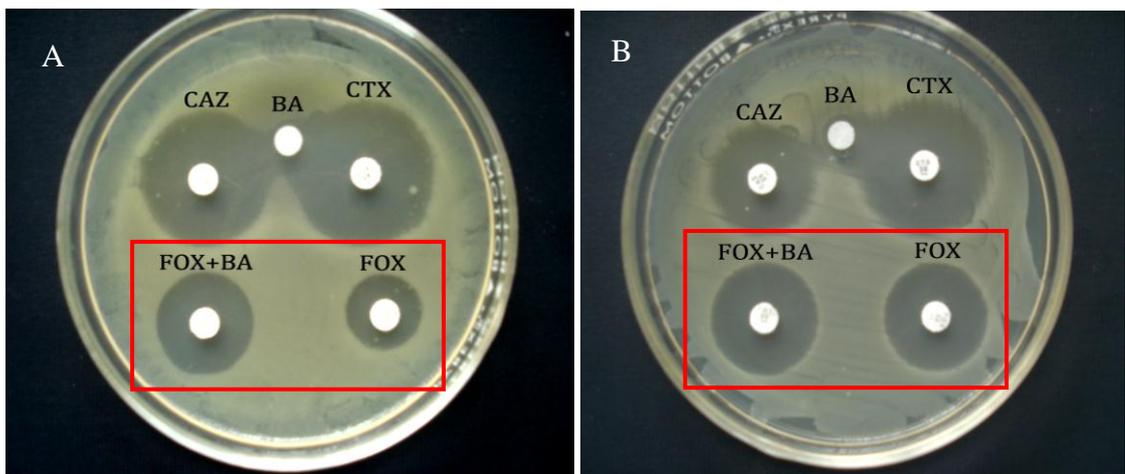


บทที่ 4 ผลการวิจัย

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่เข้าทำการรักษาในโรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลกโรงพยาบาลแม่สอด และโรงพยาบาลในแถบภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 165 ตัวอย่าง และเชื้อแบคทีเรียควบคุม ได้แก่ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ R154 เป็น Positive control (produced AmpC β -lactamase) และ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ ATCC 700603 เป็น Negative control (no AmpC β -lactamase) ถูกนำมาศึกษา ณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ดังนี้

4.1 การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ pAmpC

ทำการตรวจหาการผลิตเอนไซม์ AmpC β -lactamases ทางพีโนไทป์ในเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 165 ตัวอย่าง ด้วยวิธี inhibitor-based test โดยการวางแผ่นยา cefoxitin ขนาด 30 ไมโครกรัม และ cefoxitin ขนาด 30 ไมโครกรัม ที่เติม boronic acid ขนาด 400 ไมโครกรัม พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ AmpC beta-lactamases จำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.15

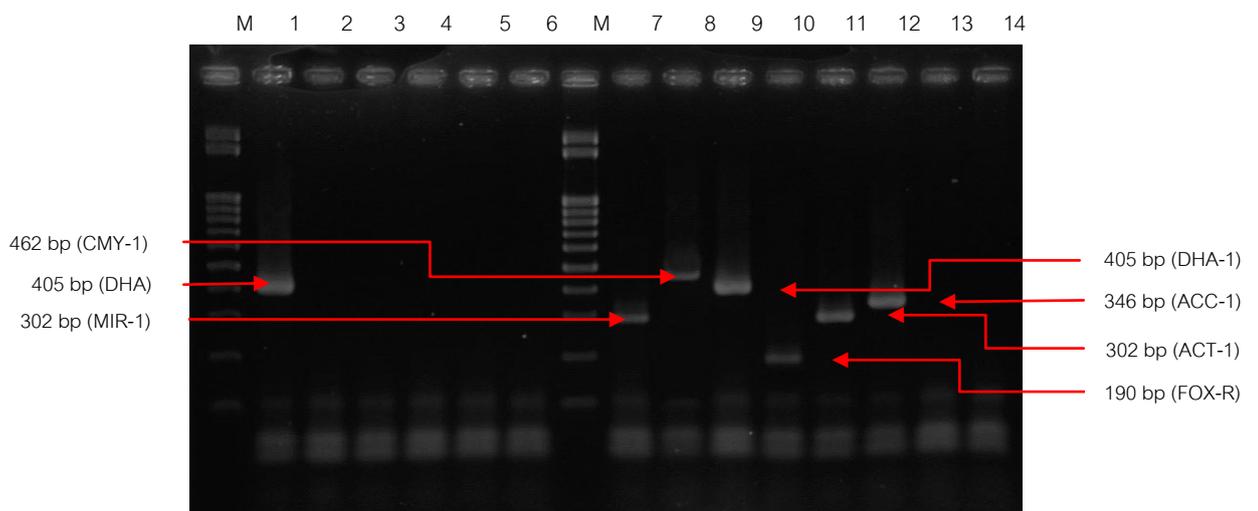


Positive

Negative

ภาพที่ 4 แสดงการตรวจหาเอนไซม์ AmpC beta-lactamases ด้วยวิธี inhibitor-based test (รูป A: ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ส่วนรูป B ให้ผลการทดสอบเป็นลบ)

เมื่อตรวจหาการผลิตเอนไซม์ AmpC β -lactamases ทางจีโนไทป์ในเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธี multiplex PCR เพื่อตรวจหายีน AmpC ที่กำกับบน พลาสมิด ได้แก่ ยีน MOX, CMY, LAT, BIL, DHA, ACC, MIR, ACT และ FOX พบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน AmpC ที่กำกับบน พลาสมิดทั้งหมด 16 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.7 ได้แก่ ยีน LAT/CMY/BIL จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43.75, ยีน DHA จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 31.25, ยีน ACC จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.5, ยีน MIR/ACT จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.25 และยีน FOX จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.25 (ดังตาราง 5) ทั้งนี้หากตรวจพบยีน AmpC ที่กำกับบนพลาสมิดมีขนาดของ PCR product เท่ากัน จะทำการตรวจหายีนใหม่ โดยการใช้ primers ที่จำเพาะกับยีนที่สงสัยโดยวิธี PCR อีกครั้ง



ภาพที่ 5 แสดง PCR product ของยีน AmpC ที่กำกับบนพลาสมิด

Lane	M	100 bp DNA ladder
	1	<i>K. pneumoniae</i> ที่มียีน DHA-1/DHA-2
	2-6	<i>K. pneumoniae</i> ที่ไม่มียีน pAmpC
	7	Positive control <i>K. pneumoniae</i> (MIR-1)
	8	Positive control <i>K. pneumoniae</i> (CMY-1)
	9	Positive control <i>K. pneumoniae</i> (DHA-1)
	10	Positive control <i>E. aerogenes</i> (FOX-R)
	11	Positive control <i>K. pneumoniae</i> (ACT-1)
	12	Positive control <i>K. pneumoniae</i> (ACC-1)
	13	Negative control <i>E.coli</i> ATCC 25922
	14	Negative control Master mix

ตารางที่ 3 การจำแนกชนิดของยีน AmpC ในเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธี multiplex PCR

ยีน	จำนวน (ตัวอย่าง)
MOX/CMY	0
LAT/CMY/BIL	7 (43.75%)
DHA	5 (31.25%)
ACC	2 (12.5%)
MIR/ACT	1 (6.25%)
FOX	1 (6.25%)
รวม	16 (100%)

ตารางที่ 4 แสดงผลการผลิตเอนไซม์ AmpC beta-lactamases ทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์

Tests	phenotype	genotype (multiplex PCR)	
		positive	negative
inhibitor-based test	positive	12	13
	negative	4	136

ตารางที่ 5 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของวิธี

Inhibitor based เมื่อเทียบกับวิธี Multiplex PCR

Tests	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
Inhibitor-based test	$12/(12+4) \times 100$ = 75%	$136/(136+13) \times 100$ = 91.28%	$12/(12+13) \times 100$ = 48%	$136/(136+4) \times 100$ = 97.14%

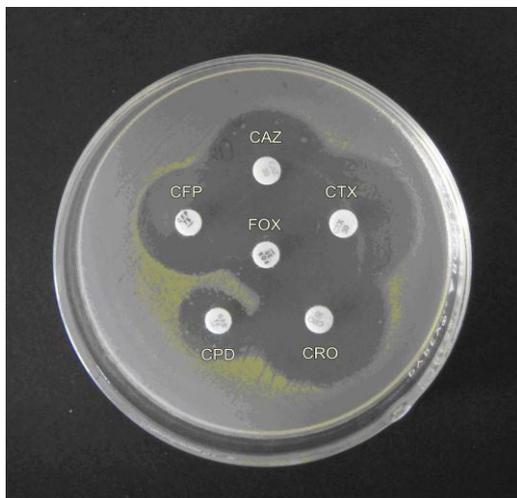
4.2 การกำหนดแนวทางในการตรวจกรองหาเอนไซม์ pAmpC โดยวิธี Disk susceptibility testing

4.2.1 การกำหนดระยะห่างระหว่างแผ่นยา Cefoxitin (Fox) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase และตัวอื่นในกลุ่มนี้ (Ceftazidime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Cefpodoxime, Cefoperazone) ที่ 2 ระยะคือ 1) 15 มิลลิเมตร และ 2) 20 มิลลิเมตร จากนั้นอ่านผลการเปลี่ยนแปลงของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นยา และผลการศึกษาพบว่า ระยะห่างระหว่างแผ่นยาที่ระยะ 20 มิลลิเมตร ทำให้เห็นลักษณะของ Inhibition zone และปฏิกริยาระหว่างคูยาได้ชัดเจนกว่าที่ระยะห่าง 15 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 6

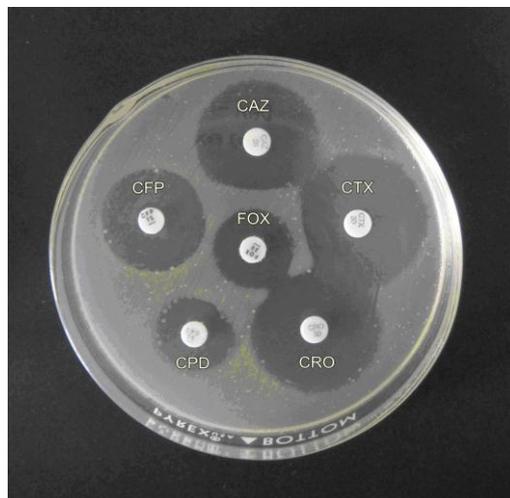
4.2.2 การเติม Phenyl boronic acid เพื่อเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ลงบนแผ่นยา cefoxitin (FOX) ที่วางอยู่ตรงกลาง ที่ระยะห่างระหว่างแผ่นยาเป็น 20 มิลลิเมตร ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* พบว่าเชื้อควบคุมที่มียื่นคือยาทุกเชื้อแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของขนาด inhibition zone (enhance zone หรือ D shape) และการเสริมฤทธิ์กันของคูยา (synergist) สูงสุดคือ 100% ในระหว่างคูยา cefoxitin ที่เติม phenylboronic acid (FOX+BA) กับ cefotaxime รองลงมาคือ คูยา FOX+BA กับ ceftazidime. และ คูยา FOX+BA กับ ceftriaxone คิดเป็น 83.33% เท่ากัน ในขณะที่เชื้อควบคุมผลลบไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ดังภาพที่ 7

เมื่อนำมาศึกษาในตัวอย่างเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 15 ตัวอย่างที่ทำให้ผลบวกต่อการตรวจหายีน AmpC พบว่า มีเพียง 5 ตัวอย่างที่ทำให้ผลการทดสอบความไวต่อยาที่มีการเพิ่มขึ้นของขนาด inhibition zone (enhance zone หรือ D shape) หรือการเสริมฤทธิ์กันของคูยา (synergist) ในระหว่างคูยา cefoxitin ที่เติม phenylboronic acid (FOX+BA) กับ cefotaxime หรือ ceftazidime. คิดเป็น 33.33% ส่วนอีก 10 ตัวอย่าง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

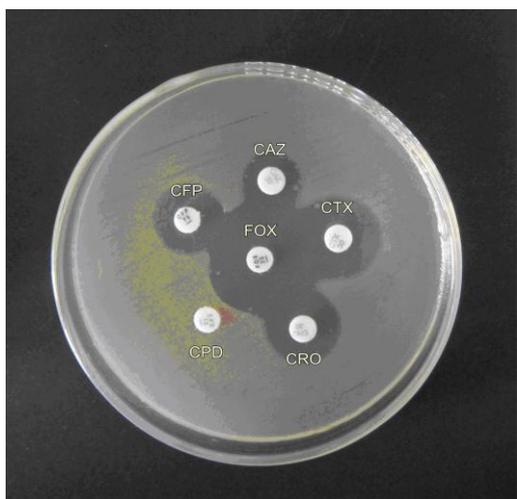
(a) DHA-1; FOX (15 mm)



