

การพัฒนาเทคนิค RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION และ HELICASE
DEPENDENT ISOTHERMAL AMPLIFICATION สำหรับตรวจจีโนมไทป์ของเอนไซม์ EXTENDED-
SPECTRUM β -LACTAMASE ที่สร้างจากเชื้อ *Escherichia coli* ในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION AND HELICASE
DEPENDENT ISOTHERMAL AMPLIFICATION FOR GENOTYPIC DETECTION OF EXTENDED-
SPECTRUM β -LACTAMASE - PRODUCING *Escherichia coli* IN NATIONAL CANCER
INSTITUTE, THAILAND



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิค RECOMBINASE POLYMERASE
AMPLIFICATION และ HELICASE DEPENDENT
ISOTHERMAL AMPLIFICATION สำหรับตรวจจีโนไทป์ของ
เอนไซม์ EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE ที่
สร้างจากเชื้อ *Escherichia coli* ในสถาบันมะเร็ง
แห่งชาติ ประเทศไทย

โดย

น.ส.ธัชกร อัครวงศารัตน์

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์
และวิทยาภูมิคุ้มกัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.รัชนีพร ตียะวิสุทธิ์ศรี)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์)

ฉัตร อัครวงคารัตน์ : การพัฒนาเทคนิค RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION และ HELICASE DEPENDENT ISOTHERMAL AMPLIFICATION สำหรับตรวจจีโนไทป์ของเอนไซม์ EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE ที่สร้างจากเชื้อ *Escherichia coli* ในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย. (DEVELOPMENT OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION AND HELICASE DEPENDENT ISOTHERMAL AMPLIFICATION FOR GENOTYPIC DETECTION OF EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE - PRODUCING *Escherichia coli* IN NATIONAL CANCER INSTITUTE, THAILAND) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

เชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างเอนไซม์ Extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) เป็นปัญหาสำคัญที่พบในโรงพยาบาลทั่วโลก การตรวจจีโนไทป์ของเอนไซม์ ESBLs เป็นวิธีที่สำคัญและมีประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาและการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสม การศึกษานี้มุ่งหวังจะพัฒนาเทคนิค Multiplex Recombinase polymerase amplification (Multiplex RPA) และ Helicase dependent amplification (HDA) สำหรับตรวจหายีนดื้อยา bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , bla_{SHV} และ bla_{TEM} ในเชื้อ *E. coli* ในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย เชื้อ *E. coli* จำนวน 144 ตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจภายในงานจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ช่วงระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2017 ถึงเดือนกันยายน 2018 ถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพและตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Disk diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI ปี ค.ศ. 2017 เชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง พบดื้อยาสูงสุดในยา Ampicillin (100%), Cefotaxime (100%), Cefdinir (100%) และ Ceftriaxone (99.9%) และเชื้อ *E. coli* จำนวน 144 ตัวอย่าง มียีน bla_{CTX-M} (100%) รองลงมาคือ bla_{TEM} (42.1%), bla_{OXA} (30.5%) และ bla_{SHV} (2.1%) ตามลำดับ โดยเป็นยีน ESBLs ชนิด CTX-M-15 สูงสุด (51.1%) รองลงมาคือ CTX-M-55 (18.1%), CTX-M-27 (17.0%), CTX-M-14 (14.9%) และชนิดอื่น ๆ คือ TEM-127 (1.1%), TEM-215 (1.1%), OXA-16 (2.1%) และ SHV-18 (2.1%) เชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-15}$ มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Gentamicin, Levofloxacin และ Amoxicillin/Clavulanic acid เพิ่มมากขึ้น และเชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-55}$ มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Ceftazidime และ Gentamicin เพิ่มมากขึ้น เทคนิค Multiplex RPA สามารถเพิ่มปริมาณยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ที่อุณหภูมิตั้ง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที และเทคนิค HDA สามารถเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} ได้ที่อุณหภูมิตั้ง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชัดจำกัดต่ำสุดในการตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA เท่ากับ 5, 0.5 และ 0.5 นาโนกรัม ตามลำดับ และเทคนิค HDA สำหรับการตรวจหายีน bla_{TEM} เท่ากับ 50 นาโนกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่าเทคนิค Multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% เทคนิค Multiplex RPA เป็นเทคนิคการตรวจที่รวดเร็ว มีค่าความไวและความจำเพาะสูง เหมาะกับการตรวจหายีนสร้างเอนไซม์ ESBLs ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือจำกัด

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6076758337 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: ESCHERICHIA COLI, ESBLs, MULTIPLEX RECOMBINASE POLYMERASE
AMPLIFICATION, HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION

Thadchaporn Assawakongkarat : DEVELOPMENT OF RECOMBINASE POLYMERASE
AMPLIFICATION AND HELICASE DEPENDENT ISOTHERMAL AMPLIFICATION FOR
GENOTYPIC DETECTION OF EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE - PRODUCING
Escherichia coli IN NATIONAL CANCER INSTITUTE, THAILAND. Advisor: Assoc. Prof.
NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D.

Escherichia coli producing extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) is a major problem in hospitals around the world. ESBLs genotyping is important and useful for surveillance, control of antimicrobial resistant spreading and rapid selection of appropriate treatments. This study aimed to develop multiplex RPA and HDA techniques for bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , bla_{SHV} and bla_{TEM} detections in *E. coli*. Antibiotic susceptibility and ESBL confirmatory testing were determined by disk diffusion method according to the CLSI guidelines with 144 *E. coli* samples collected from various specimens in the Department of Microbiology, National Cancer Institute of Thailand during February 2017 to September 2018. The high frequency of drug resistance in 95 ESBLs isolates were Ampicillin (100%), Cefotaxime (100%), Cefdinir (100%) and Ceftriaxone (99.9%). All 95 ESBLs producing *E. coli* had bla_{CTX-M} (100%) followed by 42.1% of bla_{TEM} , 30.5% of bla_{OXA} and 2.1% of bla_{SHV} , respectively. The frequency of CTX-M-15 was predominate (51.1%) followed by CTX-M-55 (18.1%), CTX-M-27 (17.0%), CTX-M-14 (14.9%). Other subtypes were TEM-127 (1.1%), TEM-215 (1.1%), OXA-16 (2.1%), and SHV-18 (2.1%). *E. coli* harbouring $bla_{CTX-M-15}$ significantly resist with Gentamicin, Levofloxacin and Amoxicillin/Clavulanic acid. *E. coli* harbouring $bla_{CTX-M-55}$ significantly resist with Ceftazidime Gentamicin. The multiplex RPA was successfully amplified bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , and bla_{SHV} genes at 37 °C within 25 min. The bla_{TEM} gene was detected by HDA at 65 °C for 30 min. The limit of detection for bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , and bla_{SHV} genes were 5, 0.5 and 0.5 ng, respectively, and at 50 ng for bla_{TEM} gene. In comparison to PCR, multiplex RPA had both sensitivity and specificity of 100%. The developed multiplex RPA is promising tools for rapid, sensitive and specific identification of ESBLs genes in laboratory with limited resources.

Field of Study: Molecular Science of Medical Student's Signature
Microbiology and Immunology

Academic Year: 2019 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน รัชวงศ์จิรกุล อาจารย์ ดร. รัชนิพร ติยะวิสุทธิศรี พร้อมทั้งท่านกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ที่ได้สละเวลา ตรวจสอบและให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้ง ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์วิษณุ ธรรมลิขิตกุล หัวหน้าหน่วยระบาดวิทยาคลินิก สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อควบคุมบวก และขอขอบคุณหัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ และหัวหน้างานงานจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์คลินิกในการทำวิจัยครั้งนี้ และรองศาสตราจารย์ ดร. Yukihiko Akeda และบุคลากรทุกท่านที่ The Research Institute for Microbial Disease มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำ ตลอดเวลา กว่า 3 เดือนที่ได้ไป ทำวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) สัญญาเลขที่ CRP6205030570 ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนนิติตระดับปริญญาโทไปทำวิจัย ต่างประเทศ (ครั้งที่ 11) ปีงบประมาณ 2562 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไปทำการศึกษาค้นคว้าวิจัย ณ ประเทศ ญี่ปุ่น

ขอขอบคุณคณะนิติตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจและให้ความคิดเห็นในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณวัฒนา แยมประยูรสวัสดิ์ ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด จนสำเร็จการศึกษา

ธัชกร อัครวงศารัตน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	6
1.3 ขอบเขตของวิทยานิพนธ์	6
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 เชื้อ <i>E. coli</i> และการก่อโรค	8
2.1.1 ชนิดของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ก่อโรค.....	8
2.1.2 ระบาดวิทยา.....	10
2.1.3 การรักษา.....	11
2.2 ยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams.....	12
2.2.1 ยากลุ่ม Penicillins	13
2.2.2 ยากลุ่ม Cephalosporins	13
2.2.3 ยากลุ่ม Monobactams	14
2.2.4 ยากลุ่ม Carbapenems	15

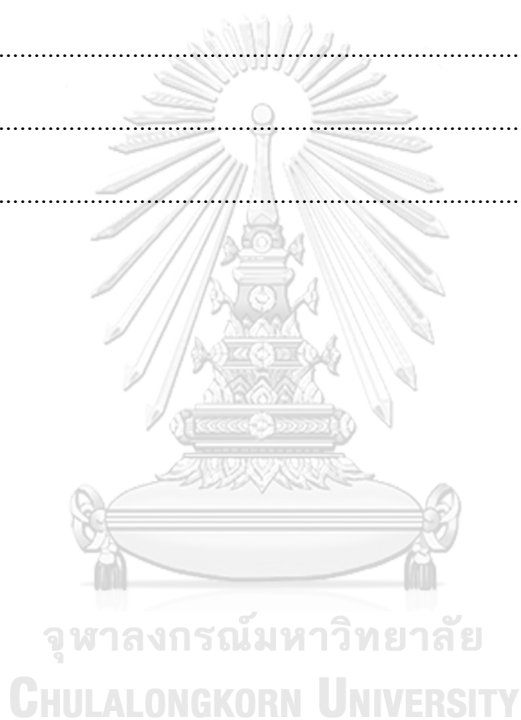
2.3 กลไกการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย	15
2.3.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ (Modification of the antibiotic molecule).....	15
2.3.2 การลดการดูดซึมยาต้านจุลชีพเข้าสู่เซลล์และการนำยาต้านจุลชีพออกนอกเซลล์ (Decreased antibiotic penetration and efflux).....	16
2.3.3 การสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายยาต้านจุลชีพ	16
2.4 เอนไซม์ β -lactamase	17
2.5 Extended-spectrum β -lactamase	19
2.5.1 TEM type.....	20
2.5.2 SHV type	21
2.5.3 CTX-M type	22
2.5.4 OXA type	23
2.5.5 Miscellaneous ESBLs	24
2.6 การตรวจหาการผลิตเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ <i>E. coli</i> ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา.....	24
2.6.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในระดับพีโนไทป์	24
2.6.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในระดับจีโนไทป์.....	26
2.7 การศึกษาวิทยาการระบาดของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs	26
2.8 Recombinase Polymerase Amplification (RPA).....	28
2.8.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา RPA	28
2.8.2 วิธีที่ใช้ตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิค RPA.....	30
2.9 Helicase Dependent Amplification (HDA).....	34
2.9.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา HDA.....	34
2.9.2 วิธีที่ใช้ตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิค HDA	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	38

3.2 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	39
3.3 การออกแบบงานวิจัย.....	40
3.3.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยวิธี Sequencing	40
3.3.2 การพัฒนาเทคนิค Multiplex RPA เพื่อตรวจหายีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV}	40
3.3.3 การพัฒนาเทคนิค HDA เพื่อตรวจหายีน <i>bla</i> _{TEM}	40
3.3.4 การตรวจหายีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA และ การตรวจหายีน <i>bla</i> _{TEM} ด้วยเทคนิค HDA ในเชื้อ <i>E. coli</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วย	40
3.3.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค RPA และ HDA ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ <i>E. coli</i>	41
3.4 วิธีการทดลอง.....	41
3.4.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	41
3.4.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	42
3.4.3 การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ.....	43
3.4.4 การตรวจยืนยันเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk method.....	44
3.4.5 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ	45
3.4.6 การตรวจหาชนิดยีน <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยเทคนิค PCR-sequencing	45
3.4.7 การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน ฐันอะกาโรส (Agarose Gel electrophoresis).....	48
3.4.8 การเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR	49
3.4.9 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} เพื่อใช้ในการทดสอบ Multiplex RPA.....	50
3.4.10 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M IV} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA กับ ไพรเมอร์ ชุดที่1	51

3.4.11 การหาสถานะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วย ปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ ชุดที่ 2.....	54
3.4.12 การทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA	56
3.4.13 การเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA.....	56
3.4.14 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex RPA และ HDA	59
3.4.15 การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่สามารถทดสอบได้ด้วย เทคนิค Multiplex RPA และ HDA.....	59
3.4.16 การตรวจหายีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิกด้วย ปฏิกิริยา Multiplex RPA.....	60
3.4.17 การตรวจหายีน <i>bla</i> _{TEM} ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิก ด้วยปฏิกิริยา HDA.....	60
3.4.18 การคำนวณค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: PPV) ของเทคนิค Multiplex RPA และ HDA.....	60
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	62
4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและรูปแบบความไวต่อสารต้านจุลชีพ	62
4.2 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk method.....	64
4.3 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ	65
4.4 การตรวจหาชนิดยีน <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยเทคนิค PCR-sequencing	65
4.5 การเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR...	70
4.6 ความสัมพันธ์ของชนิดยีน ESBLs กับรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ.....	72
4.7 การทดสอบการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M IV} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ชุดที่ 1.....	74
4.7.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M IV} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA.....	74
4.7.2 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M IV} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA	75

4.7.3 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M IV} , <i>bla</i> _{OXA} , และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA	76
4.7.4 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M IV} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA	79
4.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ ชุดที่ 2	80
4.8.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA	80
4.8.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA.....	81
4.8.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA	83
4.8.4 การหาเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วย ปฏิกิริยา Multiplex RPA.....	84
4.9 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA.....	85
4.9.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA	85
4.9.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA	86
4.9.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA.....	87
4.9.4 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA.....	88
4.10 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex RPA และ HDA	89
4.11 ผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA และยีน <i>bla</i> _{TEM} ด้วยเทคนิค HDA.....	91
4.12 การตรวจหายีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิกด้วย ปฏิกิริยา Multiplex RPA	94
4.13 การตรวจหายีน <i>bla</i> _{TEM} ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา HDA.....	96

4.14 ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: PPV) ของเทคนิค Multiplex RPA และ HDA.....	97
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	98
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย.....	105
บรรณานุกรม.....	107
ภาคผนวก.....	124
ภาคผนวก ก.....	125
ภาคผนวก ข.....	127
ประวัติผู้เขียน.....	131



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มของเอนไซม์ β -lactamase (4, 44).....	19
ตารางที่ 2 วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจคัดกรองและการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ระดับพีโนไทป์.....	25
ตารางที่ 3 ขั้นตอนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ชุดทดสอบ สำเร็จรูป TwistAmp®.....	30
ตารางที่ 4 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
ตารางที่ 5 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	39
ตารางที่ 6 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	39
ตารางที่ 7 การรายงานผลความไวต่อสารต้านจุลชีพ.....	43
ตารางที่ 8 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR.....	46
ตารางที่ 9 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR.....	49
ตารางที่ 10 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา Multiplex RPA.....	51
ตารางที่ 11 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา HDA.....	57
ตารางที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิคที่พัฒนาเปรียบเทียบกับ ผลทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน.....	61
ตารางที่ 13 ผลการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค PCR ในเชื้อ <i>E. coli</i> จำนวน 144 ตัวอย่าง.....	68
ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ในเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง.....	68
ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน bla_{TEM} ในเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 21 ตัวอย่าง.....	70
ตารางที่ 16 ผลการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ในเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง.....	72

ตารางที่ 17 ผลการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ในเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง	72
ตารางที่ 18 ร้อยละการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อที่พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด bla_{CTX-M}	73
ตารางที่ 19 ผลการตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ในเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิก ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA.....	95
ตารางที่ 20 ผลการตรวจหายีน bla_{TEM} ในเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา HDA	96
ตารางที่ 21 ค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบของเทคนิค Multiplex RPA และ HDA.....	97
ตารางที่ 22 ผลการทดสอบปฏิกิริยา Multiplex PCR, PCR-Sequencing, Multiplex RPA และ HDA ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิก จำนวน 144 ตัวอย่าง (P แทนผลบวก, N แทนผลลบ).....	128

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างหลักของยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams a) ยากลุ่ม Penicillins b) ยากลุ่ม Cephalosporins c) ยากลุ่ม Carbapenems d) ยากลุ่ม Monobactams (Aztreonam) (32).....	12
รูปที่ 2 กลไกการต่อยาของเอนไซม์ Serine β -lactamase (46)	18
รูปที่ 3 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน TEM-1 ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ TEM ชนิดต่าง ๆ และมี คุณสมบัติในการทำลายยากลุ่ม Oxyimino-cephalosporins แตกต่างกัน (9)	21
รูปที่ 4 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน SHV-1 ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ SHV ชนิดต่าง ๆ (9)	22
รูปที่ 5 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ β -lactamase ชนิด CTX ตามการเรียงลำดับของกรดอะมิโน (58) ...	23
รูปที่ 6 กลไกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค RPA (11).....	29
รูปที่ 7 แผนผังขั้นตอนการเกิด Bridging flocculation (77).....	31
รูปที่ 8 กลไกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค RPA และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี Lateral flow assays (A) เริ่มการตรวจวัดโดยใส่ตัวอย่างลงใน sample pad ที่มี α -FAM-Gold, (B) α -FAM-Gold จับกับผลิตภัณฑ์ RPA ที่บริเวณ Mixture pad, (C) α -FAM-Gold – FAM – nucleotide complex จับกับ α -Biotin antibody ที่อยู่บน Detection line, (D) α -FAM-Gold ที่เหลือจากปฏิกิริยาจับกับ Species-specific α - [α -FAM-Gold] antibody ที่ Control line (11).....	33
รูปที่ 9 กลไกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค HDA (13).....	34
รูปที่ 10 แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่แยกได้ จากผู้ป่วย แผนกจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่าง กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 จำนวน 95 ตัวอย่าง.....	63
รูปที่ 11 แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่แยกได้ จากผู้ป่วย แผนกจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่าง กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 จำนวน 49 ตัวอย่าง.....	64

รูปที่ 12 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{TEM}</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs.....	66
รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{CTX-M}</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs.....	66
รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{OXA}</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs.....	67
รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{SHV}</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs.....	67
รูปที่ 16 แผนภูมิแสดงร้อยละของยีน ESBLs แต่ละชนิด ในเชื้อ <i>E. coli</i> จากผู้ป่วย แผนกจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่าง กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 จำนวน 95 ตัวอย่าง.....	70
รูปที่ 17 ผลการตรวจสอบผลผลิต Multiplex PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M IV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{SHV}</i> และ <i>uspA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs.....	71
รูปที่ 18 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>bla_{CTX-M IV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> และ <i>bla_{SHV}</i> ในปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ชุดที่ 1.....	74
รูปที่ 19 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>bla_{CTX-M IV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> และ <i>bla_{SHV}</i> ในปฏิกิริยา Multiplex RPA.....	75
รูปที่ 20 ผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน <i>bla_{CTX-M IV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> และ <i>bla_{SHV}</i>	76
รูปที่ 21 ผลการทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์และเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน <i>bla_{CTX-M IV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> และ <i>bla_{SHV}</i>	77
รูปที่ 22 ผลการทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์และเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน <i>bla_{CTX-M IV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> และ <i>bla_{SHV}</i>	78
รูปที่ 23 ผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน <i>bla_{CTX-M IV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> และ <i>bla_{SHV}</i>	79

รูปที่ 24 ผลการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV}	81
รูปที่ 25 ผลการตรวจสอบผลผลิต Multiplex RPA จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV}	82
รูปที่ 26 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV}	83
รูปที่ 27 ผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV}	84
รูปที่ 28 ผลการทดสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน <i>bla</i> _{TEM}	86
รูปที่ 29 ผลการทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน <i>bla</i> _{TEM}	87
รูปที่ 30 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน <i>bla</i> _{TEM}	88
รูปที่ 31 ผลการทดสอบเวลาเหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน <i>bla</i> _{TEM}	89
รูปที่ 32 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex RPA จากการเพิ่มปริมาณ ยีน <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV}	90
รูปที่ 33 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{TEM}	91
รูปที่ 34 ผลการทดสอบขีดจำกัดในตรวจยีน <i>bla</i> _{CTX-M} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA	92
รูปที่ 35 ผลการทดสอบขีดจำกัดในตรวจยีน <i>bla</i> _{OXA} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA	92
รูปที่ 36 ผลการทดสอบขีดจำกัดในตรวจยีน <i>bla</i> _{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA	93
รูปที่ 37 ผลการทดสอบขีดจำกัดในตรวจยีน <i>bla</i> _{TEM} ด้วยเทคนิค HDA	93
รูปที่ 38 ผลการตรวจหายีน <i>bla</i> _{CTX-M IV} , <i>bla</i> _{OXA} และ <i>bla</i> _{SHV} ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA	95
รูปที่ 39 ผลการตรวจหายีน <i>bla</i> _{TEM} ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา HDA ของยีน <i>bla</i> _{TEM}	96

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial resistance) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่พบได้ทั่วโลก โดยเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ มีการเปลี่ยนแปลงกลไกการดื้อยามากขึ้น และแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อต้องใช้เวลารักษานาน เกิดการรักษาไม่ได้ผล หรือเป็นสาเหตุการเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดค่าใช้จ่ายภายในโรงพยาบาลที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากต้องทำการให้ยาต้านจุลชีพแบบครอบคลุมก่อนในระหว่างรอผลเพาะเชื้อจากห้องปฏิบัติการ จึงมีโอกาที่จะไม่ประสบผลสำเร็จในการรักษาเพราะเชื้อมีการดื้อยาค้นพบใหม่ ทำให้ต้องเปลี่ยนยาชนิดใหม่ จนกว่าจะพบยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมและอาจเป็นยาที่มีราคาแพง การควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล จึงมีบทบาทสำคัญในการหาสาเหตุของการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ควบคุมไม่ให้เกิดการแพร่กระจาย และลดอุบัติการณ์การเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ

การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียมีหลายกลไก โดยกลไกการดื้อยาต้านจุลชีพชนิด Extended-Spectrum β -lactamase (ESBLs) ของเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriales* เป็นอีกกลไกหนึ่งที่มีความสำคัญ ข้อมูลจาก Center for Disease Control (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รายงานว่ามีผู้ป่วยโรคติดเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriales* ประมาณ 140,000 ราย และพบว่าเป็นเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ESBLs จำนวนประมาณ 26,000 ราย และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต 1,700 ราย ซึ่งผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อดื้อยา ESBLs จะต้องเสียค่าใช้จ่ายภายในโรงพยาบาลสูงถึง 40,000 เหรียญสหรัฐต่อปี (1) องค์การอนามัยโลก (World health organization: WHO) ได้จัดเชื้อ ESBL เป็นกลุ่มเชื้อดื้อยากลับ 1 ซึ่งจัดเป็นกลุ่มวิกฤตที่ต้องหายาปฏิชีวนะใหม่มาใช้ ในปี 2014 WHO ระบุว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ดื้อยาต้านจุลชีพชนิด ESBLs มีโอกาสเสียชีวิตมากขึ้นกว่าการติดเชื้อที่ไม่ดื้อยาต้านจุลชีพเป็น 2 เท่าและสามารถกระตุ้นให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพชนิด Carbapenems ได้ ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อชีวิตของผู้ป่วยและการสูญเสียเงินที่เพิ่มมากขึ้น (2) ส่วนในประเทศไทย มีรายงานจาก National Antimicrobial Resistance

Surveillance center (NARST) กระทรวงสาธารณสุข เมื่อปี ค.ศ. 2016 (3) พบว่าเชื้อ *E. coli* มีการดื้อยาต้านจุลชีพชนิด ESBLs สูงที่สุด โดยพบอัตราอุบัติการณ์การติดเชื้อในโรงพยาบาล 10.3 ครั้งต่อ 100,000 วันนอน และจากรายงานความไวของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาต้านจุลชีพในปี ค.ศ. 2018 พบว่ามี cefotaxime และ ceftazidime ร้อยละ 48.6 และ 40.6 ตามลำดับ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เป็นโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ ขนาด 200 เตียง โดยเป็นโรงพยาบาลเฉพาะทางด้านโรคมะเร็ง จากสถิติของงานจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ในปี ค.ศ. 2017 จำนวนสิ่งส่งตรวจที่ส่งมาตรวจเพาะแยกเชื้อ จำนวน 2168 ตัวอย่าง ได้แก่ Blood, Urine, Stool, Pus, Fluid, Tissue และ Sputum ในผู้ป่วย 665 ราย พบเชื้อเจริญจำนวน 462 isolates เชื้อที่พบสูงสุดคือ เชื้อ *E. coli* ร้อยละ 22.73 ของเชื้อที่พบทั้งหมด โดยแบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ร้อยละ 13.20 ของเชื้อที่พบทั้งหมดหรือร้อยละ 58.10 ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด เช่นเดียวกับกับสถิติในปี 2018 จากจำนวนสิ่งส่งตรวจที่ส่งมาตรวจเพาะแยกเชื้อ จำนวน 1557 ตัวอย่าง ในผู้ป่วย 672 ราย พบเชื้อมีการเจริญจำนวน 668 isolates เชื้อที่พบสูงสุดคือ เชื้อ *E. coli* ร้อยละ 28.74 ของเชื้อที่พบทั้งหมด โดยแบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ร้อยละ 15.96 ของเชื้อที่พบทั้งหมดหรือร้อยละ 51.09 ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด ซึ่งพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs เป็นเชื้อที่มีการระบาดในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ และมีอัตราการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสถาบันมะเร็งแห่งชาติเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในกลุ่ม ESBLs ได้แก่ ยา Ertapenem ยา Imipenem ยา Meropenem ยา Piperacillin/Tazobactam ยา Amikacin และยา Ciprofloxacin ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่มีราคาสูงกว่าการรักษาด้วยยา Ceftriaxone ยา Cefotaxime ยา Ofloxacin ยา Ciprofloxacin และ ยา Gentamicin ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriales* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs และทำให้ผู้ป่วยต้องรักษาในโรงพยาบาลนานขึ้น งานควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล จึงมีบทบาทสำคัญในการหาสาเหตุของการเชื้อดื้อยาชนิดนี้ เพื่อหาแนวทางในการลดอัตราการดื้อยาของเชื้อจุลชีพและควบคุมการระบาดในโรงพยาบาล

เชื้อดื้อยาชนิด ESBLs เกิดจากเชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ขึ้นมาเพื่อทำลาย โครงสร้าง β -lactam ring ของยาในกลุ่ม β -lactams เชื้อได้มีการกลายพันธุ์ของการสร้างเอนไซม์ β -lactamase มากกว่า 180 สายพันธุ์ โดยแบ่งกลุ่มเป็นเอนไซม์ชนิด TEM, CTX-M, OXA, SHV และอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , bla_{SHV} และอื่น ๆ

ตามลำดับ (4) วิธีที่ใช้ตรวจหาเชื้อจุลชีพที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs โดยทั่วไปจะใช้วิธี Disk diffusion method และ Combination disk method โดยอ้างอิงจาก Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (5) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก แต่การตรวจด้วยวิธีนี้จะไม่สามารถบอกกลไกที่เกี่ยวข้องในการดื้อยา การดื้อยาในระดับต่ำหรือตรวจดูความชุกของยีนดื้อยาได้ การตรวจระดับจีโนมป์จึงมีความสำคัญในการช่วยวินิจฉัยเชื้อดื้อยาเป็นอย่างมาก โดยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{CTX-M} ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และแยกชนิดของยีนด้วยเทคนิค Isoelectric focusing (IEF) (6) การตรวจแยกชนิดของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{CTX-M} ด้วยเทคนิค DNA Microarray-Based Genotyping (7) การใช้เทคนิค Isothermal Loop-Mediated Amplification (LAMP) และ Real-time Polymerase chain reaction (Real-time PCR) ในการตรวจหาเชื้อจุลชีพกลุ่ม *Enterobacteriales* ที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M และ OXA ในเนื้อสัตว์ (8) และการหาลำดับเบส (Nucleotide sequencing) ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจระดับจีโนมป์ (9) โดยวิธีดังที่กล่าวมาจำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง ใช้เวลาในการทดสอบนาน และต้องการทักษะความเชี่ยวชาญในการทดสอบสูง จึงไม่สามารถตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้

เทคโนโลยีการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกภายใต้อุณหภูมิเดียว (Isothermal nucleic acid amplification technology; INAAT) เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนามาเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกได้โดยไม่ต้องใช้เครื่อง Thermocycler แต่สามารถใช้เครื่องมือทั่วไปที่มีในห้องปฏิบัติการในการทดสอบได้ เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตู้เพาะเชื้อ หรือเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง เทคนิคส่วนใหญ่จะใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าเทคนิค PCR และมีความไวสูง จึงนิยมใช้เทคโนโลยีนี้อย่างแพร่หลายในการทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-care analysis) หรือการปฏิบัติการภาคสนาม (10) เทคโนโลยี INAAT ได้ถูกพัฒนาและคิดค้นเทคนิคใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง จนมีเทคนิคหลากหลายและหลักการที่แตกต่างกันมากกว่า 10 เทคนิค เช่น เทคนิค Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) เทคนิค Rolling circle amplification (RCA) เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เทคนิค Helicase-dependent amplification

(HDA) เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) และเทคนิค Exponential amplification reaction (EXPAR) เป็นต้น ซึ่งแต่ละเทคนิคจะมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงควรศึกษาและเลือกเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้งาน

เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยา เพื่อเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของยีนที่สนใจภายใต้อุณหภูมิเดียว โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ระหว่าง 37 – 42 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการทดสอบ 20 – 40 นาที ซึ่งอาศัยหลักการทำงานของ Recombinase protein, ssDNA binding protein (SSB) และ DNA polymerase with strand – displacing activity (*Sau* polymerase) (11) โดยเริ่มจาก RecA จะจับกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย เกิดเป็น RecA Nucleoprotein filament ซึ่งสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอทดสอบเพื่อทำการแยกสายคู่ บริเวณเบสคู่สมให้เป็นลักษณะคล้ายรูปตัว D (D – loop structure) และตรึงสายดีเอ็นเอที่แยกออกด้วย SSBs เพื่อไม่ให้เกิดการกลับมาจับคู่ซ้ำ จากนั้น RecA จะหลุดออกจากไพรเมอร์ด้วยกระบวนการ ATP – hydrolysis ซึ่ง RecA ที่หลุดออกและจับกับไพรเมอร์สายใหม่ เรียกว่ากระบวนการ RPA self – perpetuating จากนั้นเกิดการต่อสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยอาศัยการทำงานของ *Sau* polymerase จึงเกิดผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายได้ ซึ่งเทคนิค RPA นี้มีจำหน่ายในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ ได้แก่ ชุดทดสอบ TwistAmp® Basic kit และชุดทดสอบ TwistAmp® Liquid Basic kit สำหรับการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคทั่วไปในการตรวจหาผลผลิตจากปฏิกิริยา เช่น Gel agarose electrophoresis เป็นต้น ชุดทดสอบ TwistAmp® exo kit และ TwistAmp® Liquid exo kit สำหรับการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time fluorescent DNA amplification และชุดทดสอบ TwistAmp® nfo kit สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิค Lateral flow ในการตรวจสอบ ผลผลิตจากปฏิกิริยา จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจระดับจีโนมได้ง่าย ขั้นตอน ไม่ยุ่งยาก มีความจำเพาะสูง และเหมาะกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือการทดสอบ ภาคสนาม อีกทั้งสามารถพัฒนาเป็น Multiplex RPA เพื่อเพิ่มปริมาณยีนหลาย ๆ ยีนพร้อมกันได้ เช่นเดียวกับ Multiplex PCR แต่ข้อจำกัดของเทคนิค RPA คือ หากยีนที่สนใจมีลำดับเบสเข้าคู่กับ *E. coli* สายพันธุ์ K12 หรือ BL21 จะให้ผลบวกลวง (11)

เทคนิค Helicase-dependent amplification (HDA) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของยีนที่สนใจได้ด้วยอุณหภูมิเดียว หลักการของเทคนิคนี้เลียนแบบมาจากการจำลองดีเอ็นเอของแบคทีเรียตามธรรมชาติ (12) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Helicase ที่ทำหน้าที่แยกสายดีเอ็นเอสายคู่และมี Single-strand binding proteins (SSBs) ช่วยในการป้องกันการกลับมาจับคู่ซ้ำของสายดีเอ็นเอ ไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่สนใจจึงสามารถเข้าจับได้กับดีเอ็นเอต้นแบบ เกิดการต่อสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่และเพิ่มจำนวนได้เป็นทวีคูณ (13) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 60 – 65 องศาเซลเซียส ในเวลา 90 – 120 นาที (14) ผลิตภัณฑ์ IsoAmp® II Universal tHDA kit เป็นชุดเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกที่ใช้หลักการ HDA ได้ถูกพัฒนาและจัดจำหน่ายโดยบริษัท Biohelix จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบแบบ Reverse Transcription tHDA, Real-time quantitative tHDA หรือ Real-time quantitative RT-tHDA ได้ และสามารถเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกจากสารพันธุกรรมได้หลายชนิด ได้แก่ bacterial genomic DNA, viral DNA, plasmid DNA และ cDNA เป็นต้น เทคนิค HDA จึงเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวกและสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทางอุณหภูมิหรือสามารถทดสอบจุดดูแลผู้ป่วยได้ เทคนิค HDA เป็นเทคนิคที่ใช้ *Bst* DNA polymerase ในปฏิกิริยา ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนต่อสารยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก (Amplification inhibitor) ได้ดีกว่า *Taq* polymerase ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จึงทำให้เทคนิค HDA เกิด Primer-Dimer ได้ง่าย (15) และเนื่องจากเอนไซม์ helicase ที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพและความเร็วในการแยกสายดีเอ็นเอต่ำ จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีความยาว 70 - 120 คู่เบส (16)

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RPA และ HDA มีหลากหลายวิธี สามารถทำได้เช่นเดียวกับการตรวจสอบปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิคอื่น เช่น วิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis) (14, 17) วิธี Real-time PCR (18, 19) การดูการตกตะกอน (Flocculation) (20) การดูการเปลี่ยนสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด SYBR green I (SYBR green I fluorescent dye) (21) และชุดทดสอบแบบแถบสีชนิดรู้ผลรวดเร็ว (Lateral flow assay) (22, 23) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน โดยวิธี Agarose gel electrophoresis และวิธี Real-time PCR จะต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและมีขั้นตอนการทดสอบที่

ยุ่งยาก จึงไม่เหมาะกับการใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือการทดสอบภาคสนาม วิธี Flocculation และวิธี SYBR green I fluorescent dye เป็นวิธีที่สามารถดูผลได้รวดเร็ว แต่มีขั้นตอนการเติมสาร ภายหลังการเกิดปฏิกิริยา จึงมีโอกาสที่เกิดการปนเปื้อนและไม่สามารถตรวจแยกกรณีที่มีผลิตภัณฑ์ RPA มากกว่า 1 ชนิดได้ ส่วนวิธี Lateral flow assay เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ สามารถอ่านผลได้รวดเร็วด้วยตาเปล่า และสามารถพัฒนาให้ตรวจแยกชนิดเอ็นเอทีที่มีหลายขนาด ในการทดสอบครั้งเดียวได้ การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RPA และ HDA จึงเลือกทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการทดสอบและตามความเหมาะสมของเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ

ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้พัฒนาเทคนิค RPA และเทคนิค HDA เพื่อตรวจแยกชนิดของยีนที่ควบคุม การสร้างเอนไซม์ TEM, CTX-M, OXA และ SHV ของเชื้อ *E. coli* และทดสอบความไวและความจำเพาะ ของเทคนิคดังกล่าว โดยมุ่งหวังว่าการพัฒนาเทคนิคครั้งนี้ จะสามารถทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว ให้ผล ถูกต้องและนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทางอนุชีววิทยาได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ เทคนิค HDA
2. เพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะในการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ เทคนิค HDA กับวิธี Nucleotide sequencing

1.3 ขอบเขตของวิทยานิพนธ์

ทำการศึกษาเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 144 ตัวอย่าง โดยเชื้อทั้งหมดแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ของผู้ป่วยในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย ผ่านการวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานและการ ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disk diffusion method และทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk method แยกเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง และเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อด้วยวิธี ตกตะกอนด้วยเอทานอลเพื่อนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับ เบสของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} จากนั้นพัฒนาเทคนิค RPA เพื่อใช้ในการตรวจหายีน

*bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} และเทคนิค HDA เพื่อใช้ในการตรวจหายีน *bla*_{TEM} โดยหาปริมาณ ดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิ ความเข้มข้นไพรเมอร์ และเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยา จากนั้น นำเทคนิค RPA และ HDA ที่พัฒนาได้มาทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ทั้ง 144 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผล การตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} และ *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับเทคนิค HDA กับเทคนิค Nucleotide sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์หาความไวและความจำเพาะ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำเทคนิคการเพิ่มกรดนิวคลีอิกภายใต้อุณหภูมิเดียว ได้แก่ เทคนิค RPA และ เทคนิค HDA ไปใช้ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้แก่ *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ของเชื้อ *E. coli*
2. เทคนิคที่พัฒนาขึ้นไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทางอุณหภูมิที่ราคาแพง ทำการทดสอบได้ง่าย รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถทำการทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่มีเครื่องมือจำกัด
3. สามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในศึกษาการระบาดของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดทำแนวทางการป้องกันการแพร่กระจายของ เชื้อในโรงพยาบาล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อ *E. coli* และการก่อโรค

2.1.1 ชนิดของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรค

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ชนิดแกรมลบ รูปร่างแท่ง สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) โดยทั่วไปจะพบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่ก่อให้เกิดโรค ช่วยให้เกิดการสังเคราะห์วิตามิน K₂ และป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเจริญเติบโตได้ แต่บางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง โดยปนเปื้อนมากับอาหารหรือน้ำ นอกจากนี้ยังอาจก่อให้เกิดโรคติดเชื้อภายนอกระบบทางเดินอาหาร เช่น การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในระบบประสาท หรือติดเชื้อในกระแสเลือดได้ จึงสามารถแบ่งเชื้อ *E. coli* ตามพยาธิสภาพของการเกิดโรคได้ 8 ชนิด (24) ดังนี้

1) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง พบได้ในเด็กแรกเกิดและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต โดยกลไกการก่อโรคเริ่มจากเชื้อเข้าสู่ผนังลำไส้และเกาะติดเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์ (Cytoskeleton) และทำลาย Microvilli บริเวณนั้น เยื่อบุผนังลำไส้จะยื่นส่วนของเซลล์ออกมาล้อมรอบแบคทีเรียและกลืนแบคทีเรีย (Engulfment) เข้าไปในเซลล์ ไม่มีการบุกรุกเข้าเซลล์หรือการสร้างสารพิษทำลายเซลล์ คุณสมบัติการเกาะเยื่อบุผนังลำไส้ดังกล่าวเรียกว่า Entero-adherence factor (EAF)

2) Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงแบบมีเลือดปน (Haemorrhagic colitis) และสามารถก่อให้เกิดโรคเม็ดเลือดแดงแตก (Hemolytic uremic syndrome: HUS) ได้ พบได้ในคนทุกช่วงอายุแต่อาจก่อโรครุนแรงในเด็กและผู้สูงอายุ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีความสำคัญและมีการแพร่ระบาดมากคือ เชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยเมื่อเชื้อ EHEC เข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะใช้โครงสร้างส่วน Fimbriae เกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ส่วนปลาย และมีการสร้างสารพิษ (Cytotoxin) ที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ มีคุณสมบัติคล้าย Shiga toxin ที่สร้างจาก

เชื้อ *Shigella dysenteriae* จึงเรียกสารพิษนี้ว่า Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) หรือ Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC)

3) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ได้ในเด็กเล็กและผู้เดินทางไปยังประเทศกำลังพัฒนา โดยรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ จึงมีชื่อเรียกว่าโรค Traveler's diarrhea เชื้อ ETEC จะมีส่วนของ Colonization factor antigen (CFA) ที่อยู่บนผิวของ Fimbriae ทำให้สามารถเกาะผนังเยื่อบุลำไส้และสร้างสารพิษ (Enterotoxin) ออกมาทำลายเซลล์บริเวณนั้น อาการของผู้ที่ติดเชื้อชนิด ETEC จะมีอาการอุจจาระเหลว เป็นน้ำ (Watery diarrhea) มีไข้และปวดเกร็งบริเวณช่องท้อง คล้ายกับโรคอหิวาตกโรค

4) Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 1 ปี ทั้งในประเทศที่กำลังพัฒนาและประเทศที่พัฒนาแล้ว โดยกลไกการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ยังไม่แน่ชัด แต่มีการศึกษาว่าเชื้อ EAEC ไม่สร้างสารพิษมาทำลายเซลล์และพบว่าสามารถเข้าเกาะกับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงชนิด Hep-2 cell หรือ HeLa cell ได้ ผู้ที่ติดเชื้อจะมีอาการคลื่นไส้อาเจียนและอุจจาระเหลว

5) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกช่วงอายุ โดยได้รับการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อหรือติดต่อโดยตรงกับผู้สัมผัสสัมผัส ผู้ป่วย กลไกการก่อโรคคล้ายกับเชื้อกลุ่ม *Shigella* spp. เชื้อสามารถแทรกตัวเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังเซลล์ในลำไส้ใหญ่ โดยอาศัย Invasive virulence factor ที่เชื้อสร้างขึ้นจากการควบคุมของยีนที่อยู่บนพลาสมิด เมื่อเชื้อแทรกตัวเข้าไปในเซลล์ได้ เชื้อจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น ทำให้เซลล์แตก และลุกลามไปยังเซลล์ใกล้เคียงและทำลายเซลล์ในบริเวณนั้น ผู้ที่ติดเชื้อจึงเกิดอาการปวดบิดอย่างรุนแรง อุจจาระเป็นมูกเลือด และมีไข้ เนื่องจากลำไส้เป็นแผลอักเสบ

6) Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กอายุระหว่าง 1 - 5 ปี และโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะของผู้ใหญ่ อาการที่พบคืออุจจาระเหลวเป็นน้ำและอาหารไม่ย่อย จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อสามารถเกาะติดกับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงชนิด Hep-2 cell หรือ HeLa cell ได้เช่นเดียวกับเชื้อ EAEC เชื้อ DAEC สามารถสร้างสารที่ช่วยในการยึดเกาะเยื่อบุผนังลำไส้ (Fimbrial adhesin) ชื่อว่า F1845 และกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เปลี่ยนแปลงรูปร่างยืดยาวออกมาห่อหุ้มตัวเชื้อ เชื้อจึงแทรกตัวเข้าเซลล์และทำลายเนื้อเยื่อบริเวณนั้นได้

7) Uropathogenic *E. coli* (UPEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ หรือกรวยไตอักเสบ โดยปกติเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ แต่สามารถทำให้เกิดโรคได้ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องที่เชื้ออาจเล็ดลอดเข้าไปในระบบทางเดินปัสสาวะได้ กลไกการเกิดโรคเริ่มจากเชื้อจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในท่อปัสสาวะหรือกระเพาะปัสสาวะ และสร้าง P fimbriae, Hemolysin, Aerobactin, Serum resistance และ Encapsulation เพื่อช่วยในการเกาะติดเซลล์เยื่อและทำลายเซลล์บริเวณนั้นด้วยสารพิษที่สร้างขึ้น กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) และสร้างไบโอฟิล์ม ช่วยให้สามารถบุกรุกเข้าไปในส่วนต่อไปของระบบทางเดินปัสสาวะได้

8) Meningitis/ sepsis – associated *E. coli* (MNEC) เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด (Neonatal meningitidis) และทำให้เกิดการบกพร่องทางระบบประสาท อัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 15 – 40 โดยเด็กแรกเกิดอาจได้รับเชื้อ *E. coli* จากระบบทางเดินอาหารของแม่ในขณะคลอด และเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Sepsis) หากเชื้อมีปริมาณมากกว่า 10^3 CFU/ml เชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่ระบบประสาทโดยผ่านทาง Blood-brain barrier เข้าสู่สมองและระบบประสาททำให้เกิดการอักเสบได้

2.1.2 ระบาดวิทยา

แม้ว่าเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อไม่ก่อให้เกิดโรค ที่พบได้ทั่วไปในลำไส้ แต่เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทั้งในและนอกระบบทางเดินอาหาร โดยพบมากที่สุดในการติดเชื้อทางระบบทางเดินปัสสาวะ ร้อยละ 90 และมีโอกาสกลับมาติดเชื้อซ้ำภายใน 12 เดือนได้ถึงร้อยละ 44 (25) จากการศึกษาของ Stoll และคณะในปี 2011 (26) ได้ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด พบว่าเกิดจากเชื้อ Group B *Streptococcus* และ *E. coli* ร้อยละ 43 และ 29 ตามลำดับ และเชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตสูงที่สุดถึงร้อยละ 33 เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่มีการระบาดทั่วโลก มีการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าเชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะทั้งในและนอกโรงพยาบาล (community-acquired and nosocomial UTI) มากถึงร้อยละ 50 โดยร้อยละ 12-15 เกิดจากการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล และร้อยละ 4 มีอาการของอุจจาระร่วงร่วมด้วย (27) นอกจากนี้มีรายงานว่

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EPEC เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็ก ส่วนในผู้ใหญ่พบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ETEC ได้ร้อยละ 11-15 ในผู้ที่เดินทางไปยังประเทศกำลังพัฒนา โดยพบมากที่สุดในผู้ที่เดินทางไปยังประเทศเม็กซิโก (28) จากการศึกษาของ Hortiwakul และคณะในปี 2012 (29) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล พบว่าเกิดจากเชื้อ *E. coli* มากที่สุด คือร้อยละ 17.4 รองมาคือเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* ร้อยละ 15.2, 12.3 และ 10.3 ตามลำดับ

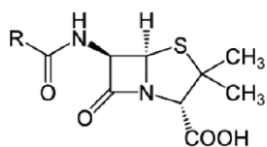
2.1.3 การรักษา

การรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ในลำไส้ ทำได้โดยการดื่มน้ำในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อชดเชยการขาดน้ำจากอาการอุจจาระร่วงและอาเจียน แต่ไม่ควรรักษาด้วยการให้ยาปฏิชีวนะเพราะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงที่จะเกิดอาการเม็ดเลือดแดงแตก (Hemolytic uremic syndrome) ได้ หากเชื้อที่ได้รับมีการผลิต Shiga-toxin อย่างไรก็ตามการให้ยาปฏิชีวนะหรือยาลดการเคลื่อนไหวตัวของลำไส้จะให้ผลดีหากผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ETEC ในกรณีที่ผู้ป่วยมีไข้สูงหรือมีอาการทางคลินิกของ Sepsis ร่วมด้วย ควรพิจารณาให้ยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin หรือ Ceftriaxone ส่วนการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ในระบบทางเดินปัสสาวะ ควรพิจารณาให้ยาปฏิชีวนะ Ofloxacin หรือ Ciprofloxacin หรือ Amoxicillin/Clavulanic acid ถ้าผู้ป่วยเคยรับยาในกลุ่ม Fluoroquinolones หรือ Cephalosporins มาก่อน อาจเกิดจากเชื้อ *E. coli* ชนิดที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ควรพิจารณาให้ยา Nitrofurantoin หรือ Fosfomycin ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงหรือรับประทานยาไม่ได้ ควรพิจารณาให้ยาฉีด Amikacin หรือ Gentamicin หรือ Ceftriaxone หรือ Ciprofloxacin จนอาการดีขึ้น และหากทราบว่าผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง ESBLs ควรพิจารณาให้ยา Ertapenem หรือ Piperacillin-Tazobactam หรือ Meropenem หรือ Imipenem หรือ Amikacin ผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* ที่มีภาวะ Sepsis หรือ Severe sepsis มักได้รับยาต้านจุลชีพฤทธิ์กว้างหรือยาต้านจุลชีพหลายขนานเพื่อให้ครอบคลุมเชื้อดื้อยาให้มากที่สุด โดยให้ยา กลุ่ม β -lactams เช่น Cephalosporins และ Carbapenems หากเป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาลหรือผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือมีความเสี่ยงของการติดเชื้อดื้อยา ควรพิจารณาให้ยา Piperacillin-Tazobactam หรือ Imipenem (30)

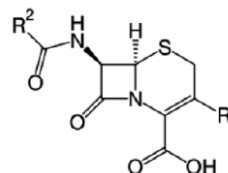
2.2 ยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams

ยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams เป็นยาที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่เป็นวงแหวน Amide ประกอบด้วยโมเลกุลคาร์บอน 3 อะตอม และโมเลกุลไนโตรเจน 1 อะตอม มีชื่อเรียกทางเคมีว่า Azetidione และมีโครงสร้างที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ (Pharmacophore) คือโครงสร้างวงแหวน β -lactam (β -lactam ring) เชื่อมกับวงแหวนคาร์บอน 5 หรือ 6 อะตอม (Fused bicyclic heterocyclic) ออกฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อ (Bactericidal) ได้ทั้งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยโครงสร้างของยามีลักษณะคล้ายกับ D-alanyl-D-alanine ในเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งโครงสร้างวงแหวน β -lactam สามารถจับกับตำแหน่งกัมมันต์ของ Penicillin binding proteins (PBPs) แทนที่ D-alanyl-D-alanine ได้ ทำให้ไม่เกิดกระบวนการ Transpeptidation เพื่อสร้าง Peptidoglycans ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้สมบูรณ์ ส่งผลให้ความแข็งแรงของผนังเซลล์ลดลง เชื้อจึงถูกทำลายได้ (31) ยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อยตามโครงสร้างโมเลกุล ดังรูปที่ 1

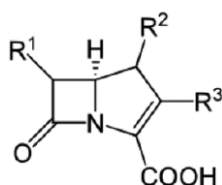
a. Core structure of penicillins



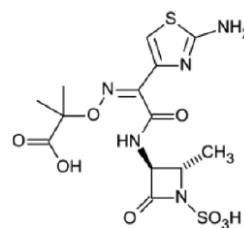
b. Core structure of cephalosporins



c. Core structure of carbapenems



d. aztreonam chemical structure



รูปที่ 1 โครงสร้างหลักของยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams a) ยากลุ่ม Penicillins

b) ยากลุ่ม Cephalosporins c) ยากลุ่ม Carbapenems d) ยากลุ่ม Monobactams (Aztreonam)

2.2.1 ยากลุ่ม Penicillins

ยา Penicillins เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มแรกที่มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ในปัจจุบันเชื่อได้ที่มีการพัฒนาให้ตัวยากลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น แต่ยังสามารถใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Neisseria* spp. และ *Listeria* spp. ได้ ยากลุ่ม Penicillins สามารถแบ่งประเภทของยาตามการออกฤทธิ์ได้ ดังนี้

1) Natural Penicillins ตัวอย่างยาประเภทนี้ เช่น Penicillin G และ Penicillin V มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างเอนไซม์ β -lactamase และเอนไซม์ Penicillinase เช่นเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* และ *Enterococcus* spp. และ *S. aureus* เป็นต้น (33)

2) Penicillinase-resistant Penicillins ตัวอย่างยาประเภทนี้ เช่น Methicillin, Nafcillin, Oxacillin และ Dicloxacillin มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่สร้างเอนไซม์ Penicillinase (34)

3) Aminopenicillins ตัวอย่างยาประเภทนี้ เช่น Ampicillin และ Amoxicillin มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเช่นเดียวกับยาประเภท Natural Penicillins แต่ออกฤทธิ์ได้กว้างกว่าและสามารถทำลายเชื้อที่สร้างเอนไซม์ Penicillinase และ β -lactamase ได้ อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมักจะพบการดื้อยา Ampicillin แต่ให้ผลการรักษาดีเมื่อให้คู่กับสารยับยั้ง β -lactamase เช่น Clavulanic acid และ Sulbactam (33)

4) Carboxypenicillins ตัวอย่างยาประเภทนี้ ได้แก่ Carbenicillin และ Ticarcillin มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Pseudomonas* spp. เนื่องจากยาสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดี โดย Ticarcillin จะออกฤทธิ์ได้ดีกว่า Carbenicillin (35)

2.2.2 ยากลุ่ม Cephalosporins

ยา Cephalosporins เป็นยาที่สกัดจากเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* มีคุณสมบัติออกฤทธิ์กว้างขึ้นและลดปัญหาการดื้อยาในกลุ่ม Penicillins และทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยากลุ่ม Cephalosporins ได้ถูกพัฒนาและในปัจจุบันจำแนกยาตามขอบเขตการออกฤทธิ์และโครงสร้างทางเคมีได้ 5 รุ่น (36, 37) ดังนี้

1) ยา Cephalosporins รุ่นที่ 1 (First generation Cephalosporins) ตัวอย่างยารุ่นนี้ เช่น Cephalothin, Cefazolin, Cephadroxil และ Cephalexin มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น เชื้อ Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) และ Group A *Streptococcus* นอกจากนี้ ยังออกฤทธิ์ได้กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *P. mirabilis* และ *E. coli* แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ β -lactamase

2) ยา Cephalosporins รุ่นที่ 2 (Second generation Cephalosporins) ตัวอย่างยารุ่นนี้ เช่น Cofactor, Cefprozil และ Cefamandole ออกฤทธิ์ได้กว้างกว่ารุ่นที่ 1 สามารถทำลายเชื้อ *Hemophilus influenzae*, *Enterobacter aerogenes* และ *Neisseria* spp. มีความทนต่อเอนไซม์ β -lactamase ได้มากขึ้นแต่ไม่ทนต่อ Extended-spectrum β -lactamase

3) ยา Cephalosporins รุ่นที่ 3 (Third generation Cephalosporins) ตัวอย่างยารุ่นนี้ เช่น Cefotaxime, Ceftriaxone และ Ceftazidime การออกฤทธิ์จะกว้างกว่ารุ่นที่ 2 และสามารถซึมผ่านเข้าสมองได้ มักใช้ในการรักษาโรคสมองอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ pneumococci, meningococci, *H. influenzae* และสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม *Enterobacterales* มีความทนต่อเอนไซม์ β -lactamase ได้มากขึ้น แต่ไม่ทนต่อ Extended-spectrum β -lactamase, AmpC β -lactamase และ Carbapenemase

4) ยา Cephalosporins รุ่นที่ 4 (Fourth generation Cephalosporins) ตัวอย่างยารุ่นนี้ เช่น Cefepime และ Cefpirome ถูกพัฒนาให้ออกฤทธิ์กว้างขึ้นกว่ารุ่นที่ 3 มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และทนต่อ AmpC β -lactamase

5) ยา Cephalosporins ที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ตัวอย่างของยารุ่นนี้ เช่น Ceftaroline และ Ceftriaxone นอกจากนี้ยังสามารถออกฤทธิ์ได้กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ใช้ไม่ได้กับเชื้อ *Pseudomonas* spp.

2.2.3 ยากลุ่ม Monobactams

ยากลุ่ม Monobactams เป็นยาที่มีโครงสร้างโมเลกุลหลัก 1 วงแหวนต่างจากยา β -lactam กลุ่มอื่น มีฤทธิ์ทำลายเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Neisseria* spp., *Pseudomonas* spp. ตัวอย่างยากลุ่มนี้ คือ Aztreonam (38)

2.2.4 ยากลุ่ม Carbapenems

ยากลุ่ม Carbapenems เป็นยาที่มีโครงสร้างคล้ายยากลุ่ม Penicillins แต่มีซัลเฟอร์อะตอมแทนที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่หนึ่ง ซึ่งมีคุณสมบัติจับได้กับ PBPs ของเซลล์ได้เช่นเดียวกัน และยาในกลุ่มนี้แต่ละชนิดมีความสามารถจับกับ PBPs ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน ออกฤทธิ์ได้ทั้งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น เชื้อกลุ่ม *Enterobacterales* และ *Staphylococcus spp.* นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทำลายเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ได้ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ยา Ertapenem, ยา Meropenem และ Imipenem (39)

2.3 กลไกการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียจะมีการปรับตัวต่อยาด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อที่จะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ หรือที่เรียกว่าการดื้อยาปฏิชีวนะ โดยหลังจากยาต้านจุลชีพ Penicillin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกได้ถูกคิดค้นและนำมาใช้ในการรักษา ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น รวมไปถึงการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการกลายพันธุ์ของ House keeping gene กลายเป็นยีนดื้อยาและแพร่กระจายไปยังเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น ๆ ผ่านการเพิ่มจำนวนและทางพลาสมิดหรือ transposon กลไกการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมีหลายกลไก ดังนี้

2.3.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ (Modification of the antibiotic molecule)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ในเชื้อแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับโมเลกุลของเซลล์ที่ทำให้ยาต้านจุลชีพสามารถเข้าสู่เซลล์ แต่ไม่สามารถจับกับเป้าหมาย (Target site) ได้ จึงเกิดการดื้อยา และอีกชนิดหนึ่งคือการดื้อยาต้านจุลชีพที่เกิดจากเชื้อผลิตโครงสร้างเป้าหมายของยาขึ้นมาใหม่ โดยมีลักษณะคล้ายโครงสร้างเดิม (Alternative target) ทำให้ยาต้านจุลชีพจับกับโครงสร้างใหม่แทน เช่น การผลิต PBP2a ของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสามารถพบการดื้อยา Imipenem ด้วยกลไกนี้ได้ในเชื้อ *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* (40)

2.3.2 การลดการดูดซึมยาต้านจุลชีพเข้าสู่เซลล์และการนำยาต้านจุลชีพออกนอกเซลล์ (Decreased antibiotic penetration and efflux)

โดยทั่วไปแล้ว ยาต้านจุลชีพจะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Outer membrane) ของแบคทีเรียเพื่อเข้าไปบริเวณภายในเซลล์หรือ Cytoplasmic membrane เพื่อทำลายเซลล์ เช่น ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Quinolones และ Macrolides จะถูกดูดซึมผ่านทาง Lipid bilayer และยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams จะถูกดูดซึมผ่าน Porins เยื่อแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งเยื่อแบคทีเรียแกรมลบ จะมีการพัฒนากลไกการดื้อยาเพื่อป้องกันไม่ให้อาต้านจุลชีพเข้าสู่เซลล์ได้ โดยเชื่อมีการกลายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Porins (Porin modification) ทำให้การซึมผ่านของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ลดน้อยลง ยาต้านจุลชีพบางกลุ่มจึงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้และไม่เกิดการทำลายเซลล์ ตัวอย่างเยื่อแบคทีเรียที่พบว่ามีกลไกการดื้อยาดังกล่าวนี้ คือ *E. coli*, *Salmonella spp.*, *N. gonorrhoeae* และ *A. baumannii* (41) นอกจากนี้เชื้อบางชนิดมีการส่งผ่านยีนดื้อยาให้สามารถสร้าง Energy-requiring membrane efflux pump เพื่อนำยาต้านจุลชีพออกจากเซลล์ได้ เรียกว่า กระบวนการ Efflux pump พบได้ทั้งในเยื่อแบคทีเรียแกรมลบและเยื่อแบคทีเรียแกรมบวก ในการดื้อยากลุ่ม Fluoroquinolones, β -lactams, Carbapenems และ Polymyxins การดื้อยาดังกล่าวนี้พบครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Tetracycline ในปี ค.ศ. 1970 (42)

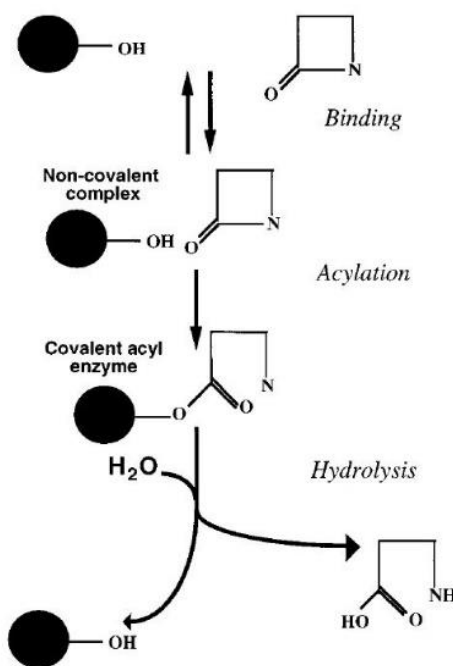
2.3.3 การสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายยาต้านจุลชีพ

เยื่อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาต้านจุลชีพที่มีการแพร่ระบาดภายในโรงพยาบาลส่วนใหญ่จะมีกลไกการสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายยา ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อ รวมถึงเชื้อ *E. coli* ที่มีกลไกการดื้อยาชนิดนี้เป็นกลไกหลัก (43) โดยสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams ทำให้ยาไม่สามารถยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเยื่อแบคทีเรียได้ เชื้อจึงอยู่รอดและเจริญต่อไป เยื่อแบคทีเรียมีการพัฒนาการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ให้สามารถดื้อยาหลายชนิดเพิ่มมากขึ้นในยุคที่มีการใช้ยา β -lactams อย่างแพร่หลาย จึงจัดกลุ่มเอนไซม์ β -lactamase ได้ตามการแสดงออกระดับฟีโนไทป์และระดับจีโนไทป์ Ambler และคณะ ในปี 1980 (44) ได้จัดกลุ่มเอนไซม์ β -lactamase ในระดับจีโนไทป์เป็น 4 กลุ่ม คือ Molecular class A, B, C และ D ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ที่จัดกลุ่มโดย Bush

ในปี 1995 (4) โดยลักษณะเด่นของ Molecular class A คือมีการแสดงออกของการดื้อยาแบบฤทธิ์ขยาย (Extended – spectrum third-generation cephalosporins โดยการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิด TEM, CTX-M และ SHV ที่ถูกควบคุมโดยยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , และ bla_{SHV} ตามลำดับ ซึ่งพบได้มากในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriales* แต่ในเชื้อ *Acinetobacter spp.* และ *Pseudomonas spp.* จะพบเป็นเอนไซม์ชนิด VEB และ PER ในขณะที่เชื้อ *Klebsiella spp.* จะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิด KPC ที่ดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems ได้ นอกจากนี้ เชื้อ *E. coli* โดยทั่วไป จะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในกลุ่ม Molecular class C ชื่อว่าเอนไซม์ AmpC β -lactamase ได้ในปริมาณต่ำ ๆ เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยาในกลุ่ม β -lactams โดยเฉพาะ Cefoxitin หากเกิดการกลายพันธุ์ของ Promotor จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น (Overexpression) หรือลดลง ทำให้เกิดการดื้อยาได้มากขึ้น (45) เอนไซม์ในกลุ่ม Molecular class D ได้แก่ เอนไซม์ชนิด OXA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Plasmid cephalosporinase และ Carbapenemase

2.4 เอนไซม์ β -lactamase

β -lactamase คือเอนไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นมีฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม β -lactams ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการดื้อยาในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่พบในแบคทีเรียแกรมลบ กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพ เกิดจากโครงสร้างทางเคมีส่วนวงแหวน β -lactam (β -lactam ring) ของยาถูกทำลาย ทำให้ยาด้านจุลชีพไม่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยแบ่งได้เป็น 2 กลไก คือ 1) Serine ester mechanism เกิดจากหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) แขนงข้างของ Serine ในเอนไซม์เข้าจับกับหมู่เอซิล (Acyl group) ของวงแหวน β -lactam เรียกว่ากระบวนการ Acylation ได้เป็น Covalent acyl ester enzyme จากนั้นเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ทำให้โครงสร้างของยา β -lactams เปลี่ยนแปลงไป ไม่สามารถจับกับ PBPs เพื่อหยุดการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อได้ เชื้อจึงเจริญต่อไปได้ และส่งผลให้เกิดการดื้อยา เรียกเอนไซม์ β -lactamase ที่เกิดกลไกลักษณะนี้ว่า Serine β -lactamase พบได้ใน Molecular β -lactamase class A, C และ D (รูปที่ 2) (46) 2) Zinc Ions mechanism มีกลไกการดื้อยาคู่กับ Serine β -lactamase แต่การเข้าจับกับหมู่เอซิลของวงแหวน β -lactam ของยาจะใช้ Zinc Ions แทน Serine กลไกลักษณะนี้พบได้ใน Molecular β -lactamase class B ซึ่งพบเป็นส่วนน้อย (47)



รูปที่ 2 กลไกการตัดยาของเอนไซม์ Serine β -lactamase (46)

การจัดกลุ่มของเอนไซม์ β -lactamase มีการเริ่มจัดกลุ่มตั้งแต่ ค.ศ. 1970 โดย Jack และ Richmond (48) แบ่งตามคุณสมบัติทางชีวเคมี ต่อมาการศึกษาของ Richmond และ Sykes (1973) (49) ได้จัดกลุ่มเพิ่มเติมโดยแบ่งตามคุณสมบัติการทำลายยาต้านจุลชีพ β -lactams ระบบนี้นิยมกันอย่างแพร่หลายประมาณ 15 ปี จากนั้นได้มีการจัดกลุ่มใหม่อีกครั้ง โดยการศึกษาของ Bush ในปี 1995 (4) ได้จัดกลุ่มของเอนไซม์ β -lactamase โดยทดสอบกับ ยาต้านจุลชีพ Penicillin, Oxacillin, Carbenicillin, Cephazolidine, Expanded-spectrum Cephalosporins, Imipenem และการถูกยับยั้งจาก Clavulanate เรียกว่าระบบ Bush-Jacoby Medeiros group การจัดกลุ่มของเอนไซม์ β -lactamase ในระดับจีโนมไทป์ ได้เกิดขึ้นครั้งแรกโดย Ambler ในปี 1980 (44) โดยทำการศึกษา ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase และศึกษาตำแหน่งการเรียงตัวของกรดอะมิโน เรียกว่า ระบบแบบแผนการจัดจำแนกทางโมเลกุลของเอนไซม์ (Molecular classification) การจัดกลุ่มเอนไซม์ β -lactamase ที่นิยมใช้ในปัจจุบันมี 2 ระบบคือ ระบบ Bush-Jacoby Medeiros group และระบบ Molecular class ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มของเอนไซม์ β -lactamase (4, 44)

Bush-Jacoby Medeiros group (4)	Molecular class (44)	ยาเป้าหมายในการออกฤทธิ์	ตัวอย่างเอนไซม์
1	C	Cephalosporins	AmpC β -lactamase
2a	A	Penicillins	Penicillinase
2b	A	Penicillins, Cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicillins, Narrow-spectrum และ Extended-spectrum cephalosporins, Monobactams	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6
2br	A	Penicillins	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicillins, Carbenicillin	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicillins, Cloxacillin	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Cephalosporins	Inducible cephalosporinases
2f	A	Penicillins, Cephalosporins, Carbapenems	NMC-A
3	B	Most β -lactams, carbapenems	L1
4	-	Penicillins	Penicillinase

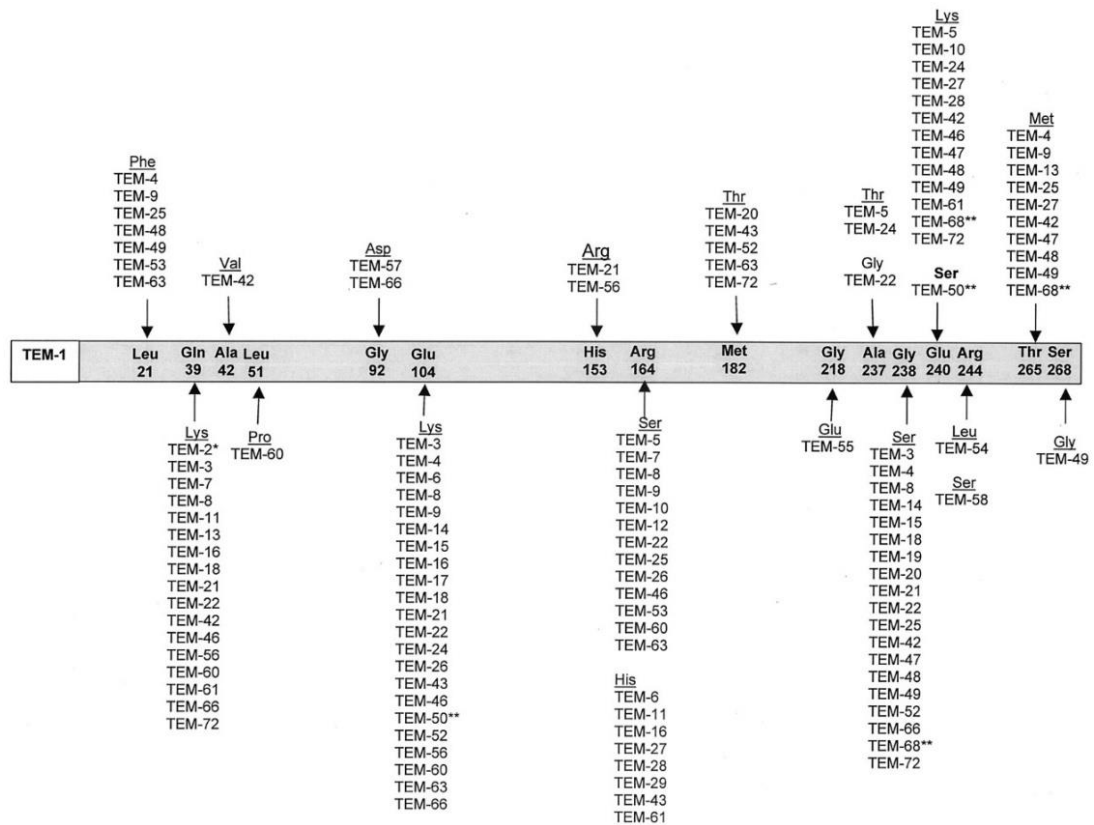
2.5 Extended-spectrum β -lactamase

หลังจากมีการใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Oxyimino-cephalosporin ซึ่งเป็น 3rd Generation cephalosporin เพื่อรักษาโรคติดเชื้ออย่างแพร่หลาย ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อยาในกลุ่ม β -lactams เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase และมีความสามารถในการเพิ่มขยายฤทธิ์

ในการทำลายยาในกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น และเกิดการกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง จนเกิดเอนไซม์ β -lactamase มากกว่า 180 สายพันธุ์ จึงเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า Extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) (50) คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์กลุ่มนี้คือ สามารถทำลายยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactam ได้หลายชนิด โดยใช้วิธี Hydrolysis ยกเว้น ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Cephamycins และ Carbapenems และถูกยับยั้งได้ด้วยสารยับยั้ง β -lactamase ได้แก่ Clavulanic acid, Tazobactam และ Sulbactam ต่อมาเกิดการกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้เกิดเอนไซม์ชนิด TEM มากกว่า 90 สายพันธุ์และชนิด SHV มากกว่า 25 สายพันธุ์ ส่งผลให้การใช้ยาในกลุ่ม β -lactams รักษาได้ผลน้อยลง

