

การพัฒนาเทคนิค MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION
(MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *GYAR* และ *PARC*
ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา CIPROFLOXACIN และ LEVOFLOXACIN
ของเชื้อ *ESCHERICHIA COLI* ในโรงพยาบาลรามารามธิบดี

นางสาวสุกัลยาณี อ่อนสีแดง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์

การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION
(MAS-PCR) FOR DETECTION OF *GYRA* AND *PARC* GENES MUTATION
ASSOCIATED WITH CIPROFLOXACIN AND LEVOFLOXACIN RESISTANCE OF
ESCHERICHIA COLI IN RAMATHIBODI HOSPITAL

Miss Sukanlayanee Onseedaeng



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical

Microbiology and Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิค MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION(MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน GYAR และ PARC ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา CIPROFLOXACIN และ LEVOFLOXACIN ของเชื้อ *ESCHERICHIA COLI* ในโรงพยาบาลรามาริบัติ

โดย

นางสาวสุกัลยาณี อ่อนสีแดง

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประวิตร เจนวรรณระกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรพล เปี้ยฉ่ำ)

สุกัลยาณี อ่อนสีแดง : การพัฒนาเทคนิค MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION(MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *GYRA* และ *PARC* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา CIPROFLOXACIN และ LEVOFLOXACIN ของเชื้อ *ESCHERICHIA COLI* ในโรงพยาบาลรามธิบดี (DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION(MAS-PCR) FOR DETECTION OF *GYRA* AND *PARC* GENES MUTATION ASSOCIATED WITH CIPROFLOXACIN AND LEVOFLOXACIN RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* IN RAMATHIBODI HOSPITAL) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล, 177 หน้า.

เชื้อ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรีย ที่เพาะแยกได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจและเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อทั้งในและนอกระบบทางเดินอาหาร ยากลุ่ม Quinolones เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* โดยมีกลไกออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase และ DNA topoisomerase IV ในกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอของเชื้อ ปัจจุบันสถานการณ์เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Quinolones มีอัตราเพิ่มสูงขึ้นและกลายเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย กลไกหลักที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Quinolones คือการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* ซึ่งอยู่ในส่วนของ Quinolone resistance determining regions (QRDRs) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาตำแหน่งโคดอนที่กลายพันธุ์บนยีน *gyrA* และ ยีน *parC* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Quinolones และพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR) สำหรับใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และ 80 และ 84 ของยีน *parC* ซึ่งเป็นตำแหน่งหลักที่มีการกลายพันธุ์บน QRDRs เชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์ เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลรามธิบดี กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เชื้อทั้งหมดถูกทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ด้วยวิธี E-test® และให้ผลไวต่อยาจำนวน 16 และ 19 สายพันธุ์ ดื้อปานกลางต่อยาจำนวน 3 และ 16 สายพันธุ์ และดื้อต่อยาจำนวน 92 และ 76 สายพันธุ์ ตามลำดับ ผลวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sequencing พบการกลายพันธุ์ในเชื้อจำนวน 99 สายพันธุ์ (89.19 เปอร์เซ็นต์) ทั้งหมด 8 รูปแบบ ได้แก่ Ser83-Lue, Asp87-Asn, Asp87-Tyr, Ser80-Ile, Glu84-Gly, Glu84-Val, Ala90-Val และ Ala108-Thr โดยเชื้อส่วนใหญ่ 92 สายพันธุ์ (82.88 เปอร์เซ็นต์) มีการกลายพันธุ์ร่วมกันอย่างน้อย 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ser83-Leu+Asp87-A-sn+Ser80-Ile และ Ser83-Leu+Asp87-Tyr+Ser80-Ile เทคนิค MAS-PCR มีความไวและความจำเพาะเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และ 80 และ 84 ของยีน *parC* เท่ากับ 96.97, 100, 100, 93.33 และ 100, 100, 100 และ 98.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เทคนิค MAS-PCR เป็นเทคนิคที่สะดวก ไม่ซับซ้อน สามารถที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยา Quinolone ในเชื้อ *E. coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในห้องปฏิบัติการและในการศึกษาระบาดของเชื้อดื้อยา

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต

คลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา
 ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2558

5576666437 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS: ESCHERICHIA COLI, GYRA PARC, QUINOLONONES, MAS-PCR

SUKANLAYANEE ONSEEDAENG: DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION(MAS-PCR) FOR DETECTION OF GYRA AND PARC GENES MUTATION ASSOCIATED WITH CIPROFLOXACIN AND LEVOFLOXACIN RESISTANCE OF ESCHERICHIA COLI IN RAMATHIBODI HOSPITAL. ADVISOR: DR. PANAN RATTHAWONGJIRAKUL, 177 pp.

Escherichia coli is bacteria that often isolated from clinical specimens and is a causative agent of intra- and extraintestinal infections. Quinolones is one of drug of choice for treatment of *E. coli* infections. The agents inhibit bacterial DNA replication after binding to drug's targets, including DNA gyrase and DNA topoisomerase IV. Quinolone-resistant *E. coli* infection becomes a global problem, including in Thailand. The quinolones resistance usually occurs mainly due to specific point of mutations of *gyrA* and *parC* genes within the quinolone resistance-determining regions (QRDRs). Here we appraised type of the *gyrA* and *parC* mutations associated in quinolone resistance and also developed Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR) for detection of "hot spot" mutations at *gyrA* codon of 83 and 87, and *parC* codon of 80 and 84 in the QRDRs. One hundred and eleven *E. coli* were isolated from Microbiology unit, Ramathibodi Hospital, Bangkok, Thailand, and were tested for antimicrobial susceptibility by E-test®. Sixteen and 19 strains were susceptible, 3 and 16 were intermediate and 92 and 76 were resistant to Ciprofloxacin and Levofloxacin, respectively. Ninety-nine (89.19%) *E. coli* isolates had mutations in the QRDRs as revealed by sequencing analysis. Eight amino acid substitutes were reported, including Ser83-Lue, Asp87-Asn, Asp87-Tyr, Ser80-Ile, Glu84-Gly, Glu84-Val, Ala90-Val and Ala108-Thr. Most of the isolates, 92 (82.88%), had at least three point mutations that were Ser83-Leu+Asp87-Asn+Ser80-Ile and Ser83-Leu+Asp87-Tyr+Ser80-Ile. MAS-PCR detected codons 83 and 87 in *gyrA* and codons 80 and 84 in *parC* mutations, yielding 96.97, 100, 100, and 93.33% sensitivity, respectively, and 100, 100, 100, and 98.48% specificity, respectively, for quinolones resistance relative to a gold standard sequencing. MAS-PCR is simple and convenient, and may be used for simultaneously rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations associated in quinolone resistance in routine laboratory as well as in epidemiology study

Department: Transfusion Medicine and Student's Signature

Clinical Microbiology Advisor's Signature

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความอนุเคราะห์และช่วยเหลือในด้านต่างๆ จึงขอขอบพระคุณคณะบุคคลต่างๆมา ณ โอกาสนี้ อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ความรู้ และคำแนะนำในด้านต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สอนและถ่ายทอดวิชาความรู้ต่างๆ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณารับเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีรพล เปี้ยฉ่ำ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์มอบเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากสิ่งส่งตรวจ และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน เพื่อใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฑ
สารบัญภาพ	ณ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
3. ขอบเขตของงานวิจัย	5
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	6
บทที่ 2	7
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	7
2. พยาธิสภาพ.....	8
3. ปัจจัยในการก่อโรค	11
4. ระบาดวิทยา.....	12
5. การติดต่อ.....	13
6. การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ	14
6.1 การตรวจวินิจฉัยโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ	14
6.1.1 การย้อมสีแกรม.....	14

6.1.2 การตรวจหาแอนติเจน.....	14
6.2 การวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม (Conventional method).....	15
6.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	15
6.2.2 การวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี	16
6.3 การทดสอบทางอณูชีววิทยา	18
7. การรักษาคาดเชื้อ <i>E. coli</i>	19
8. ยากลุ่ม Quinolones.....	20
8.1 โครงสร้างของยากลุ่ม Quinolones.....	20
8.2 การแบ่งกลุ่มของยากลุ่ม Quinolones	24
8.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม Quinolones	25
8.4 เป้าหมายของยากลุ่ม Quinolones: เอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA topoisomerase IV.....	28
8.5 เกสัชจลศาสตร์ของยากลุ่ม Quinolones	30
8.6 ผลข้างเคียงของยากลุ่ม Quinolones.....	31
9. การดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones	31
9.1 กลไกการดื้อยากลุ่ม Quinolones.....	31
9.2 การดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ในเชื้อ <i>E. coli</i>	32
9.3 อัตราการดื้อยากลุ่ม Quinolones ของเชื้อ <i>E. coli</i>	35
10. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ	37
10.1 การทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion method.....	37
10.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ	38
10.2.1 Dilution method	38
10.2.2 Gradient diffusion method	39

10.3 การทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ.....	39
10.4 การทดสอบด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา	40
11. เทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR).....	42
11.1 ความเป็นมาของเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR).....	42
11.2 เทคนิค MAS-PCR สำหรับการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย	44
บทที่ 3	46
วิธีดำเนินการวิจัย	46
1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน.....	46
2. เครื่องมือ.....	47
3. การออกแบบงานวิจัย	48
3.1 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี E-test® กับยา Quinolones ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	48
3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค Sequencing	48
3.3 การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i> .	49
3.4 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR	49
3.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i> ในเชื้อ <i>E. coli</i>	49
4. วิธีการทดลอง.....	50
4.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	50
4.2 เชื้อ <i>E. coli</i>	51

4.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i>	51
4.4 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยวิธี E-test®	52
4.5 การสกัดดีเอ็นเอ.....	53
4.6 การเพิ่มปริมาณยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	53
4.6.1 การเพิ่มปริมาณยีน <i>gyrA</i>	53
4.6.2 การเพิ่มปริมาณยีน <i>parC</i>	54
4.7 การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis).....	55
4.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ด้วยเทคนิค Sequencing.....	56
4.8.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ด้วยเทคนิค Sequencing	56
4.8.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ที่มีการ กลายพันธุ์กับระดับการดื้อยา Quinolones.....	56
4.9 การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR) เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i>	57
4.9.1 การออกแบบ Allele specific primer	57
4.9.2 การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	59
4.9.2.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	60
4.9.2.2 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	61
4.9.2.3 การหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับ ปฏิกิริยา MAS-PCR ของ ยีน <i>gyrA</i>	62
4.9.2.4 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	63

4.9.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>parC</i>	64
4.9.3.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา MAS-PCR ในยีน <i>parC</i>	64
4.9.3.2 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>parC</i>	65
4.9.3.3 การหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับ ปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>parC</i>	66
4.10 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR.....	68
4.10.1 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR.....	68
4.10.2 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR.....	69
4.11 การหาความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจ พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i>	69
4.12 การทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค MAS-PCR	70
4.13 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค MAS-PCR.....	72
4.14 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value; PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value; NPV) ของเทคนิค MAS-PCR	73
บทที่ 4	75
ผลการทดลอง	75
1. เชื้อ <i>E. coli</i> ที่ใช้ในงานวิจัย.....	75
2. ค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วย วิธี E-test®.....	76
3. การสกัดดีเอ็นเอ	79

4. การเพิ่มปริมาณยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ด้วยเทคนิค PCR	80
5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ด้วยเทคนิค Sequencing.....	82
6. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตำแหน่งที่กลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i> กับการดื้อยา Quinolones.....	88
7. การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase Chain Reaction (MAS- PCR) เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i>	93
7.1 การออกแบบ Allele specific primer.....	93
7.2 คุณสมบัติและความจำเพาะของ Allele specific primer.....	99
7.3 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก Allele specific primer ภายหลังสิ้นสุด ปฏิกิริยา MAS-PCR.....	100
7.4 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i>	102
7.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	102
7.4.2 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	104
7.4.3 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	105
7.4.4 จำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	107
7.4.5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i>	108
7.5 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>parC</i>	110
7.5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>parC</i>	111
7.5.2 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>parC</i>	112
7.5.3 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>parC</i>	114
7.5.4 จำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน <i>parC</i>	115

8. การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR...	118
8.1 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วย เทคนิค MAS-PCR	118
8.2 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR.....	121
9. ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i>	123
10. ความไวของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i> ...	125
11. ความจำเพาะของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i>	128
12. ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i>	130
บทที่ 5	136
อภิปรายผลการทดลอง.....	136
บทที่ 6	153
สรุปผลการทดลอง.....	153
รายการอ้างอิง	156
ภาคผนวก.....	175
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	177

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2. 1 คุณสมบัติปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อในวงศ์ <i>Enterobacteriaceae</i>	17
ตารางที่ 3. 1 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i> ด้วย ปฏิกิริยา PCR	55
ตารางที่ 3. 2 รายละเอียดของ Allele specific primer ที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน <i>gyrA</i> และตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของ ยีน <i>parC</i>	59
ตารางที่ 3. 3 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ ผลทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน	74
ตารางที่ 4. 1 ประเภทของสิ่งส่งตรวจที่สามารถเพาะแยกเชื้อ <i>E. coli</i> จำนวน 111 สายพันธุ์ที่ใช้ ในการศึกษา.....	76
ตารางที่ 4. 2 ผลความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ของเชื้อ เชื้อ <i>E. coli</i> จำนวน 111 สายพันธุ์ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion เปรียบเทียบกับวิธี E-test®.....	78
ตารางที่ 4. 3 ค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin และ Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> จำนวน 111 สายพันธุ์.....	79
ตารางที่ 4. 4 รูปแบบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> จำนวนทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์.....	86

ตารางที่ 4. 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโคดอนที่เกิดการกลายพันธุ์กับค่าความเข้มข้น น้อยที่สุดของยา Ciprofloxacin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ.....	91
ตารางที่ 4. 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโคดอนที่เกิดการกลายพันธุ์กับค่าความเข้มข้น น้อยที่สุดของยา Levofloxacin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ.....	92
ตารางที่ 4. 7 ตารางสรุปการตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์.....	120
ตารางที่ 4. 8 ตารางสรุปการตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์.....	122
ตารางที่ 4. 9 ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sequencing	132
ตารางที่ 4. 10 ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin ที่น้อยที่สุดที่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยวิธี E-test®.....	134
ตารางที่ 4. 11 ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin ที่น้อยที่สุดที่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยวิธี E-test®.....	135

สารบัญภาพ

รูปที่ 2. 1 โครงสร้างพื้นฐานของยาในกลุ่ม Quinolones	20
รูปที่ 2. 2 โครงสร้างของยาในกลุ่ม Quinolones ที่มีการเติมหมู่อะตอมในคาร์บอนที่ตำแหน่งต่างๆ ..	22
รูปที่ 2. 3 ตัวอย่างยาชนิดต่างๆ ในยาในกลุ่ม Quinolones	23
รูปที่ 2. 4 รูปจำลองแสดงลักษณะโมเลกุลของยาในกลุ่ม Quinolones	26
รูปที่ 2. 5 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม Quinolones ผ่านกระบวนการ SOS response	27
รูปที่ 2. 6 ส่วนประกอบของโปรตีน GyrA และโปรตีน GyrB	28
รูปที่ 2. 7 กลไกการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA topoisomerases IV ในกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ	30
รูปที่ 3. 1 ตำแหน่งและทิศทางของ Allele specific primer ของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>parC</i>	58
รูปที่ 4. 1 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>gyrA</i> และยีน <i>uspA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค PCR	81
รูปที่ 4. 2 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>parC</i> และยีน <i>uspA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	82
รูปที่ 4. 3 ตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ทางคลินิกกับเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ K-12.....	83
รูปที่ 4. 4 ตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ทางคลินิกกับเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ K-12.....	84

รูปที่ 4. 5 ตำแหน่งที่จำเพาะของ Allele specific primer ได้แก่ ไพรเมอร์ <i>gyrA83F</i> และ ไพรเมอร์ <i>gyrA87R</i> บนยีน <i>gyrA</i>	96
รูปที่ 4. 6 ตำแหน่งที่จำเพาะของ Allele specific primer ได้แก่ ไพรเมอร์ <i>parC80F</i> และ ไพรเมอร์ <i>parC84R</i> บนยีน <i>parC</i>	98
รูปที่ 4. 7 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เป็นตัวแทนทั้ง 3 สายพันธุ์จาก การทดสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67 องศาเซลเซียส ในขั้นตอน Annealing	103
รูปที่ 4. 8 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จาก การทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 ไมโครโมล.....	105
รูปที่ 4. 9 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จาก การทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 มิลลิโมล	106
รูปที่ 4. 10 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จาก การทดสอบปฏิกิริยาที่จำนวนรอบเท่ากับ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ	108
รูปที่ 4. 11 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน <i>gyrA</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์.....	110
รูปที่ 4. 12 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน <i>parC</i> ของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จาก การทดสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 องศาเซลเซียส ในขั้นตอน Annealing	112

