แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพในหลอดทดลองของเชื้อเบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอาย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ภาวนา พนมเขต*
มารุตพงศ์ ปัญญา*
จิราพร นิลสกุล†
พิฐชญาณ์ พงศ์ธารินสิริ‡
ไกรสร บุญสาม§

ผู้รับผิดชอบบทความ: *ภาวนา พนมเขต*

บทคัดย่อ เบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอายคือเชื้อสาเหตุของโรคเมลิออยโดสีส เซฟตาซิดิมเป็นยาที่ถูกเลือกใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อนี้ แต่อัตราการตายก็พบสูงในพื้นที่ระบาดของโรค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสืบสวนหาประสิทธิผลของยาปฏิชีวนะในหลอดทดลองด้วยการทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อเบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอายจากทั้งหมด 1,340 สิ่งส่งตรวจที่ถูกแยกออกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษ และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม 2556 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2558 เชื้อเบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอายถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธีให้แผ่นยาที่มียาต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหารและทดสอบหาความเข้มข้นของยาที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เซฟตาซิดิม อิมิพีเนม ไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซล และซิโปรฟลอกซาซิน ถูกใช้เป็นยาต้านจุลชีพสำหรับวิธีให้แผ่นยาที่มียาต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหาร และการทดสอบหาความเข้มข้นยาต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ถูกทดสอบในเซฟตาซิดิม อิมิพีเนม และไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซล แบคทีเรียถูกสุ่มวิเคราะห์โดยวิธีพีซีอาร์และตามด้วยการทำเจลอิเล็กโตรฟอเรซีสสำหรับวิเคราะห์หายีน penA และ ยีน oxa

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาต้านจุลชีพมีประสิทธิผลต่อต้านเชื้อเบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอายด้วยวิธีให้แผ่นยาที่มียาต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหาร ไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลมีประสิทธิผลร้อยละ 100 เซฟตาซิดิมและอิมิพีเนมมีประสิทธิผลร้อยละ 98.36 และ 99.10 ตามลำดับความเข้มข้นของเซฟตาซิดิมที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ 0.25 ถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอิมิพีเนมเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีนี้พบว่ามีเชื้อเบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอายดื้อต่อเซฟตาซิดิมร้อยละ 1.27 และดื้อต่ออิมิพีเนมร้อยละ 0.37 ทุกสิ่งส่งตรวจที่สุ่มตรวจพบยีน oxa แต่ไม่พบยีน penA

สรุปได้ว่ายาต้านจุลชีพอย่างน้อย 3 ชนิดที่ทดสอบในหลอดทดลองในการศึกษาครั้งนี้มีประสิทธิผลในการรักษาโรคเมลิออยโดสีสได้ โดยเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนมคือยาฆ่าทำลายเชื้อที่ควรเลือกใช้ ส่วนยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอาย คือไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซล ทั้งนี้ ถึงแม้ว่าการทดสอบเหล่านี้จะเป็นเพียงการทดสอบในหลอดทดลองก็ตาม การตัดสินใจให้ยาเหล่านี้แก่ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีสอย่างรวดเร็วเป็นเรื่องที่จำเป็นมาก

คำสำคัญ: *เบอโคลเดอเรีย สูโดมาลีอาย เมลิออยโดสีส เซฟตาซิดิมความเข้มข้นยาต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ ยีน oxa ยีน penA*

*วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
†โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี
‡โรงพยาบาลศรีสะเกษ จังหวัดศรีสะเกษ
§โรงพยาบาลอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ

Abstract **In Vitro Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Burkholderia pseudomallei* in Northeastern Thailand**

Pawana Panomket*, Marutpong Panya*, Jiraporn Nilsakul†, Pitchaya Pongtarinsiri‡, Krisorn Boonsam§

**College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University*
†Sappasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani Province, ‡Sisaket Hospital, Sisaket Province, §Amnatcharoen Hospital, Amnatcharoen Province

Corresponding author: *Pawana Panomket, pawana.p@ubu.ac.th*

Burkholderia pseudomallei is a causative agent of melioidosis. Ceftazidime is a drug of choice for treatment of this infection but the mortality rate is high in some endemic areas. This study investigates the effectiveness of antibiotics by an *in vitro* antimicrobial susceptibility test. A total of 1,340 *B. pseudomallei* samples were isolated from patients admitted to Sappasitthiprasong Hospital, Sisaket Hospital, and Amnatcharoen Hospital between January 2013 and February 2015. Antimicrobial susceptibility of *B. pseudomallei* were evaluated by the standard disk diffusion test and to determine minimum inhibitory concentration (MIC). Ceftazidime, imipenem, trimethoprim+sulfamethoxazole, and ciprofloxacin were used as antimicrobial agents for the standard disk diffusion test, and MIC was determined for ceftazidime, imipenem, and trimethoprim+sulfamethoxazole. Bacteria strains were randomly selected for conventional polymerase chain reaction (PCR) followed by gel electrophoresis analysis for penA and oxa gene.

