

ศึกษาเอนไซม์ metallo- β -lactamase และ integrons ของ
เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจในประเทศไทย

นางสาวเมอมา น ปิยะกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INVESTIGATION OF METALLO- β -LACTAMASE PRODUCING STRAINS AND
INTEGRONS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES IN THAILAND

Miss Cherman Piyakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ศึกษาเอนไซม์ metallo- β -lactamase และ integrons ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจในประเทศไทย

โดย

นางสาวเมอฆมาน ปิยะกุล

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร.รัชนีพร ตียะวิสุทธิศรี

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.รัชนีพร ตียะวิสุทธิศรี)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์)

เฉลิมมาน ปิยะกุล : ศึกษาเอนไซม์ metallo- β -lactamase และ integrons ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจในประเทศไทย. (INVESTIGATION OF METALLO- β -LACTAMASE PRODUCING STRAINS AND INTEGRONS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES IN THAILAND) อ.ที่
 ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม:
 อ.ดร.รัชนีพร ติยะวิสุทธิศรี, 147 หน้า.

การสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase (MBL) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ตื้อต่อยา carbapenems และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้สามารถถ่ายทอดข้ามสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียโดยผ่านโครงสร้างทางพันธุกรรมที่เรียกว่า integron ได้ งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาการสร้างเอนไซม์ MBL และความสัมพันธ์ของ class 1 integron ในเชื้อ *P. aeruginosa* จากสิ่งส่งตรวจ 150 ตัวอย่างจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร โดยทดสอบความไวและดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธี disc diffusion และหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยา (MIC) imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้โดยใช้ imipenem E-test พบว่า เชื้อมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ในอัตราสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่ม quinolones, กลุ่ม third-generation cephalosporins, กลุ่ม β -lactam/inhibitor และกลุ่ม carbapenems จากนั้นศึกษาเอนไซม์ MBL ในระดับพีโนไทป์ และระดับโมเลกุล ด้วยวิธี Modified Hodge Test และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) ตามลำดับ และตรวจสอบยีนในกลุ่ม class 1 integron ด้วยวิธี multiplex PCR ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ MBL พบว่า 28 ตัวอย่าง มีการสร้างเอนไซม์ในระดับพีโนไทป์และเชื้อทุกตัวอย่างในกลุ่มนี้ต่างก็มีค่า MIC ของยา imipenem สูง (≥ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และในระดับโมเลกุล พบว่า ร้อยละ 33.3 ของกลุ่มตัวอย่าง มียีนในกลุ่ม class 1 integron นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อมียีน *bla_{IMP}* และยีน *bla_{VIM}* จำนวน 28 และ 1 isolate ตามลำดับ ซึ่งเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า เป็นยีนชนิด IMP-14 และ VIM-2 ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อโดยใช้วิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่า เชื้อที่มียีนชนิด IMP-14 เกือบทุกสายพันธุ์มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน จึงเป็นไปได้ว่า มีการแพร่กระจายของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันระหว่างผู้ป่วย

ภาควิชา เคมีคลินิก..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5177206237 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
 KEYWORDS : METALLO- β -LACTAMASE / PSEUDOMONAS AERUGINOSA / CLASS
 1 INTEGRON / IMP-14 / VIM-2

CHERMAN PIYAKUL : INVESTIGATION OF METALLO- β -LACTAMASE
 PRODUCING STRAINS AND INTEGRONS OF PSEUDOMONAS
 AERUGINOSA CLINICAL ISOLATES IN THAILAND. ADVISOR :
 KHAEMAPORN BOONBUMRUNG Ph.D., CO-ADVISOR : RACHANEEPORN
 TIYAWISUTSRI Ph.D., 147 pp.

Metallo- β -lactamase (MBL) is the major reason for carbapenems resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and the gene encoding of MBL can be transferred to other bacteria via mobile elements; integron. We aimed to investigate MBL-producing *P. aeruginosa* strains association with class 1 integron observed in 150 isolates from a 1,200-bed hospital of Thailand. First, we investigated their susceptibility profile by the disc diffusion method and also determined the MIC of imipenem using the E-test. They showed a high rate of resistance to most antibiotics especially quinolones, third-generation cephalosporins, β -lactam/inhibitor and carbapenems. The production of MBL was detected in phenotypic and genotypic by the Modified Hodge Test and PCR. Moreover, class 1-integron genes were detected using multiplex PCR. They showed that 28 isolates were phenotypic MBL positive and presented high-level resistant to imipenem ($\text{MIC} \geq 32 \mu\text{g/ml}$). In genotypic testing, 33.3% appeared to carry class 1-integron genes. 28 isolates harboured the bla_{IMP} gene and 1 isolate harboured the bla_{VIM} gene and revealed IMP-14 and VIM-2 after nucleotide sequencing. Moreover, IMP-14 producing *P. aeruginosa* isolates were identical and closely related in PFGE pattern, suggesting that the dissemination of these MBL genes could be due to the clonal dissemination.

Department : Clinical Chemistry..... Student's Signature

Field of Study : Clinical Biochemistry and Advisor's Signature

Molecular Medicine Co-advisor's Signature

Academic Year : 2010.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง และ อาจารย์ ดร.รัชนีพร ตริยะวิสุทธิศรี ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ให้คำปรึกษา คอยอบรมสั่งสอน ตลอดจนให้ข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา ขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และ อาจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิติย์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สมศักดิ์ ราชูล และโรงพยาบาลราชวิถี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิติย์ และภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นอย่างสูง ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือสำหรับทำ pulsed field gel electrophoresis และขอขอบคุณคุณอุษณิญา พุ่มพวง ที่ให้ความช่วยเหลือ และแนะนำเทคนิคต่างๆเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต และขอขอบพระคุณ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความกรุณาที่มอบทุนค่าลงทะเบียน และทุนผู้ช่วยสอนให้ รวมถึง ทุนสำหรับทำวิจัยบางส่วนจาก โครงการในแผนพัฒนาพัฒนาวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณคุณคุณนันทนัช เมืองโคตร คุณสกนธ์รัตน์ เมืองโคตร และคุณพิทยา ไหม่ตา รวมถึงบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด และภาควิชาโลหิตวิทยา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่วัสดุอุปกรณ์ ครุภัณฑ์วิจัย และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ทุกคนในครอบครัวมหาสุวรรณและครอบครัวปิยะกุล ที่คอยว่ากล่าวตักเตือน รับฟังทุกปัญหา ให้คำปรึกษา ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจอย่างไม่เคยขาดตกบกพร่อง รวมถึง เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	6
3 ขอบเขตของการวิจัย.....	6
4 ข้อยกเว้นของการวิจัย.....	7
5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
6 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	8
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2 ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams.....	10
2.1 Penicillins.....	10
2.2 Cephalosporins.....	11
2.2.1 Cephalosporins รุ่นที่ 1.....	11
2.2.2 Cephalosporins รุ่นที่ 2.....	12
2.2.3 Cephalosporins รุ่นที่ 3.....	12
2.2.4 Cephalosporins รุ่นที่ 4.....	12
2.3 Monobactams.....	12
2.4 β -lactams/ β -lactamase inhibitors combination.....	13
2.5 Carbapenems.....	13

บทที่	หน้า
3 กลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams.....	15
3.1 การขับยาออกจากเซลล์.....	15
3.2 การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์.....	16
3.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเป้าหมายหลักของยา.....	16
3.4 การสร้างเอนไซม์ β -lactamase.....	17
4 เอนไซม์ metallo- β -lactamase.....	21
4.1 ชนิด IMP.....	21
4.2 ชนิด VIM.....	22
4.3 ชนิด SPM-1.....	22
4.4 ชนิด GIM-1.....	23
4.5 ชนิด SIM-1.....	23
5 Integron.....	25
6 Class 1 integron.....	28
7 การตรวจสอบเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธีทางฟีโนไทป์.....	30
7.1 Double Disc Synergy Test (DDST).....	30
7.2 Combined Disc Test (CDT).....	31
7.3 Modified Hodge Test.....	31
7.4 MBL E-test.....	32
8 การตรวจสอบเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธีทางจีโนไทป์.....	33
9 ระบาดวิทยาของจุลชีพที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase.....	34
10 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	37
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	38
1 กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัย.....	38
2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	38
3 วิธีการวิจัย.....	43
3.1 ส่วนที่ 1 การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	43
3.1.1 เก็บรวบรวมเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> จากผู้ป่วย.....	43
3.1.2 คัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ และเก็บเชื้อแต่ละสายพันธุ์ไว้.....	43

3.2	<u>ส่วนที่ 2</u> การศึกษาแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	44
3.2.1	ทดสอบความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยวิธี disc diffusion.....	44
3.2.2	หาความเข้มข้นต่ำที่สุด (Minimum inhibitory concentration: MIC) ของยา imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ได้ ด้วยวิธี E- test.....	47
3.3	<u>ส่วนที่ 3</u> ศึกษาทางพีโนไทป์ของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	49
3.3.1	ทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วย MBL E-test.....	49
3.3.2	ทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วย วิธี Modified Hodge Test.....	51
3.4	<u>ส่วนที่ 4</u> ศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ในระดับจีโนไทป์ และหาความสัมพันธ์ของ class 1 Integron โดยการหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase และ class 1 Integron	53
3.4.1	สกัด Chromosomal DNA ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	53
3.4.2	ตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน <i>bla_{IMP}</i> และ ยีน <i>bla_{VIM}</i>) ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase chain reaction: PCR) และตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis.....	55
3.4.3	ตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน <i>Int1</i> และยีน <i>qacEDelta1</i> และยีน <i>Sul1</i>) ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบ multiplex (Multiplex PCR) และตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis.....	57

บทที่	ญ หน้า
3.4.4	
ศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด ต่างๆ ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> กับการมีและไม่มียีนในกลุ่ม class 1 Integron.....	64
3.5	
<u>ส่วนที่ 5</u> ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase และศึกษาความหลากหลายของเชื้อ สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase.....	65
3.5.1	
ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase.....	65
3.5.2	
ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β - lactamase โดยวิธี pulsed field gel electrophoresis.....	65
4	
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	69
1	
<u>ส่วนที่ 1</u> ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> โดยแยก ตามสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ.....	69
2	
<u>ส่วนที่ 2</u> ผลการศึกษาแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	70
2.1	
แบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> เมื่อ ทดสอบด้วยวิธี disc diffusion.....	70
2.2	
ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุด (Minimum inhibitory concentration: MIC) ของ ยา imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี E-test.....	72
3	
<u>ส่วนที่ 3</u> ผลการศึกษาทางพีโนไทป์ของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	74
3.1	
ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วย MBL E-test.....	74
3.2	
ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยวิธี Modified Hodge Test.....	77
4	
<u>ส่วนที่ 4</u> ผลการศึกษากการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ในระดับโมเลกุล และหาความสัมพันธ์ของ class 1 Integron โดยการหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase	

บทที่	หน้า
และ class 1 Integron.....	80
4.1 ผลการตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ของ <i>P. aeruginosa</i> โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	80
4.2 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R และไพรเมอร์ Int-F และ Int-R.....	82
4.3 ผลการตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม class 1 integron ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex.....	90
4.4 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> กับการมีและไม่มียีนในกลุ่ม class 1 integron.....	91
5 ส่วนที่ 5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase และศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase.....	93
5.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase.....	93
5.2 ผลการศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase 24 ตัวอย่าง โดยวิธี pulsed field gel electrophoresis.....	99
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	101
1 สรุปผลการวิจัย.....	101
2 อภิปรายผลการวิจัย.....	105
3 ข้อเสนอแนะ.....	110
รายการอ้างอิง.....	111
ภาคผนวก.....	129
ภาคผนวก ก.....	130
ภาคผนวก ข.....	133
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	147

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	แสดงอัตราการติดต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ในปี พ.ศ.2552.....	2
2.1	แสดงระบบ Efflux ที่เกิดจากโปรตีน 3 ชนิด และยาที่จำเพาะกับระบบ Efflux นั้นในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	15
2.2	แสดงการจัดแบ่งประเภทของเอนไซม์ β -lactamases.....	18
3.1	แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบความไวและติดต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยวิธี disc diffusion.....	46
3.2	แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุด (Minimum inhibitory concentration: MIC) ของยา imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ได้.....	48
3.3	แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน <i>bla_{IMP}</i> และ ยีน <i>bla_{VIM}</i>).....	55
3.4	แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน <i>Int1</i> และ ยีน <i>qacEDelta1</i> และยีน <i>Sul1</i>).....	60
3.5	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม.....	61
3.6	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไพรเมอร์ Sul-F, Sul-R และ Int-F, Int-R เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม.....	62
3.7	แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex สำหรับไพรเมอร์ 3 คู่ (ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R, ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R).....	63
3.8	แสดงหลักเกณฑ์การวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อตามหลักการของ Tenover และคณะ.....	68
4.1	แสดงแบบแผนความไวและติดต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มียีน และกลุ่มที่ไม่มียีน class 1 integron.....	92

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	แสดงร้อยละการดื้อต่อยา imipenem ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ในประเทศไทย ตั้งแต่ปีพ.ศ.2541-พ.ศ.2552.....	3
2.1	แสดงโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม penicillins.....	11
2.2	แสดงโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม cephalosporins.....	12
2.3	แสดงโครงสร้างของยาในกลุ่ม monobactams.....	13
2.4	แสดงโครงสร้าง clavulanic acid	13
2.5	แสดงโครงสร้างของยา imipenem.....	14
2.6	แสดงกลไกการดื้อยาในกลุ่ม β -lactams ของแบคทีเรีย.....	17
2.7	แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ serine- β -lactamase ต่อยาในกลุ่ม β -lactams.....	19
2.8	แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ metallo- β -lactamase ต่อยาในกลุ่ม β -lactams.....	20
2.9	แสดงโครงสร้างหลักของ integron และการเคลื่อนที่ของ gene cassette สู่อโครงสร้างของ integron.....	25
2.10	แสดงโครงสร้างของ class 1 integron.....	28
2.11	แสดงการแพร่กระจายของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิดต่างๆ.....	34
3.1	ลักษณะของ MBL E-test strip.....	49
3.2	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ Int-F และไพรเมอร์ Int-R ซึ่งแสดงโดยลูกศรสีชมพู ที่จับกับ class 1 integron (GenBank No. AF313471.1).....	57
3.3	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ qacE-F และไพรเมอร์ qacE-R ซึ่งแสดงโดยลูกศรสีฟ้าที่จับกับ class 1 integron (GenBank No. AF313471.1).....	58
3.4	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ Sul-F และไพรเมอร์ Sul-R ซึ่งแสดงโดยลูกศรสีม่วงที่จับกับ class 1 integron (GenBank No. AF313471.1).....	59
4.1	แผนภูมิแสดงปริมาณเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่เก็บได้จากจากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือนเมษายน พ.ศ.2552 จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยจำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ.....	69

ภาพที่	หน้า	
4.2	กราฟแสดงแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 11 ชนิด ของกลุ่มตัวอย่าง เชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง.....	71
4.3	กราฟแสดงค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของยา imipenem เมื่อทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ด้วยวิธี E-test.....	73
4.4	ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยวิธี MBL E-test.....	75
4.5	กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับ พีโนไทป์ ด้วย MBL E-test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 74 ตัวอย่าง...	76
4.6	ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยวิธี Modified Hodge Test.....	77
4.7	กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับ พีโนไทป์ ด้วยวิธี Modified Hodge Test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 74 ตัวอย่าง,,.....	78
4.8	กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับ พีโนไทป์ ด้วยวิธี Modified Hodge Test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 150 ตัวอย่าง.....	79
4.9	แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ IMP-F, IMP-R และใช้ไพรเมอร์ VIM-F, VIM-R.....	80
4.10	กราฟแสดงความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ได้แก่ ยีน bla_{IMP} และยีน bla_{VIM} เมื่อทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	81
4.11	แสดงผลการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อ ทดสอบกับเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 และเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> IMP-1 โดยใช้ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R ที่อุณหภูมิช่วงการเกิด annealing ทั้ง 8 ระดับ.....	83
4.12	แสดงผลการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ของ เชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 และ เชื้อ <i>P. aeruginosa</i> IMP-1 โดยใช้ไพร เมอร์ qacE-F และ qacE-R ร่วมกับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่แตกต่างกัน 7 ระดับ ได้แก่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 mM และใช้อุณหภูมิช่วงการ	

ภาพที่	หน้า
เกิด annealing 4 ระดับ ได้แก่ 59.9, 62.8, 64.9 และ 66.0 องศาเซลเซียส.....	85
4.13 แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R ของเชื้อทดสอบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 และเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> IMP-1 ที่ความเข้มข้นของ MgCl ₂ ที่ 1.5 mM และ 2.0 mM ซึ่งเปลี่ยนค่าอุณหภูมิการเกิด annealing ที่แตกต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 55.0, 56.2, 58.4, 61.3, 64.9, 67.8, 69.9, 71.0 องศาเซลเซียส.....	87
4.14 แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R ของเชื้อทดสอบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 และเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> IMP-1 ที่ความเข้มข้นของ MgCl ₂ ที่ 1.5 mM และ 2.0 mM ซึ่งเปลี่ยนค่าอุณหภูมิการเกิด annealing ที่แตกต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 55.0, 56.2, 58.4, 61.3, 64.9, 67.8, 69.9, 71.0 องศาเซลเซียส.....	88
4.15 แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ multiplex โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R, ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, และไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง No.9, 13 และ 46 ซึ่งมีเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 เป็นเชื้อควบคุมลบ และเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> IMP-1 เป็นเชื้อควบคุมบวก.....	89
4.16 กราฟแสดงความชุกของเชื้อที่มียีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน <i>Int1</i> และ ยีน <i>qacEDelta1</i> และยีน <i>Sul1</i>) เมื่อทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ multiplex.....	90
4.17 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> No.4, 9, 10, 11, 18, 22, 23, 29, 31, 32 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน <i>bla_{IMP}</i> ชนิด IMP-14 ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank EMBL accession no GQ302617).....	94
4.18 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> No.33, 34, 35, 37, 38, 40, 43, 45, 100 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน <i>bla_{IMP}</i> ชนิด IMP-14 ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank EMBL accession no GQ302617).....	95

ภาพที่	หน้า	
4.19	แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> No.101, 104, 117, 119, 127, 133, 136, 140 และ 142 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน <i>bla_{IMP}</i> ชนิด IMP-14 ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank EMBL accession no GQ302617).....	96
4.20	แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> No.41 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน <i>bla_{VIM}</i> ชนิด VIM-2 ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank EMBL accession no GQ853417).....	98
4.21	แสดงรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อจำนวน 24 ไอโซเลต ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>SpeI</i> และเปรียบเทียบความหลากหลายด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis.....	100
5.1	แสดงความสัมพันธ์ของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีนโทไปี และในระดับโมเลกุล รวมถึงยีนในกลุ่ม class 1 integron.....	107

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอัตราการติดเชื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาเพียงไม่นาน และไม่มีแนวโน้มจะลดลง ทำให้ประสิทธิภาพ และประสิทธิผลของยาปฏิชีวนะที่เคยใช้ในการควบคุมรักษาโรคติดเชื้อไม่เพียงพอต่อการระงับและยับยั้งเชื้อดื้อยาดังกล่าว ส่งผลให้ไม่สามารถหายาที่เหมาะสมมาใช้ในการรักษาโรคได้ รวมถึงค่าใช้จ่ายในการรักษาตัวของผู้ป่วย และระยะเวลาในการรักษาที่นานขึ้นด้วย จึงถือได้ว่าปัญหาการดื้อยาของจุลชีพเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอันดับต้นๆ ในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย⁽¹⁻⁴⁾ เชื้อก่อโรคที่มีปัญหาการดื้อยาในประเทศไทยมีหลายชนิด⁽⁵⁻⁸⁾ ดังนี้

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Burkholderia pseudomallei*
- Enterococci
- *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นหนึ่งในเชื้อแกรมลบที่มีปัญหาการดื้อยาเกิดขึ้นเป็นอย่างมาก จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand) พบว่า ในปีพ.ศ. 2552 เชื้อดังกล่าวมีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ โดยแบ่งตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ อันได้แก่ เลือด ปัสสาวะ ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และหนอง ดังแสดงในตารางที่

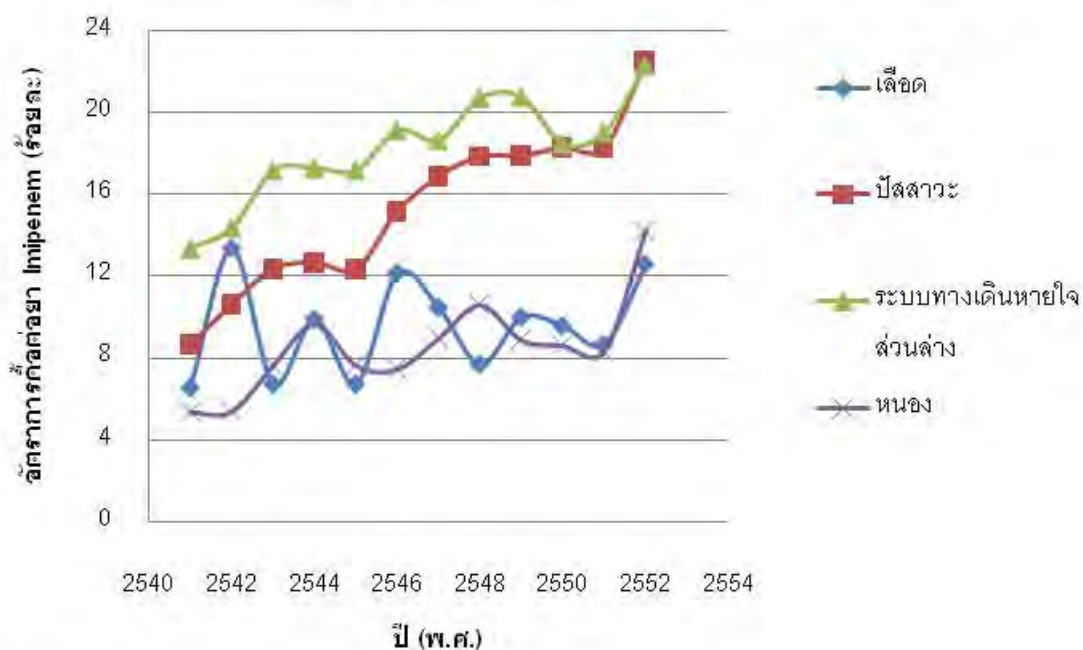
ตารางที่ 1.1 : แสดงอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของเชื้อ *P. aeruginosa* ในปี พ.ศ.2552 (อ้างอิงจาก <http://narst.dmsc.moph.go.th/>)

ยาปฏิชีวนะ	เลือด			ปัสสาวะ			ทางเดินหายใจส่วนล่าง			หนอง		
	%R	%I	%S	%R	%I	%S	%R	%I	%S	%R	%I	%S
Amikacin	23.37	0.50	76.13	34.88	2.08	63.04	16.51	1.71	81.78	13.94	1.22	84.84
Cefoperazone /sulbactam	8.81	10.54	80.65	34.46	12.36	53.18	10.99	17.69	71.32	15.17	12.82	72.01
Ceftazidime	13.37	2.71	83.93	43.65	2.01	54.33	24.08	3.59	72.33	23.39	3.87	72.74
Ciprofloxacin	14.47	10.81	74.73	48.72	1.58	49.70	23.24	2.71	74.05	20.07	2.93	77.00
Gentamicin	25.72	1.26	73.02	45.85	1.30	52.85	22.62	1.67	75.71	19.92	1.84	78.24
Imipenem	12.55	1.70	85.74	22.50	3.21	74.29	22.26	2.91	74.83	14.20	2.92	82.88
Netilmicin	27.35	4.41	68.24	29.99	2.45	67.57	11.25	1.50	87.26	14.08	2.45	83.47
Norfloxacin	7.41	0.00	92.59	47.38	1.93	50.68	3.16	0.00	96.84	5.05	1.01	93.94
Piperacillin	25.00	0.00	75.00	33.33	0.00	66.67	42.42	0.00	57.58	18.18	0.00	81.82

R; Resistance, I; Intermediate, S; Susceptible

จากตารางจะเห็นได้ว่า เชื้อมีร้อยละการดื้อยาต่อยาต้านจุลชีพในอัตราสูง โดยเห็นได้ชัดในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินปัสสาวะ นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาเฉพาะการดื้อยา imipenem ของ *P. aeruginosa* ตั้งแต่ปีพ.ศ.2541 – 2552 พบว่าอัตราการดื้อยาดังกล่าว มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากแสดง ดังแสดงดังกราฟ ในภาพที่ 1.1 โดยการติดเชื้อที่บาดแผล และในกระแสเลือด มีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5-6 ในปีพ.ศ.2541 เป็นร้อยละ 12-14 ในปีพ.ศ.2552 และปีที่มีการดื้อยาสูงที่สุดในการติดเชื้อที่บาดแผล คือ ปีพ.ศ.2552 โดยมีการดื้อยาสูงถึงร้อยละ 14.20 สำหรับการติดเชื้อในกระแสเลือดมีอัตราการดื้อยาสูงที่สุดถึงร้อยละ 13.33 ในปี พ.ศ.2542 ส่วนการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง มีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 13.35 ในปี

พ.ศ.2541 เป็นร้อยละ 22.26 ในปีพ.ศ.2552 ซึ่งเป็นปีที่มีอัตราการดื้อยาสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ มีอัตราการดื้อต่อยา imipenem เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.64 ในปีพ.ศ.2541 เป็นร้อยละ 22.50 ในปีพ.ศ.2552 จะเห็นได้ว่า ภายในระยะเวลาเพียง 11 ปี เชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อต่อยา imipenem เพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า



ภาพที่ 1.1 : แสดงร้อยละการดื้อต่อยา imipenem ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศไทย ตั้งแต่ปีพ.ศ.2541-พ.ศ.2552 (อ้างอิงจาก <http://narst.dmsc.moph.go.th/>)

จากผลการศึกษาศึกษาอุบัติการณ์ในประเทศต่างๆทั่วโลก ประสบปัญหาการดื้อยากลุ่ม imipenem ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน มีรายงานการสำรวจจากประเทศเม็กซิโก พบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อต่อยา ceftazidime, imipenem และ levofloxacin ถึงร้อยละ 40⁽⁹⁾ ในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิแห่งหนึ่งของประเทศโคลัมเบีย พบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อต่อยา imipenem เพิ่มสูงขึ้น จากร้อยละ 2 ในปีพ.ศ.2539 เป็นร้อยละ 28 ในปีพ.ศ.2540 และเพิ่มสูงขึ้นเป็น ร้อยละ 40 ในปีพ.ศ.2546⁽¹⁰⁾ ผลการรายงานในสหรัฐอเมริกา ระหว่างปีค.ศ.2001-2003 ความไวต่อยา imipenem ของเชื้อดังกล่าว ลดลงจาก

ร้อยละ 84.4 ลดลงเหลือร้อยละ 78.8 ซึ่งจะเห็นได้ว่าลดลงถึงร้อยละ 5.6 ภายในระยะเวลาเพียง 2 ปี และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของประเทศในแถบยุโรป ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ ในปีค.ศ. 2003 มีอัตราการติดเชื้อดื้อยา imipenem สูงถึงร้อยละ 44.9⁽¹¹⁻¹³⁾ นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาระหว่างประเทศจีน พบว่าระหว่างปีค.ศ. 1996 – 2002 ความไวต่อยา imipenem ลดลงถึงร้อยละ 20 โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็น multidrug-resistant พบว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวมีอัตราเพิ่มมากขึ้น จากร้อยละ 11.5 เป็นร้อยละ 20.5⁽¹⁴⁾

กลไกการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactams ของเชื้อแบคทีเรียมีหลายกลไก เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้ยาผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง, การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding proteins (PBPs), การขับยาออกจากเซลล์ เป็นต้น⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ ทั้งนี้ยังมีกลไกหนึ่งที่สำคัญ ที่ทำให้เชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactams นั่นก็คือ กลไกการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ซึ่งถือว่าเป็นกลไกที่พบบ่อยที่สุดต่อการดื้อต่อยากลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามมีเชื้อหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในการย่อยยับสเตรพ หรือยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างของวงแหวน β -lactams ประกอบอยู่ จากการศึกษาและค้นคว้าเพิ่มเติมของนักวิทยาศาสตร์ เพื่อหาทางยับยั้งเชื้อดื้อยาที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ ได้ค้นพบสารที่ทำหน้าที่ยับยั้ง β -lactamase หรือเรียกว่า β -lactamase inhibitors เช่น clavulanic acid, tazobactam และ sulbactam จึงมีการใช้สารดังกล่าวร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactams ในการรักษาผู้ป่วย แต่ต่อมาพบว่า ถึงแม้มีการให้สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactams แล้วก็ยังไม่สามารถทำลายเชื้อดื้อยาเหล่านี้ได้ และพบว่ามีเอนไซม์ β -lactamase บางชนิดที่เชื้อเหล่านี้สร้างจะไม่ถูกยับยั้งด้วยสารที่เติมลงไป เอนไซม์ในกลุ่มนี้ เรียกว่า metallo- β -lactamase ด้วยคุณสมบัติที่ไม่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid, tazobactam และ sulbactam ส่งผลให้การดื้อยาเนื่องจากกลไกการสร้าง metallo- β -lactamase มีความรุนแรง ประกอบกับแบคทีเรียที่ติดเชื้ออาศัยด้วยกลไกนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เช่น *Acinetobacter* spp. และ *P. aeruginosa*^(18, 19)

มีรายงานพบว่า การติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อดื้อยา จะทำให้อัตราการป่วย(morbidity) และอัตราการตาย(mortality) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การติดเชื้อที่ไวต่อยา(sensitive)

strains) นอกจากนี้ ยังทำให้ผู้ป่วยต้องพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น และต้องรักษาด้วยยาต้านจุลชีพที่มีราคาแพง เกิดเป็นผลกระทบต่อเนื่องถึงค่าใช้จ่ายในการรักษาตัวที่เพิ่มขึ้นต่อผู้ป่วยแต่ละราย และรัฐต้องรับภาระมากขึ้นเช่นกัน^(17, 20-22) ปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาที่สำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดื้อยาด้วยกลไกการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ต่อยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาที่ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อให้ออกฤทธิ์ต่อจุลชีพได้ครอบคลุม ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด รวมถึงสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *Pseudomonas* spp.^(23, 24) นอกจากนี้ยาในกลุ่มดังกล่าวยังเป็นประโยชน์ต่อการรักษาโรคติดเชื้อที่รุนแรง เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด หากเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่มนี้เพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่การพัฒนา ยาใหม่ๆ เริ่มชะงักลงตัว อนาคตการติดเชื้อดื้อยาเหล่านี้อาจไม่มีทางรักษาได้⁽²⁵⁾ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะแก้ไขปัญหานี้อย่างเร่งด่วน เพื่อป้องกันการกระจายตัวไปอย่างรวดเร็วของเชื้อดื้อยา ซึ่งมีแนวโน้มในการส่งผ่านเชื้อดื้อยาจากต่างประเทศ เนื่องจากความสะดวกในการเดินทางข้ามประเทศ หรือแม้แต่ข้ามทวีป ด้วยเวลาที่ไม่นาน จึงทำให้ผู้ที่ติดเชื้อดื้อยาจากประเทศหนึ่งสามารถส่งผ่านการดื้อยามายังประเทศที่เป็นจุดหมายปลายทาง โดยเชื้ออาจจะอยู่ในช่วงบ่มเพาะแต่ยังไม่ได้เกิดโรคแต่อย่างใด ดังนั้นการศึกษาทางระบาดวิทยาจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะแสดงให้เห็นถึงอุบัติการณ์ที่แท้จริงของเชื้อดื้อยาด้วยยีนชนิดต่างๆ แต่เนื่องจากในประเทศไทยมีการศึกษาถึงการดื้อยาด้วยกลไกการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ต่อยาในกลุ่ม carbapenems เป็นจำนวนน้อยมาก เมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ⁽²⁶⁾

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญและปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ดังนั้นจึงได้เล็งเห็นถึงการทำแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร เพื่อศึกษาถึงแบบแผนและความชุกของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ทั้งนี้จะทำการศึกษาทั้งในระดับฟิโนไทป์ และระดับจีโนไทป์ โดยทำการศึกษาหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน *bla_{IMP}* และยีน *bla_{VIM}*) และความสัมพันธ์ของ class 1 Integron (ยีน *Int1*, ยีน *qacEDelta1* และยีน *sul1*) ซึ่งเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis เพื่อข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่มดังกล่าวอย่างระมัดระวัง

นอกจากนี้ยังทำให้ทุกหน่วยงานที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการควบคุมแบคทีเรียดื้อยาในประเทศไทยได้ตระหนักและทราบถึงข้อเท็จจริงอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงแบบแผนและความชุกของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase โดยวิธีทางพีโนไทป์
2. เพื่อศึกษาหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน *bla_{IMP}* และยีน *bla_{VIM}*) และความสัมพันธ์ของ class 1 Integron (ยีน *Int1*, ยีน *qacEDelta1* และยีน *sul1*)
3. เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase และศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis

3. ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยจะศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เก็บได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด, ระบบทางเดินปัสสาวะ, ทางเดินหายใจส่วนล่าง และการติดเชื้อที่บาดแผล จากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ศึกษาถึงความชุกของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ทั้งนี้จะทำการศึกษาทั้งวิธีทางพีโนไทป์และระดับจีโนไทป์ โดยทำการศึกษาหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน *bla_{IMP}* และยีน *bla_{VIM}*) และความสัมพันธ์ของ class 1 Integron (ยีน *Int1*, ยีน *qacEDelta1* และยีน *sul1*) ซึ่งเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase และศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis ร่วมด้วย

4. ข้อจำกัดของการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ จำกั้ดอยู่แค่ในจากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียงแห่งหนึ่ง ในกรุงเทพมหานคร เนื่องจากการจะขอตัวอย่างจากทางโรงพยาบาลอื่น ต้องอาศัยความร่วมมือจากหลายๆฝ่ายทำให้ไม่สามารถดำเนินการได้ในเวลาที่จำกัด