รูปที่ 4. 13 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จาก
 การทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0
 ไมโครโมล..... 113

รูปที่ 4. 14 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จาก
 การทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2.0, 2.5, 3.0, 3.5,
 4.0 มิลลิโมล..... 115

รูปที่ 4. 15 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จาก
 การทดสอบปฏิกิริยาที่จำนวนรอบเท่ากับ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ 116

รูปที่ 4. 16 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ 118

รูปที่ 4. 17 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก 121

รูปที่ 4. 18 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก 123

รูปที่ 4. 19 ผลผลิต MAS-PCR จากการทดสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค
 MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* 124

รูปที่ 4. 20 ผลผลิต MAS-PCR จากการทดสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค
 MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli*..... 125

รูปที่ 4. 21 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* จากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา MAS-PCR
 ของเชื้อ *E. coli*..... 126

รูปที่ 4. 22 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* จากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา MAS-PCR
 ของเชื้อ *E. coli* 127

รูปที่ 4. 23 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* จากการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา

MAS-PCR ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ 129

รูปที่ 4. 24 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* จากการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา

MAS-PCR ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ 130



บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง และเป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (1) อย่างไรก็ตามเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคนได้ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า Diarrheagenic *E. coli* รวมถึงสามารถพบเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อก่อโรคที่ระบบอื่นๆ ในร่างกายนอกเหนือจากระบบทางเดินอาหาร (Extraintestinal pathogenic *E. coli*) (2) เช่น ระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อที่ผิวหนัง และการติดเชื้อจากการรักษาในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) เป็นต้น (3) เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่มักตรวจพบและเพาะแยกได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจในผู้ป่วย โดยเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจมากที่สุดในการตรวจเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* (2,3) นอกจากนี้ยังพบว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะมีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* (4)

การรักษาการติดเชื้อ *E. coli* โดยปกติหากเป็นการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารนั้นไม่จำเป็นต้องได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษา (4) แต่หากเป็นการติดเชื้อที่ระบบอื่นๆ สามารถรักษาได้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Beta-lactam, Aminoglycoside หรือ Quinolones เป็นต้น (4) ซึ่งยาในกลุ่ม Quinolones นั้นมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA topoisomerase IV ในขั้นตอนการเกิดจำลองสายดีเอ็นเอ (DNA replication) (5) จากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุขในปี 2557 พบว่าในประเทศไทยมีอัตราการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม Quinolones เท่ากับ 54.7 เปอร์เซ็นต์ และ

54.2 เพอร์เซ็นต์ตามลำดับ (6) สอดคล้องกับข้อมูลของโรงพยาบาลรามาริบัติปี 2555 ที่พบว่าเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin เท่ากับ 64 เพอร์เซ็นต์ และ 63 เพอร์เซ็นต์ตามลำดับ (7) ทำให้การรักษาด้วยยาดังกล่าวไม่ได้ผลและส่งผลต่อการรักษาที่ล้มเหลวตามมา กลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ได้แก่ 1). การกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายของยา หรือ Quinolones resistance determining regions (QRDRs) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเป็นกลไกหลักที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่มนี้ 2). การลดการนำยาเข้าหรือเพิ่มการขับยาออกนอกเซลล์ 3). การสร้างโปรตีนเพื่อป้องกันยาจับกับเอนไซม์เป้าหมาย และ 4). การสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายยา (8)

การกลายพันธุ์ในส่วนของ Quinolones resistance determining regions นั้นสามารถเกิดได้ทั้งในส่วนของยีน *gyrA* และยีน *gyrB* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ DNA gyrase และยีน *parC* และยีน *parE* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ DNA topoisomerase IV ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายของยา เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ยาไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยาจึงไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอได้ พบว่ากว่า 85 เพอร์เซ็นต์ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ขณะที่ 45.6 เพอร์เซ็นต์ เกิดจากการกลายพันธุ์ร่วมกันของยีน *gyrA* และ *parC* (9) ขณะที่การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยและส่งผลให้เชื้อมีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญคือ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง โคดอน ที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และที่ตำแหน่ง โคดอน ที่ 80 และ 84 ของยีน *parC* (10, 11)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility test) สำหรับเชื้อ *E. coli* ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2013 สามารถทำได้หลาย

วิธี ได้แก่ วิธี Disk diffusion method วิธี Broth dilution method และวิธี Agar dilution method

(2) อย่างไรก็ตามวิธีที่นิยมใช้ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในงานประจำคือวิธี Disk diffusion method เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสะดวก ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือชั้นสูง และมีราคาประหยัด แต่มีข้อเสียในกรณีที่ไม่สามารถวินิจฉัยเชื้อที่ดื้อยาระดับต่างๆ รวมถึงไม่สามารถบอกกลไกที่เกี่ยวข้องในการดื้อยาได้ ปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาทในการช่วยวินิจฉัยจำแนกชนิดและการวินิจฉัยความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น การใช้ Polymerase Chain Reaction (PCR)-based method ในการวินิจฉัยจำแนกชนิดและทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Enterococcus* (12) การตรวจจำแนกสายพันธุ์ Diarrheagenic *E. coli* ด้วย Multiplex PCR (13) การใช้ Real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ในบุคลากรทางการแพทย์ (14) เป็นต้น สำหรับการวินิจฉัยการดื้อยา Quinolones ในเชื้อ *E. coli* นั้นมีข้อมูลการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยาต่างๆ ในการตรวจสอบ เช่น การใช้ Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* *gyrB* และ *parC* (15, 16) การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ด้วยวิธี Single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) (17) แต่พบว่าการตรวจหาการกลายพันธุ์ในเชื้อ *E. coli* นั้น ยังมีข้อจำกัดบางประการในงานวิจัยดังกล่าว เช่น เทคนิค Single-strand conformational polymorphism analysis นั้นสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเฉพาะในยีน *gyrA* ไม่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีน *parC* ได้ ส่วนการทดสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism พบว่ามีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากต้องมีการทำการทดสอบด้วยวิธี PCR ร่วมกับการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการทดสอบหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* ที่ตำแหน่งโคดอน ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลรามาริบัติ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย และทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น กับเทคนิค Sequencing และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ เพื่อวิเคราะห์หาความจำเพาะและความไวของเทคนิค MAS-PCR ทั้งนี้การพัฒนาเทคนิคดังกล่าวนำมาซึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่เป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการตรวจหาการดื้อยาในเชื้อ *E. coli* และสามารถนำผลที่ได้ไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจหาเชื้อดื้อยาในอนาคตได้

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาหาตำแหน่งโคดอน ที่กลายพันธุ์บนยีน *gyrA* และ ยีน *parC* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลรามาริบัติ

2.2 เพื่อพัฒนาเทคนิค MAS-PCR สำหรับใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลรามาริบัติ

3. ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์ โดยเชื้อทั้งหมดแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลรามาริบัติ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย และผ่านการวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานและการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disk diffusion method จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ของโรงพยาบาล แยกเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin จำนวน 19 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา Ciprofloxacin และ Levofloxacin จำนวน 92 สายพันธุ์ เชื้อทุกสายพันธุ์ถูกทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration หรือ MIC) ด้วยวิธี Epsilon test® (E-test®) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยเทคนิค Sequencing และพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 และของยีน *parC* ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 โดยการหาอุณหภูมิ ความเข้มข้นไพรเมอร์ ความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้นแมกนีเซียมคลอไรด์และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR จากนั้นนำเทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาได้มาทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ทั้ง 111 สายพันธุ์ เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างเทคนิค MAS-PCR เทคนิค Sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐาน (goal standard) และการทดสอบความไวต่อยา เพื่อวิเคราะห์หาความไวและความจำเพาะของเทคนิค MAS-PCR

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

4.1 ทราบตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ใน เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลรามธิบดี

4.2 ได้เทคนิค MAS-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการตรวจหากลายพันธุ์บน ยีน *gyrA* และยีน *parC* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ใน เชื้อ *E. coli*

4.3 เทคนิค MAS-PCR สามารถนำมาพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ของเชื้อ *E. coli* เช่น การพัฒนาเป็น probe ที่สามารถตรวจการดื้อยาของเชื้อจากสิ่งตัวอย่างโดยตรง
ได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Escherichia coli*

เชื้อในสกุล *Escherichia* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* และประกอบไปด้วยสมาชิกจำนวนทั้งหมด 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *E. albertii*, *E. battae*, *E. fergusonii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* พบว่าเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางคลินิกมากที่สุด ในเชื้อสกุลเดียวกัน โดยปกติแล้วเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (2) อย่างไรก็ตามเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อได้ และยังเป็นเชื้อที่สามารถเพาะแยกได้มากที่สุด ในบรรดาเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* รวมถึงสามารถเพาะแยกได้เป็นอันดับต้นๆ จากสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกของโรงพยาบาลต่างๆ (2,3) จึงนับได้ว่าเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคที่สำคัญทางระบบสาธารณสุข เชื้อ *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic bacteria) ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างแท่งหรือกึ่งกลมกึ่งแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลเจลลาชนิดรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เชื้อมีความยาวประมาณ 1.5 ไมโครเมตร ความกว้างประมาณ 0.5 ไมโครเมตร (18) เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar มีลักษณะค่อนข้างใหญ่ มันวาว ขอบเรียบ สีเทาขุ่น ขณะที่โคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้โคโลนีสีชมพู เนื่องจากเชื้อสามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็คโตสได้ (3) คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่สำคัญของเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วย แอนติเจนโอ (Somatic O antigen) เป็นแอนติเจนที่เกิดจากลิโปโพลีแซคคาไรด์

(Lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ที่สามารถพบได้เฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ (19, 20) แอนติเจนเค (Capsular K antigen) เป็นแอนติเจนที่พบในส่วนประกอบของแคปซูล มีบทบาทสำคัญในการป้องกันตัวเชื้อแบคทีเรียจากการเข้าทำลายของเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี phagocytosis (21) และแอนติเจนเอช (Flagellar H antigen) เป็นแอนติเจนที่พบใน flagellin ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ Flagella และบทบาทสำคัญสำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย (22)

2. พยาธิสภาพ

เชื้อ *E. coli* สามารถก่อโรคได้ทั้งในระบบทางเดินอาหาร (Diarrheagenic *E. coli*) และนอกระบบทางเดินอาหาร (Extraintestinal pathogenic *E. coli*) (2) การเกิดพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญคือโรคท้องร่วง ซึ่งมีเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรค ได้แก่ สายพันธุ์ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) สายพันธุ์ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) สายพันธุ์ Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และสายพันธุ์ Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (3) โดยเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ที่กล่าวมาในที่นี้มีความสำคัญทางคลินิก ระดับความรุนแรงในการดำเนินของโรค และระบาดวิทยาที่แตกต่างกัน ดังรายละเอียดด้านล่าง

เชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในคนทุกช่วงอายุ โดยพบการติดเชื้อสายพันธุ์นี้สูงในแถบประเทศกำลังพัฒนา และมักพบการติดเชื้อสายพันธุ์นี้ในกลุ่มคนที่ท่องเที่ยวไปยังประเทศดังกล่าว จึงมีชื่อเรียกโรคท้องร่วงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อสายพันธุ์นี้ว่า Traveler's disease การติดต่อกันมักเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อและอาหารที่ปรุงไม่สุก เชื้อ

Enterotoxigenic *E. coli* มี Colonization factor ซึ่งใช้ในการเกาะติดบริเวณลำไส้เล็กและเพิ่มจำนวน นอกจากนี้เชื้อสามารถสร้างท็อกซินชนิดไม่ทนต่อความร้อน (Heat-labile enterotoxins: LT) และท็อกซินชนิดทนต่อความร้อน (Heat-stable enterotoxins: ST) เป็นสาเหตุของการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ของเซลล์ลำไส้ ซึ่งทำให้เกิดอาการท้องร่วงที่ไม่รุนแรง ผู้ป่วยจะมีไข้ต่ำและมีอาการปวดเกร็งบริเวณช่องท้อง ถ่ายเป็นน้ำ อาจพบอาการคลื่นไส้และอาเจียนร่วมด้วยในบางครั้ง และสามารถหายได้เองภายใน 1-5 วันโดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา (2, 23)

เชื้อ Enteropathogenic *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในเด็กทารกอายุต่ำกว่า 2 ปี มักพบการระบาดของเชื้อในสถานรับเลี้ยงเด็กอ่อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา เชื้อมี Bundle-forming pili และ intimin ซึ่งใช้ในการเกาะติดบริเวณลำไส้เล็กและเพิ่มจำนวน ส่งผลให้เยื่อลำไส้เล็กเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่เรียกว่า Attaching and effacing (A/E) lesion และทำให้เซลล์ลำไส้เล็กสูญเสียความสามารถในการดูดซึม จึงทำให้เกิดอาการท้องร่วงที่ค่อนข้างรุนแรงและเรื้อรัง ผู้ป่วยจะมีไข้ต่ำ อาเจียน อ่อนเพลีย น้ำหนักลด ขาดสารอาหารเนื่องมาจากอาหารไม่ถูกดูดซึม และอาจส่งผลต่อการหยุดการเจริญเติบโต (24)

เชื้อ Enterohemorrhagic *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในคนทุกช่วงอายุ แต่ในเด็กและผู้สูงอายุมักจะมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ มักพบการระบาดของเชื้อในประเทศที่พัฒนาแล้ว เชื้อสามารถสร้าง Verotoxin ซึ่งเป็นท็อกซินที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ Shiga toxin ที่สร้างจากเชื้อ *Shigella spp.* จึงเรียกเชื้อสายพันธุ์นี้ว่า Shiga toxinigenic *E. coli* (STEC) ท็อกซินดังกล่าวสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและยังทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ผนังหลอดเลือดบริเวณไต เกิดภาวะปัสสาวะเป็นเลือด (Hemolytic-uremic syndrome: HUS) นอกจากนี้ท็อกซินของเชื้อยังรบกวนการทำงานของเยื่อลำไส้จึงเป็นสาเหตุของอาการท้องร่วงซึ่งพบได้ตั้งแต่อาการไม่รุนแรงไปจนถึงอาการ

รุนแรง ผู้ป่วยอาจไม่มีไข้หรือมีไข้ต่ำ มีอาการปวดเกร็งบริเวณช่องท้องและถ่ายเป็นเลือดชนิดที่ไม่พบเม็ดเลือดขาวปนในอุจจาระ รวมไปถึงอาการลำไส้ใหญ่อักเสบมีเลือดออก (Hemorrhagic colitis) ผู้ติดเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าวควรได้รับยาปฏิชีวนะในการรักษา (4) ตัวอย่างของเชื้อ Enterohemorrhagic *E. coli* สายพันธุ์ที่พบการแพร่ระบาดที่สำคัญเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ซึ่งพบการแพร่ระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 ที่รัฐโอเรกอนและรัฐมิชิแกน สหรัฐอเมริกา (25)

เชื้อ Enteroinvasive *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี มักพบการระบาดของเชื้อในประเทศกำลังพัฒนาแต่พบได้น้อยกว่าการแพร่ระบาดของเชื้อสายพันธุ์ Enterotoxigenic *E. coli* และ Enteropathogenic *E. coli* เชื้อมีการดำเนินของโรคคล้ายกับเชื้อ *Shigella spp.* กล่าวคือเชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ Invasion ส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้เล็กและเกิดการอักเสบ ผู้ป่วยมักจะอ่อนเพลีย มีไข้และอาการปวดบิดบริเวณช่องท้องอย่างรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือดชนิดที่พบเม็ดเลือดขาวปนในอุจจาระซึ่งเป็นอาการของโรคบิด (4)

เชื้อ Enteroaggregative *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงเรื้อรังในทารกและเด็กเล็ก เชื้อมี Aggregative adherence fimbriae เพื่อใช้ในการเกาะติดชั้นเยื่อเมือกในลำไส้ และยังสามารถสร้างท็อกซินชนิด EAST 1 ทำให้เกิดอาการท้องร่วงถ่ายเป็นน้ำร่วมกับอาการมีไข้ แต่ไม่พบมูกเลือดปนในอุจจาระ (1, 2)

เชื้อ *E. coli* ยังสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพนอกระบบทางเดินอาหารได้ โดยมีอาการทางคลินิกที่พบบ่อย ได้แก่ (3) 1). การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะมีสาเหตุมาจากเชื้อสายพันธุ์ Uropathogenic *E. coli* ซึ่งมี P fimbriae เป็นปัจจัยที่ช่วยในการยึดเกาะติดเซลล์เยื่อบุผิวของกระเพาะปัสสาวะและมีท็อกซินต่างๆ เช่น Hemolysin Cytotoxic necrotizing factor กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ส่งผลให้เกิดการอักเสบ และหากเชื้อสามารถบุกรุกผ่านเซลล์เยื่อบุของผนัง