Results demonstrated that all the antimicrobial agents were effective against *B. pseudomallei.* Trimethoprim+sulfamethoxazole was 100% effective, and ceftazidime and imipenem were 98.36% and 99.10% effective respectively. Ceftazidime MIC was 0.25 to ≥32 μg/ml and imipenem MIC was ≤0.5 to 16 μg/ml. It was found that 1.27% of *B. pseudomallei* was resistant to ceftazidime and 0.37% was resistant to imipenem. All random samples found oxa gene but not penA gene.

It was concluded that all antimicrobial agents tested effective. Ceftazidime and imipenem were bactericidal drugs of choice for melioidosis treatment. The bacteriostatic agent for *B. pseudomallei* was trimethoprim+sulfamethoxazole. Although, the activity of the antimicrobial agents was effective *in vitro*, early diagnostic and prompt clinical treatment to which drugs be administered intravenously still urgently needed.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei, melioidosis, ceftazidime, minimum inhibitory concentration, oxa gene, penA gene*

ภูมิหลังและเหตุผล

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อสาเหตุของโรคติดเชื้อเมลิออยโดสีส อาการแสดงของโรคติดเชื้อชนิดนี้ มีความหลากหลายตั้งแต่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการไปจนถึงติดเชื้อลุกลามไปตามระบบ จัดเป็นโรคติดเชื้อในเขตร้อน สามารถพบเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทั่วไปในดิน โดยเฉพาะดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนใต้ พื้นที่ระบาดที่พบมากในประเทศไทย เช่น จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดศรีสะเกษ พบการติดเชื้อชนิดนี้มากในกลุ่มผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวาน ธาลัสซีเมีย[1] และกลุ่มประชากรที่ประกอบอาชีพทางเกษตรกรรม การตรวจวินิจฉัยสามารถทำได้โดยการเพาะเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ หรือตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ ปัจจุบันเซฟตาซิดิมและยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อเมลิออยโดสีส แม้ปัจจุบันจะพบว่าผลการทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อเซฟตาซิดิมยังอยู่

ในเกณฑ์ดี และพบการดื้อยาปฐมภูมิ (primary resistance) เพียงเล็กน้อย แต่จากการรายงานผู้ป่วยโรคติดเชื้อเมลิออยโดสีสที่ได้รับการรักษาด้วยเซฟตาซิดิม พบว่าให้ผลการรักษาล้มเหลวได้[2,3] และยังพบรายงานการกลับเป็นซ้ำสูง[4] ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น โดยมีปัจจัยที่ส่งผลให้เชื้อดื้อยาได้ เช่น การผลักยาออกจากเซลล์ การทำให้เอนไซม์หมดฤทธิ์ การทำให้เป้าหมายจับของยาหายไป และการสร้าง class A PenA β-lactamase ที่มากเกินไปและการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ตัวนี้[5] หลายการศึกษารายงานการกลายพันธุ์ของยีน penA ซึ่งเกี่ยวพันกันกับการดื้อต่อเซฟตาซิดิม โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน การเปลี่ยนสารตั้งต้นที่จำเพาะใน highly conserved class A β-lactamase[5] แม้ว่าการรายงานการดื้อยาจะมีไม่มาก แต่ยาต้านจุลชีพที่ใช้ได้กับการรักษาโรคเมลิออยโดสีสก็มีจำกัด เนื่องจากเชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดตามธรรมชาติ ดังนั้น จึงควรเฝ้าระวังความไวของเซฟตาซิดิม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิผลของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาโรคเมลิออยโดสีส ตลอดจนตรวจหายีนที่เกี่ยวพันกับการดื้อต่อเซฟตาซิดิม

ระเบียบวิธีศึกษา

แบคทีเรีย

เก็บเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษ และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม 2556 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2558 วินิจฉัยเชื้อจุลชีพด้วยชุดตรวจทางชีวเคมี และ monoclonal antibody ต่อเชื้อ เชื้อทั้งหมด 1,340 สายพันธุ์นำมาทดสอบด้วยวิธีให้แผ่นยาที่มียาต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหารและการทดสอบหาความเข้มข้นของยาที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ และการตรวจหายีน penA และ oxa ด้วยวิธีพีซีอาร์

วิธีให้แผ่นยาที่มียาต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหาร (standard disk diffusion)

เก็บเชื้อโดยเพาะเชื้อเลี้ยงบน Ashdown's agar และเลือก 1 โคโลนี เลี้ยงใน trypticase soy broth (Hardy Diagnostics Criterion, Santa Maria, USA) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37°C 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเตรียมเชื้อให้เป็น mid log phase โดยดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงใน TSB 50 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อ และป้ายลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar (Hardy Diagnostics) จากนั้นวาง paper disk (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) นำไปบ่ม 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ paper disk โดยใช้เกณฑ์แปลผลตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement[6] (ตารางที่ 1)

การทดสอบความไวด้วยวิธี MIC

1. ทดสอบ MIC โดยใช้ชุดทดสอบ Sensititre Non-Fermenter plate (TREK Diagnostic systems, Biosciences Inc., Magellan, USA) ที่มีความเข้มข้นของเซฟตาซิดิมที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 1-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) ความเข้มข้นของอิมิพีเนมที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 0.5/9.5-4/76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบโดยเลี้ยงใน Ashdown's agar และเลือก 3-5 โคโลนีเขี่ยลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นดูดมา 10 ไมโครลิตร (μL) ใส่ลงในหลอดที่มี Mueller Hinton broth with N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid; 2- (2-[hydroxyl-1,1-bis

ตารางที่ 1 เกณฑ์แปลผล disk diffusion test ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement

Antimicrobials	Susceptible (mm)	Intermediate (mm)	Resistant (mm)
ceftazidime 30 μg	≥18	15-17	≤14
imipenem 10 μg	≥19	16-18	≤15
SXT 25 μg (trimethoprim+sulfamethoxazole 1.25/23.75 μg)	≥16	11-15	≤10
ciprofloxacin 5 μg	≥21	16-20	≤15

(hydroxymethyl) ethyl] amino) ethane sulfonic acid, $C_6H_{15}NO_6S$ (TES) buffer 11 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ดูดเชื้อมา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน Sensititre Non-Fermenter plate แล้วนำไปบ่ม 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผล ถ้าหลุมที่มีเชื้อขึ้นจะเห็นการตกตะกอนของเซลล์เป็นกระดุมอยู่ก้นหลุม อ่าน MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการตกตะกอน โดยมีหลุม positive control ซึ่งพบเซลล์ตกตะกอนเป็นกระดุมในหลุม และ negative control ซึ่งไม่พบตะกอนเซลล์ในหลุม โดยใช้เกณฑ์แปลผลตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement[6] (ตารางที่ 2) ถ้าเชื้อมีค่า ceftazidime MIC มากกว่า 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ imipenem MIC มากกว่า 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะนำมาทำ MIC agar dilution ต่อไป

2. ทดสอบ MIC agar dilution โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนมความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ทำให้เจือจาง 10 เท่าและดูดเชื้อมา 10 ไมโครลิตร เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 104 CFU/spot และ spot ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาความเข้มข้นต่างๆ และปล่อยให้เชื้อที่เติมลงไปแห้ง จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปบ่ม 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลความเข้มข้นของจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

การตรวจหายีน penA และ oxa ด้วยวิธีการพีซีอาร์

1. ออกแบบไพร์เมอร์ (primer) เพื่อตรวจหายีน Class D oxa และ Class A penA ในเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธีการพีซีอาร์ ทำโดยการเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Informational (NCBI) database นำนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนมาทำการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Multiple Sequence Alignment ClustalW Version 1.83 (http://www.genome.jp/tools/clustalw/) การออกแบบไพร์เมอร์ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม LightCycler(r) Real-Time PCR (Roche, USA)

2. นำเชื้อ *B. pseudomallei* มาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปยี่ห้อ Genomic Bacterial DNA Extraction kit (RBC, Bioscience, Taiwan) โดยการสกัดทำตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ทุกขั้นตอน เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C แล้วจึงนำไปทดสอบพีซีอาร์ ซึ่งมีองค์ประกอบน้ำยาในการทำพีซีอาร์ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 เกณฑ์แปลผล MIC ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement

Antimicrobials	Susceptible (S) (μg/ml)	Intermediate (I) (μg/ml)	Resistant (R) (μg/ml)	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (acceptable range; μg/ml)
ceftazidime	≤8	16	≥32	1-4
imipenem	≤4	8	≥16	1-4
trimethoprim+sulfamethoxazole	≤2/38	-	≥4/76	8/152-32/608

ผลการศึกษา

วิธีให้แผ่นยาที่มียาต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหาร (standard disk diffusion)

เมื่อแปลผลตามเกณฑ์ของ CLSI ดังตารางที่ 1 เชื้อ *B. pseudomallei* ไวต่อเซฟตาซิดิม อิมิพีเนม ไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซล และซิโปรฟลอกซาซิน ร้อยละ 98.36, 99.10, 100 และ 87.9 ตามลำดับ และเชื้อ *B. pseudomallei* ไวระดับปานกลางไปจนถึงดื้อต่อเซฟตาซิดิม อิมิพีเนม และซิโปรฟลอกซาซิน ร้อยละ 1.64, 0.90 และ 12.1 ตามลำดับ

การทดสอบความไวด้วยวิธี MIC

จากการวิเคราะห์เชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 1,340 สายพันธุ์ เชื้อมีค่า ceftazidime MIC อยู่ระหว่าง 0.25 - ≥32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร imipenem MIC อยู่ระหว่าง ≤ 0.5 - 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ trimethoprim+sulfamethoxazole MIC อยู่ระหว่าง ≤ 1/19 - 2/38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อ *B. pseudomallei* ไวต่อไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลร้อยละ 100 เชื้อที่ให้ผลความไวปานกลาง (intermediate) สำหรับเซฟตาซิดิม จำนวน 13 สายพันธุ์ อิมิพีเนม 9 สายพันธุ์ ผลความไวดื้อ (resistant) ต่อเซฟตาซิดิม จำนวน 17 สายพันธุ์ และต่ออิมิพีเนม 5 สายพันธุ์ มี 4 สายพันธุ์ที่ให้ผลดื้อต่อทั้งเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนม ผล MIC ของเชื้อที่ให้ผลความไวปานกลางและดื้อ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 องค์ประกอบน้ำยาในการทำพีซีอาร์

Reagents	Final concentration
10X PCR buffer	1X
$MgCl_2$ buffer	1.5 mM
dNTP	200 μM
Forward primer	0.2 μM
Reverse primer	0.2 μM

การตรวจหายีน penA และ oxa ในเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธีพีซีอาร์

จากการสุ่มเลือกเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 21 ไอโซเลต เลือกมาจากเชื้อที่ให้ผลไว ปานกลางและดื้อต่อเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนม ตามแสดงในตารางที่ 4 และนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่มีคุณภาพดีคือมีค่า optical density at 260/280 อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 ซึ่งเพียงพอสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจสอบยีนได้ โดยผลของการออกแบบไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน oxa และ penA แสดงในตารางที่ 5 และมีสภาวะของการทำพีซีอาร์ (PCR condition) แสดงในตารางที่ 6 ซึ่งหากสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ พบว่าสำหรับยีน

ตารางที่ 4 MIC ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ให้ผลความไวปานกลางและดื้อต่อเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนม

Isolate	MIC (µg/ml)		Gene		Isolate	MIC (µg/ml)		Gene	
No.	CEF	IMP	oxa	penA	No.	CEF	IMP	oxa	penA
B232	16 (I)	2 (S)	+	-	B211	32 (R)	<0.5 (S)	+	-
B208	16 (I)	2 (S)	+	-	B230	32 (R)	4 (S)	+	-
B096	16 (I)	16 (R)	+	-	B234	32 (R)	2 (S)	+	-
B178	16 (I)	≤0.5 (S)	NT	NT	B242	32 (R)	<0.5 (S)	+	-
B218	16 (I)	2 (S)	NT	NT	B279	32 (R)	4 (S)	+	-
B739	16 (I)	1 (S)	NT	NT	B061	32 (R)	<0.5 (S)	+	-
BA02	16 (I)	2 (S)	NT	NT	B062	≥32 (R)	8 (I)	+	-
B064	16 (I)	≤0.5 (S)	NT	NT	B074	≥32 (R)	8 (I)	+	-
B067	16 (I)	≤0.5 (S)	NT	NT	B081	≥32 (R)	8 (I)	+	-
B068	16 (I)	≤0.5 (S)	NT	NT	B089	≥32 (R)	16 (R)	+	-
B069	16 (I)	≤0.5 (S)	NT	NT	B090	≥32 (R)	16 (R)	+	-
B070	16 (I)	≤0.5 (S)	NT	NT	B092	≥32 (R)	16 (R)	+	-
B071	16 (I)	≤0.5	NT	NT	B110	32 (R)	16 (R)	+	-
B534	32 (R)	4 (S)	+	-	B130	32 (R)	<0.5 (S)	+	-
B107	32 (R)	1 (S)	+	-	B141	32 (R)	4 (S)	+	-
B106	4 (S)	8 (I)	NT	NT	B666	4 (S)	8 (I)	NT	NT
B274	2 (S)	8 (I)	NT	NT	BA014	4 (S)	8 (I)	NT	NT
B283	4 (S)	8 (I)	+	-	B093	2 (S)	8 (I)	NT	NT

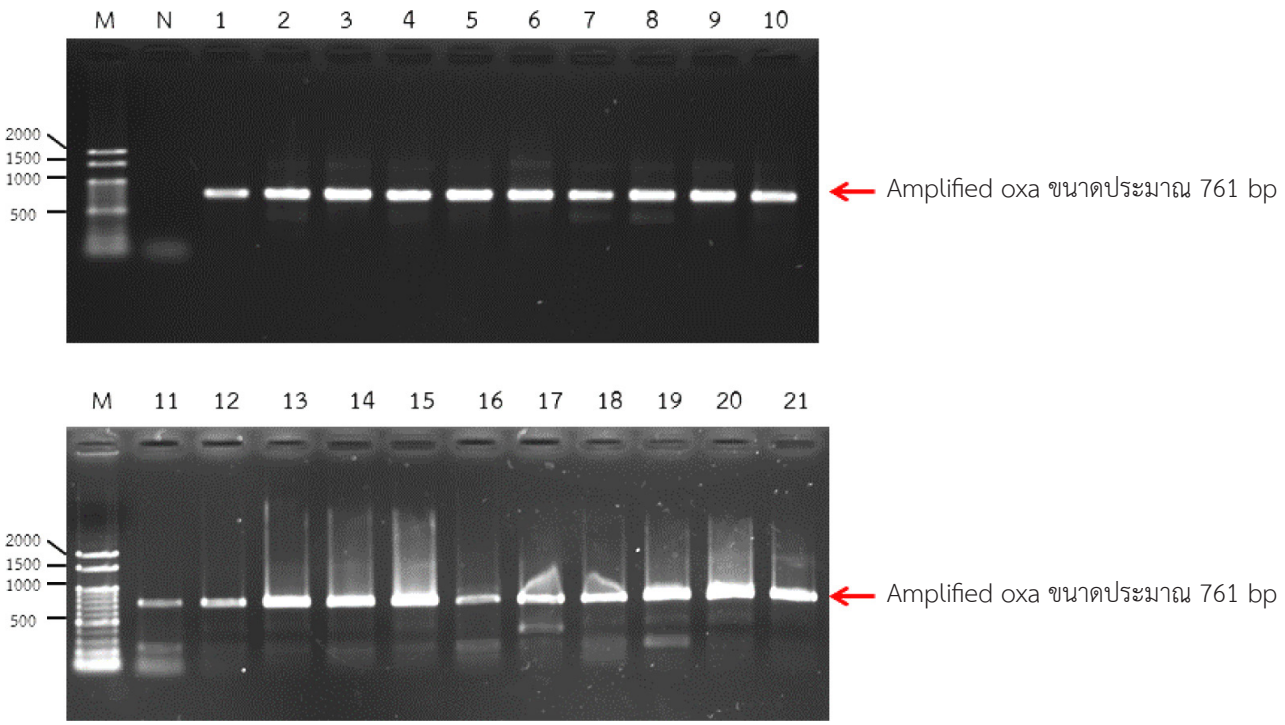
CEF = ceftazidime, IMP = imipenem, NT = No tested, + = found, - = not found

ตารางที่ 5 ไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน oxa และ penA

Primer	Sequence	Gene product (bp)
Oxa_Forward	5’ ATGAAATTCCGACACGCGCT 3’	761
Oxa_Reverse	5’ GTCCGTATGCCGGCTGAAAC 3’	
penA_ Forward	5’-TGAATCATTCTCCGTTGCGC-3	800
penA_ Reverse	5’-TAGACGATGAACACGATCGGC-3’	

ตารางที่ 6 สภาวะการทำพีซีอาร์ สำหรับยีน oxa และ penA

Step	Temperature	Time	No. of cycles
Pre-incubation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	30
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	7 min	1



รูปที่ 1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน oxa จากดีเอนเอที่สกัดได้จากเชื้อ *B. pseudomallei*

กำหนด

Lane M คือ 100 bp ladder DNA marker
Lane N คือ ชุดควบคุมลบ (PCR ที่ไม่มีส่วนผสมของ DNA template
Lane 1 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B061 strain
Lane 2 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B062 strain
Lane 3 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B074 strain
Lane 4 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B081 strain
Lane 5 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B089 strain
Lane 6 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B090 strain
Lane 7 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B092 strain
Lane 8 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B096 strain
Lane 9 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B110 strain
Lane 10 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B130 strain
Lane 11 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B232 strain
Lane 12 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B208 strain
Lane 13 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B534 strain
Lane 14 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B107 strain
Lane 15 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B283 strain
Lane 16 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B211 strain
Lane 17 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B230 strain
Lane 18 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B234 strain
Lane 19 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B242 strain
Lane 20 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B279 strain
Lane 21 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* B141 strain