2.5.1 TEM type

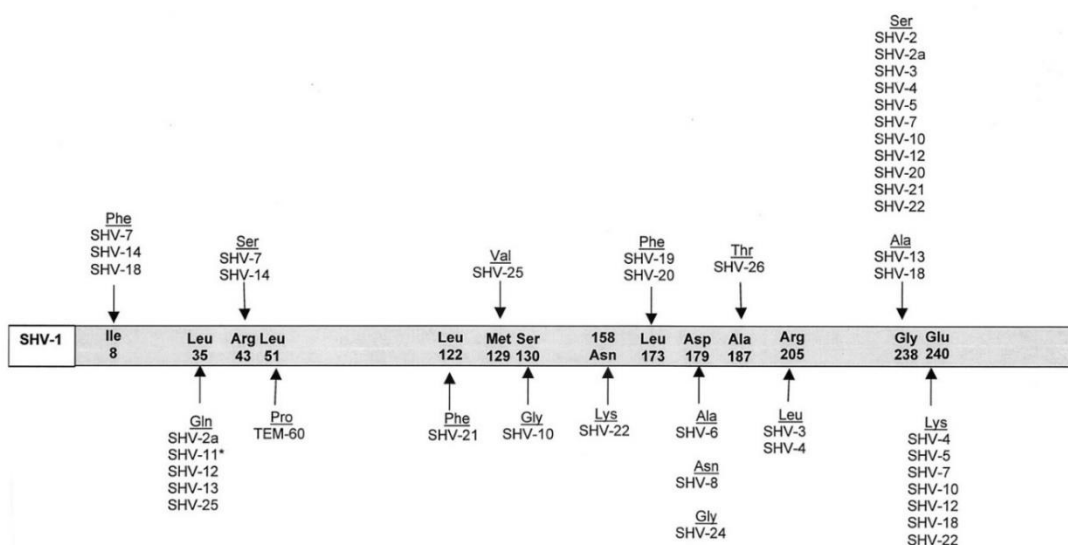
เอนไซม์ β -lactamase ชนิด TEM ได้ถูกรายงานครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1965 ได้จากการตรวจพบเอนไซม์ที่มียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิด TEM-1 ในพลาสมิดจากเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยชื่อ Temoniera โดยเชื้อ *E. coli* ที่พบ เกิดการดื้อยา Penicillins และ 1st Generation cephalosporins จากการทำปฏิกิริยา Hydrolysis แต่ไม่ดื้อต่อยา Oxyimino-cephalosporins คล้ายกับชนิด SHV-1 (51) TEM-1 จัดเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติ Broad-spectrum β -lactamase และมีการแพร่กระจายผ่านทางพลาสมิดและ Transposon ไปยังเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น เชื้อแบคทีเรียใน กลุ่ม *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa*, *Hemophilus influenzae* และ *Neisseria gonorrhoeae* ต่อมาพบการกลายพันธุ์โดยการแทนที่ของกรดอะมิโนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Isoelectric point ทำให้เกิดเอนไซม์ชนิดใหม่คือ TEM-2 แต่มีการแสดงออกของการดื้อยาเหมือน TEM-1 (52) ในปี ค.ศ. 1989 ได้มีการรายงานการพบเอนไซม์ชนิด TEM ที่มีคุณสมบัติทำลายยาในกลุ่ม Oxyimino-cephalosporins เป็นชนิดแรก คือ TEM-3 (53) และมีการกลายพันธุ์จากการแทนที่กรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของ TEM-1 เดิมเพิ่มมากขึ้น เกิดเป็น TEM ชนิดใหม่มากกว่า 90 ชนิด ดังรูปที่ 3 โดยเอนไซม์ β -lactamase ชนิด TEM ถูกควบคุมโดยยีน *bla_{TEM}* ในพลาสมิด จัดอยู่ใน Molecular class A และพบมากที่สุด ในเชื้อ *E. coli* (9)



รูปที่ 3 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน TEM-1 ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ TEM ชนิดต่าง ๆ และมีคุณสมบัติในการทำลายยาปฏิชีวนะ Oxyimino-cephalosporins แตกต่างกัน (9)

2.5.2 SHV type

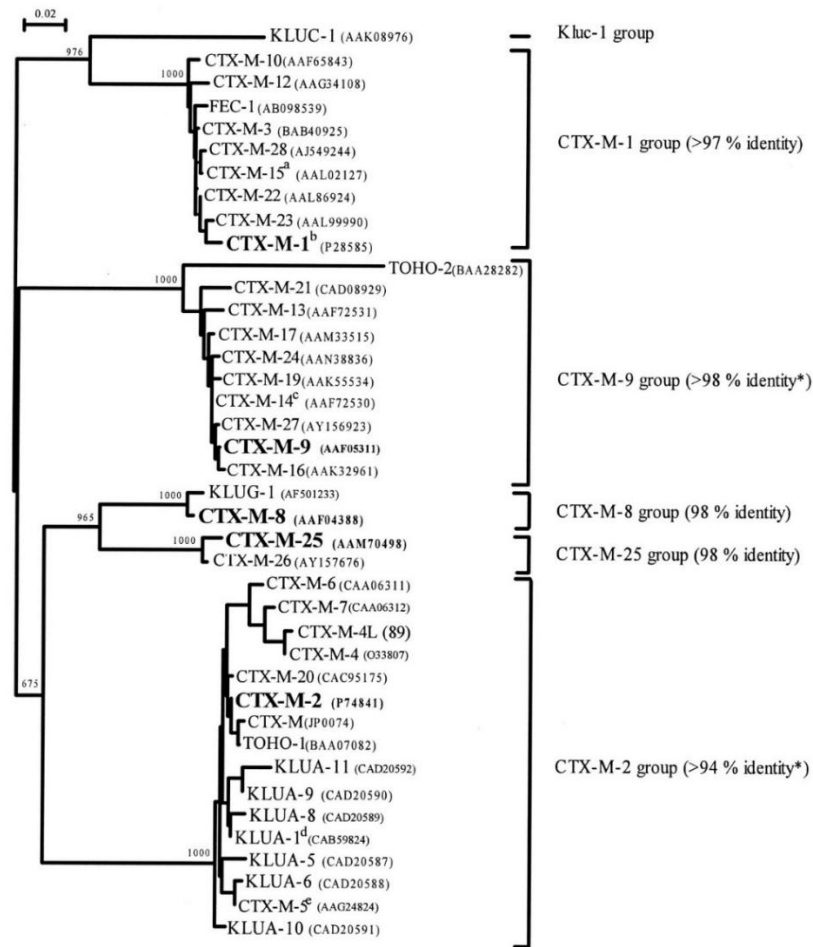
เอนไซม์ β -lactamase ชนิด SHV (Sulphydryl variable) ที่พบครั้งแรกคือ SHV-1 จากเชื้อ *K. pneumoniae* ถูกควบคุมโดยยีน bla_{SHV} ที่อยู่บนโครโมโซม (54) มีคุณสมบัติ ทำลายยาปฏิชีวนะ Penicillins และกลุ่ม Cephalosporin ชนิดแรก ๆ ได้ ต่อมาเกิดการแพร่กระจายส่งต่อยีนทางพลาสมิด และเกิดการกลายพันธุ์จากการแทนที่ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนสาย SHV-1 ทำให้เกิดเป็น SHV ชนิดใหม่และพบในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriales* ชนิดอื่น ๆ แต่ยังคงพบมากที่สุดในเชื้อ *K. pneumoniae* เอนไซม์ β -lactamase ชนิด SHV-1 จัดอยู่ในกลุ่ม Molecular class A มีโครงสร้างและคุณสมบัติคล้ายคลึงกับชนิด TEM แต่พบการกลายพันธุ์ได้น้อยกว่าชนิด TEM-1 ซึ่งปัจจุบันพบประมาณ 25 ชนิด ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็น ESBLs สามารถทำลายยาต้านจุลชีพกลุ่ม Oxyimino-cephalosporin และ Monobactam ได้ (55)



รูปที่ 4 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน SHV-1 ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ SHV ชนิดต่าง ๆ (9)

2.5.3 CTX-M type

เอนไซม์ β -lactamase ชนิด CTX-M (Cefotaximase) เป็นเอนไซม์กลุ่มที่มีคุณสมบัติทำลายยา Cephalothin, Cephaloridine และ Cefotaxime ได้ดี และถูกยับยั้งได้ด้วยสารต้าน β -lactamase ชื่อว่า Tazobactam ได้ดีกว่า Sulbactam หรือ Clavulanate พบในเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar, *Typhimurium* และ *E. coli* รวมถึงเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriales* บางชนิด (56) เอนไซม์ β -lactamase ชนิด CTX-M ถูกควบคุมโดยยีน bla_{CTX-M} และสามารถถ่ายโอนผ่านทางพลาสมิดหรือ transposon โดยมีต้นกำเนิดมาจาก Chromosomal ESBLs gene ของเชื้อ *Kluyvera* spp. (57) แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเอนไซม์ชนิด TEM หรือ SHV (54) ปัจจุบันพบเอนไซม์ชนิด CTX มากกว่า 100 ชนิด ซึ่งถูกจัดอยู่ใน Molecular class A และสามารถแบ่งตามการเรียงลำดับของกรดอะมิโนได้เป็น 5 กลุ่ม คือ CTX-M group 1, 2, 8, 9 และ 25 (58) (รูปที่ 5) มีการศึกษาว่าเอนไซม์ในกลุ่ม CTX-M ทุกชนิด มีกรดอะมิโน Serine ที่ตำแหน่ง 237 ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น ESBLs (54)



รูปที่ 5 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ β -lactamase ชนิด CTX ตามการเรียงลำดับของกรดอะมิโน (58)

2.5.4 OXA type

เอนไซม์ β -lactamase ชนิด OXA (Oxacillinase) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Molecular class D มีคุณสมบัติทำลายยาต้านจุลชีพกลุ่ม Cloxacillin และ Oxacillin ส่วนใหญ่พบในเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด (59) ในเชื้อ *E. coli* พบเอนไซม์ OXA-1 ได้ร้อยละ 1 – 10 (55) แต่ไม่มีคุณสมบัติเป็น ESBLs โดยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติ ESBLs เป็นชนิดแรกคือ เอนไซม์ OXA-10 ซึ่งทำลายยากลุ่ม Ampicillin, Cephalothin, Oxacillin และ Cloxacillin แต่ไม่ทำลายยากลุ่ม Carbapenems และถูกยับยั้งได้ด้วยสารยับยั้ง β -lactamase เช่น Clavulanic acid ได้ไม่ดี (4) เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น ESBLs ส่วนใหญ่กลายพันธุ์มาจากเอนไซม์ชนิดนี้ ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีถิ่นสร้างเอนไซม์ชนิด OXA จะมีระดับการทำลายยา Oxymino-cephalosporins สูงกว่าเอนไซม์ชนิด OXA ที่สร้างจากเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* (60)

2.5.5 Miscellaneous ESBLs

เอนไซม์ ESBLs ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ในกลุ่ม TEM และ SHV และสามารถจัดกลุ่มได้ แต่มีเอนไซม์ ESBLs บางชนิดที่ไม่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเอนไซม์ชนิด TEM และ SHV จึงไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ เช่น เอนไซม์ ESBLs ชนิด PER ซึ่งพบครั้งแรกในเชื้อ *P. aeruginosa* (61) และมีส่วนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ TEM และ SHV เพียงร้อยละ 25 – 27 (62) เอนไซม์ ESBLs ชนิด GES พบในเชื้อ *K. pneumoniae* มีคุณสมบัติทำลายยาในกลุ่ม Penicillins และ Extended-spectrum cephalosporins แต่ไม่ทำลายยาในกลุ่ม Cephamycins และ Carbapenems (63) นอกจากนี้มีเอนไซม์ ESBLs ชนิด BES-1, CME-1, VEB-1, SFO-1 และอื่น ๆ แต่พบได้ไม่บ่อย

2.6 การตรวจหาการผลิตเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs มีประโยชน์ในด้านการป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาลและการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา สามารถทดสอบได้ทั้งในระดับพีโนไทป์และจีโนไทป์ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.6.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในระดับพีโนไทป์

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในระดับพีโนไทป์ เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจคัดกรอง เพราะมีขั้นตอนไม่ยุ่งยากและแปลผลการทดสอบได้ง่าย แต่ใช้เวลาการทดสอบนานและมีความไวความจำเพาะ ต่ำกว่าการตรวจในระดับจีโนไทป์ นอกจากนี้ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ โดยใช้หลักเกณฑ์เดียวกัน ทำให้ผลการวิเคราะห์แม่นยำมากขึ้น (64) ปัจจุบัน CLSI ได้กำหนดวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจคัดกรองและการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ระดับพีโนไทป์ รวมถึงค่าจุดตัดความไวเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion test และ Minimal Inhibitory Concentration (MIC) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจคัดกรองและการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ระดับฟีนไทป์

การทดสอบ	วิธีการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Disk diffusion	วิธีการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Disk diffusion
ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ	สำหรับเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> และ <i>E. coli</i> Cefpodoxime 10 µg หรือ Ceftaxidime 30 µg หรือ Aztreonam 30 µg หรือ Cefotaxime 30 µg หรือ Ceftriaxone 30 µg สำหรับเชื้อ <i>Proteus mirabilis</i> Cefpodoxime 10 µg หรือ Ceftaxidime 30 µg หรือ Cefotaxime 30 µg	Ceftaxidime 30 µg Ceftazidime/Clavulanate 30/10 µg และ Cefotaxime 30 µg Cefotaxime/Clavulanate 30/10 µg
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม	35 °C ± 2 °C	35 °C ± 2 °C
เวลาที่ใช้ในการบ่ม	16 – 18 ชั่วโมง	16 – 18 ชั่วโมง
การแปลผล	สำหรับเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> และ <i>E. coli</i> Cefpodoxime zone ≤ 17 มม. Ceftaxidime zone ≤ 22 มม. Aztreonam zone ≤ 27 มม. Cefotaxime zone ≤ 27 มม. Ceftriaxone zone ≤ 25 มม. สำหรับเชื้อ <i>P. mirabilis</i> Cefpodoxime ≤ 22 มิลลิเมตร Ceftaxidime ≤ 22 มิลลิเมตร Cefotaxime ≤ 27 มิลลิเมตร	เปรียบเทียบ Inhibition zone ระหว่าง Ceftaxidime และ Ceftazidime/Clavulanate หรือ Cefotaxime และ Cefotaxime/Clavulanate หากมี ความกว้าง ≥ 5 มม. ในคูใดคูหนึ่ง หรือทั้งสองคู่ จัดว่าเป็น ESBLs

2.6.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในระดับจีโนม

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในระดับจีโนม เป็นวิธีที่มีความจำเพาะกว่าการตรวจในระดับฟีโนไทป์ มักใช้ในการตรวจยืนยัน วิธีที่นิยมทำการคือ วิธี PCR เพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs และวิธี Nucleotide sequencing เพื่อแยกเอนไซม์ ESBLs กับ Non ESBLs และแยกชนิดอนุพันธ์ของเอนไซม์ ESBLs กลุ่มต่าง ๆ วิธีนี้มีความจำเพาะสูงจึงใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจระดับจีโนม แต่ข้อเสียคืออาจให้ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่แตกต่างตามเทคนิคที่เลือกใช้ (9) นอกจากนี้มีการศึกษาวิธีการตรวจในระดับจีโนมวิธีอื่น ๆ เช่น Multiplex PCR (65), Real-time PCR (66) และ Reverse-line hybridization (67) เป็นต้น ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาด้านระบาดวิทยา มีความไวและความจำเพาะสูง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและใช้ผู้ที่ชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ ทำให้ไม่สามารถใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือการทดสอบภาคสนามได้

2.7 การศึกษาวิทยาการระบาดของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs

เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBLs เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วโลกและเป็นปัญหาสำคัญของการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล จากการศึกษาระบาดของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ พบว่ามีความแตกต่างของลักษณะทางจีโนมในแต่ละประเทศ เมืองและสถานที่ ยกตัวอย่างดังต่อไปนี้

Yan และคณะ (2006) (68) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs และ AmpC β -lactamase ชนิด SHV ที่พบในตอนใต้ของประเทศไต้หวัน โดยทดสอบด้วยวิธี IEF, Conjugation experiments, Plasmid analysis, PCR และ DNA sequencing พบว่า เชื้อทั้งสองชนิดมีการสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M และ SHV มากที่สุด ส่วนเอนไซม์ AmpC β -lactamase จะพบเป็นชนิด CMY-2-like และ DHA-1-like β -lactamase มากที่สุด

Spanu และคณะ (2011) (69) ได้ทำการศึกษาอุบัติการณ์ของการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม *Enterobacteriales* ในประเทศอิตาลี ที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs โดยใช้วิธี Colony blot hybridization บนแผ่น Nylon membrane จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อที่แยกได้มียีน *bla*_{TEM} และ *bla*_{SHV} และสามารถสร้างเอนไซม์ชนิด TEM, SHV, TEM-SHV และ non-TEM non-SHV ESBL

และพบว่าเป็นชนิด TEM มากกว่า SHV นอกจากนี้ยังพบว่า บ่อยครั้งที่เชื้อที่มีการดื้อยาต้านจุลชีพ β -lactams จะมีการดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycosides และ Ciprofloxacin ด้วย

Rezai และคณะ (2015) (70) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์ ESBLs ของผู้ป่วยโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในตอนเหนือของประเทศอิหร่าน ด้วยวิธี PCR พบว่า พบยีน bla_{TEM} มากที่สุดคือร้อยละ 49 รองลงมาคือ SHV, CTX, VEB และ GES ร้อยละ 44, 28, 8 และ 0 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในระดับพีโนไทป์พบว่า เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้มีความไวต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Carbapenems ร้อยละ 66 และ Amikacin ร้อยละ 58 และดื้อต่อยา Cefixime ร้อยละ 99, Colistin ร้อยละ 82 และ Ciprofloxacin ร้อยละ 76

Sheng และคณะ (2013) (71) ได้ทำการรวบรวมข้อมูลของการศึกษาของเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriales* ที่มียีนดื้อยา ESBLs ในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2008 ถึง 2009 เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลการติดตามแนวโน้มการดื้อยา (Monitoring Antimicrobial Resistance Trends: SMART) ผลการทดสอบพบว่า เชื้อที่มีการแสดงออกของยีนดื้อยา ESBLs สูงที่สุดคือ เชื้อ *E. coli* พบร้อยละ 61.2 การศึกษาชนิดของเอนไซม์ β -lactamase ของกลุ่มตัวอย่าง พบว่า เอนไซม์ชนิด CTX-M เป็นเอนไซม์ ESBLs ที่พบมากที่สุด คือร้อยละ 84.1 รองลงมาคือ SHV และ TEM ร้อยละ 8.4 และ 0.5 ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ AmpC β -lactamase ชนิดที่พบมากที่สุดคือ CMY และเอนไซม์ Carbapenemase ชนิดที่พบมากที่สุด คือ NDM

Chanawong และคณะ (2001) (72) ได้ทำการศึกษาเชื้อแกรมลบรูปร่างแท่งกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas* spp. ที่มีการสร้างเอนไซม์ชนิด SHV-12, SHV-5 และ VEB-1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในประเทศไทย โดยทำการตรวจหายีน bla_{TEM} , bla_{PER-1} , $bla_{CTX-M-1}$, bla_{VEB} , bla_{OXA-10} และ bla_{SHV} ด้วยวิธี PCR, PCR-SSCP และ PCR-RFLP นอกจากนี้ทำการทดสอบ Nucleotide sequencing, Plasmid DNA analysis, Southern blotting และ Hybridization จากผลการทดสอบพบว่า เชื้อแกรมลบรูปร่างแท่งมียีน bla_{TEM} มากที่สุด คือร้อยละ 64.3 และร้อยละ 39.3, 21.4 และ 32.1 มียีน bla_{CTX-M} , bla_{SHV} และ bla_{VEB} ตามลำดับ

Kiratisin และคณะ ในปี 2008 (73) ได้ทำการศึกษาความชุกและลักษณะระดับโมเลกุลของเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ดื้อยาต้านจุลชีพ ESBLs ของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ในประเทศไทย

ซึ่งเป็นแหล่งระบาดของเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M จากผลการวิจัยพบว่า เชื้อ *E. coli* มียีนดื้อยา bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{VEB} , bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} ร้อยละ 77.0, 3.8, 8.5, 99.6 และ 8.1 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *K. pneumoniae* มียีนดื้อยา bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{VEB} , bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} ร้อยละ 71.7, 87.4, 10.2, 99.2 และ 11.8 ตามลำดับ (73)

2.8 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

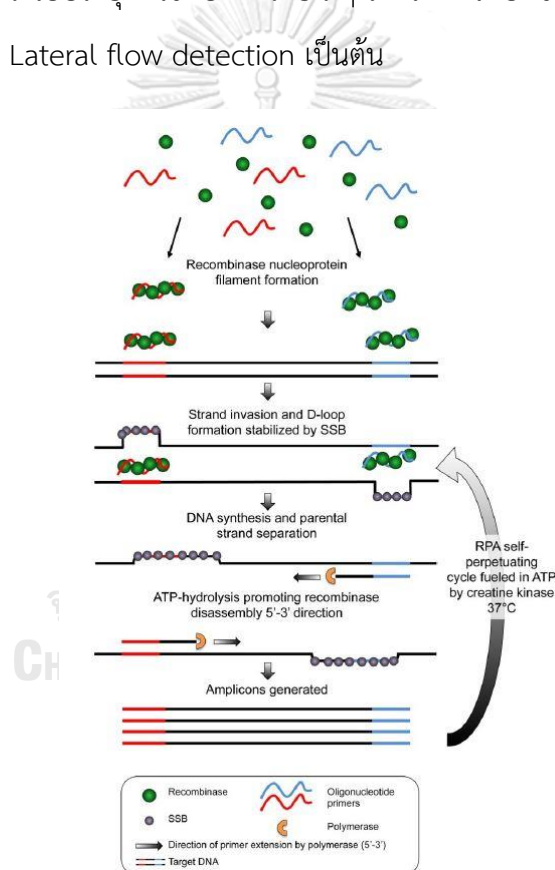
2.8.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา RPA

เทคนิค RPA เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยา เพื่อเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ของยีนที่สนใจภายใต้อุณหภูมิเดียว โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวทำปฏิกิริยา (Enzyme-based Isothermal nucleic acid amplification) ถูกคิดค้นขึ้นโดย Piepenburg และคณะ ในปี 2006 (74) และเริ่มเป็นที่สนใจมากขึ้นในปี 2010 จุดเด่นของเทคนิคนี้คือ การใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ ซึ่งง่ายต่อการออกแบบ ใช้อุณหภูมิเดียวในการทำปฏิกิริยา รวดเร็ว มีความไว และ ความจำเพาะสูง

เทคนิค RPA อาศัยหลักการทำงานของโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ Recombinase protein (69), ssDNA binding protein (SSB) และ DNA polymerase with strand-displacing activity (*Sau* polymerase) โดยเมื่อเริ่มปฏิกิริยา RecA จะจับกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายเกิดเป็น RecA Nucleoprotein filament ซึ่งสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอทดสอบเพื่อทำการแยกสายคู่บริเวณเบสคู่สมให้เป็นลักษณะคล้ายรูปตัว D (D – loop structure) และมี SSBs ที่ช่วยตรึงสายดีเอ็นเอที่แยกออกเพื่อไม่ให้เกิดการกลับมาจับคู่ซ้ำ จากนั้น RecA จะหลุดออกจาก Nucleoprotein filament ด้วยกระบวนการ ATP – hydrolysis ซึ่ง RecA ที่หลุดออกจะไปจับกับดีเอ็นเอสายใหม่ได้ เรียกว่ากระบวนการ RPA self – perpetuating และเกิดการต่อสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยอาศัยการทำงานของ *Sau* polymerase จึงเกิดผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายได้เป็นจำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 6 อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยาคือ 37 – 42 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการทดสอบ 20 – 40 นาที

ชุดทดสอบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกโดยใช้เทคนิค RPA มีจัดจำหน่ายในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ชุดน้ำยาประกอบด้วย Rehydration buffer, แมกนีเซียมอะซิเตต (Magnesium Acetate) ปริมาณความเข้มข้น 280 มิลลิโมลาร์, หลอดปฏิกิริยา RPA ที่อยู่ในรูปแบบแห้ง (Lyophilized RPA reagent)

และชุดควบคุมบวก นอกจากนี้ ชุดทดสอบ RPA ยังมีให้เลือกหลายแบบขึ้นอยู่กับชนิดของกรดนิวคลีอิก และมีชุดทดสอบที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* และ *Campylobacter* spp. เป็นต้น การทดสอบปฏิกิริยา RPA และการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา RPA มีทั้งหมด 5 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 3 การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค RPA จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจระดับจีโนมได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก มีความจำเพาะสูง และเหมาะกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือการทดสอบภาคสนาม เพราะใช้เพียงอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง หรือตู้อบเพาะเชื้อ นอกจากนี้ ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคอื่น ๆ ได้หลากหลาย เช่น การทดสอบผลิตภัณฑ์ด้วย Real-time RPA และ Lateral flow detection เป็นต้น



รูปที่ 6 กลไกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค RPA (11)

ตารางที่ 3 ขั้นตอนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป TwistAmp®

ขั้นตอนที่	สารละลายที่ใช้	ความเข้มข้น	ปริมาตรสารละลายที่ใช้ต่อ 1 การทดสอบ (µL)
1	ผสมสารละลาย ดังต่อไปนี้ ลงในหลอดทดลอง		
	Forward primer	10 uM	2.4
	Reverse primer	10 uM	2.4
	Rehydration buffer		29.5
	ดีเอ็นเอต้นแบบและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ		13.2
	เขย่าและปั่นตกตะกอน		
2	ปิเปตต์สารละลายในขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 47.5 µL ใส่ในหลอดปฏิกิริยา RPA แบบแห้ง		
3	เติม แมกนีเซียมอะซิเตต ปริมาตร 2.5 µL		
4	บ่มที่อุณหภูมิ 37 – 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 – 40 นาที		
5	ทดสอบผลิตภัณฑ์ RPA ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น Agarose gel electrophoresis, Lateral flow strip		

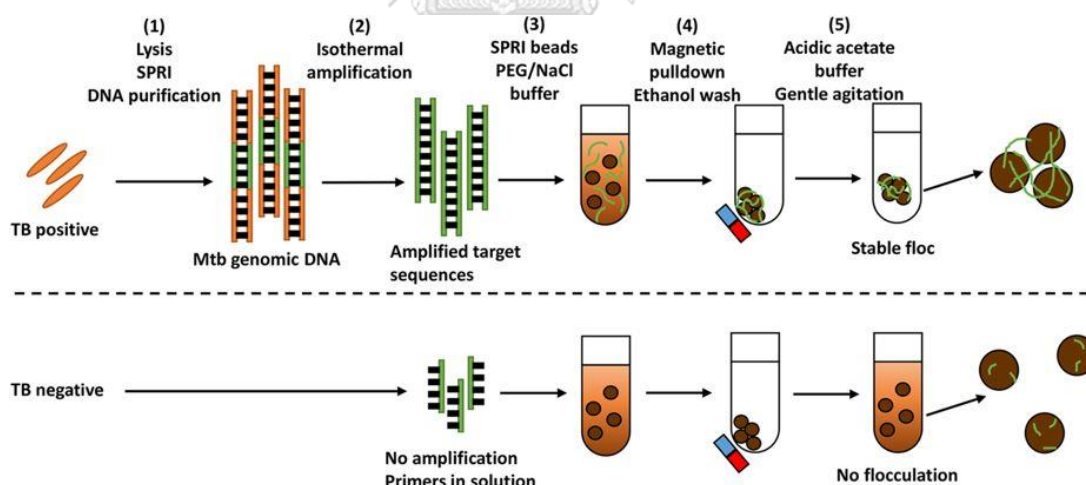
2.8.2 วิธีที่ใช้ตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิค RPA

2.8.2.1 วิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose Gel electrophoresis)

วิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่เพิ่มขึ้น ทำได้โดยการใช้แผ่นวุ้นอะกาโรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามขนาดของผลิตภัณฑ์ RPA และนำไปทำให้เกิดการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่องแยกวิเคราะห์สารพันธุกรรมในแนวนอน ทำให้ได้แถบ (Band) ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยเครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แต่การตรวจวัดด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องทำการทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA (DNA purification) ก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด Smear band ซึ่งจะให้อ่านผลได้ยาก (75)

2.8.2.2 วิธีการตรวจวัดจากการตกตะกอน (Bridging flocculation)

วิธีการตรวจวัดจากการตกตะกอน เป็นวิธีที่อ่านผลได้ง่ายด้วยตาเปล่า เหมาะสำหรับ การทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-care testing) เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะและ มีราคาถูก จากการศึกษานี้ของ Wee และคณะ ในปี 2015 (76) ได้ทำการตรวจวัด DNA methylation biomarkers ในเซลล์มะเร็ง โดยใช้เทคนิค RPA และอ่านผลด้วย SPRI magnetic beads ในการ ทำปฏิกิริยา Bridging flocculation ประสิทธิภาพของการตรวจวัดขึ้นอยู่กับ การปรับความเข้มข้น ของเกลือ pH ความยาวของผลิตภัณฑ์ RPA ต้องมีความยาวอย่างน้อย 100 คู่เบส เพื่อให้สามารถ เชื่อมอนุภาคโพลิเมอร์และเกิดการจับกันตกตะกอนได้ (รูปที่ 7) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ng และคณะ ในปี 2015 (77) ได้ทำการพัฒนาการตรวจเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยใช้เทคนิค RPA ร่วมกับ Bridging flocculation ซึ่งมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 7 การตรวจวัดผลิตภัณฑ์ RPA ด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถอ่านผลได้ชัดเจน รวดเร็วและราคาถูก แต่มีขั้นตอนการเดิมสารภายหลัง การเกิดปฏิกิริยาซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนและไม่สามารถตรวจแยกกรณีที่มีผลิตภัณฑ์ RPA มากกว่า 1 ชนิดหรือ Primer-dimer ได้



รูปที่ 7 แผนผังขั้นตอนการเกิด Bridging flocculation (77)

2.8.2.3 การตรวจวัดจากสารเรืองแสง (Fluorescence detection)

การตรวจวัดจากสารเรืองแสงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ RPA หลังจากการเกิดปฏิกิริยา สามารถตรวจแยกผลิตภัณฑ์ RPA ที่มีหลายชนิดได้โดยใช้สารเรืองแสง (Fluorophore)

ต่างชนิดกัน และสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณจากการประยุกต์ใช้กับเทคนิค Real-time RPA จากการศึกษาของ Kersting และคณะ ในปี 2014 (78) ได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *N. gonorrhoeae*, *S. enterica* และ Methicillin-resistant *S. aureus* โดยใช้เทคนิค Multiplex RPA ร่วมกับ Microarray technology หลักการทดสอบคือการติดสารเรืองแสง Cy5 ที่ปลาย 5' ของ Reverse primer และตรึง Forward primer ที่ Solid – phase โดยแต่ละจุดบน Solid-phase จะมีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต่างชนิดกันตามชนิดของเชื้อ เมื่อดีเอ็นเอต้นแบบจับเข้ากับไพรเมอร์อย่างจำเพาะ จะเกิดการเรืองแสงที่จุดนั้น และอ่านผลได้โดยใช้เครื่อง Microarray scanner การตรวจวัดผลิตภัณฑ์ RPA ด้วยวิธีนี้จึงมีความไวและความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องใช้เครื่องตรวจวัดแสงแบบเลเซอร์ (Laser scanner measurements) ในการตรวจวัด ซึ่งมีราคาแพงและไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานภาคสนาม

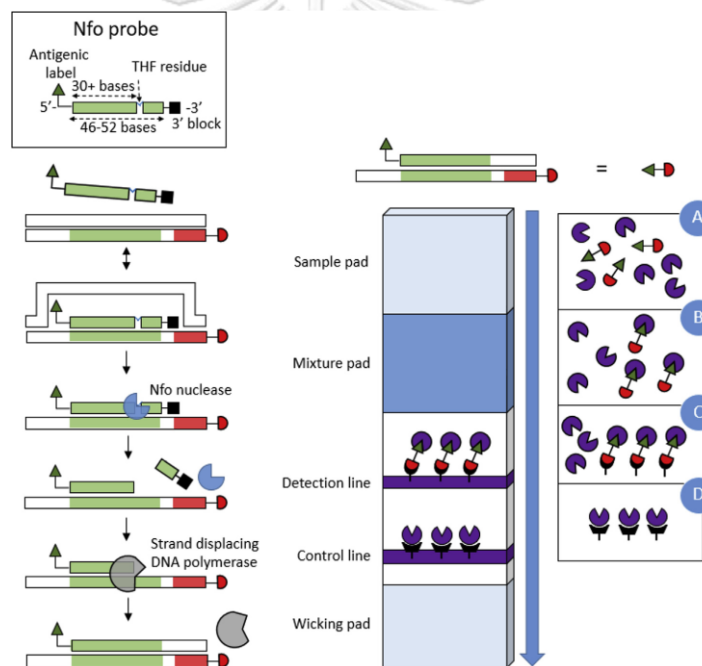
2.8.2.4 การตรวจวัดจากการเปลี่ยนแปลงสี (Colorimetric detection)

การตรวจวัดจากการเปลี่ยนแปลงสีของตัวบ่งชี้เป็นวิธีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ราคาถูก และสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากการศึกษาของ Koo และคณะ ในปี 2016 (79) ได้พัฒนาการตรวจหา *TMPRSS2-ERG* ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเริมต่อมลูกหมากด้วยเทคนิค RT-RPA และอ่านผลด้วยการเปลี่ยนแปลงของสีในหลอดปฏิกิริยา โดยอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) และ Tetramethyl benzidine (TMB) เป็นตัวติดตามปฏิกิริยา เกิดเป็นสารสีฟ้า และสามารถตรวจวัดปริมาณด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ข้อเสียของการตรวจวัดด้วยวิธีนี้คือเกิดการรบกวนปฏิกิริยาและการปนเปื้อนได้ง่าย

2.8.2.5 การตรวจวัดด้วย Lateral flow assays (LF)

การตรวจวัดด้วย Lateral flow assays เป็นวิธีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า รวดเร็ว และสามารถตรวจแยกชนิดของผลิตภัณฑ์ RPA ได้ บริษัทผู้จัดจำหน่ายได้พัฒนาชุดทดสอบ TwistAmp@nfo kit เพื่อใช้ในการตรวจวัดด้วย LF โดยแนะนำว่าไพรเมอร์ (Probe) ที่ใช้ต้องมีความยาว 46 – 52 คู่เบส ติดฉลากด้วย Antigenic โดยทั่วไปนิยมใช้ Carboxyfluorescein group (FAM) และติดปลาย 3' ด้วย Polymerase extension blocking group ไพรเมอร์ที่ใช้ติดฉลากด้วย Biotin

ที่ปลาย 5' เมื่อเกิดการจับกันของไพรเมอร์และดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สม เอนไซม์ *nfo* cleaves จะทำหน้าที่ตัดสายบริเวณ THF residue ของโพรบ ทำให้เอนไซม์ *Bsu* polymerase เข้ามาจับเพื่อต่อสายนิวคลีโอไทด์ได้ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ RPA ที่มีปลายข้างหนึ่งติดฉลากด้วย Biotin เมื่อหยดลงบนชุดทดสอบ LF บริเวณ Sample pad ที่มี α -FAM-Gold ซึ่งจับอย่างจำเพาะได้กับ FAM ที่ติดกับผลิตภัณฑ์ RPA เมื่อถูกกับฟลูออโรสโกลล์ ผลิตภัณฑ์ RPA จะเคลื่อนที่ไปยังแถบทดสอบ (Detection line) พร้อมกับ FAM-Gold และจับได้กับ α -Biotin antibody ที่อยู่บน Detection line จึงเกิดเป็นแถบสีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้น α -FAM-Gold ที่ไม่ได้ใช้ในปฏิกิริยาจะจับกับ Species-specific α - [α -FAM-Gold] antibody เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาที่ Control line (11) กลไกการเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 8