หลุดเลือดได้จะส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในการแสเลือดตามมา (26) โรคติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะที่สำคัญ ได้แก่ โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (Cystitis) และโรคกรวยไตอักเสบ (Pyelonephritis) 2). การติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนจากการติดเชื้อที่ระบบอื่นมาก่อน เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งมีปัจจัยก่อโรคที่สำคัญได้แก่ Aerobactin มีหน้าที่แย่งจับธาตุเหล็กจากเซลล์ของโฮสต์ Adhesin มีหน้าที่ช่วยในการเกาะติดและเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อ และ Type III secretion system เป็นโปรตีนสำคัญในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ ปัจจัยดังกล่าวสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายส่งผลเกิดการอักเสบ ความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือด ความดันในร่างกายต่ำ ตลอดจนส่งผลให้อวัยวะล้มเหลวได้ (27) 3). โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด โดยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคนั้นมีแอนติเจน 1 เป็นส่วนประกอบของแคปซูลซึ่งช่วยในการเกาะติดและป้องกันการถูกโอบล้อมของเม็ดเลือดขาวได้ ขณะที่โปรตีน OmpA และ Cytotoxic necrotizing factor 1 มีส่วนช่วยให้เชื้อบุกรุกผ่านเข้าสู่เยื่อสมองและภายหลังจากนั้นเชื้อจะเพิ่มจำนวนและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เกิดการอักเสบและเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือดผ่านเยื่อหุ้มสมอง ส่งผลให้สมองเกิดการบวมน้ำและความดันสูง (28)

3. ปัจจัยในการก่อโรค

แม้ว่าเชื้อ *E. coli* จะเป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (2, 18) อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถก่อโรคในคนได้ทั้งในระบบทางเดินอาหารและนอกระบบทางเดินอาหาร เนื่องมาจากเชื้อมีปัจจัยที่ช่วยในการก่อโรคหลายปัจจัย อาทิเช่น 1). Adhesive fimbriae หรือ Pili โดยที่เชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์จะมี Type I pili เป็นปัจจัยที่มีส่วนช่วยในการเคลื่อนที่และยึดเกาะกับพื้นผิวของเชื้อในขณะที่ยังมีชีวิต *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ ได้แก่ Uropathogenic *E. coli* จะมี P pili เป็นปัจจัยก่อโรคสำคัญและมีบทบาทในการเกาะติดกับเยื่อผิว

บริเวณไต (26) นอกจากนี้ในเชื้อสายพันธุ์ Enteropathogenic *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคท้องร่วงในทารกนั้นจะมี Type IV pili หรือ Bundle forming pili ช่วยในการเกาะติดเยื่อเมือกบริเวณลำไส้ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อให้เกิดโรคท้องร่วง (23) 2). เอ็นโดท็อกซิน (Endotoxin) เป็นปัจจัยช่วยก่อโรคในเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งเกิดจาก Lipopolysaccharide ที่อยู่บนผนังเซลล์และประกอบไปด้วยแอนติเจนโอ โพลีแซคคาไรด์และไลปิดเอ (Lipid A) เมื่อมีการติดเชื้อในกระแสเลือดเอ็นโดท็อกซินจะกระตุ้นให้เกิดอาการไข้ การเปลี่ยนแปลงของความดันและอาการช็อกได้ (23) 3). เอ็กโซท็อกซิน (Exotoxin) เป็นสารประเภทโปรตีนที่เชื้อสร้างขึ้นมาและหลั่งออกนอกเซลล์ ตัวอย่างเช่น อัลฟาฮีโมไลซินที่มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและสามารถยับยั้งการถูกจับกินโดยเม็ดเลือดขาว แอโรแบคทีนมีคุณสมบัติจับกับธาติเหล็ก ขณะที่เอ็นเทอโรท็อกซิน (Enterotoxin) เป็นท็อกซินที่มีผลต่อการทำงานของลำไส้โดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการขับน้ำและเกลือแร่ เอนเทอโรท็อกซินมี 2 ชนิด ได้แก่ เอนเทอโรท็อกซินประเภทที่ทนความร้อน (Heat-stable enterotoxin) และเอนเทอโรท็อกซินประเภทที่ไม่ทนความร้อน (Heat-labile enterotoxin) (23) เอนเทอโรท็อกซินเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* โดยท็อกซินจะกระตุ้นการทำงานของ Guanylate cyclase ทำให้เกิดภาวะ Hypersecretion กระตุ้นให้เกิดการหลั่งน้ำเข้าสู่ช่องท้องหรือการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ และเป็นสาเหตุของการท้องร่วงตามมา (24)

4. ระบาดวิทยา

การติดเชื้อ *E. coli* สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของโลก *E. coli* เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อทั้งในชุมชน (Community acquired infection) และในโรงพยาบาล (Hospital หรือ Nosocomial acquired infection) (29, 30) การติดเชื้อในชุมชนเป็นการติดเชื้อขณะที่เกิดขึ้นขณะอยู่ในชุมชนหรือ

ภายนอกโรงพยาบาล โดยเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อส่วนใหญ่ไม่ใช่เชื้อดื้อยา ขณะที่การติดเชื้อในโรงพยาบาลนั้นเป็นการติดเชื้อขณะที่ผู้ป่วยได้รับการตรวจหรือเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล หรือหลังจากเข้ารับการรักษาภายใน 48 ถึง 72 ชั่วโมง (31, 32) เชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุหลักอันดับหนึ่งของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในชุมชนและในโรงพยาบาล โดยพบมากถึง 80 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (4) นอกจากนี้ยังพบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* (1) จากการศึกษาของ Thamlikitkul และคณะเกี่ยวกับการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยโรงพยาบาล 4 แห่งในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2543 พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ *E. coli* สูงเป็นอันดับหนึ่งเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์และมีอัตราเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin เท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ (33) จากข้อมูลของ Chaiwarith และคณะพบว่าเชื้อ *E. coli* สามารถเพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่มาจากเลือดและปัสสาวะได้มากเป็นอันดับหนึ่งจากโรงพยาบาลเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2549 ถึง 2552 (34)

5. การติดต่อ

โดยปกติเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งสามารถถูกขับผ่านออกมากับอุจจาระได้ และมีโอกาสปนเปื้อนลงในดินหรือแหล่งน้ำที่ใช้เป็นแหล่งเพาะปลูกหรืออุปโภคบริโภค (35) ดังนั้นเชื้อที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตจากแหล่งเพาะปลูกและน้ำดื่มอาจเข้าสู่ร่างกายคนโดยการรับประทาน (Fecal-oral route) ซึ่งเป็นเป็นการติดต่อหลัก พบว่าคนเป็นแหล่งเก็บกักเชื้อที่สำคัญของเชื้อสายพันธุ์ Enteropathogenic *E. coli* สายพันธุ์ Enteroinvasive *E. coli* ในขณะที่สัตว์ อาทิเช่น สุกร ม้า วัว เป็นแหล่งเก็บกักเชื้อสายพันธุ์ Enteroaggregative *E. coli* สายพันธุ์ Enterotoxigenic *E. coli* (35)

6. การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากเชื้อ *E. coli* สามารถก่อโรคติดเชื้อได้ในหลายระบบของร่างกาย ดังนั้นสิ่งส่งตรวจที่สามารถใช้ในการเพาะแยกเชื้อจึงมีหลายประเภทขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการติดเชื้อ อาทิเช่น สิ่งส่งตรวจประเภทอุจจาระสำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร สิ่งส่งตรวจประเภทปัสสาวะทั้งที่เป็นปัสสาวะส่วนกลาง ปัสสาวะที่เก็บได้จากการสอดสายสวนและปัสสาวะที่เจาะเก็บผ่านหน้าท้องสำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ สิ่งส่งตรวจประเภทเลือดสำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อในกระแสเลือด สิ่งส่งตรวจประเภทน้ำไขสันหลังสำหรับวินิจฉัยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สิ่งส่งตรวจประเภทหนองสำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อแผลพุพอง เป็นต้น ในปัจจุบันการวินิจฉัยเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อสามารถทำได้หลายวิธี ดังรายละเอียดต่อไปนี้

6.1 การตรวจวินิจฉัยโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ

6.1.1 การย้อมสีแกรม

เป็นการย้อมตัวเชื้อแบคทีเรียด้วยสีแกรมเพื่อตรวจหาตัวเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ โดยเชื้อ *E. coli* จะย้อมติดสีแดงหรือเรียกว่าติดสีแกรมลบและมองเห็นลักษณะเชื้อเป็นรูปแท่ง (36) วิธีนี้เป็นเพียงการวินิจฉัยเบื้องต้นและไม่สามารถจำแนกเชื้อ *E. coli* ออกจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์อื่นๆ ได้ แต่สามารถใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อนอกลำไส้ โดยเฉพาะในตำแหน่งที่ปราศจากเชื้อ (36)

6.1.2 การตรวจหาแอนติเจน

เป็นการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะกับตัวเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ เช่น การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 จากอุจจาระด้วยวิธี Polymerase chain

reaction (PCR) (37) รวมไปถึงการตรวจหาท็อกซินที่เชื้อสร้างขึ้นมาและหลังออกมาป้อนอยู่ในสิ่งส่งตรวจ เช่น การตรวจหา Shiga toxin ในอุจจาระด้วยวิธี Enzyme immunoassay (38) เป็นต้น

6.2 การวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม (Conventional method)

6.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อที่เก็บได้จากสิ่งส่งตรวจบนอาหารเลี้ยงเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ในการวินิจฉัยเชื้อ โดยเชื้อ *E. coli* สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป อาทิเช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar และ อาหารเลี้ยงเชื้อ Chocolate agar เป็นต้น โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* คือการบ่มที่อุณหภูมิ 35 ถึง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง (1) โคลนินของเชื้อ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมมีลักษณะค่อนข้างใหญ่ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ถึง 5 มิลลิเมตร โคลนินมันวาว ขอบเรียบ สีเทาขุ่น และมีความคล้ายคลึงกับโคลนินของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสายพันธุ์อื่นๆ จึงไม่สามารถใช้ลักษณะโคลนินดังกล่าวในการจำแนกสายพันธุ์ได้ (1) ขณะที่โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar มีสีชมพูเข้มและมีลักษณะแห้ง โคลนิกกลมแบน (3) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อ เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถถูกวินิจฉัยเบื้องต้นได้ด้วยการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbital MacConkey agar ที่สามารถจำแนกเชื้อ Enterohemorrhagic *E. coli* ได้แก่ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ออกจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ ได้ เนื่องจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ไม่สามารถหมักย่อน้ำตาล Sorbital จึงมีโคลนินใสเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ขณะที่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ มีโคลนินสีชมพูที่เกิดจากสภาวะที่เป็นกรดภายหลังการหมักย่อน้ำตาล Sorbital (1)

6.2.2 การวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test) เป็นการทดสอบโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ ของเชื้อ อาทิเช่น การย่อยสลายซีสเตรทประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน การสร้างเอนไซม์หรือสารชีวภาพต่างๆ ความทนทานต่อสาร และคุณสมบัติที่สามารถแสดงออกได้ของเชื้อ (Phenotypic characteristic) เป็นต้น (1) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการทดสอบดังกล่าวจึงสามารถใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ถึงระดับสปีชีส์ คุณสมบัติปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญของเชื้อ *E. coli* ได้แก่ ความสามารถในการหมักย่อน้ำตาลกลูโคส แล็กโตสและซูโครสเมื่อทำการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar การให้ผลบวกกับปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันกับไลซีนและออ์นิติน การเคลื่อนที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว ความสามารถในการสร้างสารอินโดล แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูริเอส เอนไซม์ออกซิเดสและไม่สามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (39) ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* (39)

ตารางที่ 2. 1 คุณสมบัติปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* (39)

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Yellow pigment	Indole production	Motility	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Urea hydrolysis	Gelatin hydrolysis (22 °C)	DNase (25 °C)	D-Glucose, gas	Fermentation of	
													Lactose	Sucrose
<i>Edwardsiella</i> spp.	-	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	V	-	+
<i>Enterobacter</i> spp.	-	+	+	-	-	+	+	+	V	-	-	+	V	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	V	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	V
<i>Escherichia coli</i> (inactive)	-	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	V
<i>Escherichia vulneris</i>	-	+	-	V	-	+	-	-	-	-	-	+	V	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	V	V
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Kluyvera</i> spp.	-	V	+	-	+	+	-	+	-	-	-	V	+	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-	+	+	-	+	-	V	+	+	-	-	+	+	+
<i>Raoultella terrigena</i>	-	+	V	-	-	-	+	V	-	-	-	+	+	+
<i>Serratia</i> spp.	-	V	V	-	V	V	V	+	V	V	+	V	-	+
<i>Serratia fonticola</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	V	-	-	V	+	V

6.2.3 การทดสอบทางซีโรโลยี

เป็นการตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *E. coli* โดยอาศัยคุณสมบัติทางแอนติเจนของเชื้อ ได้แก่ แอนติเจนโอซึ่งเป็นส่วนประกอบที่อยู่บนผนังเซลล์และแอนติเจนเอชซึ่งเป็นส่วนประกอบแฟลเจลลาของเชื้อ (1) เนื่องมาจากการวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีไม่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ได้ (32) ตัวอย่างของเชื้อ *E. coli*

สายพันธุ์ที่ถูกจำแนกด้วยการทดสอบทางซีโรโลยี ได้แก่ สายพันธุ์ O128:H7 สายพันธุ์ O128:H8 สายพันธุ์ O128:H21 ซึ่งเป็นเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (40) สายพันธุ์ O55:H6 สายพันธุ์ O111:H2 สายพันธุ์ O128:H2 ซึ่งเป็นเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* (40, 41) สายพันธุ์ O157:H7 สายพันธุ์ O111:H8 ซึ่งเป็นเชื้อ Enterohemorrhagic *E. coli* (41, 42) สายพันธุ์ O124:H30 สายพันธุ์ O144:H25 ซึ่งเป็นเชื้อ Entero-invasive *E. coli* (42) และสายพันธุ์ O86:H2 สายพันธุ์ O128:H35 สายพันธุ์ O126:H27 ซึ่งเป็นเชื้อ Enteroaggregative *E. coli* (40, 41) การทดสอบทางซีโรโลยีดังกล่าวมีประโยชน์ในด้านระบาดวิทยา สามารถใช้ในการวินิจฉัยพยากรณ์กำเนิดและสายพันธุ์ที่กำลังเกิดการแพร่ระบาด (40) เช่น การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 โดยการตรวจหาแอนติเจนชนิด O157 และ H7 ด้วยวิธี latex agglutination (2) โดยการตรวจหาแอนติเจนดังกล่าวของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 จะให้ผลบวกโดยเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับน้ำยา (43)

6.3 การทดสอบทางอนุชีววิทยา

การวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิมอาจมีข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น ใช้ระยะเวลาในการวินิจฉัย ความจำเพาะไม่เพียงพอ และไม่สามารถวินิจฉัยเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงได้ในกรณีเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงยาก (32) ปัจจุบันเทคนิคทางอนุชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาทช่วยในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยเทคนิคดังกล่าวมีข้อได้เปรียบหลายประการ อาทิเช่น เป็นวิธีที่ให้ผลการทดสอบรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะในการทดสอบสูง สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อที่เจริญเติบโตยาก เช่น เชื้อ *Mycobacterium* หรือเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น เชื้อ *Chlamydia* และเชื้อ *Rickettsia* (32) ตัวอย่างของการนำเทคนิคทางอนุชีววิทยามาใช้ในวินิจฉัยจำแนกเชื้อ เช่น การวินิจฉัยแยกเชื้อ *E. coli* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะด้วย

เทคนิค Random amplification polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR)

(44) การวิเคราะห์แยกเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 ในอุจจาระด้วยเทคนิค Multiplex PCR (45)

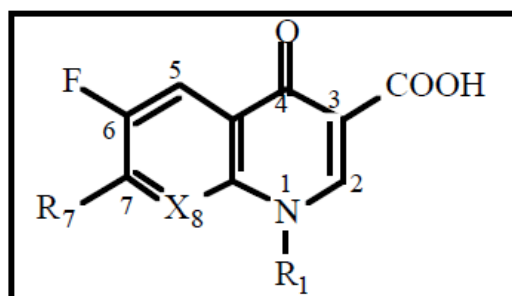
7. การรักษาการติดเชื้อ *E. coli*

การติดเชื้อ *E. coli* ในระบบทางเดินอาหารนั้นหากมีอาการไม่รุนแรง เช่น มีอาการท้องร่วง ถ่ายเหลว ไม่มีมูกเลือดปนมาในอุจจาระ และไม่มีไข้ โดยส่วนใหญ่ไม่จำเป็นต้องให้ยาปฏิชีวนะในการรักษา แต่จะให้น้ำเกลือแร่ทดแทนเพื่อป้องกันภาวะขาดน้ำและรักษาตามอาการเท่านั้น (4) การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อ *E. coli* จะใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการรุนแรง เช่น มีอาการท้องร่วงร่วมกับไข้สูงหรือมีอาการข้างเคียงโดยการปัสสาวะเป็นเลือดและในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ (46) โดยทั่วไปการรักษาการติดเชื้อ *E. coli* สามารถใช้ยา Ciprofloxacin ยา Azithromycin หรือยา Trimethoprim รักษาพร้อมกับการให้น้ำเกลือแร่ทดแทน (46) องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ยา Ciprofloxacin สำหรับการรักษาโรคท้องร่วงที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *E. coli* ซึ่งปริมาณยา Ciprofloxacin ที่เหมาะสมในผู้ใหญ่เท่ากับ 500 มิลลิกรัม ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน และในเด็กเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน (47) ขณะที่การรักษาการติดเชื้อ *E. coli* นอกกระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (Cystitis) จะใช้ยา Trimethoprim/Sulfamethoxazole ยา Cephalexin หรือยาในกลุ่ม Fluoroquinolone สำหรับการรักษา โรคกรวยไตอักเสบ (Pyelonephritis) ที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนจะใช้ยา Ampicillin ร่วมกับยา Gentamicin ยา Trimethoprim/Sulfamethoxazole หรือยา Ciprofloxacin สำหรับการรักษา เป็นต้น (23)

8. ยากลุ่ม Quinolones

8.1 โครงสร้างของยากลุ่ม Quinolones

ยากลุ่ม Quinolones เป็นยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่ง ถูกค้นพบขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1960 โครงสร้างพื้นฐานของตัวยาคือเป็นวงแหวนสองวงเชื่อมต่อกัน ประกอบด้วยวงคาร์บอน 8 ตำแหน่งที่มีหมู่กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) และหมู่คีโตน (Ketone) อยู่ที่ตำแหน่งที่ 3 และ 4 ตามลำดับ (5) ซึ่งเป็นตำแหน่งจะเข้าจับกับเอนไซม์เป้าหมายที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น ตัวอย่างของยากลุ่ม Quinolones รุ่นแรก ได้แก่ Nalidixic acid, Oxolinic acid และ Cinoxacin ต่อมามีการพัฒนายาเพื่อให้สามารถออกฤทธิ์ได้ในวงกว้างมากขึ้นโดยการเติมฟลูออรีน (Fluorine) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ในสูตรโครงสร้างเดิมของ Quinolones รุ่นแรก และเรียกกยาในกลุ่มนี้ว่ายา Fluoroquinolones (รูปที่ 2.1) (48) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ครอบคลุมในการรักษาแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก ตัวอย่างของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Fluoroquinolones ได้แก่ Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin เป็นต้น (5,8)



รูปที่ 2. 1 โครงสร้างพื้นฐานของยากลุ่ม Quinolones (48)

ความแตกต่างของการออกฤทธิ์ของยาแต่ละชนิดในยาในกลุ่ม Quinolones เกิดจากการเติมหมู่ อะตอมที่แตกต่างกันในคาร์บอนที่ตำแหน่งต่างๆ ดังที่สรุปในรูปที่ 2.2 โดยหมู่อะตอมที่เติมเข้าไปในแต่ละตำแหน่งนั้นจะส่งผลต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของตัวยาได้ (48,49) และทำให้ยาในกลุ่ม Quinolones มีความหลากหลายมากขึ้น รายละเอียดของการเติมหมู่อะตอมในคาร์บอนที่ตำแหน่งต่างๆ จะส่งผลต่อประสิทธิภาพของยาดังนี้

ตำแหน่งที่ 1 การถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไนโตรเจนและหมู่ Cyclopropyl หรือหมู่ Ethyl ที่ตำแหน่งนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอนแอโรบิก (49)

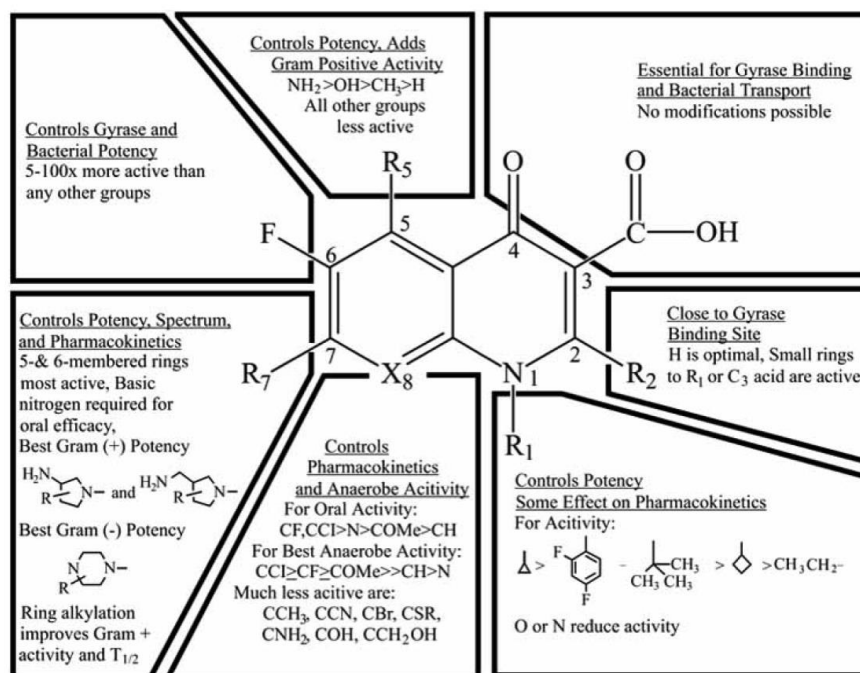
ตำแหน่งที่ 3 และ 4 เป็นตำแหน่งสำคัญที่ตัวยายจะใช้เข้าจับ เอนไซม์เป้าหมายและดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย โดยทั่วไปแล้วที่ตำแหน่งที่ 3 และ 4 นั้นจะถูกเติมด้วยหมู่ Carboxyl และหมู่ Ketone ตามลำดับ (49)

ตำแหน่งที่ 5 การเติมหมู่อะตอมของหมู่อะมิโน หมู่ Alkyl หรือหมู่ Hydroxyl ที่ตำแหน่งนี้จะช่วยเพิ่มเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก (49)

ตำแหน่งที่ 6 การเติมอะตอมของฟลูออรีนที่ตำแหน่งนี้จะช่วยให้ยาสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ DNA gyrase ได้ดีขึ้น ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ที่มากขึ้น และยังช่วยเพิ่มความสามารถของยาในการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ดีขึ้นอีกด้วย (49)

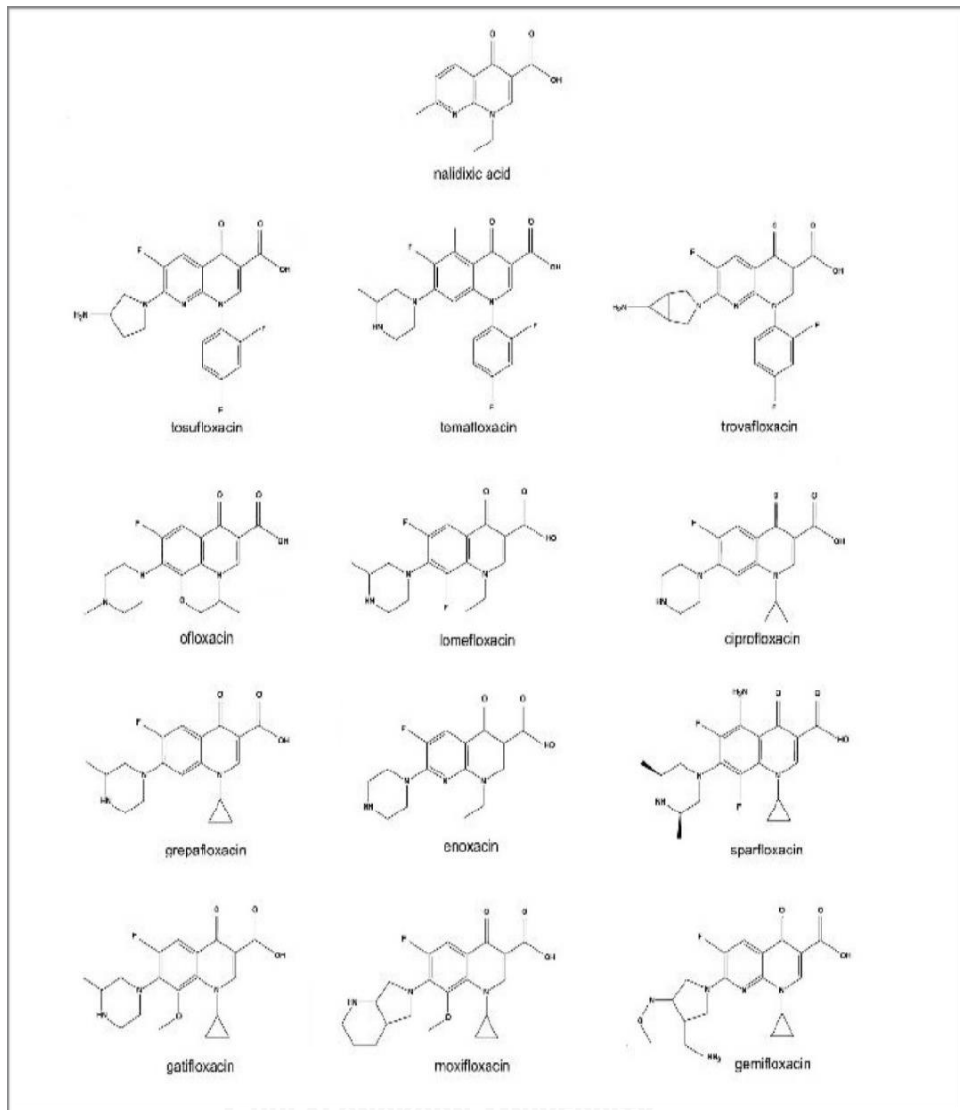
ตำแหน่งที่ 7 เป็นตำแหน่งที่สำคัญของยาที่ใช้จับกับเอนไซม์ DNA gyrase หรือเอนไซม์ DNA topoisomeraes IV ซึ่งเป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ โดยพบว่าการเติมหมู่อะตอมต่างๆ เข้าไปที่ตำแหน่งนี้จะส่งผลต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย เช่น หากมีการเติมหมู่ Aminopyrrolidine จะช่วยให้ยานั้นสามารถออกฤทธิ์ได้มากขึ้นต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แต่หากเป็นการเติมหมู่ Piperazine จะทำให้ยานั้นสามารถออกฤทธิ์ได้มากขึ้นต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (49)

ตำแหน่งที่ 8 การเติมหมู่อะตอมต่างๆ เข้าไปที่ตำแหน่งนี้จะช่วยให้ยาสามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่แตกต่างกัน โดยพบว่าหากมีการเติมอะตอมของฟลูออรีนหรือหมู่คลอรีน จะทำให้ยานั้นสามารถออกฤทธิ์มากขึ้นต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบิก แต่หากเป็นการเติมหมู่ Methyl หรือหมู่ Methoxy จะทำให้ยานั้นสามารถออกฤทธิ์มากขึ้นต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (49)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของยาในกลุ่ม Quinolones ที่มีการเติมหมู่อะตอมในคาร์บอนที่ตำแหน่งต่างๆ (48)

การเติมหมู่อะตอมต่างๆ ในคาร์บอนที่ตำแหน่งที่แตกต่างกันออกไป ทำให้ยาในกลุ่ม Quinolones มีความหลากหลาย โครงสร้างของยาชนิดต่างๆ ในยาในกลุ่ม Quinolones ดังที่แสดงรูปที่ 2.3 (50)



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างยาชนิดต่างๆ ในยากลุ่ม Quinolones (50)

8.2 การแบ่งกลุ่มของยาในกลุ่ม Quinolones

ยาในกลุ่ม Quinolone สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ตามความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (8,49) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ยาในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในวงแคบ และใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* (8) ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Nalidixic acid, Cinoxacin, Flumequine, Oxolinic acid, Pipemidic acid, Piromidic acid, Rosoxacin เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 ยาในกลุ่มนี้ถูกพัฒนาขึ้นโดยการเติมหมู่ฟลูออรีนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และหมู่ Piperazinyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 เพื่อให้สามารถออกฤทธิ์ได้ในวงกว้างขึ้น และใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรวมถึงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายสายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Enoxacin, Pazufloxacin, Pefloxacin, Prulifloxacin, Rufloxacin เป็นต้น (8)

กลุ่มที่ 3 ยาในกลุ่มนี้ถูกพัฒนาเพื่อให้ออกฤทธิ์ได้ในวงกว้างมากขึ้น โดยสามารถออกฤทธิ์ครอบคลุมทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *S. pneumoniae* ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Levofloxacin, Gatifloxacin, Garenoxacin, Sparfloxacin, Tosufloxacin เป็นต้น (8)

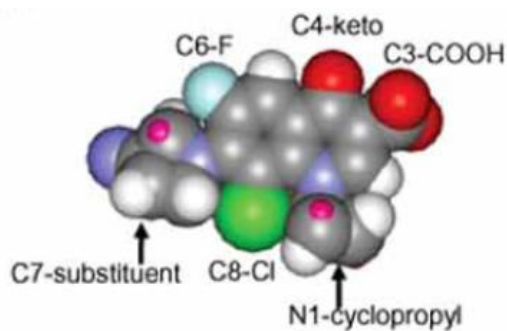
กลุ่มที่ 4 ยาในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ได้ในวงกว้างที่สุดในบรรดาในกลุ่ม Quinolones สามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และแบคทีเรียในกลุ่ม

แอนแอรอโรบิค ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ Gemifloxacin, Delafloxacin, Moxifloxacin, Sitafloracin, Trovafloxacin เป็นต้น (8)

8.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม Quinolones

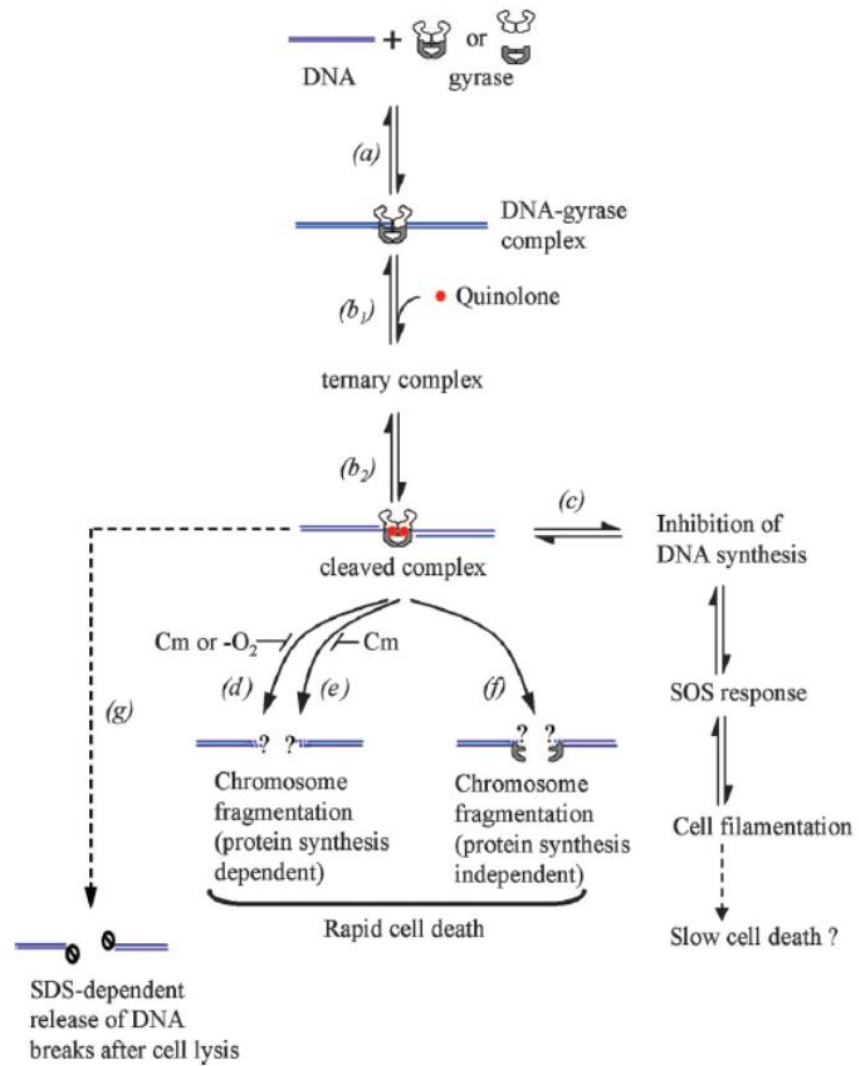
เมื่อยาในกลุ่ม Quinolones เข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียยาจะเข้าจับกับเป้าหมายของยา ได้แก่ เอนไซม์ DNA gyrase และ DNA topoisomerase IV และออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ส่งผลต่อการขัดขวางกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอสายใหม่และตายในที่สุด (51)

โดยปกติในกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ นั้น ดีเอ็นเอและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องจำเป็นต้องเข้าจับกันเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เหมาะสม เนื่องจากยาในกลุ่ม Quinolones นั้นไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอหรือเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียได้โดยตรง และจำเป็นต้องให้เกิดโครงสร้างการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและเอนไซม์ก่อน จากนั้นยาในกลุ่ม Quinolones จึงสามารถเข้าจับกับโครงสร้างดังกล่าวได้โดยใช้หมู่ Carboxyl ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และหมู่ Ketone ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 4 ของยาดังแสดงในรูปที่ 2.4 (51) เข้าจับกับหมู่อะมิโนที่ด้านปลายของเอนไซม์ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ในเชื้อแบคทีเรีย ตามลำดับ เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า Cleaved complex อยู่บริเวณเหนือจุด Replication fork ซึ่งโครงสร้าง Cleaved complex ดังกล่าวจะคงสภาพอยู่และส่งผลให้กระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียหยุดชะงัก ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้และตายในที่สุด (5, 51, 52)



รูปที่ 2. 4 รูปจำลองแสดงลักษณะโมเลกุลของยาในกลุ่ม Quinolones (51)

โครงสร้าง Cleaved complex ที่เกิดจากการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียกับยา Quinolones นอกจากจะขัดขวางกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอดังกล่าวมาแล้ว ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอผ่านกระบวนการ SOS response ซึ่งส่งผลให้ดีเอ็นเอสายคู่เกิดการแตกหักดังรูปจำลองกลไกที่แสดงในรูปที่ 2.5 (53)



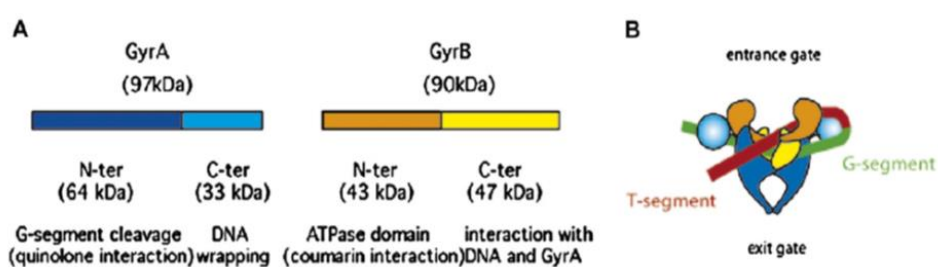
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2. 5 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม Quinolones ผ่านกระบวนการ SOS response (53)

8.4 เป้าหมายของยาในกลุ่ม Quinolones: เอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA

topoisomerase IV

เอนไซม์ DNA gyrase เป็นเป้าหมายหลักที่ยากลุ่ม Quinolones เข้ามาจับเพื่อยับยั้งกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (54) เอนไซม์ DNA gyrase ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 โดย Gellert และคณะ (55) เอนไซม์ DNA gyrase เป็นโปรตีนที่มีขนาด 353 กิโลดาลตัน มีโครงสร้างเป็น heterotetramer ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยของโปรตีน GyrA และ 2 หน่วยย่อยของ GyrB (56) โดยโปรตีน GyrA นั้นมีขนาด 97 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 875 โมเลกุล มีด้าน N-terminal domain ที่ใช้เข้าจับสายดีเอ็นเอและเชื่อมต่อกับโปรตีน GyrB ส่วนด้าน C-terminal domain นั้นเป็นส่วนที่หุ้มสายดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอหมุนและเกิดการคลายเกลียว (56) ขณะที่โปรตีน GyrB มีขนาด 90 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 804 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โปรตีนทั้งสองชนิดนี้ถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน *gyrA* และยีน *gyrB* ตามลำดับ (55)

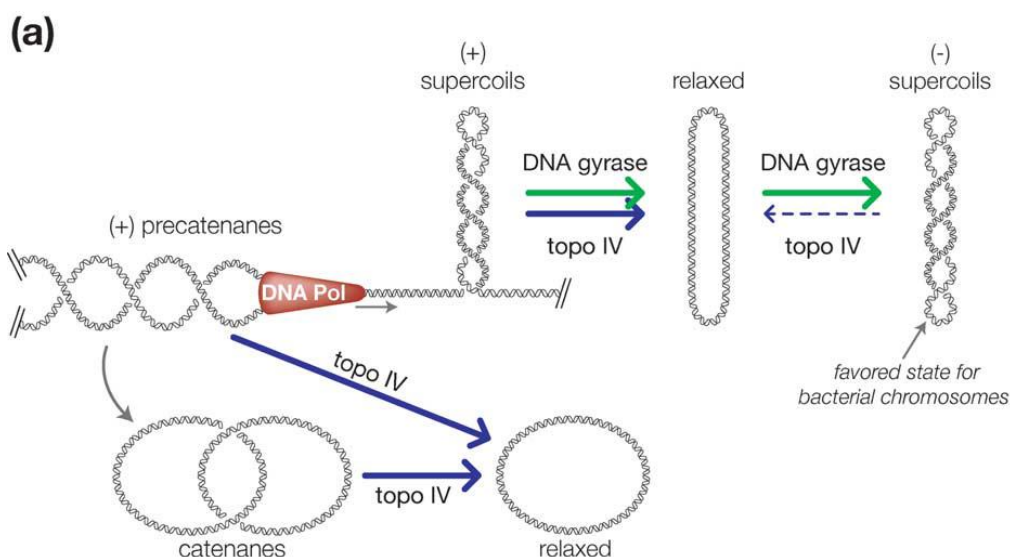


รูปที่ 2. 6 ส่วนประกอบของโปรตีน GyrA และโปรตีน GyrB (56)

ในขั้นตอนการจำลองสายดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* นั้น เมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกแยกออกจากกันด้วยเอนไซม์ Helicase แล้ว เอนไซม์ DNA gyrase จะเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่บริเวณเหนือจุด

Replication fork ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนทิศทางการวนของสายดีเอ็นเอจากเดิมที่วนทางด้านขวา (Positive supercoils) ไปเป็นวนทางด้านซ้าย (Negative supercoils) ทำให้สายดีเอ็นเอเกิดการบิดคลายเกลียว ซึ่งกระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยพลังงานจากการย่อยสลาย Adenosine triphosphate (5)

เอนไซม์ DNA topoisomerase IV เป็นเป้าหมายหลักที่ยากลุ่ม Quinolones เข้ามาจับเพื่อยับยั้งกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (54) เอนไซม์ DNA topoisomerase IV มีโครงสร้างเป็น Heterotetramer ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยของโปรตีน ParC และ 2 หน่วยย่อยของโปรตีน ParE โดยโปรตีน ParC นั้นมีขนาด 83.7 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 752 โมเลกุล ขณะที่โปรตีน ParE มีขนาด 70.2 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 630 โมเลกุล ส่วน *parE* นั้นมีขนาด 70.2 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนทั้งสองถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน *parC* และยีน *parE* ตามลำดับ (55) เอนไซม์ DNA topoisomerase IV เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการคลายเกลียวและคงสภาพของสายดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์จะเข้าจับกับสายดีเอ็นเอที่บริเวณใต้จุด replication fork ทำให้ดีเอ็นเอที่มีลักษณะวนทางด้านขวา (Positive supercoils) เกิดการคลายตัว อีกทั้งมีหน้าที่สำคัญในการแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันภายหลังสิ้นสุดกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอในเชื้อแบคทีเรีย (55) รูปที่ 2.7 แสดงกลไกการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA topoisomerases IV ในกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย (57)



รูปที่ 2. 7 กลไกการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA topoisomerases IV ในกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ (57)

8.5 เกล็ดขจลศศตรของยากลุ่ม Quinolones

ยากลุ่ม Quinolones สามารถถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วในระบบทางเดินอาหาร โดยภายหลังจากการรับประทานยาดังกล่าวแล้วยาจะสามารถดูดซึมได้ในเวลา 1-2 ชั่วโมง (58) หลังจากนั้นยากลุ่ม Quinolones จะสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกายได้เป็นอย่างดี อาทิเช่น การแพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อ กระดูก พลาสมา และน้ำไขสันหลัง เป็นต้น (8) จากนั้นยาจะถูกขับออกภายนอกร่างกายโดยพบว่ายาส่วนใหญ่จะถูกขับและย่อยสลายได้ที่ไตเป็นหลัก และมีบางส่วนย่อยสลายและถูกขับออกที่ลำไส้ (58)

8.6 ผลข้างเคียงของยาในกลุ่ม Quinolones

การใช้ยาในกลุ่ม Quinolones เพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรื้อรังสามารถพบผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้ โดยทั่วไปพบว่าประมาณ 6-10 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่ได้รับยาจะเกิดอาการข้างเคียงในระดับปานกลาง และประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์จะเกิดอาการข้างเคียงที่รุนแรง (4) อาการข้างเคียงที่มีสาเหตุมาจากใช้ยาในกลุ่ม Quinolones ที่สามารถพบได้ อาทิเช่น เกิดการอักเสบที่กระดูกและข้อ ความดันต่ำ ปวดศีรษะ เวียนศีรษะ นอนไม่หลับ ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ เป็นต้น (58)

9. การดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolones

9.1 กลไกการดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolones

ยาในกลุ่ม Quinolones ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลายตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1970 เป็นต้นมา (59) และต่อมาได้มีการคิดค้นพัฒนายาในกลุ่ม Quinolones รุ่นใหม่เพื่อให้สามารถออกฤทธิ์ครอบคลุมได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถพัฒนากลายเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolones ได้ (60) โดยอาศัยกลไกการดื้อยาดังต่อไปนี้ 1). การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมาย (Alteration of the target enzymes) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของการสร้างเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายของยา โดยยีนดังกล่าวอยู่บนโครโมโซมของเชื้อบริเวณที่เรียกว่า Quinolone resistance determining regions (QRDRs) อันประกอบไปด้วยยีน *gyrA* ยีน *gyrB* ยีน *parC* และยีน *parE* การกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากความผิดพลาดในการถอดรหัส (Transcription errors) ที่เกิดขึ้นระหว่างการจำลองสายดีเอ็นเอซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติในอัตรา 1 ใน 10^6 ถึง 1 ใน 10^9 โดยการกลายพันธุ์ของ Quinolone resistance

determining regions ที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ DNA gyrase (สำหรับการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* หรือยีน *gyrB*) และเอนไซม์ DNA topoisomerase IV (สำหรับการกลายพันธุ์ของ *parC* หรือยีน *parE*) ยาจึงไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์เป้าหมายดังกล่าวได้อย่างจำเพาะทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายได้ หรือมีการจับกับเอนไซม์เป้าหมายแบบหลวมๆ (Low affinity) ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้ไม่สมบูรณ์ (51, 61) 2). การเพิ่มการขับยาออกสู่ภายนอกเซลล์ (Increased efflux pump) เกิดขึ้นจากการที่เชื้อแบคทีเรียเพิ่มปริมาณการสร้างโปรตีน QepA efflux pump เพื่อเพิ่มการขับยาออกภายนอกเซลล์ของตัวเชื้อแบคทีเรีย โดยการสร้างโปรตีนดังกล่าวถูกควบคุมโดยยีน *qepA* ของเชื้อแบคทีเรีย (51, 61) 3). การสร้างโปรตีนเพื่อป้องกันการเข้าจับของยากับเอนไซม์เป้าหมาย (Target protection) เกิดขึ้นจากการที่เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างโปรตีน Qnr ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ DNA ของตัวเชื้อ และเข้าจับเอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA topoisomerase IV ส่งผลให้ยาในกลุ่ม Quinolones ไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ดังกล่าวทั้งสองได้ ซึ่งการสร้างโปรตีน Qnr นั้นถูกควบคุมโดยยีน *qnr* ของเชื้อแบคทีเรีย (51, 61) 4). การสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายการออกฤทธิ์ของยา (Quinolone-inactivating enzymes) ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ Acetylating Aac(6')-Ib-cr ที่มีคุณสมบัติเติมหมู่ Acetyl ให้กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ที่จับกับหมู่ Piperazinyl nitrogen ของยากกลุ่ม Quinolones ส่งผลให้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาลดลง การสร้างเอนไซม์ดังกล่าวถูกควบคุมโดยยีน *aac(6')-Ib-cr* ของเชื้อแบคทีเรีย (51, 61)

9.2 การดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ในเชื้อ *E. coli*

การดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ในเชื้อ *E. coli* นั้นพบว่าสามารถเกิดได้จากทั้ง 4 กลไกดังที่อธิบายข้างต้น แต่กลไกที่พบได้บ่อยและเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อ *E. coli* ดื้อต่อยากลุ่ม

Quinolones เกิดจากการกลายพันธุ์ในส่วนของ Quinolone resistance determining regions (34) โดยงานวิจัยของ Aoki และคณะในปี ค.ศ. 2013 ซึ่งทำการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นนั้นพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones นั้น 42.14 เปอร์เซ็นต์ เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ Quinolone resistance determining regions 1.4 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีสาเหตุมาจากการสร้างเอนไซม์ Quinolone-inactivating เพื่อมาทำลายยา แต่ไม่พบว่ามีเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ด้วยการสร้างโปรตีนเพื่อป้องกันการเข้าจับของยากับเอนไซม์เป้าหมาย (62) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cavaco และคณะในปี ค.ศ. 2008 ที่พบว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin นั้นเกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ QRDRs บริเวณยีน *gyrA*, *parC* และ *parE* 31.5 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการสร้าง drug efflux pump 1.6 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการสร้างโปรตีนเพื่อป้องกันเอนไซม์เป้าหมาย และ 9.7 เปอร์เซ็นต์ พบ *aac(6')-Ib-cr* gene ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ Quinolone-inactivating เพื่อมาทำลายยา (61)

การกลายพันธุ์ในส่วนของ Quinolone resistance determining regions นั้นสามารถเกิดได้ ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนยีน *gyrA* ยีน *gyrB* ยีน *parC* และยีน *parE* หรืออาจเกิดได้พร้อมกันมากกว่าหนึ่งตำแหน่งขึ้นไป (11, 63) อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นบนยีน *gyrA* และยีน *parC* (62, 64-66) ในปี ค.ศ. 2013 Aoike และคณะ ทำการศึกษารายการกลายพันธุ์บน QRDRs ในเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคในกระเพาะอาหารในประเทญี่ปุ่น พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones จำนวน 85 เปอร์เซ็นต์เกิดกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ในขณะที่เชื้อจำนวน 45.6 เปอร์เซ็นต์ เกิดกลายพันธุ์ของยีน *parC* (62) นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยของยีน *gyrA* คือตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ในขณะที่ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยของยีน *parC* คือตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 (62) การศึกษา

ของ Nam และคณะในปี ค.ศ. 2013 ทำการศึกษาลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin และพบว่าอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์และ 96.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* เท่ากับ 97.5 เปอร์เซ็นต์และ 21.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (11) การกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ที่เกิดขึ้น ณ ตำแหน่งโคดอน 83 ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการแทนที่ (Substitution) ของกรดอะมิโน Serine (Ser) ด้วยกรดอะมิโน Leucine (Leu) หรือ Tryptophan (Trp) หรือ Alanine (Ala) ในขณะที่ตำแหน่งโคดอน 87 มักพบการแทนที่ของกรดอะมิโน Aspartic acid (Asp) ด้วยกรดอะมิโน Asparagine (Asn) หรือ Tyrosine (Tyr) การกลายพันธุ์ของยีน *parC* ณ ตำแหน่งโคดอน 80 ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโน Serine ด้วยกรดอะมิโน Isoleucine (Ile) หรือ Arginine (Arg) ในขณะที่ตำแหน่งโคดอน 84 มักพบการแทนที่ของกรดอะมิโน Glutamic acid (Glu) ด้วยกรดอะมิโน Glycine (Gly) หรือ Valine (Val) (66-68)

อย่างไรก็ตามมีการรายงานถึงการแทนที่ของกรดอะมิโนอื่นๆ นอกเหนือจากที่ได้อธิบายข้างต้น อาทิเช่น การกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* ที่โคดอน 67 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Alanine เป็น Serine (69) ที่โคดอน 80 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Alanine เป็น Valine (10) ที่โคดอน 81 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Glycine เป็น Cysteine (69) เป็นต้น ในยีน *parC* ที่โคดอน 78 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Glycine เป็น Aspartate (10, 66) หรือ Lysine (70) ที่โคดอน 90 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Alanine เป็น Valine (10) และ โคดอน 108 การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Alanine เป็น Threonine (Thr) (10) เป็นต้น แม้ว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนอื่นๆ นอกเหนือจากที่ตำแหน่งโคดอนหลักคือ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และ 80 และ 84 ของยีน *parC* พบได้ไม่บ่อย แต่การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในบางตำแหน่งนั้นสามารถส่งผลให้เชื้อมีอัตราการดื้อยาที่สูงขึ้น เช่น การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 81 ของยีน *gyrA* และ ที่ตำแหน่งโคดอน 78 บนยีน *parC* ส่งผลให้เชื้อ *E. coli* มีดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones สูงขึ้น 4 ถึง 8 เท่า (71)

อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนที่พบไม่บ่อยเหล่านี้จะเกิดขึ้นร่วมกับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งหลักเท่านั้น (71)

จำนวนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์บนยีน *gyrA* และ *parC* มีความสัมพันธ์กับระดับการดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolones (71-73) กล่าวคือหากบริเวณ Quinolone resistance determining regions มีการกลายพันธุ์หลายตำแหน่งมากขึ้นจะสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นน้อยสุดของยาในกลุ่ม Quinolones ที่สูงขึ้นตามลำดับ (52) Minarini และคณะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 เพียงตำแหน่งเดียวบนยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่ยังคงไวต่อยาในกลุ่ม Quinolones แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ พบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ดังกล่าว มีค่าความเข้มข้นของยาในกลุ่ม Quinolones น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อที่สูงขึ้นกว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติ นอกจากนี้หากมีการการกลายพันธุ์เพิ่มเติมที่ตำแหน่งโคดอนอื่นบนยีน *gyrA* และ/หรือบนยีน *parC* จะส่งผลต่อการดื้อยาในระดับที่สูงขึ้น (59) Saenz และคณะพบว่าเชื้อ *E. coli* ยังคงไวต่อยา Ciprofloxacin แม้ว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียว ขณะที่เชื้อดื้อต่อยาในระดับต่ำเมื่อพบการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งที่เกิดขึ้นของยีน *gyrA* หนึ่งตำแหน่งร่วมกับของยีน *parC* หนึ่งตำแหน่ง และเชื้อจะดื้อต่อยาในระดับกลางหรือสูงเมื่อพบการกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งที่เกิดขึ้นของยีน *gyrA* หนึ่งตำแหน่งร่วมกับของยีน *parC* สองตำแหน่ง (68)

9.3 อัตราการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ของเชื้อ *E. coli*

ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolones มีแนวโน้มที่สูงขึ้น ในปี ค.ศ. 2012 Dalhoff และคณะได้ทำการศึกษาอัตราการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ใน 14 ประเทศจากทวีปต่างๆ ทั่วโลก พบว่าในประเทศแคนาดา มีอัตราการดื้อยาในเชื้อ *E. coli* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เท่ากับ 21.4, 37.8 และ 12.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ประเทศอเมริกาใต้มีอัตราการดื้อยาในเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *K. pneumoniae* เท่ากับ 17.2 และ 31.9

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบอัตราการดื้อยาในประเทศเนเธอร์แลนด์ในเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *Proteus spp.* เท่ากับ 29 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (74) การศึกษาในปี ค.ศ. 2012 ของ Asenso และคณะในประเทศสเปนแสดงให้เห็นอัตราการดื้อยา Fluoroquinolones ของเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่เพิ่มขึ้นจาก 15 เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างปี ค.ศ. 1999 ถึงปี ค.ศ. 2010 (75) สอดคล้องกับการศึกษาในประเทศอินเดียในปี ค.ศ. 2005 ประเทศตุรกีในปี ค.ศ. 2007 และประเทศเกาหลีใต้ในปี ค.ศ. 2009 ที่พบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา Fluoroquinolones เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเท่ากับ 69, 22 และ 88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (74)

สำหรับอัตราการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ในประเทศไทยพบว่ามีความโน้มที่เพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกัน การศึกษาของ Sianglum และคณะเกี่ยวกับการดื้อยา Nalidixic acid และยา Ciprofloxacin ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างประเภทต่างๆ เช่น อุจจาระจากคนและสัตว์ ผัก และน้ำแข็ง ในกรุงเทพมหานครและปริมณฑล พบว่ามีอัตราการดื้อยา Nalidixic acid เท่ากับ 31.6, 32.4, 35.6 และ 57.1 เปอร์เซ็นต์ และยา Ciprofloxacin เท่ากับ 5.3, 23.5, 22 และ 19 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างประเภทต่างๆ ตามลำดับ (76) โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ/หรือ 87 ของยีน *gyrA* เท่ากับ 26 และ 24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งโคดอน 83 จากกรดอะมิโน Serine เป็น Leucine ขณะที่ตำแหน่งโคดอน 87 เปลี่ยนกรดอะมิโน Aspartate เป็น Asparagine (76) จากข้อมูลการตรวจหาความไวต่อยาของเชื้อชนิดต่างๆ (Antibiogram) ของโรงพยาบาลรามาริบัติ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2555 พบว่าเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin เท่ากับ 64 และ 63 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (7) สอดคล้องกับข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2557 ซึ่งเป็นข้อมูลที่รวบรวมได้จากโรงพยาบาลจำนวนทั้งสิ้น

50 แห่งทั่วประเทศไทย พบว่าเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin เท่ากับ เท่ากับ 54.7 และ 54.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (6)

10. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นการทดสอบเพื่อวินิจฉัยว่ายาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคได้หรือไม่ (3) ปัจจุบันมีเทคนิคที่สามารถใช้ในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียหลายเทคนิค อาทิเช่น การทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion method การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration) การทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ และการทดสอบด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา เป็นต้น

10.1 การทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion method

เป็นการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกับยาต้านจุลชีพที่บรรจุอยู่ในกระดาษกรองซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน โดยยาจะแพร่กระจายออกไปในลักษณะเป็นวงรัศมีรอบๆ แผ่นยาบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ หากเชื้อสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยยานั้นๆ จะสามารถสังเกตเห็นวงใสรอบยาที่เกิดขึ้นหรือเรียกว่า Zone of inhibition การอ่านผลต้องทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Zone of inhibition ดังกล่าว และนำไปแปลผลตามค่ามาตรฐานที่ปรากฏในคู่มือของ Clinical Laboratory Standards Institute สำหรับเชื้อแต่ละชนิด ผลทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวจะให้ผลเป็นเชื้อไวต่อยา (Susceptible) เชื้อดื้อต่อยาปานกลาง (Intermediate) หรือเชื้อดื้อต่อยา (Resistant) (2) วิธี Disk

diffusion method เป็นวิธีที่สะดวก เหมาะสำหรับงานประจำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา แต่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อที่มีระดับการดื้อยาต่ำๆ ได้

10.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการ

เจริญของเชื้อ

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ เป็นการทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นยาต่ำที่สุดที่ยังไม่ให้เกิดการเจริญของเชื้อในหลอดทดลอง สามารถทดสอบโดยเจือจางยาให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ และเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาความเข้มข้นต่างๆ เหล่านั้น และสังเกตการเจริญของเชื้อภายหลังการบ่ม โดยค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสามารถสังเกตได้จากความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำค่าที่ได้ไปแปลผลตามค่ามาตรฐานที่ปรากฏในคู่มือของ Clinical Laboratory Standards Institute สำหรับเชื้อแต่ละชนิด ผลทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวจะให้ผลเป็นเชื้อไวต่อยา เชื้อดื้อต่อยาปานกลาง หรือเชื้อดื้อต่อยา (77) การทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวมีข้อดีคือเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย สามารถทดสอบกับสารต้านจุลชีพได้หลายๆ ชนิดในเวลาเดียวกัน แต่มีข้อจำกัดคือไม่เหมาะกับการทดสอบในเชื้อแบคทีเรียโตช้า

10.2.1 Dilution method

เป็นการเจือจางยาในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ยาที่ความเข้มข้นเป็นลำดับที่แน่นอน ก่อนนำยามาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะกับเชื้อที่ต้องการทดสอบ วิธีนี้สามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวเรียกว่า Broth dilution method หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งเรียกว่า Agar dilution method (2) วิธี Dilution method มีข้อดีคือเป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวต่อยา

ปฏิชีวนะ สามารถรายงานผลการทดสอบได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพแต่มีข้อจำกัดคือขั้นตอนในการทดสอบค่อนข้างยุ่งยาก มีหลายขั้นตอน ไม่เหมาะสมกับงานประจำ (32)

10.2.2 Gradient diffusion method

Epsilometer test® หรือ E-test® เป็นการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยทำการทดสอบเชื้อกับแผ่นยาซึ่งมียาที่มีความเข้มข้นหลายๆ ความเข้มข้นบรรจุอยู่แบบ Exponential gradient ภายหลังการป่มเชื้อสามารถอ่านค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสังเกตจากจุดตัดระหว่างวงของเชื้อกับยาที่ระดับความเข้มข้นที่ถูกระบุอยู่บนแผ่นยา การทดสอบด้วยวิธี Epsilometer test® นั้นมีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ให้ผลการทดสอบในเชิงปริมาณคือสามารถทราบถึงระดับความไวหรือระดับการต่อสู้ต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่มีข้อด้อยคือ แผ่นยามีราคาค่อนข้างแพง (32, 78)

10.3 การทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ

ปัจจุบันได้มีการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพด้วยระบบอัตโนมัติ อาทิเช่น Vitex system และ Microscan walkaway system ระบบ Vitex system อาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น ซึ่งเกิดจากความสามารถในการใช้สารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ภายในตัวเครื่องอัตโนมัตินั้นประกอบด้วยการ์ดพลาสติกขนาดเล็กที่บรรจุด้วยสารต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เครื่องอัตโนมัติจะทำการอ่านผลทุกๆ 15 นาที โดยเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละหลุมเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารต้านจุลชีพและรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ ขณะทีระบบของ

Microscan walkaway system อาศัยหลักการอ่านผลการทดสอบด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หรือระบบฟลูออโรมิเตอร์ ซึ่งภายในเครื่องจะประกอบด้วยภาชนะขนาดเล็กที่มีหลุมบรรจุสารต้านจุลชีพ ที่ความเข้มข้นต่างๆ อ่านผลการเจริญของเชื้อ และรายงานผลการทดสอบเป็นค่าความเข้มข้นน้อย ที่สุดของสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ และสามารถใช้ทดสอบได้ทั้งในเชื้อแอโรบิกและ แอนแอโรบิกแบคทีเรีย (32, 78)

10.4 การทดสอบด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

เนื่องด้วยข้อจำกัดบางประการของวิธีทดสอบในงานประจำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ปัจจุบัน เทคนิคทางอณูชีววิทยาจึงเข้ามามีบทบาทในการช่วยตรวจวินิจฉัยความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ แบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น เทคนิค Hybridization เป็นการตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายได้โดยการใช้ตัว ติดตาม (Probe) ที่จำเพาะเข้าจับกับระหว่างเบสคู่สมเกิดเป็นดีเอ็นเอลูกผสม (Hybrid DNA) ซึ่ง สามารถตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้โดยการติดฉลากที่ตัวติดตาม อาทิเช่น การตรวจหา การกลายพันธุ์บนยีน *gyrA* ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 85 ในเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin ด้วยเทคนิค Hybridization ร่วมกับการติด ฉลากตัวติดตามด้วยสารรังสี (79) เทคนิค Multiplex real-time PCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจาก เทคนิค PCR เพื่อให้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายหลายๆ ตำแหน่งในเวลาเดียวกัน โดยการใช้ ไพรเมอร์ที่จำเพาะมากกว่า 1 คู่ (80) เช่น การนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ ตำแหน่งโคดอน 80 และ 83 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 91 ของยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* และ *Shigella* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin (81) เทคนิค Polymerase chain reaction-Single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์โดย อาศัยความแตกต่างของขนาดและโครงสร้างของ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกได้หลังจากสิ้นสุดขั้นตอน

PCR ซึ่งจะเคลื่อนที่บนโพลีอะคริลอะไมด์เจลได้ในอัตราที่แตกต่างกัน ทำให้ทราบรูปแบบลำดับของ ดีเอ็นเอเป้าหมายได้ (82, 83) เทคนิค Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของความยาวของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ภายหลังจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะส่งผลให้เกิดรูปแบบของความยาวของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันบนเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสและทำให้ สามารถทราบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้ (84, 85) และเทคนิค Sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐาน ที่ใช้ในการทดสอบหาการกลายพันธุ์ โดยวินิจฉัยลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายและนำข้อมูลที่ได้มา เปรียบเทียบฐานข้อมูลของลำดับเบส อาทิเช่น ฐานข้อมูล Genbank (86) เทคนิค Sequencing มี หลักการทั้งหมด 4 หลักการได้แก่ 1.) หลักการของ Sanger โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายรวมกันกับการใช้ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (dNTP) และ ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (ddNTP) 2.) หลักการของ Maxam & Gilbert เป็นปฏิกิริยาที่อาศัยสารเคมีตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ 3.) หลักการ Pyrosequencing เป็นการตรวจวัดปริมาณ Pyrophosphate ที่ถูกปล่อยออกมาขณะที่เกิดการต่อ สายดีเอ็นเอในขั้นตอน Annealing และ 4.) Single-molecule sequencing with exonuclease เป็นปฏิกิริยาที่วัดปริมาณฟลูออเรสเซนต์ในขั้นตอนสุดท้าย โดยไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสาร ฟลูออเรสเซนต์เข้าจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นจึงใช้เอนไซม์ Exonuclease ย่อย ดีเอ็นเอดังกล่าวทำให้มีการปล่อยสารฟลูออเรสเซนต์ (86) แม้ว่าเทคนิค Sequencing จะเป็นเทคนิคที่มี ความน่าเชื่อถือสูงและเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องอาศัยความชำนาญในการปฏิบัติและมีราคาค่อนข้างสูง (85)

11. เทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR)

11.1 ความเป็นมาของเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction (MAS-PCR)

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว (Single-nucleotide polymorphisms: SNPs) รวมถึงการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (Point mutation) อาจก่อให้เกิดผลที่แตกต่างกันในลักษณะทางกายภาพ หรือโรคต่างๆ (Disease-associated mutation) ได้ (87) ตัวอย่างเช่น การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเอนไซม์ DNA gyrase และเป็นสาเหตุของเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolone (51) หรือการเกิด SNPs ของยีน *BIN1* ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในคน (88) การตรวจวินิจฉัยการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสดังกล่าวจึงมีความสำคัญทั้งในแง่การวินิจฉัยโรค การตอบสนองต่อยารักษาโรคที่แตกต่างกัน รวมไปถึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายชีวภาพสำหรับการสร้างแผนที่พันธุกรรม (87) ปัจจุบันมีเทคนิคทางอณูชีววิทยาหลายเทคนิคที่สามารถตรวจหาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว อาทิเช่น เทคนิค DNA sequencing เทคนิค Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) และเทคนิค Allele specific-Polymerase chain reaction (AS-PCR) (89)

เทคนิค AS-PCR หรือ PCR allele-specific amplification (PASA) ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย Newton และคณะในปี ค.ศ. 1989 ซึ่งเป็นเวลา 6 ปีหลังจากที่เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ได้ถูกคิดค้นขึ้นมา (90) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจวินิจฉัยตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว เพื่อจำแนกผู้ป่วยในโรคที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนออกจากคนปกติ โดยเทคนิค AS-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นพบว่ามี

ประสิทธิภาพดีในการจำแนกผู้ที่มีภาวะบกพร่องของ Alpha1-antitrypsin ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *aat* ที่ตำแหน่ง *aat S loci* และตำแหน่ง *aat Z loci* และเทคนิค AS-PCR ยังเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย มีความรวดเร็ว เชื่อถือได้ และไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีในการตรวจวัด (90)

เทคนิค AS-PCR เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนามาจากเทคนิค PCR เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว (89) โดยเทคนิค AS-PCR นั้นจะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ลำดับเบสปลายด้าน 3' มีความจำเพาะกับลำดับเบสที่ปกติ ณ ตำแหน่งที่ต้องการตรวจวินิจฉัยการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอต้นแบบ (91) ส่งผลให้เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วไพรเมอร์จะสามารถจับแบบคู่สมกับลำดับเบสที่ปกติและสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบได้ ขณะที่ไพรเมอร์จะไม่สามารถจับแบบคู่สมกับลำดับเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงและไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งผลผลิตจากปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis) หรือการติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent dye-based homogeneous) (92) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค AS-PCR มาใช้ในการวินิจฉัยการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ อาทิเช่น การวินิจฉัยยีน *aac(6)-Ib-cr* ในเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones (93) และการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่โคดอน 83 และ 91 ของยีน *gyrA* ในเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ดื้อต่อยา Gatifloxacin (94)

ภายหลังได้มีการพัฒนาการเทคนิค AS-PCR ให้สามารถตรวจวินิจฉัยครอบคลุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวที่เกิดขึ้นพร้อมๆ กันหลายตำแหน่งนำไปสู่การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์มากกว่า 2 คู่ขึ้นไป โดยที่ไพรเมอร์แต่ละคู่จะมี