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความเข้าใจถึงระบาดวิทยาและอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร
2. มีความเข้าใจถึงการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase และ integrons ของเชื้อ *P. aeruginosa* ชัดเจนยิ่งขึ้น
3. ได้รับข้อมูลใหม่ๆเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase และ integrons ของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งในระดับฟีโนไทป์ (phenotype) และในระดับจีโนไทป์ (genotype)
4. ข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ เมื่อนำมาวิเคราะห์และประมวลผลแล้ว จะเป็นจุดเริ่มต้นอันสำคัญ ที่จะส่งผลให้ทุกหน่วยงานที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการควบคุมแบคทีเรียดื้อยาในประเทศไทยได้ตระหนักถึงความสำคัญของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของจุลชีพ และมุ่งศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้กันมากขึ้น เพื่อข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการจัดการยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการรักษาผู้ป่วย และขณะเดียวกันการจัดการยาปฏิชีวนะดังกล่าวก็ต้องควบคุมให้มีโอกาสเกิดเชื้อดื้อยาในอนาคต น้อยที่สุดด้วย
5. โครงการวิจัยนี้ มุ่งหวังที่จะให้อุบัติการณ์ของการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในประเทศไทยลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม carbapenems และมุ่งหวังให้หน่วยงานที่มีส่วนเกี่ยวข้องช่วยกันควบคุมไม่ให้เชื้อดื้อยาเหล่านี้แพร่กระจายไปในวงกว้าง
6. คาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้อง ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง เช่นในวารสาร Clinical Microbiology and Infection (Impact factor: 4.014)
7. คาดว่าจะสามารถนำเสนอผลงานวิจัยจากโครงการนี้ ในระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ครั้งต่อปี

8. ส่งเสริมความร่วมมือด้านวิชาการระหว่างสถาบันการศึกษาและโรงพยาบาล
ภายในประเทศ

6. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ที่ไม่สามารถสลายน้ำตาลกลูโคสเพื่อนำไปใช้สร้างพลังงานได้โดยขบวนการ fermentation สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ พืช สัตว์ รวมทั้งอาหาร⁽²⁷⁾ เนื่องจากเชื้อมีความทนต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ทำให้เชื้ออาศัยอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล เช่น บริเวณอ่างล้างมือ สารน้ำต่างๆ ยาฉีด ยาฆ่าเชื้อ เครื่องมือแพทย์ เป็นต้น^(18, 20, 28-31) ส่งผลให้เชืชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญเป็นอันดับหนึ่งของการเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infections) โดยมีอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 22-31 รองลงมา ได้แก่ *E. coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. ตามลำดับ^(18, 28-32) นอกจากนี้ เชื้อ *P. aeruginosa* ยังดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียในอัตราสูง และเป็นปัญหาสำคัญในการรักษา โดยการดื้อต่อยาของเชื้อเกิดจากหลายกลไก เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้ยาผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง, เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม aminoglycosides และ chloramphenicol เช่น aminoglycoside acyltransferase (AAC), chloramphenicol acetyltransferase (CAT), กลไก efflux ซึ่งสามารถขับยาหลายชนิดออกจากเซลล์, การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา เช่น การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ DNA gyrase ทำให้เชื้อดื้อต่อยา กลุ่ม quinolones ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ เชื้อยังมีกลไกการดื้อต่อยาส่วนใหญ่ในกลุ่ม β -lactams โดยสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding proteins (PBPs) และกลไกการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ซึ่งเป็นกลไกหลักที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่มดังกล่าว⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

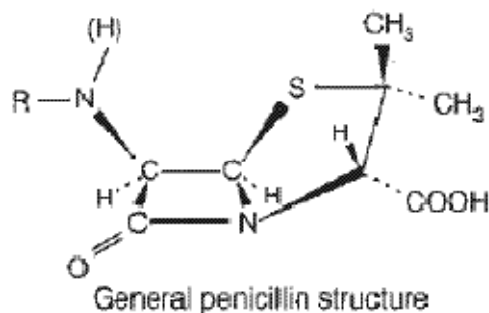
2. ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams

ยาด้านจุลชีพในกลุ่มนี้ มีสูตรโครงสร้างที่สำคัญ คือ ส่วนวงแหวน β -lactam (β -lactam ring) ซึ่งเป็นวงแหวนชนิด 4 อะตอม ยาจะออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (bactericidal effect) ผ่านกระบวนการยับยั้งขบวนการสร้างสะพานเปปไทด์ (transpeptidation) ในขั้นตอนของการสังเคราะห์ผนังเซลล์ โดยเข้าไปจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาย peptidoglycan หรือที่นิยมเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า penicillin-binding proteins (PBPs) อันประกอบไปด้วย เอนไซม์ transpeptidase และเอนไซม์ carboxypeptidase มีผลทำให้ผนังเซลล์ขาดความแข็งแรง และเกิดการแตกสลายตัวของเซลล์ได้ในที่สุด

ยาด้านจุลชีพ ในกลุ่ม β -lactams ประกอบไปด้วยยา 5 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ กลุ่ม penicillins, กลุ่ม cephalosporins, กลุ่ม monobactams, กลุ่ม β -lactams/ β -lactamase inhibitors combination และกลุ่ม carbapenems^(19, 32-34) ยาในแต่ละกลุ่มจะออกฤทธิ์แตกต่างกันในการต้านเชื้อชนิดต่างๆ ดังนี้

2.1. Penicillins เป็นยา β -lactams กลุ่มแรกที่ Sir Alexander Fleming ค้นพบขึ้นใน พ.ศ.2471 โดยพบว่า เชื้อรา *Penicillium notatum* มีผลทำให้เซลล์ของเชื้อ staphylococci แตก หลังจากนั้น 12 ปีต่อมา (ประมาณพ.ศ.2483) ได้มีการสกัดแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สารนี้มีชื่อว่า เพนนิซิลลิน (penicillin) นำไปสู่การพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาการติดเชื้อมาจนถึงปัจจุบัน ระยะเวลาที่มีการใช้ยา penicillins จำนวนมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดดื้อต่อยา ดังกล่าว นำไปสู่การพัฒนา ยา penicillins ชนิดใหม่ โดยใช้วิธีกึ่งสังเคราะห์ ทำให้ยากกลุ่มนี้ มีขอบเขตการต้านจุลชีพกว้างขึ้น รวมทั้งมีความคงตัวและทนทานต่อเอนไซม์ penicillinase ที่เชื้อสร้างมาทำลายยามากขึ้นอีกด้วย ถึงแม้ว่า penicillins เป็นยาปฏิชีวนะที่ค่อนข้างปลอดภัย และเป็นยาที่ควรเลือกใช้เป็นอันดับแรกเพื่อรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแกรมบวก แกรมลบ และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่ไวต่อยานี้⁽³⁵⁻³⁷⁾ แต่ก็ยังมีฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ที่พบได้บ่อย คือ การแพ้ยา⁽³⁸⁾ รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้กลไกอันหลากหลายที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา เช่น การสร้างเอนไซม์ penicillinase มาทำลายยา หรือการปรับเปลี่ยน PBPs ซึ่งเป็นเป้าหมาย

หลักของยา และยา penicillin ซึมผ่านเข้าไปในแบคทีเรียไปยังเอนไซม์เป้าหมายได้น้อยลง เป็นต้น⁽³⁹⁾ ด้วยเหตุนี้ จึงมีการพัฒนายา β -lactams อีกรุ่นหนึ่ง ซึ่งก็คือกลุ่ม cephalosporins



ภาพที่ 2.1 : โครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม penicillins⁽¹⁹⁾

2.2. Cephalosporins ยาในกลุ่มนี้ ค้นพบครั้งแรกในปีพ.ศ.2491 แยกได้จากเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* ต่อมาได้พัฒนายากลุ่มนี้ให้เป็นยาปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์ ยา cephalosporins รุ่นแรกๆ เช่น cephalothin, cephaloridine ขอบเขตการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแคบ ให้ผลดีต่อเชื้อแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ และมักใช้ไม่ได้ผลต่อเชื้อ แกรมลบ เนื่องจากเชื้อสร้างเอนไซม์ cephalosporinase จึงได้มีการพัฒนาสูตรโครงสร้างเพื่อให้ได้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีขึ้น มีผลต่อเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน และมีความทนทานต่อเอนไซม์ β -lactamase ดีขึ้น ตลอดจนการพยายามคิดค้น cephalosporins ชนิดที่สามารถให้โดยการรับประทาน เพื่อสะดวกในการใช้ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายที่ต้องจ่ายสำหรับการรักษาตัวในโรงพยาบาล^(23, 35) การพัฒนายาใหม่ๆ ในกลุ่มนี้ ทำให้สามารถจำแนกกลุ่ม cephalosporins เป็นรุ่นๆ ตามขอบเขตการออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย ได้เป็น 4 รุ่น (generation) ดังนี้^(23, 35, 40)

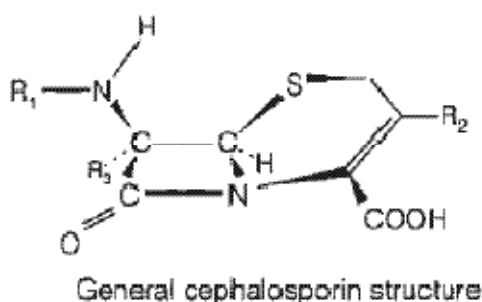
2.2.1. **Cephalosporins รุ่นที่ 1** (first generation) ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแกรมบวกส่วนใหญ่ได้ ยกเว้น enterococci, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* และใช้ได้ผลบ้างต่อเชื้อ

แกรมลบบางชนิด เช่น *Moraxella catarrhalis*, *E. coli* ยาในกลุ่มนี้ เช่น cephalothin, cephazolin

2.2.2. **Cephalosporins รุ่นที่ 2** (second generation) มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มขึ้น แต่ยังคงด้อยกว่ารุ่นที่ 3 นอกจากนั้นยาในรุ่นนี้ยังมีความทนต่อเอนไซม์ β -lactamase ตัวอย่างยาในรุ่นนี้ ได้แก่ cefuroxime, cefamandole, cefoxitin

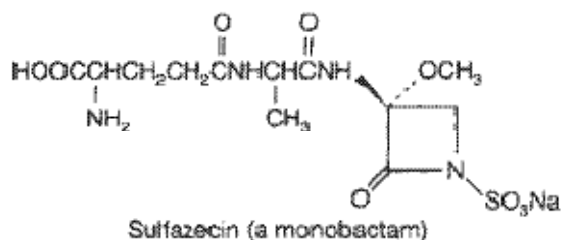
2.2.3. **Cephalosporins รุ่นที่ 3** (third generation) มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดีขึ้น แต่ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลับลดลงกว่ายาในรุ่นที่ 1 นอกจากนั้นยาในรุ่นนี้ ยังใช้ได้ผลดีมากสำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* ตัวอย่างยาในรุ่นนี้ ได้แก่ ceftazidime, cefoperazone

2.2.4. **Cephalosporins รุ่นที่ 4** (fourth generation) ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกว้างกว่ายารุ่นที่ 3 ครอบคลุมทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีความทนทานต่อเอนไซม์ β -lactamase มากขึ้นอีกด้วย



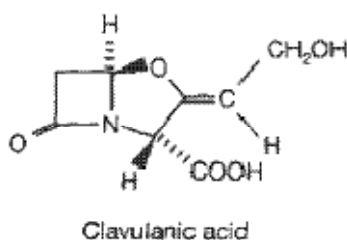
ภาพที่ 2.2 : โครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม cephalosporins⁽¹⁹⁾

2.3. **Monobactams** ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน β -lactam วงแหวนเดี่ยว ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแกรมลบได้ดี เช่น *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus*, *Neisseria* และ *Serratia* แต่ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแกรมบวก, เชื้อ anaerobes หรือเชื้อแกรมลบบางชนิด เช่น *Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp. เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้ทนต่อเอนไซม์ β -lactamase ได้ดี ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ aztreonam⁽⁴¹⁾



ภาพที่ 2.3 : แสดงโครงสร้างของยาในกลุ่ม monobactams⁽¹⁹⁾

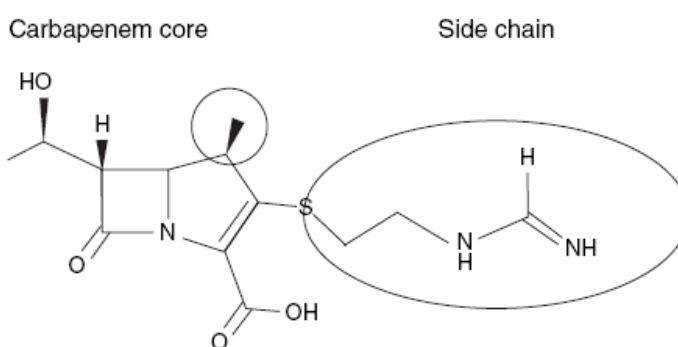
- 2.4. **β -lactams/ β -lactamase inhibitors combination** เมื่อ β -lactamase จากเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทมากขึ้น แม้ว่ายาบางตัวในกลุ่ม penicillins และกลุ่ม cephalosporins จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase บางชนิดได้ แต่อย่างไรก็ตาม ต้องใช้ยาดังกล่าวในขนาดที่สูง จึงนำไปสู่การใช้ β -lactamase inhibitors เช่น clavulanic acid, sulbactam, tazobactam เป็นต้น ร่วมกับยาในกลุ่ม β -lactams เพื่อให้ β -lactamase inhibitors ไปยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ที่เชื้อสร้างขึ้น ยาจึงสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ตามปกติ^(41, 42) ถึงแม้จะมีการพัฒนา β -lactamase inhibitors มายับยั้งเอนไซม์ β -lactamase แต่ยังมีเอนไซม์ β -lactamase บางชนิดที่ทนต่อการทำงานของ β -lactamase inhibitors ได้



ภาพที่ 2.4 : แสดงโครงสร้าง clavulanic acid⁽¹⁹⁾

- 2.5. **Carbapenems** ยาในกลุ่ม carbapenems เป็นยาด้านจุลชีพลกลุ่ม β -lactams ที่มีฤทธิ์กว้างที่สุด^(41, 43) โดยออกฤทธิ์ได้ดีในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบทั้งชนิดที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนหลายชนิด เช่น streptococci, enterococci, staphylococci, *Listeria*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* รวมถึงสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *Pseudomonas* และยาในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติที่ดื้ออีกอย่างหนึ่ง คือ

การทนทานต่อเอนไซม์ Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) และ AmpC β -lactamases ที่เชื้อสร้างขึ้นมาทำลายยาได้ จึงทำให้ยาในกลุ่มนี้ มีประโยชน์มากในการรักษาโรคติดเชื้อร่วมหลายชนิดในโรงพยาบาล ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่ imipenem, ertapenem, meropenem และ doripenem เป็นต้น ถึงแม้ยาในกลุ่ม carbapenems จะมีประสิทธิภาพสูงเพียงใด แต่ก็ไม่สามารถทนต่อการทำงานของเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่เชื้อหลากหลายสายพันธุ์สร้างขึ้นมาเพื่อทำลายยาได้ ทำให้ในปัจจุบันอัตราการดื้อยาในกลุ่มนี้เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง⁽²³⁾



ภาพที่ 2.5 : แสดงโครงสร้างของยา imipenem⁽⁴⁴⁾

3. กลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams

กลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams ของจุลชีพ มีหลายกลไก ดังนี้

3.1. การขับยาออกจากเซลล์

กลไกการขับยาออกจากเซลล์ เป็นกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ แต่เกี่ยวข้องกับการอาศัยพลังงานจากกระบวนการที่เรียกว่า Efflux system กระบวนการดังกล่าวเกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายกลุ่ม เช่น โปรตีน MexB, MexE, OprM, OprN เป็นต้น ทำให้มีความสามารถในการขับยาหลายชนิด ออกจากเซลล์ได้ ซึ่งยาที่ถูกขับออกก็จะจำเพาะกับโปรตีนที่ทำงานร่วมกันด้วย เช่น ระบบ Efflux ที่เกิดจากการทำงานของโปรตีน MexB-MexA-OprM ในเชื้อ *P. aeruginosa* จะทำให้เชื้อขับยาในกลุ่ม quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin และ β -lactams ออกจากเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถขับยา imipenem ออกได้⁽¹⁸⁾ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 : แสดงระบบ Efflux ที่เกิดจากโปรตีน 3 ชนิด และยาที่จำเพาะกับระบบ Efflux นั้นในเชื้อ *P. aeruginosa*⁽¹⁸⁾

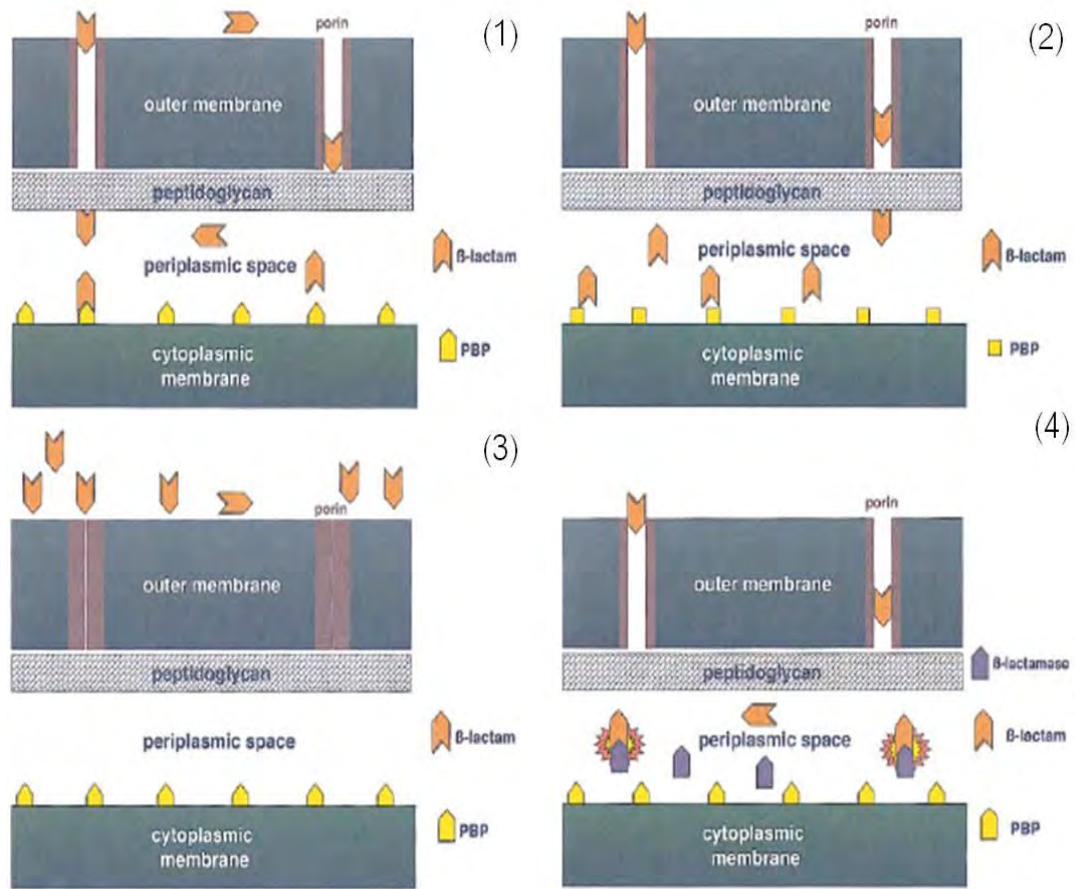
Cytoplasmic membrane pump	Periplasmic linker	Outer membrane channel	Substrate
MexB	MexA	OprM	quinolones, macrolides, tetracyclines, liconamycin, chloramphenicol, novobiocin, β -lactams except imipenem
MexD	MexC	OprJ	quinolones, macrolides, tetracyclines, liconamycin, chloramphenicol, novobiocin, penicillins except carbenicillin and sulbenicillin, cefipime, cefpirome, meropenem
MexF	MexE	OprN	fluoroquinolones, carbapenems
MexY	MexX	OprM	quinolones, macrolides, tetracyclines, liconamycin, chloramphenicol, aminoglycosides, penicillins except carbenicillin and sulbenicillin, cefipime, cefpirome, meropenem

3.2. การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์

ผนังเซลล์ของเชื้อแกรมลบมี outer membrane ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า porin รวมตัวกันเกิดเป็นช่องว่างขึ้น สารต่างๆหรือยาปฏิชีวนะจะผ่านเข้า-ออกไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ จำเป็นจะต้องเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างที่เกิดขึ้นนี้ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน porin เนื่องจากการการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุม ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactams ได้เช่นเดียวกัน เช่น ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา imipenem พบว่า มีการกลายพันธุ์ของยีน *oprD* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน OprD เกี่ยวข้องกับการเกิด porin⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ (ภาพที่ 2.6 (3))

3.3. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเป้าหมายหลักของยา (altered target)

เนื่องจากเป้าหมายหลักของยาในกลุ่ม β -lactams คือเอนไซม์ในกลุ่ม penicillin-binding proteins (PBPs) โครงสร้างของ PBPs จะเปลี่ยนแปลงได้ มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้น มีลักษณะแตกต่างออกไปจากเดิม ส่งผลให้ยาไม่สามารถจับกับเอนไซม์ ซึ่งเป็นเป้าหมายของยาได้ (ภาพที่ 2.6 (2)) กลไกนี้เป็นกลไกที่เกิดขึ้นมากในเชื้อแกรมบวก เช่น *S. aureus*, *S. pneumoniae* และเกิดขึ้นได้บ้างในเชื้อแกรมลบ เช่น *P. aeruginosa*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus influenzae*^(17, 18)



ภาพที่ 2.6 : แสดงกลไกการดื้อยาในกลุ่ม β -lactams ของแบคทีเรีย, (1) ในเชื้อแกรมลบ ยา β -lactams จะเข้าสู่ outer membrane ของเชื้อ ผ่านทางช่องว่างที่เรียกว่า porin จากนั้นก็เคลื่อนที่ผ่าน periplasmic space ไปจับกับ PBPs ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของยา, (2) กลไกการดื้อยาที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเป้าหมายหลักของยา, (3) กลไกลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ และ (4) กลไกการสร้างเอนไซม์ β -lactamase⁽¹⁷⁾

3.4. การสร้างเอนไซม์ β -lactamase

สำหรับการดื้อยาในกลุ่ม β -lactams ทั้ง penicillins, cephalosporins และ carbapenems กลไกการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ถือว่าเป็นกลไกที่มีความสำคัญและพบได้บ่อยที่สุด⁽¹⁹⁾ ในปัจจุบัน เอนไซม์ β -lactamase ที่ถูกผลิตขึ้นจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มีมากกว่า 340 ชนิด ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิด ก็มี ความสามารถในการย่อยสลายยาต้านจุลชีพ ซึ่งเป็นข้อแตกต่างกันออกไป

นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อแกรมลบ สามารถผลิตเอนไซม์ β -lactamase ได้หลากหลายกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และความหลากหลายของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นนี้เอง นำไปสู่การจัดประเภทของเอนไซม์ เป็นระบบๆ ดังตารางที่ 2.2^(27, 48-51)

ตารางที่ 2.2 : แสดงการจัดแบ่งประเภทของเอนไซม์ β -lactamases⁽⁵²⁾

	β -lactamase-class	β -lactamases	Important examples	Preferential occurrence	Important phenotypical resistance traits ^a
Serine- β -lactamases	A	Broad-spectrum β -lactamases	TEM-1, TEM-2 SHV-1, SHV-11	Enterobacteriaceae and nonfermenters ^b	ampicillin, cephalotin
		ESBL TEM-type	TEM-3, TEM-52		penicillins, 3rd gen. cephalosporins
		ESBL SHV type	SHV 5, SHV 12		
		ESBL CTX-M-type	CTX-M-1, CTX-M-15		
		Carbapenemases	KPC, GES, SME		all β -Lactams ^c
C	AmpC cephalosporinases (chromosomal-encoded)	AmpC	Enterobacter spp. Citrobacter spp.	cephamycins (cefotaxime), 3rd gen. cephalosporins	
		AmpC cephalosporinases (plasmid-encoded)	CMY, DHA, MOX FOX, ACC,	Enterobacteriaceae	cephamycins (cefotaxime), 3rd gen. cephalosporins
D	Broad-spectrum β -lactamases	OXA-1, OXA-9	Enterobacteriaceae; A. baumannii	oxacillin, ampicillin cephalotin	
		ESBL OXA-type		OXA-2, OXA-10	penicillins, 3rd gen. cephalosporins
		Carbapenemases: Carbapenemases		OXA-48: OXA-23,-24,-58	ampicillin, imipenem; all β -lactams ^c
Metallo- β -lactamases	B	Metallo- β -lactamases (Carbapenemases)	VIM IMP	Enterobacteriaceae and nonfermenters	all β -lactams ^c

^a Characteristical resistances that are partially used used for diagnostic purposes;

^b Broad-spectrum β -lactamase TEM-1 frequently occurs in nonfermenters (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*);

^c Broad hydrolytic spectrum including carbapenems.

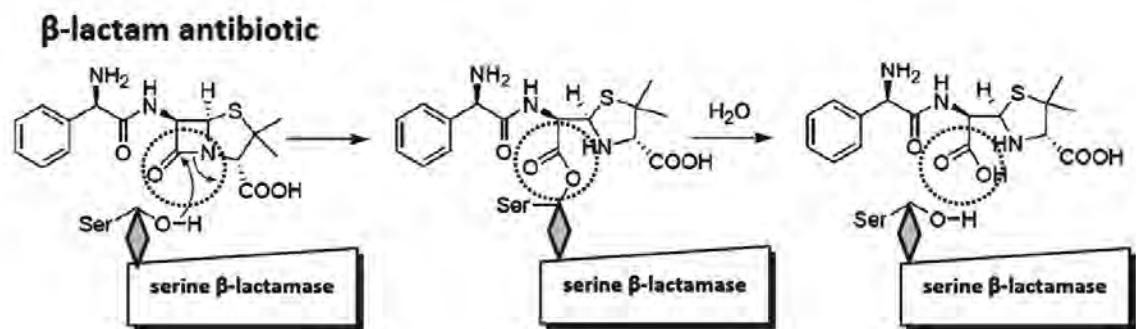
หากจัดประเภทของเอนไซม์ตามการทำงานของเอนไซม์ สามารถแบ่งเอนไซม์

β -lactamase ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

- a. serine- β -lactamase ซึ่งเอนไซม์ β -lactamase ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีตำแหน่งออกฤทธิ์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine การทำงานของเอนไซม์จะอาศัยหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโน serine ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ เข้าทำปฏิกิริยากับวงแหวน β -lactam ที่อยู่ในส่วนนิวเคลียสของยา เรียกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นว่า nucleophilic attack ทำให้เกิดการแยกของพันธะ amide บนวงแหวน β -lactam ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านจุลชีพต่างๆได้ (ภาพที่ 2.7) ส่งผลให้ยาในกลุ่ม β -lactams หลายชนิดให้ผลการรักษาที่ไม่

ดีเท่าที่ควร นำไปสู่การใช้ β -lactamase inhibitors ร่วมกับยาในกลุ่ม β -lactams ซึ่ง β -lactamase inhibitors สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้ ทำให้ยาให้ผลการรักษาที่ดียิ่งขึ้น^(41, 42, 48, 51) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น

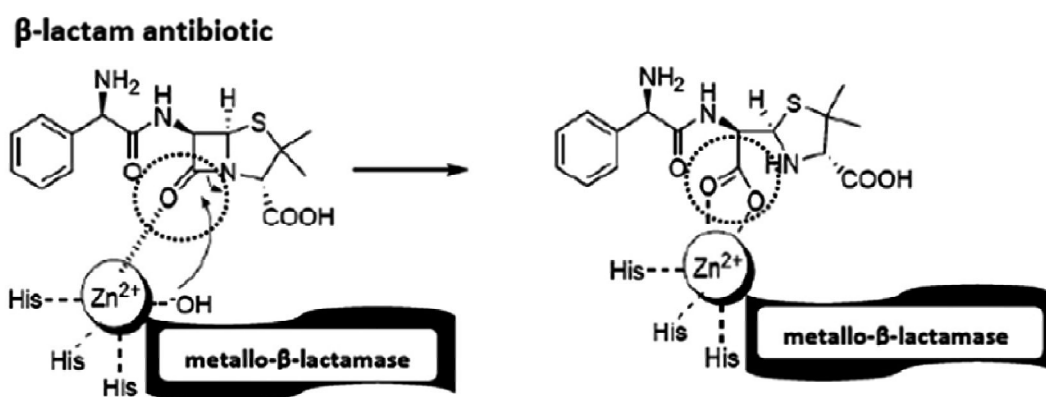
- AmpC β -lactamase : มีฤทธิ์ในการย่อยสลายยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้มีหลายชนิด เช่น *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*
- Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) : มีฤทธิ์ในการย่อยสลายยาในกลุ่ม penicillins และ cephalosporins รุ่นที่ 3 เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้มีหลายชนิด เช่น *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae*



ภาพที่ 2.7 : แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ serine- β -lactamase ต่อยาในกลุ่ม β -lactams⁽⁵¹⁾

- b. Metallo- β -lactamase เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม carbapenem-hydrolyzing- β -lactamase หรือหากจัดประเภทโดยอาศัยคุณสมบัติทางอณูชีววิทยา เอนไซม์ชนิดนี้จะจัดอยู่ในกลุ่ม molecular class B^(53, 54) การทำงานของเอนไซม์ metallo- β -lactamase คล้ายกับเอนไซม์ β -lactamase อื่นๆ คือ ตัดพันธะ amide บนวงแหวน β -lactam ของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams แต่ลักษณะเด่นอย่างหนึ่งของเอนไซม์ metallo- β -lactamase ก็

คือ บริเวณตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์จะมี metal ion ประกอบอยู่ และเอนไซม์จะออกฤทธิ์ได้ จำเป็นจะต้องอาศัยธาตุที่เป็น divalent cation เช่น Zn^{2+} เป็น cofactor ในการเร่งปฏิกิริยา (ภาพที่ 2.8)^(16, 17, 34, 51, 55, 56)



ภาพที่ 2.8 : แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ metallo-β-lactamase ต่อยาในกลุ่ม β-lactams⁽⁵¹⁾

เอนไซม์ metallo-β-lactamase สามารถย่อยสลายยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams ได้ทุกชนิด ยกเว้น monobactams เช่น aztreonam และมีคุณสมบัติที่พิเศษกว่าเอนไซม์ β-lactamase อื่นๆ คือ มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายยากลุ่ม carbapenems นอกจากนี้ β-lactamase inhibitors ต่างๆ เช่น clavulanic acid, tazobactam, sulbactam ก็ไม่สามารถต้านการทำงานของเอนไซม์ได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยไม่ได้ผลดี รวมทั้งมีการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (horizontal gene transfer) ทำให้การสร้างเอนไซม์ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* เพิ่มมากขึ้น และกระจายตัวไปอย่างรวดเร็ว⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾

4. เอนไซม์ metallo- β -lactamase

เอนไซม์ metallo- β -lactamase มียีน *bla* (MBL *bla* gene) เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ โดยยีนนี้อาจอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย บนพลาสมิด หรือบน transposons มีหลายการศึกษาพบว่า MBL *bla* gene มักจะบรรจุอยู่ใน class 1 integron ในแบคทีเรียแกรมลบ integron เหล่านี้ จะทำหน้าที่ในการถ่ายทอดยีน *bla* ข้ามระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ งานวิจัยหลายการศึกษา นำไปสู่การค้นพบเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิดต่าง เช่น

- 4.1. **ชนิด IMP (active on IMiPenem)** มียีน *bla_{IMP}* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิด IMP ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Watanabe และคณะ⁽⁶³⁾ โดยพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ประเทศญี่ปุ่น ปี 1988 แต่การค้นพบครั้งนั้น คณะผู้วิจัยไม่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และระบุชื่อเอนไซม์ดังกล่าว จนกระทั่งเมื่อปี 1991 เอนไซม์ชนิดนี้ได้ถูกค้นพบอีกครั้งที่ประเทศญี่ปุ่น ในเชื้อ *S. marcescens* นำไปสู่การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และระบุชื่อเป็นชนิด IMP-1 ในที่สุด⁽⁶³⁾ และในช่วงเวลาดังกล่าว (ต้นทศวรรษที่ 90) มีรายงานหลายฉบับกล่าวถึงการพบยีน *bla_{IMP-1}* ในเชื้อ *P. aeruginosa*⁽⁶⁴⁾ และ *S. marcescens*⁽⁶⁵⁾ ทั้งยังพบในเชื้อ *K. pneumoniae*⁽⁶⁶⁾ อีกด้วย จากการสำรวจเชื้อแกรมลบที่มีคุณสมบัติเป็น multidrug-resistant จำนวน 587 ตัวอย่างในประเทศญี่ปุ่น ระหว่างปี 2001-2002 พบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ถึง 431 ตัวอย่าง (ร้อยละ 73.4) นอกจากนี้ยังพบว่า ในเชื้อจำนวน 357 ตัวอย่างมียีน *bla_{IMP-1}* บรรจุอยู่⁽⁶⁷⁾ ในช่วงแรกของการศึกษาเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ในกลุ่มนี้พบเฉพาะในเชื้อ *P. aeruginosa* และมีการแพร่กระจายเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ปัจจุบันเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิด IMP กลับถูกพบในเชื้อแบคทีเรียหลายๆสายพันธุ์ เช่น *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Providencia rettgeri*, *M. morgani* และ *Alcaligenes* sp. ทั้งยัง มีการแพร่กระจายไปในหลายๆประเทศทั่วโลก เช่น ประเทศจีน ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา แคนาดา บราซิล อังกฤษ อิตาลี และโปรตุเกส ทำให้มีเอนไซม์ในกลุ่มนี้ มากถึง 26 ชนิด ได้แก่ IMP-1 ถึง IMP-26⁽⁵⁵⁾

- 4.2. **ชนิด VIM (Verona IMipenemase)** เป็นเอนไซม์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากชนิด IMP และมียีน bla_{VIM} ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ พบครั้งแรกเมื่อปี 1997 ในเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ที่เมือง Verona ประเทศอิตาลี⁽⁶⁸⁾ ถึงแม้ว่า ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ชนิด VIM จะมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ชนิด IMP น้อยกว่าร้อยละ 40 แต่เอนไซม์ทั้งสองชนิดก็มีคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน และยังพบว่า ยีน bla_{VIM} ส่วนใหญ่จะถูกบรรจุอยู่ในโครงสร้างของ integron เช่นเดียวกับยีน bla_{IMP} ^(61, 68) มีรายงานการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ bla_{VIM-1} ทำให้ความไวของเชื้อต่อยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins และ carbapenems ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁵⁵⁾ ในอดีต ยีน bla_{VIM} พบมากในแถบยุโรป ทำให้เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกเรียกว่า “European MBLs” แต่ปัจจุบันสามารถพบได้ในเกาหลี อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ออสเตรเลีย อินเดีย และอิหร่าน^(55, 69) จากการสำรวจเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา imipenem ในช่วงปี 2000-2003 ในศูนย์การแพทย์ที่เมือง Seoul ประเทศเกาหลีใต้ พบว่ามีเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิด VIM-2 ถึงร้อยละ 18.1 และในบรรดาเชื้อเหล่านี้ พบว่า ร้อยละ 85.7 ของเชื้อให้ผลการดื้อต่อยา imipenem ในอัตราสูง (มีค่าความเข้มข้นของยา imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ≥ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)⁽⁷⁰⁾ นอกจากเอนไซม์ชนิดนี้ จะตรวจพบในเชื้อ *P. aeruginosa* แล้ว ยังสามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *Proteus mirabilis* และ *E. coli* เป็นต้น⁽⁵⁵⁾
- 4.3. **ชนิด SPM-1 (Sao Paulo Metallo- β -lactamase)** พบครั้งแรกที่ Sao Paulo ประเทศบราซิล ปี 2001 โดยพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาเกือบทุกชนิด (ไวต่อ ยา colistin เพียงชนิดเดียว)⁽⁶⁹⁾ เชื้อดังกล่าวได้มาจากเลือดของผู้ป่วยเด็กอายุ 4 ปีที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphoblastic leukaemia ผู้ป่วยแสดงอาการไข้ที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิลต่ำ (febrile neutropenia) และภายหลังเสียชีวิตเนื่องจากภาวะ septic shock หลังจากนั้น โรงพยาบาลบางแห่งของประเทศบราซิล ได้เกิดการระบาดของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล อันมีสาเหตุมาจาก

เอนไซม์ดังกล่าว⁽⁵⁵⁾ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ชนิดนี้กับ เอนไซม์ชนิด IMP-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึง ร้อยละ 35.5⁽⁵⁶⁾

4.4. **ชนิด GIM-1** (German IMipenemase) พบครั้งแรกเมื่อปี 2002 ที่ Dusseldorf ประเทศเยอรมนี จากเชื้อ *P. aeruginosa* 5 ไอโซเลต ซึ่งเก็บได้จากผู้ป่วย พบว่า เชื้อดังกล่าวไวต่อยาปฏิชีวนะ เพียงชนิดเดียว คือ colistin⁽⁷¹⁾ และมีรูปแบบดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการแยกด้วย pulsed field gel electrophoresis ที่ไม่แตกต่างกัน ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ บรรจุอยู่ใน class 1 integron ซึ่งอยู่บนพลาสมิด ขนาดเล็ก (45 kb) เช่นเดียวกับเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิดอื่นๆ และ ลำดับกรดอะมิโนของ GIM-1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ IMP มากที่สุด โดยคล้ายคลึงกันถึงร้อยละ 39-43 ปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการพบเอนไซม์ ชนิดนี้ ในประเทศอื่นๆอีกเลย^(55, 56, 72)

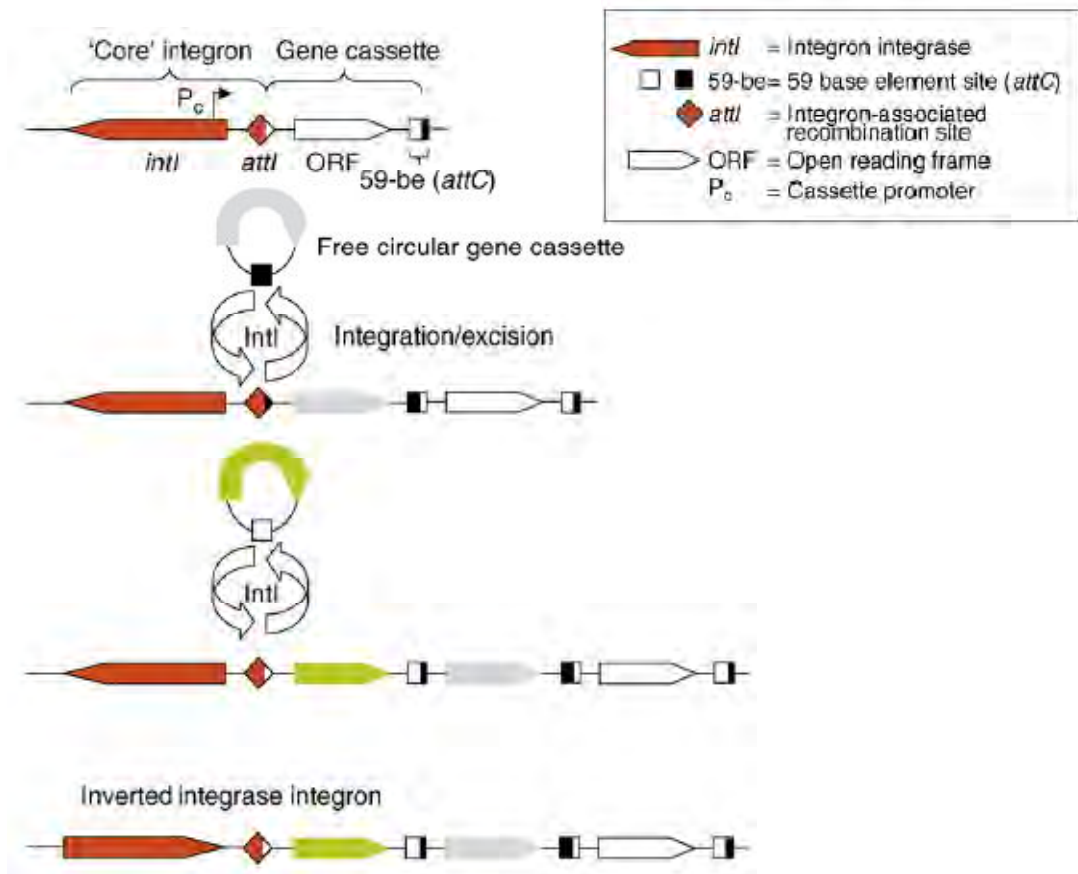
4.5. **ชนิด SIM-1** (Seoul IMipenemase) พบครั้งแรกในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ ที่ Seoul ประเทศเกาหลี ระหว่างปี 2003 – 2004 ได้มีการสำรวจเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 1,234 ตัวอย่าง พบว่า 211 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17) สามารถผลิตเอนไซม์ metallo- β -lactamase ได้ ในบรรดาเชื้อเหล่านี้ ร้อยละ 74 มียีน *bla_{IMP}* และร้อยละ 22 มียีน *bla_{VIM}* นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 7 ไอโซเลต มียีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ชนิดใหม่เกิดขึ้น ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ในกลุ่ม IMP ร้อยละ 64-69 และในที่สุดเอนไซม์ชนิดใหม่ก็ถูกตั้งชื่อเป็นชนิด SIM-1⁽⁷³⁾ จากการศึกษาพบว่า เชื้อทั้งหมดที่สร้างเอนไซม์ SIM-1 นี้ มีค่า MIC ต่อยา imipenem และ meropenem ในระดับต่ำ (8-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และต่างก็มีคุณสมบัติของการเป็น multidrug-resistant นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ SIM-1 ที่เชื้อสร้างขึ้น มีความสามารถในการย่อยสลายยาในกลุ่ม β -lactams ได้ครอบคลุม ทั้ง penicillins, cephalosporins และ carbapenems^(55, 56, 72)

นอกจากนี้ เอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิดใหม่ๆ ก็ถูกค้นพบอยู่อย่างต่อเนื่องใน หลายๆประเทศ เช่น **ชนิด AIM-1** (Australian IMipenemase) มีรายงานในผู้ป่วยเพศชายที่มี ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งลำดับกรดอะมิโน

ของเอนไซม์ชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกับชนิดอื่นๆ (ชนิด IMP, VIM, SPM-1 และ GIM-1) ในอัตราที่น้อยมาก⁽⁷²⁾ ชนิด KHM-1 (Kyorin University Hospital Metallo- β -lactamase) มีรายงานในปี ค.ศ.2008 ในผู้ป่วยที่โรงพยาบาล Kyorin (Tokyo ประเทศญี่ปุ่น) ที่ต้องใส่สายสวน (catheter) เนื่องจากติดเชื้อ *C. freundii* ในระบบทางเดินปัสสาวะ พบว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ตื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดในกลุ่ม β -lactams ยกเว้น monobactams และมีความไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems ลดลง⁽⁷⁴⁾ และเมื่อไม่นานมานี้ในปีค.ศ.2009 ได้มีรายงานการค้นพบ เอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิด NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) ในผู้ป่วยเพศชายอายุ 59 ปี เป็นชาว Swedish แต่มีต้นกำเนิดมาจากอินเดีย ผู้ป่วยรายนี้เข้ารับการรักษาที่ New Delhi เนื่องจากเกิดการติดเชื้อ *K. pneumoniae* ในระบบทางเดินปัสสาวะ และหลังจากนั้นเพียงไม่นานในปี 2010-2011 เอนไซม์ชนิดดังกล่าวได้มีการแพร่กระจายไปยังหลายๆส่วน ทั้งในประเทศอินเดียเอง และอีกหลายๆประเทศทั่วโลก เช่น ปากีสถาน บังคลาเทศ อังกฤษ เนเธอร์แลนด์ ออสเตรเลีย เกาหลี จีน และแคนาดา โดยมีเชื้อหลายๆสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ เช่น *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. organii*, *Providencia* spp.⁽⁷⁵⁻

5. Integron

Integron เป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมที่สามารถพบแทรกตัวอยู่ในโครงสร้างพันธุกรรมอื่นๆของเซลล์ เช่น โครโมโซม พลาสมิด หรือ transposon มีความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย โดยการรวม (integrate) เอา gene cassette ซึ่งบรรจุยีนควบคุมการดื้อยาเอาไว้เข้าด้วยกัน โครงสร้างของ integron ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ ยีนที่สร้างเอนไซม์ integrase (*intI* gene) และตำแหน่ง *attI* เอนไซม์ integrase จะทำหน้าที่ในการรวมตัวของ integron กับหน่วยยีนที่เรียกว่า gene cassette ที่ตำแหน่งจำเพาะคือ *attI* เมื่อ gene cassette เข้ามารวมตัวใน integron ตำแหน่งของ gene cassette จะอยู่ตรงกลางระหว่าง *attI* และ recombination site ที่ชื่อว่า *attC*⁽⁸¹⁾ (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 : แสดงโครงสร้างหลักของ integron และการเคลื่อนที่ของ gene cassette สู่อินทรีย์ของ integron⁽⁸²⁾

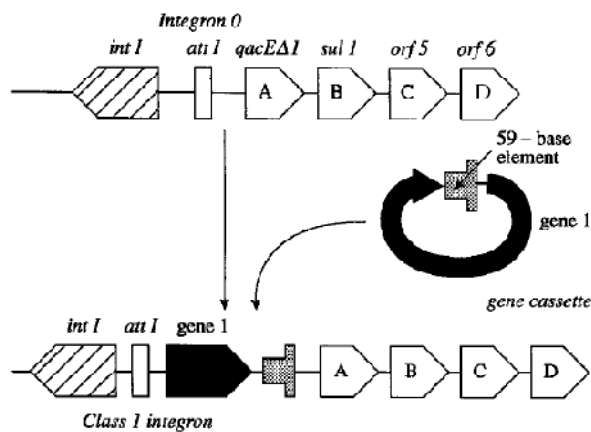
โครงสร้างของ gene cassette ส่วนใหญ่เป็นยีนขนาดเล็กที่ไม่มี promotor และไม่จำเป็นต้องบรรจุอยู่ใน integron แต่เมื่อใดที่ gene cassette ถูกบรรจุเข้าไปในโครงสร้างของ integron ยีนเหล่านั้นจะอาศัย promotor ของ integron ช่วยให้เกิดการแสดงออกของยีนนั้นๆ และที่บริเวณปลายด้าน 3' ของ gene cassette มีตำแหน่งจำเพาะที่ชื่อว่า *attC* หรือที่เรียกอีกอย่างว่า 59-base elements โครงสร้างของ 59-base elements ในยีนดื้อยาแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยมีความยาวระหว่าง 57-141 คู่เบส และเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะจำเพาะต่อยีนดื้อยาแต่ละชนิด^(83, 84) ในปัจจุบัน ยีนดื้อยาที่บรรจุอยู่ใน gene cassette และเป็นส่วนหนึ่งของ integron ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase มีมากกว่า 40 ชนิดที่แตกต่างกัน เช่น VEB-1 ในเชื้อ *K. pneumonia* จากประเทศเวียดนาม⁽⁸⁵⁾, GES-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* จากประเทศฝรั่งเศส⁽¹⁴⁹⁾, IMP-12 ในเชื้อ *P. putida* จากประเทศอิตาลี⁽⁸⁶⁾, VIM-2 ในเชื้อ *P. aeruginosa* จากประเทศสเปน⁽¹⁴⁹⁾ และ OXA-9 ในเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ในประเทศฝรั่งเศส⁽⁸⁷⁾ เป็นต้น

Integron ถูกแบ่งออกเป็น 3 class ใหญ่ๆ คือ class 1, class 2 และ class 3 integron แต่ละ class ของ integron จะมียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ integrase ที่แตกต่างกัน คือ มียีน *int1*, *int2* และ *int3* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ integrase ใน class 1, class 2 และ class 3 integron ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ class 1 และ class 2 integron พบว่ามีความเหมือนกันเพียงแค่อ้อยละ 45 และการศึกษาเกี่ยวกับ class 2 integron ก็ยังมีปริมาณน้อย เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับ class 2 integron ถูกอธิบายไว้อย่างไม่ค่อยชัดเจน^(83, 84) เช่น งานวิจัยของ Kim S และคณะ⁽⁸⁸⁾ พบว่าในเชื้อ *Salmonella enterica* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดจำนวน 4 ไอโซเลต มี *dfrA1-sat2-aadA1* gene cassette บรรจุอยู่ใน class 2 integron และงานวิจัยของ Xu Z และคณะ⁽⁸⁹⁾ ได้รายงาน class 2 integron ในเชื้อ *Enterococcus faecalis* เป็นครั้งแรกในประเทศจีน ตอนนี้เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาใด รายงานถึงยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในโครงสร้างของ class 2 integron เลย สำหรับ class 3 integron พบรายงานครั้งแรกในปี 1995 โดย Arakawa Y และคณะ⁽⁹⁰⁾ โดยพบในเชื้อ *S. marcescens* ซึ่งพบว่ายีน *bla_{IMP}* บรรจุอยู่ใน gene cassette ของโครงสร้าง integron ดังกล่าวด้วย นอกจากนี้ เมื่อ

เปรียบเทียบ class 3 integron กับ class 1 integron แล้ว พบว่ามีความเหมือนกันถึงร้อยละ 61 หลังจากนั้น ยังมีรายงานการศึกษาของ Shibata และคณะ⁽⁶⁷⁾ พบว่ามีเชื้อ *P. putida* 4 ตัวอย่างที่มีทั้งยีน *int11* และยีน *int13* และมียีน *bla*_{IMP-1} บรรจุอยู่ใน integron ดังกล่าวด้วย จะเห็นได้ว่า ชนิดของ integron ที่พบมากและสำคัญที่สุดในการแพร่กระจายของการดื้อยาต้านแบคทีเรีย คือ class 1 integron และการเคลื่อนที่ของ integron ชนิดนี้ก็เป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของการดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรีย^(83, 91-94)

6. Class 1 integron

โครงสร้างของ integron ชนิดนี้ ประกอบไปด้วย บริเวณ 5'-conserved segment ที่มียีน *intI1* ขนาด 1358 คู่เบส บรรจุอยู่ ยืนดังกล่าวทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ recombinase ที่จำเพาะ ซึ่งเป็นเอนไซม์ integrase ชนิดหนึ่ง และบริเวณ 3'-conserved segment ของ class 1 integron จะประกอบไปด้วยส่วนของ *qacEDelta1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการดื้อต่อสารประกอบ quaternary ammonium และเกี่ยวข้องกับสารฆ่าเชื้อโรคต่างๆ รวมถึง ยีน *sul1* ที่เป็นยีนควบคุมการดื้อต่อยากลุ่ม sulphonamide (ภาพที่ 2.10)^(83, 91-94)



ภาพที่ 2.10 : แสดงโครงสร้างของ class 1 integron⁽⁹²⁾

งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับ integron มีหลายงานวิจัยด้วยกัน ซึ่งงานวิจัยต่างๆ เหล่านี้ทำให้เห็นถึงการกระจายตัวของ integron เช่น งานวิจัยของ Sallen B และคณะ⁽⁹⁵⁾ ได้ศึกษาเชื้อจำนวน 49 ไอโซเลต ในประเทศฝรั่งเศส พบว่า เชื้อมี integron ถึงร้อยละ 59 และเชื้อที่มี integron เหล่านี้เป็นเชื้อที่มี species แตกต่างกัน 6 species ในกลุ่ม *Enterobacteriaceae*, งานวิจัยของ Schimitz FJ และคณะ⁽⁹⁶⁾ ได้ทำการศึกษาในเชื้อแกรมลบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในประเทศเยอรมนีในปี 1993, 1996, 1999 พบว่าเชื้อมี integron เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.7 ในปี 1993 เป็นร้อยละ 9.7 ในปี 1996 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 17.4 ในปี 1999 ในที่สุด จะเห็นได้ว่า เชื้อที่มี integron มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ

จากข้อมูลทั้งหมด จะเห็นได้ว่า กลไกการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ นับเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดเชื้อดื้อยา ทางคณะผู้วิจัยตระหนักถึงความสำคัญของปัญหาดังกล่าว และเล็งเห็นว่าในประเทศไทย มีข้อมูลการศึกษาเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในปริมาณน้อยมาก เช่นรายงานการวิจัยของ Boonkerd N และคณะ⁽²⁶⁾ ได้ทำการศึกษา ในตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* 2 สายพันธุ์ที่ได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลทางภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าทั้ง 2 ตัวอย่างมียีน *bla*_{IMP-1} และหนึ่งในสองตัวอย่าง พบว่ายีนดังกล่าว บรรจุอยู่ใน class 1 integron และเนื่องจาก เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ได้หลากหลายชนิด รวมทั้งยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ส่วนใหญ่ มักถูกบรรจุอยู่ในโครงสร้างของ integron ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเหล่านี้ไปในวงกว้าง ทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาความชุกของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งนี้จะทำการศึกษาทั้งในระดับฟีโนไทป์ และในระดับจีโนไทป์ รวมทั้งหาความสัมพันธ์ของ class 1 integron ด้วย

7. การตรวจสอบเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธีทางพีโนไทป์

เนื่องจากเอนไซม์ metallo- β -lactamase มีคุณสมบัติในการย่อยสลายปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams ได้ทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่ม carbapenems และการทำงานของเอนไซม์ จำเป็นจะต้องอาศัยธาตุที่เป็น divalent cation เช่น Zn^{2+} เป็น cofactor ในการเร่งปฏิกิริยา ทำให้สาร chelating agents ชนิดต่างๆ เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2-mercaptopropionic acid เป็นต้น สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เพราะสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ไปดึงธาตุที่เป็น divalent cation ออกจากเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ขาด cofactor ที่จะช่วยเร่งปฏิกิริยา และไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ในที่สุด⁽⁵¹⁾ ในปัจจุบัน จึงมีคณะผู้วิจัยหลายๆคณะ พยายามคิดค้นวิธีการตรวจสอบเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่สามารถนำมาใช้ใน ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ขึ้น โดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์นี้ใช้เป็นหลักการในการ ทดสอบ ขั้นตอนการตรวจสอบเอนไซม์ชนิดนี้ มีหลายวิธีด้วยกัน ดังนี้

7.1. Double Disc Synergy Test (DDST)

วิธีนี้ถูกคิดค้นขึ้นโดย Arakawa Y และคณะ⁽⁹⁷⁾ ทำการทดสอบโดยการเพาะเลี้ยง เชื้อที่ต้องการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase (10^6 CFU/ml) บน อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar จนทั่ว จากนั้นวางแผ่นยา ceftazidime 2 discs ลงไป โดยวางห่างกัน 4-5 เซนติเมตร จากนั้นวางแผ่นกระดาษที่มีสารยับยั้ง เอนไซม์ metallo- β -lactamase เช่น 2-mercaptopropionic acid, mercaptoethanol, $CuCl_2$, $FeCl_2$, EDTA ลงไปใกล้ๆกับแผ่น ยา ceftazidime แผ่นใดแผ่นหนึ่ง โดยห่างกัน 1.0-2.5 เซนติเมตร แล้วจึงนำไปอบที่ 37 องศา เซลเซียส, ข้ามคืน หากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase จะเห็น บริเวณเสริมฤทธิ์เกิดขึ้น ระหว่างแผ่นยา ceftazidime และแผ่นกระดาษที่มีสาร ยับยั้งเอนไซม์ เนื่องจาก เมื่อมีสารยับยั้ง เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้เชื้อ ไรต์่อยามากขึ้น และเกิดบริเวณเสริมฤทธิ์ขึ้น

7.2. Combined Disc Test (CDT)

Yong D และคณะ⁽⁹⁸⁾ เป็นผู้คิดค้นวิธีนี้ขึ้น ทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar จนทั่ว จากนั้นวางแผ่นยา imipenem (10 ไมโครกรัม) จำนวน 2 แผ่น ลงไปบนจานที่เพาะเชื้อไว้ แล้วหยดสารยับยั้งเอนไซม์ เช่น EDTA ในปริมาณที่เหมาะสมลงไปบนแผ่นยา imipenem แผ่นใดแผ่นหนึ่ง นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกต inhibition zone ที่เกิดจากยา imipenem และ imipenem ร่วมกับสารยับยั้งเอนไซม์ แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน

7.3. Modified Hodge Test

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก วิธีการตรวจหาเอนไซม์ Penicillinase ในเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ที่ Hodge W และคณะ⁽¹³⁰⁾ คิดค้นขึ้น วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และมีราคาไม่แพง ทำได้โดยการเพาะเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็น indicator strain ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar จนทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยา imipenem ตรงไปตรงกลาง แล้วใช้ loop ตักเชื้อที่ต้องการทดสอบขีดจากขอบแผ่นยา imipenem ไปยังขอบของจานเพาะเชื้อ โดยปกติแล้วเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 จะไม่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase เมื่อขีดเชื้อที่ทำการทดสอบลงไป หากเชื้อที่ต้องการทดสอบไม่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ออกมาทำลายยา imipenem ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์ จะทำให้ *E. coli* ATCC 25922 (indicator strain) ไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มียา imipenem แต่ถ้าแบคทีเรียที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase มาทำลายยา imipenem ได้ ก็จะส่งผลให้ *E. coli* ATCC 25922 (indicator strain) สามารถขึ้นได้ในบริเวณที่มียาดังกล่าว⁽¹²⁹⁾ และเมื่อไม่นานมานี้ Lee K และคณะ⁽⁹⁹⁾ ได้พัฒนาวิธี Modified Hodge Test ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น โดยการทดสอบบน MacConkey agar แทนที่จะทดสอบบน Mueller Hinton agar เนื่องจาก เกลือน้ำดี (bile salt) ที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar จะช่วยกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อได้

7.4. MBL E-test

วิธีนี้อาศัยหลักการคล้ายกับวิธี combined disc test เพียงแต่รวบรวมปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมาไว้บนแผ่นทดสอบ MBL E-test อันประกอบไปด้วย 2 ด้าน ด้านหนึ่งมียา imipenem (4-256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เรียกด้านนี้ว่า IP ส่วนอีกด้านหนึ่ง มียา imipenem (1-64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) รวมกับ EDTA ซึ่งเป็น chelating agent เรียกด้านนี้ว่า IPI เมื่อเพาะเชื้อที่ทดสอบการสร้างเอนไซม์ลงบน Muller Hinton agar จนทั่ว จากนั้นวางแผ่นทดสอบ MBL E-test ลงไปตรงกลาง นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วอ่านผล inhibition zone ที่เกิดขึ้น หากนำค่า MIC ของด้าน IP มาร่วมด้วยค่า MIC ของด้าน IPI ถ้าผลที่ได้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase เนื่องจาก EDTA จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่งผลให้ค่า MIC ของด้านที่มี imipenem รวมกับ EDTA มีค่าต่ำกว่า MIC ของด้านที่มี imipenem เพียงอย่างเดียว⁽¹⁰⁰⁾

จะเห็นได้ว่า วิธีทดสอบเอนไซม์ metallo- β -lactamase แต่ละวิธีข้างต้น มีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน ในวิธี double disc synergy test และ combined disc test ถึงแม้ว่าทั้งสองวิธีนี้จะมี ความจำเพาะค่อนข้างสูง แต่การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีทั้งสองนี้ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์, ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารยับยั้งเอนไซม์, ระยะห่างที่เหมาะสมระหว่างแผ่นยา หรือระหว่างแผ่นยากับแผ่นกระดาษที่มีสารยับยั้งเอนไซม์ เป็นต้น^(72, 101) ยกตัวอย่าง การทดสอบด้วยวิธี double disc synergy test ของ Arakawa Y และคณะ⁽⁹⁷⁾ แนะนำให้ใช้ 2-mercaptopropionic acid เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ในขณะที่ Lee K และคณะ⁽¹²⁹⁾ แนะนำให้ใช้ EDTA สำหรับวิธี MBL E-test ถึงแม้จะเป็นวิธีที่มีความไว (ร้อยละ 94) และความจำเพาะ (ร้อยละ 95) สูง เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ⁽¹⁰⁰⁾ แต่วิธีนี้ก็มีความง่ายในการทดสอบสูงมาก และอาจเกิดผลลบปลอม (false negative) ขึ้นได้ กรณีที่เชื้อมีค่า MIC ต่อยา imipenem น้อยกว่า 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽¹⁰²⁾ ส่วนวิธี Modified Hodge Test นั้น ถึงแม้จะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ แต่ก็เป็วิธีทดสอบได้ง่าย สะดวก มีราคาถูก มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจคัดกรองเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล⁽¹²⁹⁾

8. การตรวจสอบเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธีทางจีโนม

เนื่องจากในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase วิธีใดที่สถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) ถือให้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการทดสอบเลย จึงมีหลายการศึกษา พยายามปรับปรุงวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้เพื่อตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ เช่น การตรวจสอบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ เช่น ยีน *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM} โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ และ DNA probe ซึ่งทั้งสองวิธีต่างก็เป็นวิธีที่มีความไวสูง อย่างไรก็ตาม ทั้งสองวิธีก็ไม่สามารถระบุไปถึง variant ของยีนได้ จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการ sequencing ร่วมด้วย⁽⁵⁹⁾ และในปี 2007 Mendes RE และคณะ⁽¹⁰³⁾ ได้พัฒนาวิธี multiplex real time PCR มาใช้ในการตรวจสอบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase พบว่า วิธีนี้สามารถตรวจสอบได้รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อทุกไอโซเลต ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ได้

เนื่องจากยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ งานวิจัยครั้งนี้จึงทำการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์เบื้องต้นด้วยวิธี MBL E-test ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและจำเพาะสูง แต่ก็มีราคาแพง เปรียบเทียบกับวิธี Modified Hodge Test ซึ่งเป็นวิธีทดสอบได้ง่าย สะดวก มีราคาถูกลง และเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ทั้งนี้ จะทำการตรวจยืนยันยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase (ยีน *bla*_{IMP} และ ยีน *bla*_{VIM}) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสควบคู่ไปด้วย

9. ระบาดวิทยาของจุลชีพที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase

การสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase มีการพบแพร่กระจายเฉพาะในเชื้อ *P. aeruginosa* และ *Acinetobacter* spp. ตั้งแต่อดีต แต่เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานเกี่ยวกับการแพร่ระบาดของเชื้อ กลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase อย่างรวดเร็ว จุดเริ่มต้นของการแพร่กระจายของจุลชีพกลุ่มนี้มาจาก เอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิดแรกที่มีรายงาน คือ ชนิด IMP-1 ซึ่งรายงานในประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี 1990 จากเชื้อ *P. aeruginosa* หลังจากนั้นในช่วงกลางทศวรรษที่ 90 ก็พบเอนไซม์ชนิดนี้ ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* จำนวนมาก⁽¹⁰⁴⁾ และถึงแม้ว่า จะมีการค้นพบเอนไซม์ชนิด IMP ใหม่ๆ เพิ่มขึ้น แต่การระบาดจากเอนไซม์ชนิดอื่นๆ นั้นจะมีเป็นบริเวณเฉพาะ และมีการระบาดอยู่บางช่วงเวลาเท่านั้น (ดังภาพที่ 2.11) แตกต่างจากเอนไซม์ IMP-1 ที่ยังคงเป็นเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่พบเป็นลักษณะเด่นในประเทศญี่ปุ่น ถึงแม้เวลาจะผ่านไป 20 ปีแล้วก็ตาม⁽¹⁰⁵⁾



ภาพที่ 2.11 : แสดงการแพร่กระจายของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิดต่างๆ

สำหรับเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิด IMP-4 เป็นชนิดที่พบมากในประเทศจีน แต่ไม่มีข้อมูลจากองค์การเฝ้าระวังเชื้อระดับชาติ ทำให้เป็นการยากที่จะทราบถึงความสำคัญของเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิดนี้^(106, 107) มีข้อมูลการศึกษาพบว่า เอนไซม์ชนิด IMP-4 ที่ค้นพบในเชื้อหลายชนิด เช่น *Enterobacteriaceae* และ *P. aeruginosa* จากเมือง Melbourne และ Sydney ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งน่าจะมีการถ่ายทอดของเอนไซม์มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้⁽¹⁰⁸⁾ อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ Zhao WH และคณะ⁽¹⁰⁹⁾ พบว่า นอกจากเอนไซม์ชนิด IMP-4 แล้ว ในประเทศจีนก็ยังพบเอนไซม์ metallo- β -lactamase อีกหลายๆชนิด ในเชื้อ *P. aeruginosa* เช่น ชนิด IMP-1, IMP-7, IMP-10 และ VIM-2

Toleman MA และคณะ⁽¹¹⁰⁾ ได้กล่าวไว้ถึงยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิด IMP พบอยู่บนโครงสร้างของ class 1 และ class 3 integron แต่ก็ไม่สามารถสรุปได้ว่าการแพร่กระจายของเอนไซม์ชนิด IMP ที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจาก integron เนื่องจากสารพันธุกรรมอื่นๆ เช่น transposon ก็มีบทบาทต่อการกระจายตัวของเอนไซม์ชนิดนี้ได้เช่นกัน

เอนไซม์ metallo- β -lactamase อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ ชนิด VIM และในปัจจุบันเอนไซม์ชนิด VIM ก็พบมากถึง 25 variants แต่ชนิดที่พบมากที่สุด คือ ชนิด VIM-2 โดยยีนชนิด VIM ทุก variants ต่างก็มีความสัมพันธ์กับ class 1 integron ซึ่ง class 1 integron นี้ อาจจะพบอยู่บนโครโมโซม หรือบนพลาสมิดของเชื้อ จึงเป็นไปได้ว่าการแพร่กระจายไปทั่วโลกของเอนไซม์ชนิดนี้ มีความเกี่ยวข้องกับ class 1 integron อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดที่สามารถสรุปข้อสันนิษฐานนี้ได้^(111, 112) เอนไซม์ชนิดนี้มีการแพร่กระจายไปใน 5 ทวีปทั่วโลก⁽⁵⁹⁾ ส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ชนิดนี้ จะพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อที่เป็นต้นเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลของผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ (Ventilator Associated Pneumonia: VAP), ในผู้ป่วยที่เป็นโรค cystic fibrosis และในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเป็นเวลานาน และเชื้อเหล่านี้ก็มีการแพร่กระจายระหว่างสายพันธุ์ (clonal spread)⁽¹¹³⁾ นอกจากนี้ มีการรายงานจากประเทศฝรั่งเศส ในปี 2002 เกี่ยวกับความรุนแรงของ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบยีน *bla*_{VIM-2} ในผู้ป่วยโรค cystic fibrosis ทำให้ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อได้อย่างดี⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา พบเอนไซม์ metallo- β -lactamase จากเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เพิ่มมากขึ้น ทั้งที่ในอดีดยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase เช่น IMP, VIM, GIM-1 และ SPM-1 ต่างก็พบในเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งสิ้น มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่พบในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae*⁽⁵⁹⁾ จากอุบัติการณ์แถบเมดิเตอร์เรเนียน (ประเทศ กรีซและตุรกี) และ

ทวีปอินเดีย รวมถึงปากีสถาน ที่มีแนวโน้มการแพร่กระจายของเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* จะเป็นที่น่าวิตกกังวลมากที่สุด โดยเฉพาะการพบเอนไซม์ชนิด VIM-1 แพร่กระจายในเชื้อ *Enterobacteriaceae* จากข้อมูลของ Cagnacci S และคณะ⁽¹¹⁷⁾ พบว่า มีการถ่ายทอดยีน *bla*_{VIM-1} ผ่านโครงสร้างของพลาสมิด ในเชื้อ *K. pneumoniae* ทำให้เกิดการการระบาดขึ้นในประเทศอิตาลี และในประเทศกรีซและประเทศตุรกี ก็มีการแพร่กระจายของเอนไซม์ดังกล่าวในเชื้อ *K. pneumoniae*^(118, 119), *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* และ *Providencia stuartii* เช่นเดียวกัน⁽¹²⁰⁻¹²²⁾ นอกจากนี้ ยังมีรายงานของ Miriagou V และคณะ⁽¹²³⁾ พบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีนชนิด VIM-1 เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา colistin และ tigecycline ด้วย ทำให้เชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น pan-drug resistant

จากข้อมูลทางระบาดวิทยาของจุลชีพที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่า การแพร่กระจายของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในปัจจุบันไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะในเชื้อ *P. aeruginosa* หรือ *Acinetobacter* spp. เหมือนเช่นอดีต แต่มีการแพร่กระจายไปยังเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เพิ่มมากขึ้น และทวีความรุนแรงในการดื้อยาหลายชนิดมากขึ้นด้วย ข้อมูลทางระบาดวิทยาจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญ ทำให้ทราบข้อมูลการแพร่กระจายของเชื้อ อันจะนำไปสู่การควบคุมการแพร่กระจายของจุลชีพที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ไม่ให้แพร่กระจายไปในวงกว้าง และเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการลดอัตราการดื้อยาของเชื้อจุลชีพ

10. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

มีเทคนิคหลายเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ เพื่อศึกษาทางระบาดวิทยา หาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย เช่น เทคนิค bacteriophage typing, serotyping, plasmid fingerprinting, ribotyping เป็นต้น แต่เทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เทคนิค pulsed field gel electrophoresis ทำได้โดยการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงใน agarose gel เรียกว่า agarose plug ก่อนที่จะทำให้เซลล์แตก ย่อยโปรตีนออกให้เหลือเฉพาะ chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ จากนั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัด chromosomal DNA ของแบคทีเรีย แล้วจึงใช้ electrophoresis ในการแยกโมเลกุลของ chromosomal DNA⁽¹²⁴⁾ มีหลายการศึกษานำเทคนิคนี้มาใช้ในการหาความสัมพันธ์ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่ก่อให้เกิดการระบาดภายในโรงพยาบาล เช่น งานวิจัยของ Martins AF และคณะ⁽¹²⁵⁾ ได้ศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ชนิด IMP และชนิด SPM จากเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าเชื้อ 18 ไอโซเลต มียีนชนิดชนิด SPM และจำนวน 5 ไอโซเลต มียีนชนิด IMP เมื่อใช้เทคนิค pulsed field gel electrophoresis หาความสัมพันธ์ของเชื้อที่มียีนดังกล่าวพบว่า เชื้อที่มียีน IMP และมียีน SPM เป็นเชื้อที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณากลุ่มเชื้อที่มียีนชนิดเดียวกัน พบว่า มีสายพันธุ์ต้นกำเนิดที่เหมือนกัน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัย มีดังนี้

เชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล ขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือนเมษายน ปีพ.ศ. 2552 โดยเชื้อที่รวบรวม มาจากสิ่งส่งตรวจ 4 ประเภท ได้แก่ เลือด, ปัสสาวะ, เสมหะ และหนอง

เชื้อควบคุมบวก (positive control) ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ เชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1

เชื้อควบคุมลบ (negative control) ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น G-560E	Scientific Industries	สหรัฐอเมริกา
2. เครื่อง Refrigerated Centrifuge รุ่น Universal 320R	Hettich	เยอรมนี
3. ตู้อบ (Forma Orbital Shaker)	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Evolution 300	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
5. ตู้อบ (Incubator) รุ่น INE 300	Memmert	เยอรมนี
6. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanyo Electric	ญี่ปุ่น
7. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
8. เครื่องวัดความขุ่น รุ่น Densimat	BioMérieux	ฝรั่งเศส
9. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น Purifier Logic 34408 Series	Labconco	สหรัฐอเมริกา

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
10. ชุดถ่ายภาพเจล (Molecular Imager Chemidoc XRS)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
11. ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ electrophoresis (Mupid-exu Electrophoresis System)	Advance	ญี่ปุ่น
12. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น CP2245	Sartorius	เยอรมนี
13. ชุดอุปกรณ์ pulsed field gel electrophoresis (CHEF Mapper XA Chiller System)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น MJ Mini PTC-1148	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) NanoDrop รุ่น 1000	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
16. เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น Hiclave HVA-85	Hirayama	ญี่ปุ่น
17. เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-315	Tomy Tech	สหรัฐอเมริกา
อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes)	Bibby Sterilin	อังกฤษ
2. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร) และ PCR tube	Axygen	สหรัฐอเมริกา
3. Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร	Continental Lab Products	สหรัฐอเมริกา
4. Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร	Continental Lab Products	สหรัฐอเมริกา
5. Pipette tips (ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร)	Axygen	สหรัฐอเมริกา
6. Autopipette (ขนาด 0.1-2, 2-20 และ 20-200 ไมโครลิตร)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
7. Autopipette (ขนาด 0.2-2, 1-10, 20-100 และ 1000 ไมโครลิตร)	Gilson	ฝรั่งเศส
8. Pre-sterilized Serological pipette (ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร)	Jet Bio-Filtration Products	แคนาดา
9. Disposable Cuvettes	Plastibrand	เยอรมนี
10. ไม้พันสำลี	United Medical Instrument	ไทย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar	OXOID	อังกฤษ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth	OXOID	อังกฤษ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soya Agar	OXOID	อังกฤษ
4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypticase Soya Broth	OXOID	อังกฤษ
5. Tryptone	Merck	เยอรมนี
6. Tryptose	Merck	เยอรมนี
7. Agar Bacteriological (Agar No.1)	OXOID	อังกฤษ
8. 2,3,5 – Triphenyltetrazolium chloride	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
9. Yeast extract	OXOID	อังกฤษ
10. แผ่นยา Amikacin (AK) 30 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
11. แผ่นยา Ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
12. แผ่นยา Ciprofloxacin (CFX) 5 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
13. แผ่นยา Colistin (CL) 10 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
14. แผ่นยา Cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
15. แผ่นยา Gentamicin (GM) 10 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
16. แผ่นยา Imipenem (IPM) 10 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
17. แผ่นยา Levofloxacin (LVX) 5 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
18. แผ่นยา Meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
19. แผ่นยา Cefoperazone/sulbactam (SCFP) 105 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
20. แผ่นยา Piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 ไมโครกรัม	OXOID	อังกฤษ
21. แผ่นทดสอบ imipenem Etest	AB bioMérieux	สวีเดน
22. แผ่นทดสอบ MBL E-test	AB bioMérieux	สวีเดน
23. Ethidium bromide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
24. Absolute ethanol	Merck	เยอรมนี
25. Sodium chloride	Ajax Finechem	นิวซีแลนด์
26. Sodium acetate	Merck	เยอรมนี
27. Trizma base, minimum 99.9% titration	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
28. Boric acid, for electrophoresis	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
29. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, 99+%	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
30. N-Lauroylsarcosine sodium salt, for molecular biology, >=94%	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
31. Phenol	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
32. Chloroform	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
33. Isoamylalcohol	Ajax Finechem	นิวซีแลนด์
34. Certified Low Melt Agarose	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
35. Certified Megabase Agarose	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
36. Certified Molecular Biology Agarose	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
37. ชุดน้ำยา Taq DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas	แคนาดา
38. เอนไซม์ BcuI (SpeI)	Fermentas	แคนาดา
39. Proteinase K (Fungal)	Invitrogen	เยอรมนี
40. Lysozyme, from Chicken Egg White	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
41. dNTP set, molecular biology grade	Fermentas	แคนาดา
42. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas	แคนาดา
43. GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas	แคนาดา
44. Promega-Marker Lambda Ladders	Promega	สหรัฐอเมริกา
45. CHEF DNA Size Standards Lambda Ladder	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา

3. วิธีการวิจัย

3.1. ส่วนที่ 1 การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อ *P. aeruginosa* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน

3.1.1. เก็บรวบรวมเชื้อ *P. aeruginosa* จากผู้ป่วย

เก็บรวบรวมเชื้อ *P. aeruginosa* จากผู้ป่วยจากโรงพยาบาล ขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือน เมษายน ปีพ.ศ. 2552 โดยเชื้อที่รวบรวม มาจากสิ่งส่งตรวจ 4 ประเภท ได้แก่ เลือด, ปัสสาวะ, เสมหะ และหนอง

3.1.2. คัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ และเก็บเชื้อแต่ละสายพันธุ์ไว้

นำเชื้อที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบน Mueller Hinton agar ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวในแต่ละสายพันธุ์ จากนั้น ลงเชื้อใน motile นำไปอบ ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อที่ได้ไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะทำการทดลอง นำเชื้อที่เก็บไว้ใน motile มา subculture ลงบน Mueller Hinton agar อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2. ส่วนที่ 2 การศึกษาแบบแผนความไวและติดต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

P. aeruginosa ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.2.1. ทดสอบความไวและติดต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing)

ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion

การทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยการแพร่ของยา (diffusion) จากแผ่นกระดาษกรองชุบยาต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibiotic disc) สู่อาหารเพาะเชื้อ โดยจะทำการเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้สม่ำเสมอทั่วผิวน้ำ จากนั้นวางแผ่นกระดาษกรองที่ชุบยาต้านเชื้อไว้ลงบนผิวน้ำของอาหารวุ้นเพื่อให้ยาแพร่กระจายออกไปสู่เนื้อวุ้นแม่เป็น รัศมีโดยรอบบริเวณอาหารวุ้นที่อยู่รอบแผ่นกระดาษกรองจะมีความเข้มข้นของยาสูง และลดลงตามลำดับในบริเวณที่อยู่ห่างออกไป เมื่อทำการอบเชื้อ จะเห็นการเจริญของเชื้อบนผิวของ อาหารวุ้น แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยปริมาณของสารต้านจุลชีพที่บริเวณใด ก็จะไม่มีการเจริญขึ้นที่บริเวณนั้น เกิดเป็นวงว่าง เรียกบริเวณนั้นว่า zone of inhibition⁽²⁹⁾

วิธีการวิจัย

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เลือกลโคไลนีของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบประมาณ 4-5 โคไลนี มาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปรับให้ได้ 0.5 Mc Farland Standard
3. ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเจือจางให้ได้เท่ากับ 0.5 Mc Farland Standard เรียบร้อยแล้ว ปิดให้แห้งพอหมาดๆกับผนังหลอดทดลอง แล้วนำไปป้ายลงบน Mueller Hinton agar ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตรและผึ่งผิวน้ำให้แห้งแล้ว ทำการลง

เชื้อโดยลากผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อ แล้วป้ายตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ๆ ให้ทั่วผิวหน้า จากนั้นหมุนจานเพาะเชื้อ 60 องศาแล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. รอจนผิวหน้าแห้ง โดยไม่เกิน 15 นาที จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปราศจากเชื้อ หยิบแผ่นยามาวางบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการป้ายเชื้อไว้ทั่วแล้ว ใช้ปลายปากคีบกดเบาๆ เพื่อให้แนบกับผิววุ้น โดยยาที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ ciprofloxacin (CFX) 5 ไมโครกรัม, levofloxacin (LVX) 5 ไมโครกรัม, ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม, amikacin (AK) 30 ไมโครกรัม, gentamicin (GM) 10 ไมโครกรัม, cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม, imipenem (IPM) 10 ไมโครกรัม, meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม, cefoperazone/sulbactam (SCFP) 75/30 ไมโครกรัม และ piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 ไมโครกรัม, colistin (CL) 10 ไมโครกรัม
5. นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
6. วัด inhibition zone ที่ได้ จากนั้นนำไปเทียบกับค่ามาตรฐานจากสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI)⁽¹²⁸⁾ และเนื่องจากไม่มีค่ามาตรฐานของ CLSI สำหรับยา Cefoperazone/sulbactam จึงเทียบผลโดยอ้างอิงจาก⁽¹²⁶⁾ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และแปลผลการทดลอง

ตารางที่ 3.1 : แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion⁽¹²⁸⁾

Antimicrobial Agent	Disk Content (ไมโครกรัม)	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm		
		S	I	R
Ciprofloxacin	5	≥ 21	16-20	≤ 15
Levofloxacin	5	≥ 17	14-16	≤ 13
Ceftazidime	30	≥ 18	15-17	≤ 14
Amikacin	30	≥ 17	15-16	≤ 14
Gentamicin	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Cefepime	30	≥ 18	15-17	≤ 14
Imipenem	10	≥ 16	14-15	≤ 13
Meropenem	10	≥ 16	14-15	≤ 13
Piperacillin/tazobactam	100/10	≥ 18	-	≤ 17
Cefoperazone/sulbactam ⁽¹²⁶⁾	75/30	≥ 20	15-19	≤ 14
Colistin	10	≥ 11	-	≤ 10

3.2.2. หาความเข้มข้นต่ำที่สุด (Minimum inhibitory concentration: MIC) ของยา imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ ด้วยวิธี E-test

E-test เป็นการทดสอบความไวของจุลชีพ โดยใช้หลักการแบบ gradient method กล่าวคือ ให้สารต้านจุลชีพอยู่บนแผ่นพลาสติก ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพในแต่ละตำแหน่งจะลดลงตามระยะห่างจากจุดเริ่มต้น เมื่อทำการทดสอบโดยป้ายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้สม่ำเสมอทั่วผิวหน้า แล้ววางแผ่น E-test ลงไป นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จะเกิด inhibition zone เป็นวงรี (ellipse) อ่านค่า MIC ได้จากบริเวณรอยต่อที่มีและไม่มีเชื้อขึ้น⁽¹²⁷⁾

วิธีการวิจัย

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบประมาณ 4-5 โคโลนี มาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปรับให้ได้ 0.5 Mc Farland Standard
3. ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเจือจางให้ได้เท่ากับ 0.5 Mc Farland Standard เรียบร้อยแล้ว ปิดให้แห้งพอหมาดๆกับผนังหลอดทดลอง แล้วนำไปป้ายลงบน Mueller Hinton agar ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตรและผึ่งผิวหน้าให้แห้งแล้ว ทำการลงเชื้อโดยลากผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อ แล้วป้ายตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ๆ ทั่วผิวหน้า จากนั้นหมุนจานเพาะเชื้อ 60 องศา แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. รอจนผิวหน้าแห้ง โดยไม่เกิน 15 นาที จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปราศจากเชื้อ หยิบแผ่นทดสอบ E-test มาวางบนผิวอาหารเลี้ยง

เชื้อที่ทำการป้ายเชื้อไว้ทั่วแล้ว ใช้ปลายปากคีบกดเบาๆ เพื่อให้แนบกับผิววุ้น

5. นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่านค่า MIC ตรงจุดที่เป็นบริเวณรอยต่อที่มีและไม่มีเชื้อขึ้น นำไปเทียบกับค่ามาตรฐานจากสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และแปลผลการทดลอง

ตารางที่ 3.2 : แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผล MIC ของยา imipenem ต่อเชื้อ

P. aeruginosa⁽¹²⁸⁾

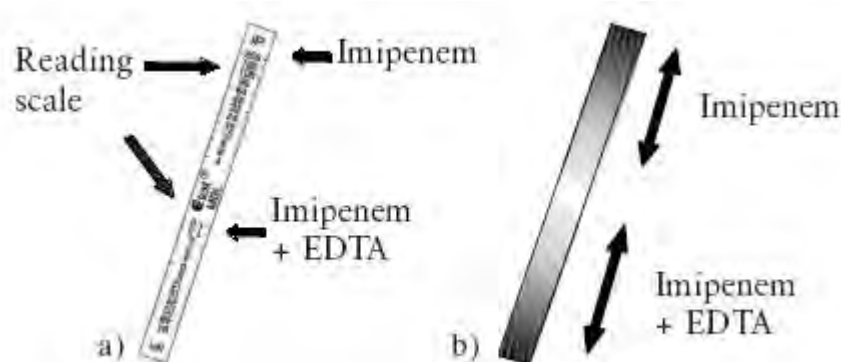
Antimicrobial Agent	MIC interpretive Standard ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	I	R
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16

3.3. ส่วนที่ 3 ศึกษาทางพีโนไทป์ของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ *P. aeruginosa* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.3.1. ทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วย MBL E-test

MBL E-test เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ โดยใช้หลักการที่เอนไซม์ metallo- β -lactamase จะถูกยับยั้งด้วยสาร chelating agents เช่น EDTA เป็นต้น ซึ่ง EDTA จะตกตะกอนและดึง zinc ออกจากเอนไซม์ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ จำเป็นจะต้องมี zinc เป็น cofactor เมื่อ EDTA ดึง zinc ออก จะส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ทำให้ inhibition zone ของเชื้อที่นำมาทดสอบที่สร้าง metallo- β -lactamase มีวงใสที่กว้างขึ้น⁽¹⁰⁰⁾

ลักษณะของ MBL E-test strip (ภาพที่ 3.1) จะประกอบไปด้วย 2 ด้าน คือ ด้าน IP ซึ่งเป็นด้านที่มียา imipenem (4-256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนอีกด้านหนึ่ง คือ ด้าน IPI ซึ่งจะมียา imipenem (1-64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ร่วมกับ EDTA ซึ่งเป็น chelating agent⁽¹⁰⁰⁾



ภาพที่ 3.1 : ลักษณะของ MBL E-test strip (<http://www.abbiodisk.com/>)

วิธีการวิจัย

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เลือกลำโพงของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบประมาณ 4-5 โคโลนี มาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปรับให้ได้ 0.5 Mc Farland Standard
3. ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเจือจางให้ได้เท่ากับ 0.5 Mc Farland Standard เรียบร้อยแล้ว บิดให้แห้งพอหมาดๆกับผนังหลอดทดลอง แล้วนำไปป้ายลงบน Mueller Hinton agar ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตรและผึ่งผิวหน้าให้แห้งแล้ว โดยลากผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อ แล้วป้ายตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ทุกๆ 1 นิ้วทั่วผิวหน้า จากนั้นหมุนจานเพาะเชื้อ 60 องศา แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. รอจนผิวหน้าแห้ง โดยไม่เกิน 15 นาที จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปราศจากเชื้อ หยิบแผ่นทดสอบ MBL E-test มาวางบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการป้ายเชื้อไว้ทั่วแล้ว ใช้ปลายปากคีบกดเบาๆเพื่อให้แนบกับผิววุ้น
5. นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
6. อ่านค่า MIC ด้าน IP (imipenem) และด้าน IPI (imipenem+EDTA) จากนั้นคำนวณหาค่า MIC ratio โดยคำนวณได้จากสูตรคำนวณนี้

$$\text{MIC ratio} = \text{MIC ของด้าน IP} / \text{MIC ของด้าน IPI}$$

หากค่า MIC ratio มีค่ามากกว่า หรือเท่ากับ 8 แปลผลว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase

3.3.2. ทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วย วิธี Modified Hodge Test (โดยดัดแปลงวิธีมาจาก Lee และคณะ⁽¹²⁹⁾)

เมื่อทำการเพาะเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งในการทดลองนี้ กำหนดให้เป็น indicator strain คือเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamases ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่มียา imipenem 10 ไมโครกรัม ถ้าแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบไม่สามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ออกมาทำลายยา imipenem ซึ่งเป็นยับยั้งของเอนไซม์ เป็นผลให้ *E. coli* ATCC 25922 (indicator strain) ไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มียา imipenem แต่ถ้าแบคทีเรียที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ได้ จะมีการทำลายยา imipenem จะทำให้ *E. coli* ATCC 25922 (indicator strain) สามารถเจริญขึ้นได้ในบริเวณที่มียาดังกล่าว เป็นที่สังเกตว่า การเจริญของแบคทีเรียในลักษณะนี้ จะเกิดเป็น inhibition zone ที่มีรูปร่างคล้ายใบไม้สามแฉก จึงเรียกว่า clover leaf^(129, 130)

วิธีการวิจัย

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อที่ต้องการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase บน Mueller Hinton agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ประมาณ 4-5 โคโลนี มาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปรับให้ได้ 0.5 Mc Farland Standard
3. ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 ที่ทำการเจือจางเรียบร้อยแล้ว บิดให้แห้งพอหมาดๆกับผนังหลอด

- ทดลอง แล้วนำไปป้ายลงบน Mueller Hinton agar ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตรและฝั่งผิวหนังให้แห้งแล้ว โดยลากผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อ แล้วป้ายตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ๆ ให้ทั่วผิวหนัง จากนั้นหมุนจานเพาะเชื้อ 60 องศา แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหนังของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. รวบรวมผิวหนังแห้ง โดยไม่เกิน 15 นาที จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปราศจากเชื้อ หยิบแผ่นยา imipenem 10 ไมโครกรัม มาวางตรงกลางบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการป้ายเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ไว้ทั่วแล้ว ใช้ปลายปากคีบกดเบาๆ เพื่อให้แนบกับผิววุ้น
 5. ใช้ loop ตักโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ประมาณ 3-4 โคโลนี จากนั้น ขีดเชื้อบน loop จากขอบของแผ่นยา imipenem 10 ไมโครกรัม ไปยังขอบของจานเพาะเชื้อ
 6. นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 7. อ่าน และบันทึกผลการทดลอง

3.4. ส่วนที่ 4 ศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ

P. aeruginosa ใน ระดับจีโนมไทป์ และหาความสัมพันธ์ของ class 1 Integron โดยการหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase และ class 1 Integron ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.4.1. สกัด Chromosomal DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa*

Chromosomal DNA ที่สกัดได้นี้จะนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ในการศึกษาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) เพื่อหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน *bla_{IMP}* และ ยีน *bla_{VIM}*) และ class 1 Integron (ยีน *Int1*, ยีน *qacEDelta1* และยีน *sul1*)

วิธีการวิจัย ⁽¹³¹⁾

1. เลี้ยงเชื้อที่ต้องการสกัด Chromosomal DNA ใน LB broth 3 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
2. ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อ (Cell suspension) ที่เลี้ยงไว้ ประมาณ 1,500 ไมโครลิตร ใส่ใน microtube บั่นเซลล์ให้ตกตะกอนที่ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. ทำการปั่นล้างเซลล์ (resuspend) โดยใช้ TNE buffer 1 มิลลิลิตร โดยการดูดขึ้น-ลงเบาๆ จนเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ และจึงปั่นตกตะกอนเซลล์อีกครั้งที่ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. เติม TNE buffer ปริมาตร 135 ไมโครลิตร ลงในตะกอนเซลล์ที่ได้ ผสมให้เข้ากัน และเติม TNE buffer ที่ผสมด้วย 2% Triton X-100 ลงไปอีกในปริมาตรที่เท่ากัน (135 ไมโครลิตร)
5. นำเซลล์ในสารละลายจากข้อ 4 มาย่อยผนังเซลล์ด้วยการเติม lysozyme ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30

- ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกับลดลดขึ้น-ลงหลายๆ ครั้ง อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการย่อยผนังเซลล์มาทำลายโปรตีนที่ปนเปื้อนด้วยการเติมเอนไซม์ proteinase K ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกับลดลดขึ้น-ลงหลายๆ ครั้ง อบไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 7. ทำการสกัดโปรตีนที่ปนเปื้อนด้วยการเติม Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) จำนวน 800 ไมโครลิตรลงไป และผสมให้เข้ากันอย่างแรง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกชั้นที่ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อปั่นเสร็จให้ดูสัดส่วนบน ซึ่งมี Chromosomal DNA อยู่ใส่ใน microtube หลอดใหม่ แล้วทำขั้นตอนเดิมอีกครั้ง
 8. ตระกอน Chromosomal DNA ที่ได้ จำนวนมาตกตะกอนโดยเติม 3M Sodium acetate และ Absolute Ethanol อัตราส่วน 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
 9. ปั่นแยกตะกอน Chromosomal DNA ที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างตะกอน DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย 70% ethanol
 10. ดูด Ethanol ออกให้หมด โดยใช้ปิเปตต์ หลังจากนั้น ปล่อยให้ DNA แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที แล้วจึงเติม 1X TE solution ลงไป 200 ไมโครลิตร
 11. วัดความเข้มข้นของ Chromosomal DNA ที่ได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นเจือจาง Chromosomal DNA ด้วย 1X TE solution ให้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 30-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.4.2. ตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน bla_{IMP} และ ยีน bla_{VIM}) ในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) และตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับโมเลกุล โดยตรวจสอบยีน bla_{IMP} และ bla_{VIM} ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ทั้งนี้มีการเลือกใช้ไพรเมอร์ จากการอ้างอิงตามงานวิจัยของ Ellington และคณะ⁽¹³²⁾ ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 : แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน bla_{IMP} และ ยีน bla_{VIM})

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (คู่เบส)
ยีน bla_{IMP}	IMP-F	5' – GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C – 3'	188
	IMP-R	5' – CCA AAC YAC TAS GTT ATC T – 3'	
ยีน bla_{VIM}	VIM-F	5' - GAT GGT GTT TGG TCG CAT A – 3'	390
	VIM-R	5' – CGA ATG CGC AGC ACC AG – 3'	

วิธีการวิจัย

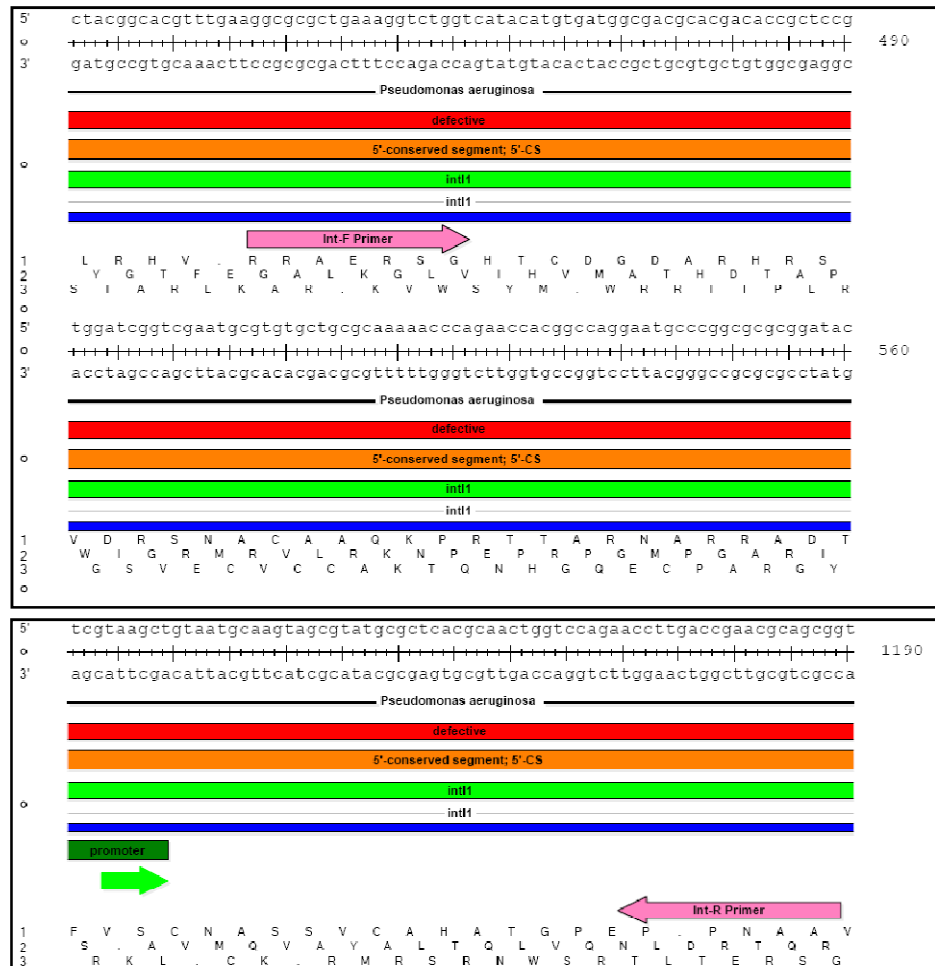
1. ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) และไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับตรวจสอบ

- การแสดงผลของยีนต่างๆ ดังตารางที่ 6 ทำการผสมซีดีเอ็นเอ ต้นแบบ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร กับ 24.5 ไมโครลิตร ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP Mix, 1 μ M Forward และ Reverse primer, 0.625 U *Taq* DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ), 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; 52 องศาเซลเซียส 40 วินาที; 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที (36 รอบ), 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ)
2. จากนั้น ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลออกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1% (1% agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide ก่อนที่จะนำไปส่องด้วยแสงเหนือม่วง (ultraviolet; UV) จากเครื่อง ultraviolet transilluminator ซึ่งจะช่วยให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอในเจลได้

3.4.3. ตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน *IntI1* และ ยีน *qacEDelta1* และยีน *SulI*) ในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบ multiplex (Multiplex PCR) และตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

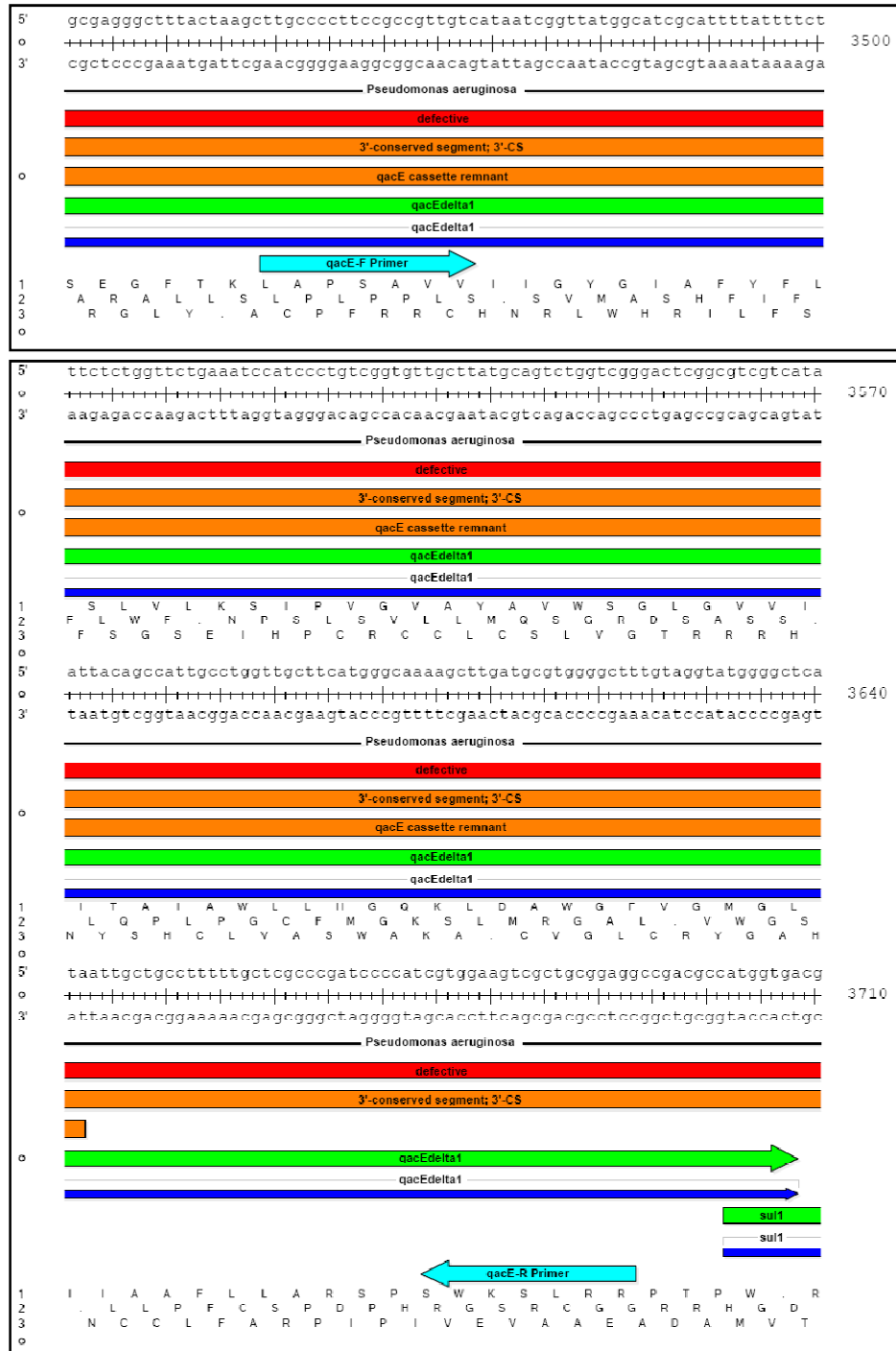
วิธีการวิจัย

- ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับทำ Multiplex PCR เพื่อตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม class 1 integron โดยออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่ คือ
 - ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R เพื่อตรวจสอบยีน *IntI1* (ภาพที่ 3.2)



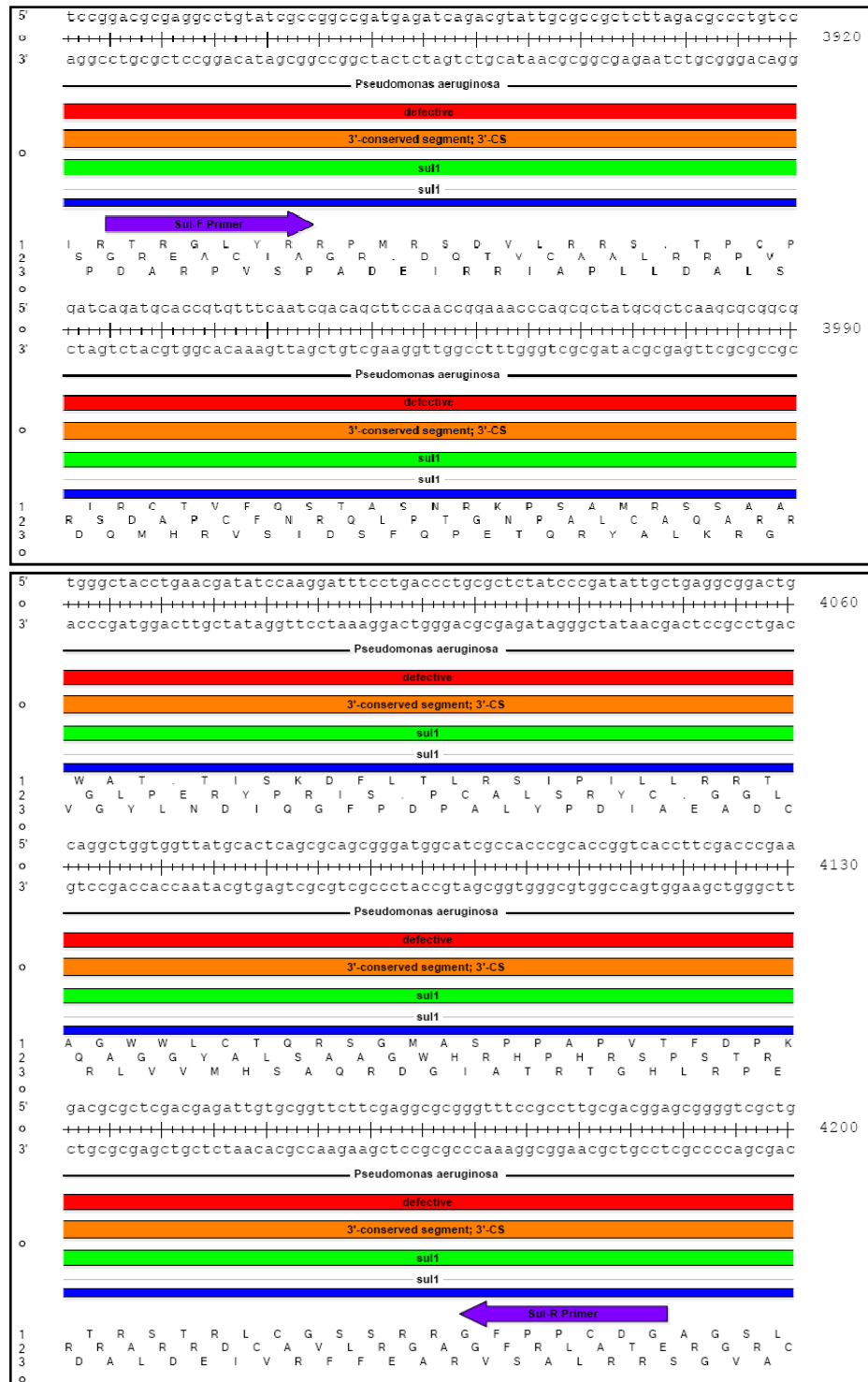
ภาพที่ 3.2 : แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ Int-F (ภาพบน) และไพรเมอร์ Int-R (ภาพล่าง) ซึ่งแสดงโดยลูกศรสีชมพูที่จับกับ class 1 integron (GenBank No. AF313471.1)

- ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R เพื่อตรวจสอบยีน qacEDelta1 (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 : แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ qacE-F (ภาพบน) และไพรเมอร์ qacE-R (ภาพล่าง) ซึ่งแสดงโดยลูกศรสีฟ้าที่จับกับ class 1 integron (GenBank No. AF313471.1)

● ไพรมเมอร์ Sul-F และ Sul-R เพื่อตรวจสอบยีน *Sul1* (ภาพที่ 3.4)



ภาพที่ 3.4 : แสดงตำแหน่งของไพรมเมอร์ Sul-F (ภาพบน) และไพรมเมอร์ Sul-R (ภาพล่าง) ซึ่งแสดงโดยลูกศรสีม่วงที่จับกับ class 1 integron (GenBank No. AF313471.1)

ตารางที่ 3.4 : แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน *Int1* และ ยีน *qacEDelta1* และยีน *Sul1*)

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (คู่เบส)
ยีน <i>Int1</i>	Int-F	5' - GGC GCG CTG AAA GGT CTG GT - 3'	753
	Int-R	5' - CCG CTG CGT TCG GTC AAG GT - 3'	
ยีน <i>qacEDelta1</i>	qacE-F	5' - TTG CCC CTT CCG CCG TTG TC - 3'	245
	qacE-R	5' - CCT CCG CAG CGA CTT CCA CG - 3'	
ยีน <i>Sul1</i>	Sul-F	5' - GAC GCG AGG CCT GTA TCG CC - 3'	334
	Sul-R	5' - TCC GTC GCA AGG CGG AAA CC - 3'	

2. ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R และชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) โดยทำการผสมซีดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 0.5 ไมโครลิตร กับ 24.5 ไมโครลิตรของน้ำยาในการทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP Mix, 1 μM Forward และ Reverse primer, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase โดยในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมนี้ได้มีการหาช่วงอุณหภูมิในการเกิด annealing ออกเป็น 8 ระดับแบบ gradient temperature ซึ่งกำหนดให้มีอุณหภูมิตั้งแต่ 50-66 องศาเซลเซียส โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่ใช้ในขั้นตอนแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 : แสดงสถานะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R เพื่อทดสอบหาสถานะที่เหมาะสม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	36
Annealing	50.0, 51.2, 53.4, 56.3, 59.9, 62.8, 64.9, 66.0	40 วินาที	
Extension	72	50 วินาที	
Extension	72	5 นาที	1

- จากขั้นตอนที่ 2 เลือกอุณหภูมิช่วง annealing ที่ให้ผลการเกิดปฏิกิริยาดีที่สุดมา 4 ระดับ (59.9, 62.8, 64.9 และ 66.0 องศาเซลเซียส) จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันอีกครั้ง โดยใช้ชุดน้ำยาเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2 และทำการปรับค่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ระดับ (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mM) เพื่อหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R
- ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R อีกครั้ง ในขั้นตอนนี้ ใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) โดยทำการผสมซีดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 0.5 ไมโครลิตร กับ 24.5 ไมโครลิตรของน้ำยาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), 0.2 mM dNTP Mix, 1 μ M Forward และ Reverse primer, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase โดยในการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมนี้ ได้มีการหาช่วงอุณหภูมิในการเกิด annealing

ออกเป็น 8 ระดับแบบ gradient temperature ซึ่งกำหนดให้มีอุณหภูมิตั้งแต่ 55-71 องศาเซลเซียส โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่ใช้ในขั้นตอนแสดงในตารางที่ 3.6 ทั้งนี้มีการทดลองเปรียบเทียบสภาวะที่มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$, ต่างกัน ดังนี้ 1.5 และ 2 mM $MgCl_2$

ตารางที่ 3.6 : แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของไพรเมอร์ Sul-F, Sul-R และ Int-F, Int-R เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	36
Annealing	55.0, 56.2, 58.4, 61.3 64.9, 67.8, 69.9, 71.0	40 วินาที	
Extension	72	50 วินาที	
Extension	72	5 นาที	1

- ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R ในขั้นตอนนี้ ใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) โดยมีรายละเอียดเช่นเดียวกับการหาสภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R ทั้งนี้ได้มีการทดลองหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม (1.5 และ 2.0 mM) ตามลำดับ
- จากขั้นตอนที่ 1-5 ที่กล่าวมาข้างต้น จะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ multiplex สำหรับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ (ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R, ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R) ซึ่งก็คือ การใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) โดยทำการผสมซีดีเอ็นเอต้นแบบ

จำนวน 0.5 ไมโครลิตร กับ 24.5 ไมโครลิตรของน้ำยาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP Mix, 1 μM Forward และ Reverse primer, 2.0 U Taq DNA Polymerase และสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 : แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ multiplex สำหรับไพรเมอร์ 3 คู่ (ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R, ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	36
Annealing	60	40 วินาที	
Extension	72	50 วินาที	
Extension	72	5 นาที	1

7. ตรวจสอบหาความถูกต้องของยีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน *Int11* และ ยีน *qacEDelta1* และยีน *Sul1*) ในเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมดที่เป็นกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยครั้งนี้ โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ multiplex ในขั้นตอนที่ 6 และตรวจสอบผลผลิต โดยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1% (1% agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide ก่อนที่จะนำไปส่องด้วยแสงเหนือม่วง (ultraviolet; UV) จากเครื่อง ultraviolet transilluminator ซึ่งจะช่วยให้สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอในเจล

3.4.4. ศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในเชื้อ *P. aeruginosa* กับการมีและไม่มียีนในกลุ่ม class 1 integron

ศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของเชื้อ *P. aeruginosa* 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มียีนในกลุ่ม class 1 integron และกลุ่มที่ไม่มียีนในกลุ่ม class 1 integron เพื่อวิเคราะห์ว่าการมียีนในกลุ่ม class 1 integron มีผลต่อการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยใช้สถิติ Pearson Chi-square test เพื่อหาความสัมพันธ์ดังกล่าว

3.5. ส่วนที่ 5 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์

metallo- β -lactamase และศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาย

พันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase

3.5.1. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์

metallo- β -lactamase

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ที่มียีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน *bla_{IMP}* และ ยีน *bla_{VIM}*) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ IMP-F, IMP-R และ VIM-F, VIM-R (ตารางที่ 3.3) หลังจากนั้น ระบุประเภทของเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่เชื้อสร้างขึ้น โดยการนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับพันธุ์กรรม (blast) กับ ข้อมูล ในฐาน ข้อมูล จาก <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3.5.2. ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase โดยวิธี pulsed field gel electrophoresis

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) เป็นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบให้กระแสไฟฟ้าเป็นเวลายังหวั่นๆ วิธีนี้สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ถึงหลายล้านคู่เบสได้ ใน PFGE มักวางระบบการให้กระแสไฟฟ้าไว้หลายทิศทาง เช่น ในระบบ Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) จะวางแผ่นเจลไว้ตรงกลางระหว่างแถวของขั้วไฟฟ้าที่วางไว้บนแต่ละด้านของหกเหลี่ยม และแต่ละด้านจะประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 4 ขั้ว ทิศทางของการให้ไฟฟ้ามี 2 ทิศสลับกันระหว่างทิศตะวันตกเฉียงเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ในการให้กระแสไฟฟ้าแต่ละรอบจะดันให้โมเลกุลเคลื่อนที่ไปในทิศทาง + 60 องศา ครั้งหนึ่ง และ - 60 องศา ครั้งหนึ่ง (เทียบกับแกนสมมติในแนวตั้ง) การให้กระแสไฟฟ้าเป็นจังหวะสลับไปมาในทิศทางเช่นนี้ทำให้ปรับโมเลกุลของดีเอ็นเอให้เคลื่อนที่ไปมาระหว่างมุม 120° สนามไฟฟ้า

ในสองทศมีปริมาณเท่ากัน ดังนั้นการเคลื่อนที่สุทธิของดีเอ็นเอจึงอยู่บนแกนสมมติในแนวตั้ง (มุม 0 องศา) เช่นนี้ ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏดูได้ง่าย และสามารถบรรจุได้หลายๆ ตัวอย่างในการทดลองครั้งเดียว⁽¹³³⁾

วิธีการ

1. เตรียมเชื้อที่ต้องการทดสอบ
 - a. เพาะเลี้ยงเชื้อลงบน Tryptone Soya Agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - b. คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบ มาเลี้ยงใน Tryptone Soya Broth 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
 - c. นำเชื้อที่เลี้ยงใน Tryptone Soya Broth ปริมาตร 1500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtube จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูสัดส่วนใสด้านบนทิ้งไป เก็บเฉพาะส่วนตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด
 - d. ล้างตะกอนเซลล์ด้วย SE buffer 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยการปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ครั้งละ 10 นาที
 - e. เจือจางตะกอนเซลล์ที่ล้างแล้วด้วย SE buffer จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปรับให้สารละลายเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0
2. เตรียมชิ้นวุ้นตัวอย่างเชื้อ (plug)
 - a. เตรียม 2% LMP agarose ใน LMP agarose buffer ตั้งไว้ที่ 55-60 องศาเซลเซียส
 - b. ผสมสารละลายเซลล์ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร กับ 2% LMP agarose 0.5 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ใส่แม่พิมพ์ ตั้งทิ้งไว้ให้ชิ้นวุ้นตัวอย่างแข็ง จึงเขี่ยชิ้นวุ้นตัวอย่างลงใน lysis buffer นำมาบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ในตู้อบ

- c. เทสส่วน lysis buffer ออก และล้างชิ้นวุ้นตัวอย่างในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 มิลลิลิตร 5 นาที และ 1X TE solution 1.2 มิลลิลิตร อีก 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำซ้ำเช่นนี้ 4 ครั้ง และครั้งสุดท้ายให้เพิ่มเวลาเป็นขั้นตอนละ 30 นาที
3. ย่อยชิ้นวุ้นตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
- a. ตัดแบ่งชิ้นวุ้นตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 2X6 มิลลิเมตร จากนั้น pre incubate ชิ้นวุ้น ใน 1X restriction enzyme buffer จำนวน 150 ไมโครลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงดูสัดส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ออกแล้วเติม 100 μ l 1X restriction enzyme buffer ซึ่งมีเอนไซม์ *SpeI* ที่มีความเข้มข้น 15U ลงไป จากนั้นนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส, 16-18 ชั่วโมง
4. การเตรียม 1% pulsed field certified agarose
- a. เตรียม 1% pulsed field certified agarose ใน 0.5X TBE buffer สำหรับการทำ Pulsed field gel electrophoresis โดยนำชิ้นวุ้นตัวอย่างที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SpeI* แล้วใส่ลงไปช่องตัวอย่าง และปิดทับด้วยวุ้น ทิ้งให้แข็ง จึงนำไปใส่ใน chamber โดยใช้ 0.5x TBE เป็นบัฟเฟอร์ และสภาวะในการทำงาน ดังนี้ Initial switch time: 1.0 วินาที, Final switch time: 50.0 วินาที, Voltage: 6 V/cm, Angle: 120°, Ramping factor: linear อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส, เวลาที่ใช้: 24 ชั่วโมง
- b. ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide ก่อนที่จะนำไปส่องด้วยแสงเหนือม่วง (ultraviolet; UV) จากเครื่อง ultraviolet transilluminator ซึ่งจะทำให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอในเจลได้
5. เปรียบเทียบรูปแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้หลักเกณฑ์การวิเคราะห์ตามหลักการของ Tenover และคณะ⁽¹²⁴⁾ ดังแสดงในตารางที่ 3.8 กล่าวคือ

- a. หากรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเหมือนกันทุกประการกับเชื้อที่เป็นสาเหตุของการระบาด จะถือว่าเชื้อชนิดนั้นเป็นสายพันธุ์เดียวกับเชื้อที่เกิดการระบาด (Indistinguishable)
- b. หากมี 2-3 แอบริเอ็นเอ ที่แตกต่างจากไปจากรูปแบบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ที่เกิดการระบาด จะถือว่าเชื้อชนิดนั้นเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกับเชื้อที่เกิดการระบาด (Closely related)
- c. หากมี 4-6 แอบริเอ็นเอ ที่แตกต่างจากไปจากรูปแบบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ที่เกิดการระบาด จะถือว่าเชื้อชนิดนั้นอาจจะเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกับเชื้อที่เกิดการระบาด (Possibly related)
- d. หากมีมากกว่า 7 แอบริเอ็นเอ ที่แตกต่างจากไปจากรูปแบบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ที่เกิดการระบาด จะถือว่าเชื้อชนิดนั้นเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กับเชื้อที่เกิดการระบาด (Different)

ตารางที่ 3.8 : แสดงหลักเกณฑ์การวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อตามหลักการของ Tenover และคณะ⁽¹²⁴⁾

Catagory	No. of genetic differences compared with outbreak strain	Typical no. of fragment differences compared with outbreak pattern	Epidemiologic interpretation
Indistinguishable	0	0	Isolate is part of the outbreak
Closely related	1	2-3	Isolate is probably part of the outbreak
Possibly related	2	4-6	Isolate is possibly part of the outbreak
Different	≥ 3	≥ 7	Isolate is not part of the outbreak

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ส่วนที่ 1 ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อ *P. aeruginosa* โดยแยกตามสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ

เชื้อ *P. aeruginosa* ที่รวบรวมได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือนเมษายน ปีพ.ศ.2552 มีทั้งสิ้น 150 ตัวอย่าง มาจากสิ่งส่งตรวจ 4 ประเภท ได้แก่ เลือด 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.7), หนอง 37 ตัวอย่าง (ร้อยละ 24.7), ปัสสาวะ 45 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30.0) และ เสมหะ 64 ตัวอย่าง (ร้อยละ 42.7) ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 : แผนภูมิแสดงปริมาณเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เก็บได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือนเมษายน พ.ศ.2552 จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยจำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ

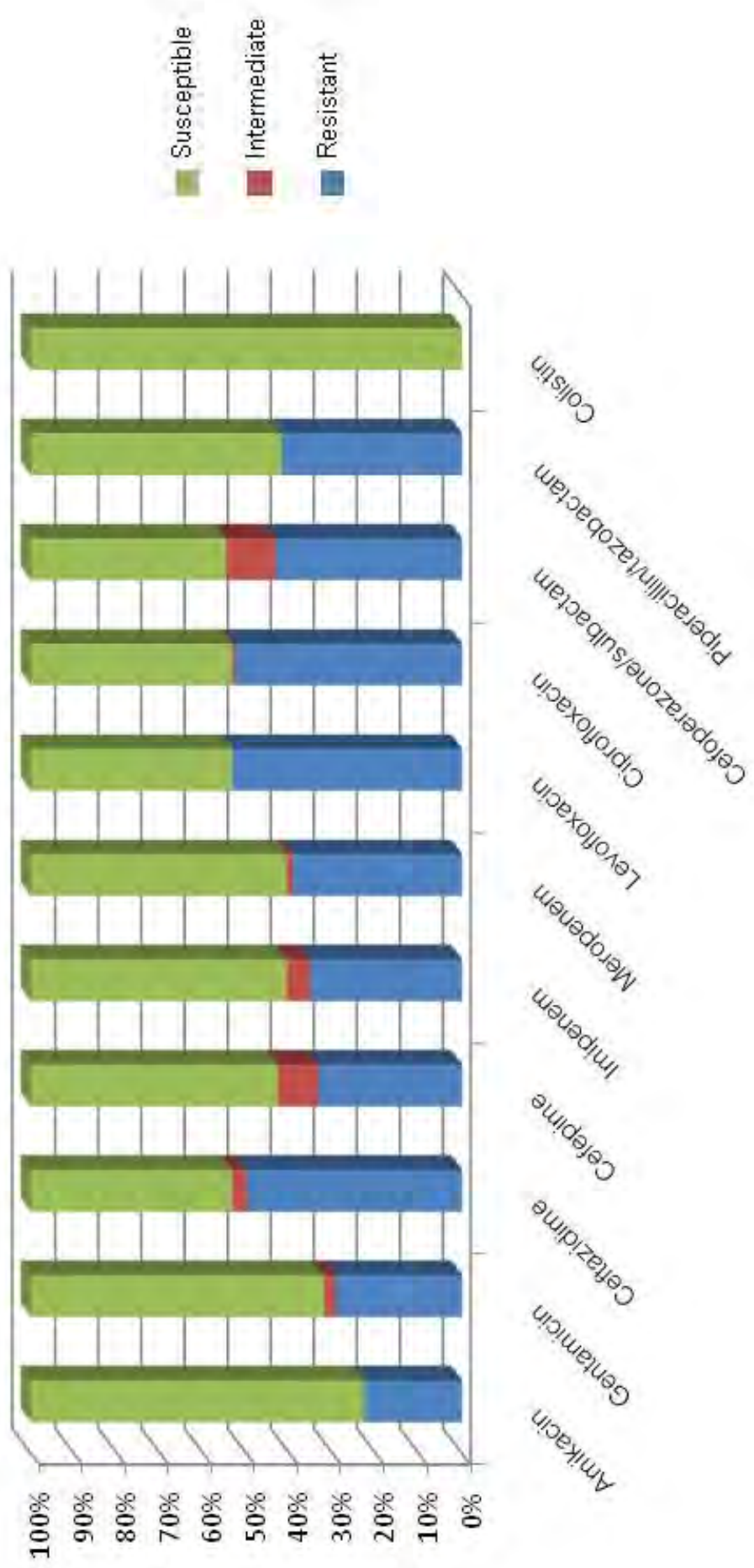
2. ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของ เชื้อ *P. aeruginosa*

2.1. แบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. aeruginosa* เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ผลการศึกษากลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ต่อแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ

P. aeruginosa (antipseudomonal drugs) 11 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ให้ผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 4.2 ดังนี้

- **กลุ่ม quinolones** ประกอบไปด้วย levofloxacin และ ciprofloxacin ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 53.3 และร้อยละ 52.7 ตามลำดับ
- **กลุ่ม third generation cephalosporins** ซึ่งมี ceftazidime เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างร้อยละ 50 ดื้อต่อยา ดังกล่าว
- **กลุ่ม β -lactam/inhibitor** ซึ่งมี cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/ tazobactam เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 43.3 และ 42.0 ตามลำดับ
- **กลุ่ม carbapenems** ประกอบไปด้วย meropenem และ imipenem ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 39.3 และ ร้อยละ 35.3 ตามลำดับ
- **กลุ่ม fourth generation cephalosporins** ซึ่งมี cefepime เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อต่อยา ดังกล่าวร้อยละ 33.3
- **กลุ่ม aminoglycoside** ประกอบไปด้วยยา gentamicin และ amikacin ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 29.3 และ 22.7 ตามลำดับ
- **กลุ่ม polymyxin** ซึ่งมียา colistin เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อทุกตัวมีความไวต่อยาชนิดนี้

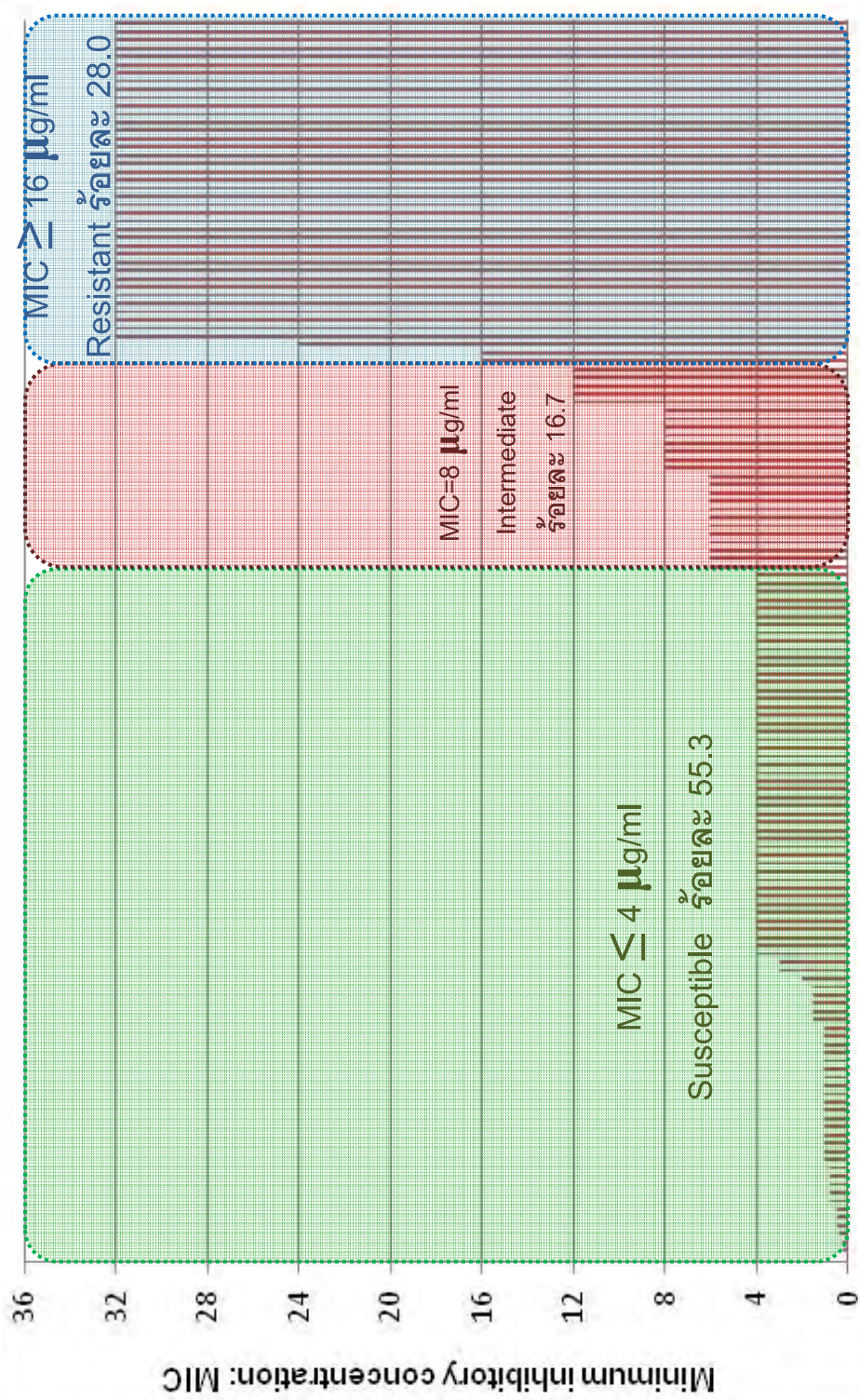


ภาพที่ 4.2 : กราฟแสดงแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 11 ชนิด ของกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง

2.2. ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุด (Minimum inhibitory concentration: MIC) ของยา imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี E-test

จากกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของยา imipenem ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration: MIC) ด้วยวิธี E-test ผลการทดสอบ (ภาพที่ 4.3) พบว่า

- กลุ่มตัวอย่างเชื้อจำนวน 83 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55.3 มีค่า MIC ต่อ ยา imipenem น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แปลผลเป็น “Susceptible”
- กลุ่มตัวอย่างเชื้อจำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.7 มีค่า MIC ต่อ ยา imipenem เท่ากับ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แปลผลเป็น “Intermediate” และ
- กลุ่มตัวอย่างเชื้อจำนวน 42 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 28.0 มีค่า MIC ต่อ ยา imipenem มากกว่าหรือเท่ากับ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แปลผลเป็น “Resistant”

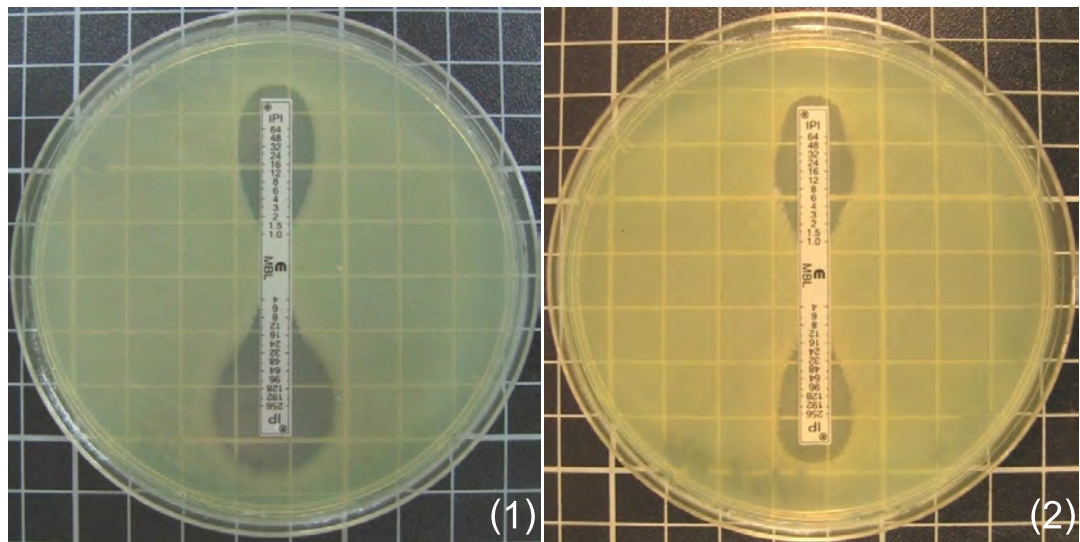


ภาพที่ 4.3 : กราฟแสดงค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของยา imipenem เมื่อทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ด้วยวิธี E-test

3. ส่วนที่ 3 ผลการศึกษาทางพีโนไทป์ของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ *P. aeruginosa*

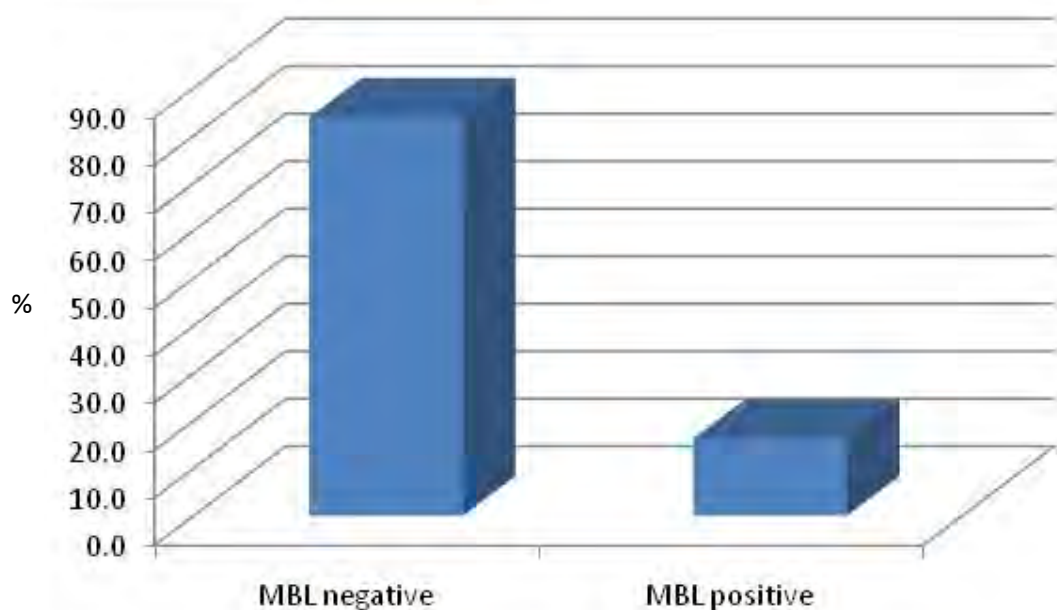
3.1. ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วย MBL E-test

เมื่อนำกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วย MBL E-test จะให้ผลดังภาพที่ 4.4(1) จะเห็นว่า ค่า MIC ของด้าน IP (imipenem) มีค่าเท่ากับ 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วน MIC ของด้าน IPI (imipenem+EDTA) มีค่าเท่ากับ 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากคำนวณ จะทำให้ค่า MIC ratio (MIC ของด้าน IP/MIC ของด้าน IPI) มีค่าเท่ากับ 4 ซึ่งน้อยกว่าค่า cut off (cut off = 8) จึงถือได้ว่าเชื้อไม่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์และภาพที่ 4.4(2) จะเห็นว่า ค่า MIC ของด้าน IP (imipenem) มีค่าเท่ากับ 24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วน MIC ของด้าน IPI (imipenem+EDTA) มีค่าเท่ากับ 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากคำนวณ จะทำให้ค่า MIC ratio (MIC ของด้าน IP/MIC ของด้าน IPI) มีค่าเท่ากับ 16 ซึ่งมากกว่าค่า cut off (cut off = 8) จึงถือได้ว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์



ภาพที่ 4.4 : ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี MBL E-test ; (1)แสดงเชื้อที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase (2) แสดงเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase

เมื่อนำกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 74 ตัวอย่างมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วย MBL E-test พบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.2 (ภาพที่ 4.5)



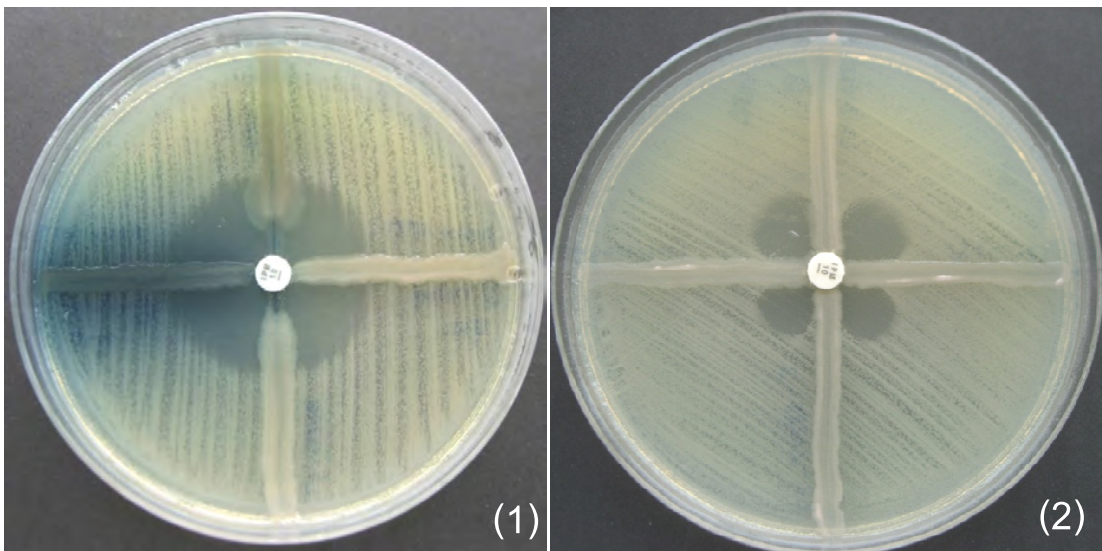
ภาพที่ 4.5 : กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วย MBL E-test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* 74 ตัวอย่าง

3.2. ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ

P. aeruginosa ด้วยวิธี Modified Hodge Test

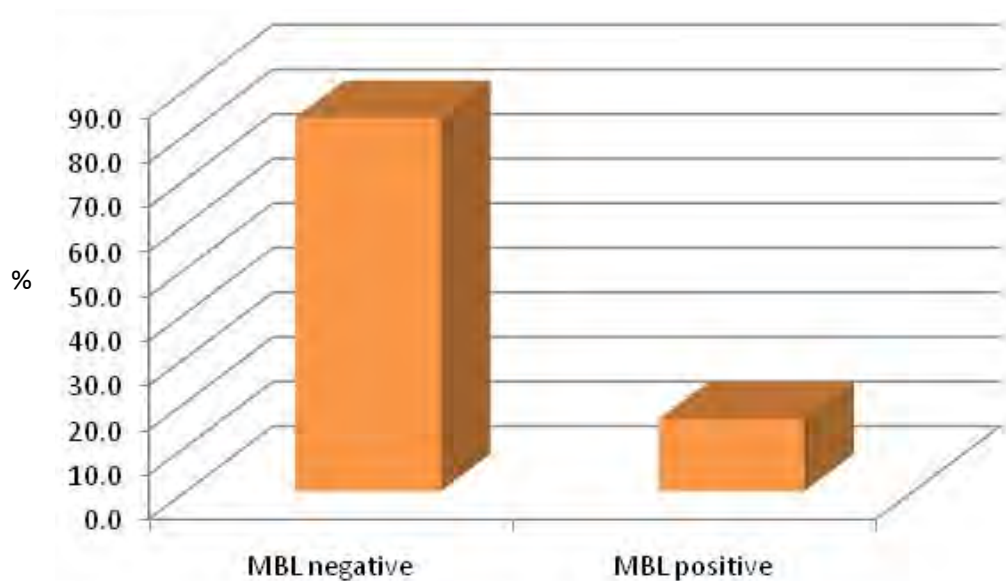
เมื่อนำกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วยวิธี Modified Hodge Test จะให้ผลแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

- เชื้อไม่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase จึงไม่มีเอนไซม์ออกมาทำลาย imipenem ส่งผลให้ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็น indicator strain ไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มียา imipenem จึงเกิด zone of inhibition ผลดังภาพที่ 4.6 (1)
- เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase เอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นนี้จึงเข้าทำลาย imipenem ซึ่งเป็นยับยั้งของเอนไซม์ ส่งผลให้ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็น indicator strain สามารถขึ้นได้ในบริเวณที่มียา ดังกล่าว เกิดเป็น inhibition zone ที่มีรูปร่างคล้ายใบไม้สามแฉก ที่เรียกว่า clover leaf ดังภาพที่ 4.6 (2)



ภาพที่ 4.6 : ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Modified Hodge Test ; (1)แสดงเชื้อที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase (2) แสดงเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase

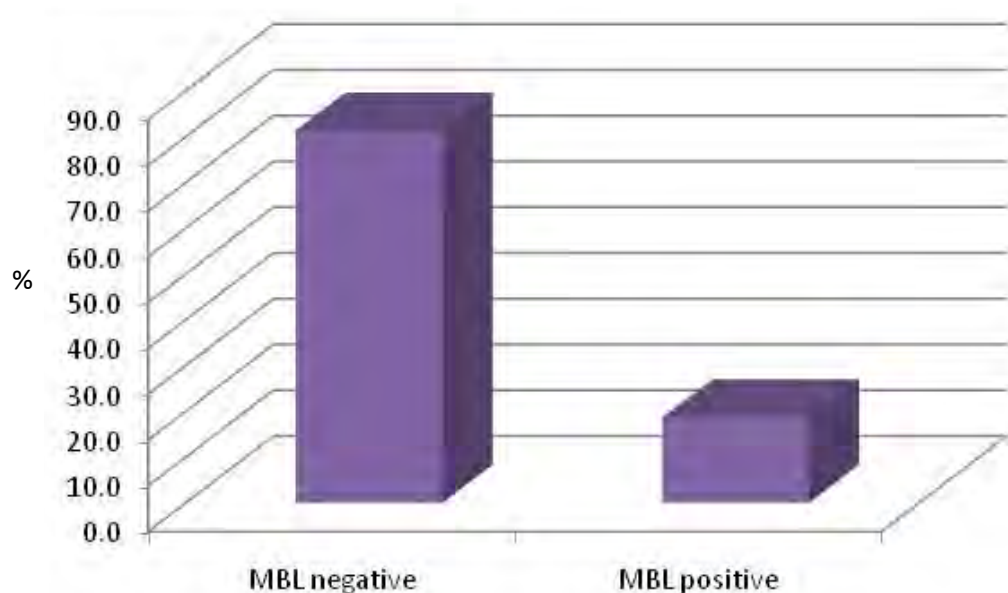
เมื่อนำกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 74 ตัวอย่างมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วยวิธี Modified Hodge Test พบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.2 (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 : กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วยวิธี Modified Hodge Test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* 74 ตัวอย่าง

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วย MBL E-test และวิธี Modified Hodge Test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* 74 ตัวอย่างพบว่า ทั้งสองวิธีให้ผลเหมือนกัน 100%

ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธี Modified Hodge Test ทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 150 ตัวอย่าง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ จำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18.7 ดังภาพที่ 4.8

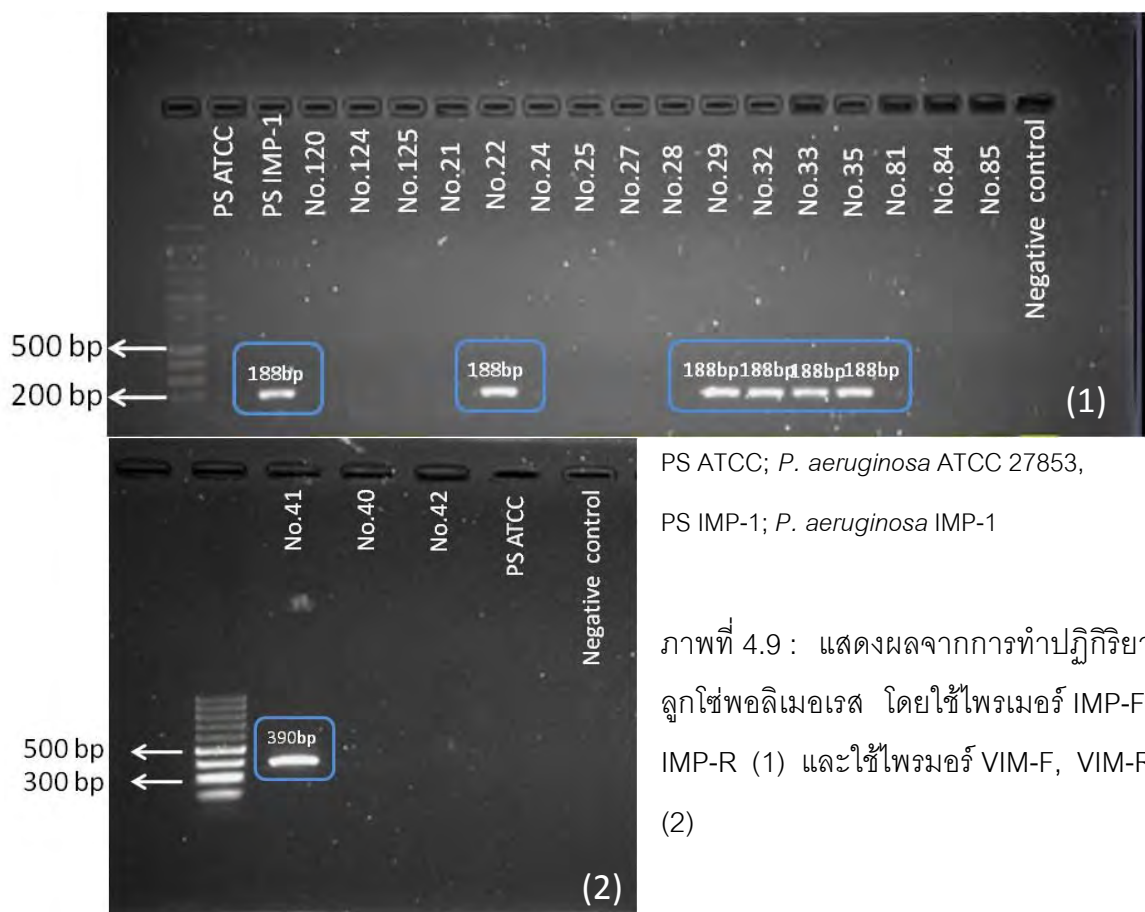


ภาพที่ 4.8 : กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ด้วยวิธี Modified Hodge Test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* 150 ตัวอย่าง

4. ส่วนที่ 4 ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับโมเลกุล และหาความสัมพันธ์ของ class 1 Integron โดยการหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase และ class 1 Integron

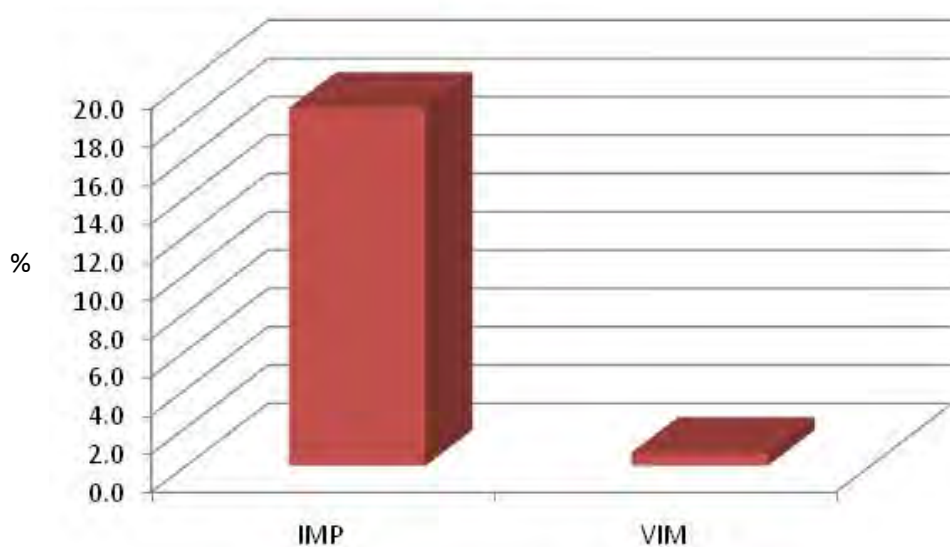
4.1. ผลการตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ของ *P. aeruginosa* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ชุดน้ำยา Taq DNA Polymerase ร่วมกับไพรเมอร์ IMP-F, IMP-R และไพรเมอร์ VIM-F, VIM-R ปฏิบัติโดยมีสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยา คือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ), 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; 52 องศาเซลเซียส 40 วินาที; 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที (36 รอบ), 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ) ซึ่งสามารถตรวจสอบยีน bla_{IMP} จากไพรเมอร์ IMP-F และ IMP-R ที่มีขนาด 188 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.9(1) และ ยีน bla_{VIM} จากไพรเมอร์ VIM-F และ VIM-R ขนาด 390 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.9(2)



ภาพที่ 4.9 : แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ IMP-F, IMP-R (1) และใช้ไพรเมอร์ VIM-F, VIM-R (2)

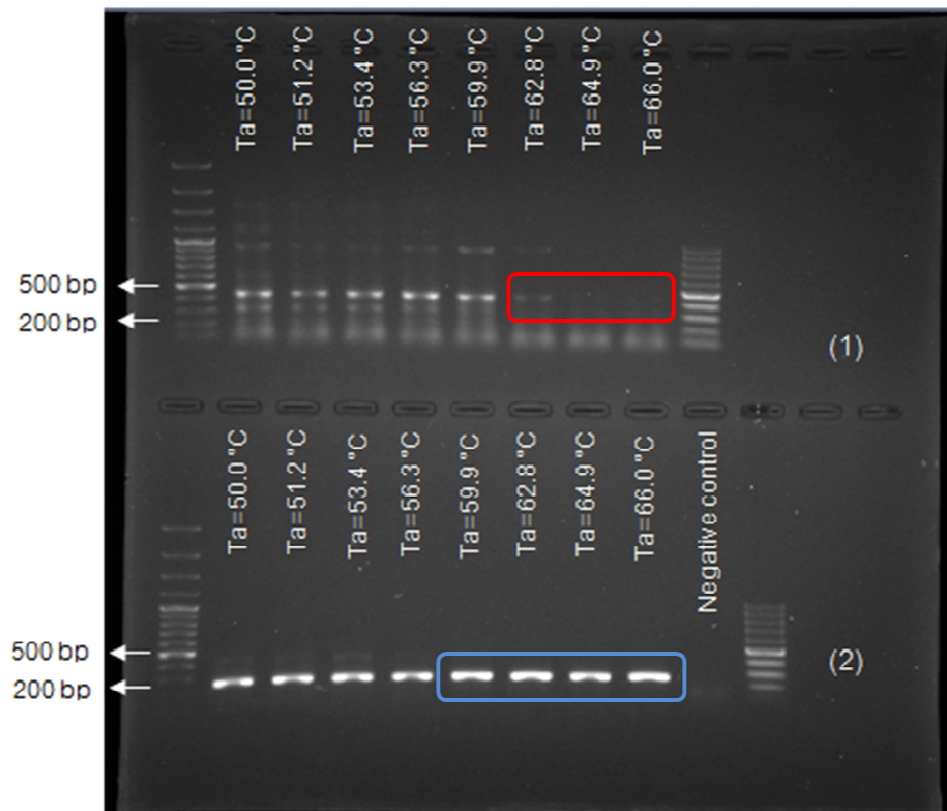
เมื่อนำกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 150 ตัวอย่าง มาทดสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน bla_{IMP} และยีน bla_{VIM}) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน พบว่า กลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* มียีน bla_{IMP} 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18.7 และมียีน bla_{VIM} 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.7 ดังแสดงในภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 : กราฟแสดงความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ได้แก่ ยีน bla_{IMP} และยีน bla_{VIM} เมื่อทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

4.2. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R และไพรเมอร์ Int-F และ Int-R

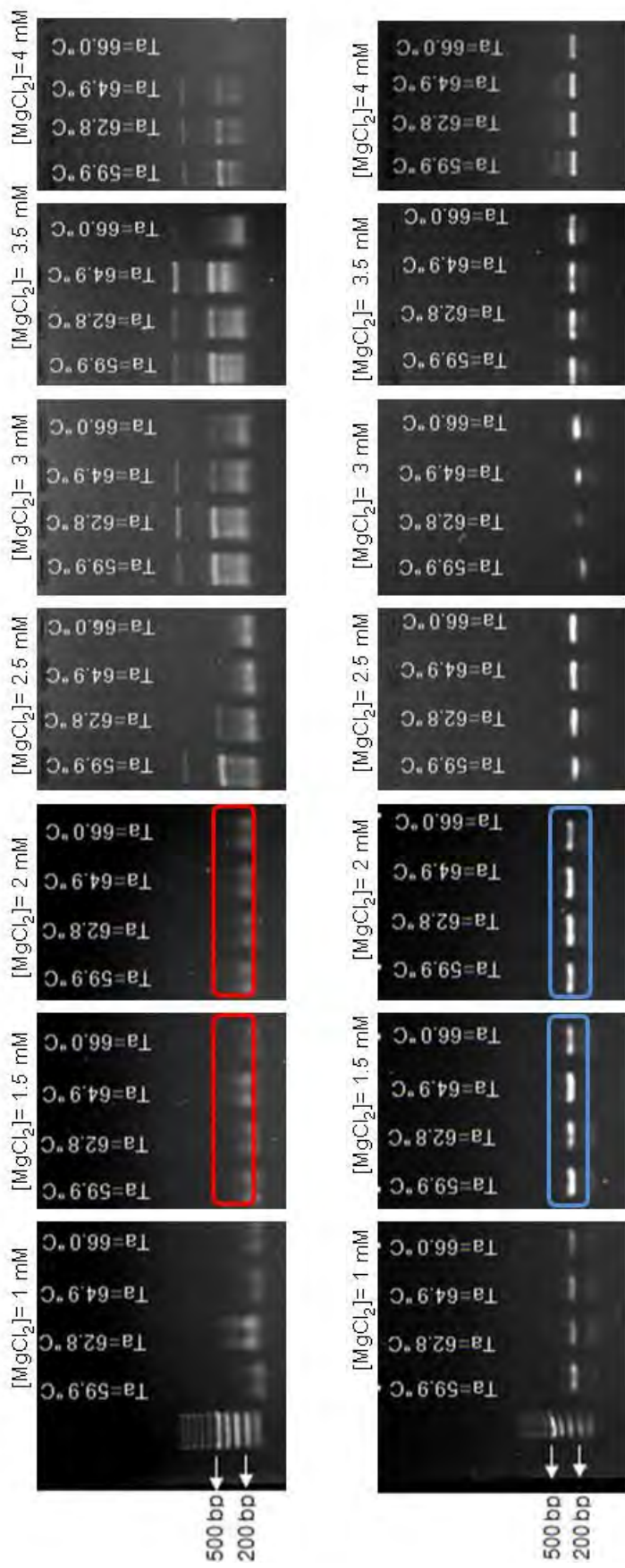
- ผลการทดสอบหาสภาวะอุณหภูมิช่วง annealing (annealing temperature; Ta) ที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R โดยมีการแบ่งออกเป็น 8 ระดับ ได้แก่ 50.0, 51.2, 53.4, 56.3, 59.9, 62.8, 64.9 และ 66.0 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.11) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิช่วงการเกิด annealing ที่เหมาะสม โดยพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่ใช้เป็น negative control ไม่สามารถพบผลผลิตได้ที่อุณหภูมิ 62.8, 64.9 และ 66.0 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิอื่นๆ ยังสามารถพบได้ และเมื่อพิจารณาที่เชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 ซึ่งกำหนดให้เป็น positive control จะพบว่าที่อุณหภูมิตั้งแต่ 59.9 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเป็นแถบยีน qacEDelta1 ขนาด 245 คู่เบสที่ชัดเจน



Ta; annealing temperature (อุณหภูมิช่วงการเกิด annealing)

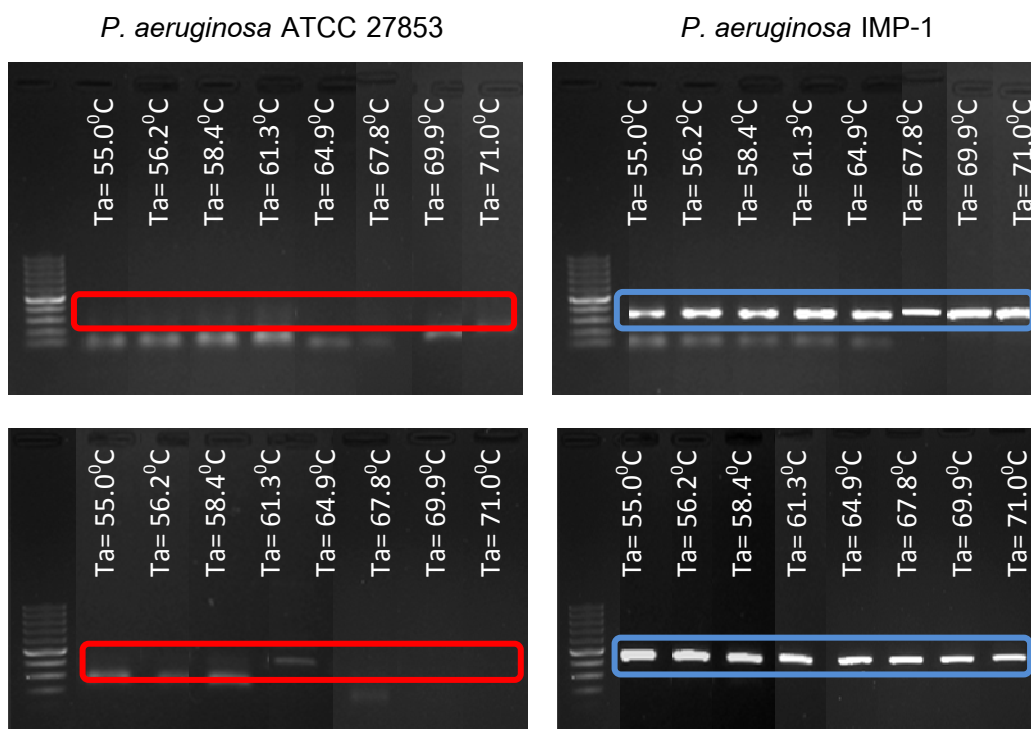
ภาพที่ 4.11 : แสดงผลการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ เมื่อดูผลทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (1) และเชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 (2) โดยใช้ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R ที่อุณหภูมิช่วงการเกิด annealing ทั้ง 8 ระดับ

- ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R โดยให้มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ แตกต่างกัน 7 ระดับ ได้แก่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 mM ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิ annealing ที่ให้ผลผลิตยีนที่ชัดเจนทั้ง 4 ระดับ ได้แก่ 59.9, 62.8, 64.9 และ 66.0 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.12) และจากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม คือ 1.5 และ 2.0 mM ที่ สภาวะดังกล่าวจะทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมลบ (negative control) ไม่เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา แต่จะทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมบวก (positive control) เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา มีขนาด 245 คู่เบส



ภาพที่ 4.12 : แสดงผลการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่ใช้ฟอสดิเมอเรส ของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ภาพบน) และ เชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 (ภาพล่าง) โดยใช้ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R ร่วมกับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่แตกต่างกัน 7 ระดับ ได้แก่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 mM และใช้อุณหภูมิช่วงการเกิด annealing 4 ระดับ ได้แก่ 59.9, 62.8, 64.9 และ 66.0 องศาเซลเซียส

- ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาปลูกโซ่พอลิเมอเวส โดยใช้ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R โดยมีตัวแปร 2 ชนิด คือความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 1.5 และ 2.0 mM และมีอุณหภูมิช่วงการเกิด annealing ที่แตกต่างกัน 8 ระดับได้แก่ 55.0, 56.2, 58.4, 61.3, 64.9, 67.8, 69.9, 71.0 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.13) จากผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาปลูกโซ่พอลิเมอเวส โดยใช้ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R พบว่า อุณหภูมิที่ทดสอบการเกิด annealing ทั้ง 8 ระดับ ตั้งแต่ 55.0-71.0 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสม สามารถทำให้เห็นผลผลิตของยีนจากปฏิกิริยาปลูกโซ่ที่มีขนาด 334 คู่เบสอย่างชัดเจน ในขณะที่เดียวกัน ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ทดสอบนั้นมีความเหมาะสมทั้งสองความเข้มข้น (1.5 และ 2.0 mM) ซึ่งสามารถเปรียบเทียบผลกับเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งเป็น negative control ไม่พบผลผลิตจากปฏิกิริยาปลูกโซ่นี้ แต่เชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมบวก (positive control) เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาอย่างชัดเจน



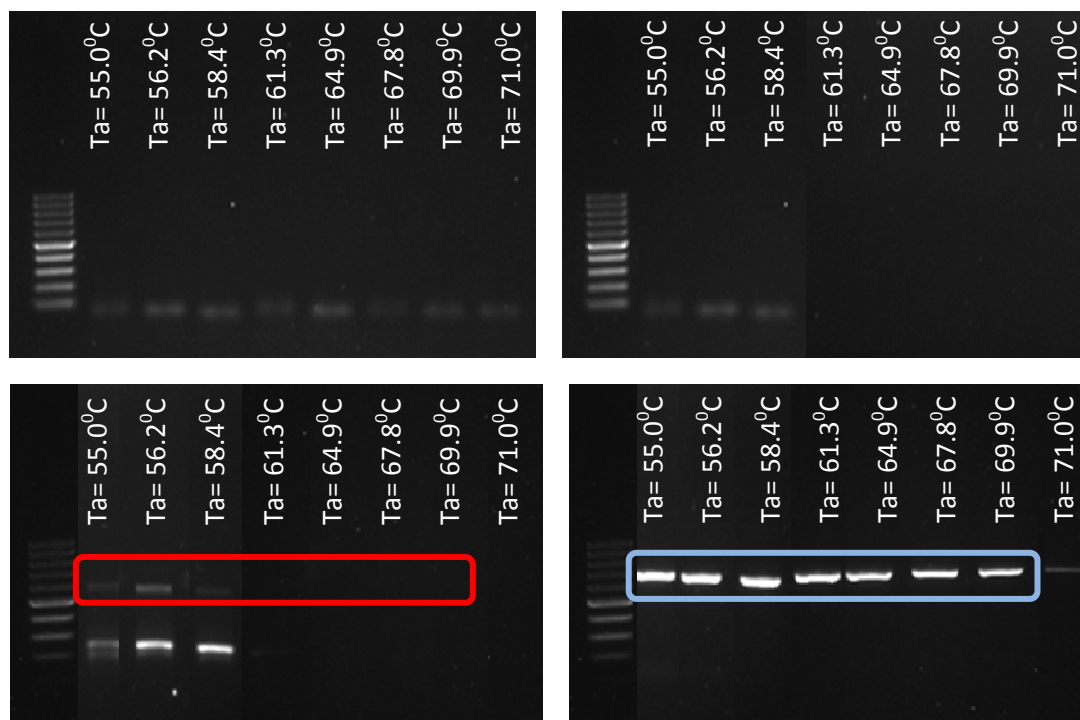
ภาพที่ 4.13 : แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R ของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 ที่ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 1.5 mM (ภาพบน) และ 2.0 mM (ภาพล่าง) ซึ่งเปลี่ยนค่าอุณหภูมิการเกิด annealing ที่แตกต่างกัน 8 ระดับได้แก่ 55.0, 56.2, 58.4, 61.3, 64.9, 67.8, 69.9, 71.0 องศาเซลเซียส

- ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R โดยมีตัวแปร 2 ชนิด คือความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 1.5 และ 2.0 mM และมีอุณหภูมิช่วงการเกิด annealing ที่แตกต่างกัน 8 ระดับได้แก่ 55.0, 56.2, 58.4, 61.3, 64.9, 67.8, 69.9, 71.0 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.14) จากผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R พบว่า อุณหภูมิที่ทดสอบการเกิด annealing ตั้งแต่ 61.3-69.9 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม คือ 2.0 mM จากสภาวะดังกล่าวจะทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งเป็นเชื้อ

ควบคุมลบ (negative control) ไม่เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา แต่จะทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมบวก (positive control) เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา มีขนาด 753 คู่เบส

P. aeruginosa ATCC 27853

P. aeruginosa IMP-1

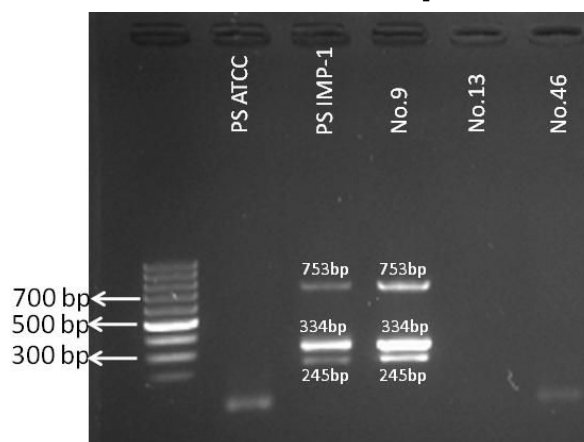


ภาพที่ 4.14 : แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R ของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 ที่ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 1.5 mM (ภาพบน) และ 2.0 mM (ภาพล่าง) ซึ่งเปลี่ยนค่าอุณหภูมิการเกิด annealing ที่แตกต่างกัน 8 ระดับได้แก่ 55.0, 56.2, 58.4, 61.3, 64.9, 67.8, 69.9, 71.0 องศาเซลเซียส

จากผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังได้กล่าวมาทั้งหมด ทำให้สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex สำหรับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ (ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R, ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, ไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R) คือ การใช้ชุดน้ำยา Taq DNA Polymerase โดยทำการผสม

ซีดีเอ็นเอต้นแบบ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร กับ 24.5 ไมโครลิตรของน้ำยาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP Mix, 1 μ M Forward และ Reverse primer, 2.0 U *Taq* DNA Polymerase มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ), 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; 60 องศาเซลเซียส 40 วินาที; 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที (36 รอบ), 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ)

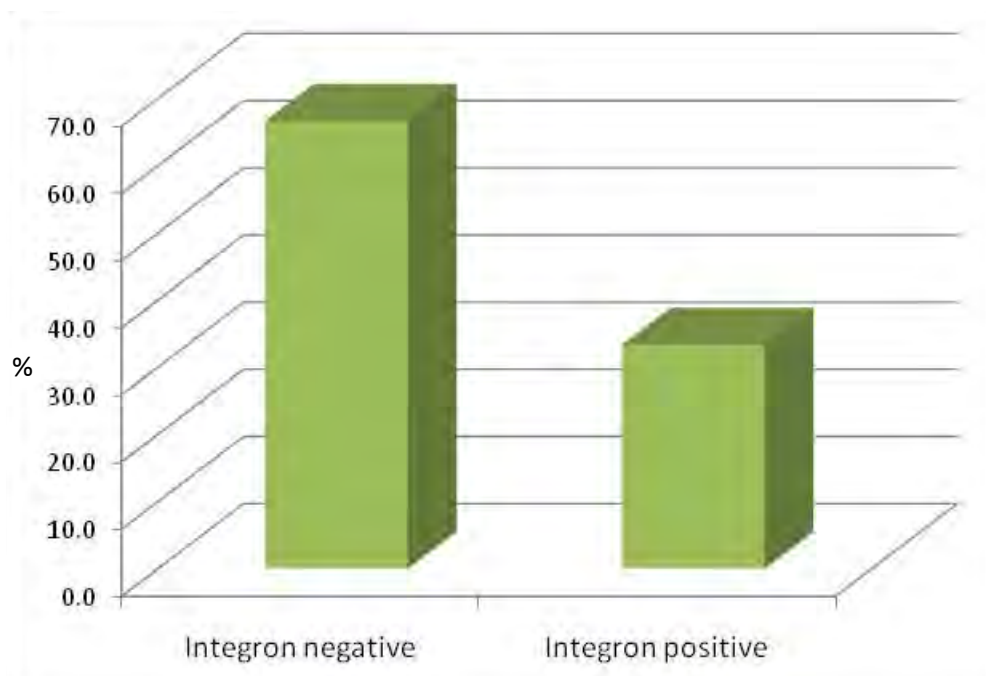
- ผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex โดยใช้สภาวะดังกล่าว จะทำให้เกิดผลผลิต 3 ขนาดในปฏิกิริยาเดียวกัน คือ ผลผลิตอันเกิดจากไพรเมอร์ Int-F และ Int-R ขนาด 753 คู่เบส, ผลผลิตอันเกิดจากไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R ขนาด 245 คู่เบส และผลผลิตอันเกิดจากไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R ขนาด 334 คู่เบส (ภาพที่ 4.15)



PS ATCC; *P. aeruginosa* ATCC 27853, PS IMP-1; *P. aeruginosa* IMP-1
 ภาพที่ 4.15 : แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ Int-F และ Int-R, ไพรเมอร์ qacE-F และ qacE-R, และไพรเมอร์ Sul-F และ Sul-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง No.9, 13 และ 46 ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เป็นเชื้อควบคุมลบ และเชื้อ *P. aeruginosa* IMP-1 เป็นเชื้อควบคุมบวก

4.3. ผลการตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม class 1 integron ในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex

ผลการตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน *Int11* และ ยีน *qacEDelta1* และยีน *Sul1*) ในเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า เชื้อมียีนในกลุ่ม class 1 integron ทั้งสิ้นถึง 50 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 ของเชื้อในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 4.16



ภาพที่ 4.16 : กราฟแสดงความชุกของเชื้อที่มียีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน *Int11* และ ยีน *qacEDelta1* และยีน *Sul1*) เมื่อทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex

4.4. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีการมีและไม่มียีนในกลุ่ม class 1 integron

เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิด ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีนในกลุ่ม class 1 integron จำนวน 50 ตัวอย่าง และที่ไม่มียีนในกลุ่ม class 1 integron อีก 100 ตัวอย่าง โดยใช้สถิติ Pearson Chi-square test พบว่ายีนในกลุ่ม class 1 integron มีความสัมพันธ์ต่อการดื้อต่อยา 10 ชนิด ได้แก่ amikacin, gentamicin, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, levofloxacin, ciprofloxacin, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value <0.01) แต่กลับมีความสัมพันธ์ต่อการดื้อต่อยา colistin อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือ การพบยีนในกลุ่ม class 1 integron ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการดื้อต่อยา colistin (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 : แสดงแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในเชื้อ

P. aeruginosa เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มียีน และกลุ่มที่ไม่มียีน class 1 integron

Antibiotic	กลุ่มที่มียีนในกลุ่ม class 1 integron (n=50)			กลุ่มที่ไม่มียีนในกลุ่ม class 1 integron (n=100)			p-value*
	%S	%I	%R	%S	%I	%R	
Amikacin	36	0	64	98	0	2	<0.01
Gentamicin	18	6	76	93	1	6	<0.01
Ceftazidime	14	0	86	63	5	32	<0.01
Cefepime	12	8	80	80	10	10	<0.01
Imipenem	24	4	72	77	6	17	<0.01
Meropenem	30	0	70	74	2	24	<0.01
Levofloxacin	10	0	90	65	0	35	<0.01
Ciprofloxacin	10	0	90	65	1	34	<0.01
Cefoperazone/Sulbactam	14	10	76	61	12	27	<0.01
Piperacillin/Tazobactam	36	0	64	69	0	31	<0.01
Colistin	100	0	0	100	0	0	NS

%S; susceptible(ร้อยละ), %I; intermediate(ร้อยละ), %R; resistant(ร้อยละ),

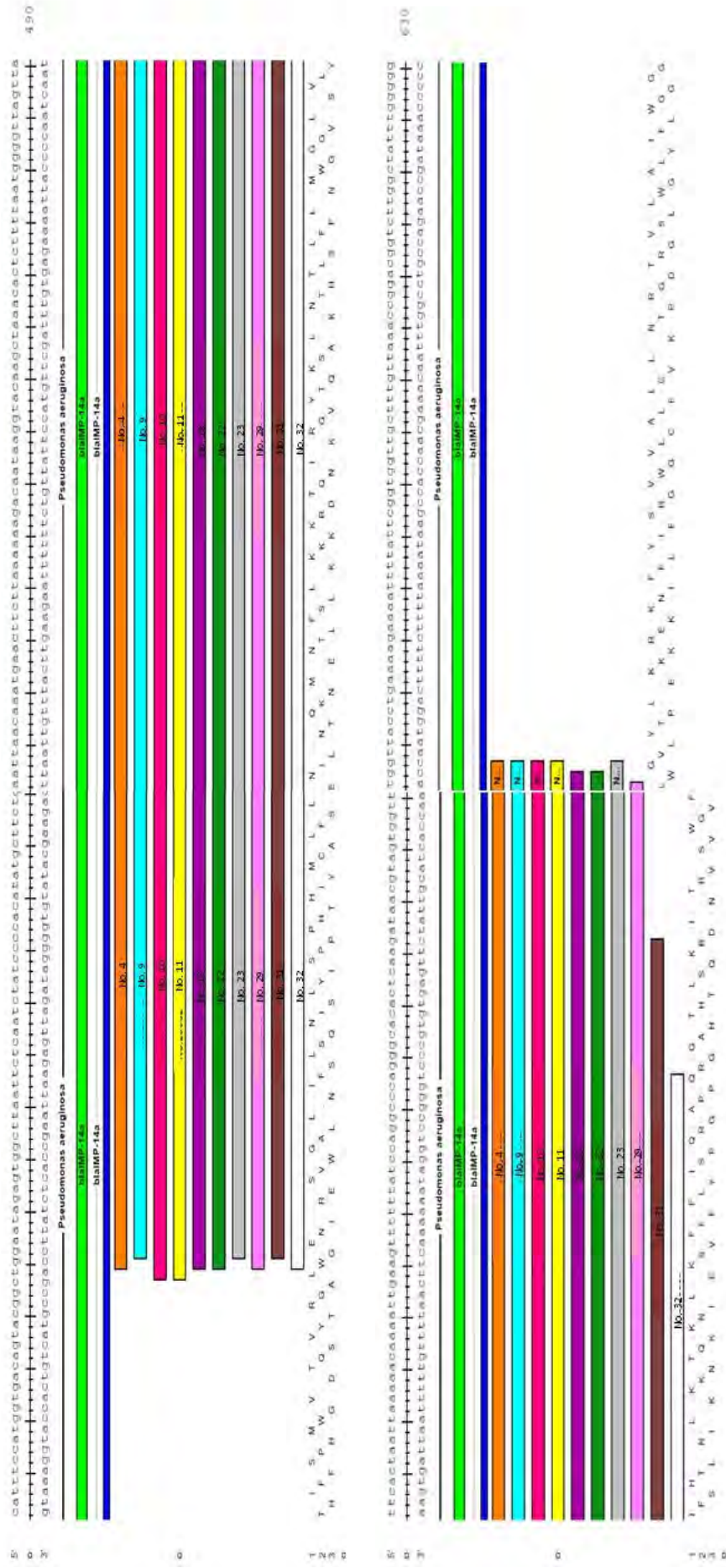
NS; not statistically significant

* วิเคราะห์ด้วยสถิติ Pearson Chi-square test

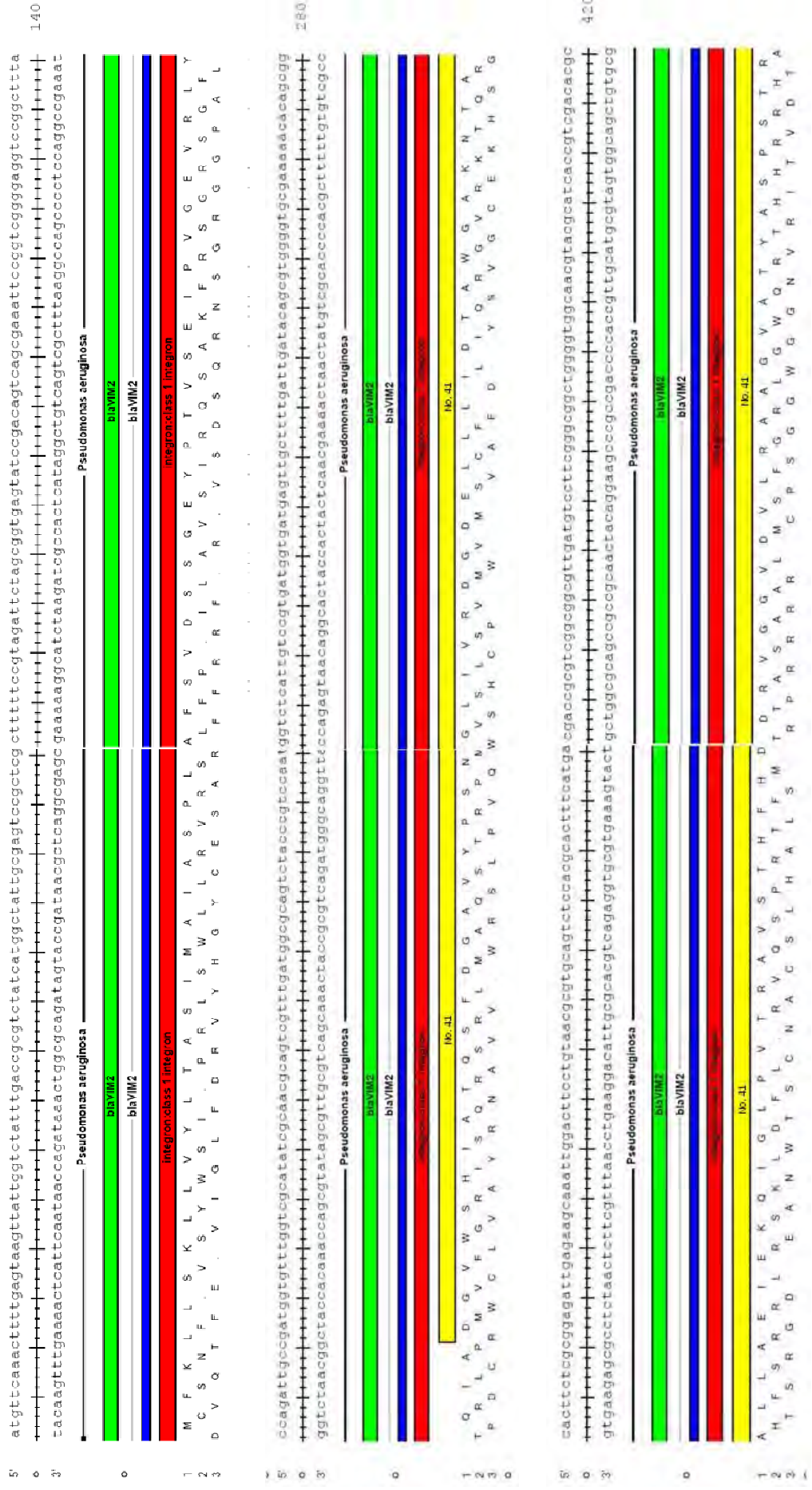
5. ส่วนที่ 5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase และศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase

5.1. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase

เมื่อนำเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ที่มียีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน bla_{IMP} และ ยีน bla_{VIM}) มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบผลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า เชื้อที่มียีน bla_{IMP} ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อ No.4, 9, 10, 11, 18, 22, 23, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 40, 43, 45, 100, 101, 104, 117, 119, 127, 133, 136, 140 และ 142 เป็นยีน bla_{IMP} ชนิด IMP-14 (GenBank EMBL accession no GQ302617) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งอยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 374 – 561 (ภาพที่ 4.17-4.19) ส่วนเชื้อที่มียีน bla_{VIM} จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อ No.41 พบเป็นยีน bla_{VIM} ชนิด VIM-2 (GenBank EMBL accession no GQ853417) และลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งอยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 151-541 (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.17 : แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.4, 9, 10, 11, 18, 22, 23, 29, 31, 32 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *bla_{IMP}* ชนิด IMP-14 ในฐานะข้อมูล NCBI (GenBank EMBL accession no GQ302617)



5.2. ผลการศึกษาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase 24 ตัวอย่าง โดยวิธี pulsed field gel electrophoresis

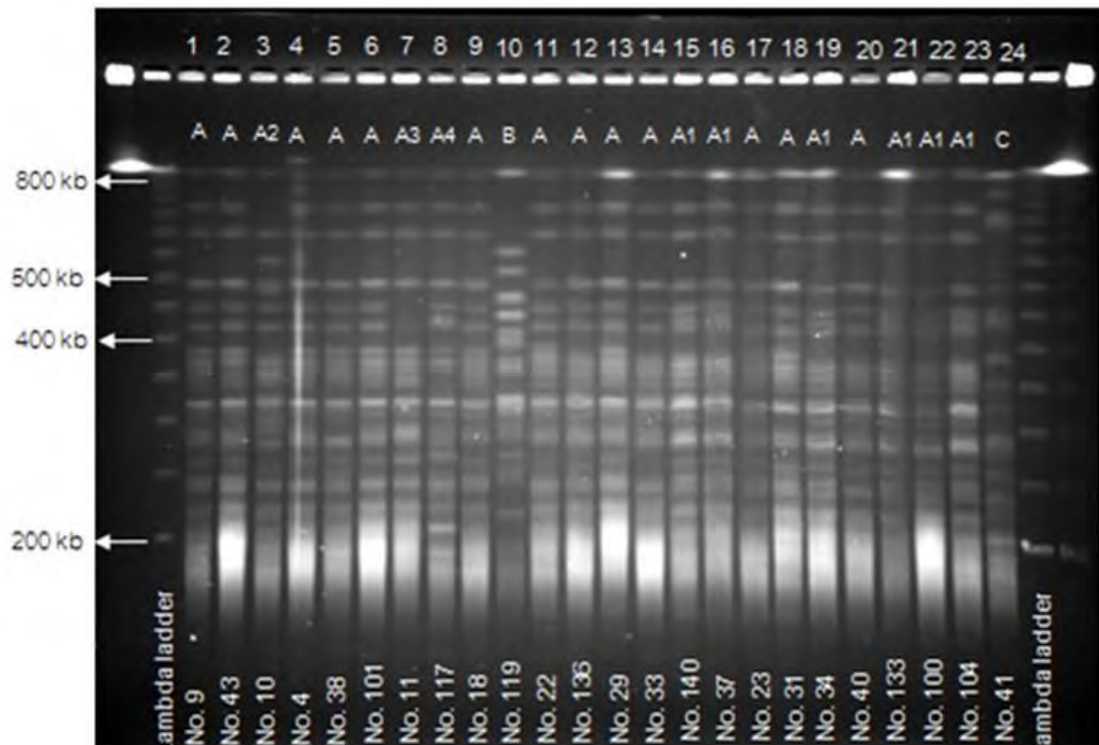
เมื่อคัดเลือกเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ที่มียีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน bla_{IMP} และ ยีน bla_{VIM}) จำนวน 24 ตัวอย่าง มาศึกษาถึงความหลากหลายของเชื้อด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis เมื่อใช้หลักเกณฑ์การวิเคราะห์ตามหลักการของ Tenover และคณะ⁽¹²⁴⁾ เปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* (ภาพที่ 4.21) พบว่า รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อที่มียีน bla_{IMP} (lane ที่ 1-23) และเชื้อที่มียีน bla_{VIM} (lane ที่ 24) มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาเฉพาะรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อที่มียีน bla_{IMP} พบว่า เชื้อส่วนใหญ่มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน สามารถจัดจำแนกรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้เป็น 2 รูปแบบหลักๆ คือ

- **ชนิด A** : ประกอบด้วย 5 กลุ่มย่อย ได้แก่
 - **A** : รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่ระหว่าง 250-800 กิโลเบส เชื้อจำนวน 13 ไอโซเลต อันได้แก่ *P. aeruginosa* No.9, 43, 4, 38, 101, 18, 22, 136, 29, 33, 23, 31 และ 40 จัดอยู่ในกลุ่มนี้
 - **A1** : รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในกลุ่มนี้แตกต่างจากชนิด A ตรงที่บริเวณระหว่าง 400-450 กิโลเบส มีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบเพิ่มขึ้นมา เชื้อจำนวน 6 ไอโซเลต อันได้แก่ *P. aeruginosa* No.140, 37, 34, 133, 100 และ 104 จัดอยู่ในกลุ่มนี้
 - **A2** : รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในกลุ่มนี้แตกต่างจากชนิด A ตรงที่ไม่ มีแถบดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่าง 650-700 กิโลเบส แต่มีแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมา 2 แถบ ขนาดประมาณ 500 และ 550 กิโลเบส มีเพียง ไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งก็คือ เชื้อ *P. aeruginosa* No.10
 - **A3** : รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในกลุ่มนี้แตกต่างจากชนิด A ตรงที่ แถบดีเอ็นเอหายไป 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่าง

400-450 กิโลเบส มีเพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งก็คือ เชื้อ *P. aeruginosa* No.11

➤ **A4** : รูปแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในกลุ่มนี้แตกต่างจากชนิด A ตรงที่แถบดีเอ็นเอหายไป 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่าง 300-400 กิโลเบส มีเพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งก็คือ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* No.117

○ **ชนิด B** : ลักษณะรูปแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น แตกต่างอย่างสิ้นเชิงกับรูปแถบดีเอ็นเอชนิด A มีเพียงเชื้อ *P. aeruginosa* No.119 ไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่ให้ลักษณะรูปแถบดีเอ็นเอชนิดนี้



ภาพที่ 4.21 : แสดงรูปแถบดีเอ็นเอของเชื้อจำนวน 24 ไอโซเลต ที่เกิดจากการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* และเปรียบเทียบความหลากหลายด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อ *P. aeruginosa* จากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือนเมษายน พ.ศ.2552 ในสิ่งส่งตรวจ 4 ประเภท ได้แก่ เลือด, ปัสสาวะ, เสมหะ และหนอง พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ได้มาจากสิ่งส่งตรวจเสมหะมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 42.7 รองลงมา คือ ปัสสาวะ คิดเป็นร้อยละ 30.0, หนอง คิดเป็นร้อยละ 24.7 และเลือด คิดเป็นร้อยละ 2.7 ตามลำดับ

ผลการศึกษาแบบแผนความไวและการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิด พบว่าเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้ง 150 ตัวอย่าง แสดงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* จากการพิจารณาตามกลุ่มโครงสร้างของยาปฏิชีวนะทั้ง 6 กลุ่ม แสดงอัตราการดื้อยาสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่ม quinolones ซึ่งประกอบไปด้วยยา levofloxacin (ร้อยละ 53.3) และยา ciprofloxacin (ร้อยละ 52.7) และกลุ่ม third-generation cephalosporins ได้แก่ ยา ceftazidime (ร้อยละ 50.0) รองลงมา คือ ยาในกลุ่ม β -lactam/inhibitor ซึ่งได้แก่ ยา cefoperazone/sulbactam (ร้อยละ 43.3) และยา piperacillin/tazobactam (ร้อยละ 42.0) สำหรับยาในกลุ่ม carbapenems ที่ประกอบด้วยยา meropenem (ร้อยละ 39.3) และยา imipenem (ร้อยละ 35.3) นั้น ถือได้ว่าเชื้อมีการดื้อยาในอัตราสูงใกล้เคียงกับยาในกลุ่ม fourth-generation cephalosporins ซึ่งได้แก่ยา cefepime (ร้อยละ 33.3) ส่วนยาในกลุ่ม aminoglycosides ที่ประกอบไปด้วยยา gentamicin (ร้อยละ 29.3) และยา amikacin (ร้อยละ 22.7) นั้น พบว่าเชื้อมีอัตราการดื้อยาในกลุ่มนี้ต่ำที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า มียาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่เชื้อทั้ง 150 ตัวอย่าง ให้ผลไวต่อยา (ร้อยละ 100) ซึ่งก็คือ ยา colistin เมื่อพิจารณา ยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษา เช่น ยาในกลุ่ม carbapenem และ fourth-generation cephalosporin จากการทดลองนี้พบว่า มีเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจเพียง 2 ใน 3 ของเชื้อกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดเท่านั้นที่ไวต่อยาทั้งสองกลุ่มนี้ ในขณะที่ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ พบการดื้อยา สูงถึงร้อยละ 50 จากผลการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าสามกลุ่ม จึงแสดงให้เห็นว่า เชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยนี้มีคุณสมบัติเป็น multidrug-

resistant *P. aeruginosa* (MDRPA) ในอัตราสูง และมีแนวโน้มทำให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อกลุ่มนี้ทำได้ยากลำบากมากขึ้น

การทดสอบความไวรับต่อยา imipenem ด้วยวิธี disk diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI ให้ผลต่างจากการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยา imipenem (MIC) ที่ยับยั้งเชื้อได้ด้วยวิธี E-test โดยพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างให้ผล resistant ด้วย E-test นั้นมีจำนวนน้อยกว่าคือ ร้อยละ 28.0 ในขณะที่ disc diffusion จะรายงานพบเชื้อตัวยานี้ถึง ร้อยละ 35.3 ในขณะที่ผลการทดสอบแบบ intermediate ของ E-test มีจำนวนถึงร้อยละ 16.7 แต่วิธี disc diffusion ให้ผลเป็น intermediate เพียงร้อยละ 5.3 ดังนั้นเชื้อที่ไวต่อยา imipenem เมื่อทดสอบด้วยวิธี E-test จึงมีเพียงร้อยละ 55.3 และวิธี disc diffusion จะรายงานผลว่ามีเชื้อที่ไวต่อยานี้ร้อยละ 59.3 จึงเป็นที่น่าสนใจว่าวิธีในการทดสอบเพื่อรายงานผลการทดสอบความไวรับต่อยา imipenem มีความแตกต่างกัน เมื่อใช้วิธีในการทดสอบที่ต่างกัน นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาในกลุ่มเชื้อตัวยานี้ทำให้พบว่า มีเชื้อที่มีค่า MIC ต่อยา imipenem มากกว่า 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงร้อยละ 92.9 (39 ตัวอย่าง ใน 42 ตัวอย่างของเชื้อตัวยานี้) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase โดยพบว่า เชื้อที่มีค่า MIC ต่อยา imipenem มากกว่า 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ได้

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี MBL E-test กับวิธี Modified Hodge Test ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 74 ตัวอย่าง พบว่า เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ได้นั้นจะถูกตรวจพบได้ด้วยการทดสอบทั้งสองวิธี ซึ่งพบว่ามีจำนวน 12 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 16.2 และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายของทั้งสองวิธี พบว่าวิธี Modified Hodge Test มีต้นทุนในการทดสอบที่ต่ำกว่ามาก จึงทำการทดสอบหาความชุกในการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับพืไนไทย ผลการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง พบว่า มีเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase จำนวน 28 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 18.7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กลไกการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่ทำให้เชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam ในอัตราสูง ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับโมเลกุล โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันหาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน bla_{IMP} และ ยีน bla_{VIM}) พบว่า กลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* มียีน bla_{IMP} 28 ตัวอย่าง คิดเป็น

ร้อยละ 18.7 และมียีน bla_{VIM} 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.7 แสดงว่า ยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย พบว่า ยีนชนิด IMP มีความชุกในการเกิดสูงกว่ายีนชนิด VIM

ผลการตรวจสอบหาความชุกของยีนในกลุ่ม class 1 integron (ยีน *Int1* และ ยีน *qacEDelta1* และยีน *Sul1*) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึแบบ multiplex ในเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า เชื้อมียีนในกลุ่ม class 1 integron ทั้งสิ้นถึง 50 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 ของเชื้อในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด นอกจากนี้ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ class 1 integron กับแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิด พบว่า ยีนในกลุ่ม class 1 integron มีความสัมพันธ์ต่อการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด (amikacin, gentamicin, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, levofloxacin, ciprofloxacin, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ต่อการดื้อต่อยา colistin ซึ่งแสดงว่า ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase รวมถึงยีนดื้อยาชนิดอื่นๆ ที่สามารถบรรจุอยู่ในโครงสร้างของ integron ได้ จะมีโอกาสแพร่กระจายไปอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ integron ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น mobile element ที่มีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดและส่งผ่านยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันได้

จากการศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในกลุ่มเชื้อที่ให้ผลบวกจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับจีโนมไทป์ทั้ง 29 ตัวอย่าง โดยตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อที่มียีน bla_{IMP} ทั้ง 28 ตัวอย่าง เป็นยีน bla_{IMP} ชนิด IMP-14 (GenBank EMBL accession no GQ302617) ส่วนเชื้อที่มียีน bla_{VIM} เพียง 1 ตัวอย่างนั้น พบเป็นยีน bla_{VIM} ชนิด VIM-2 (GenBank EMBL accession no GQ853417) แสดงว่า อุบัติการณ์การดื้อยา imipenem มีสาเหตุมาจากกลไกการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase โดยเป็นผลมาจากบทบาทของยีน bla_{IMP} ชนิด IMP-14 และยีน bla_{VIM} ชนิด VIM-2

เมื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase (ยีน bla_{IMP} และ ยีน bla_{VIM}) จำนวน 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis และวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้หลักเกณฑ์การวิเคราะห์ตามหลักการของ Tenover และคณะ⁽¹²⁴⁾ พบว่า เชื้อที่มี ยีน bla_{IMP} และ ยีน bla_{VIM} มีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาเฉพาะเชื้อที่มียีน bla_{IMP} พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแบ่งได้

เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม A และ B ซึ่งเชื้อที่มียีน bla_{IMP} เกือบทั้งหมดถูกจัดอยู่ในกลุ่ม A มีเพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้นที่จัดอยู่ในกลุ่ม B ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่า อุบัติการณ์การติดเชื้อดื้อยาที่มีสาเหตุมาจากเชื้อที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ภายในโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ระหว่างผู้ป่วย

2. อภิปรายผลการวิจัย

ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดของเชื้อ *P. aeruginosa* นับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในหลายๆประเทศทั่วโลก ปัญหานี้นำไปสู่อัตราการเจ็บป่วย และอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งยังส่งผลให้ไม่สามารถหายาปฏิชีวนะที่เหมาะสมมารักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาดังกล่าวได้ สำหรับประเทศไทย ข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่า เชื้อ

P. aeruginosa มีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยาต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้น โดยการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของเชื้อชนิดนี้ มีอัตราการดื้อต่อยา imipenem เพิ่มขึ้นถึงประมาณ 3 เท่า ภายในระยะเวลาเพียง 11 ปี กล่าวคือ เพิ่มจากร้อยละ 8.64 ในปีพ.ศ.2541 เป็นร้อยละ 22.50 ในปีพ.ศ. 2552 เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยครั้งนี้ ที่พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยา imipenem และ meropenem ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม carbapenems สูงถึง ร้อยละ 35.3 และร้อยละ 39.3 ตามลำดับ อุบัติการณ์การดื้อยาที่เกิดขึ้นนี้ ถือได้ว่าเป็นอัตราที่น่าวิตกกังวล เนื่องจากยาในกลุ่มนี้เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงและออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อหลายชนิด ทั้งนี้ เชื้อยังมีอัตราการดื้อต่อยากลุ่มอื่นๆ เช่น quinolones, third-generation cephalosporins, β -lactam/inhibitor ถึงประมาณร้อยละ 50 ซึ่งเป็นอัตราที่สูงมาก แต่เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า เชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 150 ตัวอย่าง ต่างก็ไวต่อยา colistin จึงเป็นไปได้ที่จะใช้ยา colistin ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาและไม่สามารถรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆได้ ผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของหลายๆ คณะ ที่พบว่า เมื่อทำการทดลองในหลอดทดลอง มีเพียงยา tigecycline และ colistin เท่านั้น ที่สามารถยับยั้งเชื้อที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ที่มีคุณสมบัติเป็น multi-drug resistance ได้⁽¹³⁴⁻¹⁴⁴⁾ อย่างไรก็ตาม ยา colistin เป็นยาที่มีผลข้างเคียงสูง เช่น เป็นพิษต่อไต ทำให้เกิด acute tubular necrosis และเป็นพิษต่อระบบประสาท และยา tigecycline ก็เป็นยาที่มีผลข้างเคียง ทำให้ผู้ที่รับประทานยาดังกล่าวเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ขึ้นได้ หากนำมาใช้ในการรักษา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพิจารณาอย่างละเอียดและถี่ถ้วน^(72, 145)

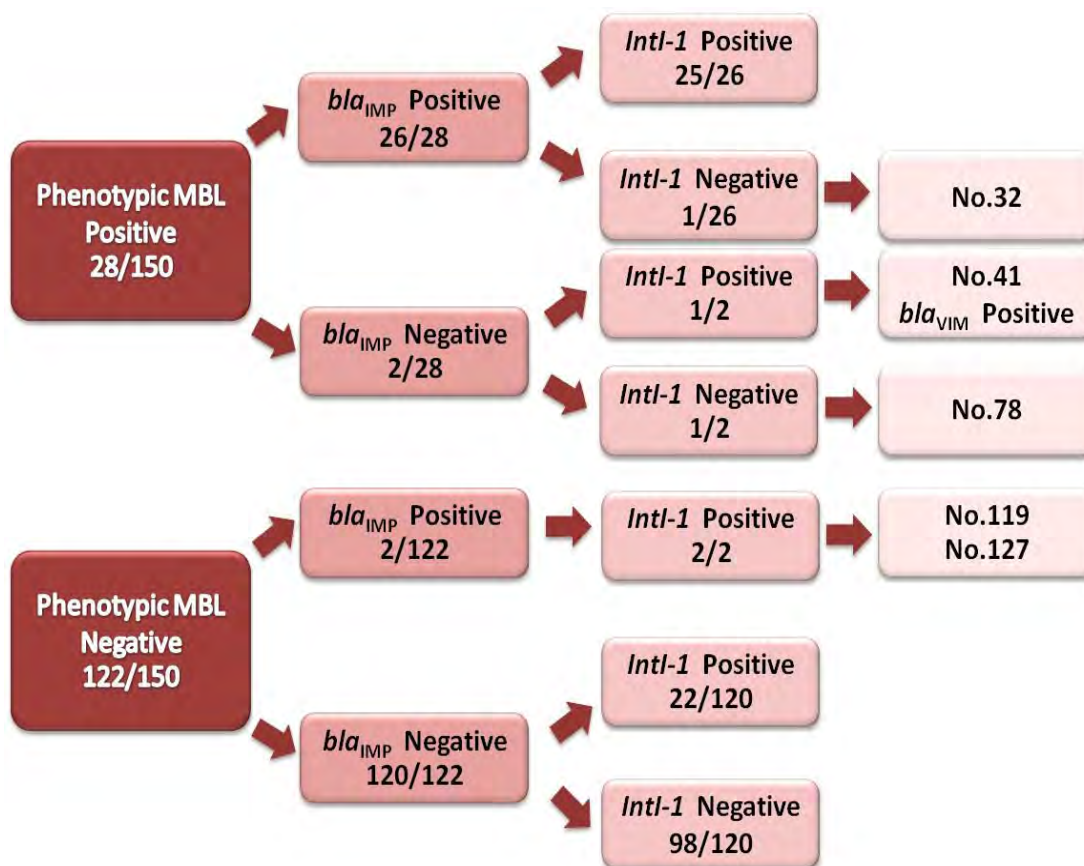
เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิด ในเชื้อ

P. aeruginosa ที่มีและไม่มียีนในกลุ่ม class 1 integron โดยใช้สถิติ Pearson Chi-square test พบว่ายีนในกลุ่ม class 1 integron มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value <0.01) ต่อการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ยกเว้น colistin สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gu B และคณะ⁽¹⁴⁶⁾ ที่กล่าวว่า ในเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *A. baumannii* พบว่ามีโครงสร้างของ integrons ซึ่ง

สัมพันธ์ต่อการดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides, quinolones และ β -lactam อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันกับ งานวิจัยของ Japoni A และคณะ⁽¹⁴⁷⁾ ได้กล่าวว่า integrons ในเชื้อ *E. coli* มีความสัมพันธ์ต่อการดื้อต่อยา gentamicin, amikacin, cephalotin, ciprofloxacin, nalidixic acid, norfloxacin และ co-trimoxazole อย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ระดับพีโนไทป์ ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี Modified Hodge Test ให้ผลไม่แตกต่างจากการทดสอบด้วยวิธี MBL E-test และเมื่อทำการยืนยันผลด้วยการตรวจในระดับจีโนไทป์ โดยอาศัยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส พบว่า ผลการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ และจีโนไทป์ในเชื้อส่วนใหญ่สอดคล้องกัน จึงมีความเป็นไปได้และมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ด้วยวิธี Modified Hodge Test มาปรับใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์แทนการเลือกใช้วิธี MBL E-test เนื่องจากเมื่อคิดต้นทุนต่อหนึ่งการทดสอบเปรียบเทียบกันแล้ว วิธี MBL E-test ต้องใช้ต้นทุนที่สูงกว่าวิธี Modified Hodge Test มาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee K และคณะ⁽¹²⁹⁾ ที่สนับสนุนให้ใช้ วิธี Modified Hodge Test สำหรับตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื้อ *P. aeruginosa*, *P. putida* และ *Acinetobacter* spp. ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

จากผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ทั้งในระดับพีโนไทป์ และในระดับจีโนไทป์ รวมถึงการศึกษาอื่นในกลุ่ม class 1 integron ในงานวิจัยครั้งนี้ สามารถสรุปข้อมูลได้ดังภาพที่ 5.1 ซึ่งพบว่า มี 1 ตัวอย่าง (No.32) ที่มียีน bla_{IMP} แต่ให้ผลลบต่อยีนในกลุ่ม class 1 integron ทั้งนี้ ยีน bla_{IMP} อาจจะแทรกอยู่ใน class อื่นๆของ integron หรือ mobile elements อื่นๆได้ เช่น class 3 integron เป็นต้น^(18, 59) นอกจากนี้ ยังพบว่า มีเชื้อ 2 ตัวอย่าง (No.41 และ No.78) ที่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ แต่กลับไม่มียีน bla_{IMP} สามารถอธิบายได้ว่า ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในเชื่อดังกล่าว อาจจะเป็นยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ยีน bla_{IMP} เช่น ชนิด VIM, GIM และ SPM เป็นต้น และเมื่อตรวจสอบยีน bla_{VIM} ในเชื้อ No.41 พบว่าเชื้อมียีน bla_{VIM} ชนิด VIM-2



ภาพที่ 5.1 : แสดงความสัมพันธ์ของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ และในระดับโมเลกุล รวมถึงยีนในกลุ่ม class 1 integron

เป็นที่น่าสนใจว่า มีเชื้อ 2 ตัวอย่าง (No.119 และ No.127) มียีน *bla*_{IMP} และยีนในกลุ่ม class 1 integron แต่กลับไม่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ สามารถอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ว่า ตำแหน่งของยีนดื้อยาที่บรรจุอยู่ใน gene cassette ในโครงสร้างของ integron ส่งผลต่อการเกิด expression กล่าวคือ หากยีนดื้อยาบรรจุอยู่ใน class 1 integron ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม อาจทำให้ไม่มีการแสดงออกของเอนไซม์ได้^(83, 93, 148)

งานวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นการเกิดขึ้นของยีน *bla*_{IMP-14} และ *bla*_{VIM-2} ในเชื้อ

P. aeruginosa โดยยีน *bla*_{IMP-14} มีการรายงานครั้งแรกในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ในประเทศไทย ในปี 2004 (GenBank no.GQ302617) แต่จนถึงปัจจุบัน ยังไม่พบการรายงานของยีนชนิดนี้แต่อย่างใด ส่วนยีน *bla*_{VIM-2} มีรายงานครั้งแรกในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ในประเทศฝรั่งเศส ในปี 2000⁽⁶¹⁾ หลังจากนั้น มีรายงานการค้นพบยีน

bla_{VIM-2} ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ประเทศสเปน⁽¹⁴⁹⁾, เยอรมนี⁽¹⁵⁰⁾, ตุรกี⁽¹⁵¹⁾, เกาหลี⁽¹⁵²⁾ และ ญี่ปุ่น⁽¹⁵³⁾ เป็นต้น

เมื่อพิจารณาความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase จำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่า เชื้อที่มีรูปแบบดีเอ็นเอชนิด A และสายพันธุ์ใกล้เคียง (closely related) กับชนิด A (A1-A4) ส่วนใหญ่เป็นสิ่งส่งตรวจประเภทปัสสาวะ ซึ่งมาหอพักผู้ป่วยที่ต่างกันของโรงพยาบาล จากตารางในภาคผนวก จะเห็นได้ว่า ใน หอพักผู้ป่วยที่ 1 (ward 1) และ หอพักผู้ป่วยที่ 3 (ward 3) เชื้อทุกตัวต่างก็มีรูปแบบดีเอ็นเอเป็นชนิด A อาจเป็นไปได้ว่า มีการแพร่กระจายเชื้อสายพันธุ์เดียวกันระหว่างหอพักของผู้ป่วย สำหรับในหอพักผู้ป่วย 2 (ward 2) พบว่ามีการติดเชื้อหลายสายพันธุ์ แต่เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันทั้งสิ้น (รูปแบบดีเอ็นเอชนิด A, A1 และ A2) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า เชื้อจากสิ่งส่งตรวจประเภทปัสสาวะ, เสมหะ และเลือด ของผู้ป่วยรายเดียวกัน (Patient No.4) มีการติดเชื้อต่างสายพันธุ์กันในแต่ละระบบ ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า ช่วงแรกของการรักษาผู้ป่วยได้ติดเชื้อสายพันธุ์หนึ่ง(รูปแบบดีเอ็นเอชนิด A2) และหลังจากเข้ารับการรักษา ได้พบการติดเชื้ออีกสายพันธุ์ (รูปแบบดีเอ็นเอชนิด A) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่กระจายภายในโรงพยาบาล ทั้งนี้ยังมีเชื้ออีก 2 ตัวอย่าง (No.119 และ No.41) ที่แสดงรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจนกับเชื้อตัวอื่น ทำให้พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อใด เมื่อพิจารณาจากข้อมูลของความไวรับต่อยาและจีโนมที่พบพบว่า เชื้อที่แสดงรูปแบบดีเอ็นเอชนิด C มียีน bla_{VIM} และอีกสายพันธุ์ที่แสดงรูปแบบดีเอ็นเอชนิด B พบยีน bla_{IMP} แต่พบว่าไวต่อยาปฏิชีวนะ ทั้ง 11 ชนิดที่ใช้ทดสอบ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 23 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็น multidrug-resistant ทุกสายพันธุ์

สำหรับประเทศไทย ความชุกของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ยังไม่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ส่งผลให้เชื้อดื้อยาที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ถูกละเลย และมองข้ามความสำคัญ จากผลการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า ในช่วงระยะเวลาเพียงสองเดือน (มีนาคม-เมษายน พ.ศ.2552) เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน bla_{IMP} และมียีน bla_{VIM} มีอัตราสูงถึงร้อยละ 18.7 (28/150) และร้อยละ 0.7 (1/150) ตามลำดับ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ ยังชี้ให้เห็นว่า การแพร่กระจายของจุลชีพที่มีการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น และหากปัญหานี้ไม่ได้รับการดูแล ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase เหล่านี้ ก็มีความเป็นไปได้ที่จะส่งผ่านไปยังเชื้อจุลชีพหลากหลายสายพันธุ์ เช่น เชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae*⁽⁵⁹⁾ เนื่องจากยีนกลุ่มที่ควบคุม

การสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase พบว่ามีการบรรจุอยู่ใน class 1 integron ซึ่งเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมที่มีความสามารถในการถ่ายถอดยีนดื้อยาระหว่างสายพันธุ์ ดังนั้นจึงเป็นเรื่องเร่งด่วนสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรเข้ามามีบทบาทและร่วมมือกันเพื่อลดอัตราการดื้อยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาเหล่านี้

ทางผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า การศึกษาครั้งนี้จะเป็นจุดเริ่มต้นอันสำคัญ ที่จะส่งผลให้ทุกหน่วยงานที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการควบคุมแบคทีเรียดื้อยาในประเทศไทยได้ตระหนักและเล็งเห็นถึงความสำคัญของการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ของจุลชีพ และมุ่งศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้กันมากขึ้น เพื่อข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการจัดการยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการรักษาผู้ป่วย ในขณะที่เดียวกันการจัดการยาปฏิชีวนะดังกล่าวก็ต้องควบคุมให้มีโอกาสเกิดเชื้อดื้อยาในอนาคต น้อยที่สุดด้วย

3. ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ในระดับพีโนไทป์ ควรศึกษาหลายวิธีเปรียบเทียบกัน เช่น วิธี combined disc test, double-disc synergy test เป็นต้น เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์ดังกล่าว การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสม ให้ผลไว ถูกต้อง และจำเพาะ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการตรวจในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
2. การศึกษาความชุกของยีนในกลุ่ม metallo- β -lactamase ควรศึกษายีนในกลุ่มนี้ทั้งหมด เช่น *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM} เป็นต้น เพื่อจะได้ข้อมูลที่ครอบคลุม และมีความสมบูรณ์มากที่สุด
3. การศึกษาโครงสร้างของ integron ควรศึกษา class อื่นๆของ Integron ร่วมด้วย เนื่องจาก ในส่วนของการอภิปรายผลการวิจัย พบว่า มีเชื้อ 1 ตัวอย่างที่มียีน *bla*_{IMP} แต่ให้ผลลบต่อยีนในกลุ่ม class 1 integron ซึ่ง ยีน *bla*_{IMP} อาจจะแทรกอยู่ใน class อื่นๆของ integron ได้ การศึกษาเพิ่มเติมจะช่วยให้สรุปข้อมูลได้ว่า ยีนดังกล่าวบรรจุอยู่ในโครงสร้างของ integron หรือ mobile elements อื่นๆ
4. จากผลการศึกษาคั้งนี้ จะเห็นได้ว่าการแพร่กระจายของเชื้อที่มียีนดื้อยาภายในโรงพยาบาลเกิดขึ้น เพื่อควบคุมยีนดื้อยาดังกล่าว ควรเก็บตัวอย่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล เช่น บริเวณอ่างน้ำ เครื่องมือแพทย์ สารฆ่าเชื้อต่างๆ เป็นต้น มาตรวจสอบเพิ่มเติมว่ามียีนดื้อยาหรือไม่ เพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อ และป้องกันไม่ให้เชื้อติดต่อสู่ผู้ป่วย
5. การเพิ่มขนาดตัวอย่างในการศึกษาเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อความน่าเชื่อถือทางสถิติของข้อมูล

รายการอ้างอิง

- (1) นลินี อัครวโกคี, สมบัติ ลีลาสุภาศรี และ สุรภี เทียนกริม. โรคติดเชื้อที่ปรากฏภายหลังปี 2000 Infectious Diseases Beyond 2000. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก แพ็บลิชชิง; 2543.
- (2) Martinez, J.L., et al. A global view of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 33, 1 (January 2009): 44-65.
- (3) Normark, B.H., and Normark, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. J Intern Med. 252, 2 (August 2002): 91-106.
- (4) Tsuchimochi, N., Takuma, T., Shimono, N., Nagasaki, Y., Uchida, Y., and Harada, M. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological analysis of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Chemother. 14, 2 (April 2008): 99-104.
- (5) Apisarntharak, A., Buppunharun, W., Tiengrim, S., Sawanpanyalert, P., and Aswapokee, N. An overview of antimicrobial susceptibility patterns for gram-negative bacteria from the National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) program from 2000 to 2005. J Med Assoc Thai. 92, 4 (August 2009): S91-4.
- (6) Dejsirilert, S., et al. National Antimicrobial Resistance Surveillance, Thailand (NARST) data among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand from 2000 to 2005. J Med Assoc Thai. 92, 4 (August 2009): S68-75.
- (7) Mootsikapun, P., Trakulsomboon, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N., and Suankratay, C. An overview of antimicrobial susceptibility patterns of gram-positive bacteria from National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) program from 2000 to 2005. J Med Assoc Thai. 92, 4 (August 2009): S87-90.

- (8) Dejsirilert, S., Tiengrim, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N., and Malathum, K. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*: six years of National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) surveillance. J Med Assoc Thai. 92, 4 (August 2009): S34-45.
- (9) Amabile-Cuevas, C. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. J Infect Dev Ctries. 4, 3 (March 2010): 126-31.
- (10) Crespo, M.P., et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. J Clin Microbiol. 42, 11 (November 2004): 5094-101.
- (11) Goossens, H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group. Clin Microbiol Infect. 9, 9 (September 2003): 980-3.
- (12) Karlowsky, J.A., et al. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. 47, 5 (May 2003): 1681-8.
- (13) Karlowsky, J.A., et al. Stable antimicrobial susceptibility rates for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the 2001-2003 tracking resistance in the United States today surveillance studies. Clin Infect Dis. 40, 2 (February 2005): S89-98.
- (14) Wang, H., and Chen, M. Surveillance for antimicrobial resistance among clinical isolates of gram-negative bacteria from intensive care unit patients in China, 1996 to 2002. Diagn Microbiol Infect Dis. 51,3 (March 2005): 201-8.

- (15) Hancock, R.E. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis. 27, 1(August 1998): S93-9.
- (16) Livermore, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 34, 5 (March 2002): 634-40.
- (17) Pitout, J.D., Sanders, C.C., and Sanders, W.E. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. Am J Med. 103, 1 (July 1997): 51-9.
- (18) Strateva, T., and Yordanov, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 58, 9 (September 2009): 1133-48.
- (19) Trevor, J., and Franklin, G.A. Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action. 6thed. United States of America: Springer, 2005.
- (20) สมหวัง ด้านชัยจิตร. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: บริษัท แอล ที เพรส จำกัด, 2544.
- (21) Holmberg, S.D., Solomon, S.L., and Blake, P.A. Health and economic impacts of antimicrobial resistance. Rev Infect Dis. 9, 6 (November 1987): 1065-78.
- (22) Phelps, C.E. Bug/drug resistance. Sometimes less is more. Med Care. 27, 2 (February 1989): 194-203.
- (23) Richard, E., Reese M.D., Robert, F., and Betts, M. A Practical Approach to Infectious Diseases. 4thed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.
- (24) Balfour, J.A., Bryson, H.M., and Brogden, R.N. Imipenem/cilastatin: an update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections. Drugs. 51, 1 (January 1996): 99-136.
- (25) Pitout, J.D., et al. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. J Clin Microbiol. 45, 2 (February 2007): 294-8.

- (26) Boonkerd, N., Pibalpakdi, P., Tiloklurs, M., and Niumsup, P.R. Class 1 integron containing metallo beta-lactamase gene *bla*_{IMP-1} in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. J Infect Chemother. 15, 4 (August 2009): 257-61.
- (27) Robert, C., and Ebbing, L. Antimicrobial Resistance: Problem Pathogens and Clinical Countermeasures. 1st ed. United States: Informa Healthcare, 2007.
- (28) Geo, F.B., Janet, B., and Stephen, M. Medical Microbiology. 24th ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, 2007.
- (29) ภัทรชัย กীরติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: หจก.วี.เจ. พรินติ้ง, 2549.
- (30) Morrison, A.J., and Wenzel, R.P. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. 6, 3 (September 1984): S627-42.
- (31) Navon-Venezia, S., Ben-Ami, R., and Carmeli, Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. Curr Opin Infect Dis. 18, 4 (August 2005): 306-13.
- (32) Katzung, B., Masters, S., and Trevor, A. Basic and Clinical Pharmacology. 11th ed. New York: the McGraw-Hill Companies, Inc., 2009.
- (33) Lambert, P.A., Allison, D.G., and Gilbert, P. Molecular Medical Microbiology. London, UK: Academic Press, 2002.
- (34) Kong, K.F., Schneper, L., and Mathee, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS. 118,1 (January 2010): 1-36.
- (35) Joel, G., et al. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1996.
- (36) Nakae, T. Outer-membrane permeability of bacteria. Crit Rev Microbiol. 13, 1 (1986): 1-62.

- (37) Tomasz, A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu Rev Microbiol. 33 (1979): 113-37.
- (38) Levine, B.B. Skin rashes with penicillin therapy: current management. N Engl J Med. 286, 1 (January 1972): 42-3.
- (39) Handwerger, S., and Tomasz, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Rev Infect Dis. 7, 3 (May 1985): 368-86.
- (40) Garzone, P., Lyon, J., and Yu, V.L. Third-generation and investigational cephalosporins: I. Structure-activity relationships and pharmacokinetic review. Drug Intell Clin Pharm. 17, 7-8 (July 1983): 507-15.
- (41) Harold, P.L., and Francis W. Antibiotic and Chemotherapy. 6th ed. London: Churchill Livingstone, 1992.
- (42) Schoonover, L.L., Occhipinti, D.J., Rodvold, K.A., and Danziger, L.H. Piperacillin/tazobactam: a new beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. Ann Pharmacother. 29, 5 (May 1995): 501-14.
- (43) Shimada, J., and Kawahara, Y. Overview of a new carbapenem, panipenem/betamipron. Drugs Exp Clin Res. 20, 6 (1994): 241-5.
- (44) Nicolau, D.P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. Expert Opin Pharmacother. 9, 1 (January 2008): 23-37.
- (45) Livermore, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 47, 3 (March 2001): 247-50.
- (46) Pai, H., Kim, J., Lee, J.H., Choe, K.W., and Gotoh, N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 45, 2 (February 2001): 480-4.
- (47) Pechere, J.C., and Kohler, T. Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 5, 1 (March 1999): S15-S8.

- (48) Richard, G., Kim, L., Abigail, S., and Taber, H. Bacterial Resistance to Antimicrobials. 2nd ed. United States of America: Taylor & Francis, Inc., 2007.
- (49) Bonomo, R.A., and Szabo, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 43, 2 (September 2006): S49-56.
- (50) Livermore, D.M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 8, 4 (October 1995): 557-84.
- (51) Sacha, P., et al. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. Folia Histochem Cytobiol. 46, 2 (2008): 137-42.
- (52) Pfeifer, Y., Cullik, A., and Witte, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol. 300, 6 (August 2010): 371-9.
- (53) Ambler, R.P. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 289, 1036 (May 1980): 321-31.
- (54) Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 39, 6 (June 1995): 1211-33.
- (55) Maltezou, H.C. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? Int J Antimicrob Agents. 33, 5 (May 2009): 405 e1-7.
- (56) Queenan, A.M., and Bush, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 20, 3 (July 2007): 440-58.
- (57) Nordmann, P., and Poirel, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 8, 6 (June 2002): 321-31.

- (58) Senda, K., et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. J Clin Microbiol. 34, 12 (December 1996): 2909-13.
- (59) Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., and Nordmann, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 18, 2 (April 2005): 306-25.
- (60) Brizio, A., Conceicao, T., Pimentel, M., Da Silva, G., and Duarte, A. High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 27, 1 (January 2006): 27-31.
- (61) Poirel, L., et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrob Agents Chemother. 44, 4 (April 2000): 891-7.
- (62) Pournaras, S., Tsakris, A., Maniati, M., Tzouvelekis, L.S., and Maniatis, A.N. Novel variant (*bla*(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene *bla*(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 46, 12 (December 2002): 4026-8.
- (63) Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., and Mitsuhashi, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 35, 1 (January 1991): 147-51.
- (64) Senda, K., et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 40, 2 (February 1996): 349-53.
- (65) Ito, H., et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother. 39, 4 (April 1995): 824-9.

- (66) Livermore, D.M., and Woodford, N. Carbapenemases: a problem in waiting?
Curr Opin Microbiol. 3, 5 (October 2000): 489-95.
- (67) Shibata, N., et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol. 41, 12 (December 2003): 5407-13.
- (68) Lauretti, L., et al. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 43, 7 (July 1999): 1584-90.
- (69) Walsh, T.R. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 11, 6 (November 2005): 2-9.
- (70) Kim, I.S., et al. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo-beta-lactamase producers in a Korean hospital. Microb Drug Resist. 11, 4 (2005): 355-9.
- (71) Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J., and Walsh, T.R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla_{GIM-1}*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 48, 12 (December 2004): 4654-61.
- (72) Gupta, V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Expert Opin Investig Drugs. 17, 2 (February 2008): 131-43.
- (73) Lee, K., et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla(SIM-1)*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother. 49, 11 (November 2005): 4485-91.
- (74) Sekiguchi, J., et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 52, 11 (November 2008): 4194-7.

- (75) Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y., and Yu, Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother. (March 2011).
- (76) Hsueh, P.R. New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among Enterobacteriaceae. J Formos Med Assoc. 109, 10 (October 2010): 685-7.
- (77) Kumarasamy, K.K., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. 10, 9 (September 2010): 597-602.
- (78) Peirano, G., Ahmed-Bentley, J., Woodford, N., and Pitout, J.D. New Delhi metallo-beta-lactamase from traveler returning to Canada. Emerg Infect Dis. 17, 2 (February 2011): 242-4.
- (79) Poirel, L., Lagrutta, E., Taylor, P., Pham, J., and Nordmann, P. Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. Antimicrob Agents Chemother. 54, 11 (November 2010): 4914-6.
- (80) Tijet, N., et al. New Delhi metallo-beta-lactamase, Ontario, Canada. Emerg Infect Dis. 17, 2 (February 2011): 306-7.
- (81) Ricky, V., Philip, M., and Bourke, B. Bacterial Genomes and Infectious Diseases. 1st ed. United States of America: Humana Press, 2006.
- (82) Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E., and Stokes, H.W. Integrins: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol. 15, 7 (July 2007): 301-9.
- (83) Rowe-Magnus, D.A., and Mazel, D. The role of integrins in antibiotic resistance gene capture. Int J Med Microbiol. 292, 2 (July 2002): 115-25.
- (84) Weldhagen, G.F. Integrins and beta-lactamases--a novel perspective on resistance. Int J Antimicrob Agents. 23, 6 (June 2004): 556-62.

- (85) Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E.B., Labia, R., and Nordmann, P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother. 43, 3 (March 1999): 573-81.
- (86) Docquier, J.D., et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 47, 5 (May 2003): 1522-8.
- (87) Ploy, M.C., Courvalin, P., and Lambert, T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, cmlA2 and qacF. Antimicrob Agents Chemother. 42, 10 (October 1998): 2557-63.
- (88) Kim, S., et al. Occurrence and distribution of various genetic structures of class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from foodborne disease patients in Korea for 16 years. Foodborne Pathog Dis. 8, 2 (February 2011): 319-24.
- (89) Xu, Z., et al. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. Diagn Microbiol Infect Dis. 68, 3 (November 2010): 315-7.
- (90) Arakawa, Y., et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother. 39, 7 (July 1995): 1612-5.
- (91) Michael, S., and Clarence, I.K. Horizontal Gene Transfer. 2nded: Springer, 1998.
- (92) Bennett, P.M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J Antimicrob Chemother. 43, 1 (January 1999): 1-4.
- (93) Fluit, A.C., and Schmitz, F.J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18, 11 (November 1999): 761-70.

- (94) Zhang, H., et al. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. Microbiol Immunol. 48, 9 (2004): 639-45.
- (95) Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., and Mabilat, C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. Microb Drug Resist. 1, 3 (1995): 195-202.
- (96) Schmitz, F.J., et al. Increased prevalence of class I integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella species*, and *Enterobacter species* isolates over a 7-year period in a German university hospital. J Clin Microbiol. 39, 10 (October 2001): 3724-6.
- (97) Arakawa, Y., et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol. 38, 1 (January 2000): 40-3.
- (98) Yong, D., et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 40, 10 (October 2002): 3798-801.
- (99) Lee, K., et al. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. J Microbiol Methods. 83, 2 (November 2010): 149-52.
- (100) Walsh, T.R., Bolmstrom, A., Qwarnstrom, A., and Gales, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol. 40, 8 (August 2002): 2755-9.
- (101) Picao, R.C., et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. J Clin Microbiol. 46, 6 (June 2008): 2028-37.

- (102) Yan, J.J., Wu, J.J., Tsai, S.H., and Chuang, C.L. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis. 49, 1 (May 2004): 5-11.
- (103) Mendes, R.E., et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol. 45, 2 (February 2007): 544-7.
- (104) Osano, E., et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother. 38, 1 (January 1994): 71-8.
- (105) Ode, T., et al. Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. Int J Antimicrob Agents. 34, 4 (October 2009): 347-50.
- (106) Chen, L.R., Zhou, H.W., Cai, J.C., Zhang, R., and Chen, G.X. Combination of IMP-4 metallo-beta-lactamase production and porin deficiency causes carbapenem resistance in a *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. Diagn Microbiol Infect Dis. 65, 2 (October 2009): 163-7.
- (107) Yang, Q., et al. Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. Antimicrob Agents Chemother. 54, 1 (January 2010): 573-7.
- (108) Espedido, B.A., Partridge, S.R., and Iredell, J.R. bla(IMP-4) in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. Antimicrob Agents Chemother. 52, 8 (August 2008): 2984-7.

- (109) Zhao, W.H., Chen, G., Ito, R., and Hu, Z.Q. Relevance of resistance levels to carbapenems and integron-borne *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-7}, *bla*_{IMP-10} and *bla*_{VIM-2} in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 58, 8 (August 2009): 1080-5.
- (110) Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennett, D.M., Jones, R.N., and Walsh, T.R. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. J Antimicrob Chemother. 55, 1 (January 2005): 61-70.
- (111) Bush, K., et al. Comment on: Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. J Antimicrob Chemother. 64, 1 (July 2009): 212-3.
- (112) Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, T.R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? Microbiol Mol Biol Rev. 70, 2 (June 2006): 296-316.
- (113) Cardoso, O., Alves, A.F., and Leitao, R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. Int J Antimicrob Agents. 31, 4 (April 2008): 375-9.
- (114) Boucher, H.W., et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 48, 1 (January 2009): 1-12.
- (115) Livermore, D.M. Has the era of untreatable infections arrived? J Antimicrob Chemother. 64, 1 (September 2009): i29-36.
- (116) Projan, S.J. Whither antibacterial drug discovery? Drug Discov Today. 13, 7-8 (April 2008): 279-80.
- (117) Cagnacci, S., et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. J Antimicrob Chemother. 61, 2 (February 2008): 296-300.

- (118) Souli, M., et al. Clinical experience of serious infections caused by Enterobacteriaceae producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek University Hospital. Clin Infect Dis. 46, 6 (March 2008): 847-54.
- (119) Yildirim, I., Ceyhan, M., Gur, D., Mugnaioli, C., and Rossolini, G.M. First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. J Chemother. 19, 4 (August 2007): 467-8.
- (120) Galani, I., et al. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1 in Greece. J Antimicrob Chemother. 59, 3 (March 2007): 578-9.
- (121) Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., Flevari, K., Tsakiri, M., and Douzinas, E.E. *Providencia stuartii* with VIM-1 metallo-beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 60, 1 (July 2007): 183-4.
- (122) Tsakris, A., et al. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 60,1 (July 2007): 136-9.
- (123) Miriagou, V., Tzelepi, E., Daikos, G.L., Tassios, P.T., and Tzouvelekis, L.S. Panresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 55, 5 (May 2005): 810-1.
- (124) Tenover, F.C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33, 9 (September 1995): 2233-9.
- (125) Martins, A.F., Zavascki, A.P., Gaspareto, P.B., and Barth, A.L. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. Infection. 35, 6 (December 2007): 457-60.

- (126) Barry, A.L., and Jones, R.N. Criteria for disk susceptibility tests and quality control guidelines for the cefoperazone-sulbactam combination. J Clin Microbiol. 26, 1 (January 1988): 13-7.
- (127) Richard, S., Lynn, S., and Goodwin, A.C. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. 1st ed. United States of America: CRC Press, 2007.
- (128) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- (129) Lee, K., et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect. 7, 2 (February 2001): 88-91.
- (130) Hodge, W., Ciak, J., and Tramont, E.C. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol. 7, 1 (January 1978): 102-3.
- (131) John, F. T., Alicia, L., and Ragout, S.. Public Health Microbiology: Methods and Protocols. 1st ed: Humana Press, 2004.
- (132) Ellington, M.J., Kistler, J., Livermore, D.M., and Woodford, N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 59, 2 (February 2007): 321-2.
- (133) Goering, R.V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infect Genet Evol. 10, 7 (October 2010): 866-75.
- (134) Castanheira, M., Sader, H.S., Deshpande, L.M., Fritsche, T.R., and Jones, R.N. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY

- Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 52, 2 (February 2008): 570-3.
- (135) Cipriano, R., et al. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. Microb Drug Resist. 13, 2 (2007): 142-6.
- (136) Cornaglia, G., Mazzariol, A., Lauretti, L., Rossolini, G.M., and Fontana, R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. Clin Infect Dis. 31, 5 (November 2000): 1119-25.
- (137) Hirakata, Y., et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 37, 1 (July 2003): 26-32.
- (138) Kasiakou, S.K., et al. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 49, 8 (August 2005): 3136-46.
- (139) Kassis-Chikhani, N., et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a French university hospital. J Antimicrob Chemother. 57, 1 (January 2006): 142-5.
- (140) Laupland, K.B., et al. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. J Infect Dis. 192, 9 (November 2005): 1606-12.
- (141) Patzer, J., et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). J Antimicrob Chemother. 53, 3 (March 2004): 451-6.

- (142) Pitout, J.D., et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 43, 7 (July 2005): 3129-35.
- (143) Sader, H.S., Reis, A.O., Silbert, S., and Gales, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. Clin Microbiol Infect. 11, 1 (January 2005): 73-6.
- (144) Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Wu, H.M., and Wu, J.J. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol. 39, 12 (December 2001): 4433-9.
- (145) Townsend, M.L., Pound, M.W., and Drew, R.H. Tigecycline: a new glycolcycline antimicrobial. Int J Clin Pract. 60, 12 (December 2006): 1662-72.
- (146) Gu, B., et al. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol. 45, 1 (January 2007): 241-3.
- (147) Japoni, A., et al. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in Southern Iran. Jpn J Infect Dis. 61, 1 (January 2008): 85-8.
- (148) Collis, C.M., and Hall, R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother. 39, 1 (January 1995): 155-62.
- (149) Prats, G., et al. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 46, 3 (March 2002): 932-3.
- (150) Henrichfreise, B., Wiegand, I., Sherwood, K.J., and Wiedemann, B. Detection of VIM-2 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. Antimicrob Agents Chemother. 49, 4 (April 2005): 1668-9.

- (151) Yakupogullari, Y., Poirel, L., Bernabeu, S., Kizirgil, A., and Nordmann, P.
Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. J Antimicrob Chemother. 61, 1 (January 2008): 221-2.
- (152) Lee, K., et al. bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother. 46, 4 (April 2002): 1053-8.
- (153) Yatsuyanagi, J., et al. Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene bla_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 48, 2 (February 2004): 626-8.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1. Mueller Hinton Agar ประกอบด้วย

Mueller Hinton Agar (Oxoid)	38	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และแบ่งใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพลาสติก จานละ 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2. Tryptone Soya Agar ประกอบด้วย

Tryptone Soya Agar (Oxoid)	40	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และแบ่งใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพลาสติก จานละ 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3. Tryptone Soya Broth ประกอบด้วย

Tryptone Soya Broth (Oxoid)	30	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4. LB Broth ประกอบด้วย

Tryptone (Merck)	10	กรัม
NaCl (Ajax Finechem)	5	กรัม
Yeast Extract (Oxoid)	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.5. Motile ประกอบด้วย

Tryptose (Merck)	10 กรัม
NaCl (Ajax Finechem)	5 กรัม
Agar (Oxoid)	3 กรัม

2,3,5 – Triphenyltetrazolium chloride (Sigma Aldrich) 0.05 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ในที่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารเคมี

2.1. 0.85% NaCl ประกอบด้วย

NaCl (Ajax Finechem)	8.5 กรัม
----------------------	----------

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2. 0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (0.5 M EDTA), pH 8.0 ประกอบด้วย

EDTA (Sigma Aldrich)	186.1 กรัม
----------------------	------------

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้มี pH 8.0 ด้วย NaOH ก่อนที่จะเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.3. 10X TBE buffer

Tris-base (Sigma Aldrich)	108 กรัม
Boric acid (Sigma Aldrich)	55 กรัม
0.5 M EDTA	40 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.4. 1M Tris, pH 8.0 ประกอบด้วย

Tris base (Sigma Aldrich)	121.1 กรัม
---------------------------	------------

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้มี pH 8.0 ด้วย HCl ก่อนที่จะ
เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่า
เชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.5. 5M NaCl ประกอบด้วย

NaCl (Ajax Finechem) 292.2 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่า
เชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.6. TNE buffer ประกอบด้วย

10 mM Tris, pH 8.0

10 mM NaCl

และ

10 mM EDTA, pH 8.0

2.7. 3M Sodium acetate ประกอบด้วย

Sodium acetate trihydrate (Merck) 408 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย acetic acid ให้ได้ pH 5.2 จากนั้นเติมน้ำ
กลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ที่
121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.8. 1X TE solution ประกอบด้วย

10 mM Tris, pH 8.0

1mM EDTA, pH 8.0

2.9. LMP agarose buffer ประกอบด้วย

10 mM Tris, pH 8.0

0.1mM EDTA, pH 8.0

2.10. SE buffer ประกอบด้วย

75 mM NaCl

25 mM EDTA, pH 8.0

2.11. Lysis buffer ประกอบด้วย

50 mM Tris, pH 8.0

50 mM EDTA, pH 8.0

1% Sarcosine

0.5 mg Proteinase K

ภาคผนวก ข

Number	Patient no.	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
1	1	เลือด	5/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
2	2	เลือด	6/3/2009	S	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	I	X	X	✓	X	X
3	3	เลือด	8/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
4	4	เลือด	12/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
5	5	ปัสสาวะ	1/4/2009	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	X	X	✓		X
6	6	ปัสสาวะ	2/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
7	7	ปัสสาวะ	2/4/2009	S	S	R	S	S	I	R	R	I	R	S	I	X	X	X		X
8	8	ปัสสาวะ	2/4/2009	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	X	X	X		X
9	9	ปัสสาวะ	2/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
10	4	ปัสสาวะ	2/3/2009	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
11	10	ปัสสาวะ	2/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
12	11	ปัสสาวะ	2/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
13	6	ปัสสาวะ	3/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X

Number	Patient no.	วันที่รับการรักษา	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ของ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
14	12	ปีศาจะ 9/3/2009	9/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
15	13	ปีศาจะ 9/3/2009	9/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
16	12	ปีศาจะ 9/3/2009	9/3/2009	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	X	X	✓	X	X
17	14	ปีศาจะ 9/3/2009	9/3/2009	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	X	X	✓	X	X
18	15	ปีศาจะ 10/3/2009	10/3/2009	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
19	16	ปีศาจะ 10/3/2009	10/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
20	17	ปีศาจะ 16/4/2009	16/4/2009	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	X	X	✓		X
21	12	ปีศาจะ 15/3/2009	15/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
22	18	ปีศาจะ 15/3/2009	15/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
23	19	ปีศาจะ 20/4/2009	20/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
24	20	ปีศาจะ 18/3/2009	18/3/2009	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	X	X	✓	X	X
25	21	ปีศาจะ 18/3/2009	18/3/2009	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	X	X	X	X	X
26	22	ปีศาจะ 21/4/2009	21/4/2009	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	X	X	X		X

Number	Patient no.	วันที่รับการรักษา	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ของ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	Integron class 1	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
27	23	ปีศาจ	20/3/2009	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	X	X	X	X	X
28	24	ปีศาจ	20/3/2009	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	X	X	✓	X	X
29	25	ปีศาจ	21/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
30	26	ปีศาจ	24/4/2009	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	X	X	X	X	X
31	19	ปีศาจ	24/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
32	9	ปีศาจ	23/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	X	✓	✓
33	27	ปีศาจ	23/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
34	28	ปีศาจ	25/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
35	18	ปีศาจ	24/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
36	29	ปีศาจ	24/3/2009	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	X	X	X		X
37	30	ปีศาจ	25/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
38	4	ปีศาจ	26/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
39	31	ปีศาจ	28/4/2009	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	X	X	X		X

Number	Patient no.	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
40	32	ปัสสาวะ	27/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
41	33	ปัสสาวะ	29/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	X	✓	✓		✓
42	34	ปัสสาวะ	30/3/2009	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	X	X	✓		X
43	9	ปัสสาวะ	30/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
44	8	ปัสสาวะ	31/3/2009	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	-	X	X			X
45	18	ปัสสาวะ	31/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
46	35	เสมหะ	2/3/2009	S	S	R	S	S	S	R	R	I	R	S	S	X	X	X	X	X
47	36	เสมหะ	2/3/2009	S	S	I	I	S	R	R	R	I	R	S	S	X	X	X	X	X
48	7	เสมหะ	2/4/2009	S	S	S	I	I	R	R	R	R	S	S	I	X	X	X		X
49	37	เสมหะ	2/3/2009	S	S	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	X	X	X	X	X
50	38	เสมหะ	3/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
51	14	เสมหะ	3/3/2009	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	I	X	X	✓	X	X
52	39	เสมหะ	3/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X

Number	Patient no.	วันที่รับการรักษา	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
53	40	เริ่ม	5/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
54	41	เริ่ม	5/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
55	36	เริ่ม	5/3/2009	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	X	X	X	X	X
56	42	เริ่ม	6/3/2009	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	X	X	X	X	X
57	43	เริ่ม	8/4/2009	S	S	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S	X	X	✓		X
58	44	เริ่ม	8/4/2009	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	X	X	X	X	X
59	45	เริ่ม	7/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
60	46	เริ่ม	8/4/2009	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X	X	✓		X
61	47	เริ่ม	8/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
62	48	เริ่ม	8/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
63	49	เริ่ม	9/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	X	X	✓		X
64	50	เริ่ม	8/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	✓	X	X
65	14	เริ่ม	9/3/2009	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	X	X	X	X	X

Number	Patient no.	วันที่รับส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
66	51	๒๕๕๓	9/3/2009	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	X	X	X	X	X
67	52	๒๕๕๓	9/3/2009	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I	X	X	X	X	X
68	53	๒๕๕๓	9/3/2009	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	X	✓	X	X	X
69	54	๒๕๕๓	9/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
70	55	๒๕๕๓	12/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
71	56	๒๕๕๓	10/3/2009	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	X	X	X	X	X
72	57	๒๕๕๓	11/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
73	43	๒๕๕๓	11/3/2009	S	S	R	S	S	S	R	R	I	S	S	S	X	✓	X	X	X
74	58	๒๕๕๓	15/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
75	59	๒๕๕๓	16/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
76	60	๒๕๕๓	16/4/2009	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	X	X	✓		X
77	52	๒๕๕๓	16/4/2009	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	X	X	X		X
78	61	๒๕๕๓	12/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	X	X	X	✓	✓

Number	Patient no.	วันที่รับการรักษา	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ของ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
79	58	เริ่ม	17/4/2009	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	X	X	X		X
80	62	เริ่ม	12/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
81	63	เริ่ม	15/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
82	51	เริ่ม	21/4/2009	S	S	R	S	I	R	R	R	R	R	S	-	X	X	X		X
83	19	เริ่ม	15/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X
84	64	เริ่ม	16/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
85	65	เริ่ม	16/3/2009	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	X	X	X	X	X
86	52	เริ่ม	21/4/2009	S	S	R	S	R	I	R	R	R	R	S	R	X	X	X		X
87	56	เริ่ม	17/3/2009	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	X	X	X	X	X
88	66	เริ่ม	22/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
89	67	เริ่ม	17/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
90	68	เริ่ม	23/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
91	69	เริ่ม	19/3/2009	S	S	R	S	I	S	R	R	R	R	S	-	X	X	X		X

Number	Patient no.	วันที่รับส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
92	70	๒๕๕๓	20/3/2009	S	R	R	R	I	S	R	R	I	S	S	-	X	X	✓		X
93	71	๒๕๕๓	26/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
94	72	๒๕๕๓	27/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
95	73	๒๕๕๓	23/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
96	74	๒๕๕๓	23/3/2009	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	I	X	X	X	X	X
97	52	๒๕๕๓	24/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
98	63	๒๕๕๓	24/3/2009	S	S	I	S	I	R	R	R	I	S	S	I	X	X	X	X	X
99	14	๒๕๕๓	24/3/2009	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	X	X	X	X	X
100	75	๒๕๕๓	28/4/2009	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	✓	X	✓		✓
101	4	๒๕๕๓	26/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	✓	X	✓		✓
102	76	๒๕๕๓	26/3/2009	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R	S	I	X	X	X		X
103	44	๒๕๕๓	27/3/2009	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	X	X	X		X
104	77	๒๕๕๓	27/3/2009	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓

Number	Patient no.	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
105	78	เสมหะ	28/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
106	79	เสมหะ	29/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
107	80	เสมหะ	30/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
108	81	เสมหะ	30/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
109	82	เสมหะ	31/3/2009	S	S	I	I	S	R	R	R	I	R	S	I	X	X	X		X
110	83	หนอง	2/4/2009	S	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	R	X	X	✓		X
111	84	หนอง	6/4/2009	S	S	R	I	S	S	S	S	I	R	S	S	X	X	X		X
112	85	หนอง	6/5/2009	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	I	X	X	X		X
113	86	หนอง	7/4/2009	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	I	X	X	✓		X
114	87	หนอง	8/4/2009	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	X	X	X		X
115	88	หนอง	8/4/2009	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	X	X	X		X
116	88	หนอง	8/4/2009	S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	X	X	X		X
117	89	หนอง	7/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓

Number	Patient no.	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
118	90	หนอง	8/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
119	91	หนอง	9/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	✓	X	✓	X	X
120	92	หนอง	10/3/2009	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	X	X	X	X	X
121	93	หนอง	10/4/2009	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	X	X	✓		X
122	8	หนอง	12/5/2009	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	-	X	X	X		X
123	83	หนอง	10/3/2009	S	R	R	R	R	S	R	R	-	S	S	-	X	X	X	X	X
124	94	หนอง	11/3/2009	S	S	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	X	X	✓	X	X
125	95	หนอง	13/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
126	11	ปัสสาวะ	18/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
127	18	ปัสสาวะ	15/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	✓	X	✓	X	X
128	96	หนอง	21/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
129	22	หนอง	22/4/2009	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	X	X	X		X
130	97	หนอง	17/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X

Number	Patient no.	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC ค่าสำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
131	28	หนอง	18/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
132	98	หนอง	18/3/2009	S	S	R	I	R	R	S	S	R	R	S	-	X	X	X	X	X
133	99	หนอง	24/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
134	100	หนอง	24/4/2009	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	S	S	X	X	X	X	X
135	100	หนอง	24/4/2009	S	S	I	I	R	R	R	R	R	R	S	-	X	X	X		X
136	18	ปัสสาวะ	26/4/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓		✓
137	101	หนอง	22/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
138	87	หนอง	27/4/2009	S	I	I	S	R	R	S	S	I	R	S	R	X	X	X		X
139	102	หนอง	23/3/2009	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	X	X	X		X
140	30	หนอง	23/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
141	103	หนอง	23/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
142	18	ปัสสาวะ	24/3/2009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	✓	X	✓	✓	✓
143	104	หนอง	28/4/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X

Number	Patient no.	วันที่รับส่งตรวจ	วันที่	Amikacin	Gentamicin	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Meropenem	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Cefoperazone/Subactam	Piperacillin/Tazobactam	Colistin	MIC สำหรับ Imipenem	bla _{IMP}	bla _{VIM}	bla _{int1} class 1 Integron	MBL E-test	MBL Modified Hodge Test
144	105	พบ	24/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
145	106	พบ	25/3/2009	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
146	89	พบ	26/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
147	107	พบ	27/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X
148	2	พบ	27/3/2009	S	I	R	R	I	S	R	R	I	S	S	-	X	X	✓	X	X
149	85	พบ	27/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X	X	X
150	108	พบ	30/3/2009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	X	X		X

ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase กับข้อมูลต่างๆทางคลินิก

แผนก	Patient No.	Number	วันที่	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	PFGE type
Ward 1	9	9	2/3/2009	ปัสสาวะ	A
	9	43	30/3/2009	ปัสสาวะ	A
	19	23	20/4/2009	ปัสสาวะ	A
	19	31	24/4/2009	ปัสสาวะ	A
	15	18	10/3/2009	ปัสสาวะ	A
	25	29	21/3/2009	ปัสสาวะ	A
Ward 2	4	10	2/3/2009	ปัสสาวะ	A2
	4	38	26/3/2009	ปัสสาวะ	A
	4	101	26/3/2009	เสมหะ	A
	4	4	12/4/2009	เลือด	A
	30	140	23/3/2009	หนอง	A1
	30	37	25/3/2009	ปัสสาวะ	A1
	28	34	25/4/2009	ปัสสาวะ	A1
	77	104	27/3/2009	เสมหะ	A1
	99	133	24/4/2009	หนอง	A1
Ward 3	18	22	15/3/2009	ปัสสาวะ	A
	18	136	26/4/2009	ปัสสาวะ	A
	27	33	23/3/2009	ปัสสาวะ	A
	32	40	27/3/2009	ปัสสาวะ	A
Ward 4	89	117	7/3/2009	หนอง	A4
Ward 5	10	11	2/3/2009	ปัสสาวะ	A3
Ward 6	75	100	28/4/2009	เสมหะ	A1
Ward 7	91	119	9/3/2009	หนอง	B
Ward 8	33	41	29/4/2009	ปัสสาวะ	C

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเฉอมาน ปิยะกุล เกิดเมื่อวันที่ 5 ตุลาคม พ.ศ.2528 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2550 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 โดยได้รับทุนอุดหนุนค่าลงทะเบียน และทุนผู้ช่วยสอนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย