

ความชุกของเอนไซม์ β -lactamase ชนิด A C และ D
ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ



นายชนกปกรณ์ เกตุวรรุฒิชัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF CLASS A, C AND D β -LACTAMASE
AMONG CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Mr. Chanokpakorn Katvoravutthichai



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 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของเอนไซม์ β -lactamase ชนิด A C และ D ในเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ
โดย	นายชนกปกรณ์ เกตุวรรุฒิชัย
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.รัชนีพร ตียะวิสุทธิ์ศรี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.รัชนีพร ตียะวิสุทธิ์ศรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์)

ชนกปรกรณ์ เกตุวรุฒิชัย : ความชุกของเอนไซม์ β -lactamase ชนิด A C และ D ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ (PREVALENCE OF CLASS A, C AND D β -LACTAMASE AMONG CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.รัชนิพร ตริยะวิสุทธิ์ศรี, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง, 141 หน้า.

Pseudomonas aeruginosa เป็นเชื้อที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล และมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดเพิ่มมากขึ้น โดยการสร้างเอนไซม์ β -lactamase เป็นกลไกการดื้อยาที่มีความสำคัญและพบได้บ่อยในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา β -lactam ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในคลาส A C และ D ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เชส (polymerase chain reaction: PCR) หาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) และทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disk diffusion กับเชื้อ *P. aeruginosa* 118 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 51 สายพันธุ์ (ร้อยละ 43.22) เป็นเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (multidrug-resistant *P. aeruginosa*: MDR-PA) และร้อยละ 44.91 ดื้อต่อยา ceftazidime นอกจากนี้ยังพบยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ในเชื้อ *P. aeruginosa* 80 สายพันธุ์ (ร้อยละ 67.80) ซึ่งพบยีน VEB-1 AmpC และ OXA-10 จำนวน 9 (ร้อยละ 7.62), 75 (ร้อยละ 63.56) และ 18 (ร้อยละ 15.25) สายพันธุ์ตามลำดับ ไม่พบยีน PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถจำแนกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี PFGE ได้ 29 pulsotype (PT) มี 2 PT ที่เป็น PT หลัก โดย PT1 เป็น PT ที่มียีน OXA-10 แสดงออร์กั่วมกับยีน AmpC เป็น PT ที่ใหญ่ที่สุด นอกจากนี้ เชื้อที่มียีน VEB-1 สามารถพบได้กระจายไปในหลายๆ PT และเชื้อที่มียีน AmpC พบว่ามีความหลากหลายของ PT มาก ดังนั้นความชุกของยีน β -lactamase สามารถพบยีนหลากหลายได้แก่ ยีน OXA-10 AmpC และ VEB-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ โดยมี PT หลักคือ PT 1 โดยพบเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน OXA-10 ดังนั้นควรตระหนักและเฝ้าระวังการพบเอนไซม์ oxacillinase ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ

ภาควิชา	เคมีคลินิก	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5576652637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: POLYMERASE CHAIN REACTION / PSEUDOMONAS AERUGINOSA / PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS / β -LACTAMASE

CHANOKPAKORN KATVORAVUTTHICHAJ: PREVALENCE OF CLASS A, C AND D β -LACTAMASE AMONG CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

ADVISOR: RACHANEEPORN TIYAWISUTSRI, Ph.D., CO-ADVISOR: KHAEMAPORN BOONBUMRUNG, Ph.D., 141 pp.

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important causes of nosocomial infection and it has increasing resistance to many antimicrobial agents. β -lactamase production is the most frequent mechanism for β -lactam resistance in *P. aeruginosa*. We evaluated the prevalence of β -lactamase genes in *P. aeruginosa* for classes A, C, and D by polymerase chain reaction (PCR), and investigated clonal diversity by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). We used the disk diffusion method to test 118 non-duplicate clinical isolates of *P. aeruginosa* for antimicrobial susceptibility. We identified 51 isolates (43.22%) as multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDR-PA), approximately 44.91% of which were resistant to ceftazidime. β -lactamase genes were found in 80 isolates of *P. aeruginosa* (67.80%). The genes that encode VEB-1, AmpC, and OXA-10 were detected in 9 (7.62%), 75 (63.56%), and 18 (15.25%) of these isolates, respectively. The genes that encode PER-1, CTX-M, TEM-1 and derivatives, and SHV-1 were not found in any of the *P. aeruginosa* isolates. We identified 29 different pulsotypes (PT) by PFGE. Two predominate PT were found. In PT1, OXA-10, which was co-produced with the AmpC gene, was predominant. Moreover, VEB-1-producing strains were found to be scattered in many PT, and AmpC-producing strains showed high PT diversity. The prevalence of β -lactamase genes in *P. aeruginosa* was represented by the genetic heterogeneity of OXA-10, AmpC, and VEB-1. The predominant clone of *P. aeruginosa* clinical isolates was OXA-10. This raises concern about oxacillinases among *P. aeruginosa* clinical isolates.

Department: Clinical Chemistry Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.รัชนีพร ติยะวิสุทธิ์ศรี และอาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ที่ปรึกษารวม ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษา รวมทั้งคอยอบรมสั่งสอน ตักเตือน ตลอดจนให้แก่คิดต่างๆในทุกๆด้านตลอดการทำวิจัยด้วยดีตลอดมาขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทน 72 พรรษา จาก บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนค่าลงทะเบียนเรียน และเงินเดือนให้ และขอขอบพระคุณ เงินสนับสนุนทุนวิจัยจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้คำแนะนำในการทำวิจัย รวมถึงคอยติดตามผลการทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยประสบผลสำเร็จตามที่คาดหวังเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณคุณพิทยา ใหม่ตา คุณนันทนัช เมืองโคตร คุณนวลจันทร์ บัวสาย รวมถึงเจ้าหน้าที่และบุคลากรของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณคุณสมศักดิ์ ราชกุล ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลราชวิถี ที่กรุณาอนุเคราะห์เชื้อตัวอย่าง ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมีคลินิก และภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด และจุลชีววิทยา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่วัสดุอุปกรณ์ ครุภัณฑ์วิจัย และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ทุกคนในครอบครัว เกตุวรวิชัย และครอบครัว ชินกิบุญ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆอย่างดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์.....	5
3. สมมติฐานของการวิจัย	6
4. ขอบเขตการวิจัย.....	6
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2. β -lactam	8
3. กลไกการดื้อยาของกลุ่ม β -lactam	13
4. β -lactamase	15
5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
1. เชื้อที่ใช้ในการวิจัย	35
2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	35
3. วิธีการวิจัย.....	40

3.1 เก็บตัวอย่างเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	40
3.2 การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยวิธี disk diffusion	40
3.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ด้วยวิธีทาง genotype	43
3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	43
3.3.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อหาความชุกของยีน β -lactamase คลาส A C และ D.....	44
3.3.3 การวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis	46
3.3.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β -lactamase คลาส A C และ D.....	46
3.3.5 การศึกษาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D โดยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	46
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	50
1. ผลการเก็บรวบรวมเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> จำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ	50
2. ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility testing) ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยวิธี disk diffusion.....	51
3. ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	56
4. ผลการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D	66
5. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 6 กลุ่มยา และ ผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D	73

6. ผลการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ตรวจพบยื่นของ เอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D จำนวน 80 สายพันธุ์ ด้วยวิธี pulsed- field gel electrophoresis (PFGE).....	77
7. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของการจัดความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อด้วย วิธี PFGE ความไวต่อยาทั้ง 11 ชนิด และผลของการทำปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรสกับยื่น ของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D.....	81
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	86
1. สรุปผลการวิจัย	86
2. อภิปรายผล	89
3. ข้อเสนอแนะ	97
รายการอ้างอิง	98
ภาคผนวก.....	126
ภาคผนวก ก ขั้นตอนการเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	127
1. การเตรียมสารหมวดอาหารเลี้ยงเชื้อ	127
2. การเตรียมสารหมวดสารเคมี	131
ภาคผนวก ข ตารางแสดงผลงานวิจัยทั้งหมด	137
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	141

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 แสดงเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	35
ตารางที่ 3.2 แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	42
ตารางที่ 3.3 แสดง Primer ที่ใช้ในการตรวจหายีน β -lactamase คลาส A C และ D ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	45
ตารางที่ 4.1 แสดงรูปแบบของความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 18 รูปแบบของตัวอย่างเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	53
ตารางที่ 4.2 แสดงการจำแนกเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ออกเป็น MDR-PA และ Non MDR-PA	55
ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 6 กลุ่มยาและผลของปฏิกิริยา ลูกลีโซฟอไลเมอเรส.....	74
ตารางที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ ปฏิกิริยาลูกลีโซ ฟอไลเมอเรส และ ความไวต่อยาทั้ง 6 กลุ่มยา	82

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของยาในกลุ่ม penicillins.....	8
ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของยาในกลุ่ม cephalosporins.....	10
ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะโครงสร้างของยา meropenem ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม carbapenems	11
ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของยาในกลุ่ม monobactams.....	11
ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะโครงสร้างของ clavulanic acid.....	12
ภาพที่ 2.6 แสดงกลไกการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam ของเชื้อแบคทีเรีย.....	13
ภาพที่ 2.7 แสดงกลไกหลักที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC	24
ภาพที่ 4.1 แผนภูมิแสดงจำนวนเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> จำนวน 118 สายพันธุ์ จำแนกตามชนิด ของสิ่งส่งตรวจ.....	50
ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ 11 ชนิดของเชื้อ	52
ภาพที่ 4.3 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน VEB-1	57
ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน PER-1	58
ภาพที่ 4.5 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน CTX-M	59
ภาพที่ 4.6 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน TEM-1 และอนุพันธ์.....	60
ภาพที่ 4.7 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน SHV-1.....	61
ภาพที่ 4.8 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน AmpC	63
ภาพที่ 4.9 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน OXA-10.....	65

ภาพที่ 4.10 แสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.76 ที่ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 67

ภาพที่ 4.11 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P.aeruginosa* No.2, 22, 35, 43, 48 ,72, 76, 79 และ 105 เทียบกับยีน VEB-1 68

ภาพที่ 4.12 แสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.7 ที่ให้ผลบวกกับยีน AmpC ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 69

ภาพที่ 4.13 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P.aeruginosa* No.7, 47, 52, 58, 61, 71 และ 114 เทียบกับยีน AmpC..... 70

ภาพที่ 4.14 แสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.35 ที่ให้ผลบวกกับยีน OXA-10 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 71

ภาพที่ 4.15 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P.aeruginosa* No.35, 36, 43, 48, 55, 56, 58, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 79, 91, 93, 108 และ 111 เทียบกับยีน OXA-10 72

ภาพที่ 4.16 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ถูกตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย SpeI-HF ด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)..... 79

ภาพที่ 4.17 แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Bionumeric เวอร์ชัน 7.5 ของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 80 สายพันธุ์ 80

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันปัญหาการติดเชื้อและการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้นถือเป็นปัญหาที่มีความสำคัญในระดับโลกเกิดขึ้นต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด (1) โดยประเทศไทยก็ประสบปัญหานี้เช่นกัน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียนั้นดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษา ทำให้การรักษาไม่ได้ผล นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดอาจดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน และยังสามารถเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อยาและแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว หากไม่มีการควบคุมการใช้ยาต้านจุลชีพให้เหมาะสม หรือละเลยการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา อาจเกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพต้องเปลี่ยนใช้ยาตัวใหม่ที่มีราคาแพงกว่า หรืออาจไม่มียารักษาที่ให้ผลดีและปลอดภัย ผู้ป่วยอาจต้องนอนรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น มีโอกาสติดเชื้อโรคอื่น ๆ มากขึ้น (2)

เชื้อแบคทีเรียดื้อยาส่วนมากจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และกลุ่ม non-ferment bacilli ซึ่งเชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล และเป็นปัญหาสำคัญคือเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (3-5) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ได้ศึกษาข้อมูลผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาล และข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาลทุกระดับทั่วประเทศจำนวน 1,023 แห่ง ในปี พ.ศ. 2553 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* เป็น 1 ใน 5 ของจุลชีพที่พบบ่อยในโรงพยาบาลและมักดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (2) จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (National Antimicrobial Resistant Surveillance in Thailand: NARST) พบว่าในปี พ.ศ. 2542 เชื้อ *P. aeruginosa* จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ มีความไวต่อยา ceftazidime อยู่ที่ร้อยละ 77.00 แต่ข้อมูลในช่วง 13 ปีที่ผ่านมาตั้งแต่ พ.ศ. 2543-2555 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีความไวต่อยา ceftazidime อยู่ในช่วงร้อยละ 70.00-74.00 เฉลี่ยมีความไวต่อยานี้ร้อยละ 72.20 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีความไวต่อยา ceftazidime ลดลงจากอดีตถึงร้อยละ 5.00 (6) การศึกษาในต่างประเทศของ Sader SH. และคณะ (7) ในผู้ป่วยโรคปอดบวมจากศูนย์การแพทย์ในประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 28 แห่งและจากประเทศในทวีปยุโรปจำนวน 11 ประเทศ 25 ศูนย์ฯ ในช่วงเดือนมกราคม ค.ศ. 2009 ถึงเดือนธันวาคม 2012 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะลดลง โดยพบความไวต่อยา ceftazidime ในสหรัฐอเมริกาและทวีปยุโรปอยู่ที่ร้อยละ 79.60 และ 68.70 ตามลำดับ ส่วนในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศจีนจากศึกษาในผู้ป่วยที่โรงพยาบาลแห่งหนึ่งในเมืองเจิ้งโจว มณฑลเหอหนาน พบอัตราการดื้อต่อยา ceftazidime อยู่ที่ร้อยละ 51.60 (8) ซึ่ง

จะเห็นว่าอัตราการดื้อต่อยา ceftazidime ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในแต่ละประเทศทั่วโลกมีอัตราที่แตกต่างกันไป

กลไกการดื้อยาของกลุ่ม β -lactam ของเชื้อแบคทีเรียมีอยู่หลายกลไก ได้แก่ การลดการผ่านของยาไม่ให้เข้าสู่เซลล์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมายที่ยาจะไปจับหรือออกฤทธิ์ การขับยาออกจากเซลล์ และการสร้างเอนไซม์ทำลายยา (9) ซึ่งกลไกที่สำคัญที่สุดและพบบ่อยที่สุดก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาเกิดจากเชื้อสร้างเอนไซม์ไปทำลายตัวยา (10) โดยยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นยาในกลุ่ม β -lactam (11) โดยเฉพาะยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้บ่อยมากที่สุดในการเริ่มการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ ยา ceftazidime cefotaxime เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ของเชื้อ *P. aeruginosa* คือเอนไซม์ β -lactamase

ในปัจจุบันเอนไซม์ β -lactamase มีมากมายหลายชนิด ถ้าจัดกลุ่มตามโครงสร้างระดับโมเลกุล (molecular classification) ตามระบบของ Ambler สามารถแบ่งได้เป็น 4 คลาส คือ คลาส A B C และ D โดยเอนไซม์คลาส B เป็นเอนไซม์คลาสเดียวในกลุ่มที่มีตำแหน่งออกฤทธิ์ต้องอาศัยธาตุโลหะที่มีประจุบวกสอง (divalent cation) เช่น สังกะสี (Zn^{2+}) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จึงเรียกเอนไซม์คลาสนี้ว่า metallo- β -lactamase สามารถยับยั้งเอนไซม์คลาสนี้ได้ด้วย ethylenediaminetetraacetate (EDTA) ส่วนเอนไซม์ คลาส A C และ D มีตำแหน่งออกฤทธิ์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine จึงเรียกว่าเป็น serine β -lactamase นอกจากนี้เอนไซม์ β -lactamase ยังมีคุณสมบัติในการทำลายยาได้ต่างกัน โดย metallo- β -lactamase จะทำลายยาได้หลายชนิดและเป็นสาเหตุให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ส่วนเอนไซม์คลาส A C และ D จะทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins ชนิดที่มีฤทธิ์กว้างโดยเฉพาะยาในรุ่นที่ 3 ดังนั้นเอนไซม์ β -lactamase ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 โดยเฉพาะยา ceftazidime ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ เอนไซม์คลาส A β -lactamase (Extended-spectrum β -lactamase: ESBL) คลาส C β -lactamase (AmpC β -lactamase: AmpC) และคลาส D β -lactamase (Oxacillinase) ในเอนไซม์ทั้งสี่คลาสของเอนไซม์ β -lactamase คลาส A ถือว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความหลากหลายมากที่สุดและพบบ่อยมากที่สุด สามารถยับยั้งเอนไซม์กลุ่มนี้ด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ได้แก่ clavulanic acid tazobactam และ sulbactam โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยยีนที่สร้างเอนไซม์หลายชนิด อาทิ เช่น VEB PER CTX SHV TEM และ GES เป็นต้น (12) โดยเอนไซม์คลาส C และ D นั้นดื้อต่อยา cephamycins (เป็นยาในกลุ่มหนึ่งของ cephalosporins) และยา oxacillin ตามลำดับ เอนไซม์ทั้ง

สองคลาสนี้ไม่สามารถยับยั้งด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase สำหรับเอนไซม์คลาส D นั้นพบได้บ่อยในเชื้อ *P. aeruginosa* (13, 14) และมีความหลากหลายของยีนมากรองจากเอนไซม์คลาส A (15) สามารถจัดอยู่เป็นกลุ่มๆได้ เช่น OXA-1 OXA-2 และ OXA-10 โดยที่ยีน OXA-10 เป็นยีนต้นแบบของการดื้อต่อยา oxacillin และ ยา cephalosporins (14)

นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของเอนไซม์ β -lactamase คลาส A (VEB-1) และเอนไซม์คลาส D (OXA) ว่าเอนไซม์ทั้ง 2 คลาสนี้พบร่วมกันบนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile element) ได้แก่ คลาส 1 integrons (16) ซึ่งทำให้เกิดการกระจายยีนดื้อยาจากเชื้อหนึ่งไปสู่เชื้ออื่นๆได้ ทำให้การรักษาด้วยยาในกลุ่ม cephalosporins ไม่ได้ผล ผู้ป่วยจะต้องเปลี่ยนไปใช้ยาต้านจุลชีพในกลุ่มใหม่ซึ่งอาจมีราคาแพง ได้แก่ ยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่ ยา imipenem meropenem เป็นต้น และถ้าหากมีการใช้ยาชนิดใหม่เป็นวงกว้างอาจทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้เกิดขึ้น หรือทำให้เกิดการดื้อยาหลายขนานของเชื้อ *P. aeruginosa* (multidrug resistant *P. aeruginosa*) ได้ จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการรักษาการติดเชื้อเนื่องจากเป็นยาขนานสุดท้าย (last resort antibiotic) ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันแทบจะไม่มียาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาอาจต้องรอการพัฒนาาใหม่ๆที่ให้การรักษาได้ผลดี มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรที่ใช้ในการรักษามากขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากผู้ป่วยต้องรักษาในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานานขึ้น อีกทั้งแพทย์อาจจำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้ยาเก่าที่เคยใช้รักษาได้ผล ได้แก่ ยา colistin แต่ยานี้มีผลข้างเคียงมาก อาทิเช่น ผลข้างเคียงต่อไต (nephrotoxicity) เป็นพิษต่อประสาท (neurotoxicity) หน้าชาหรือเป็นอัมพาต มึนงง อ่อนเพลีย (17)

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในโรงพยาบาลทั่วไปส่วนใหญ่จะตรวจหาเอนไซม์ β -lactamase ในระดับฟีโนไทป์เท่านั้น ได้แก่ disk diffusion ซึ่งถือเป็นตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) หรือการทำ combined disk test โดยเปรียบเทียบ inhibition zone ของแผ่นยาที่มี extended-spectrum cephalosporins (ESC) เพียงอย่างเดียว กับแผ่นยาที่มี ESC ร่วมกับ clavulanic acid เพื่อหาเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A ส่วนการทำ AmpC disk test เพื่อหาเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส C แต่วิธีนี้ก็ยังไม่ใช่วิธีมาตรฐานในการตรวจ (18, 19) สำหรับเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส D นั้นยังไม่มีวิธีทางหรือแนวทางที่เป็นมาตรฐานในการตรวจหาเอนไซม์คลาสนี้เลย วิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น ทำให้ทราบเบื้องต้นว่าเชือนั้นมีเอนไซม์ β -lactamase ในคลาสใด แต่วิธีการตรวจในระดับฟีโนไทป์นี้ยังไม่มีแนวทางมาตรฐานสำหรับการตรวจในเชื้อ *P. aeruginosa* และไม่สามารถบ่งบอกหรือทราบถึงว่ามียีนดื้อยาชนิดใด หรือหลายยีนร่วมกันที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ได้ รวมถึงการเกิดผลลบลปลอมในการทดสอบหา β -lactamase คลาส A จากการที่เชื้อสร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส C ไปบดบังการตรวจ

(15, 20) ดังนั้นการศึกษาหายีนดื้อยาของเชื้อในระดับโมเลกุลหรือวิธีทางจีโนมไทป์จะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและทราบความชุกของเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ตรงตามความเป็นจริง จากการศึกษาในต่างประเทศหลายการศึกษา ได้แก่ Jabalameli F. และคณะ (21) ในปี ค.ศ. 2011 ได้หาความชุกของยีนที่ผลิตเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยไฟไหม้ที่ประเทศอิหร่าน พบยีน PER-1 และ VEB-1 ประมาณร้อยละ 50.00 และ 31.30 ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับการศึกษาของ Mirsalehian A. และคณะ (22) ในปี ค.ศ. 2010 ส่วนประเทศซาอุดีอาระเบียพบเชื้อ *P. aeruginosa* มียีน VEB-1 ร้อยละ 68.00 ส่วนยีน GES ร้อยละ 20.00 (23) และจากการศึกษาของ Lin S. และคณะ (24) จากประเทศไต้หวันในปี ค.ศ. 2012 ได้ทำการทดสอบเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 765 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อดื้อยา expanded-spectrum cephalosporins (ceftazidime aztreonam หรือ cefepime) จำนวน 57 สายพันธุ์ ตรวจพบยีน AmpC อย่างเดียวร้อยละ 38.60 ยีน TEM อย่างเดียวร้อยละ 1.60 ยีน AmpC และยีน TEM ร้อยละ 14.00 ยีน AmpC และยีน ESBL อื่นๆ ได้แก่ VEB SHV และ GES ประมาณร้อยละ 3.20 แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหายีนดื้อยาที่สร้าง β -lactamase เพียงอย่างเดียวนั้นยังไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่มียีนดื้อยาเหล่านี้มาจากแหล่งต้นกำเนิดหรือ clone เดียวกันหรือไม่ จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาทางระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งบ่งบอกถึงลักษณะหรือรูปแบบของการระบาดของเชื้อได้ เทคนิคที่ได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในงานทางด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลคือ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) วิธีนี้อาศัยหลักการคล้ายกับการทำ agarose gel electrophoresis แต่สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้มากถึง 2 ล้านคู่เบส โดยการให้สนามไฟฟ้าสลับ 2 ทิศทาง ทำมุม 120° ซึ่งกันและกัน ซึ่งโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะตอบสนองต่อสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลเล็ก ทำให้สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ หลังจากนั้นนำมาแปลผลและเปรียบเทียบรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อหา pulstotype (PT) ต่อไป ซึ่งข้อมูลทั้งหมดจะนำมาประกอบกันเพื่อใช้เป็นตัวช่วยในการตัดสินใจการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาอย่างสูงสุด รวมถึงการดูแลผู้ป่วย และเฝ้าระวังการแพร่ระบาดและการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ภายในโรงพยาบาล เช่น จากการศึกษาของ Lin S. และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 ในประเทศไต้หวัน (24) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 35 สายพันธุ์ที่ตรวจยีนดื้อยาโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้ผลบวกโดยพบยีน AmpC ร่วมกับยีนที่สร้าง ESBL อื่นๆ ได้แก่ TEM VEB SHV และ GES ประกอบด้วย 9 กลุ่ม (cluster) โดยมี 2 กลุ่มหลัก ๆ ของเชื้อที่แพร่ระบาดในช่วงเวลานั้น ในขณะที่การศึกษาของ Qing Y. และคณะในปี ค.ศ. 2014 ในประเทศจีน (25) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยา ceftazidime จำนวน 51 สายพันธุ์ตรวจพบยีนดื้อยาจำนวน 35 สายพันธุ์ โดยพบยีน PER-1 มากที่สุดรองลงมาคือ CTX-M-15 CTX-M-3 และ

CTX-M-14 โดยพบว่าเชื้อที่พบยีน PER-1 อยู่ในโคลนเดียวกันและมีแบบแผนการดื้อยาที่เหมือนกัน โดยเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดในช่วงนั้น แต่ข้อมูลในประเทศไทยที่ศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยา ระดับโมเลกุลของเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ในเชื้อ *P. aeruginosa* มีจำนวนจำกัด และสายพันธุ์ที่ศึกษามีจำนวนน้อย

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาการตรวจหายีนของเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยตรวจหายีนของเอนไซม์ β -lactamase คลาส A ได้แก่ VEB-1 PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 ส่วนเอนไซม์ในคลาส C ตรวจหายีน AmpC และเอนไซม์ในคลาส D ตรวจหายีน OXA-10 ซึ่งการตรวจยีนดังกล่าวจะใช้วิธีทางโมเลกุล ที่เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ส่วนการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อดูการแพร่ระบาดของเชื้อ *P. aeruginosa* ว่ามีความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์กันหรือไม่จะใช้เทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) เพื่อที่จะนำข้อมูลดังกล่าวมาเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาระดับโมเลกุล หรือเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาหรือนำข้อมูลที่ได้ไปเก็บรวมเพื่อนำไปทำบันทึกสถิติการดื้อยาในระดับชาติหรือระดับภูมิภาคได้ นอกจากนี้ยังสร้างความตื่นตัวในการป้องกันเฝ้าระวังและควบคุมการติดเชื้อดื้อยาที่เกิดขึ้นในโรงพยาบาลอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส
2. เพื่อทราบชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลที่ทำการศึกษา
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis

3. สมมติฐานของการวิจัย

1. เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยา cephalosporins รุ่นที่ 3 โดยเฉพาะยา ceftazidime จะมี ยีนดื้อยาที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D

2. เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีนดื้อยาที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดเดียวกันน่าจะเกิด จาก clone หรือต้นกำเนิดเดียวกัน

4. ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาหาความชุกและทราบชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยา cephalosporins รุ่นที่ 3 โดยเฉพาะยา ceftazidime โดยทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ เสมหะ หนอง จากโรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร ขนาด 1,200 เตียง รวมทั้งศึกษาหาความสัมพันธ์ เชิงพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis เพื่อให้ทราบความสัมพันธ์ของเชื้อ ว่ามาจาก clone หรือต้นกำเนิดเดียวกันหรือไม่

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa*

2. ทราบชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลที่ทำการศึกษา

3. ทราบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *P. aeruginosa* และช่วยให้ตระหนักถึงปัญหา การแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล

4. ทราบถึงระดับวิทยาระดับโมเลกุลในเชิงลึกของ β -lactamase คลาส A C และ D ของ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยา ceftazidime และเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาผู้ป่วย นอกจากนี้ยังกระตุ้นกระบวนการการเฝ้าระวังการ แพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในประเทศไทย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งขนาด 0.5-1 x 1.5-5 μm เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe bacteria) ไม่สามารถหมักย่อน้ำตาล (non-ferment bacilli) ไม่สร้างสปอร์ พบทั้งในดิน น้ำ ผิวน้ำ อากาศ บนพื้นผิวของพลาสติกหรือเครื่องมือทางการแพทย์ สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมของตัวเชื้อ ก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อเรื้อรัง *P. aeruginosa* สามารถสร้างรงควัตถุ (pigment) ได้หลายชนิดได้แก่ pyocyanin (สีเขียวแกมน้ำเงิน) pyoverdine (สีเขียวเหลืองสะท้อนแสง) และ pyorubin (สีแดงอมน้ำตาล) *P. aeruginosa* สามารถใช้สารอินทรีย์ได้หลายชนิดเพื่อใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโต สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โคโลนีจะมีลักษณะแตกต่างหลายแบบได้แก่ เล็ก ขอบไม่เรียบ แบนราบ คล้ายกระสวยหรือสีเหลี่ยมขนมเปียกปูน ถ้าเชื้อมาจากระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินปัสสาวะจะมีลักษณะโคโลนีเป็นเมือกเฝิ้ม (26, 27) *P. aeruginosa* เป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) และยังเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล (nosocomial infection) โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกันเช่น ผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์ โรค cystic fibrosis โรคมะเร็งหรือผู้ป่วยที่มีบาดแผลไฟไหม้ เป็นต้น ผู้ป่วยที่ต้องใส่สายสวน *P. aeruginosa* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลายระบบในร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบไหลเวียนเลือด ระบบปัสสาวะ ระบบประสาทต่างๆ (ตา หู ระบบประสาทส่วนกลาง) ผิวน้ำ และกระดูก (27, 28)

ปัจจัยการก่อโรค (virulence factor) ของ *P. aeruginosa* มีหลายปัจจัยได้แก่ เอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้น ได้แก่ elastase, alkaline protease, phospholipase และ lecithinase สารพิษ ได้แก่ exotoxin A และ lipopolysaccharide ส่วนประกอบของแบคทีเรีย (structural component) ได้แก่ pili capsule และ flagella เป็นต้น นอกจากนี้ *P. aeruginosa* สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาผ่านทางพลาสมิด หรือกระบวนการ transduction และ conjugation ได้อีกด้วย (26)

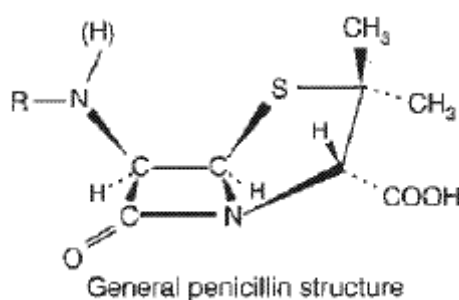
การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* โดยปกติเชื้อจะไวต่อยากลุ่ม antipseudomonal β -lactam ได้แก่ piperacillin cephalosporins รุ่นที่ 3 และ 4 ได้แก่ ceftazidime cefoperazone และ cefepime ยากลุ่ม carbapenems ได้แก่ imipenem และ meropenem ยากลุ่ม aminoglycosides ได้แก่ gentamicin tobramycin และ amikacin รวมถึง

fluoroquinolones และ colistin ในบางกรณีอาจจำเป็นที่จะต้องใช้ยา 2 กลุ่ม ควบคู่กันคือ ยากลุ่ม antipseudomonal β -lactam กับยากลุ่ม aminoglycosides เพื่อให้เกิดการรักษาที่มีประสิทธิภาพ แต่ถึงอย่างไรก็ตามการรักษาจะต้องพิจารณาผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อด้วย เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีที่สุด (27-29)

2. β -lactam

ยาที่เป็นต้นแบบของยากลุ่ม β -lactam และเป็นยา β -lactam ชนิดแรกคือยา penicillin ถูกค้นพบโดย Sir Alexander Fleming ในปี ค.ศ. 1928 (30) และต่อมา ยา β -lactam เป็นยาต้านจุลชีพที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย (11) ประกอบด้วยกลุ่มย่อยของยาหลายกลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะมีลักษณะโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคือ β -lactam ring (31) ยากลุ่ม β -lactam แบ่งได้เป็น penicillins cephalosporins cephamycins carbapenems และ monobactams (32) ดังมีรายละเอียดดังนี้

Penicillins เป็นยากลุ่มแรกที่ถูกค้นพบโดย Sir Alexander Fleming ในปี ค.ศ. 1928 หลังจากนั้น Florey และคณะได้สกัดแยกสารที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย คือสารที่มีชื่อว่า เพนนิซิลลิน (penicillin) โดยยานี้ใช้กันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน มีโครงสร้างหลักของยา คือ กรด 6-aminopenicillanic (β -lactam ring เชื่อมต่อกับวงแหวน thiazolidine) (33) เมื่อมีการใช้ยา penicillin กันอย่างกว้างขวาง จึงก่อให้เกิดการดื้อยาดังกล่าวในแบคทีเรียหลายชนิด จนต้องนำไปสู่การคิดค้นและพัฒนา ยา penicillin ตัวใหม่ๆ ขึ้นมา โดยใช้กรรมวิธีกึ่งสังเคราะห์ ทำให้เกิดยาที่มีความทนต่อ penicillinase คือ ยา penicillinase-resistant penicillins (PRPs) และ extended-spectrum penicillins (27)



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของยากลุ่ม penicillins (34)

Cephalosporins เป็นยาที่ได้จากกระบวนการหมัก (fermentation) ของเชื้อรา *Cephalosporium* มีโครงสร้างหลักคือกรด 7-aminocephalosporanic (35) (β -lactam ring เชื่อมต่อกับวงแหวน dihydrothiazine) ยากลุ่มนี้ใช้ไม่ได้ผลกับเชื้อ enterococci ซึ่งคือต่อยาชนิดนี้ โดยธรรมชาติอยู่แล้ว ยากลุ่มนี้แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม (27) ดังนี้

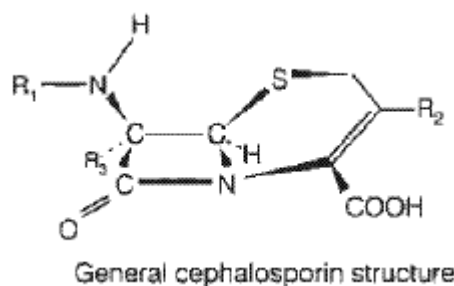
1. First generation (narrow spectrum) cephalosporins ได้แก่ cefazolin cephalexin cefadroxil cephaloridine cephalothin cephapirin และ cephadrine ยากลุ่มนี้ใช้ได้ดีกับเชื้อแกรมบวก ได้แก่ Staphylococci และ Streptococci แต่ใช้ไม่ได้ผลกับเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และบางสายพันธุ์ของเชื้อ coagulase-negative staphylococci ยานี้มีฤทธิ์ปานกลางกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Klebsiella* และมีฤทธิ์ต่ำในเชื้อ *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas* และเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae*

2. Second generation (expanded spectrum) cephalosporins ได้แก่ cefamandole cefuroxime cefaclor cefonicid และ cefprozil ยากลุ่มนี้สามารถทนทานต่อเอนไซม์ β -lactamase บางชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจำพวก *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus* และ *Neisseria* แต่ยากลุ่มนี้ไม่สามารถใช้กับเชื้อ *Pseudomonas* ได้

3. Third generation (board spectrum) cephalosporins ได้แก่ cefoperazone cefotaxime ceftibuten cefixime cefpodoxime ceftazidime cefdinir ceftizoxime และ ceftriaxone ยาในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพน้อยต่อเชื้อแกรมบวก แต่มีประสิทธิภาพสูงในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas* เนื่องจากมีความต้านทานต่อเอนไซม์ β -lactamase และสามารถผ่านชั้นผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี โดยที่ยา cefoperazone และยา ceftazidime มีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ส่วนยา cefotaxime ceftizoxime และ ceftriaxone ต้านเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ได้ดี

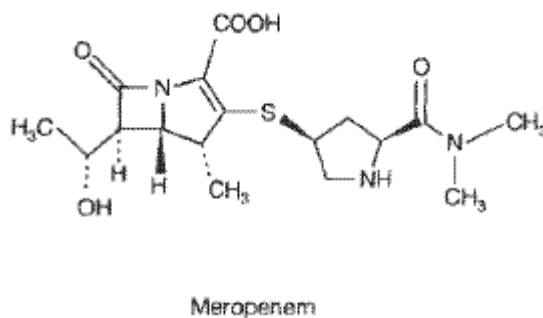
4. Fourth generation cephalosporins ได้แก่ cefpirome และ cefepime ยาในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นทั้งในเชื้อแกรมบวก และในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ สามารถต้านทานเอนไซม์ β -lactamase และสามารถผ่านชั้นผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่ากลุ่ม third generation cephalosporins (36)

Cephameycins มีความสามารถในการต้านทานเชื้อกลุ่ม anaerobe โดยทั่วไปมีฤทธิ์คล้ายกับยาในกลุ่ม second generation (expanded spectrum) cephalosporins แต่มีความต้านทานต่อเอนไซม์ β -lactamase มากกว่า ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ cefoxitin cefotetan และ cefmetazole (27, 37)



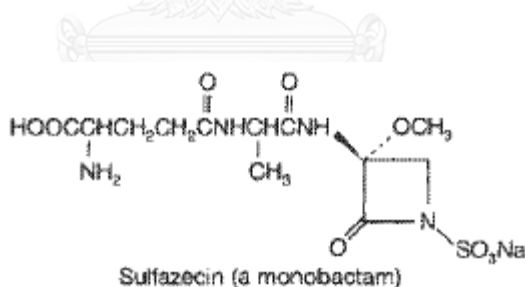
ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของยาในกลุ่ม cephalosporins (34)

Carbapenems ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ imipenem meropenem และ ertapenem เป็นยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสูง สามารถต้านเชื้อจุลชีพได้หลายกลุ่ม การออกฤทธิ์ของยาโดยจับกับ penicillin-binding proteins (PBPs) ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์และทำให้การเชื้อมตาย ยาในกลุ่มนี้ถือเป็นยาที่มีฤทธิ์กว้างที่สุดจึงนำมาใช้เป็นยาในกลุ่มท้ายๆหรือเป็นทางเลือกสุดท้าย (38) แต่ในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อยาในกลุ่มนี้แล้วเช่นกัน (39) ยาในกลุ่ม carbapenems ที่ถูกค้นพบตัวแรกคือ thienamycin เป็นสารที่ผลิตจาก *Streptomyces cattleya* (40) แต่เนื่องจาก thienamycin มีสถานะไม่คงที่ (unstable) ในสารละลายและไม่สามารถทนความเป็นด่างอ่อนได้ (pH8.0) อีกทั้งยังมีปฏิกิริยากับนิวคลีโอไทด์ (41) จึงได้มีการพัฒนายาที่มีความเหมาะสมในการรักษาซึ่งยานี้เป็นอนุพันธ์ของ thienamycin ได้แก่ยา imipenem ซึ่งไม่มีข้อจำกัดแบบ thienamycin ในปี ค.ศ. 1985 ยา imipenem ถือเป็นยาในกลุ่ม carbapenems ตัวแรกที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย แต่ข้อด้อยของยา imipenem อยู่ที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์ได้ด้วย dehydropeptidase I (DHP-I) ซึ่งพบในไตของมนุษย์ทำให้ระดับของยาลดลงอย่างรวดเร็ว (42) ดังนั้นยานี้จึงต้องใช้ร่วมกับ cilastatin ซึ่งเป็นสารยับยั้ง DHP-I ทำให้ระดับยาในเลือดไม่ลดลงเร็วเกินไป (43, 44) ต่อมาจึงมีการพัฒนายาในกลุ่มนี้ต่อมาเป็น meropenem และ ertapenem



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะโครงสร้างของยา meropenem ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม carbapenems (34)

Monobactams ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการจับกับ penicillin-binding protein 3 (PBP3) มีความสามารถใกล้เคียงกับยาในกลุ่ม aminoglycosides และ third generation (broad spectrum) cephalosporins ทั้งยังมีความทนทานต่อเอนไซม์ β -lactamase สูง มีความสามารถต้านเชื้อในกลุ่มแกรมลบ กลุ่ม aerobe และ facultative anaerobe ได้แก่กลุ่ม *Enterobacteriaceae* และกลุ่ม *Pseudomonas* แต่อย่างไรก็ตามยาในกลุ่มนี้กลับไม่ค่อยให้ผลดีกับการรักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และกลุ่ม aerobe บางชนิด ได้แก่เชื้อ *Acinetobacter* และ *Burkholderia* เป็นต้น ในปัจจุบันยาในกลุ่มนี้มียาที่ใช้เพียงตัวเดียวคือ aztreonam (27, 45)

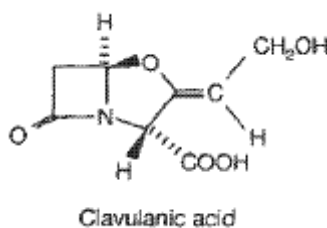


ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของยาในกลุ่ม monobactams (34)

สารยับยั้ง β -lactamase (β -lactamase inhibitor) เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพในระดับต่ำ แต่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -lactamase ได้ จึงต้องใช้ผสมร่วมกับยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactam เพื่อให้เกิดการออกฤทธิ์ของยาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น สารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ได้แก่

1. Clavulanic acid เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ที่มีจุดกำเนิดร่วมกับยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่สาร olivanic acids (เป็น backbone ของยาในกลุ่ม carbapenems ก่อนจะค้นพบสาร thienamycin ซึ่งมีฤทธิ์เป็น carbapenems) (46, 47) แต่ด้วยข้อต่อหลายประการของ

olivanic acids อาทิเช่น ความไม่คงทนของสาร (unstability) ความสามารถในการผ่านเข้าสู่เซลล์น้อย olivanic acids จึงไม่สามารถแก้ปัญหาการดื้อยาได้ (40) จึงนำไปสู่การพัฒนาและค้นพบ clavulanic acid และ thienamycin โดย clavulanic acid จะเข้าจับกับเอนไซม์ β -lactamase อย่างถาวรทำให้ยาที่ใช้ควบคู่กับ clavulanic acid สามารถออกฤทธิ์กำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น โดยยาที่ใช้ร่วมกับ clavulanic acid เป็นส่วนใหญ่คือยา amoxicillin (48)



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะโครงสร้างของ clavulanic acid (34)

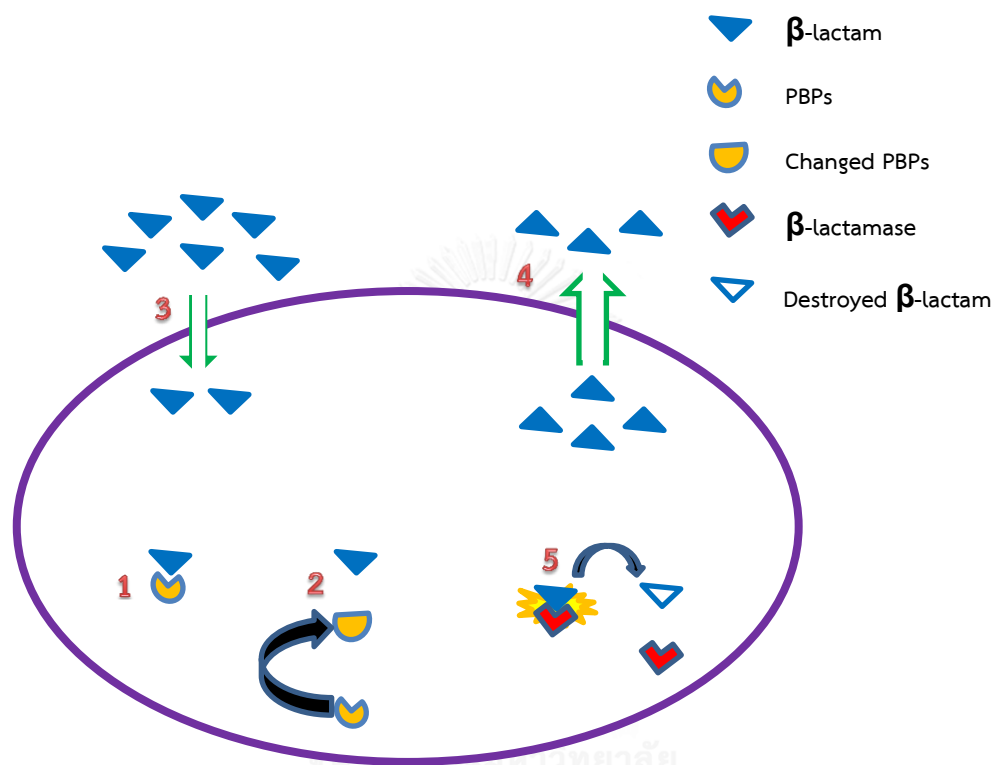
2. Tazobactam เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ที่มีความสามารถใกล้เคียงกับ clavulanic acid แต่มีฤทธิ์มากกว่า sulbactam สำหรับเอนไซม์ β -lactamase ที่เกิดจากยีน TEM และ SHV และอนุพันธ์ของยีนทั้งสอง (49) tazobactam จะมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ได้เกือบทุกประเภท โดย tazobactam มักจะใช้ร่วมกับยา piperacillin คือ piperacillin/tazobactam แต่ก็ยังยานี้ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase จากยีน AmpC (คลาส C β -lactamase) ได้ (50)

3. Sulbactam เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase อีกหนึ่งตัวที่สำคัญที่ช่วยให้ยาในกลุ่ม cephalosporins ทำงานในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น ปกติจะใช้ sulbactam คู่กับยา cefoperazone (51)

โดยยาในกลุ่ม β -lactam ที่ได้กล่าวมาข้างต้นนี้จะออกฤทธิ์โดยไปจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ transpeptidase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า penicillin-binding proteins (PBPs) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียในระยะที่มีการสร้างผนังเซลล์ จึงทำให้ไม่เกิดกระบวนการ transpeptidation หรือการ cross-linked ของสาย peptidoglycan (ระหว่างหน่วยย่อย N-acetylglucosamine: NAG และ N-acetylmuramic acid: NAM) ผลคือทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ ผนังเซลล์เกิดความผิดปกติ ทำให้เชื้อไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้และตายในที่สุด (32, 52) สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* ยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากเชือดังกล่าวจะเป็นยา β -lactam ในกลุ่ม cephalosporins ได้แก่ ceftazidime (53) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาซ้ำๆ เดิมๆ เป็นเวลานาน

หรือใช้ยาแบบผิดๆโดยที่ไม่มีการวางแผนจากข้อมูลความไวต่อยาก็อาจจะก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อได้ (32)

3. กลไกการดื้อยากลุ่ม β -lactam



ภาพที่ 2.6 แสดงกลไกการดื้อยากลุ่ม β -lactam ของเชื้อแบคทีเรีย โดย 1. การทำงานของยา β -lactam ปกติ 2. กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา 3. การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ 4. การขับยาออกจากเซลล์ 5.การสร้างเอนไซม์ทำลายยา

กลไกการดื้อยากลุ่ม β -lactam สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลไกสำคัญดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา

ตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม β -lactam คือ penicillin-binding proteins (PBPs) (54) ซึ่งจะไปขัดขวางกระบวนการ transpeptidation ที่มีความสำคัญในการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้และตายในที่สุด แต่หากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBPs ไปจะก่อให้เกิดการดื้อยาขึ้น ซึ่งส่วนมากจะพบการดื้อยาดังกล่าวด้วยกลไกนี้ในเชื้อ

แบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดย PBP_s นั้นอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีอยู่หลายชนิดแล้วแต่เชื้อ PBP_s ที่เป็นชนิดเดียวกันอาจมีโครงสร้างต่างกันหากไม่ใช่เชื้อชนิดเดียวกัน การดื้อยาในกลุ่ม β -lactam โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBP_s ที่เป็นปัญหาอยู่มากคือเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นพวก methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) เกิดการเปลี่ยนแปลง PBP_s โดยอิทธิพลของยีน *mecA* ซึ่งมี PBP2a เพิ่มขึ้นมาจากเดิมที่มี PBP4 ชนิดเดียว การเพิ่มมานี้อาจเกิดขึ้นตลอดเวลาหรือถูกกระตุ้น (55) อาจมาจากหลายปัจจัยเช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสาร เป็นต้น (56) ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam ทั้งหมด รวมถึงยาในกลุ่ม cephalosporins monobactams และกลุ่ม carbapenems ด้วย

อย่างไรก็ตามการดื้อยาดังกล่าวสามารถเปลี่ยนแปลง PBP_s นี้พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ อาทิเช่นเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ที่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ β -lactamase แต่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน *ponA* และ *penA* ที่ควบคุมการสร้าง PBP1 และ PBP2 ตามลำดับทำให้เชื้อดังกล่าวดื้อยา penicillin (57, 58) นอกจากนี้ยังมีเชื้ออื่นๆ ที่เกิดการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBP_s ได้แก่ เชื้อ *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *N. meningitidis* และ *Bacteroides fragilis* เป็นต้น

2. การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบริเวณ outer membrane จะมีช่องทางสำหรับให้สารผ่านเข้าหรือออกจากเซลล์เพื่อควบคุมสมดุลภายในเซลล์ ประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า porin ซึ่งเป็นช่องทางของยาที่เข้าสู่เซลล์เช่นเดียวกัน เชื้อบางชนิดเช่น ได้แก่ *E. coli* มีโปรตีน porin 2 ชนิดคือ OmpC และ OmpF การกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน porin จะทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้นำไปสู่การดื้อยาในที่สุด (59) ในขณะที่เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถดื้อยาหลายชนิดได้ด้วยการลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ ได้แก่ ยาดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งจำเพาะกับการเข้าสู่เซลล์ทางช่องของโปรตีนที่ประกอบด้วย OprD การกลายพันธุ์ของยีนหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ OprD ทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้ได้ (60)

3. การขับยาออกจากเซลล์

กลไกการดื้อยาชนิดนี้ขับเคลื่อนด้วยพลังงาน เรียกว่าระบบ efflux (61) การทำงานจะเป็นในลักษณะของการนำยาที่ผ่านเข้าสู่เซลล์แล้วขับออกจากเซลล์ก่อนที่จะจับกับเป้าหมายของยา ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ตัวอย่างการดื้อยาดังกล่าวด้วยกลไกการขับยาออกจากเซลล์นี้ได้แก่ เชื้อ *P. aeruginosa* มีโปรตีนหลายตัวทำงานร่วมกันเป็นระบบ efflux ที่สำคัญ ได้แก่ MexA MexB และ

OprM (62) มีบทบาทในการขับยาต้านเชื้อแบคทีเรียหลายกลุ่มโดยยาที่ถูกขับออกมานั้นมีความจำเพาะ

4. การสร้างเอนไซม์

เป็นกลไกที่มีความสำคัญและพบได้บ่อยที่สุดสำหรับการดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam โดยเอนไซม์ที่ทำลายยาในกลุ่ม β -lactam มีชื่อว่า เอนไซม์ β -lactamase ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

4. β -lactamase

เอนไซม์ β -lactamase เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายยาในกลุ่ม β -lactam ได้ โดยเข้าไปจับโมเลกุลของยาและทำลาย amide bond ของ β -lactam ring (ตำแหน่งระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน) ทำให้ยาเสียโครงสร้างและหมดฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ (32) เอนไซม์ β -lactamase จะเข้าจับกับยา β -lactam แบบไม่ถาวรคือเมื่อเข้าจับและทำลายยาโมเลกุลหนึ่งเสร็จจะสามารถแยกออกจากโมเลกุลยาที่ถูกทำลายแล้วไปจับกับโมเลกุลของยาโมเลกุลอื่นได้อีก จึงทำให้เอนไซม์ β -lactamase มีความสามารถในการทำลายยาในกลุ่ม β -lactam ได้ดี (63)

ในปัจจุบันมีเอนไซม์ β -lactamase มากมายหลายชนิด แต่ถ้าจัดกลุ่มตามโครงสร้างระดับโมเลกุล (molecular classification) ตามระบบของ Ambler สามารถแบ่งได้เป็น 4 คลาส ได้แก่ คลาส A B C และ D โดยเอนไซม์คลาส A C และ D จะมีตำแหน่งออกฤทธิ์ที่กรดอะมิโน serine มีเฉพาะเอนไซม์คลาส B เท่านั้นที่อาศัยธาตุโลหะประจุ $2+$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นธาตุสังกะสี (Zn^{2+}) (12) คุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละคลาส มีรายละเอียดดังนี้

คลาส A β -lactamase

เอนไซม์ β -lactamase คลาส A อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) พบว่าเป็นเอนไซม์กลุ่มที่มีความหลากหลายของยีนมากที่สุดในบรรดา 4 คลาส(15) ได้แก่ ยีน VEB PER CTX TEM SHV และ GES โดยในแต่ละยีนจะแยกย่อยไปอีก ได้แก่ TEM-1 TEM-50 เป็นต้น เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความสามารถการทำลายยาในกลุ่ม β -lactam ได้หลายชนิด ได้แก่ penicillins cephalosporins, monobactams แต่สามารถถูกยับยั้งด้วย β -lactamase inhibitor ได้แก่ clavulanic acid เป็นต้น (15, 63) แต่ถึงอย่างไรก็ตามเชื้อสามารถกลายพันธุ์จนสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีความต้านทานต่อ β -lactamase inhibitor ได้แล้ว (64)

VEB-1 มีชื่อเต็มว่า Vietnamese extended-spectrum β -lactamase-1 โดยที่มาของชื่อมาจากการค้นพบยีนนี้จากเชื้อ *E. coli* ในเด็กชาวเวียดนามอายุ 4 เดือนในปี ค.ศ. 1999 (65) เอนไซม์ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้างและยาในกลุ่ม

monobactams นอกจากนี้ VEB-1 ยังเป็นต้นแบบในการกลายพันธุ์ไปเป็น VEB-2 ถึง VEB-16 ด้วย (66, 67) มีรายงานการพบเอนไซม์ VEB-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* ได้หลายประเทศ ได้แก่ กลุ่มประเทศตะวันออกกลาง จากงานวิจัยของ Al-Agamy MH. และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 ที่ประเทศซาอุดีอาระเบีย (68) ทำการตรวจหายีน VEB-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* 200 สายพันธุ์ พบยีน VEB-1 จำนวน 20 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 10.00 จากงานวิจัยของ Zafer MM. และคณะ ในปีเดียวกัน จากประเทศอียิปต์ (69) ที่ทดสอบหายีน VEB-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* 122 สายพันธุ์ พบยีน VEB-1 จำนวน 5 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 10.4 Mirsalehian A. และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 จากประเทศอิหร่าน (22) ที่พบยีน VEB-1 จำนวน 21 สายพันธุ์ จากเชื้อ *P. aeruginosa* 170 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 12.35 หรือจากประเทศแถบยุโรป ได้แก่ สหราชอาณาจักร (70) และที่บัลแกเรีย (71) ตรวจหายีน VEB-1 ร้อยละ 80.00 และ 33.10 ตามลำดับ ในประเทศแถบเอเชียเช่นประเทศจีนก็มีรายงานการพบยีน VEB-1 เช่นกัน เช่น รายงานของ Chen Z. และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 (72) ที่พบยีน VEB-1 ร้อยละ 11.40 (24 สายพันธุ์) จากเชื้อ *P. aeruginosa* 210 สายพันธุ์ ซึ่งรายงานในประเทศไทยก็พบยีน VEB-1 ค่อนข้างสูง เช่น รายงานในปี ค.ศ. 2001 ที่มีการทดสอบเชื้อ *P. aeruginosa* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับฟีนอไทป์ 17 สายพันธุ์จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ตรวจพบยีน VEB-1 จำนวน 16 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 94.00 (73) หรือการศึกษาของ Girlich D. และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 (16) ที่ได้ทำการทดสอบเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime จำนวน 33 สายพันธุ์ ตรวจพบยีน VEB-1 จำนวน 31 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 93.00

PER-1 ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1994 ปัจจุบันมีการกลายพันธุ์ไปเป็น PER-2 ถึง PER-8 (66) มีฤทธิ์ในการทำลายยา ceftazidime และกลุ่ม monobactams มีโครงสร้างในระดับโมเลกุลต่างจาก ESBL ชนิดอื่น (32, 74) สามารถพบยีนนี้แพร่กระจายในเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *A. baumannii* (75) แม้ว่าในระยะแรกจะพบเอนไซม์ PER ไม่มากนัก แต่มีรายงานเพิ่มขึ้นในอเมริกาใต้และยุโรป และเป็นปัญหาในการรักษา (76, 77) ซึ่งมีรายงานการพบยีน PER-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* มากในกลุ่มประเทศตะวันออกกลางและยุโรป อาทิเช่น จากการศึกษาของ Mirsalehian A. และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 ในประเทศอิหร่าน (22) เชื้อ *P. aeruginosa* 67 สายพันธุ์ ที่ดื้อยาหลายชนิด พบยีน PER-1 สูงถึงร้อยละ 49.25 หรือรายงานในปี ค.ศ. 2014 จากประเทศอิหร่านของ Farshadzadeh Z. และคณะ (78) ที่นำเชื้อที่มีเอนไซม์ ESBL 96 สายพันธุ์ มาตรวจหายีนและพบยีน PER-1 จำนวน 52 สายพันธุ์ คิดเป็น 54.16 หรือจากรายงานของ Empel J. และคณะ ที่ประเทศโปแลนด์ในปี ค.ศ. 2007 (79) ที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 41 สายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBL นั้นมียีน PER-1 ทุกสายพันธุ์ และจากรายงานที่ประเทศตุรกีในปี ค.ศ. 1997 ของ Vahaboglu H. และคณะ (80) ที่พบเชื้อ *P. aeruginosa* 72 สายพันธุ์ มียีน PER-1 33 สายพันธุ์ คิด

เป็นร้อยละ 46.00 นอกจากนี้ยังมีการพบยีน PER-1 ในประเทศอื่นๆด้วยเช่น จากการศึกษาของ Qing Y. และคณะในปี ค.ศ. 2014 ที่ประเทศจีน (25) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 51 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ceftazidime มียีน PER-1 อยู่ร้อยละ 68.60 แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการพบยีนชนิดนี้ในประเทศไทย

TEM-1 และอนุพันธ์ ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1965 จากเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยชื่อ Temoneria ในเมืองเอเธนส์ ประเทศกรีซ ซึ่งชื่อของเอนไซม์นี้มาจากพญานาค 3 ตัวแรกของชื่อผู้ป่วย (TEM) (81) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีการกลายพันธุ์มากโดยการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน (64, 66) โดยมีฤทธิ์ในการทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins ซึ่งมีรายงานการพบยีน TEM ในเชื้อ *P. aeruginosa* ได้น้อยมาก เช่น จากการศึกษาของ Lin S. และคณะในปี ค.ศ. 2012 ในประเทศไต้หวัน (24) พบว่าจากเชื้อ *P. aeruginosa* 57 สายพันธุ์มียีน TEM อยู่ร้อยละ 13.00 ซึ่งพบว่าเป็นยีน TEM อย่างเดียวร้อยละ 1.00 และที่เหลืออีกร้อยละ 12.00 พบยีน TEM ร่วมกับยีน AmpC หรือรายงานการพบอนุพันธ์ของยีน TEM-1 เช่นการค้นพบยีน TEM-4 ในเชื้อ *P. aeruginosa* ของ Poirel L. และคณะจากประเทศฝรั่งเศสในปี ค.ศ. 1999 (82) หรือรายงานจากประเทศฝรั่งเศสในปี ค.ศ. 2002 ของ Dubois V. และคณะ (83) ที่มีรายงานการค้นพบ TEM-21 ในเชื้อ *P. aeruginosa* สำหรับในประเทศไทยรายงานการค้นพบยีน TEM-1 และอนุพันธ์ในเชื้อ *P. aeruginosa* ยังไม่มีให้พบเห็นแต่ถึงอย่างไรก็ตามก็มีรายงานการพบยีน TEM-1 และอนุพันธ์ในเชื้อในกลุ่มอื่นๆเช่น *Enterobacteriaceae* ดังเช่นการศึกษาของ Chanawong A. และคณะในปี ค.ศ. 2007 (84) ที่พบยีน TEM-1 จากเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่เก็บรวบรวมได้ในปี ค.ศ. 1998-1999 และ ค.ศ. 2003 ร้อยละ 48 (23/48 สายพันธุ์) และ 79 (41/52สายพันธุ์) ตามลำดับ

CTX-M ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1988 เป็นครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* ในประเทศญี่ปุ่น โดยให้ชื่อว่า FEC-1 (85) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1990 มีการค้นพบเอนไซม์ดังกล่าวเช่นกันในสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนีโดยตั้งชื่อว่า CTX-M-1 (86) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการทำลายยา cefotaxime ได้ดีกว่ายา ceftazidime (87) ซึ่งถือเป็นลักษณะสำคัญที่แตกต่างจาก ESBL ในกลุ่มอื่นๆ ซึ่งก็มีรายงานการพบยีน CTX-M ในเชื้อ *P. aeruginosa* เช่น จากการศึกษาของ Polotto M. และคณะในปี ค.ศ. 2012 ในประเทศบราซิล (88) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 56 สายพันธุ์มียีน CTX-M-2 อยู่ร้อยละ 19.60 หรือรายงานการระบาดของยีน CTX-M จากรายงานการศึกษาของ Celenza G. และคณะในปี ค.ศ. 2006 (89) ที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 69 สายพันธุ์พบยีน CTX-M อยู่มากถึงร้อยละ 82.61 ในประเทศแถบเอเชียเช่น จากการศึกษาของ Qing Y. และคณะในปี ค.ศ. 2014 ในประเทศจีน (25) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 51 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ceftazidime มียีน CTX-M อยู่ร้อยละ 17.60 ยังไม่มีรายงานการพบยีน CTX-M ในเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศไทย แต่มี

รายงานการพบยีนนี้มากในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ดังรายงานของ Chanawong A. และคณะในปี ค.ศ. 2007 (84) ที่พบยีน CTX-M-9 ร้อยละ 52.00 จากเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* 48 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมได้ในปี ค.ศ. 1998-1999 และพบยีน CTX-M-15 CTX-M-14 และ CTX-M-9 ร้อยละ 44.00, 11.00 และ 10.00 ตามลำดับ จากเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* 52 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมได้ในปี ค.ศ. 2003 หรือจากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Luvsansharav UO. และคณะในปี ค.ศ. 2012 (90) ที่ศึกษาหา ยีน CTX-M ในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* จำนวน 417 สายพันธุ์ พบว่ามียีน CTX-M อยู่ 274 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 65.70 ซึ่งในจำนวนนี้ส่วนมากร้อยละ 60.60 เป็นยีน CTX-M-9 group และอีกร้อยละ 38.70 เป็นยีน CTX-M-1 group

SHV-1 พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1972 โดย Pitton JS. ตอนแรกให้ชื่อว่า Pit-2 (91) ต่อมาเปลี่ยนมาเป็น SHV (sulfhydryl variable) เพราะเอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถในการตอบสนองต่อการยับยั้งฤทธิ์ได้โดยหมู่ sulfhydryl ที่เป็นส่วนประกอบของสาร *p*-chloromercuribenzoate ได้ไม่เท่ากันแปรผันไปตามชนิดของเอนไซม์ที่เป็นซับสเตรต ยีนนี้มีความใกล้เคียงกับยีน TEM-1 ถึงร้อยละ 63.70 (92) พบยีนนี้ได้บนโครโมโซมของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และสามารถส่งต่อไปยังเชื้ออื่นๆได้ (93) เริ่มแรกเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถทำลายยาในกลุ่ม penicillins เท่านั้นซึ่งถือว่ามีฤทธิ์แคบ แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์จนทำให้มีความสามารถในการจับกับตัวยาเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins ในรุ่นที่ 3 ได้ (94) และจากการศึกษาของ Kalai Blagui S. และคณะในปี ค.ศ. 2009 ในประเทศอินเดียพบเชื้อ *P.aeruginosa* มียีน SHV-1 อยู่ร้อยละ 100.00 จากตัวอย่าง *P.aeruginosa* ที่เป็น multidrug resistant 12 ตัวอย่าง (95) หรือการค้นพบยีน SHV-2a ในเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ RP-1 ที่ประเทศฝรั่งเศสในปี ค.ศ. 1999 (96) สำหรับในประเทศไทยยีน SHV นั้นส่วนมากพบได้ในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เช่นการศึกษาของ Chanawong A. และคณะในปี ค.ศ. 2007 (84) ที่พบยีน SHV ร้อยละ 79.00 (38/48 สายพันธุ์) และ 36.00 (19/52 สายพันธุ์) จากเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่เก็บรวบรวมได้ในปี ค.ศ. 1998-1999 และ ค.ศ. 2003 ตามลำดับ แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็เคยมีรายงานการพบยีน SHV ในเชื้อ *P. aeruginosa* จากการศึกษาของ Chanawong A. และคณะในปี ค.ศ. 2001 (73) ที่พบยีน SHV-12 ในเชื้อ *P. aeruginosa* 1 สายพันธุ์จากเชื้อ *P. aeruginosa* 16 สายพันธุ์

คลาส B β -lactamase

เอนไซม์ β -lactamase คลาส B เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Metallo- β -lactamase เอนไซม์ชนิดนี้ใช้สังกะสี (Zn^{2+}) ในการเร่งปฏิกิริยา มีความสามารถในการทำลายยาในกลุ่ม β -lactam ได้เกือบทุกชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในยาในกลุ่ม carbapenems ไม่สามารถต้านฤทธิ์ด้วยสาร β -lactamase inhibitor ได้ (15) การยับยั้งเอนไซม์กลุ่มนี้จะต้องใช้สารเคมีที่ไปแย่งจับกับไอออนของสังกะสี ได้แก่

ethylenediaminetetraacetic (EDTA) ทำให้เอนไซม์ไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยาและไม่สามารถทำงานได้ในที่สุด (97)

คลาส C β -lactamase

เอนไซม์ β -lactamase คลาส C เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า AmpC β -lactamase หรือ cephalosporinase เนื่องจากเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ทำลายของยา คือ ยากลุ่ม cephalosporins ส่วนอีกชื่อที่เรียกว่า AmpC ได้มาจากการค้นพบเอนไซม์นี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1940 ที่พบการดื้อยา ampicillin ในเชื้อ *E. coli* ซึ่งพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องด้วยกัน 3 ยีนคือ AmpA AmpB และ AmpC ซึ่งมีเฉพาะยีน AmpC เท่านั้นที่มีส่วนในการสร้างเอนไซม์ (98-101) เอนไซม์ AmpC เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้มากในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และกลุ่ม Nonfermentative gram-negative bacilli เอนไซม์ AmpC แม้จะมีโครงสร้างทางโมเลกุลต่างจากเอนไซม์ใน คลาส A แต่มีฤทธิ์ในการทำลายยาคล้ายกับกลุ่มของ คลาส A ที่เป็น ESBL คือ ทำลายยากลุ่ม penicillins และ cephalosporins แต่ไม่สามารถทำลาย ยากลุ่ม carbapenems ได้ แต่มีฤทธิ์ในการทำลายยาที่แตกต่างจากเอนไซม์ ESBL คือมีสามารถ ทำลายยากลุ่ม cephamycins ได้ แต่ไม่สามารถทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 4 ไม่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารที่เป็น β -lactamase inhibitor (102) สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* มีการศึกษาพบว่า หากมีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบางตำแหน่งของโมเลกุลโครงสร้าง เช่น alanine ที่ตำแหน่ง 105 จะทำให้เอนไซม์ชนิดนี้มีฤทธิ์ที่กว้างขึ้นคือมีความสามารถในการทำลายยา ในกลุ่ม carbapenems ได้ด้วย (103)

เอนไซม์ AmpC นั้นอาจเกิดจากการสร้างเอนไซม์ AmpC จากยีน AmpC ที่อยู่บนส่วนของ โครโมโซม (chromosomal-mediated) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด ได้แก่ *Enterobacter Serratia Morganella* และ *Pseudomonas* เป็นต้น ทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาที่เป็นเป้าหมายของเอนไซม์แต่กำเนิดหรืออาจเรียกว่าเป็นการดื้อยาจากภายใน (intrinsic resistance) (102, 104) อีกประเภทหนึ่งคือการสร้างเอนไซม์ AmpC จากพลาสมิด (plasmid-mediated) ซึ่งประเภทนี้พบอย่างแพร่หลายในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* (105) เกิดจากการย้ายส่วนของยีน AmpC ที่เคยอยู่บนโครโมโซมมาอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่ง ไปสู่อีกเซลล์ได้ง่ายได้แก่ พลาสมิด ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีน AmpC ได้อย่างรวดเร็วและทำให้เชื้อนั้นเดิมที่ไม่มียีน AmpC ก็มียีน AmpC และสร้างเอนไซม์ AmpC ได้ส่งผลให้เชื้อนั้นดื้อต่อยาได้ ซึ่งเป็นผลหลังจากที่ได้รับยีน AmpC มาจากภายนอก (acquired resistance) ซึ่งในทางการตรวจระดับพีโนไทป์ไม่สามารถแยกแยะระหว่างเอนไซม์ AmpC ที่มาจากโครโมโซมหรือมาจากพลาสมิดได้ต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลเพียงอย่างเดียว (106) สำหรับการจำแนกหรือจัดกลุ่มเอนไซม์ AmpC

นั้นโดยทั่วไปจะจัดกลุ่มเฉพาะเอนไซม์ AmpC ที่มาจากพลาสมิด (102, 105) โดยจำแนกได้ 10 กลุ่ม ดังนี้

1. CYM พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1989 ที่ประเทศเกาหลีใต้จากเชื้อ *K. pneumoniae* (107) ซึ่ง CMY มาจากคำว่า cephamycinase เพราะเป้าหมายหลักของเอนไซม์กลุ่มนี้คือยาในกลุ่ม cephamycins เอนไซม์ในกลุ่ม CYM นี้ถือเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่สุดในบรรดาเอ็นที่สร้างเอนไซม์ AmpC ที่พบบนพลาสมิด ปัจจุบันมีมากถึง 136 ชนิด (66) พบ CMY-2 ได้มากที่สุดจากหลายๆแหล่งทั่วโลก ซึ่งมีต้นกำเนิดจากเชื้อ *Citrobacter freundii* (102, 108, 109)

2. MIR พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาจากเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่ง MIR มาจากคำว่า Miriam เป็นชื่อโรงพยาบาลที่พบเชื้อนี้เป็นครั้งแรก (110) ปัจจุบันมีเอนไซม์ AmpC กลุ่ม MIR อยู่ 18 ชนิด (66)

3. MOX พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 ที่ประเทศญี่ปุ่นจากเชื้อ *K. pneumoniae* คำว่า MOX มาจากการที่เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้เชื้อดื้อต่อยา moxalatom (111) ปัจจุบันมีเอนไซม์ AmpC กลุ่ม MOX อยู่ 11 ชนิด(66)

4. LAT พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 ที่ประเทศกรีซจากเชื้อ *K. pneumoniae* คำว่า LAT มาจากการที่เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้เชื้อดื้อต่อยา latamoxef และเป็นเอนไซม์ AmpC ที่มีเพียงตัวเดียวคือ LAT-1 ซึ่งไม่พบอนุพันธ์ของยีนดังกล่าว (112)

5. DHA พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1997 ที่ประเทศซาอุดีอาระเบียจากเชื้อ *Salmonella* spp. คำว่า DHA มาจากคำว่า Dhahran ซึ่งเป็นชื่อโรงพยาบาลที่ค้นพบเชื้อนี้เป็นครั้งแรก (113) ปัจจุบันพบเอนไซม์ AmpC กลุ่ม DHA อยู่ 23 ชนิด (66)

6. FOX พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1994 ที่ประเทศอาเจนตินาจากเชื้อ *K. pneumoniae* คำว่า FOX มาจากการที่เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้เชื้อดื้อต่อยา cefoxitin (114) ปัจจุบันพบเอนไซม์ AmpC กลุ่ม FOX อยู่ 11 ชนิดแม้ว่าจะมี FOX-1 ถึง FOX-12 แต่เพราะ FOX-6 ซ้ำกับ FOX-5 (66)

7. ACT พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1997 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาจากเชื้อ *K. pneumoniae* คำว่า ACT มาจากคำว่า AmpC Type กลุ่มนี้มีความพิเศษตรงที่มีการสร้างโปรตีนผนังเซลล์ภายนอก ลดลง ทำให้เกิดการดื้อต่อยา imipenems ด้วย (115) ปัจจุบันพบเอนไซม์ AmpC กลุ่ม ACT อยู่ 38 ชนิด (66)

8. ACC พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1999 ที่สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนีจากเชื้อ *K. pneumoniae* คำว่า ACC มาจากคำว่า Ambler คลาส C เพราะเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับเอนไซม์คลาส C (116) ซึ่งถูกเสนอโดย Dr. Richard Ambler (12) ปัจจุบันพบเอนไซม์ AmpC กลุ่ม ACC อยู่ 5 ชนิด (66)

9. BIL พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1992 ที่ประเทศปากีสถานจากเชื้อ *E. coli* คำว่า BIL มาจาก Bilal ซึ่งเป็นชื่อผู้ป่วยที่พบเชื้อที่มียีนดังกล่าว (117) แต่อย่างไรก็ตามพบภายหลังว่า BIL-1 นี้มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับยีน CMY-2 จึงเรียกภายหลังว่า CMY-2 แทน (66, 105)

10. CFE พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 2004 ที่ประเทศญี่ปุ่นจากเชื้อ *E. coli* คำว่า CFE มาจากคำว่า *Citrobacter freundii* เพราะมีการศึกษาระดับพันธุกรรมแล้วพบว่ายีนนี้มาจากยีนที่สร้างเอนไซม์ AmpC ของ *C. freundii* (118) เป็นเอนไซม์ AmpC ที่มีเพียงตัวเดียวคือ CFE-1 ซึ่งไม่พบอนุพันธ์ของยีนดังกล่าว (66)

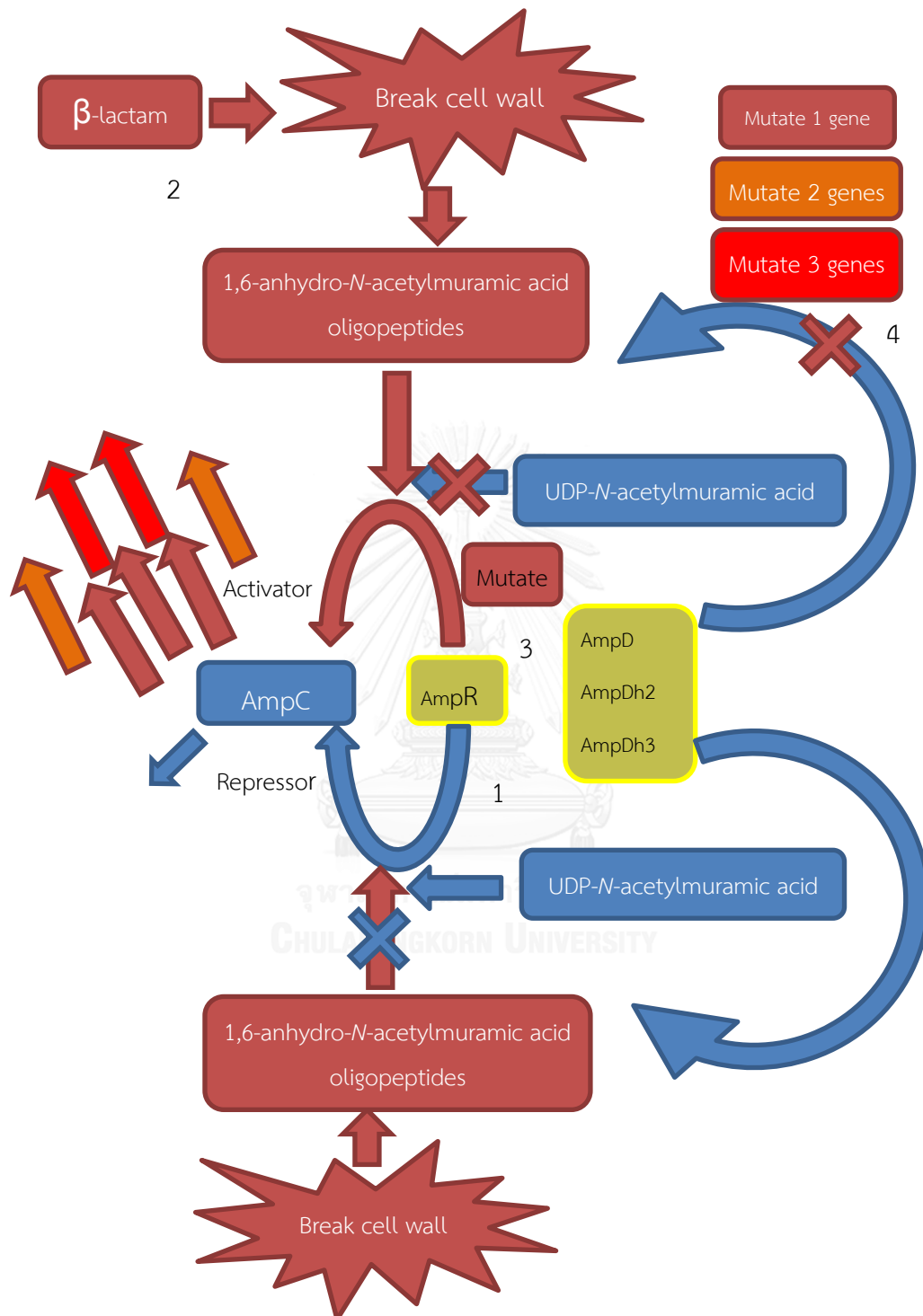
กลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC

โดยปกติการสร้างเอนไซม์ AmpC จะมีการสร้างเอนไซม์อยู่แล้วในระดับที่ต่ำมาก หรือที่เรียกว่า constitutive expression การสร้างเอนไซม์ชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อมีเจริญมากขึ้นดังที่พบในเชื้อ *E. coli* (119) และมีการสร้างเอนไซม์อีกรูปแบบหนึ่งก็คือปกติจะไม่มีการสร้างเอนไซม์ AmpC หรือมีการสร้างน้อยมาก แต่ถ้าหากมีการได้รับยา หรือถูกกระตุ้นจากยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งยา β -lactam ในกลุ่ม cephamycins และ cephalosporins จะเกิดกระบวนการเหนี่ยวนำหรือที่เรียกว่า induce expression ทำให้เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ได้ในปริมาณที่สูง (15, 20) ซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายๆ สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อ *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *C. freundii* เป็นต้น ปัจจุบันกลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเหนี่ยวนำนี้มีความซับซ้อน แต่จะกล่าวคือ ในสภาวะปกติยีน AmpR จะสร้างโปรตีน AmpR ขึ้นเพื่อกดการทำงานของยีน AmpC จึงไม่มีการสร้างเอนไซม์ AmpC เรียกภาวะนี้ว่า repression แต่ในสภาวะที่มีตัวเหนี่ยวนำ ซึ่งตัวเหนี่ยวนำในที่นี้คือยา β -lactam ในกลุ่ม cephalosporins และ/หรือ ยาในกลุ่ม cephamycins ในระยะแรกตัวยาคจะทำหน้าที่ด้านเชื้อแบคทีเรียโดยการเข้าขัดขวางกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารประกอบ murein ส่งผลให้เกิดการสะสมของโปรตีนสายสั้นๆ ที่มีชื่อว่า N-acetylglucosamine-1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid หลังจากนั้นส่วนที่เป็น N-acetylglucosamine จะแยกตัวออกไป ส่วนที่เหลือจะกลายเป็น ชุดของโปรตีนสายสั้น 1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid oligopeptides (tri- tetra- และ pentapeptides) โปรตีนสายสั้นกลุ่มนี้จะเข้าไปแย่งจับกับโปรตีน

สายสั้นที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของโปรตีน AmpR ตามปกติที่ชื่อว่า UDP-*N*-acetylmuramic acid เมื่อ UDP-*N*-acetylmuramic acid ถูกแทนที่ด้วย 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramic acid oligopeptides ที่ตำแหน่งจับบนโปรตีน AmpR ทำให้การจัดเรียงโมเลกุลของโปรตีน AmpR เปลี่ยนไปจากเดิมที่เคยทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการแสดงออกของยีน AmpC ที่สร้างเอนไซม์ AmpC ก็กลายเป็นตัวเร่ง หรือเป็นตัวกระตุ้น (activator) การแสดงออกของยีน AmpC ได้ส่งผลให้เกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC ขึ้นมาในปริมาณมากได้ เรียกสภาวะนี้ว่า derepression (120, 121) นอกจากนี้ยังพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC คือยีน AmpD AmpE และ AmpG โดย ยีน AmpD โดยปกติจะสร้างโปรตีน AmpD ที่ทำหน้าที่เป็น *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase ซึ่งจะคอยทำลายโปรตีนสายสั้น 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramic acid oligopeptides ซึ่งจะปลดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AmpR ดังที่กล่าวไปข้างต้นแล้วก็จะช่วยยับยั้งการสร้างเอนไซม์ AmpC ได้ ยีน AmpE ทำหน้าที่สร้างโปรตีน AmpE ซึ่งมีหน้าที่เป็นโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ทำงานควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC ร่วมกับโปรตีน AmpD (122) ยีน AmpG ที่สร้างโปรตีน AmpG ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ permease ที่ทำหน้าที่นำโปรตีนสายสั้นสำหรับสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียกลับเข้ามาสู่ส่วนไซโทพลาซึม เพื่อนำกลับมาใช้สร้างผนังเซลล์ใหม่ (123) การขาดหรือมีความบกพร่องของยีนทั้ง 3 นี้ ทำให้กลไกเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ AmpC นั้นเสียไป แต่ไม่ได้หมายความว่าจะไม่มีการสร้างเอนไซม์ AmpC กล่าวคือจะมีการสร้างเอนไซม์ AmpC ต่อไปแบบตลอดเวลาและมีปริมาณมากโดยไม่ขึ้นกับปริมาณของสารเหนี่ยวนำที่เรียกว่า constitutive hyperproduction ซึ่งพบว่าสาเหตุที่ก่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC ในปริมาณที่สูงตลอดเวลาได้ที่เรียกว่า constitutive hyperproduction ที่พบได้บ่อยที่สุดคือการที่มีการกลายพันธุ์ของยีน AmpD (124) รองลงมาคือการกลายพันธุ์หรือการขาดหายไปของยีน AmpR (120, 125, 126) พบน้อยสุดคือการบกพร่องของยีน AmpG (123) ถึงอย่างไรก็ตามแม้จะมีกลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้วก็ยังพบอีกว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ก็มีกลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC ที่แตกต่างกันออกไปอีกเช่น เชื้อ *E. coli* ที่ไม่มียีน AmpR (127) ดังนั้นการสร้างเอนไซม์ AmpC จึงไม่สามารถเหนี่ยวนำได้ แต่ถูกควบคุมโดย promotor และการเจริญของเชื้อ (119) ซึ่งเหมือนกับการสร้างเอนไซม์ AmpC ในเชื้อ *Shigella* (128) เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ก็พบว่าไม่มียีน AmpR เช่นเดียวกันดังนั้นการสร้างเอนไซม์ AmpC จึงเป็นไม่ใช่รูปแบบที่มีการเหนี่ยวนำ (129) ในขณะที่เชื้อ *Serratia marcescens* ถูกควบคุมโดยยีน AmpR แต่ส่วนของการถอดรหัสของยีน AmpC นั้นต่างออกไป ทำให้เกิดโครงสร้าง stem-loop ส่งผลต่อช่วงเวลาครึ่งชีวิตของการแปลรหัสของยีน AmpC (130) สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นการควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC นั้นต่างออกไปและมีความซับซ้อนมากกว่าเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เพราะ เชื้อ *P. aeruginosa* มียีน AmpD ถึง 3 ตัว คือ AmpD

AmpDh2 และ AmpDh3 (131) ซึ่งถ้ามียีนใดยีนหนึ่งหรือสองยีนกลายพันธุ์ไปจะก่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC ในปริมาณที่สูงตลอดเวลาหรืออาจเรียกว่า partial redepression constitutive hyperproduction แต่หากเกิดการกลายพันธุ์ของยีน AmpD ทั้ง 3 ยีนจะก่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC ในปริมาณที่สูงมากตลอดเวลาซึ่งอาจเรียกว่าเป็น fully redepression constitutive hyperproduction นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* ยังมีอีกกลไกหนึ่งอีกคือกลไกการชักนำการสร้างเอนไซม์ AmpC คือ จากยีน AmpG และ AmpP ซึ่งถูกกระตุ้นได้ด้วยโปรตีน AmpR เมื่อเชื้อมีการสัมผัสกับยาในกลุ่ม β -lactam (132)





ภาพที่ 2.7 แสดงกลไกหลักที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC 1. การสร้างเอนไซม์ AmpC ในสภาวะปกติที่ไม่มีการสร้างหรือสร้างได้น้อยมาก (สีฟ้า) 2. กลไกที่เกิดจากการเหนี่ยวนำจากการได้รับยากลุ่ม β -lactam 3. กลไกการสร้างเอนไซม์ AmpC เพิ่มจากการกลายพันธุ์ของยีน AmpR (สีแดงอ่อน) 4. กลไกการสร้างเอนไซม์ AmpC จากการกลายพันธุ์ของยีน AmpD ทั้ง 3 ; กลายพันธุ์ 1-2 ยีนเป็น

partial redepression (สีแดงอ่อน-สีส้ม) ถ้ากลายพันธุ์ 3 ยีนจะเป็น fully redepression (สีแดงเข้ม)

เนื่องจากเอนไซม์ AmpC นั้นไม่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสาร β -lactamase แต่ก็ยังมีสารบางชนิดที่มีผลยับยั้งเอนไซม์นี้ได้เช่น boronic acid (133) เป็นต้น ซึ่งก็มีการพัฒนาการตรวจหาเอนไซม์ AmpC ในระดับพีโนไทป์ ได้แก่วิธี three-dimensional test, AmpC disk test, Boronic acid disk test, Disk approximation test เป็นต้น (134) แต่ก็ยังไม่มีวิธีใดที่เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเอนไซม์ AmpC ในระดับพีโนไทป์ได้ ดังนั้นในทางเวชปฏิบัติจึงไม่มีการรายงานผลเอนไซม์ชนิดนี้ และจากที่ได้กล่าวไปแล้วว่าเอนไซม์ AmpC นี้จะเกิดขึ้นหลังจากได้สัมผัสกับยา β -lactam โดยเฉพาะอย่างยิ่งยากลุ่ม cephalosporins จึงทำให้ในระยะแรกการทดสอบความไวและดื้อต่อยาอาจให้ผลว่า มีความไวต่อยาที่จะใช้ในการรักษา แต่เมื่อรักษาไปได้ซักระยะหนึ่งการรักษาด้วยยาที่เคยใช้จะไม่ได้ผล สุดท้ายก็จะเกิดปัญหาของการรักษาได้

และอีกปัญหาหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ AmpC นั่นก็คือ เอนไซม์ AmpC สามารถทำให้ผลการตรวจหาเอนไซม์ β -lactamase คลาส A ในระดับพีโนไทป์ให้ผลลบปลอมด้วยเนื่องจากเอนไซม์ AmpC สามารถทนต่อ β -lactamase inhibitor ทำให้ไปบดบังการตรวจ (135) จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลของความไวและดื้อต่อยาได้

คลาส D β -lactamase

เอนไซม์ β -lactamase คลาส D อาจเรียกอีกอย่างว่า oxacillinase มีความหลากหลายของยีนรองจาก คลาส A (15) ชื่อ oxacillinase มาจากการที่ค้นพบเอนไซม์นี้ ว่ามีความสามารถทำลายยา cloxacillin และ oxacillin ได้รวดเร็วกว่า benzylpenicillin (penicillin G) (136) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทุกตัว มีคุณสมบัติทำลายยากลุ่ม aminopenicillins และ carboxycillins รวมถึง penicillins มีความสามารถทนต่อ β -lactamase inhibitor แต่ถูกยับยั้งได้ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (32, 137) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์คลาสนี้ ซึ่งคุณสมบัตินี้ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่ก็พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโน ไทโรซีน (Tyr) ที่ตำแหน่งที่ 144 ของเอนไซม์เพราะมีการพบว่าหากเกิดการกลายพันธุ์ไปโดยการแทนที่ Tyr ด้วยกรดอะมิโน ฟีนีลอลานีน (Phe) จะทำให้เอนไซม์นี้สูญเสียความสามารถถูกยับยั้งด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์นี้ไป (138) ส่วนใหญ่ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในคลาสนี้อยู่บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ๆเรียกว่า integron ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ insertion sequences (IS) and transposons (Tn) และพบว่ายีนที่สร้างเอนไซม์ส่วนมากในคลาสนี้จะเป็นการดื้อยาแบบรับมาภายหลัง (acquired resistance) แต่ก็มีพบแล้วว่ามีเอนไซม์ดื้อยาโดยกำเนิด (naturally resistance) ด้วยทั้งในเชื้อก่อโรคและในสิ่งแวดล้อม (139)

ยีนในคลาส D แบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

OXA-1 ยีนนี้สามารถถูกพบได้ทั้งบนพลาสมิดและ integron ที่อยู่บนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด OXA-1 จะสามารถทำลายยาในกลุ่ม aminopenicillins และ ureidopenicillins ได้ดีและทำลายยาในกลุ่ม narrow-spectrum cephalosporins ได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำลายยาในกลุ่ม broad-spectrum cephalosporins ได้บางตัวได้แก่ cefepime และ cefpirome แต่ไม่พบการดื้อต่อยา ceftazidime (140) ยีน OXA-1 สามารถพบได้มากในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่มีการดื้อต่อยา ampicillin ได้แก่ *E. coli*, *Shigella flexneri* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อที่พบได้ในชุมชน (community-acquired enterobacterial species) (141-143) มีการตรวจพบเชื้อเหล่านี้ทั้งในคนและในสัตว์ เช่น พบเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่แพร่กระจายอยู่ในหลายพื้นที่ (144) และเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium จากมนุษย์ และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ในประเทศโปรตุเกส (145) มีการพบเชื้อ *Shigella* spp. กับเชื้อ *Salmonella* spp. สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ampicillin ได้บ่อยจากมนุษย์ในประเทศสหรัฐอเมริกาอีกด้วย (146) ยีน OXA-1 มักถูกพบร่วมกับยีน ESBL (β -lactamase คลาส A) อื่นๆ เช่น ยีน OXA-1 และ CTX-M-1 ที่ถูกพบร่วมกันในเชื้อ *E. coli* ที่ประเทศสเปน (147) และก็มีกรายงานการพบยีน OXA-1 ที่เกี่ยวข้องกับยีน CTX-M-15 ชนิดที่ระบาดทั่วโลกจากเชื้อ *E. coli* อย่างต่อเนื่องแพร่กระจายไปในหลายพื้นที่ (148) และในกลุ่มของ OXA-1 นี้ยังมีอนุพันธุ์ของ OXA-1 อีกเช่น ยีน OXA-47 ที่สามารถพบได้ในเชื้อ *K. pneumoniae* ในประเทศตุรกีซึ่งมีคุณสมบัติดื้อยาในกลุ่มที่มีฤทธิ์แคบ (narrow-spectrum) ซึ่งคล้ายกับคุณสมบัติของ OXA-1 (149) และยีน OXA-31 ที่สามารถพบได้ในเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ประเทศฝรั่งเศสซึ่งก็มีคุณสมบัติในคล้ายกับคุณสมบัติของ OXA-1 แม้ว่าเชื้อทั้ง 2 จะมีความสามารถในการเลือกผ่านสารเข้าออกเซลล์ไม่เหมือนกันก็ตาม โดย *E. coli* เป็น low-level intrinsic impermeability แต่ *P. aeruginosa* เป็น high-level intrinsic impermeability) (140) มีการพบว่ายีน OXA-1 เป็นยีนเดียวกับยีน OXA-30 (150)

OXA-2 กลุ่มนี้ก็จะเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถทำลายยาที่มีฤทธิ์แคบได้ (narrow-spectrum) มีความเหมือนกันของกรดอะมิโนถึงร้อยละ 30.00 กับกลุ่มของ OXA-1 (151) ยีนในกลุ่ม OXA-2 นั้นมีอนุพันธุ์อยู่หลายตัวได้แก่ OXA-3 OXA-15 OXA-21 OXA-32 OXA-34 OXA-36 และ OXA-53 ยีนในกลุ่มนี้สามารถพบได้บนเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* ที่มียีน ESBL PER-1 อยู่ (79) นอกจากนี้ยังพบยีน OXA-2 ในเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศเซอเบียและ ฮังการี ซึ่งพบคู่กับยีน PER-1 ด้วย (152) และนอกจากนี้ยังพบยีนในกลุ่ม OXA-2 ได้จากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดในหลายประเทศ เช่น *Morganella morganii* ในประเทศอาร์เจนตินา (153) *K. pneumoniae* ในประเทศอูรุกวัย (154) *E. coli* ในประเทศฝรั่งเศส และก็ยังพบในเชื้ออื่นๆอีก

เช่น *Bordetella bronchuseptica* และ *Aeromonas hydrophila* แม้กระทั่งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *Corynebacterium amycolatum* (14) เป็นต้น และมีรายงานการพบ OXA-21 ที่เป็นอนุพันธ์ของ OXA-3 ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* บริเวณแถบอเมริกาใต้ (155)

OXA-10 เดิมมีชื่อว่า PSE-2 ความสามารถทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins ได้แก่ cefotaximem ceptriaxone และ aztreonam ในระดับต่ำ ไม่สามารถทำลายยา ceftazidime cephamycins และ carbapenems (156) ยีนในกลุ่มนี้พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด แต่ที่มีพบบ่อยที่สุดก็จะมีเชื้อ *P. aeruginosa* (157-161) นอกจากนี้ยังพบว่ายีนในกลุ่ม OXA-10 นั้นมีการกลายพันธุ์ของยีนไปเป็นอนุพันธ์ของยีน OXA-11 OXA-13 OXA-16 OXA-28 OXA-35 และ OXA-74 ซึ่งล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้าง (expanded-spectrum cephalosporins) มีส่วนน้อยของเอนไซม์กลุ่มนี้ที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่มยาที่มีฤทธิ์แคบ (narrow-spectrum) หนึ่งในนั้นก็คือยีน OXA-7 ซึ่งมีรายงานจากเชื้อ *E. coli* ซึ่งร้อยละ 95.00 ของลำดับกรดอะมิอนั้นตรงกับของ OXA-10 (162, 163) นอกจากนี้ยังพบว่ายีนในกลุ่ม OXA-10 นั้นมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากยีน OXA ในกลุ่มอื่นๆมากที่สุดอีกด้วย (14)

ยีน OXA ในกลุ่มอื่นๆ ในกลุ่มยีนที่สร้างเอนไซม์ OXA ที่มีฤทธิ์แคบ (narrow-spectrum) ที่ไม่ได้เป็นอนุพันธ์ กับยีนในกลุ่ม OXA-1 OXA-2 และ OXA-10 ได้แก่

ยีน OXA-9 ที่ค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน OXA-12 และ OXA-18 อยู่ร้อยละ 45.00 และ 54.00 ตามลำดับ (164) แต่ที่นำแปลกคือเอนไซม์ OXA-9 มีคุณสมบัติต่างจากเอนไซม์ OXA ใน คลาส D ตัวอื่นคือถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid และ cloxacillin แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย NaCl (165) นอกจากนี้ยังมีการพบยีน OXA-9 ในเชื้อ *Pseudomonas putida* ร่วมกับยีนที่สร้าง metallo- β -lactamase ซึ่งคือยีน VIM-2 ที่ประเทศฝรั่งเศส (166) และพบยีน OXA-9 ในเชื้อ *Enterobacter cloacae* จากประเทศแคนาดา (167) ในเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ในประเทศฝรั่งเศส (168)

ยีน OXA-48 ซึ่งเป็นเอนไซม์ คลาส D ที่มีคุณสมบัติเป็น carbapenemase ซึ่งพบใน *K. pneumoniae* จากประเทศตุรกี (149)

ยีน OXA-5 ที่พบในเชื้อ *P. aeruginosa* จากสหราชอาณาจักร (162) ซึ่งมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความเหมือนกับยีนในกลุ่ม OXA-10 อยู่น้อยกว่าร้อยละ 81.00 พบอยู่บน integron และพบว่าสามารถพบร่วมกับยีน GES-2 จากเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศแถบอเมริกา กลาง (169) โดยคุณสมบัติของ OXA-5 สามารถทำลายยา penicillins ฤทธิ์แคบ oxacillin

cephalothin (cephalotin) และถูกยับยั้งได้ด้วย NaCl แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย clavulanate (162)

ยีน OXA-129 ที่มีกรดอะมิโนต่างจาก OXA-5 เพียง 12 ตัว พบได้ในเชื้อ *S. enterica* subsp. *Enterica* serovar Bredeney จากประเทศบราซิล (170)

ยีน OXA-20 สามารถสร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส D ที่มีฤทธิ์แคบได้ OXA-20 จะเหมือนกับ OXA-2 มากที่สุด สามารถทำลายยา penicillin cephalothin และ cephaloridine แต่ไม่สามารถทำลายยา cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้างได้ OXA-20 ถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid ได้ (171) และยังพบอีกว่าในประเทศอิตาลีเชื้อ *P. aeruginosa* มีการพบยีน OXA-20 ร่วมกับยีน OXA-18 (172) ในขณะที่มีการพบยีน OXA-20 อยู่บน integron ในเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศฝรั่งเศสและอิตาลี (173, 174) และยังมีการพบยีน OXA-37 ซึ่งเป็นยีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบจุดเดียว (point mutation) ของยีน OXA-20 จากเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศสเปนอีกด้วย (175)

ยีน OXA-46 ซึ่งพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศอิตาลีที่มีการดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistant) โดยพบร่วมกับยีนที่ก่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ metallo- β -lactamase ซึ่งคือยีน VIM-1 โดยยีน OXA-46 มีความเหมือนของกรดอะมิโนถึงร้อยละ 78.00 กับยีน OXA-2 และ OXA-53 ซึ่งถือว่ามีใกล้เคียงกับยีนนี้มากที่สุด เอนไซม์ β -lactamase จากยีน OXA-46 สามารถทำลายยา penicillins oxacillin และ cephalosporins ที่มีฤทธิ์แคบได้ แต่ที่น่าสนใจคือเอนไซม์ดังกล่าวสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย tazobactam และ carbapenems และมีความไวต่อ NaCl ต่ำ (176)

นอกจากนี้ยังพบว่ายีน OXA บางยีนนั้นมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่มีฤทธิ์กว้างด้วย (extended-spectrum β -lactamase) ซึ่งส่วนมากจะเป็นยีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์หรือเป็นอนุพันธ์ของยีนในกลุ่มที่มีการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่มีฤทธิ์แคบซึ่งส่วนใหญ่จะพบได้จากเชื้อ *P. aeruginosa* อาทิเช่น

OXA-15 เกิดจากการกลายพันธุ์ของ OXA-2 โดย เปลี่ยน Asp เป็น Gly ที่ตำแหน่งที่ 150 ตามระบบเลขของ DBL OXA-15 นั้นถูกพบบน คลาส 1 integron ในเชื้อ *P. aeruginosa* จากประเทศตุรกี (177) OXA-15 มีความสามารถในการทำลายยา ceftazidime มากขึ้นเมื่อเทียบกับ OXA-2 แต่ก็ทำให้ความสามารถในการทำลายยา cefepime และ aztreonam น้อยลงเมื่อเทียบกับ OXA-2

OXA-32 เกิดจากการกลายพันธุ์ของ OXA-2 เช่นกัน โดยแทนที่กรดอะมิโน Leu เป็น Ile ที่ตำแหน่ง 169 ตามระบบเลข DBL ก่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์กว้างทำให้ดื้อต่อยา ceftazidime แต่ไม่ดื้อต่อยา cefotaxime และการกลายพันธุ์นี้ก็ส่งผลทำให้เอนไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยยา imipenem และ ceftoxitin เมื่อเทียบกับ OXA-2 ยีน OXA-32 นี้ถูกพบบน integron ที่อยู่บน 250 kb conjugative plasmid จากเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime จากผู้ป่วยที่ประเทศฝรั่งเศส (178)

ยังมียีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ OXA-10 อีกหลายตัวเช่น OXA-11 ที่ถูกพบจากเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศตุรกี ที่มีการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งคือแทนที่กรดอะมิโน Asn ไปเป็น Ser ที่ตำแหน่ง 146 และ Gly ไปเป็น Asp ที่ตำแหน่ง 167 (ตามระบบเลข DBL) ทำให้ดื้อต่อ ceftazidime มากขึ้น (179) ยีนตัวอื่นๆในกลุ่ม OXA-10 ที่มีการสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์กว้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* จากประเทศตุรกี ดังนี้ OXA-14 ที่เกิดจากการเปลี่ยน Gly ไปเป็น Asp ที่ตำแหน่ง 167 (160) OXA-16 ที่เกิดจากการเปลี่ยนกรดอะมิโน Ala เป็น Thr ที่ตำแหน่ง 114 และ Gly เป็น Asp ที่ตำแหน่ง 167 (161) OXA-17 ที่เกิดจากการเปลี่ยนกรดอะมิโน Asn เป็น Ser ที่ตำแหน่ง 76 ทำให้เพิ่มความสามารถในการทำลาย cefotaxime แต่ลดการทำลายยา ceftazidime (159) OXA-35 ที่พบจากเชื้อ *P. aeruginosa* จากประเทศฝรั่งเศส (140) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของทั้ง OXA-19 (170) และ OXA-28 (180) เอนไซม์ OXA-35 นั้นมีความสามารถในการทำลายยา penicillin และ cefsulodin แต่ไม่ทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins ทั้งฤทธิ์แคบและฤทธิ์กว้าง ซึ่งในทางตรงกันข้าม OXA-19 และ OXA-28 ที่ต่างจาก OXA-10 เพียง 9 และ 10 กรดอะมิโนตามลำดับ มีความสามารถทนต่อยา ceftazidime (180, 181)

นอกจากนี้ยังพบยีนที่สร้างเอนไซม์ OXA ที่มีฤทธิ์กว้างซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางโครงสร้างกับกลุ่มที่สร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์แคบเช่น

OXA-18 ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่พบในเอนไซม์ประเภทนี้ถูกพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่กรุงปารีสประเทศฝรั่งเศสในปี ค.ศ. 1995 เอนไซม์ OXA-18 นั้นมีความเหมือนกันของกรดอะมิโนน้อยกว่าร้อยละ 50.00 กับ OXA ตัวอื่นๆ ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้าง แต่เป็นที่น่าแปลกใจที่สามารถยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid (172)

OXA-45 ซึ่งเป็นอีก 1 ยีนที่ก่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่มีฤทธิ์กว้างที่พบจากเชื้อ *P. aeruginosa* มักพบร่วมกับยีนใน คลาส B คือ VIM-7 (182) OXA-45 มีความเหมือนกับ OXA-18 OXA-9 และ OXA-22 อยู่ร้อยละ 66.00, 43.00 และ 40.00 ตามลำดับ OXA-45 สามารถทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้างได้ อาทิเช่น ceftazidime cefotaxime และ

aztreonam แต่ไม่ทำลาย cephamycins และ carbapenems ซึ่ง OXA-45 ก็สามารถยับยั้งด้วย clavulanic acid เช่นเดียวกับ OXA-18 (182)

OXA-53 เป็นอีกยีนที่ก่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่มีฤทธิ์กว้างที่พบจากเชื้อ *S. enterica* serovar Agona จากประเทศบราซิล มีกรดอะมิโนเหมือนกับ OXA-2 ถึงร้อยละ 90.00 แต่สามารถยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid และมีความต้านทานต่อยา ceftazidime เพิ่มขึ้น ยีน OXA-53 พบได้ทั้งบน plasmid และ integron (183)

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

ในอดีตการศึกษาเรื่องโรคติดเชื้อต่างๆไม่จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการติดต่อของโรคระบาดวิทยา การหาสาเหตุของการเกิดโรคระบาดจากการติดเชื้อ หรือการจัดหมวดหมู่ของเชื้อแบคทีเรีย จะใช้เทคนิคทางฟีโนไทป์ (phenotype) ซึ่งจะดูลักษณะการแสดงออกของเชื้อ ได้แก่ biotyping, antimicrobial susceptibility testing, serotyping, bacteriophage typing (184, 185) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ประเมินในทางระบาดวิทยาเบื้องต้น ต่อมาประมาณปี ค.ศ. 1970 เทคนิคทางโมเลกุลเริ่มเข้ามามีบทบาททำให้เห็นชัดเจนยิ่งขึ้นว่าเทคนิคทางฟีโนไทป์นั้นสามารถบ่งบอกได้แค่การแสดงออกของเชื้อที่เป็นอยู่ ซึ่งอาจจะไม่ตรงกับสิ่งที่มีอยู่ในสารพันธุกรรมของเชื้อนั้นๆ ได้ ดังนั้นจะเห็นว่าเทคนิคทางโมเลกุลนั้นเริ่มที่จะนำมาใช้ในทางระบาดวิทยาเพื่ออธิบายการระบาดของเชื้อนั้นๆ ได้ อาจเรียกว่า ระบาดวิทยาโมเลกุล (molecular epidemiology) (186) ซึ่งเริ่มแรกใช้ agarose gel electrophoresis ในการวิเคราะห์พลาสมิด แต่ทว่า จีโนม ของเชื้อนั้นถือเป็นพื้นฐานของ “โมเลกุลระบุตัวตน” (molecule of identity) ในเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นตัวชี้วัดที่ดีที่สุดในการแยกแยะความสัมพันธ์ของเชื้อได้ ซึ่งหลักการดังกล่าวก็เป็นพื้นฐานให้กับเทคนิครุ่นต่อมา เช่น รุ่นที่ 2 ที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะและ probe รุ่นที่ 3 ใช้ PFGE และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึมนั่นเอง รุ่นที่ 4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ซึ่งใช้เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์ในทางระบาดวิทยา (186-188) ซึ่งแม้ว่าปัจจุบันจะมีเทคนิคทางโมเลกุลพัฒนาขึ้นมาอย่างมากมายแต่เทคนิค PFGE ยังคงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบ จีโนม ของเชื้อแบคทีเรีย (189) ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับงานในด้านการหาความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดการระบาดหรือใช้หาแหล่งที่มาของเชื้อก่อโรคนั้นๆ ได้

การใช้ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจดูกรดนิวคลีอิกในเซลล์แบคทีเรีย (190) นั้นถือเป็นการปฏิวัติวงการระบาดวิทยาสู่ระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล ซึ่งนำมาใช้งานในทางด้านระบาดวิทยา การเทียบเคียงความเหมือนของชิ้นส่วนโครโมโซมที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาตรวจผลด้วยการใช้ agarose gel electrophoresis ซึ่งถือเป็นก้าวสำคัญในเทคนิครุ่นที่ 2 ใน

งานทางด้านระบาดวิทยา ที่ใช้จีโนมเป็นพื้นฐานในการวิเคราะห์ แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็พบกับปัญหาที่แก้ได้ยาก นั่นคือดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะนั้น อาจมีตำแหน่งของการตัดมากมายจากโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียที่มีในหลักล้านคู่เบส ทำให้เกิดความยากในการจัดรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และจะเกิดขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 20 kb ทำให้ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เหล่านี้เมื่อนำมาทำ agarose gel electrophoresis จะไม่เกิดการแยกแถบดีเอ็นเอ (size independent comigration) จากนั้นในช่วงปี ค.ศ. 1980 ก็เริ่มมีการใช้หลักการการให้กระแสไฟฟ้าในการทำ electrophoresis ใหม่โดยอาศัยพื้นฐานของหลักการของการเปลี่ยนเส้นทางเป็นระยะของสนามไฟฟ้าที่สัมพันธ์กับทิศทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจล กล่าวคือ เมื่อสนามไฟฟ้ามีการเปลี่ยนทิศทางของสนามไฟฟ้านั้น ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลเล็กจะใช้เวลาในการปรับทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้อยกว่าดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลใหญ่ และการเพิ่มระยะเวลาของการเปลี่ยนทิศทางของสนามไฟฟ้า จะทำให้เกิดการแยกของแถบดีเอ็นเอได้ในช่วงที่กว้าง (191, 192) ซึ่งหลักการดังกล่าวมีการนำไปประยุกต์เป็นเครื่องมือสำหรับการทำ PFGE มากมาย เช่น orthogonal field gel electrophoresis (193), transvers alternating field electrophoresis (194), field inversion gel electrophoresis (FIGE) (195) และ contour-clamped homogenous electric field electrophoresis (CHEF) (196) ซึ่งวิธีที่กล่าวมาทั้งหมดนั้น ต่างกันที่การให้กระแสไฟฟ้า ซึ่งพบว่าวิธีที่ใช้กันอย่างมากที่สุดที่ได้รับความนิยมและแพร่หลายก็คือวิธี CHEF ทำให้เมื่อกล่าวถึง PFGE มักจะกล่าวถึงการใช้วิธี CHEF แต่ก็มีบ้างที่ยังคงใช้วิธี FIGE อยู่เหมือนกัน

จากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วว่า พื้นฐานของหลักการของ PFGE นั้นเกิดจากการที่แถบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแยกออกจากกันด้วยความสัมพันธ์ของขนาดโมเลกุล เวลาที่ใช้ และการเปลี่ยนแปลงของทิศทางของสนามไฟฟ้าซึ่ง CHEF นั้นประกอบด้วยขั้วอิเล็กโทรด 24 ตัวเรียงตัวกันเป็นรูป 6 เหลี่ยม มีด้านละ 4 อิเล็กโทรด ซึ่งจะสามารถให้สนามไฟฟ้าไล่ระดับและมีรูปแบบของทิศทางที่แน่นอนเพื่อให้โมเลกุลดีเอ็นเอปรับทิศทางได้โดยส่วนมากทิศทางของสนามไฟฟ้าทั้งสองจะทำมุมกัน 120 องศา ทำมุม 60 องศา และ -60 องศากับแนวตั้งฉาก ทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในเจล ไปทางซ้ายและทางขวาเท่ากัน ทำให้ได้ผลเป็นแถบดีเอ็นเอที่แยกกันลงมาเป็นทางเส้นตรง (straight vertical lanes) เหมือนกับ electrophoresis ทั่วไป CHEF นั้นได้รับผลกระทบจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นและความหนาของแผ่น agarose gel ส่วนผสมของบัฟเฟอร์ และความแรงของสนามไฟฟ้า (โวลต์ต่อเซนติเมตร) แต่ค่าเหล่านี้มักมีค่าที่เป็นค่ามาตรฐานอยู่แล้วเช่น ใช้ 1% agarose (SeaKem Gold, Megabase agarose), 0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) และความแรงของสนามไฟฟ้า 6 โวลต์ต่อเซนติเมตร (189, 197)

ในขณะที่ FIGE นั้นสามารถทำได้รวดเร็วกว่า CHEF แต่ว่าความสามารถในการแยกแถบดีเอ็นเอจะต่ำกว่าแม้ว่าการเตรียมตัวอย่างและเจลจะเหมือนกันก็ตาม กล่าวคือ FIGE นั้นไม่ต้องอาศัย chamber ที่มีรูปร่างพิเศษเหมือนอย่าง CHEF (CHEF chamber เป็นรูป 6 เหลี่ยม) ทำให้ทิศทางของการไหลของกระแสไฟฟ้าเป็นในลักษณะทำมุมกัน 180 องศา (CHEF 120 องศา) ซึ่งเรียกอีกแบบว่า Zero-Integrated Field Electrophoresis (ZIFE) (198) หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นการให้กระแสไฟฟ้าเพื่อให้เกิดสนามไฟฟ้าที่ย้อนกลับไปในทิศทางตรงกันข้ามนั่นเอง โดยมีอัตราส่วนการให้กระแส เดินหน้า : ย้อนกลับ อยู่ที่ 3:1 สามารถให้ความแรงของกระแสไฟได้ต่างกัน ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นสำหรับ FIGE จะให้ผลคล้ายกับ PFGE แต่ในขณะที่ CHEF อาจใช้เวลาถึง 20-30 ชั่วโมง FIGE ใช้เวลาเพียงแค่ 3-4 ชั่วโมงเท่านั้น (199, 200) แต่แถบดีเอ็นเอที่ได้จะอัดรวมกันอย่างแน่นหนาและแถบดีเอ็นเอมีความหนาแน่นมากกว่าวิธี CHEF ดังนั้นวิธี FIGE จึงเหมาะกับการเป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้นที่รวดเร็วเท่านั้น

นอกจากวิธีแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการทำ PFGE อีกหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็น สถานที่ที่ใช้ทำ PFGE ซึ่งผลของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจจะไม่เหมือนกันเนื่องจากความหลากหลายของวิธีการและการควบคุมสถานะของปฏิกิริยาต่างๆที่ไม่เหมือนกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ (201-204) แต่ก็มีหน่วยงานต่างๆเช่น United states Centers for Disease Control PulseNet และ PulseNet International consortium of laboratories illustrates ที่ทำแนวทางการทำ PFGE ให้เป็นมาตรฐานในทางเดียวกันเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่สามารถทำซ้ำได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ (205-208) แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็ยังมีปัจจัยอื่นๆที่เป็นตัวควบคุมผลของ PFGE เช่น การเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่าง การเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ สภาพะของการทำ electrophoresis ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. การเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่าง

เป็นปัจจัยเริ่มต้นที่สำคัญมากเนื่องจากคุณภาพและปริมาณของโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อมีผลต่อความสามารถในการทำซ้ำได้ ทั้งในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งปริมาณของเชื้อที่ใช้ควรจะเป็น $1-5 \times 10^9$ CFU/ml ซึ่งเทียบเท่ากับค่าความขุ่น 0.5-1 (ที่ 610 นาโนเมตร) และในขั้นตอนการทำนั้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่นำมาวิเคราะห์ เช่น เอนไซม์และสภาพะของการ lysis นั้นไม่เหมือนกันในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเชื้อแกรมบวกนั้นมักจะใช้ EC buffer (6 มิลลิโมลาร์ Tris hydrochloride [pH 7.6], 1 มิลลิโมลาร์ NaCl, 100 มิลลิโมลาร์ EDTA [pH 7.5], 0.5% Brij 58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sodium lauroyl sarcosine) เป็น buffer ในการ lysis โครโมโซมของเชื้อ และใช้ lysostaphin เป็น lysis enzyme โดย lysis enzyme ดังกล่าวจะถูกผสมเข้าไปในเนื้อของเจล ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

plug เลย เมื่อทำการ lysis จนสมบูรณ์จะแทนที่ EC buffer ด้วย TE buffer เพื่อรักษาสภาพโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อ (200) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบนั้นใช้ lysis buffer (50 มิลลิโมลาร์ Tris, 50 มิลลิโมลาร์ EDTA, 1% sarcosyl) และใช้ proteinase K เป็นเอนไซม์ทำลาย โปรตีนจำพวก nucleases เพื่อไม่ให้โปรตีนเหล่านั้นมาทำลายโครโมโซมดีเอ็นเอ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ lysis แล้วจะมีขั้นตอนการล้าง lysis buffer และ protease K ออกด้วย น้ำกลั่นและ TE buffer เพื่อไม่ให้ proteinase K มารบกวนปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป (207, 209, 210)

2. การเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นส่งผลอย่างมากต่อผลการทำ PFGE เพราะจะเป็นตัวชี้บ่งถึงความเหมือนและแตกต่างของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งโดยหลักการทั่วไปแล้วการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื่อนั้นควรอยู่ในปริมาณที่สามารถนำมาคิดวิเคราะห์ได้ คือ มากกว่า 10 ชิ้น แต่ไม่ควรมากกว่า 30 ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (211) ซึ่งผลตรงนี้มีมีความเกี่ยวข้องกับควมถี่ในการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อโดยดูจากตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ในโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อ โดยทั่วไปจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันของ ความยาวของตำแหน่งจับของเอนไซม์ และปริมาณความถี่ที่จะเกิดการตัด ดังนั้นในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจับ 8 นิวคลีโอไทด์หรือมากกว่าเช่น NotI (5'GC[^]GGCCGC3') จะมีโอกาสเกิดการตัดที่น้อย แต่อย่างไรก็ตามถ้ามีสัดส่วน G+C มากในโครโมโซมจะมีโอกาสตัดได้มากขึ้น แต่ถ้าเป็นเชื้อกลุ่มที่มีสัดส่วน A+T มากจะมีนิวคลีโอไทด์ชุด CCG และ CGG อยู่บ่อย ในขณะที่นิวคลีโอไทด์ชุด CTAG มักจะพบได้ยากในเชื้อที่มี G+C มาก (212) ซึ่งเป็นเหตุผลที่เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจับ 6 นิวคลีโอไทด์ เช่น SpeI (5'A[^]CTAGT3') จะมีการตัดที่น้อยในโครโมโซมที่มีสัดส่วน G+C มากของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่เอนไซม์ SmaI (5'CCC[^]GGG3') จะมีโอกาสตัดน้อยในโครโมโซมที่มีสัดส่วน A+T มากของเชื้อแกรมบวก แต่บางครั้งก็พบความไม่ปกติในการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเช่นกัน เช่น เอนไซม์ SmaI ที่ปกติจะมาใช้ในเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเชื้อตัวนี้ใน strain multi locus sequence type (MLST) ST398 ไม่สามารถนำมาทำ PFGE ได้กล่าวคือเป็น non-typeable (213) เนื่องจาก เอนไซม์ SmaI นั้นไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้เนื่องจากการ methylation ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ แต่ก็มีวิธีแก้ไขโดยใช้เอนไซม์ Cfr9I ซึ่งเป็น neoschizomer ของเอนไซม์ SmaI (214, 215)

3. สภาพที่ใช้ในการทำ electrophoresis

ตามที่ได้กล่าวข้างต้นไปแล้วว่า PFGE นั้นจะแยกดีเอ็นเอ ด้วยขนาดของดีเอ็นเอ เวลาที่ทำและความสามารถในการปรับทิศทางในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอโดยอาศัยจังหวะช่วงคลื่น

สนามไฟฟ้าในทิศทางที่แตกต่างกัน ดังนั้น การเลือก ช่วงเวลาสลับกระแสไฟฟ้า (pulse-time switching) นั้นจะถูกกำหนดโดย ช่วงขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการจะแยก โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูก เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดแต่ละชิ้นจะมีการตอบสนองต่อกระแสไฟฟ้าในช่วงเวลาน้อยที่สุดไม่เท่ากัน จึง ทำให้ในการทำ PFGE ช่วงเวลาในการสลับของกระแสไฟฟ้าจะเริ่มจากค่าน้อยๆแล้วค่อยๆเพิ่มขึ้น ตามลำดับ (ramped) เพื่อให้เกิดการแยกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากชิ้นเล็กไปจนถึงชิ้นใหญ่ การ ปรับเปลี่ยนค่ากระแสไฟฟ้าทั้งค่าเริ่มต้น (initial switch time) และค่าสุดท้าย (final switch time) นั้นสามารถปรับเปลี่ยนได้ร่วมกับค่าเวลารวมที่ใช้ในการทำ PFGE ทั้งหมด คือโดยทั่วไปถ้าชิ้นส่วนดี เอ็นเอชิ้นที่ใหญ่ที่สุดมีขนาดใหญ่มาก ค่าเวลาสลับกระแสไฟฟ้าค่าสุดท้าย และเวลาที่ใช้ในการทำ PFGE ก็ควรจะมากขึ้นตามด้วย (216)

จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความเหมือนหรือแตกต่างกันของลักษณะ แถบดีเอ็นเอด้วยหลักการ ของ Tenover และคณะ (217) หรือในกรณีที่มีตัวอย่างมากๆ และมีการทำหลายๆรอบ (หลาย เจล) ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอด้วยตาเปล่าได้ จะมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการช่วย วิเคราะห์ (computer-assisted analysis or CAA) ที่ใช้จำแนกความเหมือนหรือแตกต่างของ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอซึ่งส่วนมากจะคำนวณจากค่า Dice coefficient ซึ่งคำนวณจาก สองเท่าของ แถบดีเอ็นเอที่มีเหมือนกันหารด้วยผลบวกของจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของทั้งคู่ (Dice coefficient = $2N_{AB} / (N_A + N_B)$) (218) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้แก่ BioNumeric (Applied Maths) เป็นต้น เพื่อดูว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบนั้นมีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมมากน้อย เพียงใด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อตัวอย่าง *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์ ที่มาจากผู้ป่วยไม่ซ้ำกัน เก็บอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อรักษาสภาพ จากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม-เมษายน ปี พ.ศ. 2552 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณสมศักดิ์ ราชูล ห่องปฏิบัติการ จุลชีววิทยา โรงพยาบาลราชวิถี) เชื้อ *P. aeruginosa* นี้ได้ผ่านการเพาะเลี้ยง พิสูจน์แยกเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของ รพ.ที่ทำการศึกษา

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 แสดงเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

	เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1	Biosafety cabinet class II รุ่น Purifier Logic 34408 Series	Labconco	สหรัฐอเมริกา
2	เครื่อง Refrigerated centrifuge รุ่น Universal 320 R	Hettich	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
3	ตู้อบ (Incubator) รุ่น INE 300	Memmert	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
4	Water bath	Memmert	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5	Freezer -20°C	Sanyo Electric	ญี่ปุ่น
6	ชุดถ่ายภาพเจล (Molecular Imager ChemiDoc XRS)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
7	ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ Electrophoresis tool (Mupid-exu Electrophoresis System)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา

	เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
8	Thermo cycler รุ่น MJ Mini PTC-1148	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
9	Nano drop 1000	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
10	เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-315	Tommy Tech	สหรัฐอเมริกา
11	เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น G-560E	Scientific Industries	สหรัฐอเมริกา
12	ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
13	เครื่องวัดความชื้น รุ่น Densimat	BioMérieux	ฝรั่งเศส
14	เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น CP2245	Sartorius	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
15	เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น Hiclave HVA-85	Hirayama	ญี่ปุ่น
16	Speed Vacuum รุ่น DNA 110 Speed Vac	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
17	Spectrophotometer รุ่น Evolution 300	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
18	ชุดเครื่องมือ pulsed field gel electrophoresis (CHEF Mapper [®] XA System)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
	อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
19	จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes)	Bibby Sterilin	สหราชอาณาจักร
20	Microcentrifuge tube (ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร)	Axygen	สหรัฐอเมริกา
21	Autopipette (ขนาด 0.1-2, 2-20, 20-200 และ 200-1,000 ไมโครลิตร)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา

	อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
22	ขวดแลบฝาเกลียว (0.1, 0.5, 1, 2 ลิตร)	Schott Duran	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
23	Volumetric cylinder ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร	VITLAB	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
24	Parafilm	Parafilm	สหรัฐอเมริกา
25	Pipette tips (ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร)	Axygen	สหรัฐอเมริกา
26	Disposable Cuvette	Plastibrand	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
27	ไม้พันสำลี	United Medical Instrument	ไทย
28	หลอดทดลอง (ขนาด 12x75 และ 13x100 มิลลิเมตร)	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
	สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
29	อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar	Oxoid	สหราชอาณาจักร
30	อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth	Oxoid	สหราชอาณาจักร
31	อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Agar	Oxoid	สหราชอาณาจักร
32	อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth	Oxoid	สหราชอาณาจักร
33	อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth	Oxoid	สหราชอาณาจักร
34	Agar Bacteriological (Agar No.1)	Oxoid	สหราชอาณาจักร
35	อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Triple Sugar Iron	Oxoid	สหราชอาณาจักร
36	อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Simmons Citrate	Oxoid	สหราชอาณาจักร
37	อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Arginine Decarboxylation	BD	สหรัฐอเมริกา

	สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
38	อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Motile	BD	สหรัฐอเมริกา
39	Absolute ethanol	Merck	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
40	แผ่นยา Ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
41	แผ่นยา Cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
42	แผ่นยา Cefoperazone/sulbactam (SCFP) 75/30 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
43	แผ่นยา Piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
44	แผ่นยา Amikacin (AK) 30 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
45	แผ่นยา Gentamicin (GM) 10 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
46	แผ่นยา Ciprofloxacin (CFX) 5 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
47	แผ่นยา Levofloxacin (LVX) 5 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
48	แผ่นยา Imipenam (IPM) 10 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
49	แผ่นยา Meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
50	แผ่นยา Colistin (CL) 10 ไมโครกรัม	Oxoid	สหราชอาณาจักร
51	ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
52	dNTP set	Promega	สหรัฐอเมริกา
53	GeneRuler 100 bp DNA ladder	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
54	TBE buffer (powder)	aMResco	สหรัฐอเมริกา
55	SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
56	Ethidium bromide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา

	สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
57	Sodium Chloride	Ajax Finechem	นิวซีแลนด์
58	100X TE buffer	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
59	Tris base	aMReSCo	สหรัฐอเมริกา
60	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate, 99%	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
61	N-lauroylsarcosine sodium salt, for molecular biology, ≥94%	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
62	Certified™ Low Melt Agarose	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
63	Certified™ Megabase Agarose	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
64	Certified™ Molecular Biology Agarose	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
65	Proteinase K (Fungal)	Invitrogen	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
66	เอนไซม์ตัดจำเพาะ SpeI-HF	New England Biolabs	สหรัฐอเมริกา
67	CHEF DNA Size Standard Lamda Ladder	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา

3. วิธีการวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa*

3.1.1. นำเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์ ที่ได้จากโรงพยาบาลดังกล่าวข้างต้น นำมาเพาะเลี้ยงบน Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.1.2. เลือกโคโลนีเดี่ยวของ *P. aeruginosa* ซึ่งจะให้โคโลนีสีเขียว หรือสีเขียวเหลือง ลักษณะแบน คล้ายกระดาษ มาทดสอบทางชีวเคมี คือ Triple Sugar Iron Agar (TSI), Simmons Citrate Agar (Citrate utilization test), Arginine Decarboxylation Test (AD) และ Motile บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.1.3. นำเชื้อที่ผลการทดสอบชีวเคมียืนยันว่าเป็น *P. aeruginosa* มาเก็บในอาหาร Tryptone Soya Broth ที่ผสม glycerol ร้อยละ 15 อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

3.2 การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disk diffusion

เป็นวิธีที่อาศัยการแพร่ของยาจากแผ่นกระดาษกรองชุบยาปฏิชีวนะ (antibiotic disk หรือ Kirby-Bauer disk) สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีที่นิยมปัจจุบันคือการวางแผ่นยาลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ยาแพร่กระจายออกไปสู่น้ำที่เรียกว่า disk diffusion test หรือ Kirby-Bauer test (219) บริเวณที่อยู่รอบแผ่นยาจะมีความเข้มข้นของยาสูง และลดลงตามลำดับในบริเวณที่อยู่ห่างออกไป ในการทดสอบนี้เชื้อที่นำมาทดสอบจะเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นวางแผ่นยาลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม จะเห็นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อหากระดับยาในบริเวณนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ บริเวณรอบแผ่นยาซึ่งมีความเข้มข้นของยาสูงทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้จะเรียกว่า inhibition zone โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณดังกล่าว โดยมีจุดศูนย์กลางอยู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางแผ่นยาสามารถใช้ในการแปลผลความไวต่อยาโดยเทียบกับค่ามาตรฐานของเชื้อและยาชนิดนั้น (27)

วิธีการวิจัย

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. เลือกโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาประมาณ 4-5 โคโลนี มาทำการเจือจางใน 0.85% NaCl ให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard
3. ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว มาจุ่มเชื้อที่เจือจางไว้แล้ว ปิดให้แห้งพอประมาณกับผนังหลอดทดลอง แล้วนำมาป้ายให้ทั่วบน MHA ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร เริ่มด้วยการลากไม้พันสำลีผ่านกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ จากนั้นป้ายตั้งฉากกับเส้นที่ลากไว้ข้างต้นโดยป้ายในลักษณะถี่ๆให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 60 องศา เพื่อให้เชื้อที่ทำการทดสอบกระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ
4. รอให้ผิวหน้าแห้งแต่ไม่เกิน 15 นาที จากนั้นใช้ปากคีบที่ผ่านการเผาฆ่าเชื้อ หยิบแผ่นยามาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการป้ายเชื้อไว้จนทั่วผิวหน้าแล้ว ไขปลายปากคีบกดแผ่นยาเบาๆเพื่อให้ผิวหน้าของแผ่นยาแนบติดกับผิวหน้าของผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยยาที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 11 ชนิด คือ ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม cefoperazone/sulbactam (SCFP) 75/30 ไมโครกรัม piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 ไมโครกรัม amikacin (AK) 30 ไมโครกรัม gentamicin (GM) 10 ไมโครกรัม ciprofloxacin (CFX) 5 ไมโครกรัม levofloxacin (LVX) 5 ไมโครกรัม imipenem (IPM) 10 ไมโครกรัม meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม และ colistin (CL) 10 ไมโครกรัม
5. นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
6. วัด inhibition zone จากนั้นนำไปเทียบกับค่ามาตรฐานจากสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standard Institute: CLSI) ปี ค.ศ. 2009 (220) และเนื่องจากไม่มีค่ามาตรฐานสำหรับยา cefoperazone/sulbactam (SCFP) จึงเปรียบเทียบกับอ้างอิงจาก Barry A. และคณะ (221) ดังแสดงตารางการแปลผลการทดลองตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ *P. aeruginosa* (220)

Antimicrobial Agents	Disk Content (µg)	Zone diameter (mm) Interpretive Criteria		
		R	I	S
Ceftazidime	30	≤14	15-17	≥18
Cefepime	30	≤14	15-17	≥18
Cefoperazone/sulbactam (221)	75/30	≤14	15-19	≥20
Piperacillin/tazobactam	100/10	≤17	-	≥18
Amikacin	30	≤14	15-16	≥17
Gentamicin	10	≤12	13-14	≥15
Ciprofloxacin	5	≤15	16-20	≥21
Levofloxacin	5	≤13	14-16	≥17
Imipenem	10	≤13	14-15	≥16
Meropenem	10	≤13	14-15	≥16
Colistin	10	≤10	-	≥11

3.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ด้วยวิธีทาง genotype

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *P. aeruginosa*

วิธีการวิจัย (ดัดแปลงจาก (222))

1. นำเชื้อ *P. aeruginosa* มาทำการเพาะเลี้ยงบน Tryptone Soya Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำโคโลนีของเชื้อประมาณ 10-15 โคโลนี มาละลายใน Nutrient Broth ปรับความเข้มข้นให้ได้ 2 McFarland Standard
3. ต้มที่อุณหภูมิ 98-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่เตรียมไว้
5. เติม 95% ethanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
6. นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วน 95% ethanol ทิ้งและซับ ethanol ออกให้หมด
7. เติม 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เขย่าหลอดกลับไปมา แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำในขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างตะกอนดีเอ็นเอ รอบสุดท้ายจะซับ ethanol ออกให้หมด
8. จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือนำเข้าเครื่อง speed vacuum เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง เติมสารละลาย 1X TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
9. นำไปตรวจหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง nano drop ที่ความยาวคลื่น 260 nm
10. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อจะนำไปทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรส

3.3.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อหาความชุกของยีน β -lactamase คลาส A C และ D

วิธีการวิจัย (223)

1. เตรียมน้ำยา master mix ปริมาตร 24 ไมโครลิตรประกอบด้วย 1x Taq buffer with KCL (100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl; pH 8.8 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 500 มิลลิโมลาร์ KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40.), MgCl₂ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTP mix ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ forward และ reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 1.0 U Taq DNA polymerase

2. เติมน้ำยาลูกโซ่ของ *P. aeruginosa* ที่สกัดไว้แล้ว หลอดละ 1 ไมโครลิตร สำหรับ negative control ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ส่วนเชื้อ positive control ของแต่ละยีนมีดังนี้ เชื้อ *P. aeruginosa* No.76 สำหรับยีน VEB-1 เชื้อ *A. baumannii* No.35 สำหรับยีน PER-1 และ เชื้อ *K. pneumoniae* clinical strain สำหรับยีน CTX-M ยีน TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 เชื้อ *P. aeruginosa* No.4 สำหรับยีน AmpC และเชื้อ *P. aeruginosa* No.35 สำหรับยีน OXA-10

3. จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermo cycler โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที แล้วตามด้วย 30 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ตามตารางที่ 3.3 เป็นเวลา 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

ตารางที่ 3.3 แสดง Primer ที่ใช้ในการตรวจหายีน β -lactamase คลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa*

Genes		Primer (5'-3')	Annealing temp (°C)	Product size (bp)	Reference
Class A	VEB-1	F: cgacttcatttcccgatgc R: ggactctgcaacaatacgc	58.6	650	(224)
	PER-1	F: atgaatgtcattataaaagc R: aatttgggcttagggcagaa	52.3	920	(225)
	CTX-M	F: cgctttgcatgtgagcag R: accgcgatatcgttggc	49.5	550	(226)
	TEM-1 and derivatives	F: ataaaattcttgaagacgaaa R: gacagttaccaatgcttaatca	43.1	1079	(227)
	SHV-1	F: tggttatgcgtt atattcgcc R: ggtagcgttgccagtgc	50.7	870	(228)
Class C	AmpC	F: atgcagccaacgacaaaagg R: cgccctcgcgagcgcgcttc	57.6	1243	(103)
Class D	Oxa-10	F: tctttcgagtacggcattagc R: ccaatgatgcctcactttcc	60.22	760	(229)

3.3.3 การวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

วิธีการวิจัย

1. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน มาตรวจสอบผลผลิตโดยเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ผสมด้วยสี SYBR® Safe DNA gel stain
2. ผสมผลิตภัณฑ์กับ loading dye แล้วใส่ลงในหลุมบนวุ้นโดยใช้ DNA marker ladder 100-basepair plus เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์
3. ตั้งค่าเครื่อง electrophoresis ที่ 80 โวลต์ เวลา 40 นาที
4. จากนั้นนำไปถ่ายภาพและดูแถบดีเอ็นเอใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc XRS

3.3.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β -lactamase คลาส A C และ D

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน β -lactamase คลาส A C และ D โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่งวิเคราะห์ผลที่บริษัท BIONEER (ประเทศเกาหลี) โดยผ่านตัวแทนในประเทศไทยคือ บริษัท ยูทูไบโอ (ประเทศไทย) จำกัด ตรวจสอบวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์รุ่น ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems™) ด้วยหลักการ Dye-terminator sequencing นำมาดูผลด้วย Program SnapGene Viewer จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรม (blast) กับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.3.5 การศึกษาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D โดยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ในงานวิจัยครั้งนี้จะใช้หลักการ Clamped homogeneous electric field (CHEF) (196) ซึ่งเป็นวิธีการทำ PFGE ที่ได้รับความนิยมและใช้กันมากในปัจจุบัน พื้นฐานของหลักการของ PFGE นั้นเกิดจากการที่แถบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (ที่อาจมากถึงขนาด Mb) แยกออกจากกันด้วยความสัมพันธ์ของขนาดโมเลกุล และเวลาของการเปลี่ยนแปลงของทิศทางของสนามไฟฟ้า กล่าวคือ ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะมีตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ซึ่งในระบบ CHEF นั้นแผ่น gel ตัวอย่างนั้นจะอยู่ตรงกลางของขั้วอิเล็กโทรดที่ประกอบไปด้วยขั้วอิเล็กโทรด 24 ตัวเรียงตัวกันเป็นรูป 6 เหลี่ยมด้านเท่า มีด้านละ 4 อิเล็กโทรด ซึ่งจะสามารถให้สนามไฟฟ้าไล่ระดับและมีรูปแบบของทิศทางที่แน่นอนเพื่อให้

โมเลกุลดีเอ็นเอปรับทิศทางและเคลื่อนที่ไปได้ โดยส่วนมากทิศทางของสนามไฟฟ้าทั้งสองจะทำมุมกัน 120 องศา (ทำมุม 60 องศา และ -60 องศา กับเส้นสมมติในแนวตั้งฉาก) ซึ่งการให้สนามไฟฟ้าใน 2 ทิศทางดังกล่าวในระบบ CHEF นี้จะทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอใน gel นั้นเคลื่อนที่ลงมาในทิศทางที่เฉียงไปทางซ้ายและทางขวาเท่ากัน ทำให้ได้ผลเป็นแถบดีเอ็นเอที่แยกกันลงมาเป็นทางเส้นตรง (straight vertical lanes) เหมือนกับการทำ electrophoresis ทั่วไป ทำให้สามารถอ่านผลการแยกของแถบดีเอ็นเอได้ง่าย (230)

วิธีการวิจัย

1. ขั้นตอนเตรียมตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ใช้ทดสอบ

1.1 เลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่จะทำการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง

1.2 เลือกโคโลนีของเชื้อ *P. aeruginosa* มาเลี้ยงต่อใน Tryptone Soya Broth (TSB) 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง

1.3 ปิเปตต์เชื้อที่เลี้ยงใน TSB มา 1.5 มิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งอย่างระมัดระวัง เก็บตะกอนเซลล์ไว้

1.4 ล้างตะกอนเซลล์โดยการผสมตะกอนเซลล์กับ 1 มิลลิลิตร ของ SE buffer (ผสมจนตะกอนเซลล์ละลายหมด) นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 ครั้ง

1.5 เจือจางตะกอนเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วย SE buffer ด้วยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยปรับสารละลายเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0

2. ขั้นตอนการเตรียมชิ้นวุ้น (plug) ตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa*

*สำหรับขั้นตอนนี้ต้องทำต่อจากขั้นตอนที่ 1 ทันที

2.1 เตรียม 2% Low Melting Point (LMP) Agarose ใน LMP buffer ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส (ต้องรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 55-60 องศาตลอด)

2.2 ผสมสารละลายเซลล์ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 1.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ 2 % LMP agarose 0.5 มิลลิลิตร (ควรระวังอย่าให้มีเซลล์ที่ติดเป็นก้อนปนมา) ให้เข้ากันดีด้วยการปิเปตต์เบาๆ จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในแม่พิมพ์ชิ้นวุ้นตัวอย่าง (plug mold) โดยต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง ในขั้นตอนนี้เราจะได้ plug ที่มีเชื้อ *P. aeruginosa* อยู่ภายใน

2.3 ระหว่างรอ plug แข็งตัวเตรียม lysis buffer โดยแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร

2.4 เชียขึ้น plug ที่แข็งแล้วลงใน lysis buffer ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-20 ชั่วโมง

2.5 เมื่อครบเวลา เทส่วน lysis buffer ออก และล้างชิ้นวุ้นตัวอย่างในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำทิ้งแล้วล้าง plug ต่อด้วย 1X TE buffer ที่ปราศจากเชื้อ 1.2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำซ้ำ 4-5 รอบ โดยรอบสุดท้ายให้เพิ่มเวลาเป็นขั้นตอนละ 30 นาที

2.6 ในขั้นตอนนี้เราจะได้ plug ที่มีโครโมโซมดีเอ็นเอทั้งหมดของเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถเก็บ plug ไว้ใน 1X TE buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานหลายสัปดาห์ โดยต้องมีการเปลี่ยนถ่าย TE buffer เป็นครั้งคราว

3. การย่อยโครโมโซมดีเอ็นเอใน plug ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.1 ตัดแบ่ง plug ให้ได้ขนาด 2X6 มิลลิเมตรหรือประมาณ 1/3 ของ plug ตามขวาง จากนั้น pre equilibrated ชิ้น plug ที่ตัดแล้ว ด้วยการบ่มชิ้น plug ที่ตัดแล้วใน 150 ไมโครลิตร ของ 1X restriction enzyme buffer ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2 ตูด 1X restriction enzyme buffer ออกแล้วเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ SpeI-HF ความเข้มข้น 15U ที่ละลายอยู่ใน 1X restriction enzyme buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง

4. การนำชิ้น plug ลง gel และทำ PFGE

4.1 เตรียม 1% Certified™ Megabase Agarose ใน 0.5X TBE buffer รอ gel แข็งตัว

4.2 นำชิ้น plug ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ SpeI-HF ใส่ลงในช่องตัวอย่าง (ตามหลุมของหริ) ปิดช่องตัวอย่างด้วย gel ที่ยังอุ่นให้ทั่วหลุม ทิ้งให้ gel ทั้งหมดแข็ง ตรวจสอบความเรียบร้อยของแผ่น gel อีกครั้งว่าไม่มีฟองอากาศหรือความเสียหายที่ plug ตัวอย่าง

4.3 นำแผ่น gel ไปใส่ใน chamber electrophoresis ของเครื่อง CHEF Mapper XA® System ที่มีบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 2.4 ลิตรอยู่ จากนั้นตั้งสภาวะการทำงานของเครื่อง CHEF Mapper XA® System ดังนี้ Two state program, voltage: 6 V/cm, run time: 24 h., included angle: 120°, initial switch time: 1 sec., final switch time: 50 sec., ramping factor: linear, อุณหภูมิ (ตั้งที่ chiller): 12 องศาเซลเซียส

4.4 เมื่อครบเวลา นำ gel ไปย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปดูแถบดีเอ็นเอใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc XRS จากนั้นบันทึกภาพถ่าย gel ไว้เป็นไฟล์ภาพดิจิทัล

5.เปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Bionumeric Version 7.5 โดยใช้หลักเกณฑ์เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Dice coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ด้วยค่าพารามิเตอร์ optimize 1.5% และ tolerance in the band position 1.5% โดยจะตัดสินให้เชื่อที่ทำการทดสอบเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน $\geq 80\%$

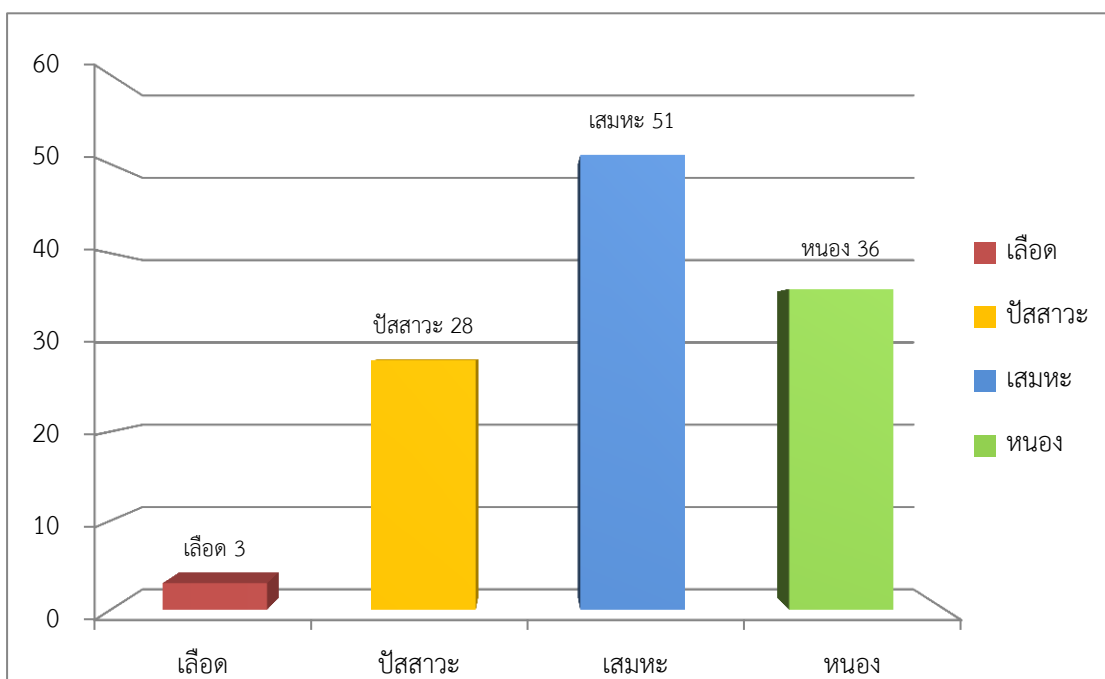


บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการเก็บรวบรวมเชื้อ *P. aeruginosa* จำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ

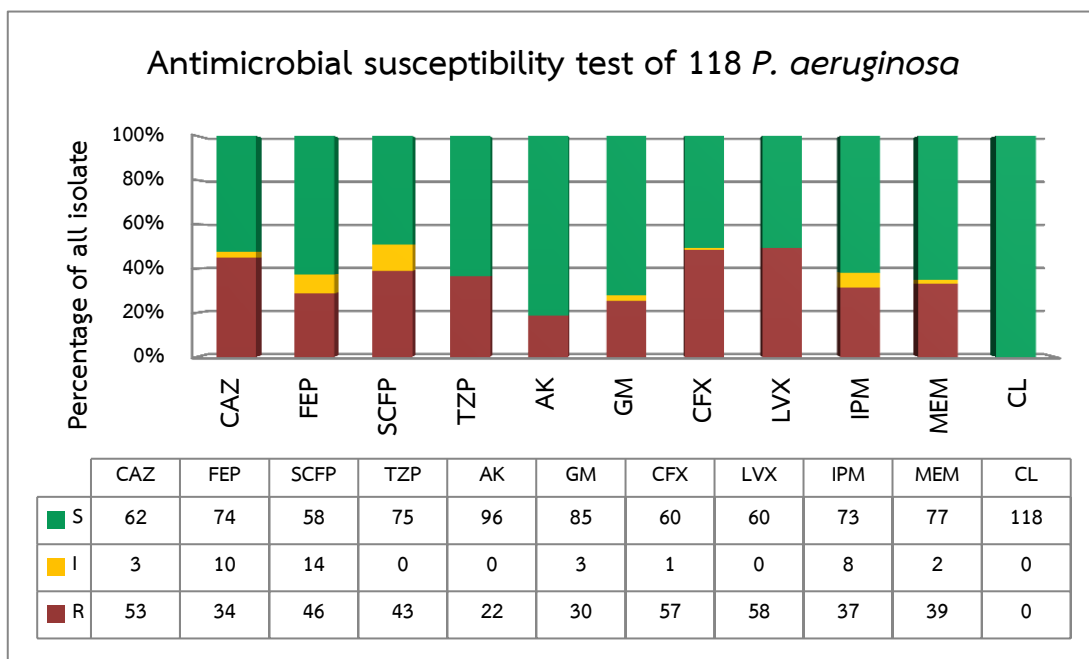
เชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์จากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม ถึง เมษายน ปี พ.ศ. 2552 ส่วนใหญ่มาจาก เสมหะ (51/118 สายพันธุ์ ร้อยละ 43.22) รองลงมาคือ หนอง (36/118 สายพันธุ์ ร้อยละ 30.51) ปัสสาวะ (28/118 สายพันธุ์ ร้อยละ 23.73) และ เลือด (3/118 สายพันธุ์ ร้อยละ 2.54) ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 แผนภูมิแสดงจำนวนเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์ จำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ

2. ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility testing) ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disk diffusion

แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มยา โดยกลุ่มยาแรกคือ cephalosporins เป็นยาในกลุ่ม β -lactam ในการศึกษานี้ประกอบด้วย ยา ceftazidime (CAZ) และ ยา cefepime (FEP) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อต่อยาร้อยละ 44.91 และ 28.81 ตามลำดับ กลุ่มยาที่สอง β -lactam/ β -lactamase inhibitor เป็นยาในกลุ่ม β -lactam ที่เพิ่มสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase เข้าไปเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีขึ้น ในการศึกษานี้ได้ทดสอบยา cefoperazone/sulbactam (SCFP) และยา piperacillin/tazobactam (TZP) พบว่าเชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อต่อยาร้อยละ 38.98 และ 36.44 ตามลำดับ กลุ่มยาที่สาม aminoglycosides ประกอบด้วยยา amikacin (AK) และยา gentamicin (GM) พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยาร้อยละ 18.64 และ 25.42 ตามลำดับ กลุ่มยาที่สี่ fluoroquinolones ประกอบด้วยยา ciprofloxacin (CFX) และยา levofloxacin (LVX) พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยาร้อยละ 48.30 และ 49.15 ตามลำดับ กลุ่มยาที่ห้า carbapenems ประกอบด้วย ยา imipenem (IPM) และยา meropenem (MEM) พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยาร้อยละ 31.36 และ 33.05 ตามลำดับ และยาในกลุ่มสุดท้าย polymyxins ยาที่ใช้คือ colistin (CL) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ไวต่อยานี้ทั้ง 118 สายพันธุ์



ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ 11 ชนิดของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 118 สายพันธุ์

CAZ; cefazidime, FEP; cefepime, SCFP; cefoperazone/sulbactam, TZP; piperacillin/tazobactam, AK; amikacin, GM; gentamicin, CFX; ciprofloxacin, LVX; levofloxacin, IPM; imipenem, MEM; meropenem, CL; colistin, S; susceptible, I; intermediate, R; resistance

เมื่อนำแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์ มาจัดรูปแบบของความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 6 กลุ่มยา สามารถจัดได้ ทั้งหมด 18 รูปแบบ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงรูปแบบของความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 18 รูปแบบของตัวอย่างเชื้อ

P. aeruginosa

รูปแบบ ความไว ต่อยา	กลุ่มยา antibiotics						จำนวนเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>
	β -lactam	β -lactam/ inhibitor	Amino glycosides	Fluoro quinolones	Carbapenems	Polymyxins	
1	R	R	R	R	R	S	20
2	R	R	R	R	S	S	3
3	R	R	S	R	R	S	13
4	R	S	R	R	R	S	3
5	R	R	S	R	S	S	6
6	S	R	S	R	R	S	3
7	R	R	S	S	R	S	1
8	R	S	R	S	R	S	1
9	R	S	S	R	R	S	1
10	R	R	S	S	S	S	5
11	R	S	S	R	S	S	2
12	S	R	S	S	R	S	2
13	S	S	R	R	S	S	3
14	S	S	S	R	R	S	1
15	R	S	S	S	S	S	1
16	S	S	S	R	S	S	3
17	S	S	S	S	R	S	3
18	S	S	S	S	S	S	47

S; susceptible, I; intermediate, R; resistance

จากตารางที่ 4.1 พบว่ารูปแบบของความไวต่อกลุ่มยาของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 18 รูปแบบนั้นสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่มีการดื้อยามากกว่าหรือเท่ากับ 3 กลุ่มยา เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายขนานที่เรียกว่า Multidrug resistance *P. aeruginosa* (MDR-PA) (231) ประกอบด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 51 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 43.22 (51/118) โดยในกลุ่ม MDR-PA นี้มีรูปแบบของความไวต่อกลุ่มยาในรูปแบบที่ 1 ถึง 9 มีรายละเอียดดังนี้ รูปแบบที่ 1 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาทั้ง 5 กลุ่มยา (ยกเว้นไวต่อ polymyxins: colistin) รูปแบบที่ 2 ถึง 4 ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีการดื้อยา 4 กลุ่มยา โดยรูปแบบที่ 2 ไม่ดื้อยา (non susceptible) ในกลุ่ม carbapenems และ polymyxins รูปแบบที่ 3 ไม่ดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides และ polymyxins รูปแบบที่ 4 ไม่ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam/ β -lactamase inhibitor และ polymyxins สำหรับรูปแบบที่ 5 ถึง 9 นั้นจะมีรูปแบบที่ดื้อยา 3 กลุ่มยา โดยรูปแบบที่ 5 ไม่ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides carbapenems และ polymyxins รูปแบบที่ 6 ไม่ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam aminoglycosides และ polymyxins, รูปแบบที่ 7 ไม่ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides fluoroquinolones และ polymyxins, รูปแบบที่ 8 ไม่ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam/ β -lactamase inhibitor fluoroquinolones และ polymyxins และรูปแบบที่ 9 ไม่ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides และ polymyxins โดยพบรูปแบบที่ 1 จำนวน 20 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 16.95 (20/118) ส่วนรูปแบบที่ 2 ถึง 4 พบ 19 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 16.10 (19/118) และ รูปแบบที่ 5 ถึง 9 พบ 19 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 16.10 (19/118)

อีกกลุ่มที่มีการดื้อยาน้อยกว่า 3 กลุ่มยาจัดว่าเป็นกลุ่มเชื้อที่ไม่ดื้อยาหลายขนานที่เรียกว่า Non Multidrug resistance *P. aeruginosa* (Non MDR-PA) ประกอบด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 67 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 56.78 (67/118) โดยในกลุ่ม Non MDR-PA มีรูปแบบของความไวต่อกลุ่มยาในรูปแบบที่ 10-18 มีรายละเอียดดังนี้ รูปแบบที่ 10-14 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาเพียง 2 กลุ่มยาเท่านั้น โดยรูปแบบที่ 10 ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam และ β -lactam/ β -lactamase inhibitor รูปแบบที่ 11 ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam และ fluoroquinolones รูปแบบที่ 12 ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam/ β -lactamase inhibitor และ carbapenems รูปแบบที่ 13 ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides และ fluoroquinolones รูปแบบที่ 14 ดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones และ carbapenems ส่วนรูปแบบที่ 15-17 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาเพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น โดยรูปแบบที่ 15 ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam รูปแบบที่ 16 ดื้อต่อยา fluoroquinolones รูปแบบที่ 17 ดื้อต่อยา carbapenems และรูปแบบสุดท้าย รูปแบบที่ 18 เป็นรูปแบบที่ไม่ดื้อต่อยากลุ่มใดเลย โดยพบรูปแบบที่ 10-14 จำนวน 13 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 11.02 (13/118) รูปแบบที่ 15-17 จำนวน 7

สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 5.93 (7/118) รูปแบบที่ 18 จำนวน 47 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 39.83 (47/118) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

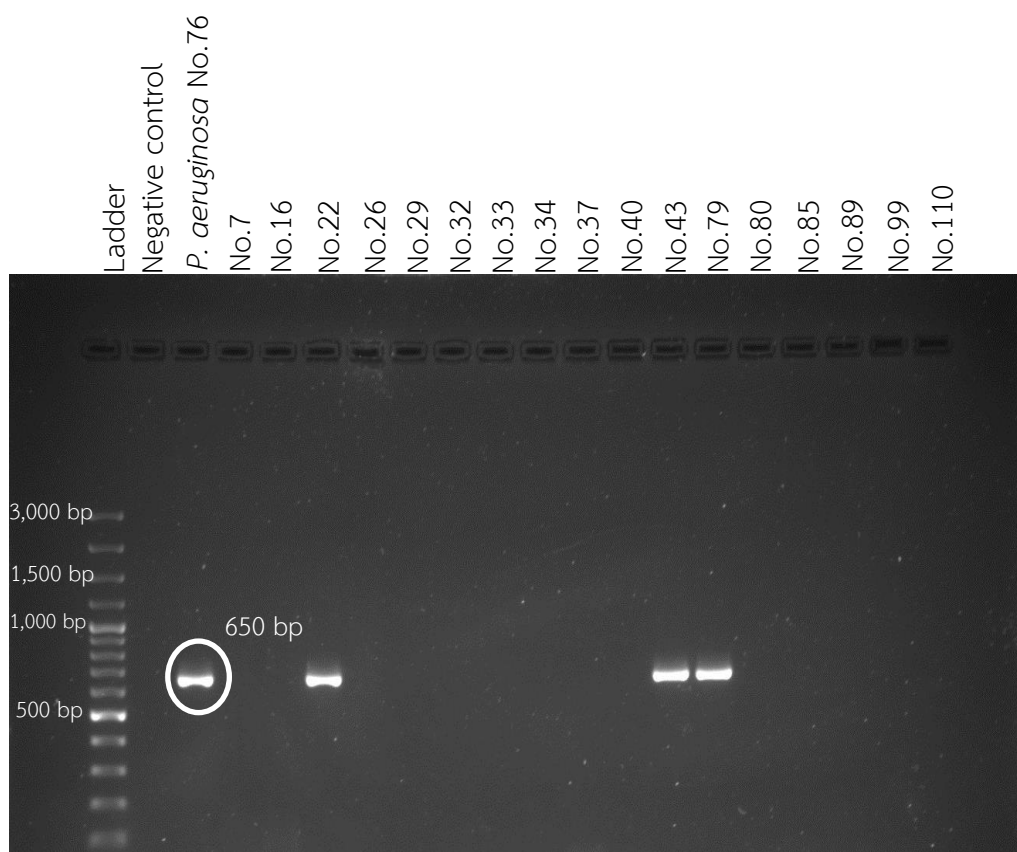
ตารางที่ 4.2 แสดงการจำแนกเชื้อ *P. aeruginosa* ออกเป็น MDR-PA และ Non MDR-PA

ประเภท	จำนวนกลุ่มยาที่ดี	รูปแบบการดื้อต่อยา	จำนวนเชื้อ (%)
MDR-PA	5	1	20 (16.95)
	4	2-4	19 (16.10)
	3	5-9	12 (10.17)
รวม	≥3 กลุ่มยา	1-9	51 (43.22)
Non MDR-PA	2	10-14	13 (11.02)
	1	15-17	7 (5.93)
	0	18	47 (39.83)
รวม	≤2 กลุ่มยา	10-18	67 (56.78)

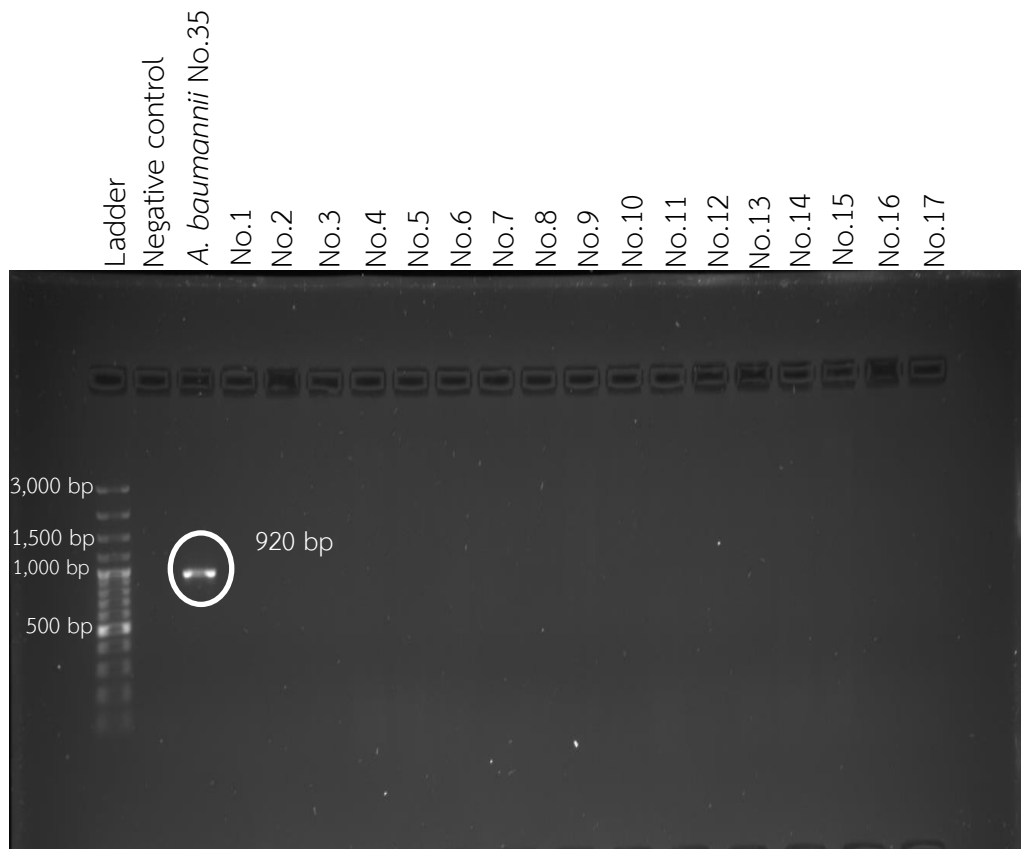
3. ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซฟออลิเมอเรส

คลาส A β -lactamase

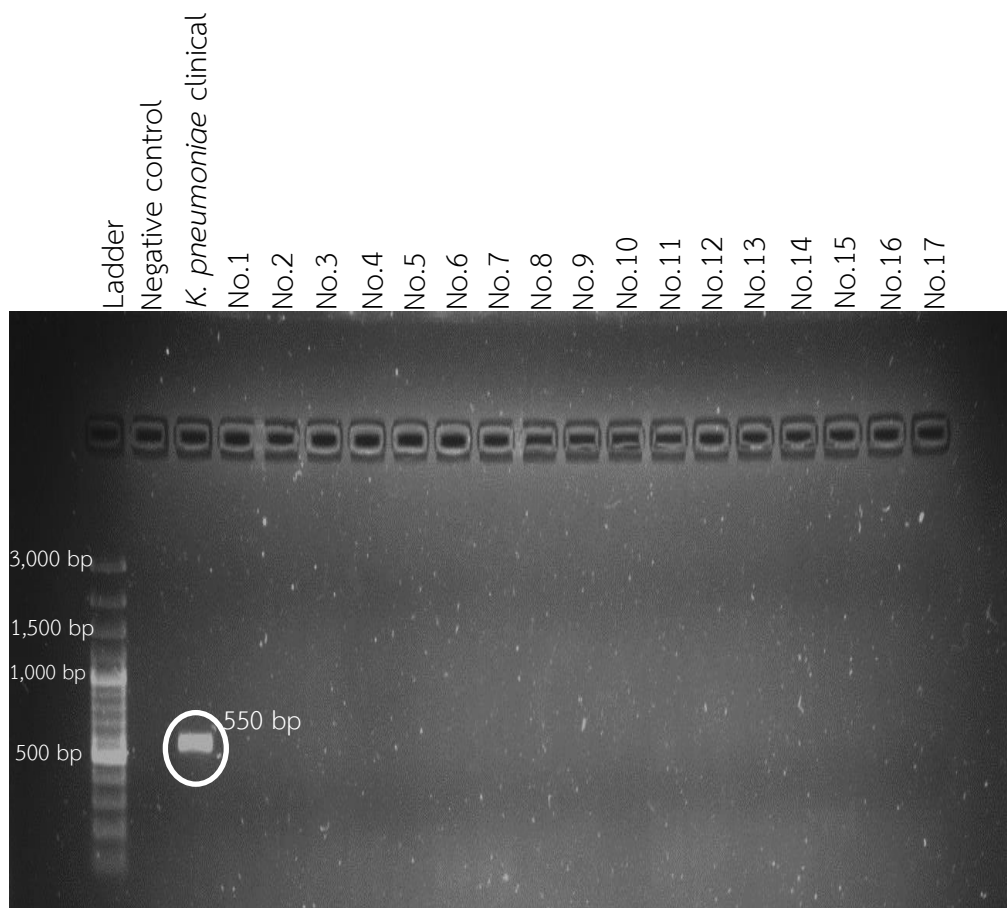
สำหรับ คลาส A β -lactamase ยีนที่ทำการทดสอบมี 5 ยีนคือ VEB-1 PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 เมื่อทำปฏิกิริยาลูกลูโซฟออลิเมอเรสกับ primer ของยีนดังกล่าว โดยมีเชื้อ positive control ของแต่ละยีนดังนี้ เชื้อ *P. aeruginosa* No.76 สำหรับยีน VEB-1 เชื้อ *A. baumannii* No.35 สำหรับยีน PER-1 และ เชื้อ *K. pneumoniae* clinical strain สำหรับยีน CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกลูโซฟออลิเมอเรสด้วย agarose gel electrophoresis แล้ว ดูแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้แสง UV ด้วยเครื่อง Chemidoc XRS จะเห็นแถบของผลิตภัณฑ์สำหรับยีน VEB-1 PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 ขนาด 650, 920, 550, 1,079 และ 870 คู่เบส ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.3-4.7 การศึกษานี้พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 เพียงยีนเดียว จำนวน 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.2, 22, 35, 43, 48, 72, 76, 79, 105 คิดเป็นร้อยละ 7.63 ไม่พบผลบวกกับยีน PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์กับ primer ของยีน VEB-1 โดยแถวที่ 1 (ซ้ายสุด) คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ negative control แถวที่ 3 คือ positive control; *P.aeruginosa* No.76 ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 650 คู่เบส แถวที่ 4-20 คือเชื้อ *P.aeruginosa* ที่ทดสอบ โดยแถวที่ 6, 14-15 จะให้ผลบวกกับยีน VEB-1

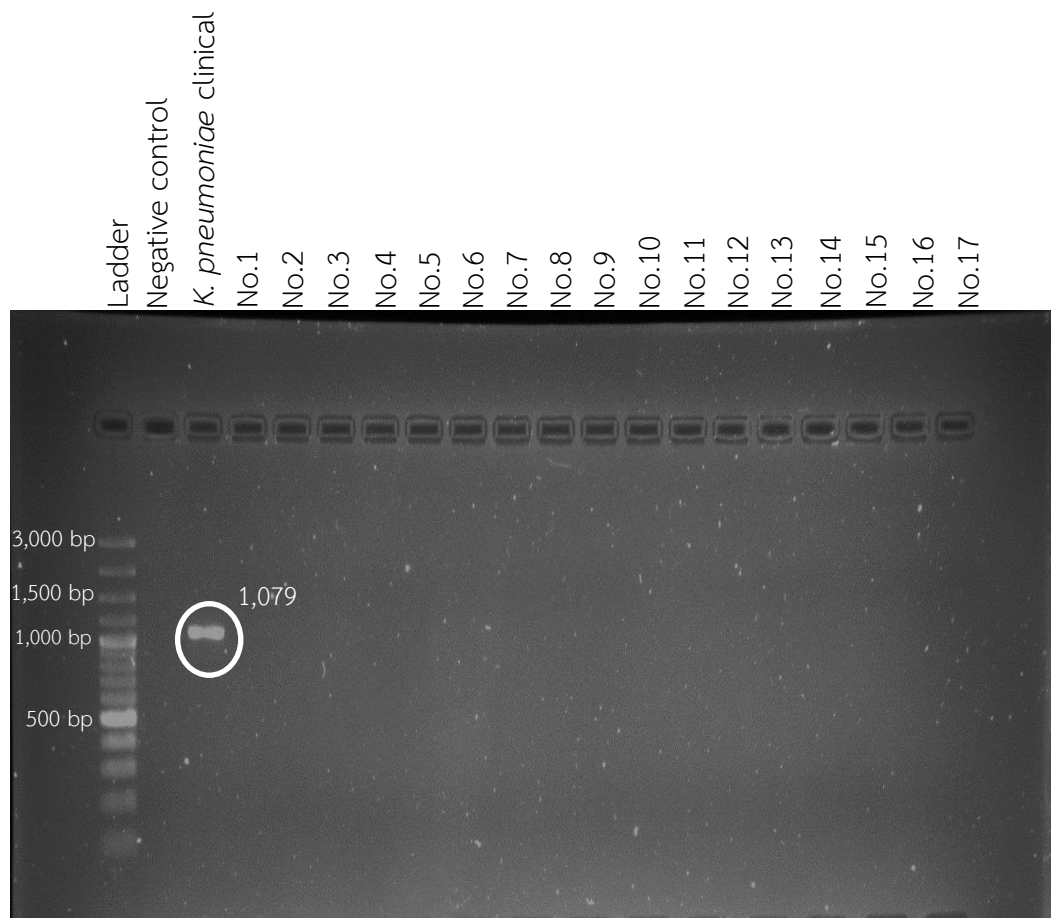


ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน PER-1 โดยแถวที่ 1 (ซ้ายสุด) คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ negative control แถวที่ 3 คือ positive control; *A. baumannii* No.35 ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 920 คู่เบส แถวที่ 4-20 คือเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทดสอบ

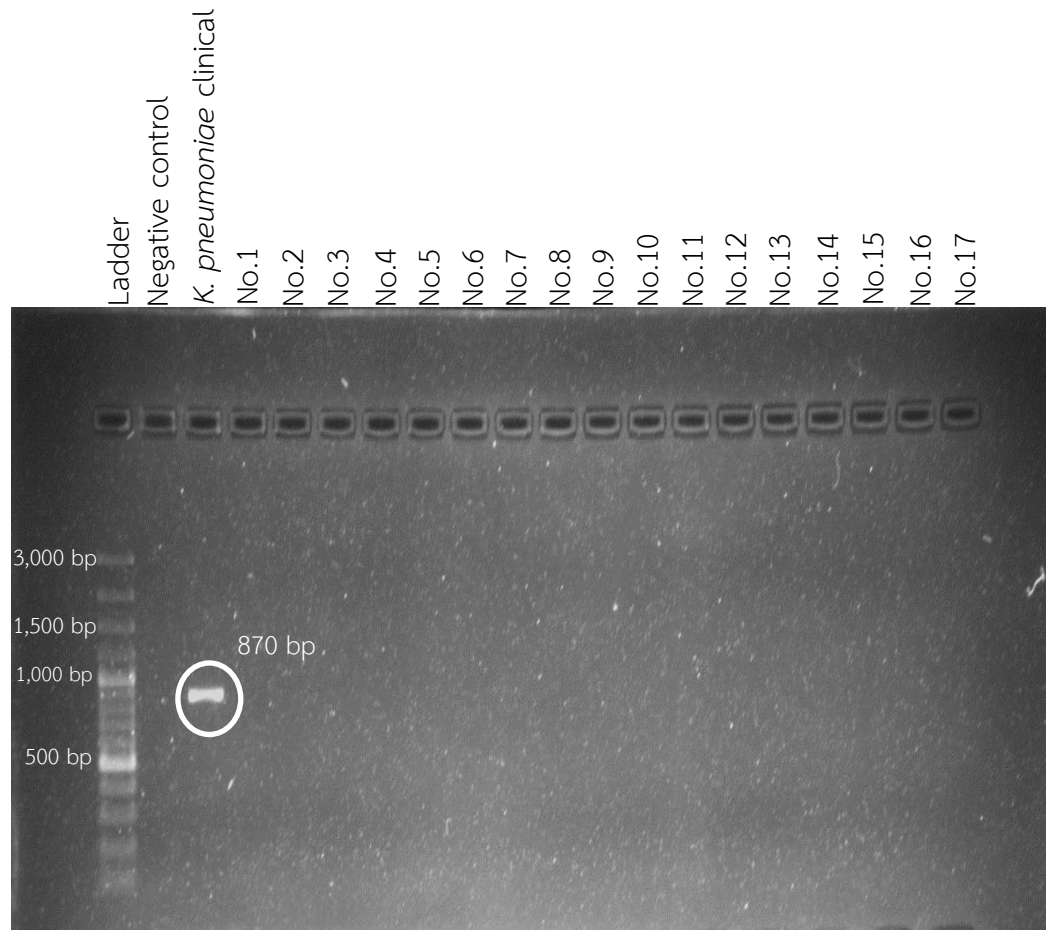


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.5 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน CTX-M โดยแถวที่ 1 (ซ้ายสุด) คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ negative control แถวที่ 3 คือ positive control; *K. pneumoniae* clinical stain ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 550 คู่เบส แถวที่ 4-20 คือเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทดสอบ



ภาพที่ 4.6 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน TEM-1 และอนุพันธ์ โดยแถวที่ 1 (ซ้ายสุด) คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ negative control แถวที่ 3 คือ positive control; *K. pneumoniae* clinical stain ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 1,079 คู่เบส แถวที่ 4-20 คือเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทดสอบ

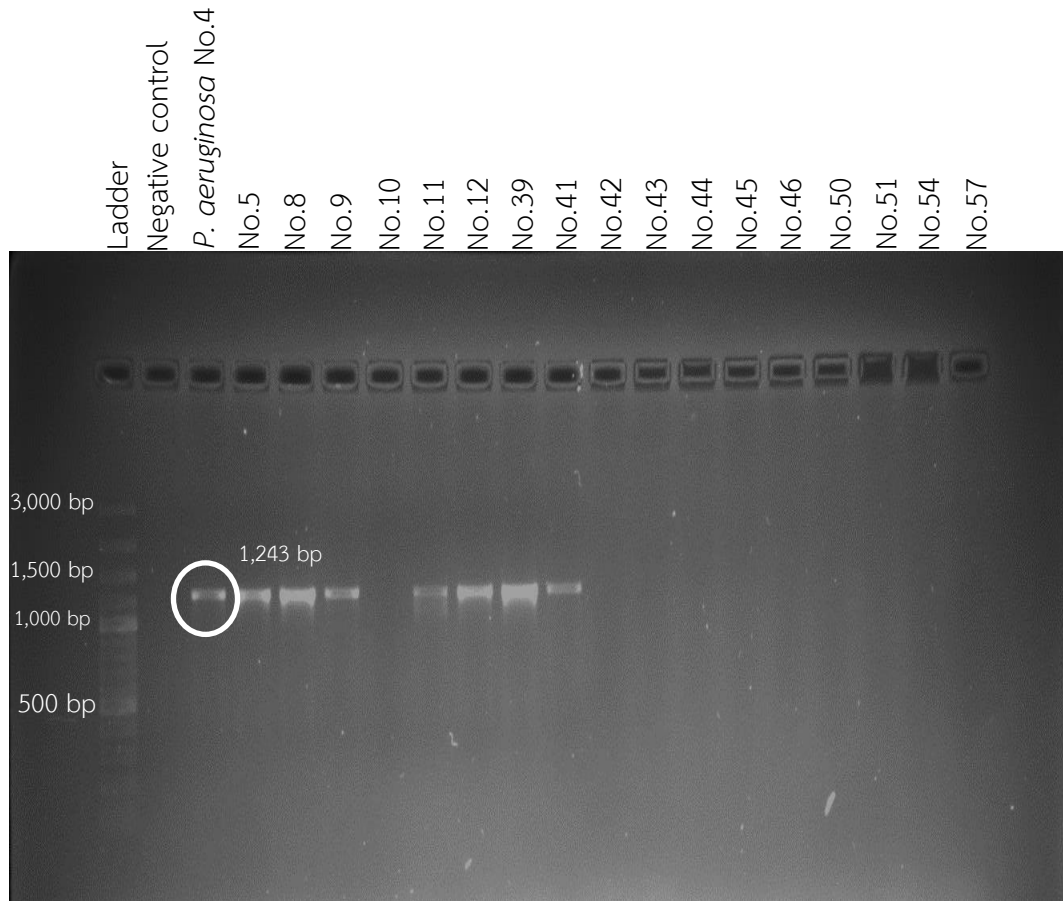


ภาพที่ 4.7 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน SHV-1 โดยแถวที่ 1 (ซ้ายสุด) คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ negative control แถวที่ 3 คือ positive control; *K. pneumoniae* clinical stain ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 870 คู่เบส แถวที่ 4-20 คือเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทดสอบ

คลาส C β -lactamase

สำหรับ คลาส C β -lactamase ยีนที่ทำการทดสอบคือยีน AmpC เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส กับ primer ของยีน AmpC โดยมี *P. aeruginosa* No.4 เป็นเชื้อ positive control จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วย agarose gel electrophoresis แล้ว ดูแถบผลิตภัณฑ์ใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Chemidoc XRS จะเห็นแถบของผลิตภัณฑ์สำหรับยีน AmpC ขนาด 1,243 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.8 ผลการทดสอบพบว่า มีเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับยีน AmpC จำนวน 75 สายพันธุ์ จากเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 118 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 63.56



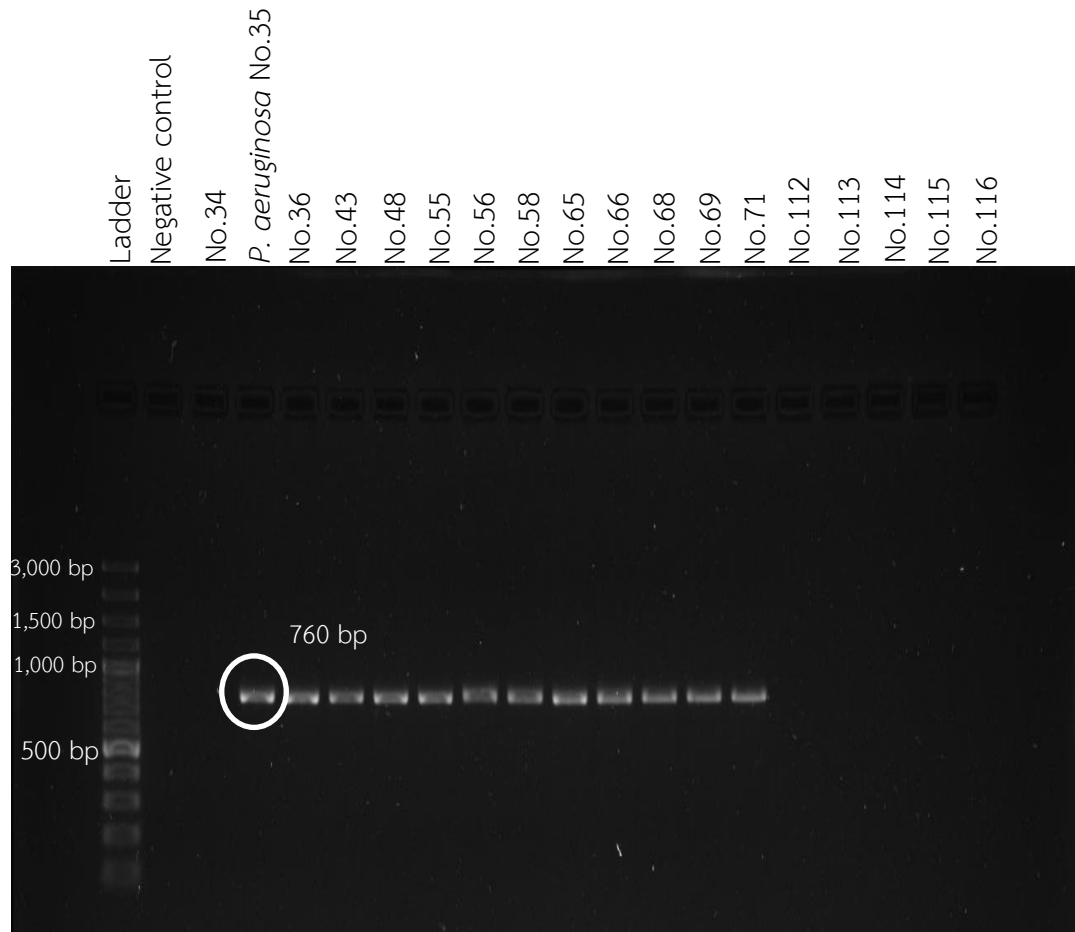


ภาพที่ 4.8 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน AmpC โดยแถวที่ 1 (ซ้ายสุด) คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ negative control แถวที่ 3 คือ positive control; *P. aeruginosa* No.4 ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 1,234 คู่เบส แถวที่ 4-20 คือเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทดสอบ โดยแถวที่ 4-6, 8-11 ให้ผลบวกกับยีน AmpC

คลาส D β -lactamase

สำหรับ คลาส D β -lactamase ยีนที่ทำการทดสอบคือยีน OXA-10 เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส กับ primer ของยีน OXA-10 โดยมี *P. aeruginosa* No.35 เป็นเชื้อ positive control จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วย agarose gel electrophoresis แล้ว ดูแถบผลิตภัณฑ์ที่โตแสง UV ด้วยเครื่อง Chemidoc XRS จะเห็นแถบของผลิตภัณฑ์สำหรับยีน OXA-10 ขนาด 760 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ผลการทดสอบพบว่า มีเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับยีน OXA-10 จำนวน 18 สายพันธุ์ จากเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 118 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 15.25 ได้แก่ *P. aeruginosa* No.35, 36, 43, 48, 55, 56, 58, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 79, 91, 93, 108 และ No.111





ภาพที่ 4.9 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับ primer ของยีน OXA-10 โดยแถวที่ 1 (ซ้ายสุด) คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ negative control แถวที่ 4 คือ positive control; *P. aeruginosa* No.35 ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 760 คู่เบส แถวที่ 3, 5-20 คือเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทดสอบ โดยแถวที่ 5-15 ให้ผลบวกกับยีน OXA-10

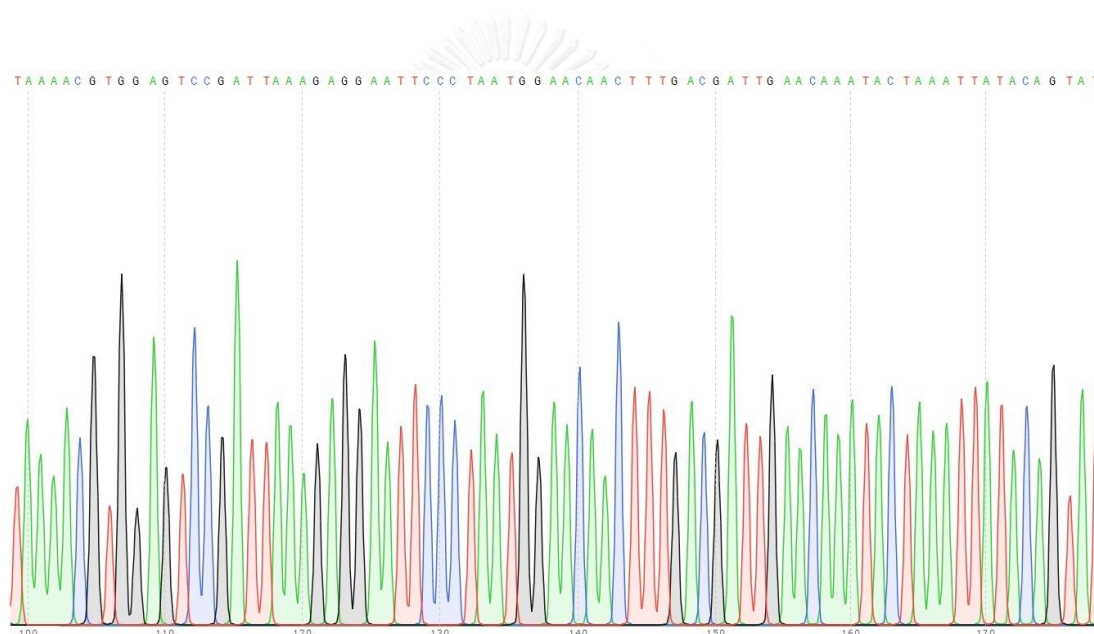
4. ผลการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีนของเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ซึ่งก็คือยีน VEB-1 AmpC และ OXA-10 โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่งวิเคราะห์ผลที่บริษัท BIONEER (ประเทศเกาหลีใต้) ด้วยหลักการ Dye-terminator sequencing นำมาดูผลด้วย Program SnapGene Viewer แล้วจึงนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรม (blast) กับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) มีรายละเอียดดังนี้

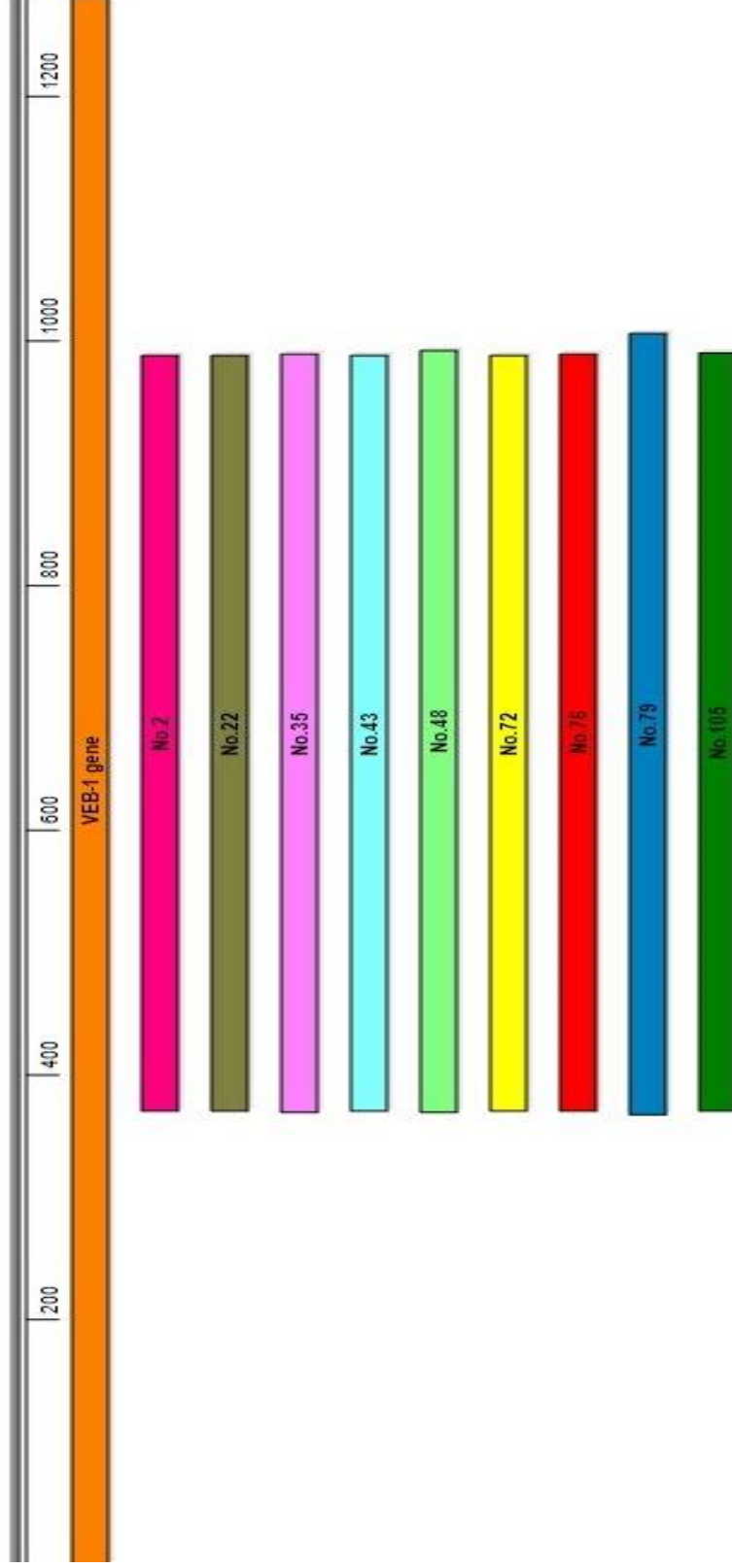


ยีน VEB-1

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 จำนวน 9 สายพันธุ์ (No.2 , 22, 35, 43, 48 ,72, 76, 79 และ 105) มาทำการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับ ยีน VEB-1 (จากฐานข้อมูลของ NCBI: Accession No. AF010416) เพื่อหาความเหมือนและความต่าง พบว่ายีน VEB-1 ที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอเรสมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับยีน VEB-1 ที่ใช้อ้างอิง ถึงร้อยละ 99 ทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 372-381 ถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 974-988 ของยีน VEB-1 ดังแสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.76 ที่ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 ด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอเรส (ภาพที่ 4.10-4.11)



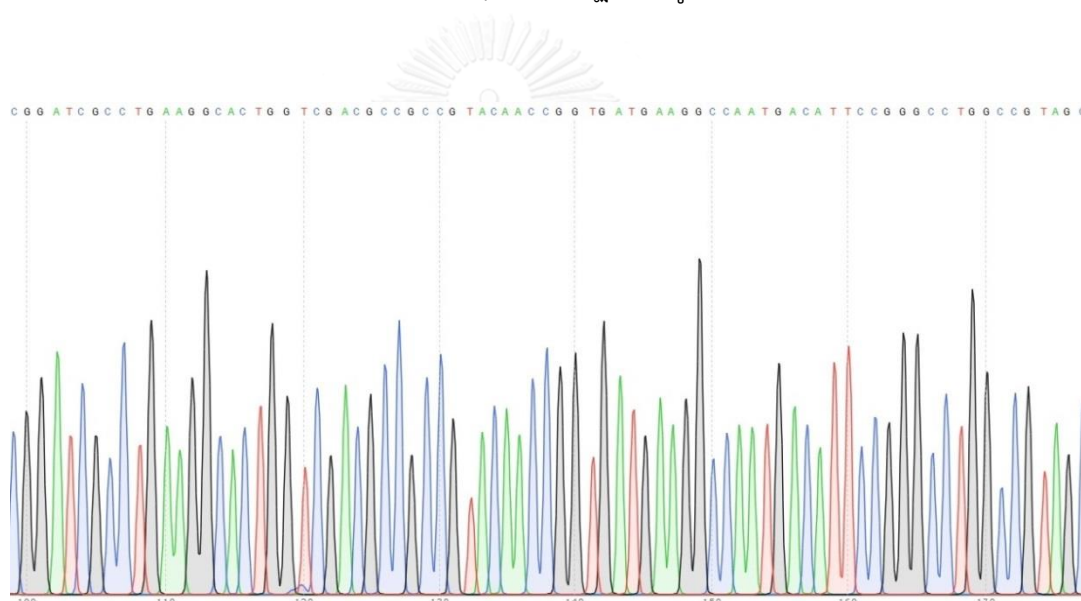
ภาพที่ 4.10 แสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.76 ที่ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 ด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอเรส



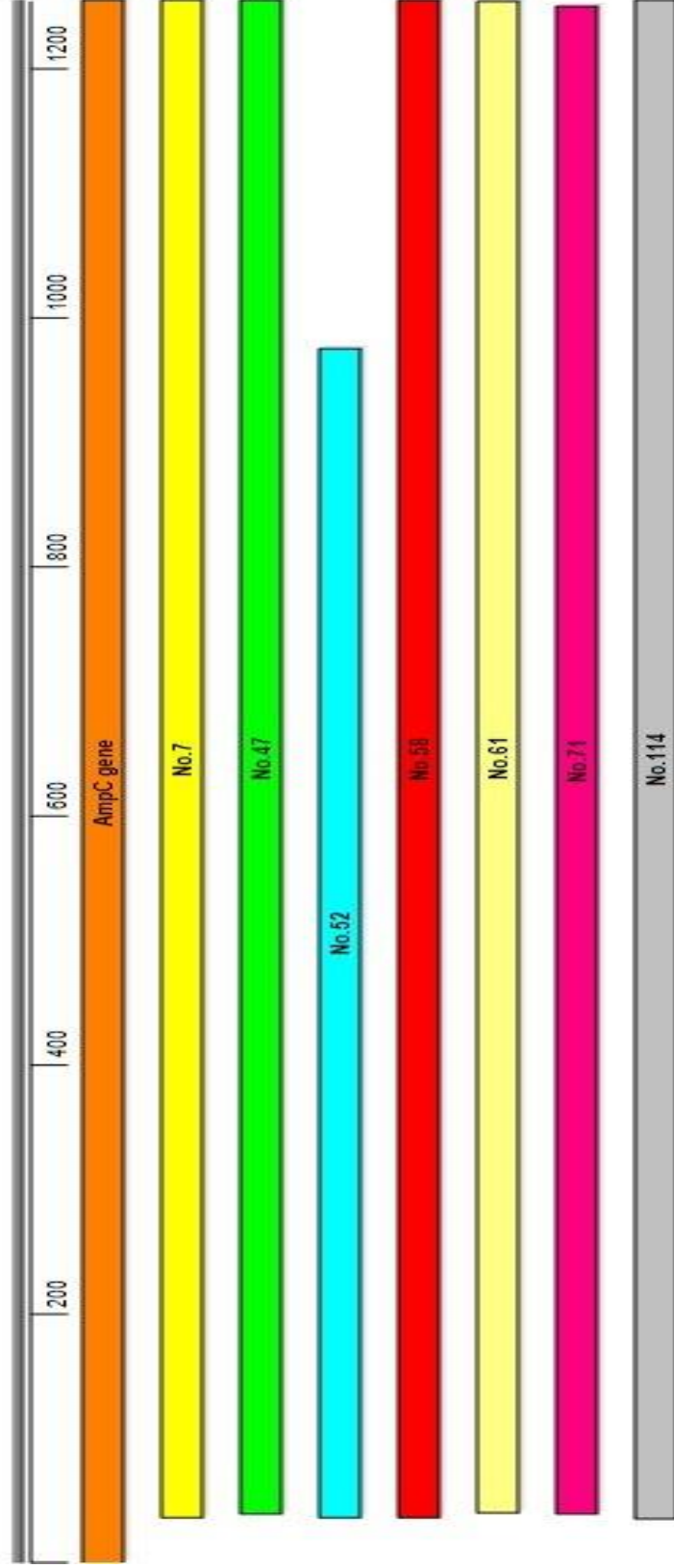
ภาพที่ 4.11 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P.aeruginosa* No.2, 22, 35, 43, 48, 72, 76, 79 และ 105 เทียบกับยีน VEB-1

ยีน AmpC

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลบวกกับยีน AmpC จำนวน 7 สายพันธุ์ (No.7, 47, 52, 58, 61, 71 และ 114) โดยสุ่มมาจากเชื้อที่ให้ผลบวกทั้งหมด 75 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 10 โดยนำมาเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน AmpC (จากฐานข้อมูลของ NCBI: Accession No. AF490770.1) เพื่อหาความเหมือนและความต่าง พบว่ายีน AmpC ทั้ง 7 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับปฏิชีวนาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับยีน AmpC ที่ใช้อ้างอิง ถึงร้อยละ 95-99 โดยสามารถเทียบได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 39-395 ถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 967-1,256 ของยีน AmpC ดังแสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.7 ที่ให้ผลบวกกับยีน AmpC ด้วยปฏิชีวนาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ภาพที่ 4.12-4.13)



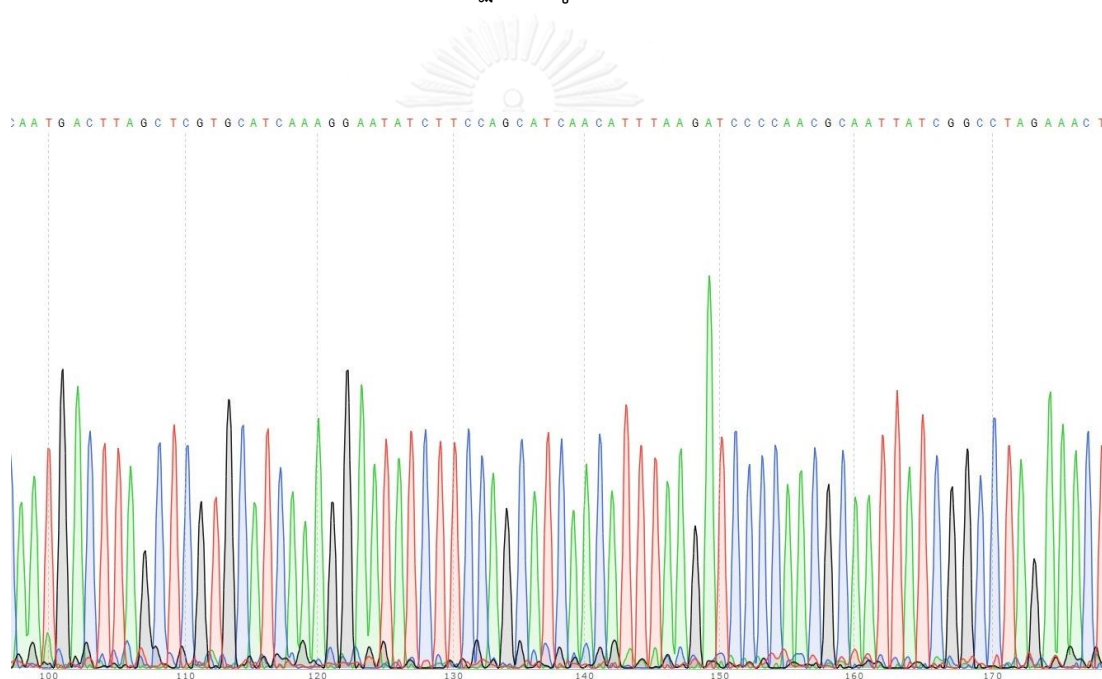
ภาพที่ 4.12 แสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.7 ที่ให้ผลบวกกับยีน AmpC ด้วยปฏิชีวนาลูกโซ่พอลิเมอเรส



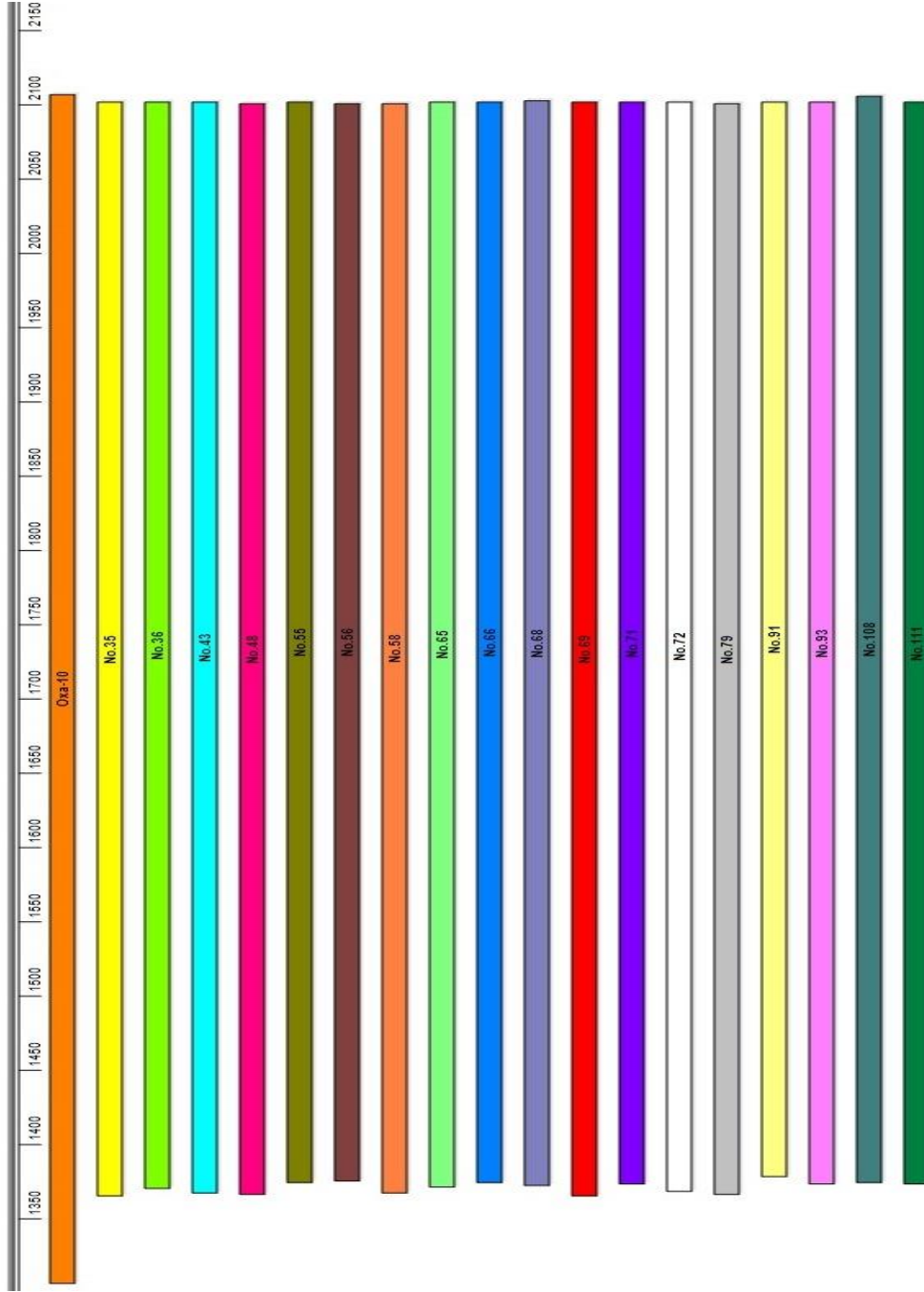
ภาพที่ 4.13 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P.aeruginosa* No.7, 47, 52, 58, 61, 71 และ 114 เทียบกับยีน AmpC

ยีน OXA-10

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลบวกกับยีน OXA-10 จำนวน 18 สายพันธุ์ (No.35, 36, 43, 48, 55, 56, 58, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 79, 91, 93, 108 และ 111) มาทำการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน OXA-10 (จากฐานข้อมูลของ NCBI: Accession No. U37105) เพื่อหาความเหมือนและความต่าง พบว่ายีน OXA-10 ที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูกลูโซ่พอลิเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับยีน OXA-10 ที่ใช้อ้างอิง ถึงร้อยละ 99 ทั้ง 18 สายพันธุ์ โดยเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 1,371-1,385 ถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 2,090-2,100 ของยีน OXA-10 ดังแสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No. 35 ที่ให้ผลบวกกับยีน OXA-10 ด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซ่พอลิเมอร์ (ภาพที่ 4.14-4.15)



ภาพที่ 4.14 แสดงตัวอย่างภาพบางส่วนของผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* No.35 ที่ให้ผลบวกกับยีน OXA-10 ด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซ่พอลิเมอร์



ภาพที่ 4.15 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P.aeruginosa* No.35, 36, 43, 48, 55, 56, 58, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 79, 91, 93, 108 และ 111 เทียบกับยีน OXA-10

5. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 6 กลุ่มยา และ ผลของการทำปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D

เมื่อนำผลของการทำปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D ของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 118 ตัว มาเทียบเคียงหาสัมพันธ์กับผลของความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 6 กลุ่มยาแสดงในตารางที่ 4.3 ดังนี้



ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลความไวต่อกัญยาทั้ง 6 กลุ่มยาและผลของปฏิกริยาสุกใช้พอลิเมอไรเซชัน

ยีน	จำนวน (%)	จำนวนเชื้อที่ตีต่อยา (%)						รูปแบบของความไวต่อยา (จำนวน)
		β -lactam	β -lactam/inhibitor	Aminoglycosides	Fluoroquinolones	Carbapenems	Polymyxins	
ยีนที่ให้ผลบวก	VEB-1	9 (100%)	5 (55.56%)	7 (77.78%)	9 (100%)	7 (77.78%)	0 (0.00%)	1 (2), 2 (2), 3, 4 (3), 9
	AmpC	75 (75/118, 63.56%)	37 (43.33%)	22 (29.33%)	42 (56.00%)	37 (49.33%)	0 (0.00%)	1 (18), 3 (10), 4 (2), 5 (6), 6 (2), 7, 8, 11 (2), 13, 14, 17 (2), 18 (29)
	OXA-10	18 (18/118, 15.25%)	14 (77.78%)	17 (94.44%)	16 (88.89%)	15 (78.95%)	0 (0.00%)	1 (12), 2 (2), 4 (2), 8, 18
ให้ผลบวก ยีนเดี่ยว	VEB-1 เท่านั้น	1 (1/118, 0.85%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0.00%)	9
	AmpC เท่านั้น	58 (58/118, 49.15%)	24 (41.38%)	7 (12.07%)	27 (46.55%)	21 (36.20%)	0 (0.00%)	1 (6), 3 (9), 5 (6), 6 (2), 7, 11 (2), 13, 14, 17 (2), 18 (28)
ให้ผลบวก หลายยีน	VEB-1 + AmpC	3 (3/118, 2.54%)	2 (66.67%)	2 (66.67%)	3 (100%)	3 (100%)	0 (0.00%)	1, 3, 4
	VEB-1 + OXA-10	4(4/118, 3.39%)	3 (75.00%)	4 (100%)	4 (100%)	2 (50.00%)	0 (0.00%)	1, 2 (2), 4
	AmpC + OXA-10	13 (13/118, 11.01%)	11 (84.61%)	12 (92.31%)	11 (84.61%)	12 (92.31%)	0 (0.00%)	1 (11), 8, 18
ให้ผลปฏิกริยาเป็นลบ	VEB-1 + AmpC + OXA-10	1 (1/118, 0.85%)	0 (0.00%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0.00%)	4
	รวม	38 (38/118, 32.2%)	13 (34.21%)	4 (10.52%)	11 (28.95%)	8 (21.05%)	0 (0.00%)	1, 2, 3 (3), 6, 10 (5), 12 (2), 13 (2), 15, 16 (3), 17, 18 (18)

จากตารางเทียบเคียงแสดงความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีพบว่า มีความสัมพันธ์ระหว่างผลความไวต่อกลุ่มยาทั้ง 6 กลุ่มยาและผลของปฏิกริยาลูโกโซพอลิเมอเรส ดังนี้

เชื้อที่ให้ผลบวกกับปฏิกริยาลูโกโซพอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 6 กลุ่มยา พบว่ายีน VEB-1 พบในเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 9 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 7.62 (9/118) มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems คือร้อยละ 100.00, 55.55, 77.78, 100.00 และ 77.78 ตามลำดับ โดยทุกสายพันธุ์ไวต่อยากลุ่ม polymyxins (CL) โดยพบรูปแบบความไวต่อยา 5 รูปแบบซึ่งเป็นแบบ MDR-PA ทุกสายพันธุ์ คือ รูปแบบที่ 1 (2 สายพันธุ์), 2 (2 สายพันธุ์), 3, 4 (3 สายพันธุ์) และ 9

ในขณะที่ยีน AmpC พบในเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 75 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 63.56 (75/118) ส่วนอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems คือร้อยละ 53.33, 43.33, 29.33, 56.00 และ 49.33 ตามลำดับ โดยทุกสายพันธุ์ ไวต่อยากลุ่ม polymyxins (CL) พบรูปแบบความไวและดื้อต่อยามีความหลากหลายถึง 12 รูปแบบดังนี้ รูปแบบที่ 1 (18 สายพันธุ์), 3 (10 สายพันธุ์), 4 (2 สายพันธุ์), 5 (6 สายพันธุ์), 6 (2 สายพันธุ์), 7, 8, 11 (2 สายพันธุ์), 13, 14, 17 (2 สายพันธุ์) และ 18 (29 สายพันธุ์) แต่พบว่าเชื้อเป็น MDR-PA ร้อยละ 53.33 (40/75) ที่เหลือมีรูปแบบของความไวต่อยาแบบ Non MDR-PA ร้อยละ 46.67 (35/75)

สำหรับยีน OXA-10 พบในเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 18 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 15.25 (18/118) มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems คือร้อยละ 94.44, 77.78, 94.44, 88.89 และ 78.95 ตามลำดับ โดยทุกสายพันธุ์ ไวต่อยาในกลุ่ม polymyxins (CL) เช่นเดียวกับเชื้อที่พบในสองยีนแรก และพบรูปแบบความไวและดื้อต่อยา 5 รูปแบบคือ รูปแบบที่ 1 (12 สายพันธุ์), 2 (2 สายพันธุ์), 4 (2 สายพันธุ์), 8 และ 18 ซึ่งเชื้อแทบทุกสายพันธุ์เป็น MDR-PA ยกเว้นสายพันธุ์เดียวที่ไวต่อยาทุกกลุ่ม (รูปแบบที่ 18)

กลุ่มที่ให้ผลบวกกับปฏิกริยาลูโกโซพอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D เพียงยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น พบว่ามีเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน VEB-1 ยีนเพียงเดียวเท่านั้น จำนวน 1 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 0.85 (1/118) โดยเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam fluoroquinolones และ carbapenems ร้อยละ 100.00 พบรูปแบบความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA (รูปแบบที่ 9) ในขณะที่เชื้อที่ให้ผลปฏิกริยาลูโกโซพอลิเมอเรสกับยีน AmpC เพียงยีนเดียว

เท่านั้น จำนวน 58 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 49.15 (58/118) มีอัตราการดื้อต่อยาทั้ง 5 กลุ่มยา β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems ในระดับปานกลางคือร้อยละ 41.38, 41.38, 12.07, 46.55 และ 36.20 ตามลำดับ พบรูปแบบความไวต่อยา 10 รูปแบบ ดังนี้ รูปแบบที่ 1 (6 สายพันธุ์), 3 (9 สายพันธุ์), 5 (6 สายพันธุ์), 6 (2 สายพันธุ์), 7, 11 (2 สายพันธุ์), 13, 14, 17 (2 สายพันธุ์) และ 18 (28 สายพันธุ์) ซึ่งเชื่อว่าเป็น MDR-PA ร้อยละ 41.38 (24/58) ที่เหลือมีรูปแบบของความไวต่อยาแบบ Non MDR-PA ร้อยละ 58.62 (34/58) ไม่พบเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลบวกกับปฏิชีวนาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับเฉพาะกับยีน OXA-10 เพียงยีนเดียวเลย

กลุ่มที่ให้ผลบวกกับปฏิชีวนาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D ร่วมกันสองยีนหรือทั้งสามยีน จำนวน 21 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 17.80 (21/118) ซึ่งเชื่อส่วนใหญ่จะดื้อยาทั้ง 5 กลุ่มค่อนข้างสูงและรูปแบบการดื้อต่อกุ่มยาเป็นแบบ MDR-PA เกือบทุกสายพันธุ์

สำหรับกลุ่มที่ให้ผลลบกับปฏิชีวนาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D พบจำนวน 38 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 32.20 (38/118) มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems ค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 28.95, 34.21, 10.52, 28.95 และ 21.05 ตามลำดับ พบรูปแบบความไวต่อยา 11 รูปแบบคือ รูปแบบที่ 1, 2, 3 (3 สายพันธุ์), 6, 10 (5 สายพันธุ์), 12 (2 สายพันธุ์), 13 (2 สายพันธุ์), 15, 16 (3 สายพันธุ์), 17 และ 18 (18 สายพันธุ์) ซึ่งเชื่อว่าเป็น MDR-PA เพียงร้อยละ 15.79 (6/38) ส่วนมากเชื่อมีรูปแบบของความไวต่อยาแบบ Non MDR-PA ถึงร้อยละ 84.21 (32/38)

6. ผลการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ตรวจพบยื่นของ
เอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D จำนวน 80 สายพันธุ์ ด้วยวิธี pulsed-field gel
electrophoresis (PFGE)

เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ตรวจพบยื่นของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D (ยีน
VEB-1 AmpC และ OXA-10) จำนวน 80 สายพันธุ์ มาศึกษาถึงความหลากหลายทางสายพันธุ์ของ
เชื้อด้วยวิธี PFGE จะได้ภาพถ่ายของเจลตามภาพที่ 4.16 และเมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ
Bionumeric เวอร์ชัน 7.5 (ใบอนุญาตการใช้งานในระยะทดลองใช้ฟรี 30 วัน) โดยใช้หลักเกณฑ์
เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SpeI-HF ด้วยวิธี Dice coefficient
และจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)
โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ optimize 1.5% และ tolerance in the band position 1.5% เกณฑ์ตัดสิน
ว่าเชื้อที่ทำการทดสอบเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน \geq ร้อยละ 80 ซึ่งเป็นไปตาม
หลักการของ Tenover และคณะ พบว่ามีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 29 pulsotype
(PT) ตามภาพที่ 4.17 โดยมีรายละเอียดดังนี้

Pulsotype 1 (PT1): เป็น PT หลักที่ใหญ่ที่สุด มีเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 19 สายพันธุ์
คิดเป็นร้อยละ 23.75 มีสมาชิกดังนี้คือ *P. aeruginosa* No.4, 5, 12, 25, 32, 36, 55, 56, 58, 65,
66, 68, 69, 71, 91, 93, 100, 108, 111

Pulsotype 2 (PT2): เป็น PT ที่มีขนาดรองลงมาโดยมีเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 17 สาย
พันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 21.25 มีสมาชิกดังนี้คือ *P. aeruginosa* No.6, 7, 20, 29, 42, 47, 59, 61, 88,
96, 98, 99, 106, 107, 109, 113, 114

Pulsotype 3 (PT3): มีสมาชิกจำนวน 4 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 5.00 ประกอบด้วย *P.*
aeruginosa No. 8, 15, 22, 48

Pulsotype 4 (PT4): เป็น PT ขนาดเท่ากับ PT3 มีสมาชิกจำนวน 4 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อย
ละ 5.00 ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.1, 2, 18, 103

Pulsotype 5 (PT5): เป็น PT ขนาดเล็กมีสมาชิกจำนวน 3 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 3.75
ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.13, 72, 90

Pulsotype 6 (PT6): เป็น PT ขนาดเล็กเท่ากับ PT5 มีสมาชิกจำนวน 3 สายพันธุ์ คิดเป็น
ร้อยละ 3.75 ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.19, 77, 41

Pulsotype 7 ถึง Pulsotype 13 (PT7-PT13): มีสมาชิก PT ละ 2 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 2.50 โดย

Pulsotype 7 (PT7): ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.92, 102

Pulsotype 8 (PT8): ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.9, 79

Pulsotype 9 (PT9): ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.85, 112

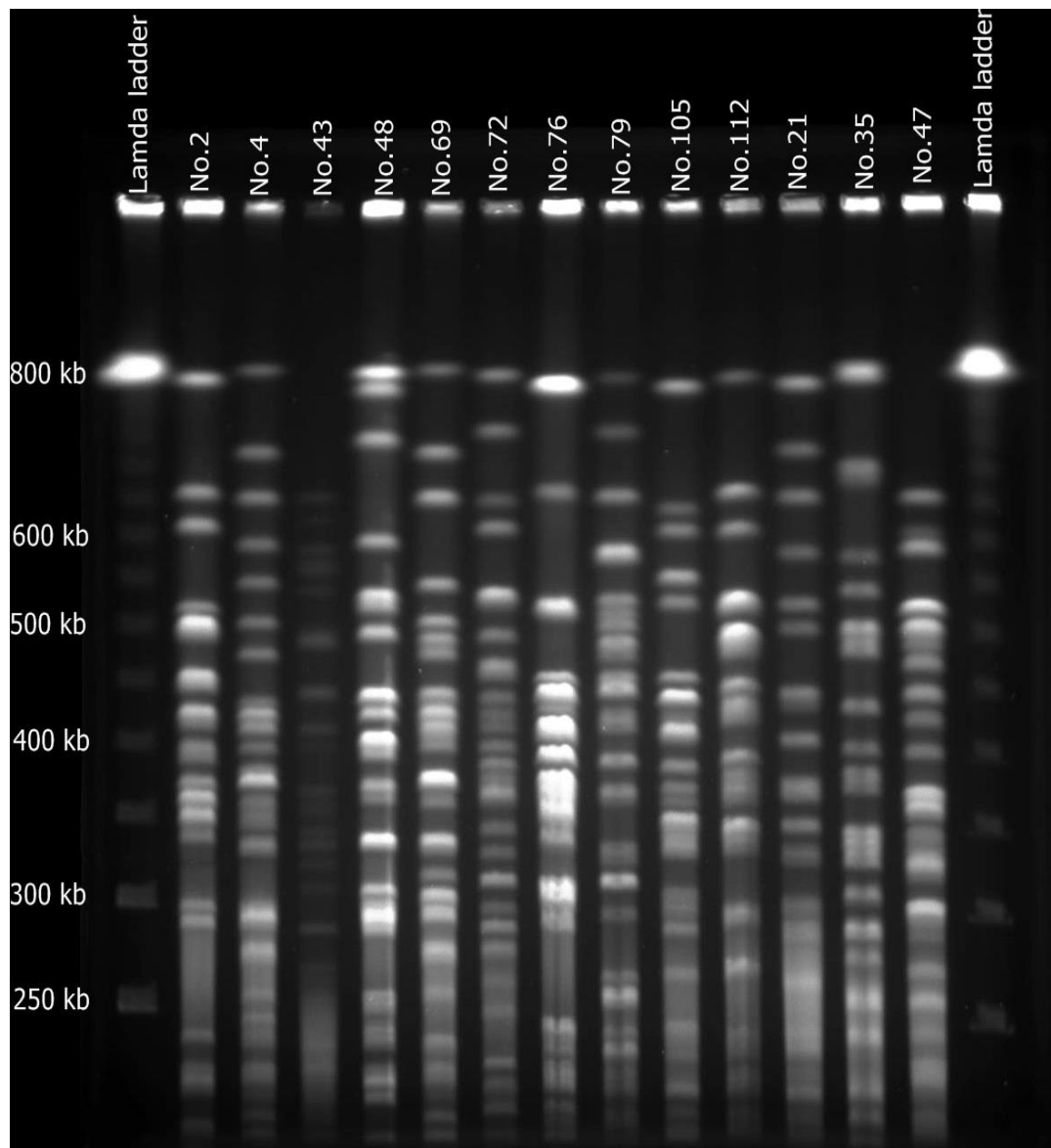
Pulsotype 10 (PT10): ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.23, 24

Pulsotype 11 (PT11): ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.11, 76

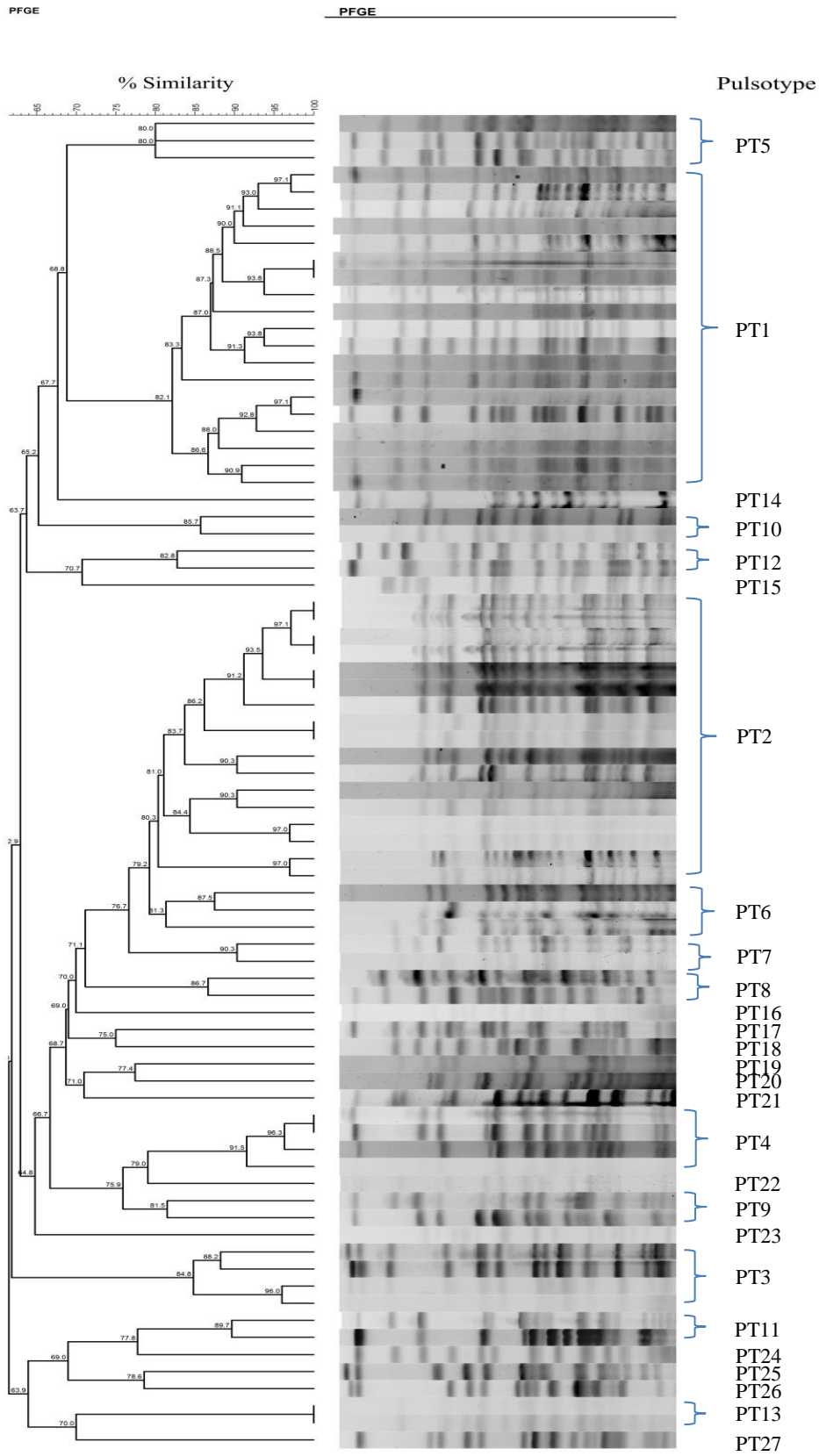
Pulsotype 12 (PT12): ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.35, 39

Pulsotype 13 (PT13): ประกอบด้วย *P. aeruginosa* No.104, 115

Pulsotype 14 ถึง Pulsotype 27 (PT14-PT27) มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ SpeI-HF ที่ไม่เหมือนกันเลย (unique type) คิดเป็นร้อยละ 1.25 นอกจากนี้ยังมีเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่ให้ผล PFGE เป็น Smear band คือ *P. aeruginosa* No.16, 17 จึงจัดเป็น PT 28 และ 29 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.16 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ถูกตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย *SpeI*-HF ด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) โดยแถวที่ 1 และ 15 เป็น Lamda Ladder ส่วนแถวที่ 2-14 เป็นตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa*



ภาพที่ 4.17 แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Bionumeric เวอร์ชัน 7.5 ของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 80 สายพันธุ์

7. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของการจัดความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี PFGE ความไวต่อยาทั้ง 11 ชนิด และผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D

เมื่อนำผลของการจัดความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี PFGE การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และD ซึ่งถือเป็นวิธีทางจีโนไทป์มาเทียบเคียงหาความสัมพันธ์กับผลของความไวต่อยาทั้ง 6 กลุ่มยาดังแสดงในตารางที่ 4.4 ดังนี้



ตารางที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลลดความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ ปฏิริยาอุกไซโฟลิมเอด และ ความไวต่อยาทั้ง 6 กลุ่มยา

PT	ยีน		จำนวนเชื้อที่ติดต่อยา (%)							รูปแบบของความไวต่อยา
	ยีน	จำนวน (%)	β -lactam	β -lactam/inhibitor	Aminoglycosides	Fluoroquinolones	Carbapenems	Polymyxins		
1	AmpC	6 (31.58%)	6	6	4	6	6	6	0 (0.00%)	1 (4), 3 (2)
	AmpC + OXA-10	13 (68.42%)	13	11	12	11	12	12	0 (0.00%)	1 (11), 8, 18
	รวม	19/80 (23.75%)	19/19 (100%)	17/19 (89.47%)	16/19 (84.21%)	17/19 (89.47%)	18/19 (94.73%)	18/19 (94.73%)	0 (0.00%)	1 (15), 3 (2), 8, 18
2	AmpC	17/80 (21.25%)	10/17 (58.82%)	10/17 (58.82%)	0/17 (0.00%)	12/17 (70.59%)	10/17 (58.82%)	10/17 (58.82%)	0 (0.00%)	3 (7), 5 (2), 6, 11, 14, 17, 18 (4)
	AmpC	2 (50.00%)	1	2	1	2	2	2	0 (0.00%)	1, 6
3	VEB-1 + AmpC	1 (25.00%)	1	1	0	1	1	1	0 (0.00%)	3
	VEB-1 + OXA-10	1 (25.00%)	1	1	1	1	1	1	0 (0.00%)	1
	รวม	4/80 (5.00%)	3/4 (75.00%)	4/4 (100%)	2/4 (50.00%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0 (0.00%)	1 (2), 3, 6
4	AmpC	3 (75.00%)	0	0	0	0	0	0	0 (0.00%)	18 (3)
	VEB-1 + AmpC	1 (25.00%)	1	0	1	1	1	1	0 (0.00%)	4
	รวม	4/80 (5.00%)	1/4 (25.00%)	0/4 (0.00%)	1/4 (25.00%)	1/4 (25.00%)	1/4 (25.00%)	1/4 (25.00%)	0 (0.00%)	4, 18 (3)
5	AmpC	2 (66.67%)	0	0	0	0	1	1	0 (0.00%)	17, 18
	VEB-1 + OXA-10	1 (33.33%)	1	1	1	1	0	0	0 (0.00%)	2
	รวม	3/80 (3.75%)	1/3 (33.33%)	1/3 (33.33%)	1/3 (33.33%)	1/3 (33.33%)	1/3 (33.33%)	1/3 (33.33%)	0 (0.00%)	2, 17, 18
6	AmpC	3/80 (3.75%)	1/3 (33.33%)	1/3 (33.33%)	0/3 (0.00%)	1/3 (33.33%)	0/3 (0.00%)	0/3 (0.00%)	0 (0.00%)	5, 18 (2)
	AmpC	2/80 (2.5%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	0/2 (0.00%)	1/2 (50.00%)	0/2 (0.00%)	0/2 (0.00%)	0 (0.00%)	5, 18

PT	ยีน		จำนวนเชื้อที่ติดต่อ (%)							รูปแบบของความไวต่อยา
	ยีน	จำนวน (%)	β -lactam	β -lactam/inhibitor	Aminoglycosides	Fluoroquinolones	Carbapenems	Polymyxins		
8	AmpC	1 (50.00%)	0	0	0	0	0	0 (0.00%)	18	
	VEB-1 + AmpC + OXA-10	1 (50.00%)	1	0	1	1	1	0 (0.00%)	4	
	รวม	2/80 (2.50%)	1/2 (50.00%)	0/2 (0.00%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	0 (0.00%)	4, 18	
9	AmpC	2/80 (2.50%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	0 (0.00%)	1, 18	
10	AmpC	2/80 (2.50%)	1/2 (50.00%)	0/2 (0.00%)	0/2 (0.00%)	1/2 (50.00%)	0/2 (0.00%)	0 (0.00%)	11, 18	
11	VEB-1	1 (50.00%)	1	0	0	1	1	0 (0.00%)	9	
	AmpC	1 (50.00%)	0	0	0	0	0	0 (0.00%)	18	
	รวม	2/80 (2.50%)	1/2 (50.00%)	0/2 (0.00%)	0/2 (0.00%)	1/2 (50.00%)	1/2 (50.00%)	0 (0.00%)	9, 18	
12	AmpC	1 (50.00%)	1	1	0	1	0	0 (0.00%)	5	
	VEB-1 + OXA-10	1 (50.00%)	1	1	1	1	0	0 (0.00%)	2	
	รวม	2/80 (2.50%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	1/2 (50.00%)	2/2 (100%)	0/2 (0.00%)	0 (0.00%)	2, 5	
13	AmpC	2/80 (2.50%)	0/2 (0.00%)	0/2 (0.00%)	0/2 (0.00%)	0/2 (0.00%)	0/2 (0.00%)	18 (2)		
14-29	AmpC	14 (87.50%)	2	2	1	2	1	0 (0.00%)	5, 7, 13, 18 (11)	
	VEB-1 + AmpC	1 (6.25%)	1	1	1	1	1	0 (0.00%)	1	
	VEB-1 + OXA-10	1 (6.25%)	1	0	1	1	1	0 (0.00%)	4	
รวม	16/80 (20.00%)	4/16 (25.00%)	3/16 (18.75%)	3/16 (18.75%)	4/16 (25.00%)	3/16 (18.75%)	0 (0.00%)	1, 4, 5, 7, 13, 18 (11)		

กลุ่มที่ 1. PT1 มีสมาชิก 19 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 23.75 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ใน PT นี้มียีน OXA-10 เป็นหลักคิดเป็นร้อยละ 68.42 (13/19) โดยพบร่วมกับยีน AmpC และพบยีน AmpC เพียงยีนเดียวเท่านั้น ร้อยละ 31.58 (6/19) โดย PT มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems อยู่ในระดับสูงคือร้อยละ 100.00, 89.47, 84.21, 89.47 และ 94.73 ตามลำดับ พบรูปแบบความไวต่อยา 4 รูปแบบ คือรูปแบบที่ 1 (15 สายพันธุ์), 3 (2 สายพันธุ์), 8 และ 18 ซึ่งเกือบทุกสายพันธุ์เป็น MDR-PA

กลุ่มที่ 2. PT2 มีสมาชิก 17 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 21.25 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ใน PT นี้พบยีน AmpC เพียงยีนเดียว คิดเป็นร้อยละ 100.00 (17/17) มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems อยู่ในระดับปานกลางคือร้อยละ 58.82, 58.82, 0.00, 70.59 และ 58.82 ตามลำดับ พบรูปแบบความไวต่อยา 7 รูปแบบ คือรูปแบบที่ 3 (7 สายพันธุ์), 5 (2 สายพันธุ์), 6, 11, 14, 17 และ 18 (4 สายพันธุ์) มีรูปแบบความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA เพียงร้อยละ 58.82 (10/17) ส่วน Non MDR-PA พบร้อยละ 41.18 (7/17)

กลุ่มที่ 3. PT3 มีสมาชิก 4 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 5.00 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ใน PT นี้พบยีน AmpC เท่านั้น ยีน VEB-1 ร่วมกับยีน AmpC และ ยีน VEB-1 ร่วมกับยีน OXA-10 คิดเป็นร้อยละ 50.00 (2/4), 25.00 (1/4) และ 25.00 (1/4) ตามลำดับ มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems ร้อยละ 75.00, 100.00, 50.00, 100.00 และ 100.00 ตามลำดับ และพบรูปแบบความไวและดื้อต่อยา 3 รูปแบบ คือรูปแบบที่ 1(2 สายพันธุ์), 3 และ 6 ซึ่งทุกสายพันธุ์เป็น MDR-PA

กลุ่มที่ 4. PT4 มีสมาชิก 4 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 5.00 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ใน PT นี้พบยีน AmpC เท่านั้นและ ยีน VEB-1 ร่วมกับยีน AmpC คิดเป็นร้อยละ 75.00 (3/4) และ 25.00 (1/4) ตามลำดับ มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam aminoglycosides fluoroquinolones และ carbapenems เท่ากันคือร้อยละ 25.00 และพบรูปแบบความไวต่อยา 2 รูปแบบ คือรูปแบบที่ 4 และ 18 (3 สายพันธุ์) โดยเชื้อส่วนใหญ่เป็น Non MDR-PA พบร้อยละ 75.00 (3/4) และ MDR-PA เพียงร้อยละ 25.00 (1/4)

กลุ่มที่ 5. PT5 มีสมาชิก 3 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 3.75 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ใน PT พบยีน AmpC เท่านั้นและ ยีน VEB-1 ร่วมกับ OXA-10 คิดเป็นร้อยละ 66.67 (2/3) และ 33.33 (1/3) ตามลำดับ และพบอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam β -lactam/ β -lactamase inhibitor

aminoglycoside fluoroquinolones และ carbapenems เท่ากันๆ คือ ร้อยละ 33.33 พบรูปแบบ ความไวต่อยา 3 รูปแบบ คือรูปแบบที่ 2, 17 และ 18 โดยเชื้อส่วนใหญ่เป็น Non MDR-PA พบร้อยละ 67.77 (2/3) และ MDR-PA เพียงร้อยละ 33.33 (1/3)

กลุ่มที่ 6. พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ในกลุ่มนี้ พบยีน AmpC เท่านั้น ประกอบด้วย PT6, PT7, PT9, PT10 และ PT13 โดยเชื้อส่วนใหญ่เป็น Non MDR-PA พบร้อยละ 67.77 (6/9) และ MDR-PA เพียงร้อยละ 33.33 (3/9)

กลุ่มที่ 7. ประกอบด้วย PT8 PT11 PT12 และ PT14 -29 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ในกลุ่มนี้ พบยีน AmpC เพียงยีนเดียว หรือพบ AmpC ร่วมกับ VEB-1 หรือพบ VEB-1 ร่วมกับ OXA-10



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์ จากโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียง ในกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม-เดือนเมษายน ปี พ.ศ. 2552 พบว่าเป็นเชื้อที่มาจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 43.22 (51/118) รองลงมา คือ หนองร้อยละ 30.51 (36/118), ปัสสาวะร้อยละ 23.73 (28/118) และน้อยที่สุดคือเลือดร้อยละ 2.54 (3/118)

ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 11 ชนิดโดยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 118 สายพันธุ์ มีอัตราการดื้อยาดังนี้ ยากลุ่ม fluoroquinolones ได้แก่ ยา LVX และยา CFX มีอัตราการดื้อยาร้อยละ 49.15 (58/118) และ 48.30 (57/118) ตามลำดับ รองลงมาคือยา β -lactam ที่เป็น third generation cephalosporins ได้แก่ ยา CAZ โดยมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 44.91 (53/118) ซึ่งถือได้ว่าการดื้อยาสูงในระดับใกล้เคียงกับกลุ่ม fluoroquinolones ลำดับถัดมาเป็นยา β -lactam/ β -lactamase inhibitor คือยา SCFP และยา TZP มีอัตราการดื้อยาร้อยละ 38.98 (46/118) และ 36.44 (43/118) ตามลำดับ สำหรับการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ประกอบด้วย ยา MEM และ IPM มีอัตราการดื้อยาร้อยละ 33.05 (39/118) และ 31.36 (37/118) ตามลำดับ ส่วนยา β -lactam ในกลุ่ม fourth generation cephalosporins ได้แก่ ยา FEP มีอัตราการดื้อยาร้อยละ 28.81 (34/118) ส่วนยากลุ่ม aminoglycosides มีอัตราการดื้อยาในระดับต่ำโดยเฉพาะยา AK ดื้อยาร้อยละ 18.64 (22/118) ส่วนยา GM มีอัตราการดื้อยาร้อยละ 25.42 (30/118) และยากลุ่มสุดท้าย polymyxins ได้แก่ ยา CL นั้นเชื้อ *P. aeruginosa* ทุกสายพันธุ์ไม่พบการดื้อยาชนิดนี้

เมื่อพิจารณารูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 18 รูปแบบของเชื้อ *P. aeruginosa* 118 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีรูปแบบที่ดื้อยาทั้ง 5 กลุ่มยา (รูปแบบที่ 1) มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 16.95 (20/118) รองลงมาเป็นรูปแบบที่ดื้อยา 4 กลุ่มยา (รูปแบบที่ 2-4) ร้อยละ 16.10 (19/118) และรูปแบบที่ดื้อยา 3 กลุ่มยา (รูปแบบที่ 5-9) ร้อยละ 10.17 (12/118) รวมทั้งหมดที่เชื้อดื้อต่อยาตั้งแต่สามกลุ่มขึ้นไป (รูปแบบที่ 1-9) ซึ่งถือว่าเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน MDR-PA ถึงเกือบครึ่งหนึ่งคือร้อยละ 43.22 (51/118) ส่วนที่เหลือเป็น non MDR-PA (รูปแบบที่ 10-18) คิดเป็นร้อยละ 56.78 (67/118) โดยในกลุ่มนี้จะพบรูปแบบที่ 18 ซึ่งไวต่อยาทุกชนิดมากที่สุดร้อยละ 39.83 (47/118)

รองลงมาเป็นรูปแบบที่ดื้อยา 2 กลุ่มยา (รูปแบบที่ 10-14) ร้อยละ 11.02 (13/118) และรูปแบบที่ดื้อยาเพียงหนึ่งกลุ่มยา (รูปแบบที่ 15-17) ร้อยละ 5.93 (7/118)

ผลการศึกษการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D โดยวิธีทางจีโนมไทป์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสในการหาความชุกของยีนในกลุ่ม β -lactamase คลาส A ได้แก่ยีน VEB-1 PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 เอนไซม์คลาส C ได้แก่ยีน AmpC เอนไซม์คลาส D ได้แก่ยีน OXA-10 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีความชุกต่อยีน AmpC มากที่สุดคือร้อยละ 63.56 (75/118) รองลงมาคือยีน OXA-10 และยีน VEB-1 พบร้อยละ 15.25 (18/118) และ 7.63 (9/118) ตามลำดับ ไม่พบยีน PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์ และยีน SHV-1 เลย เมื่อนำเชื้อที่ให้ผลบวกจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D ในระดับจีโนมไทป์ทั้ง 80 สายพันธุ์ มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 เป็นยีน VEB-1 จริง (GenBank accession No. AF010416) เชื้อที่ให้ผลบวกกับยีน AmpC เป็นยีน AmpC (GenBank accession No. AF490770.1) และเชื้อที่ให้ผลบวกกับยีน OXA-10 เป็นยีน OXA-10 จริงเช่นกัน (GenBank accession No. U37105)

เมื่อพิจารณาผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 6 กลุ่มยา และผลการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสพบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* 9 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 มีการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam ทุกสายพันธุ์คือร้อยละ 100.00 (9/9) และการดื้อยาลดลงในกลุ่มยา β -lactam/ β -lactam inhibitor คือร้อยละ 55.55 (5/9) โดยมีรูปแบบของความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA ทุกตัว (รูปแบบที่ 1, 2, 3, 4 และ 9) สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* 18 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสกับยีน OXA-10 พบว่ามีการดื้อยาทุกชนิดสูง ยกเว้นยา CL และมีรูปแบบของความไวต่อยาแบบ MDR-PA เป็นส่วนใหญ่ ร้อยละ 94.44 (17/18) ยกเว้นสายพันธุ์เดียวที่เป็น non MDR-PA (รูปแบบที่ 18) สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลบวกกับยีน AmpC พบว่ามีอัตราการดื้อยาทุกชนิดในระดับปานกลาง โดยพบว่ามีรูปแบบของความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA ร้อยละ 53.33 (40/75) (รูปแบบที่ 1, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8) ที่เหลือมีรูปแบบของความไวต่อยาแบบ Non MDR-PA ร้อยละ 46.67 (35/75) (รูปแบบที่ 11, 13, 14, 17 และ 18)

จากผลดังกล่าวแสดงว่าอุบัติการณ์ของการดื้อยา β -lactam โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา cephalosporins มีสาเหตุมาจากการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ได้แก่ยีน VEB-1 AmpC และ

OXA-10 อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงกลไกอื่นๆที่อาจเกี่ยวข้องกับการดื้อยา β -lactam ได้แก่ การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ หรือการขับยาออกจากเซลล์โดย efflux systems

เมื่อศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน β -lactamase ในคลาส A C และ D จำนวน 80 สายพันธุ์ ด้วยวิธี PFGE พบว่ามี 2 pulsotype (PT) หลักคือ PT1 และ PT2 โดย PT1 เป็น PT ที่ใหญ่ที่สุดคิดเป็นร้อยละ 23.75 (19/80) โดยมียีน OXA-10 เป็นหลักคิดเป็นร้อยละ 68.42 (13/19) โดยพบร่วมกับยีน AmpC โดยมีรูปแบบความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA เกือบทุกสายพันธุ์ถึงร้อยละ 94.73 (18/19) ยกเว้นเพียงสายพันธุ์เดียวที่ไวต่อยาทุกตัว สำหรับ PT2 เป็น PT ที่พบมากเป็นอันดับสองคิดเป็นร้อยละ 21.25 (17/80) โดยมียีน AmpC เป็นหลักเพียงยีนเดียวคิดเป็นร้อยละ 21.25 (17/80) มีรูปแบบความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA น้อยกว่าใน PT1 พบเพียงร้อยละ 58.82 (10/17)

สำหรับ PT อื่นๆมี 1 PT ที่มีเชื้อ 4 สายพันธุ์ 2 PT ที่มีเชื้อ 3 สายพันธุ์ 6 PT ที่มีเชื้อ 2 สายพันธุ์ และมี 17 PT ที่มีเชื้อ PT ละ 1 สายพันธุ์เท่านั้น นอกจากนี้พบว่ายีน VEB-1 อยู่กระจายในหลายๆ PT โดยพบถึง 7 PT ด้วยกัน ได้แก่ PT3 PT4 PT5 PT11 PT12 PT23 และ PT27 และสามารถพบยีน AmpC กระจายในเกือบทุกๆ PT ถึง 28 PT จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์การดื้อเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาที่มีสาเหตุมาจากการที่เชื้อสร้างเอนไซม์ β -lactamase ภายในโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียงในกรุงเทพมหานคร เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อหลายๆ PT ไม่ได้มาจาก PT เดียว โดยมี PT ที่พบมากอยู่ 2 PT ได้แก่ PT1 ซึ่งเป็น PT ที่มียีน OXA-10 ร่วมกับ AmpC เป็นสมาชิกส่วนมากซึ่ง PT นี้จะก่อปัญหาในการรักษามากกว่าเนื่องจากมีอัตราการดื้อยาแบบ MDR-PA ที่สูงกว่า PT2 ที่พบรองลงมา

2. อภิปรายผล

ปัญหาการดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในหลายๆประเทศทั่วโลก ปัญหานี้นำไปสู่อัตราการเจ็บป่วย และอัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้หากยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมกับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* อาจทำให้เกิดการดื้อยาได้ สำหรับประเทศไทย ข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีแนวโน้มของความไวต่อยากลุ่ม β -lactam ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา CAZ (6) ซึ่งจะเห็นได้ในการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นดื้อต่อยา CAZ ค่อนข้างสูง จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ยิ่งต้องตระหนักถึงการติดตามการดื้อต่อยา CAZ ของเชื้อ *P. aeruginosa* เพราะยา CAZ นั้นเป็นยาในกลุ่ม third generation cephalosporins ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* (232)

ตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 118 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนใหญ่มาจากเสมหะร้อยละ 43.22 หนองร้อยละ 30.15 ปัสสาวะร้อยละ 23.73 และเลือดร้อยละ 2.54 ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยในประเทศอินเดียสองงานวิจัย โดยงานวิจัยแรก Mohanasoundaram KM. (233) พบว่าการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในช่วงปี ค.ศ. 2008-2010 ส่วนใหญ่มาจากหนอง ระบบทางเดินหายใจ และปัสสาวะเป็นหลัก โดยพบร้อยละ 30.00, 29.19 และ 16.22 ตามลำดับ ส่วนงานวิจัยที่สองของ Senthamarai S.และคณะ (234) ในปี ค.ศ. 2014 พบมากในสิ่งส่งตรวจที่มาจากหนอง ร้อยละ 47.11 รองลงมาคือ เสมหะและปัสสาวะเช่นเดียวกันโดยพบร้อยละ 36.53, 12.50 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการติดเชื้อ *P. aeruginosa* จะพบมากในสิ่งส่งตรวจที่มาจากหนอง ระบบทางเดินหายใจ และปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามการก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นสามารถก่อโรคได้หลายๆระบบดังเช่น งานวิจัยของประเทศทางตะวันออกกลาง Yetkin G.และคณะจากประเทศตุรกี (235) พบว่าการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ส่วนใหญ่มาจากปัสสาวะร้อยละ 35.00 ส่วนน้อยจากเลือด และเสมหะคิดเป็นร้อยละ 13.00 และ 8.00 ตามลำดับ ส่วนงานวิจัยในประเทศอียิปต์ (69) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ส่วนใหญ่มาจากหนองจากบาดแผลร้อยละ 36.06 รองลงมาคือเลือด ปัสสาวะ เสมหะ และจากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ สายสวน น้ำไขสันหลัง พบร้อยละ 23.77, 18.03, 9.01 และ 13.11 ตามลำดับ จากประเทศอิหร่าน (236) Akhi MT. และคณะ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มาจากระบบทางเดินหายใจส่วนบนและล่าง ร้อยละ 57.71 รองลงมาเป็นปัสสาวะ เลือด บาดแผลและจากน้ำไขสันหลังร้อยละ 30.06, 7.14, 3.57 และ 1.76 ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดโดยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่นำมาทดสอบทั้ง 118 สายพันธุ์ มีอัตราการดื้อยากลุ่ม fluoroquinolones

สูงสุดโดยมีอัตราการดื้อยา LVX และยา CFX ร้อยละ 49.15 (58/118) และ 48.30 (57/118) ตามลำดับ พบอัตราการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ต่ำกว่าคือยา AK และยา GM การดื้อยานี้ ร้อยละ 18.64 และ 25.42 ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Sutherland CA. และคณะจากประเทศสหรัฐอเมริกา (237) ที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่นำมา ทดสอบนั้นมีอัตราการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolones ค่อนข้างสูงอยู่ที่ประมาณร้อยละ 68.00 และ ดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ต่ำคือประมาณร้อยละ 5.00 ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะยาในกลุ่ม fluoroquinolones เป็นยาที่นิยมใช้รักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* (antipseudomonal antibiotic) โดยเป็นยาที่ใช้รับประทานในขนาดที่เหมาะสม (convenient oral dosing) นอกจากนี้ ยังมีความปลอดภัยสูง รักษาได้ผลดี จึงนิยมใช้กันมากขึ้นเรื่อยๆ จึงอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการดื้อยาใน อัตราที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (238) กลไกการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolones นี้มี 2 กลไกหลักที่สำคัญคือ 1.การเปลี่ยนแปลงโมเลกุล subunit ของ DNA gyrase (ยีน *gyrA*) และ topoisomerase IV (ยีน *parC*) 2.การกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ efflux pump ได้แก่ membrane fusion proteins และ outer membrane protein (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN) (239)

ในการศึกษารังนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์ β -lactamase คลาส A C และ D ซึ่ง สามารถทำลายยา β -lactam โดยเฉพาะยาในกลุ่ม cephalosporins ได้ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทำการทดสอบนี้พบว่าดื้อยา CAZ ซึ่งเป็นยา β -lactam ในกลุ่ม cephalosporins ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 44.91 (53/118 สายพันธุ์) โดยพบดื้อมากเป็นอันดับ สองรองจากยาในกลุ่ม fluoroquinolones ซึ่งให้ผลการวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Woodford N. และคณะจากสหราชอาณาจักร (70) Li Y. และคณะจากประเทศจีน (8) พบว่ามีอัตราการดื้อยา CAZ ของเชื้อ *P. aeruginosa* ร้อยละ 47.00 และ 51.60 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังให้ผล คล้ายกับงานวิจัยของ Kos VN. และคณะ (240) ที่ทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* 181 สายพันธุ์ที่มาจากประเทศต่างๆทั่วโลก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา จาก 6 ประเทศทางทวีปอเมริกาใต้ 7 ประเทศทางทวีปยุโรป และ 3 ประเทศจากทวีปเอเชียโดยพบว่ามีอัตราการดื้อยา CAZ ร้อยละ 55.00 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการดื้อยา CAZ แตกต่างจากการศึกษานี้โดยพบอัตราการดื้อยาสูงหรือต่ำกว่า จากการศึกษานี้ของ Sader HS. และคณะ (7) ที่ทำในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เก็บตัวอย่างจากศูนย์ การแพทย์ในประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 28 แห่งและจากทวีปยุโรปจำนวน 11 ประเทศ 25 ศูนย์ฯ และงานวิจัยของ Vahaboglu H. และคณะจากประเทศตุรกี (80) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อยา CAZ ต่ำกว่าในการศึกษารังนี้ คือร้อยละ 16.10-24.00 และ 28 ตามลำดับ แต่พบว่าการวิจัยของ Zafer MM. และคณะจากประเทศอิหร่าน (69) Mirsalehian A. และคณะจากประเทศ อิหร่าน (22) และ Mayank D. และคณะจากประเทศอินเดีย (241) มีอัตราการดื้อยา CAZ สูงกว่า

การศึกษานี้คือพบร้อยละ 60.60, 63.00 และ 100.00 ตามลำดับ จากผลข้างต้นจะเห็นว่าอุบัติการณ์การดื้อต่อยา CAZ นั้นมีความหลากหลายแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเป็นเพราะความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่ก่อให้เกิดการดื้อต่อยา CAZ ในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน หรืออาจมีการใช้ยา CAZ ในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* มากเกินความจำเป็น หรือใช้ยารักษาโดยวินิจฉัยจากการอาการแสดงของผู้ป่วย (empirical therapy) โดยไม่ได้ทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะก่อน จึงทำให้เกิดการดื้อยา CAZ มากขึ้น

เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับการดื้อยาหลายขนานของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยใช้เกณฑ์ว่าเชื้อเป็น MDR-PA เมื่อมีการดื้อยามากกว่าหรือเท่ากับ 3 กลุ่มยา ในการศึกษาครั้งนี้พบ MDR-PA ร้อยละ 43.22 (51/118 สายพันธุ์) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Li Y. และคณะจากประเทศจีน (8) และงานวิจัยที่ผ่านมาของ Fazeli H. และคณะจากประเทศอิหร่าน (242) ที่พบว่ามีเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น MDR-PA อยู่ประมาณร้อยละ 37.90 และ 45.00 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีเชื้อดื้อยาหลายขนานของเชื้อ *P. aeruginosa* แตกต่างจากการศึกษานี้โดยพบในอัตราที่สูงหรือต่ำกว่า ดังงานวิจัยในประเทศอิหร่าน โดย Vaez H. และคณะ (243) และ Mirsalehian A. และคณะ (22) มีอัตราการพบ MDR-PA สูงกว่างานวิจัยนี้คือพบร้อยละ 51.80 และ 87.05 ตามลำดับ ส่วนประเทศเอธิโอเปีย Godebo G. และคณะ (244) พบ MDR-PA อยู่เพียงร้อยละ 19.30 เท่านั้นซึ่งน้อยกว่าการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ทุกสายพันธุ์ไวต่อยา CL ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกับกับหลายประเทศ อาทิเช่น สหราชอาณาจักร (70) ตุรกี (245) กรีซ (246) และสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี (247) ดังนั้นยา CL ซึ่งยาเก่าที่เคยใช้รักษาได้ผลอาจเป็นทางเลือกในการใช้รักษาเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น MDR-PA ได้ แต่ยานี้มีผลข้างเคียงมาก เช่น ผลข้างเคียงต่อไต (nephrotoxicity) เป็นพิษต่อประสาท (neurotoxicity) (17) อย่างไรก็ตามเริ่มมีรายงานการดื้อยา CL บ้างแล้วในประเทศเดนมาร์ก โดย Johansen HK. และคณะ (248) พบว่าการดื้อยา CL ในผู้ป่วยโรค chronic lung infection จากเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งพบสองช่วงช่วงแรกในปี ค.ศ. 1995-1999 จำนวน 17 รายโดยที่ผู้ป่วยโรคนี้ได้รับยา CL ในการรักษาต่อเนื่องเป็นเวลาเฉลี่ย 10 ปี (ช่วงระหว่าง 5-15ปี) และพบการระบาดครั้งที่ 2 ในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งเป็นผู้ป่วยกลุ่มเดิม 17 รายและผู้ป่วยกลุ่มใหม่ 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 14 (40/280 ราย) ได้รับยา CL ในการรักษาต่อเนื่องเป็นเวลาเฉลี่ย 17 ปี (ช่วงระหว่าง 10-21ปี) จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าระบาดวิทยาของการดื้อต่อยา CAZ การดื้อยาหลายขนาน MDR-PA มีเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มมีอุบัติการณ์การดื้อต่อยา CL ให้พบเห็น ดังนั้นผู้วิจัยหวังว่าควรมีความระมัดระวังและ ตระหนักถึงการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *P. aeruginosa*

สำหรับการศึกษาจีโนมโดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อหาความชุกของยีน β -lactamase คลาส A C และ D พบว่าให้ผลบวก ร้อยละ 67.80 (80/118 สายพันธุ์) ได้แก่ ยีน VEB-1 AmpC และ OXA-10 ไม่สามารถตรวจพบยีน PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์และยีน SHV-1 ได้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากการแพร่กระจายของยีนแต่ละยีนในแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างกัน หรือขึ้นกับตัวเชื้อเอง ได้แก่ ยีน PER-1 ที่มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่ามีการแพร่กระจายในประเทศตุรกี กลุ่มประเทศตะวันออกกลาง ยุโรป และจีน (22, 25, 78-80, 152, 249) ส่วนยีน SHV TEM และ CTX-M นั้นโอกาสพบได้น้อยมากในเชื้อ *P. aeruginosa* (250) แต่มีรายงานการพบยีนดังกล่าวในเชื้อ *P. aeruginosa* บ้าง โดยพบยีน CTX-M-2 และ CTX-M-43 ที่แพร่กระจายในประเทศอิตาลี และบราซิล (88, 89) ยีน SHV-2a ที่มีรายงานการพบที่ประเทศฝรั่งเศส (96) และยีน TEM-4 และ TEM-24 ที่มีรายงานการค้นพบที่ประเทศฝรั่งเศส (82, 83) สำหรับในประเทศไทยนั้นยังไม่มีรายงานการพบยีน PER-1 CTX-M TEM-1 และอนุพันธ์และยีน SHV-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* แต่สามารถพบได้บ่อยในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ดังเช่นการศึกษาของ Chanawong A. และคณะ (84) ตรวจเชื้อ *Enterobacteriaceae* 48 สายพันธุ์ ในปี ค.ศ. 1998-1999 พบยีน SHV CTX-M-9 และ TEM-1 ร้อยละ 79.00, 52.00 และ 48.00 ตามลำดับ ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 ตรวจเชื้อ *Enterobacteriaceae* 52 สายพันธุ์พบยีน TEM-1 CTX-M-15 SHV CTX-M-14 และ CTX-M-9 ร้อยละ 79.00, 44.00, 36.00, 11.00 และ 10.00 ตามลำดับ ส่วน Luvsansharav UO. และคณะ (90) ตรวจหายีน CTX-M ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* พบว่าเป็นยีน CTX-M-9 group และ CTX-M-1 group ร้อยละ 60.60 และ 38.70 ตามลำดับ โดยเชื้อส่วนมากนั้นมาจาก *Escherichia coli* ร้อยละ 85.4 รองลงมาคือ *Klebsiella pneumoniae* ร้อยละ 4.7 แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบอนุพันธ์ของยีน SHV ในประเทศไทยโดย Chanawong A. และคณะ (251) พบยีน SHV-12 ในเชื้อ *P. aeruginosa* 1 สายพันธุ์จากเชื้อ *P. aeruginosa* 16 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 6.25

จากการหาความชุกของยีน β -lactamase คลาส A C และ D ในเชื้อ *P. aeruginosa* พบยีน VEB-1 AmpC และ OXA-10 โดยยีน AmpC (class C β -lactamase) ตรวจพบมากที่สุดคือร้อยละ 63.56 (75/118) เนื่องจากยีนนี้เป็นยีน intrinsic ของเชื้อ *P. aeruginosa* (252, 253) สามารถสร้างได้ตลอดเวลาในระดับต่างๆ ซึ่งการศึกษาเป็นไปในทางเดียวกับ Lin SP. และคณะจากประเทศไต้หวัน (24) ที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ตรวจพบยีน AmpC เป็นส่วนใหญ่ สำหรับยีน OXA-10 (class D β -lactamase) ในการศึกษาครั้งนี้พบมากรองลงมาจากยีน AmpC คือร้อยละ 15.25 (18/118) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานจากประเทศเกาหลีใต้และตุรกีที่พบยีน OXA-10 ร้อยละ 13.10 และ 17.33 ตามลำดับ (227, 254)

แต่งงานวิจัยจากประเทศเกาหลีได้อีกกลุ่มหนึ่ง (255) และบางประเทศในกลุ่มประเทศ ตะวันออกกลาง เช่น ประเทศอิหร่าน (22) อียิปต์ (69) จะพบยีน OXA-10 สูงกว่าการศึกษาครั้งนี้คือร้อยละ 28.29, 29.41 และ 41.70 ตามลำดับ ส่วนยีน class A β -lactamase ในการศึกษาที่พบยีนเดียว คือ VEB-1 ซึ่งพบน้อยเพียงร้อยละ 7.62 (9/118) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยจากหลายๆประเทศ ได้แก่ ประเทศจีนโดย Chen Z. และคณะ (72) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มียีน VEB-1 อยู่ร้อยละ 11.4 บางประเทศในแถบตะวันออกกลาง ได้แก่ ประเทศซาอุดีอาระเบีย (68) อียิปต์ (69) และอิหร่าน (22) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ตรวจพบยีน VEB-1 ร้อยละ 10.00, 10.40 และ 12.35 ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามการศึกษาจากสหราชอาณาจักร และในประเทศไทยพบอัตราการแพร่กระจายของยีน VEB-1 ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่สูงกว่าการศึกษารั้งนี้ (70, 71, 251) จากผลข้างต้นจะเห็นว่าอุบัติการณ์การพบยีน OXA-10 และ VEB-1 นั้นมีความหลากหลายอัตราการตรวจพบได้ไม่เท่ากัน แม้จะอยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันอาจเป็นเพราะพื้นที่ที่ทำการศึกษานั้นมีการระบาดหรือการกระจายตัวของยีนต่างกัน นอกจากนี้ยีนดื้อยาทั้งสองยีนนี้เป็นยีนชนิดได้รับมา (acquired resistant genes) ซึ่งยีนเหล่านี้จะรับมาจากเชื้ออื่นๆ ทางพลาสมิดหรือหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ชนิดอื่น ได้แก่เชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* (65) หรือรับมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* ตัวอื่นๆ (157) จึงทำให้อุบัติการณ์การพบยีนดังกล่าวแตกต่างกันไป

จากตารางที่ 4.3 พบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* 9 สายพันธุ์ที่มียีน VEB-1 นั้นทุกตัวต้องต่อ ยากลุ่ม β -lactam แต่ยังคงพบที่มีความไวต่อยากลุ่ม β -lactam/ β -lactamase inhibitor อยู่โดยพบ ร้อยละ 100 (9/9) และ 55.56 (5/9) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบรูปแบบของความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA ทุกตัว (แบบที่ 1, 2, 3, 4 และ 9) ในขณะที่เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน OXA-10 จำนวน 18 สายพันธุ์มีอัตราการดื้อยา β -lactam และ β -lactam/ β -lactamase inhibitor สูง พบร้อยละ 94.44 (17/18) และ 77.78 (14/18) ตามลำดับ โดยรูปแบบของความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA เกือบทุกตัว (แบบที่ 1, 2, 4 และ 8) ยกเว้นหนึ่งสายพันธุ์ที่ไวต่อยา (แบบ 18) เนื่องจากยีน VEB-1 อยู่ใน class A β -lactamase สามารถทำลายยาในกลุ่ม β -lactam ได้แต่ถูกยับยั้งฤทธิ์ด้วย β -lactamase inhibitor (63) ส่วนยีน OXA-10 อยู่ใน class D β -lactamase สามารถทำลายยา กลุ่ม β -lactam ได้เช่นเดียวกับ class A β -lactamase แต่มักไม่ถูกต้านทานฤทธิ์ด้วยสาร β -lactamase inhibitor (15) จึงทำให้มีอัตราการดื้อยาในยากลุ่ม β -lactam และ β -lactamase inhibitor ในระดับสูงได้ ส่วนการพบรูปแบบของความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA สูงนั้น ให้ผล สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Vatcheva-Dobrevska R. และคณะจากประเทศบัลแกเรีย (256) และ Murugan N. จากประเทศอินเดีย (257) ที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน VEB-1 และ OXA-10 มี รูปแบบของความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA หรืองานวิจัยของ Yan JJ. และคณะจากประเทศไต้หวัน

(258) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน OXA-10 เป็น MDR-PA ทั้งหมด สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน AmpC จำนวน 75 สายพันธุ์มีอัตราการติดต่อยา β -lactam ในระดับปานกลางประมาณร้อยละ 53.33 (40/75) และมีรูปแบบของความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA เพียงร้อยละ 53.33 (40/75) (แบบที่ 1, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8) แบบ Non MDR-PA ร้อยละ 46.67 (35/75) (แบบที่ 11, 13, 14, 17 และ 18) เนื่องจากยีน AmpC จะทำให้ความไวต่อยาในกลุ่ม cephalosporins ที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ยา CAZ ลดลง (reduced susceptible) และเอนไซม์ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการทำลายยา CAZ ต่ำ จึงทำได้แค่ลดความไวต่อยา CAZ เท่านั้น (103) ส่วนการพบ MDR-PA น้อย เนื่องจากเอนไซม์ cephalosporinase หรือ AmpC ในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยปกติสามารถสร้างได้ในปริมาณต่ำๆ แต่สามารถเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ได้จากหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการ derepression ที่เกิดจากการที่เชื้อสัมผัสกับยา β -lactam (120) กล่าวคือ AmpR หลังจากถูกกระตุ้นด้วยยากกลุ่ม β -lactam แล้ว จะไปกระตุ้นยีน AmpG และ AmpP ให้เกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC ได้มากขึ้น (131, 132) หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน AmpD (131)

นอกจากนี้ยังพบยีน OXA-10 ร่วมกับยีน VEB-1 ซึ่งผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Murugan N. และคณะจากประเทศอินเดีย (257) ที่ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ VRFPA09 และพบ ยีน VEB-1 ร่วมกับ OXA-10 ในจีโนมของเชื้อ ซึ่งผลดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการที่พบ ยีน OXA-10 และยีน VEB-1 อยู่บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile element) เดียวกัน เช่น class 1 integron (16, 259, 260) ซึ่งผลนี้สนับสนุนจากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Piyakul C. และคณะ (261) ที่พบว่ามี class 1 integron ในเชื้อ *P. aeruginosa* 75 สายพันธุ์ ซึ่งเชื้อบางสายพันธุ์เป็นเชื้อส่วนหนึ่งในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

จากผลการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของเชื้อจากการทำ PFGE ของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 80 สายพันธุ์ ที่ให้ผลบวกด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอเรสกับยีนของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A C และ D (ยีน VEB-1 AmpC และ OXA-10) โดยใช้เอนไซม์ SpeI-HF ในการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อ *P. aeruginosa* ให้ผลการจำแนกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดี โดยวิธี PFGE นั้นเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการศึกษาระดับวิทยาระดับโมเลกุล (molecular genotyping) ของเชื้อ *P. aeruginosa* ภายในโรงพยาบาล เนื่องจากความสามารถในการแยกแยะที่สูง (high discriminatory capacity) สามารถทำซ้ำได้ดี (good reproducibility) และแปลผลได้ง่าย (ease of interpretation) (230) ในการศึกษาสามารถจำแนกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *P. aeruginosa* ภายในโรงพยาบาลขนาด 1,200 เตียงในกรุงเทพมหานคร ได้ถึง 29 PT ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทำการทดสอบนั้นมาจากบรรพบุรุษคนละบรรพบุรุษกันหรือมีแหล่งต้นกำเนิดเริ่มต้นจากเชื้อคนละโคลนกัน (217)

โดยพบ PT หลักอยู่ 2 PT คือ PT1 (19 สายพันธุ์) และ PT2 (17 สายพันธุ์) นอกจากนี้ยังพบ PT เล็กๆ ที่มีสมาชิก 1-4 สายพันธุ์ อยู่ร้อยละ 55.00 (44/80 สายพันธุ์) โดยใน PT1 พบว่าเชื้อมีรูปแบบ ความไวต่อยาเป็นแบบ MDR-PA (แบบที่ 1, 3 และ 8) ยกเว้นหนึ่งสายพันธุ์ที่เป็น non MDR-PA (แบบที่ 18) ซึ่งให้ผลคล้ายกับงานวิจัยของ Muller-Premru M. และคณะจากประเทศสโลวีเนีย (262) ได้ทำการศึกษาด้วยวิธี PFGE ในเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าสามารถแยกความหลากหลายทาง สายพันธุ์ได้ 9 PT โดยมี PT ใหญ่อยู่ 2 PT และ PT หลักเป็นเชื้อที่เป็น multi-resistant และพบ PT ที่ไม่ใช่ PT หลักนั้นพบได้ร้อยละ 43.75 (7/16) แต่งานวิจัยของ Selim S. และคณะจากประเทศ อียิปต์ (263) ให้ผลที่แตกต่างจากงานวิจัยนี้ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 19 สายพันธุ์ นั้นสามารถแยก PT ได้ทั้งหมด 10 PT มี PT หลัก 1 PT แต่เชื้อเป็น non MDR-PA และ PT ย่อยๆมากถึงร้อยละ 73.68 (14/19 สายพันธุ์)

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีนของเอนไซม์ β -lactamase กับรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. aeruginosa* จากการทำ PFGE พบว่า PT1 ซึ่งเป็น PT หลักพบยีน OXA-10 เป็น ส่วนใหญ่ ซึ่งผลเป็นไปในทางเดียวกับงานวิจัยในประเทศฝรั่งเศสสองงานวิจัย โดยงานวิจัยแรกเป็น ของ Vettoretti L. และคณะ (264) พบว่า PT หลักประกอบด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน OXA-10 และอีกงานวิจัยที่สนับสนุนคืองานวิจัยของ Cholley P. และคณะ (265) พบว่า PT หลักนั้น ประกอบด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีนที่เป็นอนุพันธ์ของ OXA-10 ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Qing Y. และคณะจากประเทศจีน (25) ที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีนที่เป็นอนุพันธ์ของยีน OXA-10 นั้นกระจายอยู่ในหลายๆ PT สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน VEB-1 ในการศึกษา นี้พบว่าจะอยู่กระจายอยู่ในหลายๆ PT ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในประเทศไทยของ Girlich D. และคณะ (16) ที่ศึกษาในเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 31 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับยีน VEB-1 พบว่าเชื่อนั้น กระจายอยู่ใน 3 PT และ 4 unique type ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Woodford N. และคณะจาก สหราชอาณาจักร (70) และ Chanawong A. และคณะจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย (251) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน VEB-1 นั้นอยู่รวมกันเป็น PT หลัก นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน AmpC นั้นมีความหลากหลาย ทางสายพันธุ์หรือมีจำนวน PT มากถึง 28 PT ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Rodríguez-Martínez JM และคณะ (266) ที่พบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน AmpC 25 สายพันธุ์นั้นมีความหลากหลายของ PT ได้มากถึง 15 PT ในการศึกษาครั้งนี้มีเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 2 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 2.50 ที่ให้ผลการทดลอง PFGE เป็น smear band หรือ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือไม่สามารถจำแนกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื่อดังกล่าวด้วยวิธี PFGE ได้ (untypable) ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Grundmann H. และคณะ (267) และ Girlich D. และคณะ

(16) ที่ว่าเชื้อ *P. aeruginosa* บางสายพันธุ์นั้นไม่สามารถนำมาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ด้วยวิธี PFGE ได้แม้ว่าจะพยายามนำมาทำซ้ำก็ตาม เพราะในเชื้อตัวอย่างบางตัวอาจมี activity ของเอนไซม์ nuclease ภายในเซลล์มากกว่าปกติทำให้โครโมโซมดีเอ็นเอถูกทำลายก่อนที่จะถึงขั้นตอนที่โครโมโซมดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (268) จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี PFGE ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบเอนไซม์ oxacillinases (OXA-10) cephalosporinase (AmpC) และ class A β -lactamase (VEB-1) พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก แต่อย่างไรก็ตาม PT ที่พบบ่อยเป็นจำนวนมากคือ PT ที่มียีน OXA-10 เป็นหลักและเชื้อ *P. aeruginosa* เป็น MDR-PA เกือบทั้งหมด งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าต้องเฝ้าระวังและตระหนักถึงความสำคัญในการพบเอนไซม์คลาส D β -lactamase (oxacillinases; OXA-10) ในเชื้อ *P. aeruginosa*

จากผลงานวิจัยนี้ผู้วิจัยหวังว่าผู้ที่เกี่ยวข้องต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มวิชาชีพ แพทย์ พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ หรือวิชาชีพอื่นๆที่มีความใกล้ชิดหรือเกี่ยวข้องกับผู้ป่วยและตัวเชื้อทั้งทางตรงและทางอ้อม จะได้ตระหนักถึงความสำคัญของการติดตามเฝ้าระวังและการควบคุมโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *P. aeruginosa* ภายในโรงพยาบาล การเฝ้าระวังชีวิตหรือยาด้านจุลชีพที่เหมาะสมกับตัวเชื้อหรือโรคติดเชื้อเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

3. ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* จากโรงพยาบาลหลายๆแห่งทั่วประเทศ หรือเก็บเชื้อตัวอย่างในช่วงเวลาที่นานกว่านี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มากขึ้นและครอบคลุมขึ้น

2. ควรศึกษาความชุกของเอนไซม์ β -lactamase ในคลาส A และ D เพิ่มขึ้น เพื่อศึกษาการสว่ายีนในคลาสนั้นให้มาก ครอบคลุม และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ได้แก่ ยีน GES BEL OXA-1 และอนุพันธ์ และยีน OXA-2 และอนุพันธ์ เป็นต้น

3. เพื่อให้ทราบกลไกการดื้อยาทั้งหมดของเชื้อ *P. aeruginosa* ควรศึกษาการดื้อยาอื่นๆเพิ่มเติม ได้แก่ การขับยาออกเซลล์โดย efflux pump หรือการลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์

4. เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ในด้านระบาดมากขึ้นควรเก็บตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ที่อยู่ภายในสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล หรือนำข้อมูลจากเวชระเบียนมาใช้ (ต้องได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการจริยธรรมก่อน)

รายการอ้างอิง

1. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2013;1:63-9.
2. สำนักงานนิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในประเทศไทย. [cited 24 March 2013]; Available from: <http://narst.dmsc.moph.go.th/news001.html>.
3. Ben-Mahrez K, Rejiba S, Belhadj C, Belhadj O. β -lactamase-mediated resistance to extended spectrum cephalosporins among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*. 1999;150(6):403-6.
4. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12:883-93.
5. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Research in Microbiology*. 2004;155:409-21.
6. ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (NARST). Antibiograms. [cited 12 December 2013]; Available from: <http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms.html>.
7. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(4):328-34.
8. Li Y, Zhang X, Wang C, Hu Y, Niu X, Pei D, et al. Characterization by phenotypic and genotypic methods of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *Mol Med Rep*. 2015;11(1):494-8.
9. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634-40.

10. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006;9:142-56.
11. Elander RP. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61:385-92.
12. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289:321-31.
13. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(1):11-8.
14. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):24-38.
15. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
16. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):603-11.
17. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *New England Journal of Medicine*. 2010;362:1804-13.
18. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3110-3.
19. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48 Suppl 1:59-64.
20. Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol*. 1987;6:439-45.
21. Jabalameli F, Mirsalehian A, Sotoudeh N, Jabalameli L, Aligholi M, Khoramian B, et al. Multiple-locus variable number of tandem repeats (VNTR) fingerprinting (MLVF) and antibacterial resistance profiles of extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* among burnt patients in Tehran. *Burns*. 2011;37:1202-7.

22. Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*. 2010;36(1):70-4.
23. Tawfik AF, Shibl AM, Aljohi MA, Altammami MA, Al-Agamy MH. Distribution of Ambler class A, B and D β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Burns*. 2012;38:855-60.
24. Lin S-P, Liu M-F, Lin C-F, Shi Z-Y. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum β -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012;45:200-7.
25. Qing Y, Cao KY, Fang ZL, Huang YM, Zhang XF, Tian GB, et al. Outbreak of PER-1 and diversity of beta-lactamases among ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 3):386-92.
26. Todar K. *Pseudomonas aeruginosa*. [cited 15 January 2014]; Available from: <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>.
27. ภัทรชัย กীরติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. หจก. วี.เจ. พรินติ้ง: หจก. บางรัก ดอทคอม; 2552.
28. Klaus-Dieter Lessnau M, FCCP. *Pseudomonas aeruginosa* Infections [cited 16 August 2013]; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>.
29. CDC. Healthcare-associated Infections (HAIs). [cited 4 May 2014]; Available from: <http://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>.
30. Hare R. New light on the history of penicillin. *Med Hist*. 1982;26(1):1-24.
31. Gilchrist TL. *Heterocyclic Chemistry*. Harlow: Longman Scientific; 1987.
32. ภัทรชัย กীরติสิน. Beta-lactamase ในแบคทีเรียแกรมลบ จากความรู้พื้นฐานสู่เวชปฏิบัติ. หจก. วี.เจ. พรินติ้ง: บริษัท โกลบอล ไอซีที (ประเทศไทย) จำกัด; 2555.
33. Chambers HF. Penicillins. In: Mendell GL BJ, Dolin R, editor. *Principle and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2000. p. 261-74.

34. Trevor J. Franklin, George Alan Snow. Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action: Springer US; 2005.
35. Karchmer AW. Cephalosporins. In: Mendell GL BJ, Dolin R, editor. Principle and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2000. p. 261-74.
36. Garau J, Wilson W, Wood M, Carlet J. Fourth-generation cephalosporins: a review of in vitro activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical utility. Clinical Microbiology and Infection. 1997;3, Supplement 1:S87-S101.
37. Wallick H, Hendlin D. Cefoxitin, a Semisynthetic Cephamycin Antibiotic: Susceptibility Studies. Antimicrob Agents Chemother. 1974;5(1):25-32.
38. Bradley JS, Garau J, Lode H, Rolston KV, Wilson SE, Quinn JP. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. Int J Antimicrob Agents. 1999;11(2):93-100.
39. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):440-58.
40. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11):4943-60.
41. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. J Antibiot. 1979;32(1):1-12.
42. Hikida M, Kawashima K, Yoshida M, Mitsuhashi S. Inactivation of new carbapenem antibiotics by dehydropeptidase-I from porcine and human renal cortex. J Antimicrob Chemother. 1992;30(2):129-34.
43. Norrby SR, Alestig K, Bjornegard B, Burman LA, Ferber F, Huber JL, et al. Urinary recovery of *N*-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of *N*-formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 1983;23(2):300-7.
44. Barza M. Imipenem: first of a new class of beta-lactam antibiotics. Ann Intern Med. 1985;103(4):552-60.
45. Brogden RN, Heel RC. Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs. 1986;31(2):96-130.

46. Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C, et al. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot.* 1976;29(6):668-9.
47. Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Rolinson GN. Olivanic acids, a family of beta-lactam antibiotics with beta-lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species. I. Detection, properties and fermentation studies. *J Antibiot.* 1979;32(4):287-94.
48. Brown AG. Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor--a case study in drug discovery and development. *Drug Des Deliv.* 1986;1(1):1-21.
49. Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ, Knowles DJ. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(4):767-72.
50. Gin A, Dilay L, Karlowsky JA, Walkty A, Rubinstein E, Zhanel GG. Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(3):365-83.
51. Williams JD. beta-Lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. *Clin Infect Dis.* 1997;24(3):494-7.
52. Calderwood SB. Beta-lactam antibiotics: Mechanisms of action and resistance and adverse effects. 2013 [cited 29 July 2013]; Available from: <http://www.uptodate.com/contents/beta-lactam-antibiotics-mechanisms-of-action-and-resistance-and-adverse-effects>.
53. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(4):388-416.
54. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):234-58.
55. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(1):25-31.

56. Madiraju MV, Brunner DP, Wilkinson BJ. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(11):1727-33.
57. Faruki H, Sparling PF. Genetics of resistance in a non-beta-lactamase-producing gonococcus with relatively high-level penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30(6):856-60.
58. Spratt BG. Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature.* 1988;332(6160):173-6.
59. Livermore DM. Permeation of beta-lactam antibiotics into *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and other gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):691-8.
60. Fukuoka T, Ohya S, Narita T, Katsuta M, Iijima M, Masuda N, et al. Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(2):322-7.
61. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994;264(5157):382-8.
62. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(9):1948-53.
63. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:160-201.
64. Bret L, Chaibi EB, Chanal-Clariss C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Inhibitor-resistant TEM (IRT) beta-lactamases with different substitutions at position 244. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2547-9.
65. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, 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.* 1999;43:573-81.
66. Bush K, Jacoby GA. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes.

Lahey Clinic; [cited 20 March 2016]; Available from:

<http://www.lahey.org/studies/>.

67. Zong Z, Partridge SR, Iredell JR. A bla_{VEB}-1 variant, bla_{VEB}-6, associated with repeated elements in a complex genetic structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:1693-7.
68. Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF, Elkhizzi NA, Livermore DM. Extended-spectrum and metallo-beta-lactamases among ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Riyadh, Saudi Arabia. *J Chemotherapy*. 2012;24(2):97-100.
69. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014(10):101635.
70. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas Mdel M, Faris C, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1265-8.
71. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorova A, Marteva-Proevska Y, Mitov I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 7):956-63.
72. Chen Z, Niu H, Chen G, Li M, Zhou Y. Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a Chinese teaching hospital. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):19400-5.
73. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:839-52.
74. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:104-14.

75. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2265-9.
76. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2523-9.
77. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1865-70.
78. Farshadzadeh Z, Khosravi AD, Alavi SM, Parhizgari N, Hoveizavi H. Spread of extended-spectrum beta-lactamase genes of blaOXA-10, blaPER-1 and blaCTX-M in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns.* 2014;40(8):1575-80.
79. Empel J, Filczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2829-34.
80. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2265-9.
81. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature.* 1965;208:239-41.
82. Poirel L, Ronco E, Naas T, Nordmann P. Extended-spectrum beta-lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 1999;5(10):651-2.

83. Dubois V, Arpin C, Noury P, Quentin C. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3624-6.
84. Chanawong A, Lulitanond A, Kaewkes W, Lulitanond V, Srigulbutr S, Homchampa P. CTX-M extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a Thai university hospital. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007;38(3):493-500.
85. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:1243-6.
86. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18:294-8.
87. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1-14.
88. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rubio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis.* 2012;12:176.
89. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(5):975-8.
90. Luvsansharav UO, Hirai I, Nakata A, Imura K, Yamauchi K, Niki M, et al. Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in rural Thai communities. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1769-74.
91. Pitton JS. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Ergeb Physiol.* 1972;65:15-93.
92. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44(3):309-18.

93. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(10):2856-61.
94. Barthelemy M, Peduzzi J, Ben Yaghlane H, Labia R. Single amino acid substitution between SHV-1 beta-lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme. *FEBS Lett*. 1988;231(1):217-20.
95. Kalai Blagui S, Achour W, Bejaoui M, Abdeladhim A, Ben Hassen A. Detection of SHV-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains by genetic methods. *Pathol Biol*. 2009;57(3):5.
96. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(5):1281-4.
97. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:306-25.
98. Eriksson-Grennberg KG, Boman HG, Jansson JAT, Thorén S. Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins I. Genetic Study of Some Ampicillin-Resistant Mutants. *Journal of Bacteriology*. 1965;90(1):54-62.
99. Eriksson-Grennberg KG. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. II. An improved mapping of the ampA gene. *Genet Res*. 1968;12(2):147-56.
100. Linstrom EB, Boman HG, Steele BB. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. VI. Purification and characterization of the chromosomally mediated penicillinase present in ampA-containing strains. *J Bacteriol*. 1970;101(1):218-31.
101. Nordstrom K, Burman LG, Grennberg KG. AmpB a mutation which affects the cell envelope and ampicillin resistance in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*. 1969;57(3):xxx-xxxi.
102. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:161-82, Table of Contents.
103. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):1766-71.

104. Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1019-25.
105. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):1-11.
106. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153-62.
107. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection.* 1989;17(5):316-21.
108. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(1):221-4.
109. Mata C, Miro E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Prevalence of acquired AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(5):472-6.
110. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(11):2200-9.
111. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N. Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum beta-lactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(5):984-90.
112. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Mentis AF, Tsakris A. Identification of a novel plasmid-mediated beta-lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31(5):645-54.

113. Gaillot O, Clement C, Simonet M, Philippon A. Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(1):85-7.
114. Gonzalez Leiza M, Perez-Diaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martinez-Beltran J, Bush K, et al. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(9):2150-7.
115. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):563-9.
116. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(8):1924-31.
117. Payne DJ, Woodford N, Amyes SG. Characterization of the plasmid mediated beta-lactamase BIL-1. *J Antimicrob Chemother.* 1992;30(2):119-27.
118. Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, et al. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1151-8.
119. Jaurin B, Grundstrom T, Edlund T, Normark S. The E. coli beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature.* 1981;290(5803):221-5.
120. Hanson ND, Sanders CC. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm Des.* 1999;5(11):881-94.
121. Jacobs C, Frere JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell.* 1997;88(6):823-32.
122. Honore N, Nicolas MH, Cole ST. Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. *Mol Microbiol.* 1989;3(8):1121-30.

123. Lindquist S, Weston-Hafer K, Schmidt H, Pul C, Korfmann G, Erickson J, et al. AmpG, a signal transducer in chromosomal beta-lactamase induction. *Mol Microbiol.* 1993;9(4):703-15.
124. Schmidtke AJ, Hanson ND. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):2030-7.
125. Kaneko K, Okamoto R, Nakano R, Kawakami S, Inoue M. Gene mutations responsible for overexpression of AmpC beta-lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2955-8.
126. Kuga A, Okamoto R, Inoue M. ampR gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):561-7.
127. Honore N, Nicolas MH, Cole ST. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *Embo J.* 1986;5(13):3709-14.
128. Bergstrom S, Olsson O, Normark S. Common evolutionary origin of chromosomal beta-lactamase genes in enterobacteria. *J Bacteriol.* 1982;150(2):528-34.
129. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):428-32.
130. Mahlen SD, Morrow SS, Abdalhamid B, Hanson ND. Analyses of ampC gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(4):791-802.
131. Juan C, Moya B, Perez JL, Oliver A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1780-7.
132. Kong KF, Aguila A, Schneper L, Mathee K. *Pseudomonas aeruginosa* beta-lactamase induction requires two permeases, AmpG and AmpP. *BMC Microbiol.* 2010;10(328):1471-2180.

133. Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. *Biochem J*. 1983;209(1):229-33.
134. Gupta G, Tak V, Mathur P. Detection of AmpC beta Lactamases in Gram-negative Bacteria. *J Lab Physicians*. 2014;6(1):1-6.
135. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(2):128-31.
136. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.
137. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2043-8.
138. Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(1):268-73.
139. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(3):373-83.
140. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1615-20.
141. Dubois V, Arpin C, Quentin C, Texier-Maugein J, Poirel L, Nordmann P. Decreased susceptibility to cefepime in a clinical strain of *Escherichia coli* related to plasmid- and integron-encoded OXA-30 beta-lactamase: *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jul;47(7):2380-1.
142. Hanson ND, Moland ES, Hong SG, Propst K, Novak DJ, Cavalieri SJ. Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 beta-lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U.S. community. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3814-6.

143. Siu LK, Lo JY, Yuen KY, Chau PY, Ng MH, Ho PL. beta-lactamases in *Shigella flexneri* isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like beta-lactamase, OXA-30. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(8):2034-8.
144. Dubois V, Parizano MP, Arpin C, Coulange L, Bezian MC, Quentin C. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1333-40.
145. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(2):429-34.
146. Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thomson KS. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(6):1011-4.
147. Costa D, Poeta P, Saenz Y, Coelho AC, Matos M, Vinue L, et al. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Vet Microbiol.* 2008;127(1-2):97-105.
148. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):195-200.
149. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
150. Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(21):7378-82.
151. Kratz J, Schmidt F, Wiedemann B. Transposition of a gene encoding OXA-2 beta-lactamase. *J Gen Microbiol.* 1983;129(9):2951-7.
152. Libisch B, Poirel L, Lepsanovic Z, Mirovic V, Balogh B, Paszti J, et al. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex

- CC11 from Hungary and Serbia. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;54(3):330-8.
153. Power P, Galleni M, Di Conza J, Ayala JA, Gutkind G. Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. J Antimicrob Chemother. 2005;55(4):461-5.
154. Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Schelotto F, Radice M, Ayala J, et al. Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay. Rev Argent Microbiol. 2006;38(2):84-8.
155. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):2001-4.
156. Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA. Sequence of PSE-2 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32(1):134-6.
157. Aubert D, Poirel L, Ali AB, Goldstein FW, Nordmann P. OXA-35 is an OXA-10-related beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2001;48(5):717-21.
158. Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques Ede A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. Microb Drug Resist. 2006;12(2):103-8.
159. Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(6):1362-6.
160. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(8):1881-4.
161. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(12):3117-22.

162. Medeiros AA, Cohenford M, Jacoby GA. Five novel plasmid-determined beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27(5):715-9.
163. Scoulica E, Aransay A, Tselentis Y. Molecular characterization of the OXA-7 beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1379-82.
164. Tolmasky ME, Crosa JH. Genetic organization of antibiotic resistance genes (*aac(6')*-Ib, *aadA*, and *oxa9*) in the multiresistance transposon Tn1331. *Plasmid.* 1993;29(1):31-40.
165. Bojorquez D, Belei M, Delira SF, Sholly S, Mead J, Tolmasky ME. Characterization of OXA-9, a beta-lactamase encoded by the multiresistance transposon Tn1331. *Cell Mol Biol.* 1998;44(3):483-91.
166. Poirel L, Cabanne L, Collet L, Nordmann P. Class II transposon-borne structure harboring metallo-beta-lactamase gene *blaVIM-2* in *Pseudomonas putida*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2889-91.
167. Plante I, Centron D, Roy PH. Direct sequencing and PCR mapping of integrons reveals multiple class 1 integrons in the multiresistant strain *Enterobacter cloacae* SCH88040794. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;221(1):59-62.
168. Ploy MC, Courvalin P, Lambert T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(10):2557-63.
169. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(3):561-5.
170. Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(2):120-9.
171. Naas T, Sougakoff W, Casetta A, Nordmann P. Molecular characterization of OXA-20, a novel class D beta-lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(8):2074-83.
172. Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from

- Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(10):2188-95.
173. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(10):2684-8.
174. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. Clin Microbiol Infect. 2007;13(5):481-9.
175. Navia MM, Ruiz J, Vila J. Characterization of an integron carrying a new class D beta-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. Microb Drug Resist. 2002;8(4):261-5.
176. Giuliani F, Docquier JD, Riccio ML, Pagani L, Rossolini GM. OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a blaVIM-1-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):1973-80.
177. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(4):785-90.
178. Poirel L, Gerome P, De Champs C, Stephanazzi J, Naas T, Nordmann P. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(2):566-9.
179. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(8):1637-44.
180. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(2):447-53.

181. Mugnier P, Casin I, Bouthors AT, Collatz E. Novel OXA-10-derived extended-spectrum beta-lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(12):3113-6.
182. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(9):2859-63.
183. Mulvey MR, Boyd DA, Baker L, Mykytczuk O, Reis EM, Asensi MD, et al. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase (blaOXA-53) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [aac(6')-I30]. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(2):354-9.
184. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(6):426-39.
185. Soll DR, Pujol C, Lockhart SR. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. *Manual of Clinical Microbiology* 2007. p. 129-51.
186. Goering RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: Past, present and future. *Reviews in Medical Microbiology.* 2000;11(3):145-52.
187. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc.* 2007;2(3):677-84.
188. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):512-30.
189. Struelens MJ, De Ryck R, Deplano A. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data* 2001. p. 159-76.

190. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 1976;127(3):1529-37.
191. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 1984;37(1):67-75.
192. Schwartz DC, Koval M. Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. *Nature.* 1989;338(6215):520-2.
193. Carle GF, Olson MV. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(14):5647-64.
194. Gardiner K, Laas W, Patterson D. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Somat Cell Mol Genet.* 1986;12(2):185-95.
195. Carle GF, Frank M, Olson MV. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science.* 1986;232(4746):65-8.
196. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science.* 1986;234(4783):1582-5.
197. Birren B, Lai E. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide*: Elsevier Science; 2012.
198. C. Turmel, E. Brassard, R. Forsyth, K. Hood, G.W. Slater, J. Noolandi. High-resolution zero integrated field electrophoresis of DNA. In: E. Lai, B.W. Birren, editors. *Electrophoresis of Large DNA Molecules: Theory and Applications*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1991. p. 101-32.
199. Goering RV, Duensing TD. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of *Staphylococci*. *J Clin Microbiol.* 1990;28(3):426-9.
200. Goering RV, Winters MA. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1992;30(3):577-80.

201. Cookson BD, Aparicio P, Deplano A, Struelens M, Goering R, Marples R. Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 1996;44(3):179-84.
202. van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol*. 1998;36(6):1653-9.
203. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*. 2000;6(3):189-98.
204. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1574-85.
205. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):382-9.
206. Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, Lukinmaa S, Kam KM, Rolando S, et al. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3(1):36-50.
207. Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*. 2001;65(1-2):55-62.

208. Gerner-Smidt P, Scheutz F. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3(1):74-80.
209. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1889-94.
210. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3(1):59-67.
211. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007;3:1-46.
212. McClelland M, Jones R, Patel Y, Nelson M. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(15):5985-6005.
213. Fanoy E, Helmhout LC, van der Vaart WL, Weijdema K, van Santen-Verheuevel MG, Thijsen SF, et al. An outbreak of non-typeable MRSA within a residential care facility. *Euro Surveill.* 2009;14(1):19080.
214. Bosch T, de Neeling AJ, Schouls LM, van der Zwaluw KW, Kluytmans JA, Grundmann H, et al. PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. *BMC Microbiol.* 2010;10(40):1471-2180.
215. Argudin MA, Rodicio MR, Guerra B. The emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 clone can easily be typed using the Cfr9I SmaI-neoschizomer. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(1):127-30.
216. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution.* 2010;10(7):866-75.
217. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field

- gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
218. Vauterin L, Vauterin P. Integrated Databasing and Analysis. In: Stackebrandt E, editor. *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 141-217.
219. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-6.
220. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Informational Supplement M100-S19*. Wayne, PA: Clinical Lab Standards Institute; 2009.
221. Barry AL, Jones RN. Criteria for disk susceptibility tests and quality control guidelines for the cefoperazone-sulbactam combination. *J Clin Microbiol.* 1988;26(1):13-7.
222. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods.* 2000;42(2):139-47.
223. Innis MA, et al. *PCR Protocols and Applications: A Laboratory Manual*. Academic: New York; 1989.
224. Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;176(2):411-9.
225. Danel F, Hall LM, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35(2):281-94.
226. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2269-75.
227. Lee S, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, et al. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):122-7.

228. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JW, Cho DT. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1446-9.
229. Naas T, Benaoudia F, Massuard S, Nordmann P. Integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(5):703-11.
230. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):866-75.
231. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
232. Richards DM, Brogden RN. Ceftazidime. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs.* 1985;29(2):105-61.
233. Mohanasoundaram KM. The Antimicrobial Resistance Pattern in the Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Care Hospital; 2008–2010 (A 3 Year Study). *J Clin Diagn Res.* 2011;5(3):491-4.
234. S S, Reddy AS, C A, V S, Ms K, Sk A, et al. Resistance Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Care Hospital of Kanchipuram, Tamilnadu, India. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(5):15.
235. Yetkin G, Otlu B, Cicek A, Kuzucu C, Durmaz R. Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *Am J Infect Control.* 2006;34(4):188-92.
236. Akhi MT, Khalili Y, Ghottaslou R, Aghazadeh M, Seroush Bar Hagh MH, Yousefi S. Prevalence of PER-1- type Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Tabriz, Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2012;15(1):678-82.
237. Sutherland CA, Verastegui JE, Nicolau DP. In vitro potency of amikacin and comparators against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* respiratory and blood isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15(1):016-0155.

238. Gasink LB, Fishman NO, Weiner MG, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk factors and clinical impact. *Am J Med.* 2006;119(6):e19-25.
239. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(1):105-16.
240. Kos VN, McLaughlin RE, Gardner HA. Elucidation of Mechanisms of Ceftazidime Resistance among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by Using Genomic Data. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3856-61.
241. Mayank D, Anshuman M, Singh RK, Afzal A, Baronia AK, Prasad KN. Nosocomial cross-transmission of *Pseudomonas aeruginosa* between patients in a tertiary intensive care unit. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52(4):509-13.
242. Fazeli H, Sadighian H, Esfahani BN, Pourmand MR. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-resistant isolates at the university teaching hospital in Iran. *Adv Biomed Res.* 2015;4(156):2277-9175.
243. Vaez H, Faghri J, Nasr Esfahani B, Moghim S, Fazeli H, Sedighi M, et al. Antibiotic Resistance Patterns and Genetic Diversity in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Patients of a Referral Hospital, Isfahan, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(8):e20130.
244. Godebo G, Kibru G, Tassew H. Multidrug-resistant bacterial isolates in infected wounds at Jimma University Specialized Hospital, Ethiopia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2013;12:17-.
245. Ece G, Samlioglu P, Atalay S, Kose S. Evaluation of the in vitro colistin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains at a tertiary care centre in Western Turkey. *Infez Med.* 2014;22(1):36-40.
246. Mastoraki A, Douka E, Kriaras I, Stravopodis G, Manoli H, Geroulanos S. *Pseudomonas aeruginosa* susceptible only to colistin in intensive care unit patients. *Surg Infect.* 2008;9(2):153-60.

247. Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. PLoS One. 2015;10(10).
248. Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. Journal of Cystic Fibrosis. 2008;7(5):391-7.
249. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(5):962-9.
250. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. Int J Antimicrob Agents. 2015;45(6):568-85.
251. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J Antimicrob Chemother. 2001;48(6):839-52.
252. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):582-610.
253. Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. J Med Microbiol. 1995;43(4):300-9.
254. Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal H, Saribas S, Tansel O, Coskuncan F. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum beta-lactamases. J Clin Microbiol. 1998;36(3):827-9.
255. Bae IK, Suh B, Jeong SH, Wang KK, Kim YR, Yong D, et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Korea producing beta-lactamases with extended-spectrum activity. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(3):373-7.

256. Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, Zamorano L, Dobрева E, Velinov T, et al. Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist.* 2013;19(5):355-61.
257. Murugan N, Malathi J, Umashankar V, Madhavan HN. Draft genome sequence of blaVeb-1, bla_{oxa}-10 producing multi-drug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* strain VRFPA09 recovered from bloodstream infection. *Braz J Microbiol.* 2015;46(3):639-40.
258. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Ko WC, Wu JJ. Characterization of acquired beta-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(3):530-6.
259. Sanschagrín F, Couture F, Levesque RC. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(4):887-93.
260. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 9):1133-48.
261. Piyakul C, TiyaWisutSri R, Boonbumrung K. Emergence of metallo-beta-lactamase IMP-14 and VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary-level hospital in Thailand. *Epidemiol Infect.* 2012;140(3):539-41.
262. Muller-Premru M, Gubina M. Serotype, antimicrobial susceptibility and clone distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital. *Zentralbl Bakteriologie.* 2000;289(8):857-67.
263. Selim S, El Kholy I, Hagagy N, El Alfay S, Aziz MA. Rapid identification of by pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2015;29(1):152-6.
264. Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, Dehecq B, Plesiat P, Talon D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(10):1217-22.

265. Cholley P, Hocquet D, Alauzet C, Cravoisy-Popovic A, Talon D, Aissa N, et al. Hospital outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 7):866-9.
266. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4783-8.
267. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1995;33(3):528-34.
268. Romling U, Wingender J, Muller H, Tummeler B. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(6):1734-8.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมสารหมวดอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Mueller Hinton Agar มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Mueller Hinton Agar (Oxoid) 38 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันนำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) มาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ (sterile plate) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (sterile technique) ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.2 Mueller Hinton Broth มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Mueller Hinton Broth (Oxoid) 38 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.3 Tryptone Soya Agar มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Tryptone Soya Agar (Oxoid) 40 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันนำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) มาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ (sterile plate) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (sterile technique) ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.4 Tryptone Soya Broth มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Tryptone Soya Broth (Oxoid) 30 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.5 Nutrient Broth มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Nutrient Broth (Oxoid) 13 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.6 Triple Sugar Iron มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Triple Sugar Iron Agar (Oxoid) 65 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) มาเอียงให้หน้าวุ้นเฉียง (slope) และมีก้น (butt) ลึกประมาณ 1 นิ้ว เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.7 Simons Citrate มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Simons Citrate Agar (Oxoid) 23 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) มาเอียงให้หน้าวุ้นเฉียง (slope) เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.8 Arginine Decarboxylation มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Difco™ Decarboxylase Base Moeller (BD) 10.5 กรัม
- ชั่งผง Agar Bacteriological (Agar No.1) (Oxoid) 0.2 กรัม (0.2% w/v)
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- สำหรับหลอดที่ใช้ทดสอบ Arginine Decarboxylation นั้น จะใส่ L-Arginine monohydrochloride (Merck) 1 กรัม (1% w/v) (สำหรับหลอด control นั้นจะไม่ใส่ L-Arginine monohydrochloride)
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.9 Motile มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Motility test medium (BD) 22 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารหมวดสารเคมี

2.1 70% ethanol 1 ลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ตวง Absolute ethanol 700 มิลลิลิตร
- เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากันดี เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 0.5X TBE buffer 2 ลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง TBE (aMReSCo) 17.0 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 2 ลิตร
- ผสมโดยเขย่าให้เข้ากันมากที่สุด แล้วอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.3 Normal saline solution หรือ NSS (0.85% NaCl) มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่ง NaCl (Ajax Finechem) 8.5 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
- เขย่าให้เข้ากันให้ละลายดีอาจใช้ความร้อนช่วย จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำ NSS ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4 5 โมลาร์ Sodium Chloride 100 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่ง NaCl (Ajax finechem) 29.22 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- นำไป autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.5 1 โมลาร์ Tris, pH 8.0 250 มิลลิลิตร วิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Tris base (aMReSCo) 30.275 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer
- ปรับ pH ด้วย 6 M HCL จนได้ pH ประมาณ 8.0
- ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำ 1 M Tris ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.6 0.5 โมลาร์ EDTA (Na₂), pH 8.0 250 มิลลิลิตร วิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง EDTA (Na₂) (Bio-Rad) 30.275 กรัม
- เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer และอาจใช้ความร้อนช่วย
- ปรับ pH ด้วยเกล็ด NaOH จนได้ pH ประมาณ 8.0
- ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำ 0.5 M EDTA (Na₂) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.7 1X TE buffer 500 มิลลิลิตร (10 มิลลิโมลาร์ Tris, 1 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8.0) มีวิธีเตรียมดังนี้

- ตวง 100X TE buffer (Sigma-aldrich) 5 มิลลิลิตร
- เติมน้ำกลั่น 495 มิลลิลิตร
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำ 1X TE buffer ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.8 Saline-EDTA (SE) buffer 500 มิลลิลิตร (75 มิลลิโมลาร์ NaCl, 25 มิลลิโมลาร์ EDTA) มีวิธีเตรียมดังนี้

- ตวง 5 M NaCl 7.5 มิลลิลิตร
- ตวง 0.5 M EDTA 25 มิลลิลิตร
- นำมาผสมกันแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำ SE buffer ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.9 Low Melting Point Agarose (LMP) buffer 50 มิลลิลิตร (10 มิลลิโมลาร์ Tris, 0.1 มิลลิโมลาร์ EDTA) มีวิธีเตรียมดังนี้

- ปิเปต 1 โมลาร์ Tris 500 ไมโครลิตร
- ปิเปต 0.5 โมลาร์ EDTA 50 ไมโครลิตร
- ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร
- นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- นำ LMP buffer ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.10 Proteinase K buffer 10 มิลลิลิตร (50 มิลลิโมลาร์ Tris, 50 มิลลิโมลาร์ EDTA, 1% N-Lauroylsarcosine sodium salt) มีวิธีเตรียมดังนี้

- ตวง 1 โมลาร์ Tris 0.5 มิลลิลิตร
- ตวง 0.5 โมลาร์ EDTA 1 มิลลิลิตร
- ชั่ง N-Lauroylsarcosine sodium salt 0.1 กรัม
- ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น (sterile) 8.5 มิลลิลิตร
- กรองด้วยแผ่นกรอง (filter 0.2 ไมครอน) แล้วแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.11 Proteinase K solution (stock) 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง proteinase K (Invitrogen) 0.05 กรัม
- เติม proteinase K buffer 1 มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.12 Proteinase K solution (working) 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ปิเปต proteinase K solution (stock) 0.4 มิลลิลิตร
- เติม proteinase K buffer 0.6 มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากันสามารถเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.13 Lysis buffer 40 มิลลิลิตร (50 มิลลิโมลาร์ Tris, 50 มิลลิโมลาร์ EDTA, 1% N-Lauroylsarcosine sodium salt, proteinase K 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีวิธีเตรียมดังนี้

- ตวง 1 โมลาร์ Tris 2 มิลลิลิตร
- ตวง 0.5 โมลาร์ EDTA 4 มิลลิลิตร
- ชั่งผง N-Lauroylsarcosine sodium salt 0.4 กรัม
- เติมน้ำกลั่น (sterile) 34 มิลลิลิตร
- ปิเปต สารละลายดังกล่าวออกมา 39 มิลลิลิตร
- เติม proteinase K solution (working) 1 มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (filter 0.2 ไมครอน) แล้วแบ่งใส่ หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปใช้ทันที

2.14 Ethidium bromide 400 มิลลิลิตร สำหรับย้อมแผ่น PFGE-gel (working 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีวิธีเตรียมดังนี้

- ปิเปต Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร
- เติม 0.5X TBE buffer 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในที่มืด

2.15 SpeI-HF 15 U 100 ไมโครลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ปิเปต SpeI (10 U/ไมโครลิตร) 1.5 ไมโครลิตร
- เติม 1X Restriction enzyme (RE) buffer 100 ไมโครลิตร
- ผสมให้เข้ากันนำไปใช้ได้ทันที

2.16 1.5% agarose gel 100 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Certified™ Molecular Biology Agarose จำนวน 1.5 กรัม
- เติม 0.5x TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยเครื่อง microwave ได้สารละลายใส จึงนำออกจาก microwave ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอให้อุณหภูมิของสารละลายเย็นลงจนมือจับได้
- เติม 10,000X SYBR® Safe DNA gel stain ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงใน gel cast tray รอให้วุ้นแข็งตัว

2.17 2% Low Melting Point Agarose 10 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Certified™ Low Melting Point Agarose จำนวน 0.2 กรัม
- เติม LMP buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยเครื่อง microwave ได้สารละลายใส จึงนำออกจาก microwave และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 55-60 องศาเซลเซียส

2.18 1% Certified™ Megabase Agarose 100 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่งผง Certified™ Megabase Agarose จำนวน 1 กรัม
- เติม 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยเครื่อง microwave ได้สารละลายใส จึงนำออกจาก microwave ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอให้อุณหภูมิของสารละลายเย็นลงจนมือจับได้
- เทลงใน gel cast tray รอให้วุ้นแข็งตัว

ภาคผนวก ข
ตารางแสดงผลงานวิจัยทั้งหมด

No.	ID	CAZ	FEP	SCFP	TZP	AK	GM	CFX	LVX	IPM	MEM	CLASP	VEB-1	AmpC	OXA-10	PT	
1	10321	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	4
2	10345	R	R	I	S	S	R	R	R	R	R	S	4	P	P	N	4
3	20030	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	19
4	20055-2	R	S	R	R	S	I	R	R	I	R	S	3	N	P	N	1
5	20062	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	N	1
6	50023	I	I	I	R	S	S	R	R	S	R	S	3	N	P	N	2
7	50039-2	R	I	R	R	S	S	R	R	S	R	S	3	N	P	N	2
8	50048-2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	1	N	P	N	3
9	50050	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	8
10	50089-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
11	50118	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	11
12	60154	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	N	1
13	20249	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	5
14	20253	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	20
15	20276-2	S	I	R	R	S	S	R	R	R	R	S	6	N	P	N	3
16	20307-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	28
17	50135-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	29
18	50144	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	4
19	50158-2	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	5	N	P	N	6
20	50163-2	R	R	I	R	S	S	R	R	R	R	S	3	N	P	N	2
21	50166-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	24
22	50182-2	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	3	P	P	N	3
23	50185	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	10
24	50186	R	S	I	S	S	S	R	R	S	S	S	11	N	P	N	10
25	50221-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	N	1
26	50225	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	25
27	60172-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
28	60203-2	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	13	N	P	N	14
29	60239	R	I	R	R	S	S	R	R	I	R	S	3	N	P	N	2

No.	ID	CAZ	FEP	SCFP	TZP	AK	GM	CFX	LVX	IPM	MEM	CL	ASP	VEB-1	AmpC	OXA-10	PT
30	60297	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
31	20451-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
32	20453	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	N	1
33	20548-2	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	15	N	N	N	N/A
34	20592-2	S	S	S	s	S	S	R	R	S	S	S	16	N	N	N	N/A
35	20595-2	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	2	P	N	P	12
36	20717-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
37	50274-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
38	50277	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
39	50283-2	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	5	N	P	N	12
40	50291	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	S	3	N	N	N	N/A
41	50307-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	6
42	50349	R	S	R	R	S	S	R	R	I	S	S	5	N	P	N	2
43	50354	R	R	I	S	S	R	R	R	R	S	S	4	P	N	P	23
44	50399-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
45	50409-2	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	S	3	N	N	N	N/A
46	50427	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
47	50430-2	I	S	I	S	S	S	R	R	I	R	S	14	N	P	N	2
48	50431-2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	1	P	N	P	3
49	60334-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	N	N	N/A
50	60392	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
51	60414-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
52	60415-2	R	I	R	R	S	S	S	S	R	R	S	7	N	P	N	21
53	60503-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
54	60511-2	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	12	N	N	N	N/A
55	60512	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
56	60546	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
57	60560	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
58	10672	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
59	20032-2	R	S	I	R	S	S	R	R	S	I	S	5	N	P	N	2
60	20037	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	10	N	N	N	N/A
61	20070-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	2
62	20406-2	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	2	N	N	N	N/A

No.	ID	CAZ	FEP	SCFP	TZP	AK	GM	CFX	LVX	IPM	MEM	CL	ASP	VEB-1	AmpC	OXA-10	PT
63	20553	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	17	N	N	N	N/A
64	20660-2	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	13	N	N	N	N/A
65	20681	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
66	20714	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
67	20735-2	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	5	N	P	N	15
68	20749	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
69	20792-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
70	20807-2	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	10	N	N	N	N/A
71	20831	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
72	20875-2	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	2	P	N	P	5
73	20911	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	10	N	N	N	N/A
74	60606-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
75	60634	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
76	60646-2	R	R	I	S	S	I	R	R	R	S	S	9	P	N	N	11
77	60167-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	6
78	60692	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
79	60023-2	R	R	I	S	S	R	R	R	R	S	S	4	P	P	P	8
80	60103	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	10	N	N	N	N/A
81	60105	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	3	N	N	N	N/A
82	60136	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	10	N	N	N	N/A
83	60140-1	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	16	N	N	N	N/A
84	60140-2	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	S	16	N	N	N	N/A
85	60647-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	9
86	60208	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	13	N	N	N	N/A
87	60210	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	S	6	N	N	N	N/A
88	60302-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	2
89	60365	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	17
90	60382	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	17	N	P	N	5
91	60446	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
92	60455	R	I	R	R	S	S	R	R	S	S	S	5	N	P	N	7
93	60487	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	P	1
94	60503	I	S	I	R	S	I	S	S	R	R	S	12	N	N	N	N/A
95	60549-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A

No.	ID	CAZ	FEP	SCFP	TZP	AK	GM	CFX	LVX	IPM	MEM	CL	ASP	VEB-1	AmpC	OXA-10	PT
96	50025	S	I	R	S	S	S	R	R	I	R	S	6	N	P	N	2
97	50075	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
98	50115	R	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	11	N	P	N	2
99	50117-2	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	18	N	P	N	2
100	50122-2	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	3	N	P	N	1
101	50129-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	N	N	N/A
102	50167	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	7
103	50190	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	4
104	50209	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	13
105	50215-2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	1	P	P	N	27
106	50272	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	3	N	P	N	2
107	50285-2	R	S	R	R	S	S	R	R	R	I	S	3	N	P	N	2
108	50298	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	P	1
109	50381-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	2
110	50383	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	16
111	50452	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	8	N	P	P	1
112	50464	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	1	N	P	N	9
113	50465	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	S	3	N	P	N	2
114	50478-2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	17	N	P	N	2
115	50504-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	13
116	50511-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	22
117	50525	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	26
118	50530-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18	N	P	N	18

CAZ; cefazidime, FEP; cefepime, SCFP; cefoperazone/sulbactam, TZP; piperacillin/tazobactam, AK; amikacin, GM; gentamicin, CFX; ciprofloxacin, LVX; levofloxacin, IPM; imipenem, MEM; meropenem, CL; colistin, ASP; antibiotic susceptible pattern, PT; pulsotype, S; susceptible, I; intermediate, R; resistance

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชนกปกรณ์ เกตุวรวิชัย เกิดเมื่อวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532 ที่ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2554 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2555