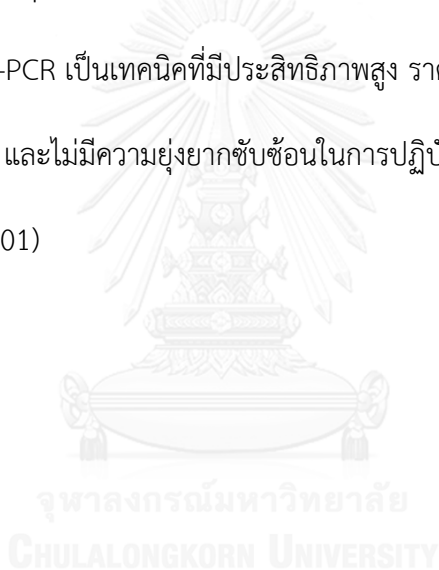
ความจำเพาะกับลำดับเบสที่ปกติ ณ ตำแหน่งต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถวินิจฉัยดีเอ็นเอ ต้นแบบที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในหลายๆ ตำแหน่งได้พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว (95)

11.2 เทคนิค MAS-PCR สำหรับการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค MAS-PCR ในการวินิจฉัยการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวที่เกิดขึ้นพร้อมๆ กันหลายตำแหน่ง ตัวอย่างการใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจวินิจฉัย เช่น การศึกษาของ Nicole และคณะในปี ค.ศ. 2006 ที่ทำการตรวจหายีน *dhfr* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* จากอุจจาระ (96) การศึกษาของ Bi และคณะในปี ค.ศ. 2011 เกี่ยวกับความผิดปกติของยีนที่ตำแหน่ง m.3460G m.11778 14484 ของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย ในผู้ป่วยโรค Leber hereditary optic neuropathy (LHON) ที่มีอาการตาบอดเนื่องจากมีความผิดปกติที่ยีนดังกล่าวในประชากรประเทศจีน (97) การศึกษาของ Ahmad และคณะในปี ค.ศ. 2014 ที่ทำการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 98 ของยีน *cyp51A* และยีน *TR34* promoter ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา Triazole ของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* (98) และการศึกษาของ Bagheri และคณะในปี ค.ศ. 2011 ที่ศึกษาการกลายพันธุ์ใน factor V G1691A และ prothrombin G20210A ซึ่งเกี่ยวข้องกับผู้ที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด (99)

เทคนิค MAS-PCR ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* อาทิเช่น การตรวจหาการกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียวของยีน *katG* ยีน *rpoB* ยีน *gyrA* และ ยีน *rrs* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Fluoroquinolone และยา Aminoglycoside ตามลำดับ โดยพบว่าเทคนิค MAS-PCR นั้นมีความไวและความจำเพาะสำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียวของยีนดังกล่าวเท่ากับ 97 และ 98.7 เปอร์เซ็นต์สำหรับยา Isoniazid เท่ากับ 99.4 และ 89.1

เปอร์เซ็นต์สำหรับยา Rifampicin เท่ากับ 93.6 และ 97 เปอร์เซ็นต์สำหรับยา Fluoroquinolone และเท่ากับ 95.8 และ 98.8 เปอร์เซ็นต์สำหรับยา Aminoglycoside ตามลำดับ (100) นอกจากนี้ยังได้มีการนำเทคนิค MAS-PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน (Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: MTB) ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ยา Rifampicin และยา Ethambutol ซึ่งเป็นยากกลุ่มแรกสำหรับใช้ในการรักษาวัณโรค โดยพบว่าเทคนิคดังกล่าวให้ความไวและความจำเพาะเท่ากับ 81.1 และ 97.5 เปอร์เซ็นต์สำหรับยา Isoniazid เท่ากับ 93 และ 98.9 เปอร์เซ็นต์สำหรับยา Rifampicin และเท่ากับ 54.5 และ 68 เปอร์เซ็นต์สำหรับยา Ethambutol (101) พบว่าเทคนิค MAS-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาประหยัดเมื่อเทียบกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาอื่นๆ และไม่มีความยุ่งยากซับซ้อนในการปฏิบัติเนื่องมาจากมีขั้นตอนการทดสอบเหมือนกับเทคนิค PCR (101)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัย มีรายละเอียด ดังนี้

สารเคมี น้ำยาและวัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วย ฐาน Agar base เบอร์ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ซื้อจากบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักรและ ฐานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton (MH) broth ซื้อจากบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร แผ่นทดสอบ E-test® สำหรับยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ซื้อจากบริษัท AB biomerieux จำกัด ประเทศสวีเดน

สารเคมี น้ำยาและวัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และ เทคนิค Multiplex allele specific-polymerase chain reaction (MAS-PCR) ประกอบด้วยดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) และเอนไซม์ *Taq* polymerase ซื้อจากบริษัท New England Biolabs จำกัด สหรัฐอเมริกา Boric acid Etylenediaminetetraacetic acid ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา Tris base ซื้อจากบริษัท Promega จำกัดสหรัฐอเมริกา ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ซื้อจากบริษัท Thermo Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกาไพโรเมอร์สั่งจากบริษัท Life Sciences AP จำกัด ประเทศไทย Agarose ซื้อจากบริษัท 1st Base จำกัด ประเทศสิงคโปร์ Ethidium bromide ซื้อจากบริษัท Plus One™

จำกัด สหรัฐอเมริกา หลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตรและหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลรามธิบดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

2. เครื่องมือ

เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer) จากบริษัท Thermo scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) จากบริษัท Wealtech จำกัด ประเทศไต้หวัน เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) จากบริษัท Genie2 จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง Micro high speed refrigerate centrifuge) จากบริษัท Vision จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ เครื่อง Thermo cycler จากบริษัท Biorad จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) จากบริษัท Myrun จำกัด ประเทศญี่ปุ่น เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator G:BOX) จากบริษัท SynGene จำกัด สหรัฐอเมริกา

3. การออกแบบงานวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้แบ่งการทดสอบออกเป็นทั้งหมด 5 ส่วนได้แก่

3.1 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี E-test® กับยา Quinolones ต่อเชื้อ *E. coli*

เพื่อยืนยันผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion และเพื่อให้ทราบค่าของผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพในเชิงปริมาณ โดยทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือ Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยทำการทดสอบกับยากลุ่ม Quinolones 2 ชนิด คือ ยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ด้วยวิธี E-test®

3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *gyrA* และ *parC* ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค Sequencing

เพื่อศึกษาลำดับเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sequencing ตามวิธีของ Sanger จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางสถิติถึงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งและจำนวนของโคดอนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* กับระดับการดื้อยา Quinolones

3.3 การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase Chain Reaction

(MAS-PCR) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli*

เพื่อพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่สามารถตรวจตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ที่พบได้บ่อยและสัมพันธ์กับการดื้อยา Quinolone ในเชื้อ *E. coli* โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งโคดอนที่มีกลายพันธุ์ที่พบบ่อยจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และหาสถานะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่สามารถตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ที่ตำแหน่งโคดอนนั้นๆ

3.4 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค

MAS-PCR

เพื่อตรวจตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ที่พบได้บ่อยและสัมพันธ์กับการดื้อยา Quinolone ในเชื้อ *E. coli* โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 111 สายพันธุ์มาทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นมา

3.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ

ยีน *gyrA* และยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli*

เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* โดยนำผลจากการทดสอบที่ได้จากเทคนิค MAS-PCR มาคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value; PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value; NPV) โดยเปรียบเทียบกับผลของเทคนิค Sequencing และการ

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี

E-test®

4. วิธีการทดลอง

4.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาในตัวอย่าง 1 กลุ่ม กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ $1-\alpha$ โดยคำนวณขนาดตัวอย่างจากข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้าที่นำเสนอในรูปแบบของร้อยละหรืออัตรา โดยใช้สูตรดังนี้ (102)

$$n = \frac{Z^2 \alpha/2 P(1-P)}{e^2}$$

n = ขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้

Z $\alpha/2$ = เป็นค่าจากตารางที่ระดับความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.05 มีค่าเท่ากับ 1.96

P = สัดส่วนตัวแปรที่สนใจศึกษาที่พบในประชากร

e = ค่าความผิดพลาดสูงสุดระหว่างสัดส่วนของตัวแปรที่สนใจศึกษาในตัวอย่าง และในประชากร (มักนิยมใช้ค่า d = 0.01 ถึง 0.1 ส่วนใหญ่นิยมใช้ 0.05)

จากคำนวณด้วยสูตรดังกล่าวโดยใช้ตัวแปรเป็นข้อมูลจากงานวิจัยของ Uchida และคณะในปี ค.ศ. 2010 ที่ทำการศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Fluoroquinolones ของประเทศในทวีปเอเชีย รวมถึงประเทศไทย ซึ่งพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาดังกล่าวมีการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 เท่ากับ 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และของยีน *parC* ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 เท่ากับ 80 และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (63) ขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้ถูกนำมา

พิจารณาประกอบกับการอ้างอิงขนาดจำนวนตัวอย่างของการศึกษาก่อนหน้าที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน
(16) จึงเป็นที่มาของขนาดตัวอย่างของงานวิจัยในครั้งนี้

4.2 เชื้อ *E. coli*

เชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์ แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ (Leftover specimen) ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลรามาริบัติ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในช่วงระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม พ.ศ.2557 โดยเชื้อทั้งหมดถูกเพาะแยกมาจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ไม่เข้ากันและถูกวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสังเกตลักษณะโคโลนีและการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี และผ่านการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี Disk diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute ปี 2013 (103) เชื้อ *E. coli* ทั้ง 111 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolones ซึ่งได้แก่ ยา Ciprofloxacin และ/หรือ Levofloxacin

4.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*

เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 111 สายพันธุ์และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป สำหรับการเก็บรักษาเชื้อทำโดยการเชื้อเชื้อที่ผ่านการการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูบ และเจือจางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4.4 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการ

เจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี E-test®

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 111 สายพันธุ์ ด้วยวิธี E-test® ดังนี้ เชื้อโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 3-5 โคโลนี เจือจางในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งเท่ากับเชื้อที่มีปริมาณ $1-2 \times 10^8$ colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิตร ใช้ไม้ปั่นสำลีป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Hinton (MH) agar ทั้งหมด 3 ระบาย วางแผ่น E-test® สำหรับทดสอบยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ลงไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยสังเกตจุดตัดระหว่างโซนใสกับความเข้มข้นของยาที่ระบุดูอยู่บนแผ่น E-test® และแปลผลตามค่าที่อ้างใน Clinical Laboratory Standard Institute ปี 2013 (103) ดังนี้ ค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่ในช่วง $\leq 1, 2, \geq 4$ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แปลผลได้เท่ากับไวต่อยา (Susceptible) ดื้อปานกลางต่อยา (Intermediate) และดื้อต่อยา (Resistant) ตามลำดับ ขณะที่ค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่ในช่วง $\leq 2, 4, \geq 8$ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แปลผลได้เท่ากับไวต่อยา ดื้อปานกลางต่อยา และดื้อต่อยา ตามลำดับ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ถูกใช้เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพของสำหรับการทดสอบดังกล่าว

4.5 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 111 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ดังนี้ เชื้อโคลนของเชื้อ *E. coli* ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูบ เจือจางในสารละลาย Tris-Ethylenediaminetetraacetic (Tris-EDTA) buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสในกล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายมาปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บน้ำใสส่วนบนซึ่งเป็นส่วนที่มีดีเอ็นเอมาทำการวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.6 การเพิ่มปริมาณยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยเทคนิค PCR

4.6.1 การเพิ่มปริมาณยีน *gyrA*

เพิ่มปริมาณยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* ซึ่งอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Oram และคณะ (104) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *uspA* ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายในหลอดทดลอง (internal control) โดยอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Chen และคณะ (105) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ในปฏิกิริยา ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครโมล ดิออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ความเข้มข้นรวม 200 ไมโครโมล บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq*

DNA polymerase ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาซึ่งอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Oram และคณะ (104) ดังนี้ อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วินาที อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2.5 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ เก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.6.2 การเพิ่มปริมาณยีน *parC*

เพิ่มปริมาณยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *parC* ซึ่งอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Vila และคณะ (106) และไพรเมอร์ที่จำเพาะยีน *uspA* ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายในหลอดทดลอง โดยอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Chen และคณะ (105) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกริยา PCR โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ในปฏิกริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครโมล ดิออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 400 ไมโครโมล บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมล และ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาซึ่งดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Vila และคณะ (107) ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72

องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ เก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

ตารางที่ 3. 1 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยปฏิกิริยา PCR

ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบสของ Forward primer และ reverse primer	ตำแหน่ง	ขนาดของ ผลผลิต PCR (คู่เบส)	อุณหภูมิ Tm (องศาเซลเซียส)	ที่มา
<i>gyrA</i>	5'-TACACCGGTCAACATTGAGG-3' 5'-TTAATGATTGCCGCGTCGG-3'	24-671	647	60 62	104
<i>parC</i>	5'AAACCTGTTTCAGCGCCGCATT-3' 5'-GTGGTGCCGTTAAGCAAA-3'	115-509	395	64 54	106
<i>uspA</i>	5'- CCGATACGCTGCCAATCAGT-3' 5'-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT-3'	4-887	884	62 64	105

4.7 การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส

(Agarose gel electrophoresis)

นำผลผลิต PCR ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำไปเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

4.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *gyrA* และ *parC* ด้วยเทคนิค Sequencing

4.8.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *gyrA* และ *parC* ด้วยเทคนิค

Sequencing

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ที่ได้ในขั้นตอน 4.6.1 และ 4.6.2 โดยเทคนิค Sequencing โดยเตรียมผลผลิต PCR ของยีน *gyrA* และ *parC* ปริมาตรไม่น้อยกว่า 20 ไมโครลิตร และควรมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ Forward primer ของยีน *gyrA* และ Forward primer ของยีน *parC* ตามรายละเอียดในตารางที่ 3.1 เพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger sequencing (108) โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ นำผลการทดสอบ Sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 (GenBank accession number U00096) (62) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.1.3

4.8.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีน *gyrA* และ *parC* ที่มีการกลายพันธุ์กับระดับการดื้อยา Quinolones

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งและจำนวนของโคดอนที่พบการกลายพันธุ์บนยีน *gyrA* และยีน *parC* กับระดับการดื้อยา Quinolones ที่ทำการทดสอบด้วย E-test® ด้วย

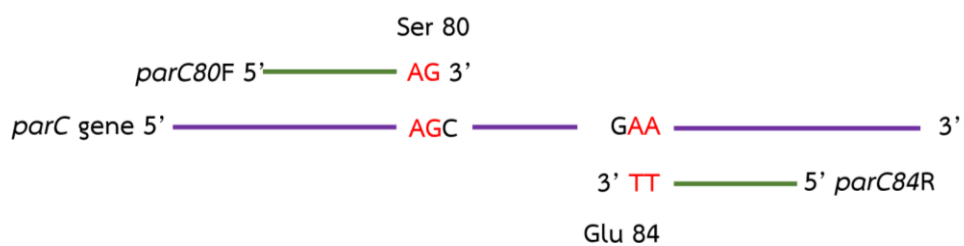
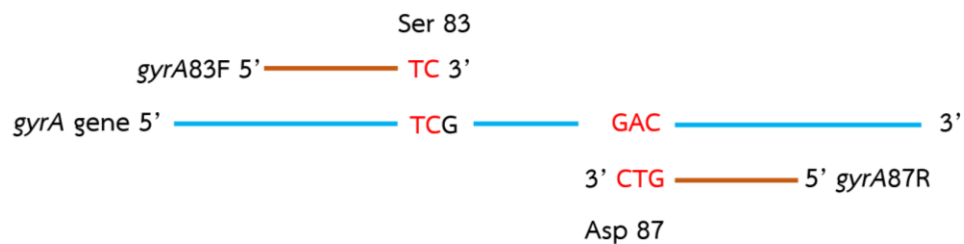
Fisher's exact test (IBM SPSS 18.0 statistical package; บริษัท IBM จำกัด สหรัฐอเมริกา) โดยพิจารณาว่าความน่าจะเป็น (P-value) ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

4.9 การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase chain reaction

(MAS-PCR) เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC*

4.9.1 การออกแบบ Allele specific primer

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งอัลลีลที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* โดยออกแบบให้ไพรเมอร์มีปลายด้าน 3' เป็นคู่สมจำเพาะกับเบสที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* และเพื่อให้ขนาดผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นมีขนาดที่ต่างกันอย่างชัดเจน จึงออกแบบให้ Forward primer เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 80 ในยีน *gyrA* และ *parC* ตามลำดับ ขณะที่ Reverse primer จำเพาะกับโคดอนที่ 87 และ 84 ในยีน *gyrA* และ *parC* ตามลำดับ ดังที่แสดงตำแหน่งและทิศทางของ Allele specific primer ในรูปที่ 3.1 โดยใช้ลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 (62) เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ดังกล่าว ตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของ Allele specific primer ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยมีรายละเอียดของ Allele specific primer แสดงในตารางที่ 3.2