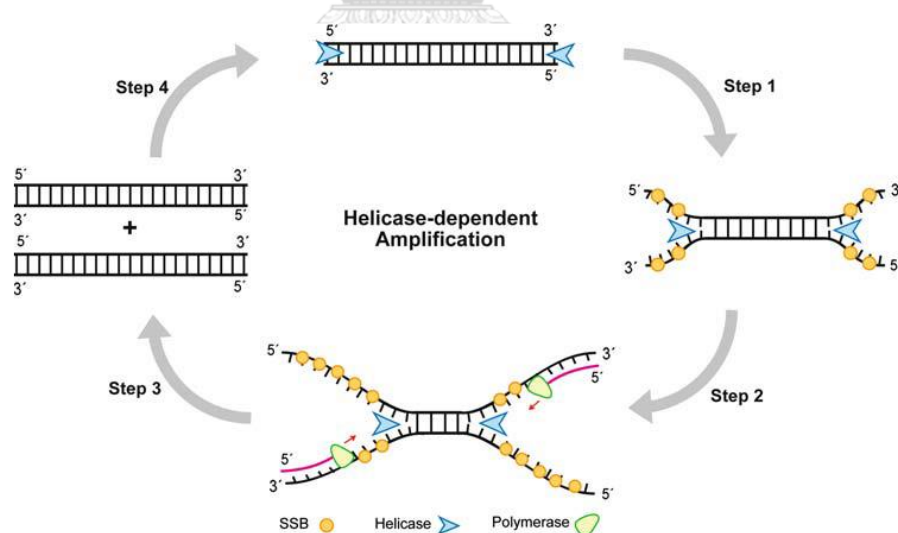


รูปที่ 8 กลไกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค RPA และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Lateral flow assays (A) เริ่มการตรวจวัดโดยใส่ตัวอย่างลงใน sample pad ที่มี α -FAM-Gold, (B) α -FAM-Gold จับกับผลิตภัณฑ์ RPA ที่บริเวณ Mixture pad, (C) α -FAM-Gold – FAM – nucleotide complex จับกับ α -Biotin antibody ที่อยู่บน Detection line, (D) α -FAM-Gold ที่เหลือจากปฏิกิริยาจับกับ Species-specific α - [α -FAM-Gold] antibody ที่ Control line (11)

2.9 Helicase Dependent Amplification (HDA)

2.9.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา HDA

เทคนิค HDA เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นโดย Vincent และคณะ ภายใต้โครงการวิจัยของบริษัท Biohelix ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 2004 (12) การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิคนี้จะใช้เอนไซม์ *E. coli* UvrD Helicase, single-stranded DNA (SSB)-binding protein และ DNA polymerase ซึ่งเลียนแบบมาจากการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียตามธรรมชาติ (80) หลักการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเริ่มจากเอนไซม์ Helicase ทำหน้าที่คลายเกลียวของดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่ และ SSB เข้ามาจับบริเวณดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออกเพื่อป้องกันการกลับมาจับคู่ซ้ำของสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา หากดีเอ็นเอต้นแบบมียื่นที่สนใจ ไพรมเมอร์จะสามารถเข้าจับที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้อย่างจำเพาะ จากนั้นจะเกิดการต่อสายดีเอ็นเอสายใหม่ได้โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase จึงเกิดผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายได้เป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 9 โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 60 – 65 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาคือ 30 – 120 นาที



รูปที่ 9 กลไกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค HDA (13)

ชุดทดสอบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค HDA จัดจำหน่ายโดยบริษัท New England Biolabs จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่า IsoAmp® II Universal tHDA Kit สามารถใช้เพิ่มปริมาณยีนที่สนใจได้ทั้งใน bacterial genomic DNA, viral DNA,

plasmid DNA และ cDNA วิธีการตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิค HDA ทำได้หลายวิธีทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ ได้แก่ วิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel (81) วิธีการตรวจวัดปริมาณของ ผลิตภัณฑ์ HDA จากสารเรืองสี (Fluorescent reporter dyes) (81) วิธีการตรวจวัดด้วยชุดทดสอบ แบบแถบสีชนิดรู้ผลรวดเร็ว (Lateral flow strip) (82) และวิธีการใช้ Oligonucleotide probe (83) นอกจากนี้ชุดทดสอบ IsoAmp® II Universal tHDA Kit สามารถประยุกต์ใช้เป็นเทคนิค Reverse Transcriptase tHDA ได้ (81) ชุดน้ำยา IsoAmp® II Universal tHDA Kit ประกอบด้วย 10X Annealing buffer II, แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) ปริมาณความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์, IsoAmp® dNTP Solution และ IsoAmp® Enzyme Mix ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยชุดทดสอบพื้นฐาน One-Step tHDA (thermostable HDA) มีเพียง 2 ขั้นตอน คือ ผสมสารละลายจากชุดทดสอบ ไพรมเมอร์และดีเอ็นเอ ต้นแบบลงใน PCR tube ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 – 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 – 120 นาที โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิหรือเครื่องให้ความร้อน แก่หลอดทดลอง เทคนิค HDA เป็นเทคนิคที่ง่าย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือการทดสอบภาคสนามได้

2.9.2 วิธีที่ใช้ตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิค HDA

2.9.2.1 วิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

การตรวจวัดผลิตภัณฑ์กรดนิวคลีอิกที่เพิ่มขึ้นด้วยเทคนิค HDA ทำได้เช่นเดียวกับ เทคนิค RPA แต่ไม่จำเป็นต้องผ่านการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ HDA โดยขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคนี้ ควรมีความยาว 70 – 120 คู่เบส ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้วิธีนี้ ได้แก่ การศึกษาของ Goldmayer และคณะ (2007) โดยได้พัฒนาเทคนิค Reverse transcription thermophilic Helicase-dependent amplification (RT-tHDA) ในการตรวจหา GAPDA gene ในมนุษย์ Ebola virus และ Enterovirus พบว่ามีความไวสูง ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้คือ 0.2 พิโคกรัม และสามารถเพิ่ม ปริมาณกรดนิวคลีอิกได้ล้านเท่าโดยใช้เวลาน้อยกว่า 10 นาที (81)

2.9.2.2 การตรวจวัดด้วย Lateral flow assays (LF)

การตรวจวัดผลิตภัณฑ์จากเทคนิค HDA ด้วย Lateral flow assays เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีจัดจำหน่ายในรูปแบบชุดทดสอบสำเร็จรูป เช่น ผลิตภัณฑ์ AmpliVue® (Quidel, สหรัฐอเมริกา) โดยมีชุดทดสอบสำหรับเชื้อ *Clostridioides difficile*, *Bordetella* spp., Group B *Streptococcus* และ Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) หลักการที่ใช้คือ Indirect Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) ในกระบวนการ HDA ไพรมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่สนใจ ถูกติดฉลากด้วย Biotin จะสามารถจับกับยีนเป้าหมายได้ในตำแหน่งที่เอนไซม์ Helicase แยกดีเอ็นเอสายคู่ จากนั้น โพรบที่ติดฉลากด้วย FITC จะสามารถเข้าจับ single-stranded biotinylated amplicon ได้ เมื่อหยดผลิตภัณฑ์ HDA ที่ได้ลงบนตลับทดสอบ (Cassete) single-stranded biotinylated amplicon จะจับได้กับ Streptavidin coat red latex beads บริเวณ label pad หากตัวอย่างที่ทดสอบมียีนที่สนใจ FITC จะจับได้กับ anti-FITC antibodies บน test line ปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีแดงสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า งานวิจัยของ Antonara และคณะ ในปี 2014 (84) ได้ทำการประสิทธิภาพของการตรวจ *Clostridioides difficile*-associate diarrhea ด้วยชุดทดสอบ AmpliVue® และวิธี Illumigene molecular method เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Toxic culture พบว่า ชุดทดสอบ AmpliVue® มีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 96.1 และค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 99.2 และจากการศึกษาของ Miller และคณะ ในปี 2015 พบว่า การตรวจหาเชื้อ Group B *Streptococcus* ด้วยชุดทดสอบ AmpliVue® มีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 96.4 และค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 95.8 เมื่อเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ (85)

2.9.2.3 การตรวจวัดจากสารเรืองแสง (Fluorescence detection)

การตรวจวัดผลิตภัณฑ์ HDA ด้วยการใช้สารเรืองแสงสามารถทำได้เช่นเดียวกับการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ RPA นิยมใช้ในการตรวจวัดเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Real-time HDA และสามารถใช้ในการตรวจวัดแบบ Endpoint detection ในการทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point of care testing) ได้ Doseeva และคณะ ในปี 2011 ได้ทำการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* ด้วยเทคนิค Multiplex HDA โดยใช้ Dual-labeled fluorescent probes (EvaGreen) จากการศึกษพบว่า การตรวจหายีนที่สนใจหลายชนิดด้วยเทคนิคนี้ให้ค่าความไวและ

ความจำเพาะสูง และสามารถใช้ได้กับสิ่งตัวอย่างหลายชนิด เช่น Elementary bodies (EB), Liquid-based cytology (LBC) media, Detergent (DCM) concentration และ Guanidine (STM) concentration (86)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 4 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy Digital biology, ญี่ปุ่น
2.	ตู้อบเพาะเชื้อ	Memmert, เยอรมนี
3.	เครื่องเผาหลูป	MccormickScientific, สหรัฐอเมริกา
4.	เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก	Eppendorf, เยอรมนี
5.	เครื่องชั่งสาร	Sartorius, เยอรมนี
6.	เครื่องผสมสาร	Genie2, สหรัฐอเมริกา
7.	เครื่องวิเคราะห์ภาพเจล	Biorad, สหรัฐอเมริกา
8.	อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, เยอรมนี
9.	เครื่องแยกวิเคราะห์สารพันธุกรรมในแนวนอน	Labnet, สหรัฐอเมริกา
10.	เครื่องเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอ	Biorad, สหรัฐอเมริกา
11.	เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Dry thermal block)	Major Science, สหรัฐอเมริกา
12.	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบนาโน	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
13.	เครื่องผลิตน้ำ Milli-Q	MilliporeSigma, สหรัฐอเมริกา
14.	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)	Eutech Instruments Pte, สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 5 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	Auto pipette	Gilson, ฝรั่งเศส
2.	Glassware	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
3.	Microcentrifuge tube (1.5 mL)	Watson, ญี่ปุ่น
4.	PCR tube strips (0.2 mL)	Cell-Nest, จีน
5.	Pipette tip (10, 200, 1000 μ L)	Wuxi NEST Biotechnology, จีน

3.2 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

ตารางที่ 6 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	น้ำยาที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)	New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา
2.	DNA ladder	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
3.	GeneJet PCR purification kit	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
4.	LE agarose	VWR International, สหรัฐอเมริกา
5.	MgCl ₂	New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา
6.	Primer	Bioneer, สาธารณรัฐเกาหลี
7.	Ultrapure dye	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
8.	<i>Taq</i> polymerase	New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา
9.	TwistAmp® Basic reaction kit	TwistDx, อังกฤษ
10.	6X loading dye	New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา
11.	OnePCR™	GeneDirex, สหรัฐอเมริกา

3.3 การออกแบบงานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้แบ่งการทดสอบออกเป็น 5 ขั้นตอน ได้แก่

3.3.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยวิธี Sequencing

เพื่อตรวจยืนยันชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sequencing ตามวิธีของ Sanger จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม BLASTN program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) และ Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

3.3.2 การพัฒนาเทคนิค Multiplex RPA เพื่อตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV}

เพื่อพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่สามารถตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ได้แก่ ยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ในเชื้อ *E. coli* โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะและหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยเทคนิค RPA

3.3.3 การพัฒนาเทคนิค HDA เพื่อตรวจหายีน *bla*_{TEM}

เพื่อพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่สามารถตรวจหายีน *bla*_{TEM} ในเชื้อ *E. coli* โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะและหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยเทคนิค HDA

3.3.4 การตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA และ การตรวจหายีน *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

เพื่อตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้แก่ *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA และ *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA ที่พัฒนาขึ้น ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 144 ตัวอย่าง

3.3.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค RPA และ HDA ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli*

เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค RPA และ HDA ที่พัฒนาขึ้น โดยนำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิค RPA และ HDA มาคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ โดยเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์จากเทคนิค Nucleotide sequencing

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาตัวอย่าง 1 กลุ่ม กำหนดค่าคาดหวังที่ $1 - \alpha$ โดยคำนวณขนาดตัวอย่างจากข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้าที่น่าเสนอในรูปของร้อยละหรืออัตรา โดยใช้สูตร Buderer (87) ดังนี้

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความไว

$$TP + FN = \frac{Z_{\alpha}^2 SN(1 - SN)}{W^2}$$

$$N1 = \frac{TP + FN}{P}$$

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความจำเพาะ

$$FP + TN = \frac{Z_{\alpha}^2 SP(1 - SP)}{W^2}$$

$$N2 = \frac{FP + TN}{(1 - P)}$$

เมื่อ	$N1$ และ $N2$	=	ขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้
	W	=	ค่าผิดพลาดสูงสุดที่ยอมรับได้
	P	=	ค่าเฉลี่ยความชุกของการติดเชื้อดื้อยา ESBLs
	$\frac{Z_{\alpha}}{2}$	=	ระดับความเชื่อมั่นที่ผู้วิจัยกำหนดไว้ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

SN = ค่าความไวของการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน

SP = ค่าความจำเพาะของการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน

จากการคำนวณจากสูตรดังกล่าวโดยใช้ข้อมูลตัวแปรจากงานวิจัยของ Kiratisin และคณะ (2008) (73) ที่ทำการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์และระบาดวิทยาการติดเชื้อดื้อยา ESBLs ของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อในประเทศไทย พบว่า ค่าเฉลี่ยความชุกของการติดเชื้อดื้อยา ESBLs ของเชื้อ *E. coli* เท่ากับร้อยละ 13.2 วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจระดับจีโนไทป์เพื่อแยกชนิดของเอนไซม์ ESBLs ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ลำดับเบส (Nucleotide sequencing) (9) จากงานวิจัยของ Naas และคณะ (2010) (88) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจแยกชนิดของเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี DNA Microarray และวิธี PCR ร่วมกับ Nucleotide sequencing โดยใช้ขนาดตัวอย่างเท่ากับ 144 ตัวอย่าง พบว่าวิธี Nucleotide sequencing มีค่าความไวและความจำเพาะต่อการตรวจเอนไซม์ชนิด CTX-M และ SHV ร้อยละ 100 สำหรับการตรวจหาเอนไซม์ชนิด TEM มีค่าความไวและค่าความจำเพาะร้อยละ 93 และ 100 ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดค่าความหวังใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้า โดยกำหนดค่าความจำเพาะที่ร้อยละ 100 และค่าความไวที่ร้อยละ 96.5 เมื่อคำนวณแล้ว ขนาดกลุ่มตัวอย่างที่คำนวณได้เท่ากับ 99 ตัวอย่าง นำมาพิจารณาร่วมกับขนาดตัวอย่างของการศึกษาที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน (88) จึงเป็นที่มาของขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ เท่ากับ 144 ตัวอย่าง

3.4.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากงานจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 144 ตัวอย่าง โดยเชื้อทั้งหมดถูกเพาะแยกมาจากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ Blood, Urine, Pus, Fluid และ Sputum ในช่วงระหว่างเดือน กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar และทดสอบทางชีวเคมีด้วยการทดสอบ Oxidase test, Triple sugar iron (TSI), Indole test, Lysine iron agar (LIA), Motility medium, Simmons citrate medium, Urease test และ Malonate เชื้อทั้งหมดผ่านการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพและตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Disk diffusion ตามวิธี

มาตรฐานของ CLSI ปี ค.ศ. 2017 (5) แบ่งเป็น เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง และเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 ได้นำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} และ bla_{SHV} เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 ได้นำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์นายแพทย์ วิษณุ ธรรมลิขิตกุล หัวหน้าหน่วยระบาดวิทยาคลินิก สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย เลขที่รับรอง 020/2562

3.4.3 การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

นำเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ มาทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี Disk diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI ปี ค.ศ. 2017 (5) ดังต่อไปนี้ Amikacin 30 μ g, Gentamicin 10 μ g, Ampicillin 10 μ g, Amoxicillin/Clavulanic acid 20/10 μ g, Ceftazidime 30 μ g, Cefotaxime 30 μ g, Cefdinir 5 μ g, Cefepime 30 μ g, Ciprofloxacin 5 μ g, Ceftriaxone 30 μ g, Doripenem 10 μ g, Ertapenem 10 μ g, Imipenem 10 μ g, Meropenem 10 μ g, Levofloxacin 5 μ g และ Piperacillin/Tazobactam 1.25/23.75 μ g และแปลผลความไวต่อสารต้านจุลชีพตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การรายงานผลความไวต่อสารต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพ	ขนาดของยาที่ใช้ (μ g)	การรายงานผล		
		S	I	R
Amikacin	30	≥ 17	15-16	≤ 14
Gentamicin	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Ampicillin	10	≥ 17	14-16	≤ 13
Amoxicillin/Clavulanic acid	20/10	≥ 18	14-17	≤ 13
Ceftazidime	30	≥ 21	18-20	≤ 17
Cefotaxime	30	≥ 26	23-25	≤ 22

ยาต้านจุลชีพ	ขนาดของยาที่ใช้ (μg)	การรายงานผล		
		S	I	R
Cefdinir	5	≥ 20	17-19	≤ 16
Cefepime	30	≥ 25	19-24 (SDD)	≤ 18
Ciprofloxacin	5	≥ 26	22-25	≤ 21
Ceftriaxone	30	≥ 23	20-22	≤ 19
Doripenem	10	≥ 23	20-22	≤ 19
Ertapenem	10	≥ 22	19-21	≤ 18
Imipenem	10	≥ 23	20-22	≤ 19
Meropenem	10	≥ 23	20-22	≤ 19
Levofloxacin	5	≥ 21	17-20	≤ 16
Piperacillin/Tazobactam	1.25/23.75	≥ 21	18-20	≤ 17

3.4.4 การตรวจยืนยันเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk method

นำเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ มาทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI ปี ค.ศ. 2017 (5) โดยนำโคโลนีของเชื้อ *E. coli* จำนวน 3-5 โคโลนี มาเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ป้ายเชื้อลงบน Mueller Hinton agar และวางแผ่นยาต้านจุลชีพ ดังต่อไปนี้ Ceftazidime 30 μg , Ceftazidime/Clavulanic acid 30/10 μg , Cefotaxime 30 μg และ Cefotaxime/Clavulanic acid 30/10 μg จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดขนาดของ Inhibition zone และแปลผลตามมาตรฐาน CLSI ปี ค.ศ. 2017 (5) เชื้อที่มีขนาด Inhibition zone ของยา Ceftazidime/Clavulanic acid และ/หรือ Cefotaxime/Clavulanic acid กว้างกว่าขนาด Inhibition zone ของยา Ceftazidime และ/หรือ Cefotaxime ตามลำดับ มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แปลผลว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ ESBLs เก็บรักษาเชื้อที่แยกได้ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.5 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ

เชื้อเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MacConkey จำนวน 5 โคโลนี ใส่ลงใน Tris - EDTA buffer (TE buffer) ปริมาตร 400 μL นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใสปริมาตร 300 μL ใส่ในหลอดใหม่ เติม 3 M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 30 μL และเติม ethanol 600 μL จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ชับน้ำให้แห้งแล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 1000 μL นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้แห้งด้วยการคว่ำหลอดทดลองทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาเติม TE buffer ปริมาตร 50 μL จากนั้นนำมาทดสอบคุณภาพและความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop™ spectrometer) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) และ 280 nm (A_{280}) ผลการคำนวณอัตราส่วนของ A_{260} / A_{280} ควรอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 และเจือจางดีเอ็นเอให้มีปริมาณความเข้มข้น 50 – 100 nm/ μL เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.6 การตรวจหาชนิดยีน bla_{TEM} , $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค PCR-sequencing

การตรวจหาชนิดยีน bla_{TEM} , $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} , และ bla_{SHV} โดยการเพิ่มปริมาณยีนแต่ละยีน ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับเบส กับเชื้อ *E. coli* จำนวน 144 ตัวอย่าง โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} , $bla_{\text{CTX-M}}$ และ bla_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน bla_{TEM} , $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} อ้างอิงมาจากงานวิจัย ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบส Forward primer และ Reverse primer	ขนาดของ ผลผลิต (bp)	Genbank Accession No.	อ้างอิง
<i>bla</i> _{TEM}	5'-TCCGCTCATGAGACAATAACC-3' 5'-TTGGTCTGACAGTTACCAATGC-3'	931	J01749	(89)
<i>bla</i> _{CTX-M}	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3' 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG-3'	593	MK652434	(90)
<i>bla</i> _{OXA}	5'-ACACAATACATATCAACTTCGC-3' 5'-AGTGTGTGTTTAGAATGGTGATC-3'	885	CP020519.1	(91)
<i>bla</i> _{SHV}	5'-TGGTTATGCGTTATATTCGCC-3' 5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3'	868	MK070495.1	(92)

3.4.6.1 การเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM}

ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 μ L ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* ความเข้มข้น 50 – 100 ng/ μ L ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{TEM} ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μ M ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ความเข้มข้น 200 μ M Magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 100 μ M สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาซึ่งอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Sturenburg และคณะ (89) ดังนี้ ขั้นตอน Pre-Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที ขั้นตอน Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และกลับไปเริ่มที่ขั้นตอน Denature อีก เป็นจำนวน 29 รอบ และขั้นตอน Post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี วิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เก็บผลผลิต PCR ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.4.6.2 การเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M}

ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 μ L ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* ความเข้มข้น 50 – 100 ng/ μ L ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M} ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μ M น้ำยา OnePCR™ ปริมาตร 12.5 μ L และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาซึ่งอ้างอิงมาจากการงานวิจัยของ Hasman และคณะ (90) ดังนี้ ขั้น Pre-Denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ขั้น Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที และกลับไปเริ่มที่ขั้น Denature อีกเป็นจำนวน 29 รอบ และขั้น Post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เก็บผลผลิต PCR ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.4.6.3 การเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{OXA}

ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 μ L ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* ความเข้มข้น 50 – 100 ng/ μ L ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M} ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μ M น้ำยา OnePCR™ ปริมาตร 12.5 μ L และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้ อุณหภูมิและระยะเวลาซึ่งอ้างอิงมาจากการงานวิจัยของ Costa และคณะ (91) ดังนี้ ขั้น Pre-Denature ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขั้น Denature ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้น Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที และกลับไปเริ่มที่ขั้น Denature อีก เป็นจำนวน 34 รอบ และขั้น Post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เก็บผลผลิต PCR ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.4.6.4 การเพิ่มปริมาณยีน *bla_{SHV}*

ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 μ L ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* ความเข้มข้น 50 – 100 ng/ μ L ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-M}* ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μ M น้ำยา OnePCR™ ปริมาตร 12.5 μ L และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้ อุณหภูมิและระยะเวลาซึ่งอ้างอิงมาจากการวิจัยของ Kim และคณะ (92) ดังนี้ ขั้น Pre-Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขั้น Denature ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้น Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และกลับไปเริ่มที่ขั้น Denature อีก เป็นจำนวน 34 รอบ และขั้น Post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เก็บผลผลิต PCR ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.4.6.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}*

ด้วยวิธี Sequencing

เตรียมผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.6.1 – 3.4.6.4 ที่มีปริมาตร 10 – 15 μ L ปริมาณความเข้มข้น 150 – 200 ng/ μ L พร้อมกับ Forward primer ของยีน *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* ความเข้มข้น 10 μ M ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่ บริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ เมื่อได้ผลการทดสอบ นำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ และโปรตีน โดยใช้โปรแกรม BLASTN program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) และ Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

3.4.7 การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose Gel electrophoresis)

เตรียมแผ่น Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-acetate EDTA (TAE) buffer ปริมาณความเข้มข้น 1 เท่า จากนั้นนำผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก ปริมาตร 5 μ L ผสมกับ 6x Loading dye ปริมาตร 1 μ L และนำไปทำให้เกิดการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้

เครื่องแยกวิเคราะห์สารพันธุกรรมในแนวนอน ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบผลโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ภาพเจล สังเกตจากแถบสีดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นวุ้นเทียบขนาด กับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพ

3.4.8 การเพิ่มปริมาณ ยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค

Multiplex PCR

การตรวจหายีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตั้งงานวิจัยของ Kim และคณะ (93) สำหรับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $uspA$ ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายใน ออกแบบในงานวิจัยนี้ด้วยโปรแกรม Primer3 (v. 0.4.0) โดยใช้ข้อมูลจากธนาคารยีน Accession no. NC000913.3 (94, 95) ลำดับเบสของไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} และ bla_{SHV} และเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิษณุ ธรรมลิขิตกุล หัวหน้าหน่วยระบาดวิทยาคลินิก สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน $uspA$ และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 9 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบส Forward primer และ Reverse primer	ขนาดของ ผลผลิต (bp)	Genbank Accession No.	อ้างอิง
bla_{TEM}	5' – AGTGCTGCCATAACCATGAGTG – 3' 5' – CTGACTCCCC GTCGTGTAGATA – 3'	431	MG515250.1	Kim และคณะ (93)
$bla_{CTX-M IV}$	5' – GACAAAGAGAGTGCAACGGATG – 3' 5' – TCAGTGCATCCAGACGAAA – 3'	501	MF474175.1	
bla_{OXA}	5' – ATTATCTACAGCAGCGCCAGTG – 3' 5' – TGCATCCACGTCTTTGGTG – 3'	296	LT985276.1	
bla_{SHV}	5' – GATGAACGCTTTCCCATGATG – 3' 5' – CGCTGTTATCGCTCATGGTAA – 3'	214	MG797558.1	
$uspA$	5' – AATGCAGGCTACCAATCAC – 3' 5' – GGTGTTGATCAGCTGACGTG – 3'	162	NC000913.3	การศึกษานี้

ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 μL ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 – 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้น เส้นละ 0.4 μM และ ยีน *uspA* ความเข้มข้น 0.1 μM dNTPs ความเข้มข้น 200 μM MgCl_2 ความเข้มข้น 100 μM บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และ เอนไซม์ *Taq* polymerase ความเข้มข้น 2.5 U สภาวะปฏิกิริยา ดังนี้ ขั้น Pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 29 รอบ ขั้น Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้น Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และกลับไปเริ่มที่ขั้น Denature อีก เป็นจำนวน 29 รอบ และขั้น Post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บผลผลิต PCR ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.4.9 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} เพื่อใช้ในการทดสอบ Multiplex RPA

การพัฒนาเทคนิคการตรวจหายีนของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ESBLs ในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการพัฒนาเทคนิค Multiplex RPA ด้วยผลิตภัณฑ์ชุด TwistAmp® Basic reaction kit ของบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ เพื่อตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด เพื่อใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยชุดที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M IV} และ *bla*_{OXA} อ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Kim และคณะ (92) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{SHV} ออกแบบในงานวิจัยนี้ด้วยโปรแกรม Primer3 (v. 0.4.0) โดยใช้ข้อมูลจากธนาคารยีน Accession no. MN786391.1 (94, 95) และชุดที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M} อ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Hasman และคณะ (90) ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} อ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Kim และคณะ (92) ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา Multiplex RPA

ชุดที่	ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบส Forward primer และ Reverse primer	ขนาดของ ผลผลิต (bp)	Genbank Accession No.	อ้างอิง
1	<i>bla</i> _{CTX-M IV}	5' – GACAAAGAGAGTGCAACGGATG – 3' 5' – TCAGTGCATCCAGACGAAA – 3'	501	MF474175.1	(93)
	<i>bla</i> _{OXA}	5'-ATTATCTACAGCAGCGCCAGTG-3' 5'-TGCATCCACGTCTTTGGTG-3'	296	LT985276.1	(93)
	<i>bla</i> _{SHV}	5'- ATCTCCCTGTTAGCCACCCT-3' 5'- TGCTCATCATGGGAAAGCGT-3'	175	MN786391.1	การศึกษานี้
2	<i>bla</i> _{CTX-M}	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3' 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAACAGCGG-3'	593	MK652434	(90)
	<i>bla</i> _{OXA}	5'-ATTATCTACAGCAGCGCCAGTG-3' 5'-TGCATCCACGTCTTTGGTG-3'	296	LT985276.1	(93)
	<i>bla</i> _{SHV}	5'-GATGAACGCTTCCCATGATG-3' 5'-CGCTGTTATCGCTCATGGTAA-3'	214	MN786391.1	(93)

3.4.10 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA กับ ไพรเมอร์ ชุดที่ 1

3.4.10.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

เพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ผลิตภัณฑ์ชุด TwistAmp® Basic reaction kit ของบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ โดยเริ่มจากการทดสอบไพรเมอร์ชุดที่ 1 ครั้งละ 1 คู่, 2 คู่ และ 3 คู่ ตามลำดับ ดังนี้ การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ครั้งละ 1 คู่ ใช้ความเข้มข้นเส้นละ 0.48 μ M ครั้งละ 2 คู่ คือ *bla*_{CTX-M IV} คู่กับ *bla*_{OXA} ทดสอบ *bla*_{OXA} คู่กับ *bla*_{SHV} และทดสอบ *bla*_{CTX-M IV} คู่กับ *bla*_{SHV} ใช้ความเข้มข้นเส้นละ 0.24 μ M และทั้ง 3 คู่ พร้อมกัน ใช้ความเข้มข้นเส้นละ 0.24 μ M ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ L เติมดีเอ็นเอต้นแบบ ที่มีความเข้มข้น 25 ng/ μ L ปริมาตร 2 μ L โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M}

เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 11.2 μ L ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 47.5 μ L ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลายทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำผลผลิต RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ตั้งในชั้นตอนถัดไป

3.4.10.2 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

นำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.24 μ M ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ L เติมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน $bla_{CTX-M IV}$ และ bla_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ โดยทดสอบดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้น 50, 5, 2.5 และ 1 ng และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนได้ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 47.5 μ L ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 47.5 μ L ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลายทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.10.3 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมการเพิ่มปริมาณยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} , และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

ในการทดสอบเวลาที่เหมาะสม ใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์แตกต่างกัน 2 ชุด โดยชุดการทดสอบที่ 1 ใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$ ความเข้มข้นเส้นละ 0.2 μ M ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μ M ทดสอบที่เวลา 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ชุดการทดสอบที่ 2 ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$ ความเข้มข้น 0.2 μ M

ไพรมอร์ที่จำเพาะต่อยีน bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.3 μM ทดสอบที่เวลา 10, 15 และ 20 นาที การทดสอบทั้ง 2 ชุด ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μL เติมดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.10.2 โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{CTX-M} และ bla_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนได้ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 47.5 μL ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 47.5 μL ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลายทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่กำหนด ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกเวลาที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , และ bla_{SHV} ครบทั้ง 3 ยีน ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.4.10.4 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมการเพิ่มปริมาณยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

นำไพรมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ตามความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.4.10.3 ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μL เติมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{CTX-M} และ bla_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตามความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.4.10.2 และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนได้ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 47.5 μL ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 47.5 μL ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลายทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μL บ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 37, 38, 39 และ 40 องศาเซลเซียส และใช้เวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.10.3 ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกอุณหภูมิที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ครบทั้ง 3 ยีน ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.4.11 การหาสถานะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ ชุดที่ 2

3.4.11.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

นำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.24 μ M ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ L เติมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ โดยทดสอบดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5 ng และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนได้ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 47.5 μ L ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 47.5 μ L ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลายทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.11.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

นำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ และ 0.2, 0.05 และ 0.05 μ M ตามลำดับ ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ L เติมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.11.1 และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนได้ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 47.5 μ L ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์

ปริมาตร 47.5 μL ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลายทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่แสดงแถบสี ดีเอ็นเอของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} , และ bla_{SHV} ครบทั้ง 3 ยีน ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.4.11.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมการเพิ่มปริมาณยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

นำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ตามความเข้มข้นที่ได้ จากข้อ 3.4.11.2 ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μL เติมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ และ bla_{SHV} ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} และใช้น้ำกลั่น ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตามความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.4.11.1 และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จนได้ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 47.5 μL ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนึ่งดูสารละลายในหลอด ปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 47.5 μL ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลาย ทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μL บ่มที่อุณหภูมิ 37, 39 และ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกอุณหภูมิ ที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ครบทั้ง 3 ยีน ขนาดความยาวดีเอ็นเอ ตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.4.11.4 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมการเพิ่มปริมาณยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

นำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ตามความเข้มข้นที่ได้ จากข้อ 3.4.11.2 ผสมกับน้ำยา Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μL เติมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน $bla_{\text{CTX-M}}$ และ bla_{SHV}

ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตามความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.4.11.1 และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนได้ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 47.5 μ L ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดปฏิกิริยาด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 47.5 μ L ใส่ลงใน Freeze-dried tube ผสมสารด้วยปิเปตต์ให้ละลายทั่วทั้งหลอด และเติม Magnesium Acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 μ L บ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากข้อ 3.4.11.3 เป็นเวลา 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกเวลาในการบ่มที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ครบทั้ง 3 ยีน ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน

3.4.12 การทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA

การทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA ด้วยผลิตภัณฑ์ชุด GeneJet PCR purification kit ของบริษัท Thermo Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยผสมผลผลิต RPA กับน้ำยา Binding buffer และ isopropanol ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 และดูดใส่ใน GeneJet purified column นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำยา Wash buffer ปริมาตร 700 μ L และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำส่วนคอลัมน์ใส่ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL หลอดใหม่ เติมน้ำยา Elution buffer ปริมาตร 50 μ L และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนคอลัมน์ออก นำผลผลิต RPA ที่บริสุทธิ์ ไปตรวจสอบด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7

3.4.13 การเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA

เพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA โดยใช้ผลิตภัณฑ์ IsoAmp® II Universal tHDA kit ของบริษัท Biohelix ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{TEM} ออกแบบในงานวิจัยนี้ด้วยโปรแกรม Primer3 (v. 0.4.0) โดยใช้ข้อมูลจากธนาคารยีน Accession no. MG515250.1 (94, 95) โดยมีลำดับเบสดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา HDA

ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบส Forward primer และ Reverse primer	ขนาดของผลผลิต (bp)	Genbank Accession No.	อ้างอิง
<i>bla_{TEM}</i>	5' – TGAGTGATAACACTG CGGCCAACTTAC – 3' 5' – CCCTACGATCAAGGCGAGTTACATGAT – 3'	111	MG515250.1	การศึกษานี้

3.4.13.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{TEM}* ด้วยปฏิกิริยา HDA

ในปฏิกิริยารวม 50 μ L เติม 10X Annealing buffer II ปริมาตร 5 μ L Magnesium sulfate ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 2 μ L Sodium chloride ความเข้มข้น 500 mM ปริมาตร 4 μ L IsoAmp® dNTP Solution ปริมาตร 3.5 μ L ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{TEM}* ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตรเส้นละ 0.75 μ L และ IsoAmp® Enzyme Mix ปริมาตร 3.5 μ L จากนั้นเติมดีเอ็นเอต้นแบบ ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05, 0.5, 5, 50 และ 100 ng/ μ L ปริมาตร 1 μ L โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla_{TEM}* และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารและเติม Mineral oil ปริมาตร 50 μ L ลงในหลอดปฏิกิริยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน *bla_{TEM}* ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.13.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{TEM}* ด้วยปฏิกิริยา HDA

ในปฏิกิริยารวม 50 μ L เติม 10X Annealing buffer II ปริมาตร 5 μ L Magnesium sulfate ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 2 μ L Sodium chloride ความเข้มข้น 500 mM ปริมาตร 4 μ L IsoAmp® dNTP Solution ปริมาตร 3.5 μ L ทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{TEM}* ความเข้มข้น 0.025, 0.050 และ 0.075 μ M และ IsoAmp®

Enzyme Mix ปริมาตร 3.5 μL จากนั้นเติมดีเอ็นเอต้นแบบ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.13.1 ปริมาตร 1 μL โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{TEM} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารและเติม Mineral oil ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดปฏิกิริยา นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน *bla*_{TEM} ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.13.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA

ในปฏิกิริยารวม 50 μL เติม 10X Annealing buffer II ปริมาตร 5 μL Magnesium sulfate ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 2 μL NaCl ความเข้มข้น 500 mM ปริมาตร 4 μL IsoAmp® dNTP Solution ปริมาตร 3.5 μL ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{TEM} ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.13.2 และ IsoAmp® Enzyme Mix ปริมาตร 3.5 μL จากนั้นเติมดีเอ็นเอต้นแบบ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.13.1 ปริมาตร 1 μL โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{TEM} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารและเติม Mineral oil ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดปฏิกิริยา นำไปป้อนที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 59, 61, 63, 65 และ 67 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกอุณหภูมิที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน *bla*_{TEM} ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนดและให้แถบสีชัดเจน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.13.4 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA

ในปฏิกิริยารวม 50 μL เติม 10X Annealing buffer II ปริมาตร 5 μL Magnesium sulfate ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 2 μL NaCl ความเข้มข้น 500 mM ปริมาตร 4 μL IsoAmp® dNTP Solution ปริมาตร 3.5 μL ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{TEM} ความเข้มข้นที่

เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.13.2 และ IsoAmp® Enzyme Mix ปริมาตร 3.5 μL จากนั้นเติมดีเอ็นเอต้นแบบ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.13.1 ปริมาตร 1 μL โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารและเติม Mineral oil ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดปฏิกิริยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.13.3 เป็นเวลา 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 เลือกเวลาในการบ่มที่แสดงแถบสีดีเอ็นเอของยีน bla_{TEM} ขนาดความยาวดีเอ็นเอตรงตามที่กำหนด และให้แถบสีชัดเจน

3.4.14 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex RPA และ HDA

นำสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Multiplex RPA และ HDA ที่พัฒนาขึ้น มาทดสอบความจำเพาะ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, และ *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 และใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} , $bla_{\text{CTX-M}}$ และ bla_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

3.4.15 การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่สามารถทดสอบได้ด้วยเทคนิค Multiplex RPA และ HDA

ทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่ให้ผลบวกสำหรับการทดสอบยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ได้แก่ เชื้อ *E. coli* ตัวอย่างที่ E120, E119 และ E053 ตามลำดับ และทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้ด้วยปฏิกิริยา HDA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ เจือจางดีเอ็นเอแม่แบบของแต่ละ

ยีนความเข้มข้นสิบเท่า (10-fold dilution) ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 ng ถึง 0.005 ng ทำปฏิกิริยา Multiplex RPA และ HDA ด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังข้อ 3.4.11 และ 3.4.13 ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

3.4.16 การตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ที่แยกได้จากงานจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 144 ตัวอย่าง มาตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.11 และใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{CTX-M} และ bla_{SHV} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} และนำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.12 และ 3.4.7 และบันทึกผล

3.4.17 การตรวจหายีน bla_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ด้วยปฏิกิริยา HDA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ที่แยกได้จากงานจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 144 ตัวอย่าง มาตรวจหายีน bla_{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.13 และใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 ได้นำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} และนำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ 3.4.7 และบันทึกผล

3.4.18 การคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: PPV) ของเทคนิค Multiplex RPA และ HDA

นำผลการตรวจหายีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยวิธี RPA และ HDA ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 160 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกับผลการตรวจหายีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยวิธีมาตรฐาน (Nucleotide sequencing) คำนวณหาความไว ความจำเพาะ

ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม MEDCALC® (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) จากสูตรการคำนวณ ดังตารางที่ 12 (87)

ตารางที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิคที่พัฒนาเปรียบเทียบกับผลทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน

	ผลทดสอบเป็นบวก ด้วยวิธีมาตรฐาน	ผลทดสอบเป็นลบ ด้วยวิธีมาตรฐาน
ผลทดสอบเป็นบวก ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น	ผลบวกจริง (<i>a</i>)	ผลบวกปลอม (<i>b</i>)
ผลทดสอบเป็นลบ ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น	ผลลบปลอม (<i>c</i>)	ผลลบจริง (<i>d</i>)

ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบของเทคนิค RPA และ HDA ที่พัฒนาขึ้นมา สามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้ (87)

$$\text{ความไว} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{ความจำเพาะ} = \frac{d}{b+d}$$

$$\text{ค่าทำนายผลบวก} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{ค่าทำนายผลลบ} = \frac{d}{c+d}$$

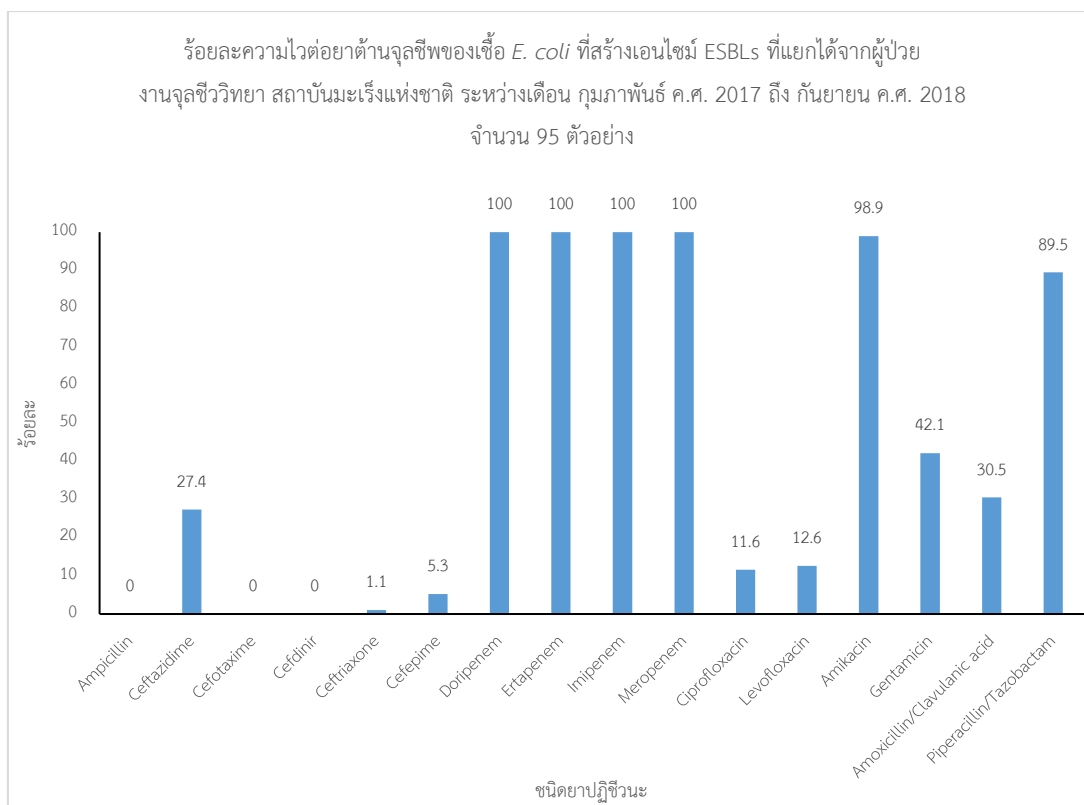
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและรูปแบบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ที่งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 จากผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี Disk diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI (5) คัดเลือกเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง และไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง มาใช้ในการศึกษายีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV}

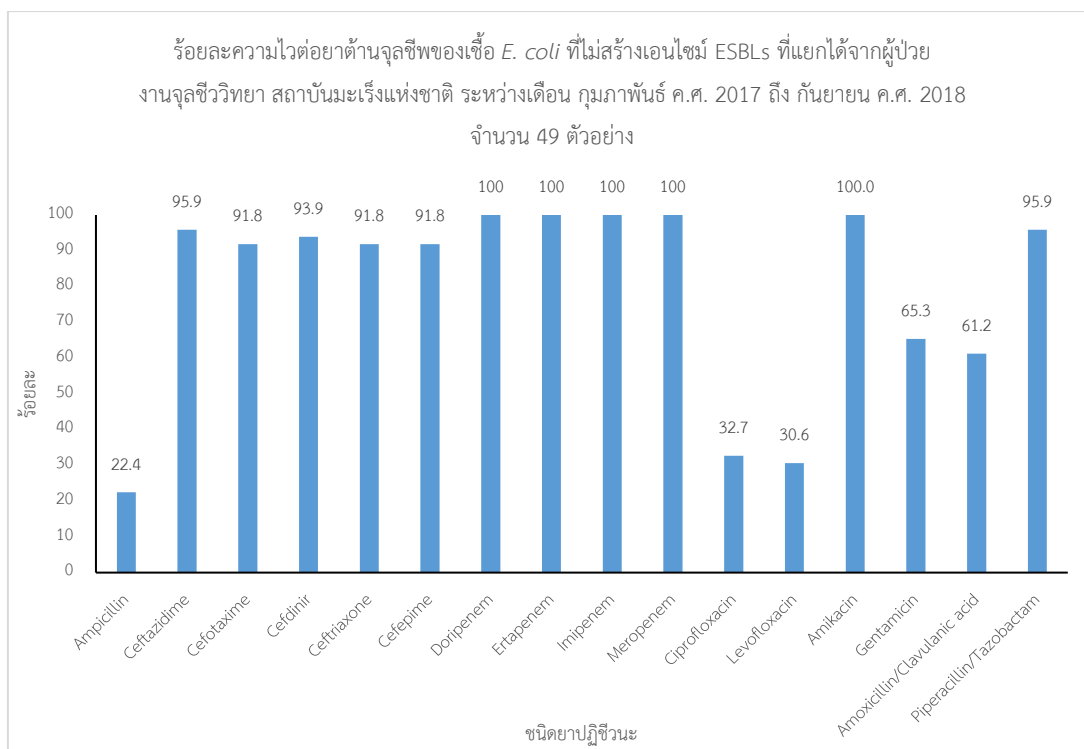
ผลการวิเคราะห์รูปแบบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกด้วยวิธีการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs โดยใช้วิธี Disk diffusion จำนวน 95 ตัวอย่าง พบว่ามีความไวต่อยา β -lactam ในกลุ่ม penicillins ได้แก่ Ampicillin ร้อยละ 0 กลุ่ม Cephalosporin ได้แก่ Cefotaxime ร้อยละ 0, Cefdinir ร้อยละ 0, Ceftriaxone ร้อยละ 1.1, Cefepime ร้อยละ 5.3 และ Ceftazidime ร้อยละ 27.4 พบเชื้อทั้งหมด ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่ Meropenem, Ertapenem, Imipenem และ Doripenem ความไวต่อยากกลุ่ม Fluoroquinolone ได้แก่ Ciprofloxacin ร้อยละ 11.6 Levofloxacin ร้อยละ 12.6 กลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ Amikacin ร้อยละ 98.9 แต่พบความไวต่อยา Gentamicin เพียงร้อยละ 42.1 และในยาในกลุ่มอื่น ๆ พบความไวต่อ ยา Amoxicillin/Clavulanic acid ร้อยละ 30.5 และยา Piperacillin/ Tazobactam ร้อยละ 89.5 ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่แยกได้จากผู้ป่วย
 แผนกจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่าง กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018

จำนวน 95 ตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์รูปแบบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลลบด้วยวิธีการ
 ตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs โดยใช้วิธี Disk diffusion จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่ามีความ
 ไวต่อยา β -lactam ในกลุ่ม penicillins ได้แก่ Ampicillin ร้อยละ 22.4 กลุ่ม Cephalosporin
 ได้แก่ Cefotaxime ร้อยละ 91.8, Cefdinir ร้อยละ 93.9, Ceftriaxone ร้อยละ 91.8, Cefepime
 ร้อยละ 91.8 และ Ceftazidime ร้อยละ 95.9 พบเชื้อทั้งหมด ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่
 Meropenem, Ertapenem, Imipenem และ Doripenem ส่วนยาในกลุ่ม Fluoroquinolone ได้แก่
 Ciprofloxacin ร้อยละ 32.7, Levofloxacin ร้อยละ 30.6 กลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ Amikacin
 ร้อยละ 100 และ Gentamicin ร้อยละ 65.3 และ ในยาในกลุ่มอื่น ๆ พบความไวต่อ ยา Amoxicillin/
 Clavulanic acid ร้อยละ 61.2 และยา Piperacillin/ Tazobactam ร้อยละ 95.9 ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่แยกได้จากผู้ป่วย
 แผนกจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่าง กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018

จำนวน 49 ตัวอย่าง

จากผลการศึกษา พบว่า เชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลลบด้วยวิธีการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs มีความไวต่อยากลุ่ม β -lactam ได้แก่ penicillin และ cephalosporins ต่ำกว่าในเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลลบด้วยวิธีการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs เช่นเดียวกับในยากลุ่ม fluoroquinolone, aminoglycoside และกลุ่ม combinations แต่เชื้อ *E. coli* ทั้งสองกลุ่มไม่พบการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems

4.2 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk method

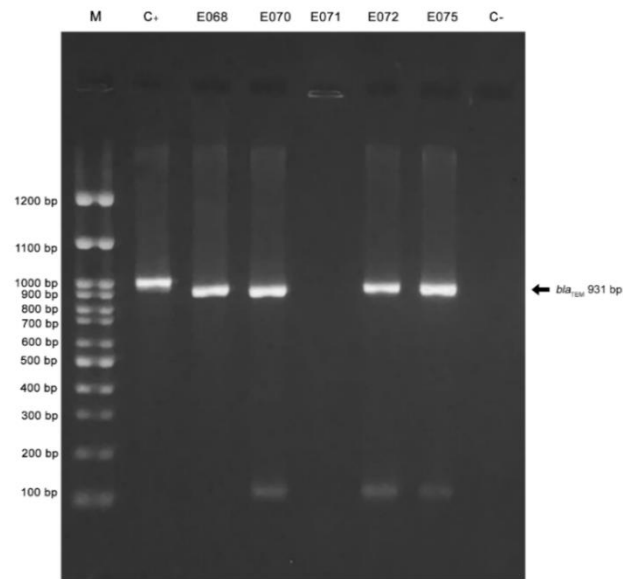
การทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI (5) กับเชื้อ *E. coli* ที่คัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในข้อ 4.1 ให้ผลตรงกับผลของการคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs ทั้งหมด พบเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผล ESBLs บวกจำนวน 95 ตัวอย่าง และเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผล ESBLs ลบจำนวน 49 ตัวอย่าง

4.3 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ

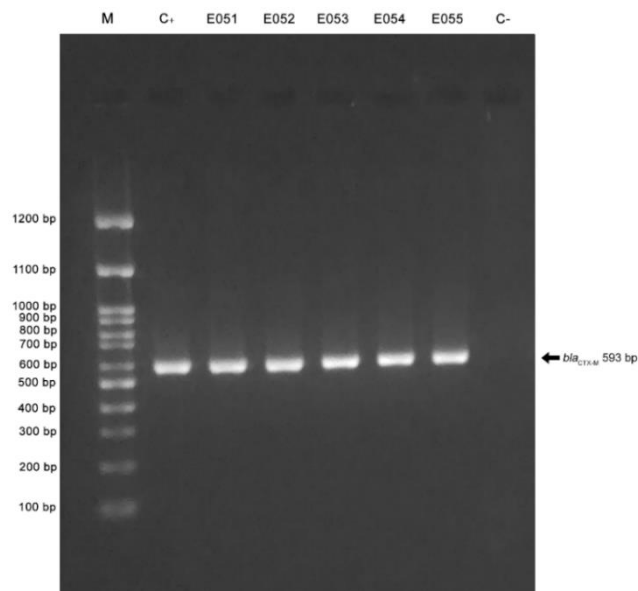
การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{SHV} และ $uspA$ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{OXA} เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง และเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการต้ม ดังข้อ 3.4.5 และทำการวัดปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง Nanodrop™ spectrometer พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 20-300 ng/μl และมีผลการคำนวณอัตราส่วนของ A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วง 1.8 – 2.0

4.4 การตรวจหาชนิดยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค PCR-sequencing

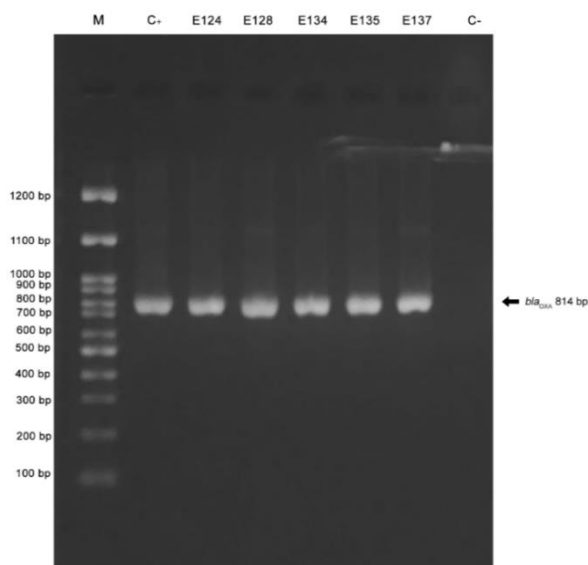
เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 144 ตัวอย่าง และใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} และเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{SHV} และนำกลิ่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ถูกทดสอบด้วยเทคนิค PCR ตามข้อ 3.4.6 พบผลผลิตของยีนต่าง ๆ ตามที่คาดหวังไว้ดังนี้ ผลผลิตยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , bla_{SHV} มีขนาดเท่ากับ 931, 593, 814 และ 868 คู่เบส (รูปที่ 12 - รูปที่ 15) ผลการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก พบว่า เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง พบยีน bla_{CTX-M} มากที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 100 รองลงมาพบยีน bla_{TEM} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} เท่ากับร้อยละ 42.1, 30.5 และ 2.1 ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง พบยีน bla_{TEM} เพียงอย่างเดียว คิดเป็นร้อยละ 42.9 และไม่พบยีน ESBLs ใด ๆ เลย คิดเป็นร้อยละ 57.1 ดังสรุปในตารางที่ 13



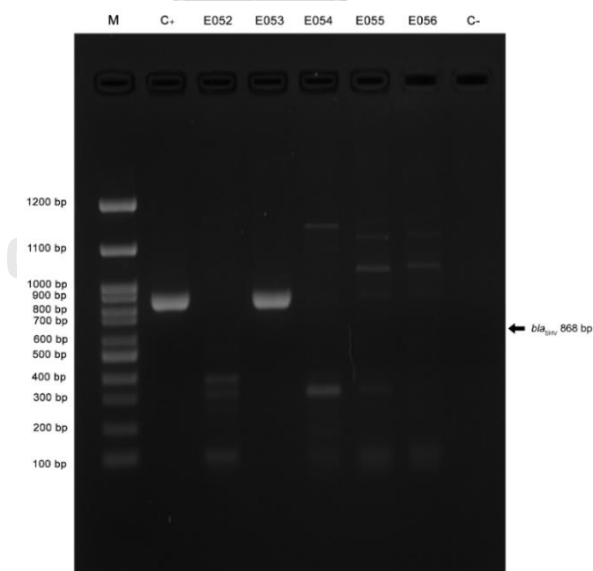
รูปที่ 12 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง
 เอนไซม์ ESBLs บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว L: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส;
 แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวก; แถวที่ 2-6: เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ



รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M} ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง
 เอนไซม์ ESBLs บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว L: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
 แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวก แถวที่ 2-6: เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ



รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{OXA}* ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง เอนไซม์ ESBLs บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว L: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวกที่ได้จาก *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 แถวที่ 2-6: เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ



รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{SHV}* ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง เอนไซม์ ESBLs บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว L: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวกที่ได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 แถวที่ 2-6: เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ

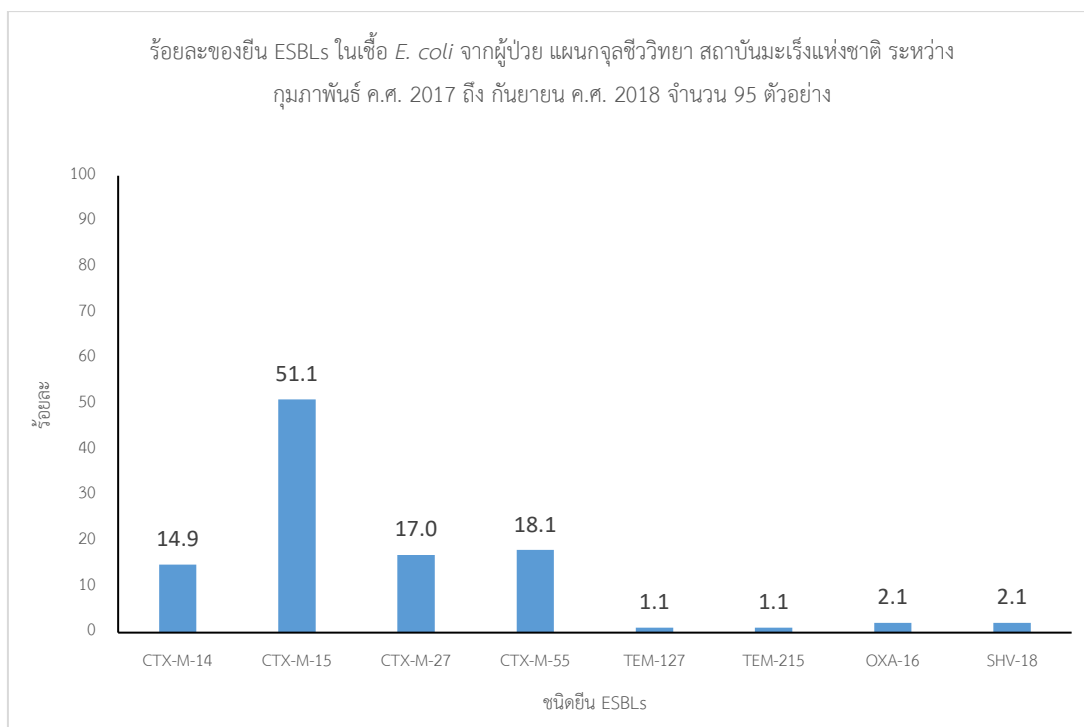
ตารางที่ 13 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค PCR ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 144 ตัวอย่าง

ชนิดของยีน	<i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 95 (ร้อยละ)	<i>E. coli</i> ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 49 (ร้อยละ)
ยีน <i>bla</i> _{TEM}	40 (42.1)	21 (100)
ยีน <i>bla</i> _{CTX-M}	95 (100)	0
ยีน <i>bla</i> _{OXA}	29 (30.5)	0
ยีน <i>bla</i> _{SHV}	2 (2.1)	0

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง มีเชื้อที่มียีน 1 ชนิดร้อยละ 43.2 เชื้อที่มียีนร่วมกัน 2 ชนิด ร้อยละ 40 เชื้อที่มียีนร่วมกัน 3 ชนิด ร้อยละ 15.8 และเชื้อที่มียีนร่วมกัน 4 ชนิดร้อยละ 1.1 ดังตารางที่ 14 ชนิดของยีน ESBLs ที่พบมากที่สุด คือ ยีน *bla*_{CTX-M-15} รองลงมาคือ *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{OXA-16}, *bla*_{SHV-18}, *bla*_{TEM-127} และ *bla*_{TEM-215} ตามลำดับ ดังรูปที่ 16 และพบยีนที่ไม่ใช่ ESBLs ได้แก่ *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-1b} และ *bla*_{OXA-1} ร้อยละ 33, 7.4 และ 28.7 ตามลำดับ และเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs และพบยีน *bla*_{TEM} จำนวน 21 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสพบเป็นชนิด *bla*_{TEM-1} ดังตารางที่ 15 ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ในเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง

ชนิดของยีน <i>bla</i> ที่พบ	<i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 95 (ร้อยละ)
CTX-M-14	7 (7.4)
CTX-M-14, TEM-1	4 (4.2)
CTX-M-14, TEM-1, OXA-1	2 (2.1)
CTX-M-14, TEM-1b, OXA-1, SHV-18	1 (1.1)
CTX-M-15	16 (16.8)
CTX-M-15, OXA-1	12 (12.6)
CTX-M-15, OXA-16	1 (1.1)
CTX-M-15, TEM-1	4 (4.2)

ชนิดของยีน <i>bla</i> ที่พบ	<i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 95 (ร้อยละ)
CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	7 (7.4)
CTX-M-15, TEM-1, OXA-16	1 (1.1)
CTX-M-15, TEM-1, SHV-18	1 (1.1)
CTX-M-15, TEM-1b	3 (3.2)
CTX-M-15, TEM-1b, OXA-1	3 (3.2)
CTX-M-27	13 (13.7)
CTX-M-27, OXA-1	1 (1.1)
CTX-M-27, TEM-1	2 (2.1)
CTX-M-55	5 (5.3)
CTX-M-55, TEM-1	9 (9.5)
CTX-M-55, TEM-1, OXA-1	1 (1.1)
CTX-M-55, TEM-127	1 (1.1)
CTX-M-55, TEM-215	1 (1.1)



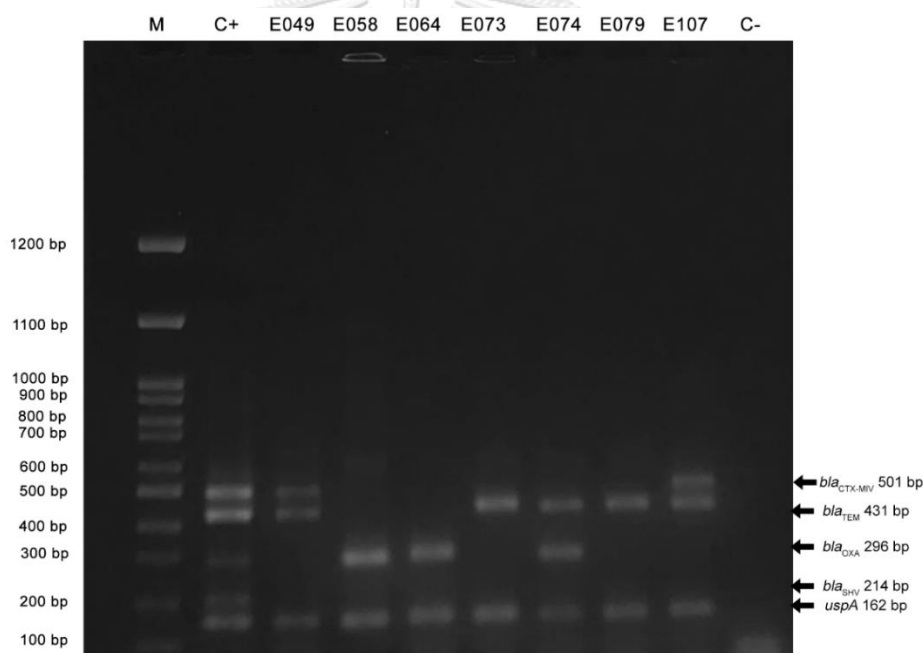
รูปที่ 16 แผนภูมิแสดงร้อยละของยีน ESBLs แต่ละชนิด ในเชื้อ *E. coli* จากผู้ป่วย แผนกจุลชีววิทยา
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่าง กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 จำนวน 95 ตัวอย่าง
ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *bla*_{TEM} ในเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs
จำนวน 21 ตัวอย่าง

ชนิดของยีนที่พบ	<i>E. coli</i> ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 21 (ร้อยละ)
TEM-1	21 (100)

4.5 การเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

นำดีเอ็นเอเชื้อ *E. coli* จำนวน 144 ตัวอย่าง ที่สกัดได้จากข้อ 4.3 มาใช้เป็นต้นแบบในการ
เพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} และ *uspA* เป็นยีนควบคุมภายใน ด้วยเทคนิค
Multiplex PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน
*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} และ *uspA* และเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัว
ควบคุมบวกของยีน *bla*_{OXA} โดยผสมดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 ความเข้มข้น 25
ng/μl และดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 ความเข้มข้น 25 ng/μl ในปริมาณ

เท่ากัน และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต Multiplex PCR ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อ 3.4.7 พบผลผลิตของยีนต่าง ๆ ตามที่คาดหวังไว้ดังนี้ ผลผลิตยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} มีขนาดเท่ากับ 431, 501, 296 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ และผลผลิตของยีนควบคุมภายใน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 162 คู่เบส (รูปที่ 17) ผลการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกด้วยวิธี Multiplex PCR พบยีน *bla*_{TEM} มากที่สุด เท่ากับร้อยละ 42.1 รองลงมาคือ ยีน *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{SHV} เท่ากับ ร้อยละ 28.4, 26.3 และ 2.1 ตามลำดับ ดังตารางที่ 16 เชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง พบยีน *bla*_{TEM} เท่ากับร้อยละ 42.0 ดังตารางที่ 17 และเชื้อตัวอย่างทั้งหมดพบยีน *uspA*



รูปที่ 17 ผลการตรวจสอบผลผลิต Multiplex PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} และ *uspA* ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส; แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวก; แถวที่ 2-8: เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก และแถวที่ 9: ตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 16 ผลการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ในเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง

ชนิดของยีน	<i>E. coli</i> ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 95 (ร้อยละ)
ยีน bla_{TEM}	40 (42.1)
ยีน bla_{CTX-M}	25 (26.3)
ยีน bla_{OXA}	27 (28.4)
ยีน bla_{SHV}	2 (2.1)
ไม่พบยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV}	18 (18.9)

ตารางที่ 17 ผลการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ในเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง

ชนิดของยีนที่พบ	<i>E. coli</i> ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 49 (ร้อยละ)
ยีน bla_{TEM}	21 (42)
ไม่พบยีน bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV}	28 (58)

4.6 ความสัมพันธ์ของชนิดยีน ESBLs กับรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน ESBLs ร่วมกับการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่มต่าง ๆ ด้วยสถิติ Pearson correlation coefficient พบมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) โดยเชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-15}$ มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Gentamicin, Levofloxacin และ Amoxicillin/Clavulanic acid เพิ่มมากขึ้น และเชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-55}$ มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Ceftazidime และ Gentamicin เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้พบเชื้อที่มียีน ESBLs ร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ เชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-15}$ ร่วมกับ bla_{OXA-16} จำนวน 2 ตัวอย่าง เชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-55}$ ร่วมกับ $bla_{TEM-127}$ จำนวน 1 ตัวอย่าง เชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-55}$ ร่วมกับ $bla_{TEM-215}$ จำนวน 1 ตัวอย่าง เชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-15}$ ร่วมกับ bla_{SHV-18} จำนวน 1 ตัวอย่าง และเชื้อที่พบยีน $bla_{CTX-M-14}$ ร่วมกับ bla_{SHV-18}

จำนวน 1 ตัวอย่าง แต่ไม่สามารถนำมาหาความสัมพันธ์กับการดื้อยาต้านจุลชีพได้ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอต่อการคำนวณ

ตารางที่ 18 ร้อยละการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อที่พบในควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด

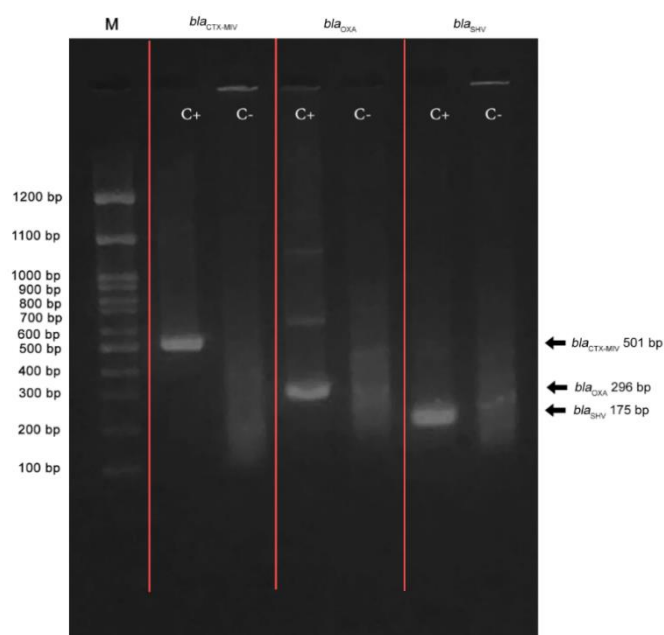
*bla*_{CTX-M}

กลุ่มยา	ชนิดของยาต้านจุลชีพ	ร้อยละ			
		<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
penicillins	Ampicillin	100	100	100	100
cephalosporins	Ceftazidime	100	97.9	94	100
	Cefotaxime	7.1	72.9	41.2	87.5
	Cefdinir	100	100	100	100
	Ceftriaxone	100	100	100	100
	Cefepime	85.7	97.9	94.1	100
carbapenems	Doripenem	57.1	91.7	41.2	93.8
	Ertapenem	0	0	0	0
	Imipenem	0	0	0	0
	Meropenem	0	0	0	0
fluoroquinolones	Ciprofloxacin	0	0	0	0
	Levofloxacin	78.6	93.8	94.1	68.8
aminoglycoside	Amikacin	71.4	93.8	94.1	68.8
	Gentamicin	0	2.1	0	0
combination	Amoxicillin/Clavulanic acid	35.7	68.8	29.4	75
	Piperacilin/tazobactam	50.0	54.2	17.6	37.5
จำนวนเชื้อที่พบ		14	48	17	16

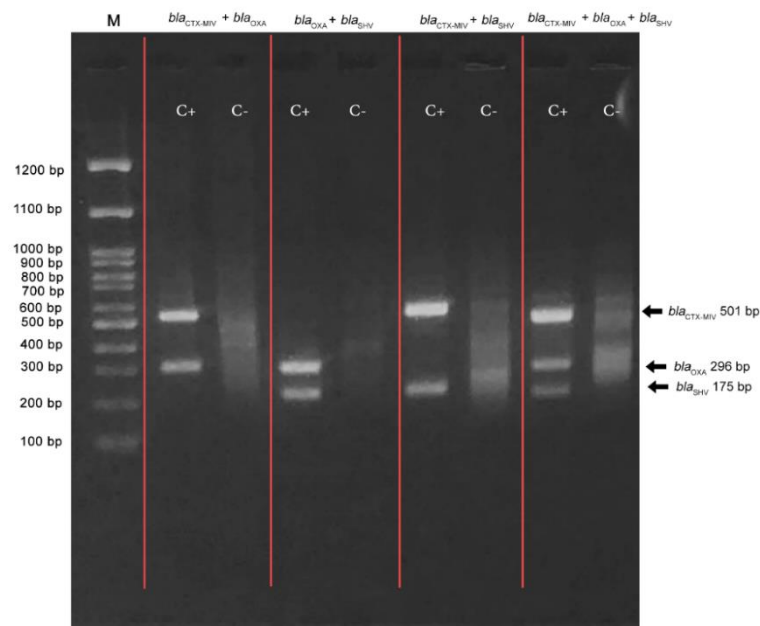
4.7 การทดสอบการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ชุดที่ 1

4.7.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

การเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M IV} และ *bla*_{SHV} และ ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{OXA} ที่ และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการทดสอบไพรเมอร์ครั้งละ 1 คู่ ความเข้มข้นเส้นละ 0.48 μ M ดังรูปที่ 18, 2 คู่ และ 3 คู่ ความเข้มข้นเส้นละ 0.24 μ M ดังรูปที่ 19 พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{OXA} เกิดผลผลิตตามที่คาดหวังขนาดเท่ากับ 501, 175 และ 296 คู่เบส ตามลำดับ แต่ยีน *bla*_{OXA} พบว่ามี non-specific ที่ความเข้มข้น 0.48 μ M



รูปที่ 18 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ในปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ชุดที่ 1 บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3, 5: ตัวควบคุมบวกกับไพรเมอร์ยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} ตามลำดับ แถวที่ 2, 4, 6: ตัวควบคุมลบ *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} ตามลำดับ

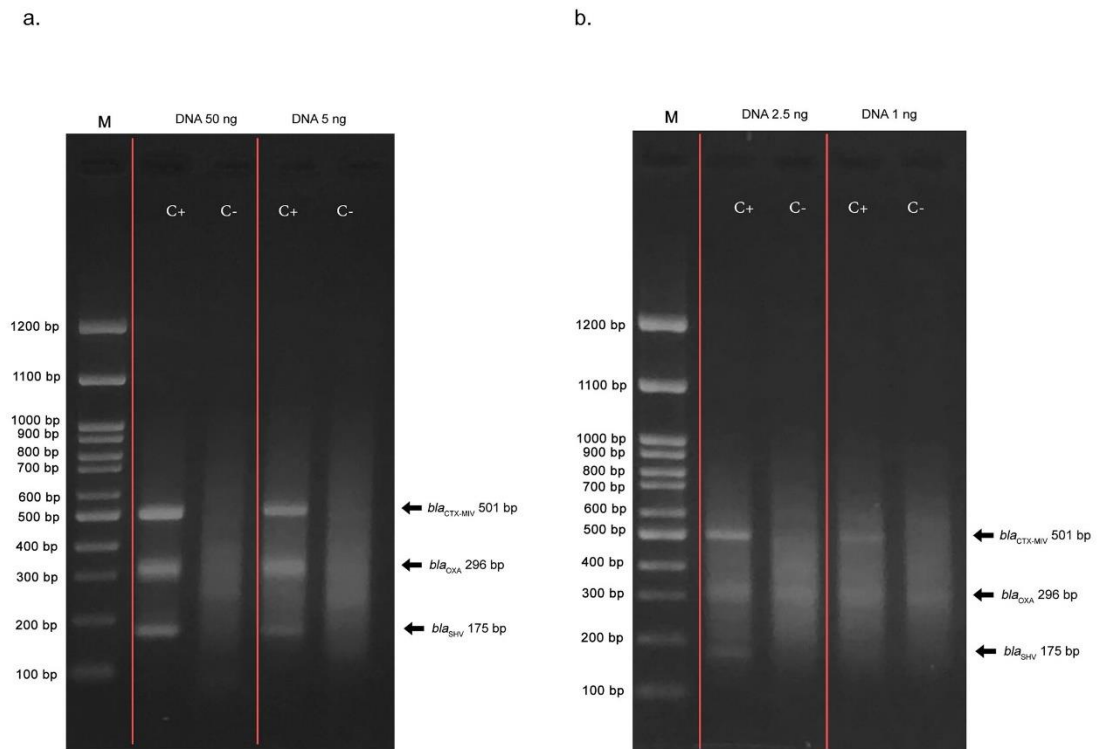


รูปที่ 19 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ในปฏิกิริยา Multiplex RPA บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3, 5: ตัวควบคุมบวกที่ทดสอบกับไพรเมอร์ครั้งละ 2 คู่ แถวที่ 2, 4, 6: ตัวควบคุมลบที่ทดสอบกับไพรเมอร์ครั้งละ 2 คู่ แถวที่ 7: ตัวควบคุมบวกที่ทดสอบกับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ร่วมกัน แถวที่ 8: ตัวควบคุมลบที่ทดสอบกับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ร่วมกัน

4.7.2 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

ทดสอบดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้น 50, 5, 2.5 และ 1 ng และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้น 0.24 μ M บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 50 พบผลผลิตยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ตามขนาดที่คาดหวังไว้ มีขนาดเท่ากับ 501, 296 และ 175 คู่เบส ตามลำดับ ดังรูปที่ 20 ขณะที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 5 ng พบผลผลิตชัดเจน 2 ยีน คือ ยีน $bla_{CTX-M IV}$ และ ยีน bla_{OXA} ส่วนผลผลิตของยีน bla_{SHV} จาง ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 2.5 ng พบผลผลิตชัดเจนเพียง 1 ยีน คือยีน $bla_{CTX-M IV}$ ส่วนยีน bla_{OXA} และ bla_{SHV} พบผลผลิตจาง และที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 1 ng พบผลผลิตจาง 2 ยีน คือยีน $bla_{CTX-M IV}$ และ ยีน bla_{OXA}

ส่วนยีน *bla_{SHV}* ไม่พบผลผลิตใด ๆ จึงเลือกดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ 50 ng สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 3 ยีน



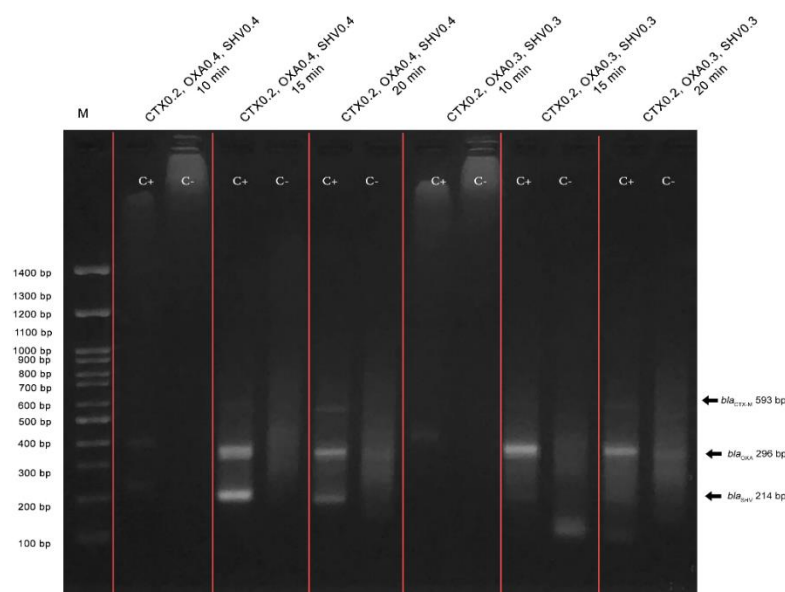
รูปที่ 20 ผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน *bla_{CTX-MIV}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ภาพ a. แถวที่ 1 และ 3: ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng และ 5 ng ตามลำดับ แถวที่ 3 และ 5: ตัวควบคุมลบ ภาพ b. แถวที่ 1 และ 3: ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5, 1 ng ตามลำดับ แถวที่ 3 และ 5: ตัวควบคุมลบ

4.7.3 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{CTX-MIV}*, *bla_{OXA}*, และ *bla_{SHV}* ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

จากผลการทดสอบข้อ 4.7.2 พบว่าผลผลิตของยีน *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* จางกว่ายีน *bla_{CTX-MIV}* จึงปรับเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* และลดความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-MIV}* เพื่อให้ปริมาณผลผลิตใกล้เคียงกัน ผลการทดสอบดังรูปที่ 21 พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-MIV}* ความเข้มข้นเส้นละ 0.2 μ M และ *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}*

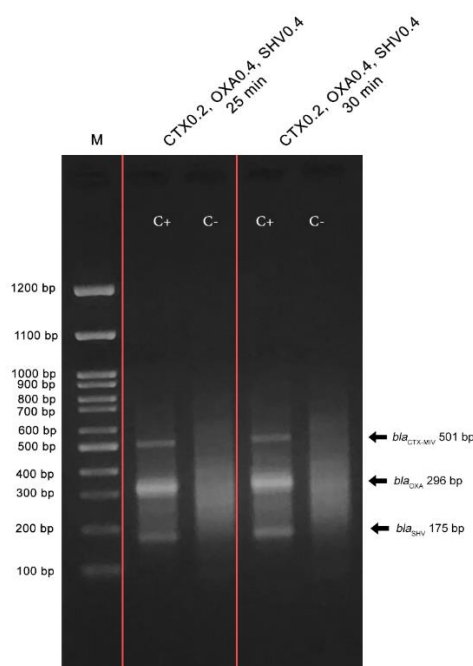
ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μM ที่เวลาบ่ม 10 นาที ไม่พบผลผลิตใด ๆ ที่เวลาบ่ม 15 นาที พบผลผลิต 2 ยีน คือ ยีน bla_{OXA} และ bla_{SHV} ที่เวลาบ่ม 20 นาที พบผลผลิตชัดเจน 2 ยีน ได้แก่ ยีน bla_{OXA} และ bla_{SHV} แต่ผลผลิตของยีน $bla_{\text{CTX-M IV}}$ จาง จึงเพิ่มเวลาบ่มเป็น 25 และ 30 นาที ดังรูปที่ 22 พบผลผลิตชัดเจนทั้ง 3 ยีน ตามขนาดที่คาดหวังไว้ ขนาดผลผลิตของยีน $bla_{\text{CTX-M IV}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} เท่ากับ 501, 296 และ 175 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนการทดสอบที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{\text{CTX-M IV}}$ ความเข้มข้นเส้นละ 0.2 μM ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.3 μM ดังรูปที่ 21 พบว่าที่เวลาบ่ม 10 นาที ไม่พบผลผลิตใด ๆ ที่เวลาบ่ม 15 และ 20 นาที พบผลผลิตเพียง 1 ยีน คือ ยีน bla_{OXA}

จึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{\text{CTX-M IV}}$ ความเข้มข้นเส้นละ 0.2 μM ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μM และใช้เวลาในการทดสอบ 25 นาที สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA เนื่องจากเป็นความเข้มข้นและเวลาน้อยที่สุดที่ให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 3 ยีน



รูปที่ 21 ผลการทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์และเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน $bla_{\text{CTX-M IV}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ตามลำดับ บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3, 5: ตัวควบคุมบวกที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.4 และ 0.4 μM ตามลำดับ ที่เวลา 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ แถวที่ 2, 4, 6: ตัวควบคุมลบใช้ความเข้มข้นของ

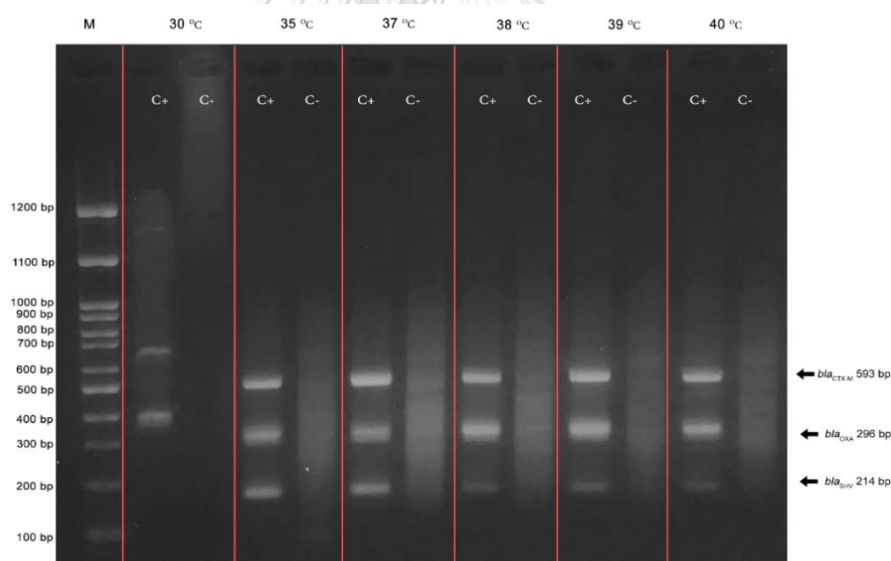
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.4 และ 0.4 μ M ตามลำดับ ที่เวลา 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ แถวที่ 7, 9, 11: ตัวควบคุมบวกที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.3 และ 0.3 μ M ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ แถวที่ 8, 10, 12: ตัวควบคุมลบที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.3 และ 0.3 μ M ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ



รูปที่ 22 ผลการทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์และเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ตามลำดับ บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3: ตัวควบคุมบวกที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.4 และ 0.4 μ M ตามลำดับ ที่เวลา 25 นาที และ 30 นาที ตามลำดับ, แถวที่ 2, 4: ตัวควบคุมลบใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.4 และ 0.4 μ M ตามลำดับ ที่เวลา 25 นาที และ 30 นาที ตามลำดับ

4.7.4 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

ทำปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสม เท่ากับ 50 ng ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M IV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.2 μ M ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นเส้นละ 0.4 μ M เวลาบ่มที่ 25 นาที บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30, 35, 37, 38, 39 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบดังรูปที่ 23 พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส พบผลผลิตของปฏิกิริยา Multiplex RPA ตามขนาดที่คาดหวังไว้ ขนาดผลผลิตของยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} เท่ากับ 501, 296 และ 175 คู่เบส ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิ 38, 39 และ 40 องศาเซลเซียส พบผลผลิตชัดเจน 2 ยีน ได้แก่ *bla*_{CTX-M IV} และ *bla*_{OXA} แต่ผลผลิตของยีน *bla*_{SHV} จาก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบผลผลิตใด ๆ จึงเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 3 ยีน



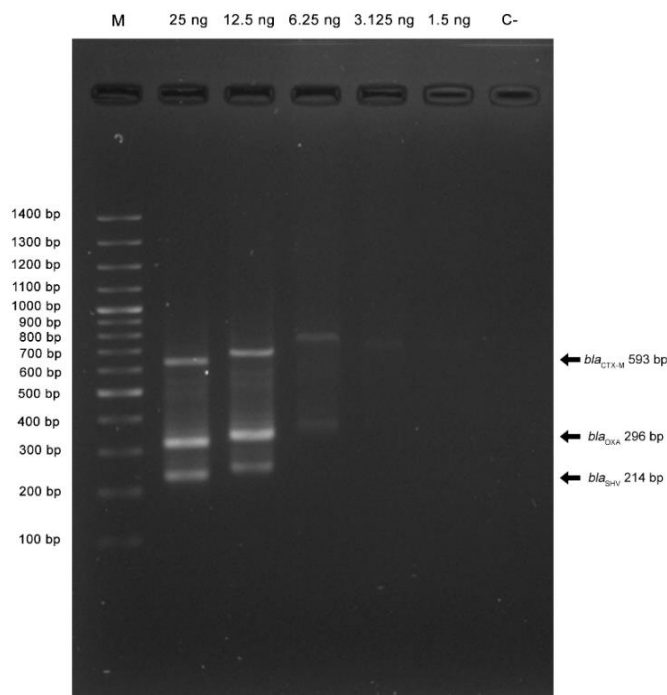
รูปที่ 23 ผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แลว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แลวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 แสดงผลของตัวควบคุมบวกที่อุณหภูมิ 30, 35, 37, 38, 39 และ 40 ตามลำดับ แลวที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 แสดงผลของตัวควบคุมลบ ที่อุณหภูมิ 30, 35, 37, 38, 39 และ 40 ตามลำดับ

4.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA กับไพรเมอร์ ชุดที่ 2

ในการทดสอบการเพิ่มปริมาณยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$ สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้เฉพาะในเชื้อที่สร้างเอนไซม์ CTX-M Group IV ได้แก่ CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-18, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27, Toho 2 (96) จากผลการตรวจหาชนิดของยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยวิธี PCR-Sequencing ในข้อ 4.5 พบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ CTX-M Group IV ได้แก่ CTX-M-14 และ CTX-M-27 ร้อยละ 29.1 และพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ CTX-M Group I ได้แก่ CTX-M-15 และ CTX-M-55 ร้อยละ 70.9 ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$ จึงไม่สามารถทดสอบครอบคลุมเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M ได้ทั้งหมด จึงทำการเปลี่ยนไพรเมอร์ดังกล่าวให้สามารถเพิ่มปริมาณยีน bla_{CTX-M} ได้หลากหลายมากขึ้น และออกแบบไพรเมอร์ bla_{SHV} ใหม่อีก 1 คู่ เนื่องจากไพรเมอร์ bla_{SHV} ในชุดที่ 1 เกิด Primer-dimer เมื่อนำไปตรวจวัดผลด้วยวิธี lateral flow strip ซึ่งจะทำให้การพัฒนาต่อเนื่องในอนาคต

4.8.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

การทดสอบปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบ เท่ากับ 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5 ng ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ความเข้มข้น 0.24 μ M บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 25 และ 12.5 ng พบผลผลิต RPA ครบทั้ง 3 ยีน ตามขนาดที่คาดหวังไว้ ดังนั้น ขนาดผลผลิตของยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} เท่ากับ 593, 296 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 6.25 ng พบผลผลิตเพียง 2 ยีน เท่านั้น คือ bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} และ ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 3.125 ng พบเพียงผลผลิตยีน bla_{CTX-M} เท่านั้น ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 1.5 ng ไม่พบผลผลิตใด ๆ ดังรูปที่ 24 จึงเลือกดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ 25 ng สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 3 ยีน

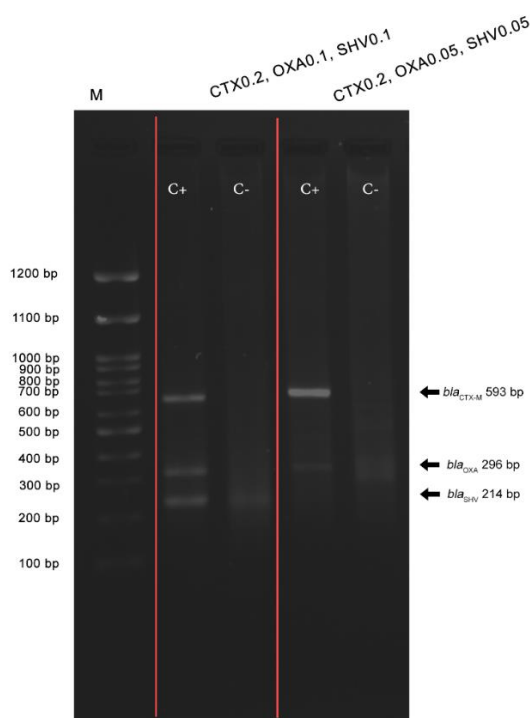


รูปที่ 24 ผลการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 แสดงผลของตัวควบคุมบวกที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5 นาโนกรัมตามลำดับ และแถวที่ 6: ตัวควบคุมลบ

4.8.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

ทำปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเท่ากับ 25 ng และทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ และ 0.2, 0.05 และ 0.05 μ M ตามลำดับ ผลการทดสอบ ดังรูปที่ 25 พบว่า ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้น 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ พบผลผลิต RPA ครบทั้ง 3 ยีน ตามที่คาดหวังไว้ ดังนี้ ขนาดผลผลิตของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} เท่ากับ 593, 296 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ ขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ความเข้มข้น 0.2, 0.05 และ 0.05 μ M ตามลำดับ พบผลผลิตเพียง 2 ชนิด คือผลผลิตยีน *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{OXA} แต่ผลผลิตของยีน *bla*_{OXA} จางกว่าผลผลิตยีน *bla*_{CTX-M}

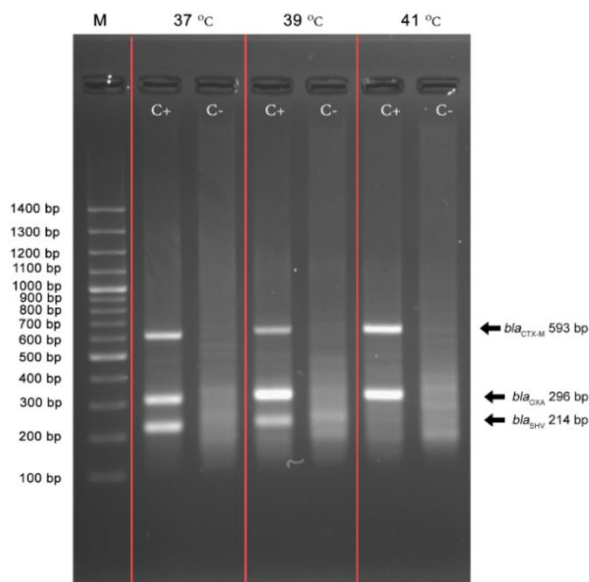
และไม่พบผลผลิตของยีน *bla_{SHV}* จึงเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-M}* ความเข้มข้น 0.2 μ M และ ยีน *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* ความเข้มข้น 0.1 μ M เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เห็นผลของปฏิกิริยา Multiplex RPA ได้ชัดเจนทั้ง 3 ยีน



รูปที่ 25 ผลการตรวจสอบผลผลิต Multiplex RPA จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวกที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ, แถวที่ 2: ตัวควบคุมลบที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ แถวที่ 3: ตัวควบคุมบวกที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.05 และ 0.05 μ M ตามลำดับ แถวที่ 4: ตัวควบคุมลบที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{SHV}* ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.05 และ 0.05 μ M ตามลำดับ

4.8.3 การทดสอบอุณหภูมิต่างๆที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

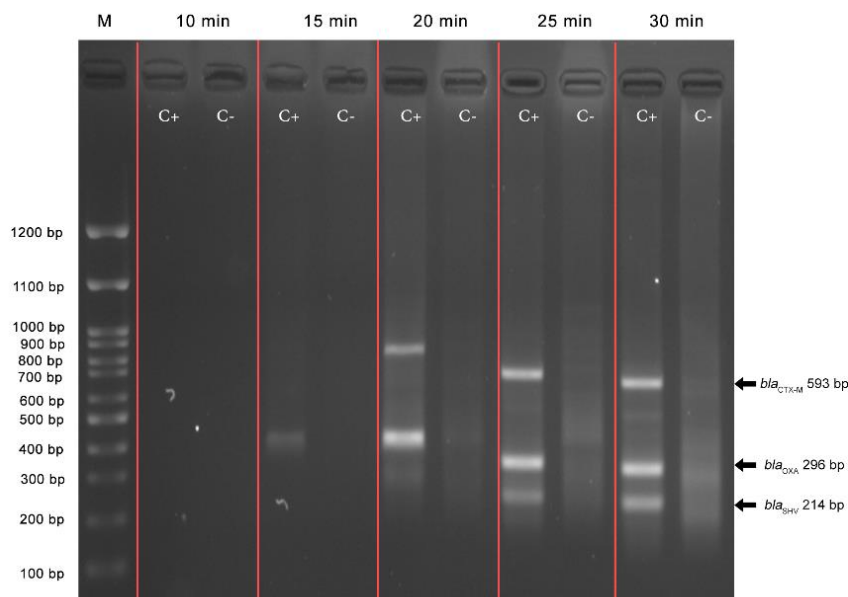
ทำปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเท่ากับ 25 ng และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ที่เหมาะสม ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนี้ 37, 39 และ 41 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบดังรูปที่ 26 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่พบผลผลิต Multiplex RPA ครบทั้ง 3 ยีน ตามขนาดที่คาดหวัง ดังนี้ ขนาดผลผลิตของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} เท่ากับ 593, 296 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ แต่ที่ อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ผลผลิตของยีน *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{SHV} จางกว่าผลผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส พบผลผลิตเพียง 2 ยีนเท่านั้น คือ *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{OXA} แต่ไม่พบผลผลิตของยีน *bla*_{SHV} จึงเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA เนื่องจากเป็นอุณหภูมิให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 3 ยีน



รูปที่ 26 ผลการทดสอบอุณหภูมิต่างๆที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3 และ 5: ตัวควบคุมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37, 39 และ 41 ตามลำดับ แถวที่ 2, 4 และ 6: ตัวควบคุมลบ บ่มที่อุณหภูมิ 37, 39 และ 41 ตามลำดับ

4.8.4 การหาเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

ทำปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเท่ากับ 25 ng และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ที่เหมาะสม ความเข้มข้นคู่ละ 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาแตกต่างกัน ดังนี้ 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ผลการทดสอบดังรูปที่ 27 พบว่า ที่เวลา 25 และ 30 นาที เป็นเวลาที่พบผลผลิต Multiplex RPA ครบทั้ง 3 ยีน ตามขนาดที่คาดหวัง ดังนี้ ขนาดผลผลิตของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} เท่ากับ 593, 296 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ ที่เวลา 20 นาที พบผลผลิตเพียง 2 ยีนเท่านั้น คือ *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{OXA} แต่ไม่พบผลผลิตของยีน *bla*_{SHV} ที่เวลา 15 นาที พบผลผลิตเพียง 1 ยีนเท่านั้น คือ *bla*_{OXA} แต่ไม่พบผลผลิตของยีน *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{SHV} และไม่พบผลผลิตของยีนใด ๆ เลยที่เวลา 10 นาที จึงเลือกเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ 25 นาที สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA เนื่องจากเป็นเวลาน้อยที่สุดที่ให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 3 ยีน



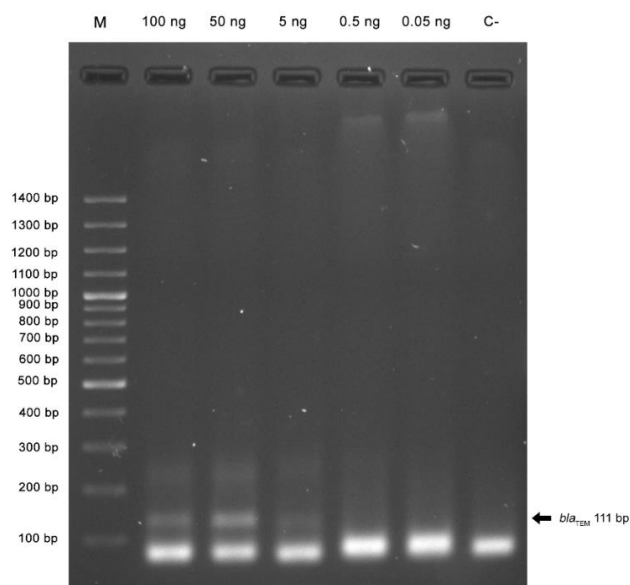
รูปที่ 27 ผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Multiplex RPA ของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3, 5, 7 และ 9: ตัวควบคุมบวก ที่เวลา 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ แถวที่ 2, 4, 6, 8 และ 10: ตัวควบคุมลบ ที่เวลา 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ

4.9 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA

เนื่องจากข้อจำกัดของน้ำยา TwistAmp® Basic reaction kit ของบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มียีน bla_{TEM} ของ *E. coli* สายพันธุ์ K12 หรือ BL21 ในชุดน้ำยา จึงไม่สามารถใช้น้ำยา RPA ในการตรวจยีน bla_{TEM} ในเชื้อ *E. coli* ได้ เพราะทำให้เกิดผลบวกปลอมในการศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Helicase dependent amplification (HDA) ด้วยชุดน้ำยา IsoAmp® II Universal tHDA kit ของบริษัท Biohelix ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้ในการตรวจหา ยีน bla_{TEM}

4.9.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA

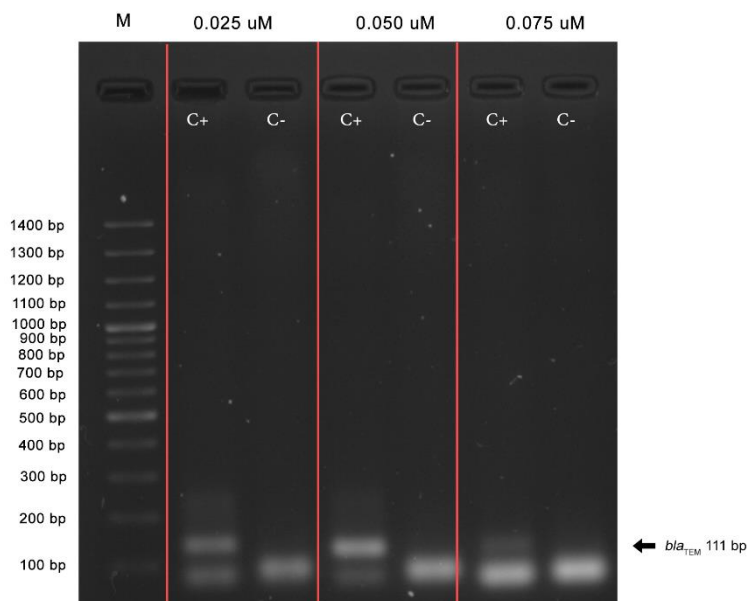
ทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 สำหรับการทดสอบยีน bla_{TEM} ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100, 50, 5, 0.5 และ 0.05 ng บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ 100 และ 50 ng พบผลผลิต HDA ยีน bla_{TEM} ตามที่คาดหวังไว้ ขนาด 111 คู่เบส ขณะที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ 5 ng พบผลผลิตจาง และความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ 0.5 และ 0.05 ng ไม่พบผลผลิตใด ๆ จึงเลือก ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ 50 ng เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่เห็นผลผลิตของปฏิกิริยา HDA ได้ชัดเจน ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 ผลการทดสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน *bla*_{TEM} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4 และ 5: ของตัวควบคุมบวกที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ความเข้มข้น 100, 50, 5, 0.5 และ 0.05 ng ตามลำดับ และแถวที่ 6: ตัวควบคุมลบ

4.9.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA

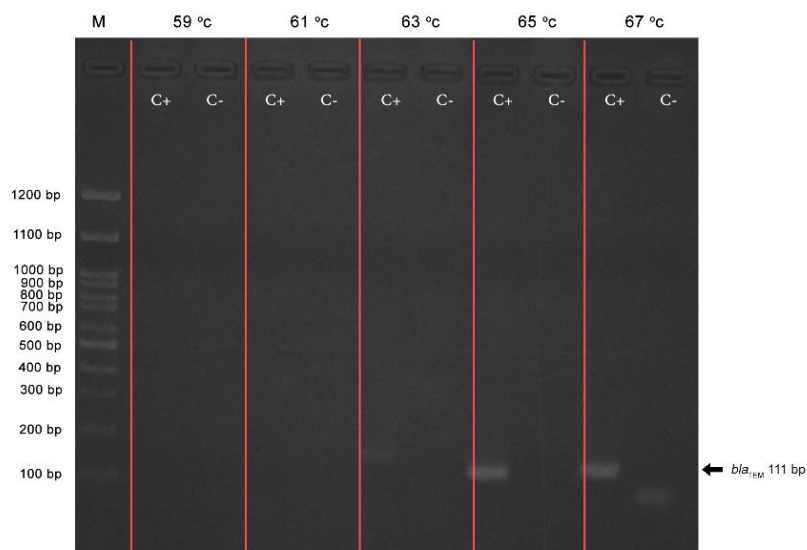
ทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 50 ng ทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{TEM} ที่ความเข้มข้น 0.025, 0.050 และ 0.075 μ M บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ผลการทดสอบดังรูปที่ 29 พบว่า ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.050 μ M พบผลผลิตยีน *bla*_{TEM} ตามที่คาดหวังไว้ ขนาด 111 คู่เบส ขณะที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 0.075 μ M พบผลผลิตจาง จึงเลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่ 0.025 μ M เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เห็นผลของปฏิกิริยา HDA ได้ชัดเจน



รูปที่ 29 ผลการทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน *bla*_{TEM} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3 และ 5: ตัวควบคุมบวก ที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.025, 0.050 และ 0.075 μ M ตามลำดับ แถวที่ 2, 4 และ 6 แสดงผลของตัวควบคุมลบ ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.025, 0.050 และ 0.075 μ M ตามลำดับ

4.9.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA

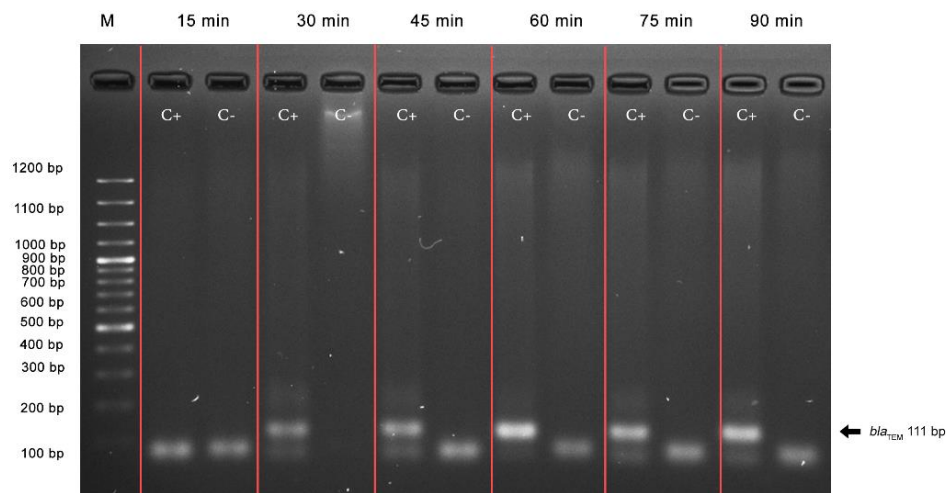
ทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 50 ng และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมเท่ากับ 0.025 μ M บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันดังนี้ 59, 61, 63, 65, และ 67 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ผลการทดสอบดังรูปที่ 30 พบว่า ที่อุณหภูมิ 65 และ 67 องศาเซลเซียส พบผลผลิตของยีน *bla*_{TEM} ตามที่คาดหวังไว้ ขนาด 111 คู่เบส ขณะที่อุณหภูมิ 59, 61 และ 63 ไม่พบผลผลิตใด ๆ จึงเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 65 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เห็นผลของปฏิกิริยา HDA ได้ชัดเจน



รูปที่ 30 ผลการทดสอบอนุกรมที่เหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน *bla*_{TEM} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3, 5, 7 และ 9: ตัวควบคุมบวก ที่ใช้อุณหภูมิเท่ากับ 59, 61, 63, 65 และ 67 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถวที่ 2, 4, 6, 8 และ 10: ตัวควบคุมลบ ที่ใช้อุณหภูมิเท่ากับ 59, 61, 63, 65 และ 67 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4.9.4 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA

ทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 50 ng ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมเท่ากับ 0.025 μ M บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในเวลาต่าง ๆ กัน ดังนี้ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ผลการทดสอบดังรูปที่ 31 พบว่า ที่เวลา 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที พบผลผลิตยีน *bla*_{TEM} ตามที่คาดหวังไว้ ขนาด 111 คู่เบส ส่วนที่เวลา 15 นาที ไม่พบผลผลิตใด ๆ จึงเลือกเวลาที่ 30 นาที เป็นเวลานที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เห็นผลของปฏิกิริยา HDA ได้ชัดเจน

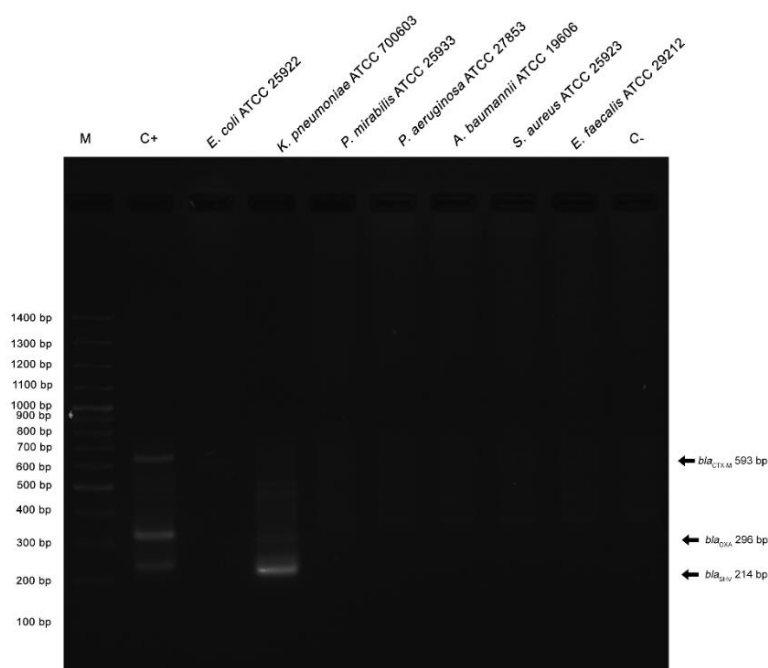


รูปที่ 31 ผลการทดสอบเวลาเหมาะสมในปฏิกิริยา HDA ของยีน *bla*_{TEM} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: แสดงถึงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11: ตัวควบคุมบวกที่ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ตามลำดับ แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12: ตัวควบคุมลบ ที่ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ตามลำดับ

4.10 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex RPA และ HDA

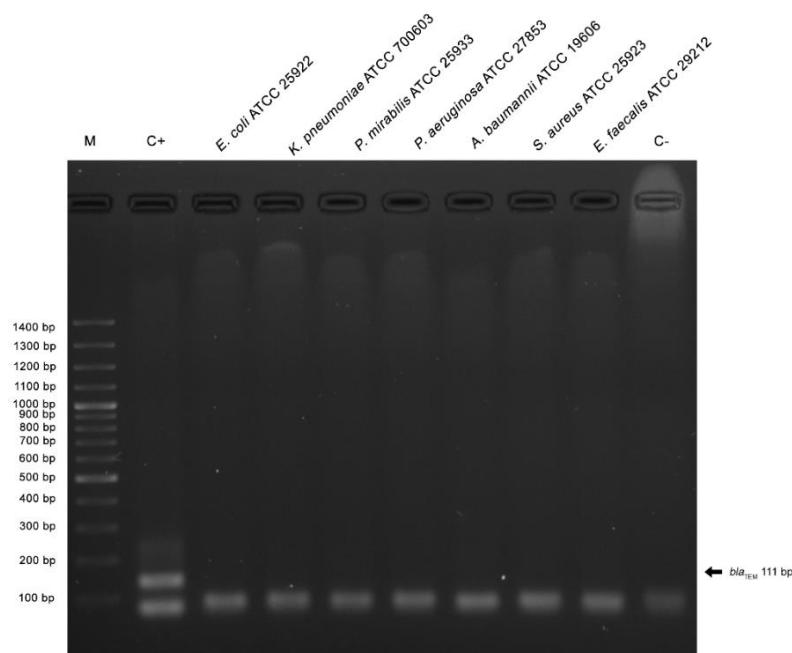
ทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex RPA ในการตรวจยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} และ ปฏิกิริยา HDA ในการตรวจยีน *bla*_{TEM} กับดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานแกรมลบ ดังนี้ *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 25933, *P. aeruginosa* ATCC 27853, และ *A. baumannii* ATCC 19606 เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานแกรมบวก ดังนี้ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. faecalis* ATCC 29212 และใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{TEM} ดีเอ็นเอของเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 เป็นตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{OXA} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการทดสอบพบว่า ในปฏิกิริยา Multiplex RPA เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 ให้ผลบวกที่ยีน *bla*_{SHV} ซึ่งเชื่อดังกล่าว เป็นเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ชนิด SHV-18 (97) ส่วนเชื้อชนิดอื่นตรวจไม่พบยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} ดังรูปที่ 32 และไม่มีเชื้อมาตรฐานชนิดใดเลยที่ให้ผลบวกต่อยีน *bla*_{TEM} เมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยา HDA ดังรูปที่ 33 ขณะที่ตัวควบคุมบวกให้ผลผลิต

Multiplex RPA และ HDA ของยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{TEM} ตามขนาดที่คาดหวังไว้
 ดังนั้นเทคนิค Multiplex RPA และ HDA มีความจำเพาะไม่เกิด ปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้ออื่นที่ไม่มียีน
 ดังกล่าว



รูปที่ 32 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกริยา Multiplex RPA จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{CTX-M},
*bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอ
 มาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวก แถวที่ 2 – 7: *E. coli* ATCC 25922,
K. pneumoniae ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 25933, *P. aeruginosa* ATCC 27853,
A. baumannii ATCC 19606, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. faecalis* ATCC 29212

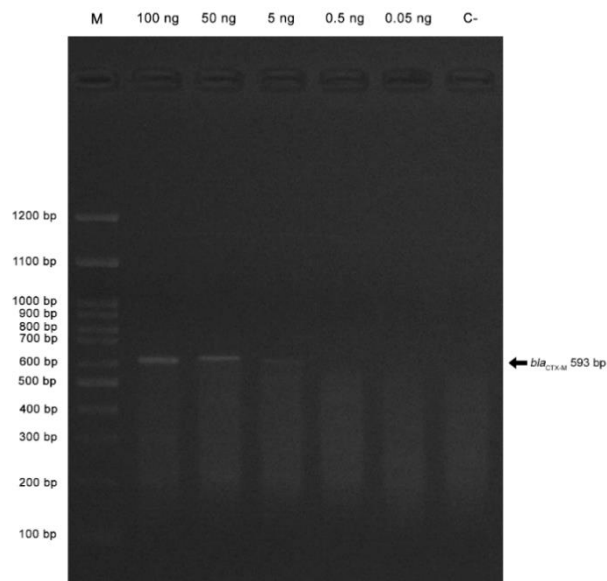
ตามลำดับ และ แถวที่ 8: ตัวควบคุมลบ



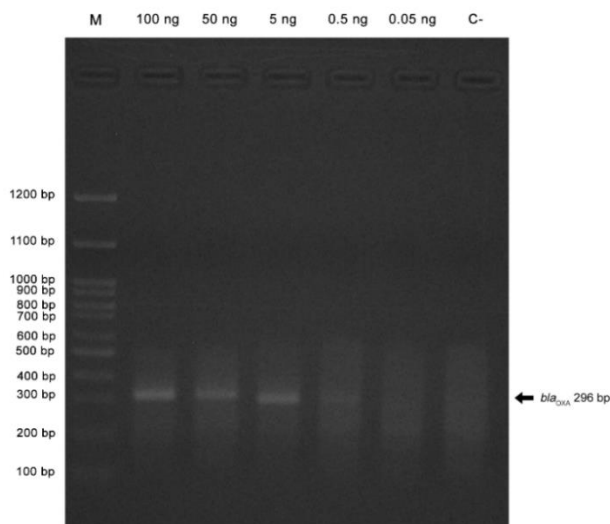
รูปที่ 33 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{TEM} บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวก แถวที่ 2 – 7: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. mirabilis* ATCC 25933, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 19606, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. faecalis* ATCC 29212 ตามลำดับ และ แถวที่ 8: ตัวควบคุมลบ

4.11 ผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA และยีน *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA

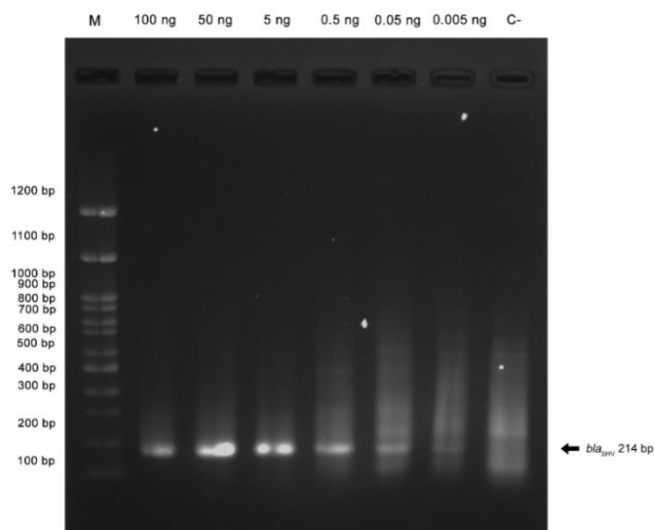
การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด โดยเจือจางดีเอ็นเอควบคุมบวกความเข้มข้นสิบเท่า (10-fold dilution) ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 ng ถึง 0.05 ng สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RPA ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก E120, E119 และ E053 ที่ให้ผลบวกสำหรับยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ตามลำดับ สำหรับปฏิกิริยา HDA ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 ที่มียีน *bla*_{TEM} และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการทดสอบพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA เท่ากับ 5, 0.5 และ 0.5 ng ตามลำดับ ดังรูปที่ 34, รูปที่ 35 และรูปที่ 36 ตามลำดับ และปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถตรวจหายีน *bla*_{TEM} ด้วยปฏิกิริยา HDA เท่ากับ 50 ng ดังรูปที่ 37



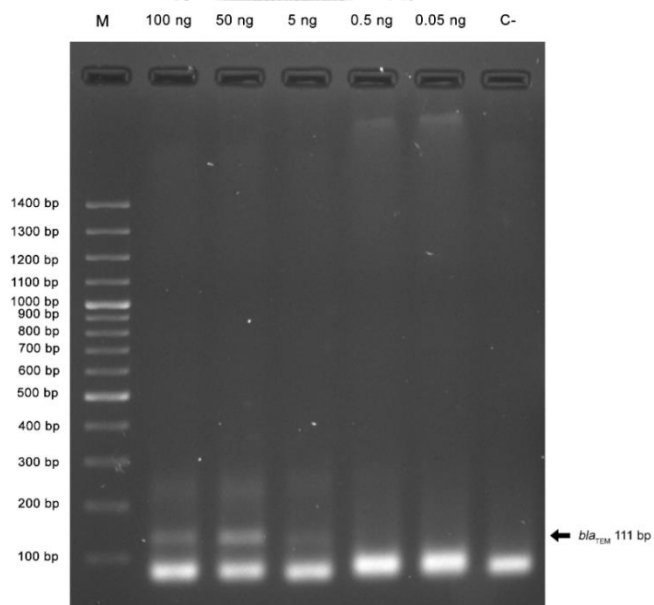
รูปที่ 34 ผลการทดสอบซีดีจำกัดในตรวจยีน *bla*_{CTX-M} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 เพอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6: ตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M} ความเข้มข้น 100, 50, 5, 0.5 และ 0.05 ng ตามลำดับ และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ



รูปที่ 35 ผลการทดสอบซีดีจำกัดในตรวจยีน *bla*_{OXA} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 เพอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6: ตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M} ความเข้มข้น 100, 50, 5, 0.5 และ 0.05 ng ตามลำดับ และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ



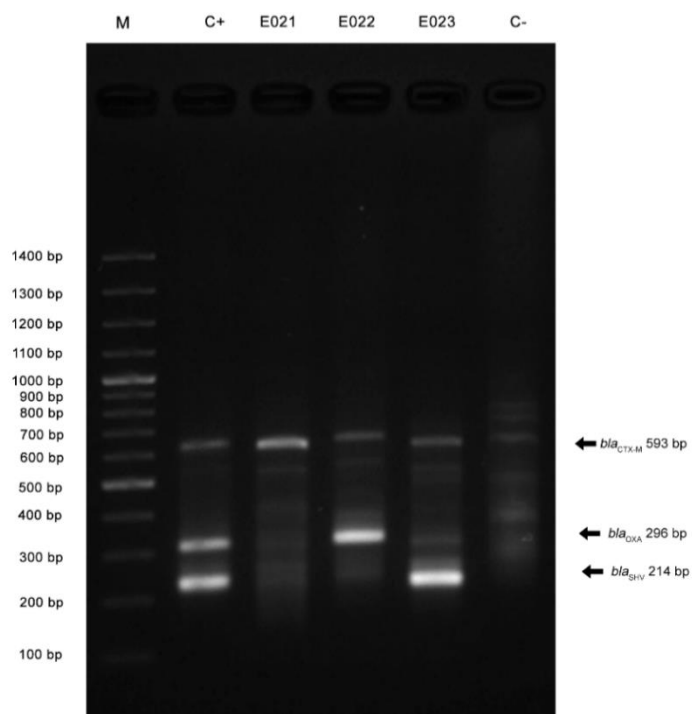
รูปที่ 36 ผลการทดสอบซีดีจำกัดในตรวจยีน *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 เพอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6: ตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M} ความเข้มข้น 100, 50, 5, 0.5, 0.05 และ 0.005 ng ตามลำดับ และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ



รูปที่ 37 ผลการทดสอบซีดีจำกัดในตรวจยีน *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 เพอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6: ตัวควบคุมบวกของยีน *bla*_{CTX-M} ความเข้มข้น 100, 50, 5, 0.5 และ 0.05 ng ตามลำดับ และแถวที่ 7: ตัวควบคุมลบ

4.12 การตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

การตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} , และ bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 ความเป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} และเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 ความเป็นตัวควบคุมบวกของยีน bla_{SHV} และ ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ พบว่าปฏิกิริยา Multiplex RPA สามารถเพิ่มปริมาณยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกได้ผลผลิตตามที่คาดหวังไว้ ขนาดผลผลิตของยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} เท่ากับ 593, 296 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ ดังรูปที่ 38 ผลการตรวจเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง พบยีน bla_{CTX-M} จำนวน 95 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) ยีน bla_{OXA} จำนวน 29 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30.5) และยีน bla_{SHV} จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.1) ส่วนเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง ไม่พบผลผลิตของยีนใด ๆ เมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้น ดังตารางที่ 19



รูปที่ 38 ผลการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว L: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวกที่ได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 *K. pneumoniae* สายพันธุ์ KP125 แถวที่ 2-4: เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก และแถวที่ 5: ตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 19 ผลการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา Multiplex RPA

ชนิดของยีนที่พบ	จำนวนของยีนที่พบในเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิก ที่สร้าง เอนไซม์ESBLs N = 95 (ร้อยละ)	จำนวนของยีนที่พบในเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิก ที่ไม่สร้าง เอนไซม์ESBLs N = 49 (ร้อยละ)
<i>bla</i> _{CTX-M}	95 (100)	0
<i>bla</i> _{OXA}	29 (30.5)	0
<i>bla</i> _{SHV}	2 (2.1)	0

4.13 การตรวจหายีน bla_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา HDA

การตรวจหายีน bla_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ด้วยปฏิกิริยา HDA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ พบว่า ปฏิกิริยา HDA สามารถเพิ่มปริมาณยีน bla_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกได้ผลผลิตตามที่คาดหวังไว้ ขนาด 111 คู่เบส ดังรูปที่ 39 การตรวจหายีน bla_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง พบยีน bla_{TEM} จำนวน 39 ตัวอย่าง (ร้อยละ 41.1) ส่วนเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง พบยีน bla_{TEM} จำนวน 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28.6) ดังตารางที่ 20



รูปที่ 39 ผลการตรวจหายีน bla_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา HDA ของยีน bla_{TEM} บน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แถว M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1: ตัวควบคุมบวกที่ได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EC137 แถวที่ 2-10: ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก และแถวที่ 11: ตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 20 ผลการตรวจหายีน bla_{TEM} ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกด้วยปฏิกิริยา HDA

ชนิดของยีนที่พบ	จำนวนของยีนที่พบในเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิก ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 95 (ร้อยละ)	จำนวนของยีนที่พบในเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์คลินิก ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs N = 49 (ร้อยละ)
bla_{TEM}	46	14

4.14 ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: PPV) ของเทคนิค Multiplex RPA และ HDA

การตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} และ *bla*_{TEM} ของเชื้อ *E. coli* จำนวน 144 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Multiplex RPA และ HDA เทียบกับวิธี conventional PCR ได้ค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบของเทคนิค Multiplex RPA ในการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} เท่ากับ 100% ส่วนการตรวจหายีน *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA พบว่ามีค่าความไว เท่ากับ 86.89% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% และค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 91.21% ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบของเทคนิค Multiplex RPA และ HDA

ผลการทดสอบ ด้วยวิธี PCR	ผลการทดสอบด้วยวิธี Multiplex RPA		ผลการทดสอบด้วย วิธี HDA		ความไว	ความจำเพาะ	ค่าทำนาย ผลบวก	ค่าทำนาย ผลลบ
	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ				
<i>bla</i> _{CTX-M}								
พบยีน <i>bla</i> _{CTX-M}	95	0			100	100	100	100
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{CTX-M}	0	49						
<i>bla</i> _{OXA}								
พบยีน <i>bla</i> _{OXA}	29	0			100	100	100	100
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{OXA}	0	115						
<i>bla</i> _{SHV}								
พบยีน <i>bla</i> _{SHV}	2	0			100	100	100	100
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{SHV}	0	142						
<i>bla</i> _{TEM}								
พบยีน <i>bla</i> _{TEM}			53	8	86.89	100	100	91.21
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{TEM}			0	83				

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่สามารถก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ในบางสายพันธุ์ และหากเกิดการติดเชื้อในระบบอื่น ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบประสาท และอาจติดเชื้อในกระแสเลือดที่อาจก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้ (24) โครงการควบคุมและป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้จัดให้เชื้อ *E. coli* ชนิดที่สร้างเอนไซม์ ESBLs เป็นเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพที่เป็นภัยคุกคามต่อคนไทยอย่างเร่งด่วน (30) การทราบความชุกและชนิดของเอนไซม์ ESBLs จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นแนวทางการควบคุมและป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาลและยังสามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพของการดำเนินการควบคุมดูแลป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพอีกด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วย แผนกจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในช่วงระหว่างเดือน กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 คัดเลือกเชื้อ *E. coli* จากการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs โดยใช้วิธี Disk diffusion ที่ให้ผลบวก จำนวน 95 ตัวอย่าง และเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลลบ จำนวน 49 ตัวอย่างมาตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี Combination disk method พบว่าให้ผลตรงกับการตรวจคัดกรองทั้ง 144 ตัวอย่าง แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่าง พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ ในประเทศไทย เช่น การศึกษาของ Bubpamala และคณะ ในปี 2018 (98) ที่ศึกษาลักษณะของพิโนไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ในประเทศไทย และการศึกษาของ Sethaphanich และคณะ ในปี 2016 (99) ที่ศึกษาการติดเชื้อในชุมชนและการรักษาการติดเชื้อ ESBLs ที่พบในผู้ป่วยแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติ และการศึกษาของ Sawatwong และคณะ ในปี 2019 (100) ที่ศึกษาเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ของผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด โดยพบว่า เชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ส่วนใหญ่คือต่อยากลุ่ม penicillins, cephalosporins, fluoroquinolones และยา Gentamicin แต่ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems

ในปัจจุบัน ยีน ESBLs ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบการระบาดสูงในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriales* ได้แก่ ยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} (101) โดยพบว่ายีน *bla*_{CTX-M} มีการแพร่กระจายสูงที่สุดทั่วโลก โดยในประเทศไทยพบส่วนใหญ่เป็นยีนชนิด CTX-M-15 และ CTX-M-14 (102) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้และการศึกษาของ Kiratisin และคณะ ในปี 2008 (73) ที่พบเชื้อ *E. coli* มียีน *bla*_{CTX-M} มากที่สุด รองลงมาคือยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ตามลำดับ แต่แตกต่างกับการศึกษาปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriales* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ของผู้ป่วยหอผู้ป่วยหนัก ในโรงพยาบาลตติยภูมิ ในประเทศไทย ที่ทำการศึกษาโดย Kiddee และคณะ ในปี 2019 (103) ที่พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs พบยีน *bla*_{CTX-M-55} มากที่สุด ส่วนเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 50 ตัวอย่างพบยีน *bla*_{TEM} ชนิด TEM-1 จำนวน 21 ตัวอย่าง คิดเป็น 42% ซึ่งเอนไซม์ TEM-1 จัดเป็นเอนไซม์ Broad-spectrum β -lactamase ที่มีคุณสมบัติดีต่อยา Penicillins และ 1st Generation cephalosporins จากการทำปฏิกิริยา Hydrolysis แต่ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อยา Oxyimino-cephalosporins จึงให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยวิธี Combination disk method (52) ส่วนยีน *bla*_{TEM} ที่จัดเป็น ESBLs เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *bla*_{TEM-1} โดยการแทนที่กรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่าง ๆ เกิดเป็น TEM ชนิดใหม่ มากกว่า 90 ชนิด ทำให้ได้ออกฤทธิ์ต่อยากลุ่ม Oxyimino-cephalosporins เช่น cefuroxime, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime และ cefepime (9) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนดีเอ็นเอ ESBLs ที่พบร่วมกับแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่มียีน *bla*_{CTX-M-15} นอกจากจะมีการดีเอ็นเอต่อยากลุ่ม cephalosporin แล้ว ยังมีการดีเอ็นเอร่วมกับการดีเอ็นเอกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ Gentamicin, Levofloxacin และ Amoxicillin/Clavulanic acid และพบการดีเอ็นเอต่อยา ceftazidime สูงขึ้นในเชื้อที่มียีน *bla*_{CTX-M-55} สอดคล้องกับการศึกษาในปี 2005 ของ Al-Agamy และคณะ (104) ที่ทำการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M} ของเชื้อ *E. coli* ในประเทศอียิปต์ ที่พบว่าเชื้อที่ตรวจพบยีน ESBLs บางสายพันธุ์ จะมี Aminoglycoside-modifying enzymes ร่วมด้วยถึง 6 แบบ ทำให้เกิดโอกาสในการดีเอ็นเอต่อยากลุ่ม aminoglycoside เพิ่มมากขึ้น ซึ่งความสัมพันธ์ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs กับการดีเอ็นเอต่อยากลุ่ม fluoroquinolones อธิบายได้ว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดีเอ็นเอต่อยากลุ่ม fluoroquinolones ได้แก่ ยีน *qepA* ยีน *qnr* และยีน *aac-6'-Ib-cr* สามารถพบได้บนพลาสมิด (Plasmid-mediated quinolone resistance ; PMQRs) (105) และถูกส่งต่อในสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์ได้แบบ horizontal gene transfer พร้อมกับยีน ESBLs ที่อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน โดยมักพบร่วมกับ

ยีน *bla*_{CTX-M} (106) ส่วนการดื้อยา Gentamicin เกิดจากยีน *aac-6'-Ib-cr* ที่ควบคุมการสร้าง เอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา Gentamicin เพิ่มมากขึ้นได้ (107) นอกจากนี้ มีการศึกษาที่พบว่ายีน *bla*_{CTX-M-55} สามารถทำปฏิกิริยา hydrolysis เพื่อทำลายยา ceftazidime ได้ดีกว่ายีน ESBLs ชนิดอื่น ๆ (108) แต่ในการศึกษาของ Martinez และคณะ (109) พบว่าการดื้อยา Ciprofloxacin ที่เกิดจากยีนบนพลาสมิดนั้น มักมีการดื้อยาในระดับต่ำ ส่วนการพบการดื้อยาระดับสูง อาจเกิดจากกลไกการดื้อยาชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น กลไกลดการนำเข้า ของยาเข้าสู่เซลล์ กลไกการปั๊มยาออกจากเซลล์ เป็นต้น

การตรวจหายีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M IV}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดงงานวิจัยของ Kim และคณะ ในปี 2009 (93) ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิด TEM, OXA, SHV, CTX-M, CMY และ DHA เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR โดยแบ่งไพรเมอร์เป็น 2 ชุด ได้แก่ ไพรเมอร์ชุดที่ 1 จำเพาะต่อยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิด CTX-M IV, TEM, OXA และ SHV และไพรเมอร์ชุดที่ 2 จำเพาะต่อยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิด CMY II, CTX-M I, CTX-M II และ DHA เมื่อเทียบกับวิธี Conventional PCR พบว่าให้ผลตรงกัน 100% แต่ในการศึกษารั้งนี้พบว่าวิธี Multiplex PCR ให้ผลไม่ตรงกับวิธี Conventional PCR-Sequencing เนื่องจากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M} ดงงานวิจัยของ Kim และคณะ (93) นั้นสามารถตรวจหาได้เฉพาะการสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M group IV ได้แก่ CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-18, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 และ Toho 2 (96) เท่านั้น จึงไม่สามารถตรวจหายีน *bla*_{CTX-M} ได้ครอบคลุมทุกรูปแบบ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นที่ใช้ไพรเมอร์ *bla*_{CTX-M IV} ชุดเดียวกัน คือ การศึกษาของ Singh และคณะ ในปี 2019 (110) พบผลการทดสอบใกล้เคียงกัน การทดสอบ Multiplex PCR ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าว เหมาะกับการศึกษาในแหล่งที่มีการระบาดของยีน *bla*_{CTX-M} ชนิด CTX-M group IV

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิค Multiplex Recombinase polymerase amplification (Multiplex RPA) เพื่อใช้ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ที่พบบ่อย ได้แก่ ยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} ซึ่งเทคนิค RPA เป็นเทคนิค Isothermal nucleic acid amplification technology เทคนิคหนึ่ง ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจระดับจีโนมได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก

มีความจำเพาะสูง ใช้เวลาการทดสอบไม่นาน เหมาะกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือ การทดสอบภาคสนาม และสามารถตรวจหายีนหลายชนิดในปฏิกิริยาเดียวกันได้ นอกจากนี้ผลผลิต ที่ได้จากปฏิกิริยา RPA สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคอื่น ๆ ได้ เช่น Bridging flocculation (77), Real time RPA (111) และ Lateral flow assay (112) อย่างไรก็ตาม พบว่า RPA มีข้อจำกัดคือ เอนไซม์ recombinase ในน้ำยา RPA เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K12 ที่ดัดต่อ พันธุกรรม ซึ่งมียีน bla_{TEM} จึงไม่สามารถใช้เทคนิค RPA ในการตรวจยีน bla_{TEM} ได้เพราะทำให้เกิดผลบวกปลอม งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Helicase dependent amplification (HDA) เพื่อใช้ ในการตรวจหายีน bla_{TEM} ซึ่งเป็นยีน ESBLs ที่มีอุบัติการณ์สูงเช่นกัน

ในการทดสอบเทคนิค Multiplex RPA ด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 1 ที่จำเพาะต่อยีน $bla_{CTX-M IV}$, bla_{OXA} , และ bla_{SHV} ดังงานวิจัยของ Kim และคณะ ในปี 2009 (93) พบผลผลิตตามที่คาดหวังไว้ ขนาด 501, 296 และ 175 คู่เบส ตามลำดับ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ 50 ng อุณหภูมิที่ เหมาะสมเท่ากับ 37 °C และเวลาเท่ากับ 25 นาที อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ชุดนี้มีข้อจำกัด เนื่องจาก สามารถตรวจหาเฉพาะยีน $bla_{CTX-M IV}$ เท่านั้น จึงไม่ครอบคลุมชนิดยีน CTX-M อื่น ๆ จึงเปลี่ยน ไพรเมอร์ชุดใหม่ที่ครอบคลุมชนิดยีน bla_{CTX-M} ผลการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค Multiplex RPA พบผลผลิตตามที่คาดหวังไว้ ขนาด 593, 296 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ เท่ากับ 37 °C เป็นเวลา 25 นาที สภาวะที่เหมาะสมที่ทดสอบได้ใกล้เคียงกับการศึกษาอื่น ๆ ที่ใช้ เทคนิค Multiplex RPA เช่น การศึกษาของ Gao และคณะ ในปี 2016 (113) ที่ทำการพัฒนาเทคนิค RPA เพื่อการตรวจหาเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างอาหาร โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส และเวลาบ่ม 20 นาที Piepenburg และคณะ (74) ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจยีน Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA) ด้วยเทคนิค real-time RPA โดยสามารถตรวจแยก ชนิดของยีน MRSA ได้โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้เวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่ใช้แหล่งความร้อนชนิดอื่นในการบ่มปฏิกิริยา RPA เช่น ตู้บ่มเพาะเชื้อ (114) อ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิ (115) ก่อ่งร้อน (Heat block) (116) และการใช้อุณหภูมิร่างกายในการทำ ปฏิกิริยา (117) เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน ESBLs กับเทคนิคอื่น ๆ พบว่า เทคนิค Multiplex RPA ใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าการศึกษาของ Anjum และคณะ ในปี 2013 (8) ที่ทำการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ตรวจแยกชนิดของยีน ESBLs ในเนื้อสัตว์ พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ใน

การทำปฏิกิริยาเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และการศึกษาของ Costa และคณะ (91) ที่ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณยีนดื้อยา ESBLs โดยต้องทำปฏิกิริยาอย่างน้อย 90 นาที และต้องใช้เครื่อง Thermocycler ในการให้ความร้อนแก่ปฏิกิริยา (118) แต่อย่างไรก็ตาม การทดสอบด้วยวิธี Multiplex RPA เป็นเทคนิคที่ใช้โปรตีนและ crowding agents คือ Carbowax20M, Dithiothreitol และ Phosphocreatine ในการดำเนินปฏิกิริยา เมื่อเติมดีเอ็นเอต้นแบบ จะทำให้เกิด DNA-protein-crowding agent complexes ที่ไม่สามารถตรวจสอบผลผลิตได้โดยตรงด้วยวิธี Gel electrophoresis จำเป็นต้องมีขั้นตอน DNA purification เพื่อขจัดโปรตีนที่ใช้ในปฏิกิริยา มิฉะนั้นจะทำให้เกิด smear band ไม่สามารถอ่านผลการทดสอบได้ (75) โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ชุด NucleoSpin® ซึ่งจะใช้เวลาทำบริสุทธิ์ประมาณ 6 นาที เท่านั้น

การตรวจหายีน bla_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน bla_{TEM} เท่ากับ $0.025 \mu\text{M}$ บ่มที่อุณหภูมิ 65°C ซึ่งสามารถใช้เครื่องมือทั่วไปในห้องปฏิบัติการในการทำปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับเทคนิค RPA แต่จำเป็นต้องใช้ mineral oil เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำยา เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ คือ 65 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการทดสอบ 30 นาที การศึกษาของ Doseeva และคณะ ในปี 2011 (86) ที่ได้พัฒนาเทคนิค HDA เพื่อตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* โดยผลการทดสอบพบ สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเวลาที่ใช้เท่ากับการตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA ที่พัฒนาได้ ซึ่งเร็วกว่าเทคนิค Multiplex PCR แต่พบว่าเกิด Primer-dimer ขึ้นในปฏิกิริยา HDA เนื่องจากเทคนิค HDA เป็นเทคนิคที่ใช้ *Bst* DNA polymerase ในปฏิกิริยา ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนต่อสารยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก (Amplification inhibitor) ได้ดีกว่า *Taq* polymerase ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จึงทำให้เทคนิค HDA เกิด Primer-Dimer ได้ง่าย (15) และเนื่องจากเอนไซม์ helicase ที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพและความเร็วในการแยกสายดีเอ็นเอต่ำ จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีความยาว 70 - 120 คู่เบส เท่านั้น (16) โดยผลผลิตของเทคนิค HDA ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้มีขนาด 111 คู่เบส

ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจหายีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA เท่ากับ 5, 0.5 และ 0.5 นาโนกรัม ตามลำดับ และขีดจำกัดต่ำสุดที่จะสามารถตรวจหายีน

*bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA เท่ากับ 50 ng ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Ahmed และคณะ ในปี 2015 (17) ที่ได้ทำการพัฒนาเทคนิค RPA เพื่อตรวจหาเชื้อ *Madurella mycetomatis* ในผู้ป่วยโรค Mycetoma โดยพบว่าขีดจำกัดต่ำสุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.47 ng และการศึกษาของ Wee และคณะ ในปี 2015 (76) ทำการพัฒนาเทคนิค RPA ร่วมกับ Bridging flocculation ในการตรวจหาชิ้นที่จำเพาะต่อการเกิด DNA methylation ขีดจำกัดต่ำสุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.5 ng ซึ่งสังเกตได้ว่าการศึกษาข้างต้นรวมถึงการศึกษานี้ มีดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการศึกษาเป็น ดีเอ็นเอสายคู่ (double-stand DNA) ดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง และใช้วิธี Agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลผลิต RPA แต่ในงานวิจัยของ Kersting และคณะ ในปี 2014 (119) ที่พัฒนาเทคนิค RPA ร่วมกับ Lateral flow assay ในการตรวจหาเชื้อ *Plasmodium falciparum* สามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้นเพียง 10 fg และพบว่าวิธีมีขีดจำกัดต่ำสุดต่ำกว่าเมื่อทำการทดสอบเทียบกับการใช้วิธี Agarose gel electrophoresis และการศึกษาของ Du และคณะ ในปี 2017 (120) ที่พัฒนาเทคนิค HDA ร่วมกับ lateral flow assay ในการทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* พบขีดจำกัดต่ำสุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่สามารถทดสอบได้อยู่ในช่วง 73.4 – 80.7 fg ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ ที่พบว่าการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Lateral flow assay มีความไวสูงกว่าวิธี Agarose gel electrophoresis (121, 122) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Reid และ คณะ ในปี 2018 (123) ที่ทำการพัฒนาเทคนิค Multiplex Real-time PCR สำหรับการตรวจหาชิ้น ESBLs ของผู้ป่วยโรคติดเชื้อทางระบบทางเดินปัสสาวะ พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจหาชิ้น *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} เท่ากับ 0.001 ng และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจหาชิ้น *bla*_{TEM} เท่ากับ 0.061 ng ทั้งนี้ อาจเกิดจากความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำที่สุดที่สามารถตรวจด้วยสี Ultra pure dye ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เท่ากับ 20 พิโคกรัม (124) ซึ่งสูงกว่าวิธี Lateral flow assay และ Real-time PCR นอกจากนี้ยังพบว่ามี ในการทดสอบความจำเพาะ พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้ออื่น ดังนี้ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 25933, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 19606, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. faecalis* ATCC 29212 แต่ในการทดสอบ Multiplex RPA พบเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 ให้ผลบวกที่ยีน *bla*_{SHV} ซึ่งเชื่อดังกล่าว เป็นเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ชนิด SHV-18 (97)

เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกจำนวน 95 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยเทคนิค Multiplex RPA และเทคนิค HDA ที่พัฒนาขึ้น พบว่า ทั้งหมดให้ผลการตรวจหาชิ้น *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA ตรงกับผลการทดสอบด้วยวิธี Nucleotide sequencing

พบว่า ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบที่ได้จากเทคนิค Multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้น มีค่า 100% ส่วนการตรวจหา ยีน *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA พบว่าค่าความไวเท่ากับ 86.89% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 91.21% โดยมีเชื้อ *E. coli* จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR แต่ให้ผลลบเมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค HDA ทั้งนี้อาจเกิดจากคุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้ที่เก็บไว้เป็นเวลานาน อาจเป็นสาเหตุให้ดีเอ็นเอเกิดการสลายได้ (125, 126) ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดด้วยเทคนิค HDA ที่ต้องการปริมาณความเข้มข้นของ DNA template สูงได้ ในการตรวจหา ยีน *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} และ *bla*_{KPC} ด้วยเทคนิค DNA Microarray (127) พบความไวและความจำเพาะของการตรวจ ยีน *bla*_{SHV} เท่ากับ 98.8% และ 100% ตามลำดับ ยีน *bla*_{TEM} เท่ากับ 100% และ 96.4% ตามลำดับ ยีน *bla*_{CTX-M} 100% และ 100% ตามลำดับ การศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจหา ยีน ESBLs ด้วยวิธี AID Line probe assay (128) พบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจ ยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} และ ยีน *bla*_{TEM} เท่ากับ 100% ซึ่งความไวและความจำเพาะในการตรวจ ยีน *bla*_{TEM} สูงกว่าในการศึกษาครั้งนี้

เทคนิค Multiplex RPA และ HDA ที่พัฒนาขึ้น เพื่อตรวจหา ยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้แก่ *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และสามารถ ใช้เครื่องให้ความร้อนที่มีทั่วไปในห้องปฏิบัติการในการเพิ่มปริมาณยีนได้ นอกจากนี้ยังมีค่าความไว และความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตาม ในอนาคตอาจพัฒนาวิธีการตรวจวัดผลให้รวดเร็ว สะดวก และ มีความไวสูงขึ้นกว่าการใช้วิธี Agarose gel electrophoresis เช่น การวัดผลด้วย Lateral flow strip

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของชนิดยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} กับความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ที่งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ค.ศ. 2017 ถึง กันยายน ค.ศ. 2018 แบ่งเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 95 ตัวอย่างและเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์รูปแบบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกด้วยวิธีการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBLs โดยใช้วิธี Disk diffusion จำนวน 95 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยา β -lactam ในกลุ่ม penicillins, Cephalosporin, Fluoroquinolone และกลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ยา Gentamicin สูง และเชื้อทั้งหมด ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems เมื่อทดสอบหายีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยวิธี PCR-Sequencing พบยีน *bla*_{CTX-M} ร้อยละ 100 เป็นชนิด CTX-M-14, CTX-M-15 , CTX-M-27 และ CTX-M-55 รองลงมาพบยีน *bla*_{TEM} ร้อยละ 42.1 เป็นยีน ESBLs ได้แก่ TEM-127 และ TEM-215 และไม่ใช่เอนไซม์ ESBLs ได้แก่ TEM-1 และ TEM-1b ยีน *bla*_{OXA} พบร้อยละ 30.5 เป็นยีน ESBLs คือชนิด OXA-16 และไม่ใช่เอนไซม์ ESBLs คือ OXA-1 และยีน *bla*_{SHV} พบ 2.1% เป็นชนิด SHV-18 ทั้งหมด สำหรับเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBLs จำนวน 49 ตัวอย่าง พบยีน *bla*_{TEM} เพียงอย่างเดียว แต่ไม่ใช่ยีนดื้อยา ESBLs เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน ESBLs ร่วมกับการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่มต่าง ๆ พบว่า เชื้อที่พบยีน *bla*_{CTX-M-15} มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Gentamicin, Levofloxacin และ Amoxicillin/Clavulanic acid เพิ่มมากขึ้น และเชื้อที่พบยีน *bla*_{CTX-M-55} มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Ceftazidime และ Gentamicin เพิ่มมากขึ้น

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ด้วยเทคนิค Multiplex RPA ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 25 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} เท่ากับ 0.2, 0.1 และ 0.1 μ M ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 100% ขณะที่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับ

การทดสอบยีน *bla*_{TEM} ด้วยเทคนิค HDA ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.025 μ M บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่า ค่าความไวเท่ากับ 86.89% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% และ ค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 91.21% โดยใช้เครื่องให้ความร้อนทั่วไปได้ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทางอณูชีววิทยา แต่ในการทำปฏิกิริยา Multiplex RPA จำเป็นต้องมีขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ก่อนการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Gel electrophoresis

เทคนิค Multiplex RPA และ HDA ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหายีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, และ *bla*_{SHV} ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้เวลาทดสอบไม่นาน และมีขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยาก เหมาะกับการใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะ และสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในศึกษาการระบาดของยีน *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} และ *bla*_{SHV} ของเชื้อ *E. coli* เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดทำแนวทางการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อในโรงพยาบาลได้

บรรณานุกรม

1. Center for Disease Control and Prevention. Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR / AMR): Biggest Threats and Data [Internet]. 2019 [cited 2018 Apr 11]. Available from: https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html/.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Internet]. 2014 [cited 2018 Apr 11]. Available from: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
3. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand. Antimicrobial Resistance 2000-2016 [Internet]. [cited 2018 Apr 11]. Available from: <http://narst.dmsc.moph.go.th/>.
4. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211-33. doi:10.1128/aac.39.6.1211 PubMed PMID: 7574506; PubMed Central PMCID: PMC162717.
5. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
6. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, et al. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):199-205. doi:10.1128/JCM.01319-06.
7. Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M, Weile J, Schröppel K, Wichelhaus TA, et al. Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. *J Clin Microbiol*. 2010 Feb;48(2):460-71. Epub 2009 Dec 9. doi:10.1128/JCM.00765-09 PubMed PMID: 20007393; PubMed Central PMCID: PMC2815585.
8. Anjum MF, Lemma F, Cork DJ, Meunier D, Murphy N, North SE, et al. Isolation and detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* from meat using chromogenic agars and isothermal loop-mediated amplification (LAMP) assays. *J Food Sci*. 2013 Dec;78(12):M1892-8. doi:10.1111/1750-3841.12297; PubMed

Central PMCID: 24329955.

9. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):933-51. doi:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001 PubMed PMID: 11585791; PubMed Central PMCID: PMC89009.
10. Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review. *Lab Chip.* 2012 Jul 21;12(14):2469-86. Epub 2012 May 16. doi:10.1039/c2lc40100b PubMed PMID: 22592150.
11. Piepenburg O, Williams CH, Armes NA, Stemple DL, inventors; Alere San Diego Inc, assignee. Recombinase polymerase amplification. United States patent US 7,399,590 B2. 2008 Jul 15.
12. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004 Aug;5(8):795-800. Epub 2004 Jul 9. doi:10.1038/sj.embor.7400200 PubMed PMID: 15247927; PubMed Central PMCID: PMC1249482.
13. Jeong Y-J, Park K, Kim D-E. Isothermal DNA amplification in vitro: The helicase-dependent amplification system. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Oct;66(20):3325-36. Epub 2009 Jul 24. doi:10.1007/s00018-009-0094-3 PubMed PMID: 19629390.
14. An L, Tang W, Ranalli TA, Kim H-J, Wytiaz J, Kong H. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J Biol Chem.* 2005 Aug 12;280(32):28952-8. Epub 2005 Jun 13. doi:10.1074/jbc.M503096200 PubMed PMID: 15955821; PubMed Central PMCID: PMC1361353.
15. Cao Y, Kim H-J, Li Y, Kong H, Lemieux B. Helicase-dependent amplification of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013 Oct 11;104(1):15.11.1-15.11.12. doi:10.1002/0471142727.mb1511s104 PubMed PMID: 24510297.
16. Ali JA, Maluf NK, Lohman TM. An oligomeric form of *E. coli* UvrD is required for optimal helicase activity. *J Mol Biol.* 1999 Nov 5;293(4):815-34. doi:10.1006/jmbi.1999.3185 PubMed PMID: 10543970.
17. Ahmed SA, van de Sande WW, Desnos-Ollivier M, Fahal AH, Mhmoud NA, de Hoog GS. Application of isothermal amplification techniques for identification of

- Madurella mycetomatis*, the prevalent agent of human mycetoma. J Clin Microbiol. 2015;53(10):3280-5. Epub 2015 Aug 5. doi:10.1128/JCM.01544-15 PubMed PMID: 26246484; PubMed Central PMCID: PMC4572522.
18. Murinda SE, Ibekwe AM, Zulkaffly S, Cruz A, Park S, Razak N, et al. Real-time isothermal detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using recombinase polymerase amplification. Foodborne Pathog Dis. 2014 Jul;11(7):529-36. Epub 2014 Apr 21. doi:10.1089/fpd.2013.1663 PubMed PMID: 24749488.
19. Mahalanabis M, Do J, ALMuayad H, Zhang JY, Klapperich CM. An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification. Biomed Microdevices. 2010 Apr;12(2):353-9. doi:10.1007/s10544-009-9391-8 PubMed PMID: 20066496; PubMed Central PMCID: PMC2998058.
20. Wee EJ, Lau HY, Botella JR, Trau M. Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings. Chem Commun (Camb). 2015 Apr 7;51(27):5828-31. Epub 2015 Jan 26. doi:10.1039/c4cc10068a PubMed PMID: 25622026.
21. Cao Y, Zheng K, Jiang J, Wu J, Shi F, Song X, et al. A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I. Food Chem. 2018 Nov 15;266:73-8. Epub 2018 May 26. doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.115 PubMed PMID: 30381228.
22. Liu H-b, Zang Y-X, Du X-j, Li P, Wang S. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria. J Dairy Sci. 2017 Sep;100(9):7016-25. Epub 2017 Jul 12. doi:10.3168/jds.2017-12566 PubMed PMID: 28711269.
23. Cai H. A simple nucleic acid dipstick for rapid influenza detection: Toward the development of a real time diagnosis assay at point-of-care. Los Alamos, NM: Los Alamos National Lab; 2007.
24. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123-40. doi:10.1038/nrmicro818 PubMed PMID: 15040260.
25. Karlowsky JA, Denisuk AJ, Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, et al. In vitro activity of fosfomycin against *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections in Canada as part of the CANWARD surveillance study.

- Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):1252-6. Epub 2013 Dec 9. doi:10.1128/AAC.02399-13 PubMed PMID: 24323476; PubMed Central PMCID: PMC3910835.
26. Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, et al. Early onset neonatal sepsis: The burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. Pediatrics. 2011 May;127(5):817-26. Epub 2011 Apr 25. doi:10.1542/peds.2010-2217 PubMed PMID: 21518717; PubMed Central PMCID: PMC3081183.
27. Tas T, Mengeloglu Z, Kocoglu E, Bucak Ö. In vitro activity of fosfomycin against *Escherichia coli* strains isolated from recurrent urinary tract infections. South Eastern Europe Health Sci J. 2013;3(2):147-51.
28. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis. 1987 Mar;155(3):377-89. doi:10.1093/infdis/155.3.377 PubMed PMID: 3543152.
29. Hortiwakul T, Nagij S, Chusri S, Silpapojakul K. Nosocomial bloodstream infection in Songklanagarind Hospital: Outcome and factors influencing prognosis. J Med Assoc Thai. 2012 Feb;95(2):170-4. PubMed PMID: 22435245.
30. วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. คู่มือ การควบคุมและป้องกันแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาล. กรุงเทพฯ: โครงการควบคุมและป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย; 2558.
31. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. Chem Rev. 2005 Feb;105(2):395-424. doi:10.1021/cr030102i PubMed PMID: 15700950.
32. Terico AT, Gallagher JC. Beta-lactam hypersensitivity and cross-reactivity. J Pharm Pract. 2014 Dec;27(6):530-44. Epub 2014 Aug 14. doi:10.1177/0897190014546109 PubMed PMID: 25124380.
33. Barber M, Waterworth PM. Antibacterial activity of the penicillins. Br Med J. 1962 Apr 28;1(5286):1159-64. doi:10.1136/bmj.1.5286.1159 PubMed PMID: 13864843; PubMed Central PMCID: PMC1958721.
34. Marcy SM, Klein JO. The isoxazolyl penicillins: Oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. Med Clin North Am. 1970 Sep;54(5):1127-43. doi:4919148.

35. Basker M, Edmondson R, Sutherland R. Comparative antibacterial activity of azlocillin, mezlocillin, carbenicillin and ticarcillin and relative stability to beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella aerogenes*. *Infection*. 1979;7(2):67-73. doi:10.1007/BF01641616 PubMed PMID: 108220.
36. Theuretzbacher U. Resistance drives antibacterial drug development. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Oct;11(5):433-8. Epub 2011 Aug 19. doi:10.1016/j.coph.2011.07.008 PubMed PMID: 21862408.
37. Worthington RJ, Melander C. Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. *J Org Chem*. 2013 May 3;78(9):4207-13. Epub 2013 Mar 28. doi:10.1021/jo400236f PubMed PMID: 23530949; PubMed Central PMCID: PMC3644377.
38. Fuchs PC, Jones RN, Barry AL. In vitro antimicrobial activity of tigemonam, a new orally administered monobactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Mar;32(3):346-9. doi:10.1128/aac.32.3.346 PubMed PMID: 3259122; PubMed Central PMCID: PMC172173.
39. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):4943-60. Epub 2011 Aug 22. doi:10.1128/AAC.00296-11 PubMed PMID: 21859938; PubMed Central PMCID: PMC3195018.
40. Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jul 29;57(10):1471-85. doi:10.1016/j.addr.2005.04.003 PubMed PMID: 15964098.
41. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*. 2016 Apr;4(2):1-24. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015 PubMed PMID: 27227291; PubMed Central PMCID: PMC4888801.
42. Nikaido H, Pagès J-M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Mar;36(2):340-63. Epub 2011 Jul 29. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x PubMed PMID: 21707670; PubMed Central PMCID: PMC3546547.
43. Domínguez E, Zarazaga M, Sáenz Y, Briñas L, Torres C. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. *Microb*

Drug Resist. 2002 Winter;8(4):321-7. doi:10.1089/10766290260469589 PubMed PMID: 12523629.

44. Ambler RP. The structure of β -lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980 May 16;289(1036):321-31. doi:10.1098/rstb.1980.0049 PubMed PMID: 6109327.

45. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J, Böttger EC, et al. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol. 2011 Aug;49(8):2924-32. Epub 2011 Jun 8. doi:10.1128/JCM.00091-11 PubMed PMID: 21653764; PubMed Central PMCID: PMC3147754.

46. Ghuysen J-M. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. Annu Rev Microbiol. 1991;45(1):37-67. doi:10.1146/annurev.mi.45.100191.000345 PubMed PMID: 1741619.

47. Waley SG. β -Lactamase: mechanism of action. In: Page MI, editor. The Chemistry of β -lactams. London, UK: Blackie; 1992. p. 198-228.

48. Jack GW, Richmond MH. A comparative study of eight distinct β -lactamases synthesized by gram-negative bacteria. J Gen Microbiol. 1970 Apr;61(1):43-61. doi:10.1099/00221287-61-1-43 PubMed PMID: 5489064.

49. Richmond MH, Sykes RB. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv Microb Physiol. 1973;9:31-88. doi:10.1016/s0065-2911(08)60376-8 PubMed PMID: 4581138.

50. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: An emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008 Mar;8(3):159-66. doi:10.1016/S1473-3099(08)70041-0 PubMed PMID: 18291338.

51. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 1965 Oct 16;208(5007):239-41. doi:10.1038/208239a0 PubMed PMID: 5326330.

52. Barthelemy M, Peduzzi J, Labia R. Distinction between the primary structures of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases. Ann Inst Pasteur Microbiol. 1985 May-Jun;136(3):311-21.

53. Sirot D, Sirot J, Labia RL, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, et al.

- Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987 Sep;20(3):323-34. doi:10.1093/jac/20.3.323 PubMed PMID: 3316146.
54. Tzouveleki LS, Bonomo RA. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999 Nov;5(11):847-64. PubMed PMID: 10539992.
55. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Oct;8(4):557-84. PubMed PMID: 8665470; PubMed Central PMCID: PMC172876.
56. Gazouli M, Tzelepi E, Markogiannakis A, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing β -lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Aug 15;165(2):289-93. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13159.x PubMed PMID: 9742701.
57. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012 Apr 2;3:110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110 PubMed PMID: 22485109; PubMed Central PMCID: PMC3316993.
58. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):1-14. doi:10.1128/aac.48.1.1-14.2004 PubMed PMID: 14693512; PubMed Central PMCID: PMC310187.
59. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Aug;47(8):2385-92. doi:10.1128/aac.47.8.2385-2392.2003 PubMed PMID: 12878494; PubMed Central PMCID: PMC166056.
60. 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 Aug;37(8):1637-44. doi:10.1128/aac.37.8.1637 PubMed PMID: 8215276; PubMed Central PMCID: PMC188033.
61. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: Implications for fluoroquinolone use. *JAMA.* 2003 Feb 19;289(7):885-8. doi:10.1001/jama.289.7.885 PubMed PMID: 12588273.

62. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Feb;40(2):509-13. PubMed PMID: 8834913; PubMed Central PMCID: PMC163149.
63. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Mar;44(3):622-32. doi:10.1128/aac.44.3.622-632.2000 PubMed PMID: 10681329; PubMed Central PMCID: PMC89737.
64. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, et al. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* isolates. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3257-62. doi:10.1128/JCM.00433-06 PubMed PMID: 16954257; PubMed Central PMCID: PMC1594689.
65. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Sep;35(5):736-55. Epub 2011 Mar 1. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x PubMed PMID: 21303394.
66. Birkett CI, Ludlam HA, Woodford N, Brown DF, Brown NM, Roberts MT, et al. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Med Microbiol.* 2007 Jan;56(Pt 1):52-5. doi:10.1099/jmm.0.46909-0 PubMed PMID: 17172517.
67. Ensor VM, Livermore DM, Hawkey PM. A novel reverse-line hybridization assay for identifying genotypes of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Mar;59(3):387-95. Epub 2007 Jan 25. doi:10.1093/jac/dkl505 PubMed PMID: 17255146.
68. Yan J-J, Hsueh P-R, Lu J-J, Chang F-Y, Shyr J-M, Wan J-H, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan.

Antimicrob Agents Chemother. 2006 May;50(5):1861-4. doi:10.1128/AAC.50.5.1861-1864.2006 PubMed PMID: 16641462; PubMed Central PMCID: PMC1472213.

69. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggieri A, et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: An observational study in two large microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2011 Jan;50(1):176-9. Epub 2011 Nov 16. doi:10.1128/JCM.05742-11 PubMed PMID: 22090401; PubMed Central PMCID: PMC3256727.

70. Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Langaee T, Rafati M, Shafahi K, et al. Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in North of Iran. Biomed Res Int. 2015;2015:1-7. Epub 2015 May 3. doi:10.1155/2015/309478 PubMed PMID: 26064896; PubMed Central PMCID: PMC4433631.

71. Sheng W-H, Badal RE, Hseuh P-R. Distribution of extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases, and carbapenemases among *Enterobacteriaceae* isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: Results of the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Antimicrob Agents Chemother. 2013 Jul;57(7):2981-8. Epub 2013 Apr 15. doi:10.1128/AAC.00971-12 PubMed PMID: 23587958; PubMed Central PMCID: PMC3697370.

72. Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J Antimicrob Chemother. 2001;48(6):839-52. doi:10.1093/jac/48.6.839 PubMed PMID: 11733468.

73. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Aug;52(8):2818-24. Epub 2008 May 27. doi:10.1128/AAC.00171-08 PubMed PMID: 18505851; PubMed Central PMCID: PMC2493136.

74. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using

- recombination proteins. PLoS Biol. 2006 Jul;4(7):1115-21. doi:10.1371/journal.pbio.0040204 PubMed PMID: 16756388; PubMed Central PMCID: PMC1475771.
75. Babu B, Washburn BK, Miller SH, Poduch K, Sarigul T, Knox GW, et al. A rapid assay for detection of Rose rosette virus using reverse transcription-recombinase polymerase amplification using multiple gene targets. J Virol Methods. 2017 Feb;240:78-84. Epub 2016 Nov 30. doi:10.1016/j.jviromet.2016.11.014 PubMed PMID: 27915036.
76. Wee EJ, Ha Ngo T, Trau M. A simple bridging flocculation assay for rapid, sensitive and stringent detection of gene specific DNA methylation. Sci Rep. 2015 Oct 13;5:1-7. doi:10.1038/srep15028 PubMed PMID: 26458746; PubMed Central PMCID: PMC4602207.
77. Ng BY, Wee EJ, West NP, Trau M. Rapid DNA detection of *Mycobacterium tuberculosis*-towards single cell sensitivity in point-of-care diagnosis. Sci Rep. 2015 Oct 13;5:1-7. doi:10.1038/srep15027; PubMed Central PMCID: PMC4602229.
78. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. Mikrochim Acta. 2014;181(13-14):1715-23. Epub 2014 Feb 18. doi:10.1007/s00604-014-1198-5 PubMed PMID: 25253912; PubMed Central PMCID: PMC4167443.
79. Koo KM, Wee EJ, Trau M. Colorimetric TMPRSS2-ERG gene fusion detection in prostate cancer urinary samples via recombinase polymerase amplification. Theranostics. 2016 Jun 15;6(9):1415-24. doi:10.7150/thno.15250 PubMed PMID: 27375789; PubMed Central PMCID: PMC4924509.
80. Kornberg A. DNA Replication. San Francisco: W. H. Freeman; 1980.
81. Goldmeyer J, Kong H, Tang W. Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection. J Mol Diagn. 2007 Nov;9(5):639-44. doi:10.2353/jmoldx.2007.070012 PubMed PMID: 17975029; PubMed Central PMCID: PMC2049050.
82. Kolm C, Martzy R, Führer M, Mach RL, Krska R, Baumgartner S, et al. Detection of a microbial source tracking marker by isothermal helicase-dependent amplification and a nucleic acid lateral-flow strip test. Sci Rep. 2019;9:1-9. doi:10.1038/s41598-018-36749-

7.

83. Tong Y, McCarthy K, Kong H, Lemieux B. Development and comparison of a rapid isothermal nucleic acid amplification test for typing of herpes simplex virus types 1 and 2 on a portable fluorescence detector. *J Mol Diagn*. 2012 Nov;14(6):569-76. Epub 2012 Aug 27. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.05.005 PubMed PMID: 22951487; PubMed Central PMCID: PMC5803548.

84. Antonara S, Daly J, Greene W, Leber A. A large scale clinical evaluation of the AmpliVue and Illumigene molecular tests for the identification of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adult and pediatric patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Aug;82(4):265-8. Epub 2015 Mar 13. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.007 PubMed PMID: 26008122.

85. Miller SA, Deak E, Humphries R. Comparison of the AmpliVue, BD Max system, and illumigene molecular assays for detection of group B *Streptococcus* in antenatal screening specimens. *J Clin Microbiol*. 2015 Jun;53(6):1938-41. Epub 2015 Mar 18. doi:10.1128/JCM.00261-15 PubMed PMID: 25788551; PubMed Central PMCID: PMC4432075.

86. Doseeva V, Forbes T, Wolff J, Khripin Y, O'Neil D, Rothmann T, et al. Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Dec;71(4):354-65. Epub 2011 Oct 14. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.021 PubMed PMID: 22000085.

87. Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 1: Sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatr*. 2007 Mar;96(3):338-41. doi:10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x PubMed PMID: 17407452.

88. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr;49(4):1608-13. Epub 2011 Feb 16. doi:10.1128/JCM.02607-10 PubMed PMID: 21325547; PubMed Central PMCID: PMC3122838.

89. Stürenburg E, Lang M, Horstkotte MA, Laufs R, Mack D. Evaluation of the MicroScan ESBL plus confirmation panel for detection of extended-spectrum

- β -lactamases in clinical isolates of oxyimino-cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Nov;54(5):870-5. Epub 2004 Oct 7. doi:10.1093/jac/dkh449 PubMed PMID: 15471997.
90. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jul;56(1):115-21. Epub 2005 Jun 7. doi:10.1093/jac/dki190 PubMed PMID: 15941775.
91. Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, et al. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(6):1311-2. Epub 2006 Oct 5. doi:10.1093/jac/dkl415 PubMed PMID: 17023496.
92. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim J-W, Cho D-T. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases: Prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J Clin Microbiol.* 1998 May;36(5):1446-9. PubMed PMID: 9574728; PubMed Central PMCID: PMC104851.
93. Kim J, Jeon S, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H, et al. Rapid detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL) for *Enterobacteriaceae* by use of a multiplex PCR-based method. *J Infect Chemother.* 2009;41(3):181-4. doi:10.3947/ic.2009.41.3.181.
94. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(15):e115. Epub 2012 Jun 22. doi:10.1093/nar/gks596 PubMed PMID: 22730293; PubMed Central PMCID: PMC3424584.
95. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007 May 15;23(10):1289-91. Epub 2007 Mar 22. doi:10.1093/bioinformatics/btm091 PubMed PMID: 17379693.
96. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5715-21. doi:10.1128/JCM.42.12.5715-5721.2004 PubMed PMID: 15583304; PubMed Central PMCID: PMC535227.
97. Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson

- JM, et al. Characterization of the extended-spectrum β -lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Sep;44(9):2382-8. doi:10.1128/aac.44.9.2382-2388.2000 PubMed PMID: 10952583; PubMed Central PMCID: PMC90073.
98. Bubpamala J, Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Montakantikul P, Santanirand P, Chomnawang MT. Phenotypic and genotypic characterizations of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Thailand. *Infect Drug Resist*. 2018 Nov 5;11:2151-17. doi:10.2147/IDR.S174506 PubMed PMID: 30464558; PubMed Central PMCID: PMC6223337.
99. Sethaphanich N, Santanirand P, Rattanasiri S, Techasaensiri C, Chaisavaneeyakorn S, Apiwattanakul N. Pediatric extended spectrum β -lactamase infection: Community-acquired infection and treatment options. *Pediatr Int*. 2016 May;58(5):338-46. Epub 2016 Apr 13. doi:10.1111/ped.12845 PubMed PMID: 26513341.
100. Sawatwong P, Sapchookul P, Whistler T, Gregory CJ, Sangwichian O, Makprasert S, et al. High burden of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in older adults: A seven-year study in two rural Thai provinces. *Am J Trop Med Hyg*. 2019 Apr;100(4):943-51. doi:10.4269/ajtmh.18-0394 PubMed PMID: 30793684; PubMed Central PMCID: PMC6447101.
101. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2015 Jan;22(1):90-101. Epub 2014 Aug 17. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002 PubMed PMID: 25561890; PubMed Central PMCID: PMC4281622.
102. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Aug 1;72(8):2145-55. doi:10.1093/jac/dkx146 PubMed PMID: 28541467.
103. Kiddee A, Assawatheptawee K, Na-udom A, Boonsawang P, Treebupachatsakul P, Walsh TR, et al. Risk factors for extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* carriage in patients admitted to intensive care unit in a tertiary care hospital in Thailand. *Microb Drug Resist*. 2019 Oct;25(8):1182-90. Epub 2019 May 29. doi:10.1089/mdr.2018.0318 PubMed PMID: 31140920.

104. Mohamed Al-Agamy MH, El-Din Ashour MS, Wiegand I. First description of CTX-M β -lactamase-producing clinical *Escherichia coli* isolates from Egypt. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Jun;27(6):545-8. Epub 2006 May 18. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.01.007 PubMed PMID: 16713187.
105. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: An update. *Curr Med Chem*. 2009;16(8):1028-46. doi:10.2174/092986709787581879 PubMed PMID: 19275610.
106. Keeling PJ, Palmer JD. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet*. 2008 Aug;9(8):605-18. doi:10.1038/nrg2386 PubMed PMID: 18591983.
107. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Sep;64(Suppl 1):i3-10. doi:10.1093/jac/dkp256 PubMed PMID: 19675017.
108. Kiratisin P, Apisantharak A, Saifon P, Laesripa C, Kitphati R, Mundy LM. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Jul;58(3):349-55. Epub 2007 Apr 20. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.005 PubMed PMID: 17449211.
109. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998 Mar 14;351(9105):797-9. doi:10.1016/S0140-6736(97)07322-4 PubMed PMID: 9519952.
110. Singh T, Singh PK, Dar SA, Haque S, Akhter N, Das S. Changing paradigm of antibiotic resistance amongst *Escherichia coli* isolates in Indian pediatric population. *PLoS One*. 2019 Apr 17;14(4):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0213850 PubMed PMID: 30995225; PubMed Central PMCID: PMC6469777.
111. Kim JY, Lee J-L. Development of a multiplex real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for rapid quantitative detection of *Campylobacter coli* and *jejuni* from eggs and chicken products. *Food Control*. 2017;73:1247-55. doi:10.1016/j.foodcont.2016.10.041.
112. Mayboroda O, Gonzalez Benito A, Sabaté del Rio J, Svobodova M, Julich S, Tomaso H, et al. Isothermal solid-phase amplification system for detection of

- Yersinia pestis*. Anal Bioanal Chem. 2016 Jan;408(3):671-6. Epub 2015 Nov 13. doi:10.1007/s00216-015-9177-1 PubMed PMID: 26563112.
113. Gao W, Huang H, Zhang Y, Zhu P, Yan X, Fan J, et al. Recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. Food Anal Methods. 2017;10(6):1972-81.
114. Crannell ZA, Cabada MM, Castellanos-Gonzalez A, Irani A, White AC, Richards-Kortum R. Recombinase polymerase amplification-based assay to diagnose *Giardia* in stool samples. Am J Trop Med Hyg. 2015 Mar;92(3):583-7. Epub 2014 Dec 15. doi:10.4269/ajtmh.14-0593 PubMed PMID: 25510713; PubMed Central PMCID: PMC4350554.
115. Yang Y, Qin X, Wang G, Jin J, Shang Y, Zhang Z. Development of an isothermal amplification-based assay for rapid visual detection of an Orf virus. Virol J. 2016 Mar 19;13(1):46. doi:10.1186/s12985-016-0502-x PubMed PMID: 26993468; PubMed Central PMCID: PMC4799565.
116. Crannell ZA, Castellanos-Gonzalez A, Nair G, Mejia R, White AC, Richards-Kortum R. Multiplexed recombinase polymerase amplification assay to detect intestinal protozoa. Anal Chem. 2016 Feb 2;88(3):1610-6. Epub 2016 Jan 12. doi:10.1021/acs.analchem.5b03267 PubMed PMID: 26669715.
117. Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. PLoS One. 2014 Nov 5;9(11):e112146. doi:10.1371/journal.pone.0112146 PubMed PMID: 25372030; PubMed Central PMCID: PMC4221156.
118. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. J Clin Microbiol. 1996 Aug;34(8):1880-4. PubMed PMID: 8818874; PubMed Central PMCID: PMC229146.
119. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. Malar J. 2014 Mar 15;13(1):99. doi:10.1186/1475-2875-13-99 PubMed PMID: 24629133; PubMed Central PMCID: PMC4004163.
120. Du X-j, Zhou T-j, Li P, Wang S. A rapid *Salmonella* detection method involving thermophilic helicase-dependent amplification and a lateral flow assay. Mol Cell

Probes. 2017 Aug;34:37-44. Epub 2017 May 16. doi:10.1016/j.mcp.2017.05.004 PubMed PMID: 28526589.

121. Mens PF, van Amerongen A, Sawa P, Kager PA, Schallig HD. Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human *Plasmodium* spp. and its evaluation in Mbita, Kenya. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Aug;61(4):421-7. Epub 2008 May 1. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.009 PubMed PMID: 18455349.

122. Zulkiply NA, Sjafrri FR, Ismail A, Ismail A. An in-house multiplex PCR for detection of *S. typhi* and *S. paratyphi* A: A comparison between detection method by agarose gel electrophoresis and lateral flow assay. *Int J Infect Dis*. 2012 Jun 1;16(1):e395. doi:10.1016/j.ijid.2012.05.526.

123. Reid R, Samaras S. The development and evaluation of a multiplex real-time PCR assay for the detection of ESBL genes in urinary tract infections. *Int J Clin Microbiol*. 2018;1(1):16-24. doi:10.14302/issn.2690-4721.ijcm-18-2217.

124. Gallex. UltraPower DNA/RNA safedye [Internet]. [cited 2018 Feb 24]. Available from: http://www.gellex.jp/item/ultrapower_safedye/.

125. Krajden M, Minor JM, Rifkin O, Comanor L. Effect of multiple freeze-thaw cycles on hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA quantification as measured with branched-DNA technology. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1683-6. PubMed PMID: 10325307; PubMed Central PMCID: PMC84922.

126. Shao W, Khin S, Kopp WC. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreserv Biobank*. 2012 Feb;10(1):4-11. doi:10.1089/bio.2011.0016 PubMed PMID: 24849748.

127. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC, Jacobs MR, et al. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type β -lactamase genes in Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol*. 2010 Jul;48(7):2618-22. Epub 2010 May 26. doi:10.1128/JCM.00568-10 PubMed PMID: 20504993; PubMed Central PMCID: PMC2897517.

128. Bloemberg GV, Polsfuss S, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the

AID ESBL line probe assay for rapid detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and KPC carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jan;69(1):85-90. Epub 2013 Sep 4. doi:10.1093/jac/dkt345 PubMed PMID: 24004861.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

1. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Difco™ Skim milk จำนวน 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ผสมให้ละลาย และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น แบ่งใส่ Microcentrifuge tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งาน

2. วิธีการเตรียม 10X Tris-EDTA buffer

ชั่ง Tris 15.76 กรัม และ EDTA 2.92 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 8 (pH 8.0) ด้วย สารละลาย HCl ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จนละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. วิธีเตรียม 3M Sodium acetate pH 5.2

ชั่ง Sodium acetate 24.6 กรัม และเติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 5.2 (pH 5.2) ด้วย Glacial acetic acid เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งาน

4. วิธีเตรียม 0.5 M EDTA

ชั่ง EDTA 186.12 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 8 (pH 8.0) ด้วยเกล็ด NaOH ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. วิธีเตรียม 1X TAE buffer

ชั่ง Tris 242 กรัม 0.5 M EDTA 100 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 57 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จะได้ 50x TAE buffer เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาใช้งาน ผสม 50x TAE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 490 มิลลิลิตร



ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบปฏิกิริยา Multiplex PCR, PCR-Sequencing, Multiplex RPA
และ HDA ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 144 ตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบปฏิบัติการ Multiplex PCR, PCR-Sequencing, Multiplex RPA และ HDA ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 144 ตัวอย่าง (P แทนผลบวก, N แทนผลลบ)

Sample No.	Multiplex PCR					PCR-Sequencing				Multiplex RPA			HDA
	<i>uspA</i>	CTX-M IV	OXA	SHV	TEM	CTX-M	OXA	SHV	TEM	RPA-CTX	RPA-OXA	RPA-SHV	HDA-TEM
E021	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E022	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E023	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	SHV-18	TEM-1	P	N	P	P
E024	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E025	P	P	N	N	P	CTX-M-14	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E026	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E028	P	N	P	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1b	P	P	N	P
E029	P	N	P	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E030	P	N	P	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1b	P	P	N	P
E031	P	N	P	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1b	P	P	N	P
E032	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E033	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E034	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E035	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E036	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E037	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E038	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E039	P	N	P	N	P	CTX-M-15	OXA-16	N	TEM-1	P	P	N	P
E040	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E041	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E042	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E043	P	N	N	N	P	CTX-M-14	N	N	N	P	N	N	N
E044	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E045	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E046	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E047	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E048	P	N	N	N	N	CTX-M-14	N	N	N	P	N	N	N
E049	P	P	N	N	P	CTX-M-14	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E050	P	N	N	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E051	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E052	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E053	P	N	N	P	P	CTX-M-14	OXA-1	SHV-18	TEM-1b	P	P	P	P
E054	P	N	N	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	N
E055	P	N	N	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E059	P	P	N	N	N	CTX-M-27	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E060	P	N	N	N	P	CTX-M-14	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E064	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E068	P	N	N	N	P	CTX-M-55	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E069	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E071	P	N	N	N	N	CTX-M-14	N	N	N	P	N	N	N
E072	P	N	P	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E073	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E074	P	N	P	N	P	CTX-M-15	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E075	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	TEM-1b	P	N	N	P
E076	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	TEM-1b	P	N	N	P
E077	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	TEM-1	P	N	N	P

Sample No.	Multiplex PCR					PCR-Sequencing				Multiplex RPA			HDA
	<i>uspA</i>	CTX-M IV	OXA	SHV	TEM	CTX-M	OXA	SHV	TEM	RPA-CTX	RPA-OXA	RPA-SHV	HDA-TEM
E078	P	N	N	N	N	CTX-M-55	N	N	N	P	N	N	N
E079	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	TEM-1b	P	N	N	P
E080	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E081	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E082	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-16	N	N	P	P	N	N
E083	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E084	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E085	P	P	N	N	P	CTX-M-14	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E088	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	N	P	N	N	N
E089	P	P	N	N	N	CTX-M-14	N	N	N	P	N	N	N
E090	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E091	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E092	P	P	N	N	P	CTX-M-27	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E094	P	P	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E096	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-127	P	N	N	P
E097	P	N	N	N	N	CTX-M-55	N	N	N	P	N	N	N
E098	P	N	N	N	P	CTX-M-14	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E100	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E101	P	N	N	N	N	CTX-M-14	N	N	N	P	N	N	N
E102	P	P	N	N	N	CTX-M-55	N	N	N	P	N	N	N
E103	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E104	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E105	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E106	P	N	N	N	N	CTX-M-14	N	N	N	P	N	N	N
E108	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E110	P	N	N	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E111	P	N	P	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E113	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E114	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E115	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E116	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-215	P	N	N	P
E117	P	N	P	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E119	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E120	P	P	N	N	P	CTX-M-27	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E121	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E122	P	P	N	N	P	CTX-M-14	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E123	P	N	N	N	N	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E124	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E126	P	P	N	N	N	CTX-M-14	N	N	N	P	N	N	N
E129	P	N	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E130	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
E132	P	P	N	N	P	CTX-M-55	N	N	TEM-1	P	N	N	P
E135	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E136	P	N	P	N	N	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E137	P	N	P	N	N	CTX-M-15	OXA-1	N	N	P	P	N	N
E138	P	N	N	N	P	CTX-M-15	OXA-1	N	TEM-1	P	P	N	P
E139	P	N	N	N	P	CTX-M-15	N	N	N	P	N	N	N
E140	P	P	N	N	N	CTX-M-27	N	N	N	P	N	N	N
N01	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N02	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N03	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	N

Sample No.	Multiplex PCR					PCR-Sequencing				Multiplex RPA			HDA
	<i>uspA</i>	CTX-M IV	OXA	SHV	TEM	CTX-M	OXA	SHV	TEM	RPA-CTX	RPA-OXA	RPA-SHV	HDA-TEM
N04	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N05	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	N
N06	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N07	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N08	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N09	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N10	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N11	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N12	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N13	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N14	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N15	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	N
N16	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N17	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	N
N18	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	N
N19	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N20	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N21	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	N
N22	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N23	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N24	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N25	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N26	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N27	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N28	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N29	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N30	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N31	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N32	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N33	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	N
N34	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N35	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N36	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N37	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N38	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N39	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N40	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N41	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N42	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N43	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N44	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N45	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N47	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N48	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P
N49	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N50	P	N	N	N	P	N	N	N	TEM-1	N	N	N	P

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ฉัชร อัสวคงคารัตน์
วัน เดือน ปี เกิด	27 พฤษภาคม 2534
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	48/321 ซอยสุขุมวิท 64 ถนนสุขุมวิท แขวงพระโขนงใต้ เขตพระโขนง กรุงเทพมหานคร 10260



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY