540	E41	B1				fyuA	
	33	E42	A				fyuA	
	364	E43	A				fyuA, chuA	IRON
	74	E44	A			A		IRON
	182		B2	ST131		A	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	181	E45	B2	ST131		A	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	517	E46	A				fyuA	IRON, ompT, HlyF, ISS, lutA
	503		B2	ST131		A	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	502		B2	ST131		A	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	441	E47	B2	ST131		A	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	176		B2	ST131		A	fyuA, chuA, yfcV	lutA
	291	E48	D				Vat, fyuA, chuA, yfcV	IRON
	366		D				fyuA, chuA	IRON
	15	E49	A				fyuA	
	13	E50	A				fyuA	

ผลการทดลองที่ 9 ศึกษารูปแบบของเชื้อ *E. coli* ที่มีการกระจายสูง และลักษณะของยีนดื้อยา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบที่แตกต่างกันของ MLVA (cluster) กับ genotype ของยีนดื้อยา การศึกษานี้มุ่งเน้นที่จะตรวจสอบยีนดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ในกลุ่ม Beta-lactam และกลุ่มยา Quinolone โดยใช้วิธี Multiplex PCR

การตรวจสอบความสอดคล้องกันระหว่าง Phenotype และ genotype การดื้อยาของเชื้อ *E. coli* การศึกษานี้พบว่าการดื้อยาในรูปแบบ ESBL และแบบ Quinolone ใน phenotype ของการดื้อยากลุ่ม Quinolone ถ้ามีการเกิด mutation ที่ตำแหน่ง *gyrA83* และ *gyrA87* ทำให้เกิดการดื้อยาทั้ง 3 ชนิด คือ Norfloxacin, Ciprofloxacin และ Levofloxacin แต่ถ้าไม่เกิด mutation ที่ตำแหน่ง *gyrA83* มักไม่เกิดการดื้อยาหรือเกิดการดื้อยาเพียงบางตัวเท่านั้น พบว่าใน clade x มีการดื้อยากลุ่ม Quinolone เป็นส่วนใหญ่เนื่องจากเกิดการ mutation ในทั้ง *gyrA83* และ *gyrA87* ส่วน clade Y ไม่พบว่าการดื้อยาในกลุ่ม Quinolone แต่มีการเกิด mutation ที่ตำแหน่ง *gyrA87* ส่วนใน clade131_A พบว่ามีเกิด mutation ที่ *gyrA83* และ *gyrA87* การดื้อยาทั้งแบบ ESBL และยากลุ่ม Quinolone ส่วนในกรณีของ clade131_B พบว่าการดื้อยากลุ่ม Quinolone เพียงชนิดเดียวคือ Ciprofloxacin เนื่องจากไม่มีการเกิด mutation ที่ตำแหน่ง *gyrA83* แต่มี *gyrA87*

การดื้อยาแบบ ESBL พบว่ามีความสัมพันธ์กับยีน 4 ชนิด คือ *CTXm1*, *CTXm9*, *TEM* และ *cmy* ซึ่งพบว่าเป็นกรณีของ clade x และ clade Y ไม่พบการดื้อยาแบบ ESBL และไม่พบยีนทั้ง 4 ยีนดังกล่าว ส่วนใน clade131_A พบความสัมพันธ์ของการดื้อยากับ subtype กลุ่ม C2 ซึ่งจะมียีน *CTXm1* ในขณะที่ subtype กลุ่ม C1nonM27 อาจจะมียีน *CTXm9* และใน clade131_B พบ subtype กลุ่ม A สามารถมียีนได้ 2 รูปแบบ คือ *CTXm1* หรือ *CTXm9* ดังแสดงใน (ตารางที่ 9) ซึ่งเราทำการสรุปลักษณะการดื้อยาและความสัมพันธ์ของยีนดื้อยาโดยแบ่งตาม clade จำนวน 4 clade ดังแสดงใน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงคุณลักษณะของยีนดื้อยา และการดื้อยาของเชื้อ *E. coli*

Antibiotic resistance gene										Antibiotic resistance									
clade	Number of Isolate	ST	subST131	gyrA83	gyrA87	TEM	OXA	CTXm1	CTXm9	cmv	Ampicillin	Cefotaxime	Ceftazidime	Cepriaxone	Norfloxacin	ciprofloxacin	Levofloxacin	trimethoprim	Gentamicin
clade x	8			●	●	●					■			■	■	■	■	■	■
	2			●		●									■	■		■	■
clade y	4				●													■	■
clade 131_A	3	131	C1M27	●	●	●			●		■	■	■	■	■	■	■	■	■
	4		C2	●	●		●	●		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	4		C1M27	●	●				●	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1		C2	●	●		●	●		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1		C2	●	●			●		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
clade 131_B	2	131	A	●	●	●			●		■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1		A	●	●	●			●		■	■	■	■	■	■	■	■	■
	2		A		●	●			●		■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1		A			●			●		■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1		A		●	●			●		■	■	■	■	■	■	■	■	■

หมายเหตุ: ● หมายถึง มียีน *gyrA83* *gyrA87* *TEM* *OXA* *CTXm1* *CTXm9* และ *cmv*

■ หมายถึง มีลักษณะการดื้อยา

*Clad หมายถึง การแบ่งตามการกระจายที่พบในการใช้เทคนิค MLVA ดังแสดงในตารางที่ 8

ผลการทดลองที่ 10 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *E. coli* ตามการจัดกลุ่มของ Clermont และ virulence gene ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI)

ความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่เกี่ยวข้องกับ Virulence gene ที่ก่อให้เกิดโรค UTI พบว่าเชื้อ *E. coli* ในกลุ่ม B2 ทั้งหมดจำนวน 41 ตัวอย่าง มี virulence gene 3-4 ยีน ประมาณ 89.1% ซึ่งพบว่าตัวอย่างในกลุ่ม B2 จำนวน 4 ตัว มี virulence gene อย่างน้อย 1 ยีน ประมาณ 8.6% จากข้อมูลบ่งชี้ได้ว่าเชื้อ *E. coli* กลุ่ม B2 เป็นกลุ่มเชื้อที่น่าจะสัมพันธ์กับเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI) นอกจากนี้ในกลุ่ม D จำนวน 7 ตัวอย่าง พบ Virulence gene 2-3 ยีน ประมาณ 9.2% ซึ่งจากการทดลองนี้เราพบว่าเชื้อ B2 และ D น่าจะเป็นเชื้อที่สัมพันธ์กับ UTI ดังแสดงใน (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 การแสดงคุณสมบัติของเชื้อ *E. coli* ที่เกี่ยวกับ virulence UTI

clermont group	virulence gene UTI				cluster MLVA	Number of Isolate
	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>yfcv</i>	<i>Vat</i>		
A	■				E3,E5,E35,E40,E42,E43,E46,E49,E50	9
	■			■	E3	1
B1	■				E6,E15,E44	5
	■		■		E12,E28,E29,E30,E32,E41	6
					E31	1
B2					E33	1
	■	■	■	■	E7,E11,E14,E17,E18,E19,E20,E38	19
	■	■	■		E8,E21,E22,E23,E24,E25,E26,E45,E47	22
		■	■	■	E16	1
	■	■	■		E27	2
D		■	■		E34	1
	■	■	■	■	E4	1
	■	■	■	■	E48	1
	■	■	■		E10	1
		■			E9,E13,E49	3
		■	■	E36	1	
		■		E39	1	

หมายเหตุ: ■ หมายถึง มียีน *fyuA chuA yfcv Vat*

*Cluster หมายถึง การแบ่งตามความคล้ายคลึงกันของเทคนิค MLVA ดังแสดงในตารางที่ 8

ผลการทดลองที่ 11 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *E. coli* ตามการจัดกลุ่มของ Clermont และ virulence gene ที่ก่อโรคในไก่

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่มีความสัมพันธ์กับ Virulence gene ที่ก่อให้เกิดโรคในไก่ โดยดูจาก Virulence ที่สำคัญ 5 ตัว คือ *IRON*, *OMPT*, *HlyF* และ *lutA* เราพบว่าในกลุ่ม A พบ 1 ตัวอย่าง ที่มียีนทั้ง 5 ตัว อยู่ใน cluster E46 และยังพบในกลุ่ม B2 จำนวน 5 คือ cluster E4 จำนวน 1 ตัวอย่าง และ E19 จำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งจัดอยู่ใน Clade X ที่เราสนใจ ดังแสดงใน (ตารางที่ 8) ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่ไม่พบยีนหรือมียีนอย่างน้อย 1 ยีน ที่มีความสัมพันธ์กับ Virulence gene ก่อโรคในไก่ ประมาณ 70 ตัวอย่าง หรือประมาณ 92% ซึ่งสรุปได้ว่าตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ทำการศึกษาอาจจะได้รับมาจากไก่ที่เกิดโรค ดังแสดงใน (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 การแสดงคุณสมบัติของเชื้อ *E. coli* ที่เกี่ยวกับ virulence gene ที่ก่อโรคไก่

Clermont group	Virulence gene Chicken					cluster MLVA	Number of Isolate
	<i>IRON</i>	<i>ompT</i>	<i>HlyF</i>	<i>ISS</i>	<i>lutA</i>		
A	■	■	■	■	■	E46	1
	■					E2,E3,E43,E44	4
					■	E3	1
						E1,E5,E6,E15,E35,E40,E42,E49,E50	9
B1	■					E12,E28,E29,E30,E32	5
						E8,E33,E41	3
B2	■	■	■	■	■	E4,E19	5
	■					E7,E8,E11,E17,E19,E22,E23,E26,E37	14
		■		■		E24	1
				■		E11,E21,E22,E24	4
D					■	E11,E16,E25,E45	15
						E11,E14,E20,E27,E34,E38	7
	■					E9,E36,E48,E49	4
					■	E13	1
						E10,E39	2

หมายเหตุ: ■ หมายถึง มียีน *IRON ompT HlyF ISS* และ *lutA*

*Cluster หมายถึง การแบ่งตามความคล้ายคลึงกันของเทคนิค MLVA ดังแสดงในตารางที่ 8

ผลการทดลองที่ 12 การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ในกลุ่มที่มีการแพร่กระจายสูง

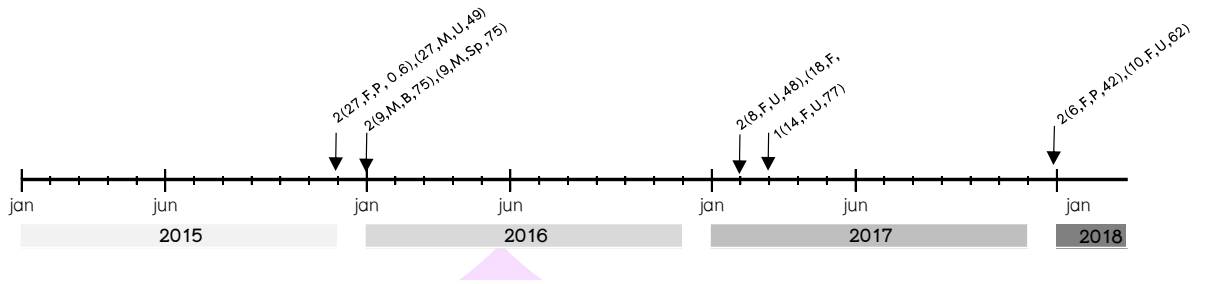
จากการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* โดยใช้วิธี MLVA เราพบกลุ่มของเชื้อ *E. coli* ที่มีการแพร่กระจายสูง และมีรูปแบบคล้ายคลึงกัน เช่น ลักษณะการดื้อยา ลักษณะของ Virulence gene ที่เหมือนกัน ซึ่งใน clade X เราพบว่าเป็นกลุ่มที่มีการดื้อยากลุ่ม Quinolone แต่ไม่ดื้อยากลุ่ม ESBL เราคาดว่าเชื้อ *E. coli* ใน clade X มาจากการติดเชื้อ UTI แต่ไม่ได้มาจากโรคที่เกิดในไก่ clade Y คือกลุ่มที่ไม่มีการดื้อยาทั้งในยากลุ่ม Quinolone และยากลุ่ม ESBL คาดว่าได้รับยีนมาจากการติดเชื้อ UTI และมาจากโรคที่เกิดในไก่ clade131_A และ clade131_B เป็น clade ที่มีการดื้อยาทั้งใน beta-lactams และยากลุ่ม Quinolone คาดว่าในเชื้อ *E. coli* ทั้งสองกลุ่มนี้มาจากเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI)

การแพร่กระจายเชื้อ *E. coli* ช่วงเวลาที่แตกต่างกันที่มีการแพร่กระจายสูง ซึ่งเราแบ่งได้เป็น 4 clade คือ clade X, clade Y, clade131_A และ clade131_B พบว่าเชื้อ *E. coli* ในทั้ง 4 clade ที่เราสนใจเป็นเชื้อ *E. coli* กลุ่ม B2 ซึ่ง clade X พบว่ามีภาระโรคในช่วงต้นปีของทุกปี

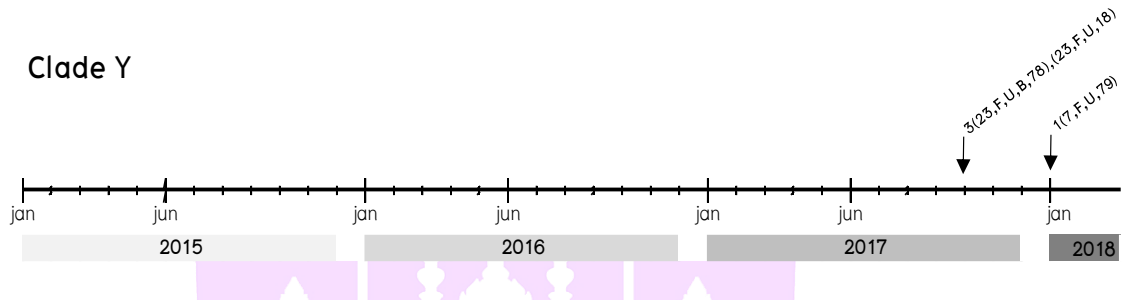
ตั้งแต่ เดือนมกราคม ค.ศ. 2015 ถึงเดือนมกราคม ค.ศ. 2018 และมีการดื้อยาในกลุ่ม Quinolone ส่วน clade Y พบว่ามีการระบาดในช่วงเดือนตุลาคม ปี ค.ศ. 2017 ถึงเดือนมกราคม ปี ค.ศ. 2018 และพบ Virulence gene ที่สัมพันธ์กับเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและมีความสัมพันธ์กับ Virulence gene ก่อโรคในไก่ ส่วนในการระบาดของ clade131_A เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 มี subtype ในกลุ่ม C1 และ C2 เราจะสังเกตเห็นว่ามีการระบาดทั้งปีและมีความชุกในช่วงปี 2016 และลดน้อยลงในปี 2017 กรณีของ clade131_B เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 มี subtype ในกลุ่ม A เราพบว่ามี การระบาดในช่วงเดือนมกราคมปี 2016 เดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2016 และเดือนกรกฎาคม ปี ค.ศ. 2017 ดังแสดงใน (ภาพที่ 33)