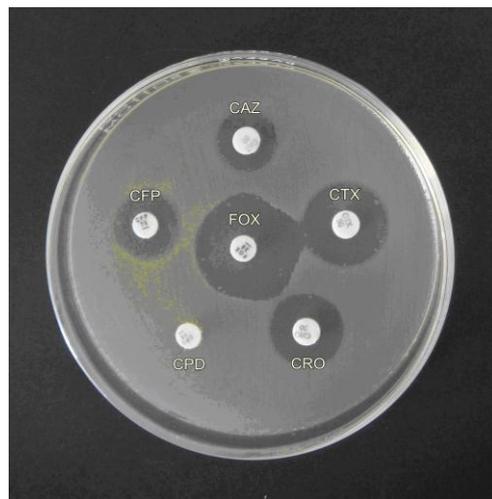
(b) DHA-1; FOX (20 mm)



(c) ACC-1; FOX (15 mm)

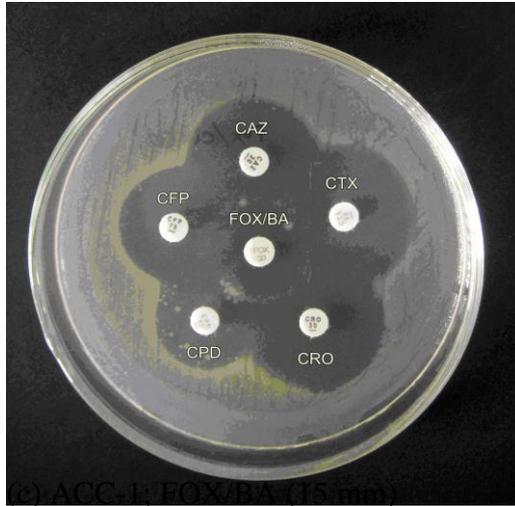


(d) ACC-1; FOX (20 mm)



ภาพที่ 6 The interaction pattern between cefoxitin alone and five antibiotics

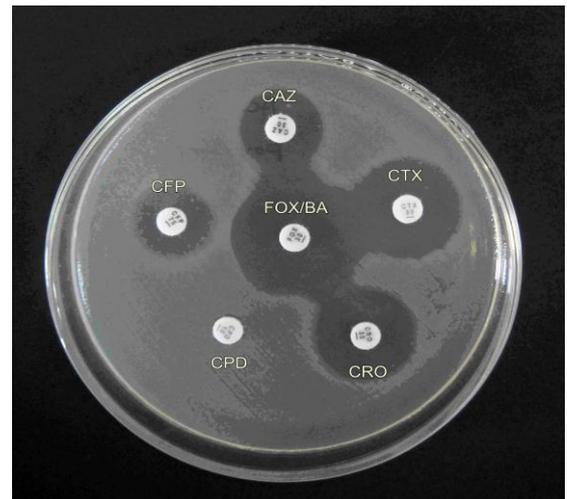
(a) DHA-1; FOX/BA (15 mm)



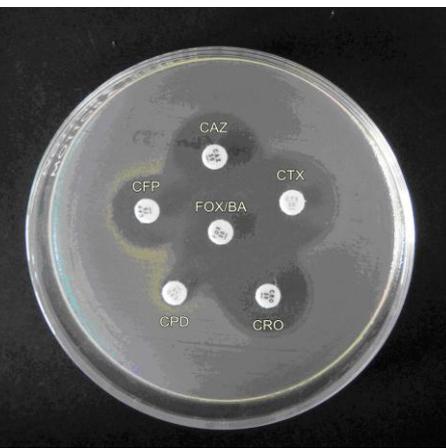
(b) DHA-1; FOX/BA (20 mm)



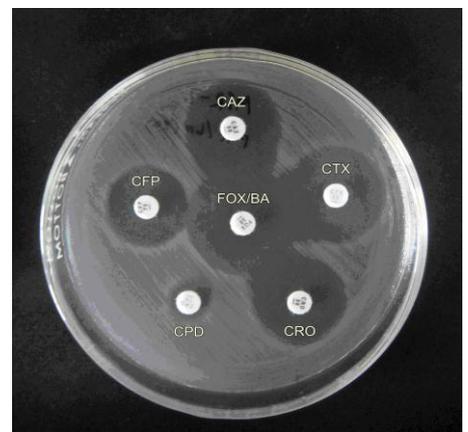
(c) ACC-1; FOX/BA (15 mm)



(d) ACC-1; FOX/BA (20 mm)



(e) MIR-1; FOX/BA (15 mm)



(f) MIR-1; FOX/BA (20 mm)

ภาพที่ 7 The interaction pattern between cefoxitin with phenylboronic acid