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ partial oxa gene ในฐานข้อมูล NCBI

B.pseudomallei isolate	NCBI accession no.	*B. pseudomallei* isolate	NCBI accession no.
B103	KY214384	B061	KY214394
B208	KY214385	B062	KY214395
B211	KY214386	B074	KY214396
B230	KY214387	B081	KY214397
B232	KY214388	B090	KY214398
B2034	KY214389	B092	KY214399
B242	KY214390	B096	KY214400
B279	KY214391	B110	KY214401
B283	KY214392	B270	KY214402
B534	KY214393	B107	N.D.
		B089	N.D.

N.D. = Not determine

oxa จะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 761 bp ส่วนยีน penA จะได้ดีเอ็นเอขนาด 800 bp ผลการทดสอบเพิ่มจำนวนยีนทั้งสอง พบว่าจากตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอ ของเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 21 ไอโซเลต พบว่าสามารถตรวจพบและเพิ่มจำนวนยีน oxa ได้ในทุกไอโซเลต โดยมีขนาดของ amplified product ที่มีขนาดเท่ากันคือ ขนาดประมาณ 761 bp (รูปที่ 1) เทียบกับ DNA marker ในขณะเดียวกันก็ไม่สามารถตรวจพบยีน penA ได้ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

ผลการหาลำดับและการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของยีน oxa ของเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 21 ไอโซเลต พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน oxa ได้รายงานในฐานข้อมูล NCBI ภายใต้ accession number ดังตารางที่ 7

วิจารณ์

การรักษาโรคติดเชื้อเมลิออยโดสีสนั้น จำแนกได้เป็นสองช่วง ช่วงแรกเรียกระยะเฉียบพลัน (acute phase) เน้นไปที่การให้ยาทางหลอดเลือดเพื่อป้องกันการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในกระแสเลือด ดังนั้นยาที่ได้ผลในการรักษาในระยะนี้คือยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal) เช่น เซฟตาซิดิม ยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม ระยะที่สองเป็นระยะในการกำจัดเชื้อให้หมดไปจากร่างกาย (eradication phase) ซึ่งในระยะนี้จะให้การรักษาด้วยการกินยาต่อเนื่อง 20 สัปดาห์[7,8] ยาที่ได้ผลในการรักษาในระยะนี้คือยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (bacteriostatic) ในอวัยวะต่างๆ เพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำ (relapse) เช่น ไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซล, ด็อกซีไซคลิน[3,4]

เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ทดสอบด้วยวิธีให้แผ่นยาที่มียาต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหาร (standard disk diffusion) สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองความไวของยาต่อเชื้อได้ดี แม้ว่าการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวจะให้ผลความไวต่อเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนม ร้อยละ 98.36 และ 99.10 ตามลำดับ ในขณะที่การทดสอบด้วยการทำ MIC นั้น เซฟตาซิดิมให้ผลความไวร้อยละ 97.96 และอิมิพีเนมร้อยละ 98.95 มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} ของเซฟตาซิดิมเป็น 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ MIC_{50} และ MIC_{90} ของอิมิพีเนม เป็น

≤ 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แม้ว่าจะให้ผลบวกปลอมร้อยละ 0.4 สำหรับเซฟตาซิดิม และร้อยละ 0.15 สำหรับอิมิพีเนม แต่การทดสอบวิธี standard disk diffusion สามารถทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์จำนวนมาก และราคาต่อการทดสอบถูกมากเมื่อเปรียบเทียบกับการทำ MIC จากการศึกษายาที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทั้งเซฟตาซิดิม และอิมิพีเนมยังให้ผลดีในการต้านเชื้อ *B. pseudomallei* ในหลอดทดลอง และเหมาะที่จะใช้เป็นยาเริ่มต้นในการรักษา (initial intensive therapy) ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสีส อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าอิมิพีเนมออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ดีกว่าเซฟตาซิดิม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Smith และคณะ[9,10]

ในระยะกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากร่างกายให้หมดไป (eradication therapy) เพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำ การรักษาที่ใช้ยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจะมีบทบาทมาก ไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลเป็นยาที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการรักษาโรคเมลิออยโดสีสในพื้นที่ระบาด จากการรายงานของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ในระหว่างปีค.ศ. 1992 ถึง 2003 จำนวน 1,976 สายพันธุ์ ให้ผลดื้อยาร้อยละ 71 ด้วยการทดสอบ standard disk diffusion และเมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วย E-test พบเชื้อดื้อยาเพียงร้อยละ 13[11] ซึ่งเป็นไปได้ว่าการทดสอบด้วย standard disk diffusion อาจทำให้เกิดการประมาณการดื้อยาที่มากเกินไป จากการศึกษาสรุปได้ว่า การทดสอบ standard disk diffusion อาจมีประโยชน์แต่ก็อาจมีข้อจำกัดในการทดสอบ เช่น แผ่นยาเสื่อมคุณภาพได้ง่าย หากมีการเก็บรักษาไม่ดี หรือควรมีการให้ข้อมูลในการใช้เกณฑ์พิจารณาค่า break point ของยาให้มีความเหมาะสม ซึ่งหากพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ให้ผลไวปานกลางด้วยวิธี standard disk diffusion ให้มองว่าเชื้อน่าจะไวต่อยา แต่หากพบเชื้อดื้อต่อไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซล จำเป็นต้องทำการทดสอบ MIC ต่อไป[11] ผลทดสอบความไวของไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลจากการศึกษานี้ พบมีความไวร้อยละ 100 ทั้งจากการทดสอบด้วยวิธี standard disk diffusion และ MIC โดยมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เป็น 1/19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ซิโปรฟลอกซาซินให้ผลความไวเพียงร้อยละ 87.9 อย่างไรก็ตาม มีรายงานการพบการดื้อต่อไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลในประเทศออสเตรเลีย ประมาณร้อยละ 0-2.5[12] และการรายงานการดื้อต่อไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลด้วยวิธี standard disk diffusion ในปีค.ศ. 2000 จากประเทศไทยร้อยละ 16[13] ดังนั้นการควบคุมคุณภาพในการทดสอบด้วยวิธี standard disk diffusion จึงเป็นเรื่องที่ควรตระหนักและทำควบคู่ไปกับการทดสอบตัวอย่างอย่างสม่ำเสมอ

จากการศึกษาการโคลนนิ่งยีน class D beta-lactamase (oxa) จากเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า ยีนที่ถอดรหัสออกมานี้จะสร้างเอนไซม์ oxacillinase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อเซฟตาซิดิม[14] นอกจากนี้การดื้อต่อเซฟตาซิดิมที่เกิดขึ้นภายหลังมักเกิดร่วมกับการเกิดการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียว (single mutation) ในยีน class A beta-lactamase (penA)[5] และยังพบว่าในผู้ป่วยหนึ่งราย การแยกได้เชื้อ *B. pseudomallei* ในตำแหน่งต่างๆ ของร่างกายที่แตกต่างกัน เชื้อจะมีความไวที่หลากหลายต่อยาชนิดเดียวกัน การทดสอบความไวของยาต่อเชื้อในโคโลนีที่แตกต่างกันจากตำแหน่งต่างๆ ที่เก็บสิ่งส่งตรวจควรทำการยืนยันการวินิจฉัยเชื้อและทดสอบความไวอยู่เสมอ[15] จากการสุ่มเชื้อ *B. pseudomallei* ทำพีซีอาร์เพื่อตรวจหายีน penA และ oxa จำนวน 21 ไอโซเลต โดยเชื้อที่สุ่มมาทดสอบมีทั้งเชื้อที่ให้ผลความไวต่อเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนมในระดับไว ปานกลางและดื้อ จากการตรวจพีซีอาร์พบยีน oxa ทุกไอโซเลต แต่ไม่พบยีน penA ซึ่งเป็นไปได้ว่า ยีน oxa น่าจะเป็นยีนที่ปรากฏอยู่บนโครโมโซม (chromosomal gene) อย่างไรก็ตาม ใน

การศึกษานี้ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน oxa เนื่องจากผลการหาลำดับและการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของยีน oxa ของเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 21 ไอโซเลต พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

แม้ว่าจะพบความไวต่อเซฟตาซิดิมและอิมิพีเนมลดลงจากการพบค่า MIC_{50} และ MIC_{90} ที่สูงขึ้น เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้[16] แต่จากการทดสอบในหลอดทดลองทั้งด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional) และวิธีการทดสอบในเซลล์ (intracellular method) ก็ยังให้ผลดีในการต่อต้านเชื้อ *B. pseudomallei* แต่พบว่าค่า MIC ที่ทดสอบด้วยวิธีการทดสอบในเซลล์มีค่าสูงกว่าการทดสอบด้วยวิธีดั้งเดิม[17] ดังนั้น เซฟตาซิดิม อิมิพีเนมและไตรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลก็ยังจัดเป็นยาทางเลือกอันดับแรกในการใช้รักษาโรคติดเชื้อเมลิออยโดสีส อย่างไรก็ตาม การรักษาที่ได้ผลก็ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่รวมถึงสภาวะของผู้ป่วยแต่ละคนด้วย