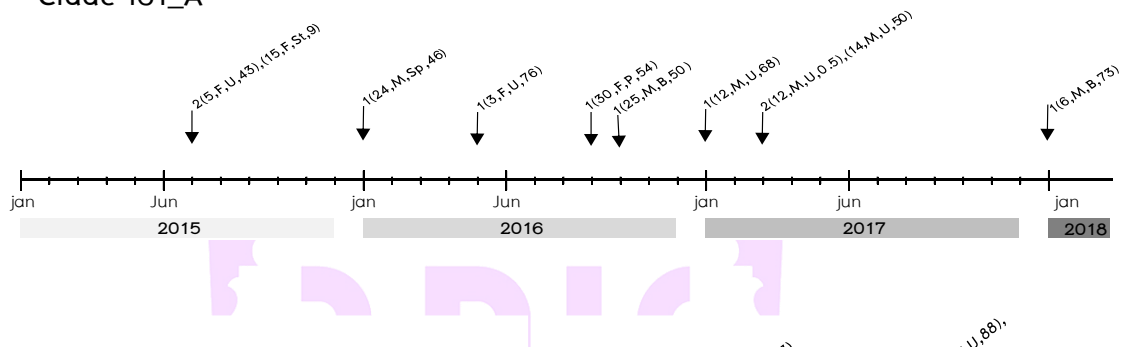
Clade X



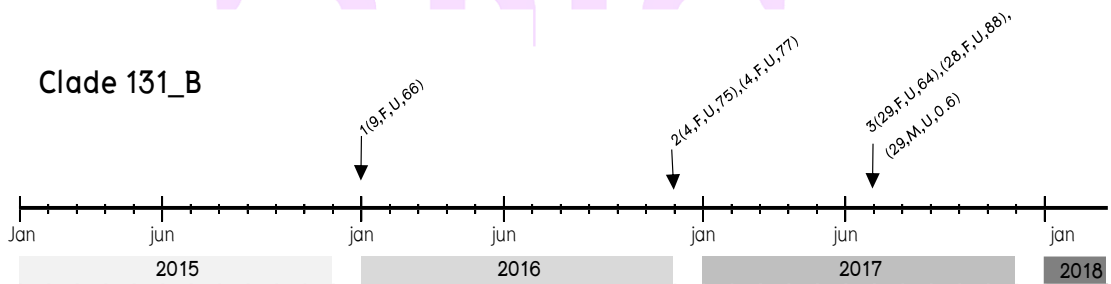
Clade Y



Clade 131_A



Clade 131_B



ภาพที่ 33 การแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่มีการกระจายสูง 4 clade ในแต่ละช่วงเวลา

หมายเหตุ: จำนวนตัวอย่าง (วันที่,เพศ,ชนิดตัวอย่าง,อายุ)

F : female M : male U : urine Sp : sputum B : blood P : pus St : stool

บทที่ 5

สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษากาการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับตัวอย่างมาจากผู้ป่วยในของโรงพยาบาลจังหวัดพะเยาราม จำนวน 76 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมกราคม ปี ค.ศ. 2015 ถึงเดือน มกราคม ปี ค.ศ. 2018 พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับมาจากผู้ป่วยในของโรงพยาบาลพะเยารามมีอัตราการดื้อยาต่อยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมาก โดยเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน ยากลุ่มแรกที่พบว่าเชื้อมีการดื้อยาปฏิชีวนะ คือยา cephalosporin และยา fluoroquinolone เป็นยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในโรงพยาบาลของรัฐในประเทศไทย (Lestari, et al., 2012) การตรวจสอบเชื้อ *E. coli* ที่มีลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะและความรุนแรงของโรคในปัจจุบันวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* ที่มีลักษณะการดื้อยาเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาสั้น ผู้วิจัยจึงใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็วเพื่อระบุเชื้อที่มียีนดื้อยาปฏิชีวนะ และสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง เพื่อให้การรักษาที่มีประสิทธิภาพและการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา จากการศึกษาในครั้งนี้การตรวจยีนดื้อยาปฏิชีวนะมีความสอดคล้องกันกับการตรวจสอบการดื้อยาด้วยวิธีมาตรฐาน ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ในผู้ป่วยส่วนใหญ่มาจากตัวอย่างของปัสสาวะ และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในภาคเหนือของประเทศไทย (Parikumsil, et al., 2017) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีการติดเชื้อเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน จึงทำการศึกษาโดยทำการจัดกลุ่มของเชื้อ *E. coli* ซึ่งวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบันเป็นการดูความแตกต่างของ O antigen, H antigen และ K antigen ของเชื้อ *E. coli* แต่วิธีนี้ใช้เวลานาน การศึกษาครั้งนี้จึงทำการจัดกลุ่มของเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค Clermont อาศัยความแตกต่างของยีน *chuA*, *yjaA* และ DNA fragment TSPE4.C2 ซึ่งสามารถจัดกลุ่มของเชื้อ *E. coli* ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ A, B1, B2 และ D (Clermont, et al., 2000) โดยสามารถเทียบเคียงได้กับการศึกษาในประเทศอิหร่านพบความสัมพันธ์ของเชื้อ *E. coli* ที่มีความรุนแรงของโรค โดยศึกษารูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะและ virulence gene ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ Uropathogenic *E. coli* (UPEC) พบว่าเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ B2 และ D ซึ่งในกลุ่มนี้มีลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะมากกว่ากลุ่มอื่น (Halaji, et al., 2022)

นอกจากนี้ยังมีวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการ typing และ subtyping ของเชื้อ *E. coli* คือ Pulsed-field gel-electrophoresis (PFGE) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูง แต่วิธีนี้ใช้เวลานานและมีความยุ่งยาก โดยมีรายงานการศึกษาในเชื้อ *E. coli* ที่มีการผลิตเอนไซม์ Beta-lactamase ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในประเทศอิหร่าน พบว่าวิธีมาตรฐาน PFGE มีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิค MLVA แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้สามารถนำมาใช้สำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาได้ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว ราคาถูก และวิเคราะห์ผลได้ง่าย (Dolatyar, et al., 2021) ในการศึกษาครั้งนี้จึงเปรียบเทียบวิธี Pulsed-field gel-electrophoresis กับ Multi-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) ในการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ พบว่าการใช้เทคนิค MLVA สามารถนำมาใช้ศึกษาการระบาดของเชื้อ *E. coli* ได้เหมือนกันกับงานวิจัยในประเทศอิหร่าน ในกรณีของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 เป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดสูงทั่วโลก ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการดื้อยาทั้งในกลุ่มเบต้าแลคแตม และยากุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Finn, et al., 2020) การศึกษาในครั้งนี้เชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างของปัสสาวะพบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 จำนวน 20 ตัวอย่าง จาก 43 ตัวอย่าง หรือประมาณ 46 % ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2016 พบว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ที่มียีน *blaCTXm-9* สูงกว่า เชื้อ *E. coli* ที่มียีน *blaCTXm-1* และมีอัตราการติดเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น (Matsumura, et al., 2016; Birgy, et al., 2017; Ghosh, et al., 2017) โดยประเทศไทยก่อนหน้านี้ พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 ที่มียีน *blaCTXm-9* มีต้นกำเนิดมาจากฟาร์มสัตว์ปีก เกษตรกร และสิ่งแวดล้อม (Tansawai, et al., 2019) ซึ่งเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ST131 สามารถ subtype ได้ 4 กลุ่ม คือ A, C2, C1M27 และ C1nonM27 บ่งชี้ถึงการแพร่กระจายในขนาดของเชื้อ *E. coli* กลุ่ม C1 ในภาคเหนือของประเทศไทย ในขณะที่ประเทศญี่ปุ่นพบกลุ่ม C1M27 ซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากพบว่าการแพร่กระจายของพลาสมิดที่มีความรุนแรง (*blaCTX-M-27*) (Matsuo, et al., 2020) และ ST131 กลุ่ม C2 ที่มียีน *blaOXA* อาจเป็น nosocomial และมาจากโคลน SEA-C2 ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Chen, et al., 2019)

การศึกษากการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ในกลุ่มตัวอย่างของผู้ป่วยในโรงพยาบาลจังหวัดพะเยา มาทำการตรวจสอบ Virulence gene จำนวน 5 ยีน ได้แก่ *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* และ *ompT* ซึ่งพบในสัตว์ปีกที่เป็นโรค ซึ่งผู้วิจัยพบ virulence gene ดังกล่าวในเชื้อ *E. coli* กลุ่ม B2 จำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งอาจจะได้มาจากอุจจาระของไก่ หรืออาจมีการติดเชื้อมาจากสัตว์ปีก เนื่องจากมีการศึกษากการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* (APEC) จากอุจจาระของไก่ที่เกิดโรค จำนวน 124 ตัวอย่าง พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง Virulence gene และการแพร่กระจาย

จากสัตว์สู่มนุษย์ได้ (Stromberg ZR, et al., 2017) นอกจากนี้เรายังศึกษาความสัมพันธ์ Virulence gene กับ UTI พบว่า เชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่คาดว่าเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ โดยสังเกตจากการพบ virulence gene จำนวน 3-4 ยีนที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิด UTI ดังการศึกษากลุ่มเชื้อ *E. coli* จำนวน 4 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน และถูกพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อ UTI โดยใช้ 4 virulence gene เป็น gene marker (Rachel R, et al., 2012) งานวิจัยนี้สามารถจัดกลุ่มของ *E. coli* ที่แตกต่างกันและมีความสอดคล้องกับ ST type อย่างง่ายและรวดเร็ว โดยใช้วิธี MLVA analysis และการใช้ virulence เพื่อยืนยันกลุ่มเชื้อ *E. coli* ต่าง ๆ เช่น กลุ่ม UTI และทำให้เกิดโรคในสัตว์ปีก โดยเทคนิค PCR ที่ศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของวิธีทางอณูชีววิทยาที่รวดเร็วและง่ายต่อการระบุยีนที่ก่อต่อยาปฏิชีวนะและเชื้อ *E. coli* ที่มีความรุนแรงที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกซึ่งน่าจะช่วยในการรักษาที่เหมาะสมและทันท่วงที เพื่อศึกษาลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อ ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย



บรรณานุกรม

- กฤติกา คำมูณี. (2558). **ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ Escherichia coli ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์.** [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. สงขลา; มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จักรพงษ์ สีนามะ. (2561). **การจำแนกลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อ Escherichia coli ที่สร้างเอนไซม์ EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES ที่แยกได้จากสุกรและประชากรในอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน.** [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ณรงค์ นวลเมือง และ อักษรกร คำมาสุข. (2018). การดื้อยา Extended-spectrum cephalosporins และ Fluoroquinolones ของเชื้อ Salmonella spp.: กลไกการดื้อยาและระบาดวิทยา. *J Med Tech Assoc Thailand*. 6494-6507.
- ดร.ภญ.เกษร เทพแปง. (2019). **รู้จักกับเชื้ออีโคไล (Escherichia coli).** [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 27 ก.ค. 2563]. เข้าถึงได้จาก: <http://osh.labour.go.th/attachments/article>
- ดร.สุนัดดา โยมญาติ. (2556). **การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย (ตอนที่ 2) กลไกการถ่ายทอดยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย.** [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 8 ส.ค. 63]. เข้าถึงได้จาก: <http://biology.ipst.ac.th>.
- ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนานนท์. *Escherichia coli / E. coli.* [อินเทอร์เน็ต]. 2010. [เข้าถึงเมื่อ 25 ก.ค. 2563]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.foodnetworksolution.com>
- พีรพัฒน์ ปัญญาดี, เพชรดา ทองเงิน, คณิต อัครเทพทวี, อนงค์ คิตดี, อรรถพล ต้นไสว, ดร.นพวรรณ บุญชู, และคณะ. (2018). **การแพร่กระจายของเชื้อเอสเชอริเชียโคไลดื้อยาที่แยกได้จากแมลงวันหัวเขียวในพื้นที่ตลาดจังหวัดพิษณุโลก.** การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 19 ประจำปี 2561.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2019). **Percentage of Susceptible Organisms Isolated From All Specimen, 92 hospitals, Jan-Dec**

2019 . [อินเทอร์เน็ต].2019. [เข้าถึงเมื่อ 5 ส.ค. 63]. เข้าถึงได้จาก:

<http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms/2019 .pdf>

สมาคมกุมารเวชศาสตร์ทางเดินอาหารและตับ. (2562). **แนวทางเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคท้องร่วงเฉียบพลันในเด็ก**. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 5 ก.พ. 2567]. เข้าถึงได้จาก <http://www. Pthaigastro.org>.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส) สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล องค์การเฝ้าระวัง (international development research centerX :IDRC. (2557). **โครงการควบคุม และป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย**. [อินเทอร์เน็ต]. 2557. เข้าถึงได้จาก: <https://www.fda.moph.go.th/sites/.pdf>.

อรทัย ทองจ้อย. (2561). **รูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียชนิด Escherichia coli และ Staphylococcus aureus ที่เพาะแยกได้จากพื้นที่ปฏิบัติงานภายในโรงพยาบาลสัตว์เพื่อการเรียนการสอน จังหวัดนครปฐม**. [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร]. นครปฐม; มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ÁvilaOliveira ESI, Cardozo MVI, Borzi MMI, Borges CAI, Guastalli EALII, Ávila FAI h. (2019). Highly Pathogenic and Multidrug Resistant Avian Pathogenic Escherichia Coli in Free-RangeChickens from Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**.

Avneet Saini, Rohit Bansal. (2012). Insights on the structural characteristics of NDM-1: The journey so far. **Advances in Biological Chemistry**. Vol. 2 No. 4.

Belayneh Regasa. (2018). **Phenotypic and molecular characterization of uropathogenic Escherichia coli from urinary tract infection patients in selected health facilities of Addis Ababa, Ethiopia**. Semantic Scholar.

Bhanot SK, Singh M, Chatterjee NR. (2001). The Chemical and Biological Aspects of Fluoroquinolones Reality and Dreams. **Current Pharmaceutical Design**. 25: 311–335

BioMérieux SA. (2024). **Multilocus sequence typing (MLST) analysis**. Biomerieux.com.

- Birgy A, Bidet P, Levy C, Sobral E, Cohen R, Bonacorsi S. (2017). **CTX-M-27-producing Escherichia coli of sequence type 131 and clade C1-M27, France.** Emerg Infect Dis.
- Caméléna F., Birgy A., Smail Y., Courroux C., Mariani-Kurkdjian P., Hello L. S., Bonacorsi S & Bideta P. (2019). Rapid and Simple Universal Escherichia coli Genotyping Method Based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Using Single-Tube Multiplex PCR and Standard Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology.**
- Cameron J. Reid J. C., Jechalke S., Smalla K., & Djordjevic S. (2019). Whole Genome Sequencing of Escherichia coli From Store-Bought Produce. **Frontiers in microbiology. Volume 10.**
- Cập nhật lúc. (2021). **Escherichia coli—the source of infection and how to prevent it. Faculty of Food Science and Technology.**
- Caractéra. (2004). **Pathogenic E. coli.** Taming bacteria to promote animal and public health.
- Caractera. (2004). **Pathogenic Escherichia coli.** taming bacteria to promote animal and public health.
- Chahinez M, Yamina M, Rabah B. (2019). Virulence gene profiles, antimicrobial resistance and phylogenetic groups of fecal Escherichia coli strains isolated from broiler chickens in Algeria. **National library of medicine.** 31;55(1):35–46.
- Charlène R., Adeline S., Tom Van de W. & Stéphanie Blanquet-D. (2016). Foodborne enterotoxigenic Escherichia coli: from gut pathogenesis to new preventive strategies involving probiotics. **FUTURE MICROBIOLOGYVOL. 12, NO. 1REVIEW**
- Chattaway, Marie. (2015). **A Novel Approach to Pathogen Recognition for Diarrhoeagenic Enteroaggregative Escherichia coli.** UCL (University College London).

- Chen SL, Ding Y, Apisarnthanarak A, et al. (2019). The higher prevalence of extended spectrum beta-lactamases among Escherichia coli ST131 in Southeast Asia is driven by expansion of a single, locally prevalent subclone. **Sci Rep.**
- Clermont O, Bonacorsi S and Bingen E. (2000). Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. **Applied and environmental.** 4555–4558.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. **Applied and environmental microbiology.** 4555–4558.
- Dallenne C, Costa AD, Decré D, Favier C, Arlet G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal Antimicrob Chemother.** 490–495.
- David MG, Clermont O, Heather T and Erick D. (2008). Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology.** 2484–2496.
- Dolatyar Dehkharghani A, Haghghat S, Rahnamaye Farzami M, Douraghi M, Rahbar M. (2021). Subtyping beta-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from patients with UTI by MLVA and PFGE methods. **Iran J Basic Med Sci.**
- Dolatyar Dehkharghani A, Haghghat S, Rahnamaye Farzami M, Douraghi M, Rahbar M. (2021). Subtyping beta-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from patients with UTI by MLVA and PFGE methods. **Iran J Basic Med Sci.**
- Drlica K. and Zhao X. (1997). DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. **Microbiology and molecular biology reviews.** 377–392.
- Elaine FFC, Edilaine FB, Aline A, Teodorico CR. (1999). Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.** 619–625.
- Escherichia coli Isolates That Carry vat, fyuA, chuA, and yfcV Efficiently Colonize the Urinary Tract. **ASM Journals Infection and Immunity**

- Finn TJ, Scriver L, Lam L, et al. (2020). A comprehensive account of Escherichia coli sequence type 131 in wastewater reveals an abundance of fluoroquinolone-resistant clade A strains. **Appl Environ Microbiol**.
- Flores–Mireles, A., Walker, J., Caparon, M. et al. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol** 13, 269–284 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- François C, André B, Yasmine S, Céline C, Patricia MK, Simon LH, et al. (2019). Rapid and Simple Universal Escherichia coli Genotyping Method Based on Multiple–Locus Variable–Number Tandem Repeat Analysis Using Single–Tube Multiplex PCR and Standard Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**.
- Ganesh Adhikari. (2016). **Escherichia coli in Bharatpur Urban Area, Nepal**. IAAS, Tribhuvan University, Nepal.
- Ghosh H, Doijad S, Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Chakraborty T. (2017). blaCTX–M–27 encoding Escherichia coli sequence type 131 lineage C1–M27 clone in clinical isolates, **Germany**. **Emerg Infect Dis**.
- Girish Bilagi. (2020). **Quinolone cellular mechanism of action and resistance**. H.S.K college of Pharmacy, Bagakot.
- Gowda S. N. R. (2023). **MECHANISM OF ANIBIOTIC RESISTANCE**. Former and Founding VC, KVAFSU, Bidar, Former Director, IAH&VB, Bangalore, Former Prof and University Head, Dpt. Of Pathology, Veterinary College, UAS, Bangalore.
- Gurudas Khilnani and Ajeet Kumar Khilnani. (2019). **Antibiotic Resistance**. Red Biotechnology
- Halaji, Mehrdad Fayyazi, Amirhossein Rajabnia, Mehdi Zare, Donya Pournajaf, Abazar Ranjbar, Reza. (2022). phylogenetic Group Distribution of Uropathogenic Escherichia coli and Related Antimicrobial Resistance Pattern: A Meta–Analysis and Systematic Review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**.

- Halaji, Mehrdad Fayyazi, Amirhossein Rajabnia, Mehdi Zare, Donya Pournajaf, Abazar Ranjbar, Reza. (2022). Phylogenetic Group Distribution of Uropathogenic Escherichia coli and Related Antimicrobial Resistance Pattern: A Meta-Analysis and Systematic Review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**.
- Hammadi Amer and Almousawi Masar. (2021). Cloning of DNA: A Review. **Scientific journal of medical research**.
- Hooper CD. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Resistance Updates**. 38–55
- Jane E. Sykes and Stanley L. Marks. (1885). **Enteric Escherichia coli Infections**. Humans and a large variety of animals. Chapter 46
- Jiangang Hu, Dossêh Jean Apôtre Afayibo, Beibei Zhang, Hong Zhu, Lan Yao, Weiqi Guo, Xinyu Wang, Zhiyang Wang, Di Wang, Haoheng Peng, Mingxing Tian, Jingjing Qi and Shaohui Wang. (2022). Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic Escherichia coli (APEC). **Frontiers in Microbiology**.
- Kanokporn pantong. (2565). **Characterization of Alpha-hemolysin (HlyA) Toxin protein from Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) Strain**. Degree of master in biochemistry prince of Songkla University.
- Karen B and Patricia AB. (2019). Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Antimicrobial resistance**. 17: 295–306.
- Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, George AJ, David CH. (2009). Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. **Antimicrobial agent and chemotherapy**. 639–645.
- Kulengowski T. B. (2016). **IN VITRO ACTIVITY OF POLYMYXIN B AND MEROPENEM ALONE AND IN COMBINATION AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE**. degree of Master of Science in the Department of Pharmacy Practice and Science at the University of Kentucky.

- Lagerstrom KM, Hadly EA. (2021). The under-investigated wild side of Escherichia coli: genetic diversity, pathogenicity and antimicrobial resistance in wild animals. **Royal society publishing.**
- Leila C Campos, Marcia R Franzolin, Luiz R Trabulsi. (2004). Diarrheagenic Escherichia coli Categories among the Traditional Enteropathogenic E. coli O Serogroups – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, Vol. 99, pp. 545–552
- Lestari ES, Severin JA, Verbrugh HA. (2012). Antimicrobial resistance among pathogenic bacteria in Southeast Asia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.**
- Lisa K. Nolan, Kwang Sik Kim, James R. Johnson, Harry L. T. Mobley. (2012).
- Manageiro V., Clemente L., Jone-Dias D., Albuquerque T., Ferreira E., Canica M. (2015). CTX-M-15-Producing Escherichia coli in Dolphin, Portugal. **Emerging infectious Diseases.** Vol. 21. No. 12.
- Maria Maslinska. (2013). Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. **Advances in Bioscience and Biotechnology.**
- Mariaulfa. (2019). **PATOGENESIS ESCHERICHIA COLI.** MH Magazine WordPress Theme by MH Themes.
- Martínez M, Alvaro P, George A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. **The lancet.** 797–799.
- Matsumura Y, Pitout JDD, Gomi R, et al. (2016). Global Escherichia coli sequence type 131 clade with blaCTX-M-27 gene. **Emerg Infect Dis.**
- Matsumura Y, Pitout JDD, Peirano G, et al. (2017). Rapid identification of different Escherichia coli sequence type 131 clades. **Antimicrob Agents Chemother.**
- Matthew A. Croxen, Robyn J. Law, Roland Scholz, Kristie M. Keeney, Marta Wlodarska and B. Brett Finlay. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. **American society for Microbiology.**

Mohamed HA, Atef MS, Abdulkader F T, Noura A E, David M L. (2012). Extended–spectrum and metallo–beta–lactamases among ceftazidime–resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Riyadh, Saudi Arabia. **Journal of Chemotherapy.** 97–100.

Mohsen Naghavi. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Articles.** page 606

Naber KG. (2001). Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections. **Int J Antimicrob Agents.** s0924–8579.

Nelson AR and Anete SG. (2006). Allergy to beta–lactams in pediatrics: a practical approach. **Journal de pediatria.** 1678–4782.

Nishant Nandanwar. (2013). Functional genotyping of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) belonging to the highly pathogenic Sequence type 95 reveals the Zoonotic nature of human and avian strains. **Chemistry and Pharmacy of Freie University Berlin.**

Panusanon Silamat. (2010). **Developmental of molecular technique for salmonella enterica serovar Thyphimirium and Enteritidis stains identification by high resolution melting analysis.** [Thesis of master of science program]. Bangkok; Chulalongkorn university.

Parikumsil N, Prapasawat W, Siriphap A, et al. (2017). Virulence factors and molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from paired urine and rectal swab samples of patients with urinary tract infections in Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.**

Raad Naji Hasan a, Saade Abdalkareem Jasim b, Yasameen Hassan Ali c. (2022). Detection of *fimH*, *kpsMTII*, *hlyA*, and *traT* genes in *Escherichia coli* isolated from Iraqi patients with cystitis. **Gene Reports.** Volume 26.

Rachel R. Spurbeck, a Paul C. Dinh, Jr.,b Seth T. Walk, c Ann E. Stapleton, d Thomas M. Hooton, e Lisa K. Nolan, f Kwang Sik Kim, g James R. Johnson, h and Harry L. T.

- Mobley. (2012). Escherichia coli Isolates That Carry vat, fyuA, chuA, and yfcV Efficiently Colonize the Urinary Tract. **Infection and Immunity** p. 4115– 4122.
- Rachel R. Spurbeck, Paul C. Dinh Jr., Seth T. Walk, Ann E. Stapleton, Thomas M. Hooton, Lisa K. Nolan, Kwang Sik Kim, James R. Johnson, Harry L. T. Mobley. (2012). Escherichia coli Isolates That Carry vat, fyuA, chuA, and yfcV Efficiently Colonize the Urinary Tract. **ASM Journals Infection and Immunity**.
- Roussel C., Sivignon A., Blanquet-Diot S. (2017). Pathogenesis to new preventive strategies involving probiotics. Published in Future Microbiology Medicine, **Agricultural and Food Sciences**.
- Sean DR, Corinne JH, Alyssa CB, Robert KS, Thomas SW. (2000). **Parallel evolution of virulence in pathogenic Escherichia coli**. letters to nature. 406: 64–67.
- Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, et al. (2017). Evaluation of Escherichia coli isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. **PLOS ONE**
- Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, et al. (2017). Evaluation of Escherichia coli isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. **PLOS ONE**.
- Tansawai U, Walsh TR, Niomsup PR. (2019). Extended spectrum β -lactamase producing Escherichia coli among backyard poultry farms, farmers, and environments in Thailand. **Poult Sci**.
- Timothy J. Johnson, Yvonne Wannemuehler, Curt Doetkott, Sara J. Johnson, Sandra C. Rosenberger, and Lisa K. Nolan. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic Escherichia coli Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**. p. 3987–3996
- Yan X., Wang B., Tao X., & Hu Q. 2012. Characterization of Staphylococcus aureus Strains Associated with Food Poisoning in Shenzhen, China. **Applied and Environmental Microbiology**.

Yasufumi M, Johann DP, Gisele P, Rebekah D, Taro N, Masaki Y, et al. (2017). Rapid Identification of Different Escherichia coli Sequence Type 131 Clades. **Applied and Environmental Microbiology**. 61: e00179–17.

Zainel Abdulwahed, Hana Mitchell, Manish Sadarangani. (2021). Bacterial Meningitis in Children: Neurological Complications, Associated Risk Factors, and Prevention. **Microorganisms**.





ภาคผนวก

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	รุ่งทิwa ศรีโมรา
วัน เดือน ปี เกิด	13 พฤษภาคม 1997
สถานที่เกิด	สุพรรณบุรี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยพะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 121/2 หมู่ 4 ตำบลหนองฝักราบ อำเภอสามชุก จังหวัด สุพรรณบุรี 72130
ผลงานตีพิมพ์	Rungthiwa Srimora. (2021) Prevalence and molecular characterization of escherichia coli st131 isolates from patients at a tertiary-care hospital in phayao province, thailand (march 2015 – june 2017). Southeast asian j trop med public health. Vol 52 No.1 (143–160)