ข้อยุติ

เซฟตาซิดิม อิมิพีเนม และไทรเมโทพริม+ซัลฟาเมทอกซาโซลยังคงเป็นยาทางเลือกอันดับแรกในการใช้รักษาโรคติดเชื้อเมลิออยโดสีส เพราะยังมีประสิทธิผลดีในหลอดทดลองในการต่อต้านเชื้อ *B. pseudomallei*

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษ และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ ที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และงานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส) โครงการทุนวิจัยมุ่งเป้าด้านสุขภาพและชีวเวชศาสตร์ ประจำปี 2556

References

1. Fong SM, Wong KJ, Fukushima M, Yeo TW. Thalassemia major is a major risk factor for pediatric melioidosis in Kota Kinabalu, Sabah Malaysia. Clin Infect Dis 2015;60(12):1802-7.
2. Panomket P, Wanram S, Jittimanee J, Teerawatanasuk N, Nilsakul J, Nuntalohit S. Susceptibility of ceftazidime for *Burkholderia pseudomallei* in patients at Sapprasithiprasong Hospital. J Med Tech Phy Ther 2011;23(3):265-73. (in Thai)
3. Simpson AJ, Suputtamongkol Y, Smith MD, Angus BJ, Rajanuwong A, Wuthiekanun V, et al. Comparison of imipenem and ceftazidime as therapy for severe melioidosis. Clin Infect Dis 1999;29(2):381-7.
4. Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DA, Rajchanuvong A, Pattara-arechachai J, White NJ. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. J Infect Dis 1993;168(5):1181-5.
5. Tribuddharat C, Moore RA, Baker P, Woods DE. *Burkholderia pseudomallei* class A β-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(7):2082-7.
6. Clinical Laboratory Standard Institute. NCLS performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standards. 6th ed. CLSI Document M100-S16. Wayne Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
7. Dance D. Treatment and prophylaxis of melioidosis. Int J Antimicrob Agents 2014;43(4):310-8.
8. Currie B. Treatment and prognosis of melioidosis [Internet]. Wolters Kluwer; 2017 [cited 2017 July 12]. Available from Netlibrary: https://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prognosis-of-melioidosis.
9. Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, White NJ. Susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to some newer beta-lactam antibiotics and antibiotic combinations using time-kill studies. J Antimicrob Cemother 1994;33:145.
10. Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, White NJ. In-vitro activity of carbapenem antibiotics against beta-lactam susceptible and resistant strains of *Burkholderia pseudomallei.* J Antimicrob Cemother 1996;37:611.
11. Wuthiekanun V, Cheng AC, Chierakul W, Amornchai P, Limmathurotsakul D, Chaowagul W, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei.* JAC 2005;55:1029-31.
12. Piliouras P, Ulett GC, Ashhurst-Smit C, Hirst RG, Norton RE. A comparison of antimicrobial agent susceptibility testing methods for cotrimoxazole with *Burkholderia pseudomallei.* Int J Antimicrob Agents 2002;19(5):427-9.
13. Lumbiganon P, Tattawasatra U, Chetchotisakd P, Wongratanacheewin S, Thinkhamrop B. Comparison between the antimicrobial susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* to trimethoprim-sulfamethoxazole by standard disk diffusion

method and by minimal inhibitory concentration determination. J Med Assoc Thai 2000;83(8):856-60.

14. Niumsup P, Wuthiekanun V. Cloning of the class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime -susceptible and -resistant strains. J Antimicrob Chemother 2002;50(4):445-55.
15. Sam IC, See KH, Puthucheary SD. Variations in ceftazidime and amoxicillin clavulanic susceptibilities within a clonal infection of *Burkholderia pseudomallei*. J Clin Microbiol 2009;47(5):1556-8.
16. Panya M, Thirat S, Wanram S, Panomket P, Nilsakul J. Prevalence of bla_{PenA} and bla_{OXA} in *Burkholderia pseudomallei* isolated from patient at Sapprasitthiprasong Hospital and their susceptibility to ceftazidime and carbapenems. J Med Assoc Thai 2016;99(1):S12-S16.
17. Inglis TJ, Rodrigues F, Rigby P, Norton R, Currie BJ. Comparison of the susceptibilities of *Burkholderia pseudomallei* to meropenem and ceftazidime by conventional and intracellular methods. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(8):2999-3005.