รูปที่ 3. 1 ตำแหน่งและทิศทางของ Allele specific primer ของยีน *gyrA* และยีน *parC*

หมายเหตุ Ser คือกรดอะมิโน Serine Asp คือกรดอะมิโน Aspartate Glu คือกรดอะมิโน

Glutamate

ตารางที่ 3. 2 รายละเอียดของ Allele specific primer ที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของ Allele specific Primer	ขนาดของผลผลิต MAS-PCR (คู่เบส)	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ Tm (องศาเซลเซียส)
<i>gyrA</i> 83F	5'-TACCATCCCCATGGTGACTC-3'	443	229-671	62
<i>gyrA</i> 87R	5'-GCCATGCGGACGATCGTGTC-3'	256	24-279	64
<i>parC</i> 80F	5'-AATACCATCCGCACGGCGATAG-3'	272	238-509	68
<i>parC</i> 84R	5'-CGCCATCAGGACCATCGCTT-3'	176	115-290	64

4.9.2 การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

เพื่อเป็นการหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมและจำนวนรอบ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในขั้นตอน 4.5 ของเชื้อ 3 สายพันธุ์ ถูกใช้เป็นตัวแทนของการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมดังกล่าวทั้งหมด เชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 3 สายพันธุ์ประกอบไปด้วย เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* จำนวน 1 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียว จำนวน 1 สายพันธุ์

4.9.2.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 3 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ ในขั้นตอน Annealing โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *gyrA* (ตารางที่ 3.2) ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครโมล ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 200 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที อุณหภูมิ 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกอุณหภูมิที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.9.2.2 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

ของยีน *gyrA*

ในขั้นตอนนี้ได้เพิ่มเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนอีก 1 สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยปริมาณของไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *gyrA* (ตารางที่ 3.2) ที่มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 ไมโครโมล ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 200 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.2.1 ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.9.2.3 การหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา

MAS-PCR ของ ยีน *gyrA*

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยปริมาณของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยา ประกอบด้วย แมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 มิลลิโมล Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *gyrA* (ตารางที่ 3.2) ที่มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ ตามขั้นตอน 4.9.2.2 ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 200 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.2.1 ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.9.2.4 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยจำนวนรอบต่างๆ ของการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็น ดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *gyrA* (ตารางที่ 3.2) ที่มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ ตามขั้นตอน 4.9.2.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นตามขั้นตอน 4.9.2.3 ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ไดออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 200 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอด ควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.2.1 แต่จะใช้ จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังนี้ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มี ส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสง อัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกจำนวนรอบของการทำ ปฏิกิริยาที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของ ดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.9.3 การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC*

เพื่อเป็นการหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมและจำนวนรอบ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในขั้นตอน 4.5 ของเชื้อ 4 สายพันธุ์ ถูกใช้เป็นตัวแทนของการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมดังกล่าวทั้งหมด เชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ประกอบไปด้วย เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* จำนวน 2 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* เพียงตำแหน่งเดียวจำนวน 1 สายพันธุ์

4.9.3.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา MAS-PCR ในยีน *parC*

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิต่างๆ ในขั้นตอน Annealing โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *parC* (ตารางที่ 3.2) ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครโมล ดีออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 400 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกอุณหภูมิที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.9.3.2 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

ของยีน *parC*

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยปริมาณของไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *parC* (ตารางที่ 3.2) ที่มีความเข้มข้นของ Primer ต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 ไมโครโมล ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ดิโออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 400 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.3.1 ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น

2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.9.3.3 การหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา

MAS-PCR ของยีน *parC*

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยปริมาณของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย แมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 มิลลิโมล Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *parC* (ตารางที่ 3.2) ที่มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ ตามขั้นตอน 4.9.3.2 ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม คีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 400 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.3.1 ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบ

ดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.9.3.4 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน

parC

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยจำนวนรอบต่างๆ ของการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *parC* (ตารางที่ 3.2) ที่มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ ตามขั้นตอน 4.9.3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นตามขั้นตอน 4.9.3.3 ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 400 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.3.1 แต่จะใช้จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังนี้ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เลือกจำนวนรอบของการทำ

ปฏิกิริยาที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องอย่างชัดเจนที่สุดและไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.10 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค

MAS-PCR

4.10.1 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค

MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 111 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *gyrA* (ตารางที่ 3.2) และแมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นตามขั้นตอน 4.9.2 คือออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นหลอดควบคุมบวกและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.2 ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

4.10.2 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค

MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 111 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.5 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* (ตารางที่ 3.1) Allele specific primer ของยีน *parC* (ตารางที่ 3.2) และแมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นตามขั้นตอน 4.9.3 ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 400 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นหลอดควบคุมบวกและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน 4.9.3 ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

4.11 การหาความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจ

พบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC*

ทดสอบหาความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* (Limit of detection) โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามขั้นตอน 4.5 ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่ผ่านการวิเคราะห์

ด้วยเทคนิค Sequencing แล้วไม่พบการกลายพันธุ์ที่ยีน *gyrA* และยีน *parC* จำนวน 2 สายพันธุ์ นำดีเอ็นเอที่สกัดมาปรับความเข้มข้นและเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นลำดับ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 นาโนกรัม จากนั้นนำดีเอ็นเอในแต่ละระดับความเจือจางไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน 4.9.2 สำหรับยีน *gyrA* และขั้นตอน 4.9.3 สำหรับยีน *parC* โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้น อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ความเข้มข้นดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* คือความเข้มข้นสุดท้ายที่ยังสามารถสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอทุกแถบได้อย่างชัดเจน

4.12 การทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค MAS-PCR

ทดสอบหาปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing แล้วไม่พบการกลายพันธุ์ที่ยีน *gyrA* และยีน *parC* จำนวน 2 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งเท่ากับเชื้อ

ที่มีปริมาณ $1-2 \times 10^8$ colony forming unit ต่อมิลลิลิตร นำสารละลายเชื้อต้นดังกล่าวมาเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่าจนได้ระดับความเจือจางของเชื้อเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 (109) จุดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรจากหลอดสารละลายเชื้อในแต่ละระดับความเจือจางมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar ใช้แท่งแก้วเกลี่ย (Spreader) เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำซ้ำสองครั้งในแต่ละระดับความเจือจาง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีของเชื้อที่มีจำนวนอยู่ระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนี นำค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีในแต่ละระดับความเจือจางไปคำนวณจำนวนเชื้อที่นับได้โดยมีหน่วยเป็น colony forming unit ต่อมิลลิลิตร ตามสูตรที่แสดงต่อไปนี้

จำนวนของเชื้อ (colony forming unit ต่อมิลลิลิตร) = ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อ \times 100 \times ระดับความเจือจาง

จุดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรจากหลอดสารละลายเชื้อในแต่ละระดับความเจือจางมาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอน 4.5 นำดีเอ็นเอที่สกัดจากแต่ละระดับความเจือจางไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน 4.9.2 สำหรับยีน *gyrA* และขั้นตอน 4.9.3 สำหรับยีน *parC* โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ปริมาณของเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ได้ จะมีค่า

เท่ากับจำนวนของเชื้อ (colony forming unit ต่อมิลลิลิตร) ณ ระดับความเจือจางของเชื้อน้อยที่สุดที่สามารถสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอทุกแถบได้อย่างชัดเจน

4.13 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค MAS-PCR

ทดสอบหาความจำเพาะของเทคนิค MAS-PCR กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis* (110) เพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดตั้งกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอน 4.5 นำดีเอ็นเอที่สกัดจากไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน 4.9.2 สำหรับยีน *gyrA* และขั้นตอน 4.9.3 สำหรับยีน *parC* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นหลอดควบคุมบวกและใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้น อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

4.14 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value; PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value; NPV) ของเทคนิค MAS-PCR

นำผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 111 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค MAS-PCR มาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วย E-test® เพื่อคำนวณหาค่าความไว (หมายถึงโอกาสที่ผลบวกด้วยวิธีมาตรฐานจะได้รับผลการทดสอบว่าเป็นบวกด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา) ค่าความจำเพาะ (หมายถึงโอกาสที่ผลลบด้วยวิธีมาตรฐานจะได้รับผลการทดสอบว่าเป็นลบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา) ค่าทำนายผลบวก (หมายถึงโอกาสที่การทดสอบที่ให้ผลบวกจากวิธีที่พัฒนาขึ้นมาจะมีการกลายพันธุ์ของเชื้อจริง) และค่าทำนายผลลบ (หมายถึงโอกาสที่การทดสอบที่ให้ผลลบจากวิธีที่พัฒนาขึ้นมาจะไม่มีการกลายพันธุ์ของเชื้อจริง) โดยความสัมพันธ์ระหว่างผลของการทดสอบด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาเปรียบเทียบกับผลของการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานเป็นไปตามที่แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3. 3 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ
ผลทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน (111)

	ผลทดสอบเป็นบวก ด้วยวิธีมาตรฐาน	ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธี มาตรฐาน
ผลทดสอบเป็นบวกด้วยวิธีที่ พัฒนาขึ้น	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธีที่ พัฒนาขึ้น	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ที่
พัฒนาขึ้นมา สามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้ (111)

$$\text{ความไว} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{ความจำเพาะ} = \frac{d}{b+d}$$

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

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

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. เชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์แยกได้จากสิ่งส่งตรวจประเภทต่างๆ ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลรามาริบัติ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบเชื้อ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจมากที่สุดจำนวน 96 สายพันธุ์ (86.49 เปอร์เซ็นต์) เชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ผ่านการทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และ ยา Levofloxacin ด้วยวิธี Disk diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute ปี 2013 (103) สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา Ciprofloxacin และ Levofloxacin จำนวน 19 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin จำนวน 92 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4. 1 ประเภทของสิ่งส่งตรวจที่สามารถเพาะแยกเชื้อ *E. coli* จำนวน 111 สายพันธุ์ที่ใช้
ในการศึกษา

ประเภทของสิ่งส่งตรวจ	จำนวนสายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์
ปัสสาวะ	96	86.49
เลือด	6	5.41
แผล, ฝี, หนอง (Pus, wound)	2	1.80
น้ำดี (Bile)	3	2.70
น้ำเจาะจากส่วนต่างๆของร่างกาย (Abdominal fluid, pelvic cavity)	2	1.80
กระดูกก้นกบ (Coccyx)	1	0.90
ขาหนีบ (Groin)	1	0.90
รวม	111	100

2. ค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี
E-test®

เชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์ ถูกนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้าน
จุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี E-test® โดยมีเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์
มาตรฐาน ATCC 25922 ถูกใช้เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบ และแปลผลตามค่าที่อ้างอิง
ใน Clinical Laboratory Standard Institute ปี ค.ศ. 2013 (103) ดังนั้น ค่าความเข้มข้นของยา
Ciprofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่ในช่วง $\leq 1, 2, \geq 4$ ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร แปลผลได้เท่ากับไวต่อยา (Susceptible) ตี้อปานกลางต่อยา (Intermediate) และตี้อต่อยา (Resistant) ตามลำดับ ขณะที่ค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่ในช่วง $\leq 2, 4, \geq 8$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แปลผลได้เท่ากับไวต่อยา ตี้อปานกลางต่อยา และตี้อต่อยา ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 16 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin เชื้อ *E. coli* จำนวน 3 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ตี้อปานกลางต่อยา Ciprofloxacin และไวต่อยา Levofloxacin เชื้อ *E. coli* จำนวน 76 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ตี้อต่อยา Ciprofloxacin และ ยา Levofloxacin ขณะที่เชื้อ *E. coli* จำนวน 16 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ตี้อต่อยา Ciprofloxacin และตี้อปานกลางต่อยา Levofloxacin ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4.2



ตารางที่ 4. 2 ผลความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ของเชื้อ เชื้อ *E. coli*

จำนวน 111 สายพันธุ์ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion เปรียบเทียบกับวิธี E-test®

เชื้อ <i>E. coli</i> (จำนวน 111 สายพันธุ์)	ผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disk diffusion		ผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี E-test®	
	ยา Ciprofloxacin	ยา Levofloxacin	ยา Ciprofloxacin	ยา Levofloxacin
16	S	S	S	S
3	S	S	I	S
76	R	R	R	R
16	R	R	R	I

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 มีค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin และ ยา Levofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.008 และ 0.032 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ทั้งคู่ ขณะเดียวกันเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทางคลินิก จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์มีค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 0.004 ถึง มากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับยา Ciprofloxacin และช่วงระหว่าง 0.06 ถึง มากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับยา Levofloxacin ดังที่แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4. 3 ค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin และ Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* จำนวน 111 สายพันธุ์

เชื้อ <i>E. coli</i> จำนวน 111 สายพันธุ์	ค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)										
	≤1	1.5	2	3	4	6	8	12	16	24	≥32
จำนวนเชื้อที่ให้ผลการ ทดสอบกับยา Ciprofloxacin	16 ¹		3		1	1	1	4	1	1	83
จำนวนเชื้อที่ให้ผลการ ทดสอบกับยา Levofloxacin	17 ²		2	3	3	10	18	13	9	2	34

¹ หมายถึง เชื้อจำนวน 1, 2, 7, 1, 1, 1, 3 สายพันธุ์มีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของยา Ciprofloxacin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.004, 0.008, 0.016, 0.03, 0.06, 0.25, 1 ตามลำดับ

² หมายถึง มีเชื้อจำนวน 9, 1, 4, 3 สายพันธุ์ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของยา Levofloxacin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.06, 0.12, 0.25, 0.5 ตามลำดับ

3. การสกัดดีเอ็นเอ

เชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Tris-Ethylenediaminetetraacetic buffer และวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วงระหว่าง

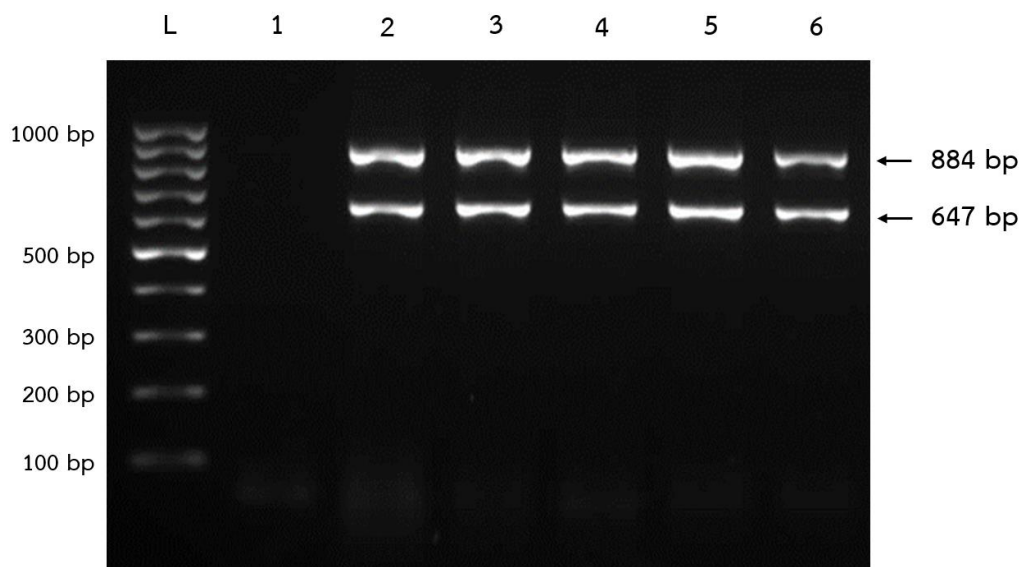
321.2 ถึง 1,871.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 1,215.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ในช่วงระหว่าง 1.69 ถึง 2.09 ซึ่งวัดจากอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 ดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดมีปริมาณและความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการทดสอบขั้นตอนถัดไป

4. การเพิ่มปริมาณยีน *gyrA* และ *parC* ด้วยเทคนิค PCR

เชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยเทคนิค PCR โดยมียีน *uspA* เป็นยีนควบคุมภายในหลอดทดลอง และมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ร่วมกับไพรเมอร์และปฏิกิริยา PCR ตามที่อธิบายในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ภายหลังจากปฏิกิริยา PCR และการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอของยีน *gyrA* มีขนาดเท่ากับ 647 คู่เบส ปรากฏอยู่คู่กับแถบดีเอ็นเอของยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอของยีน *parC* มีขนาดเท่ากับ 395 คู่เบส ปรากฏอยู่คู่กับแถบดีเอ็นเอของยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

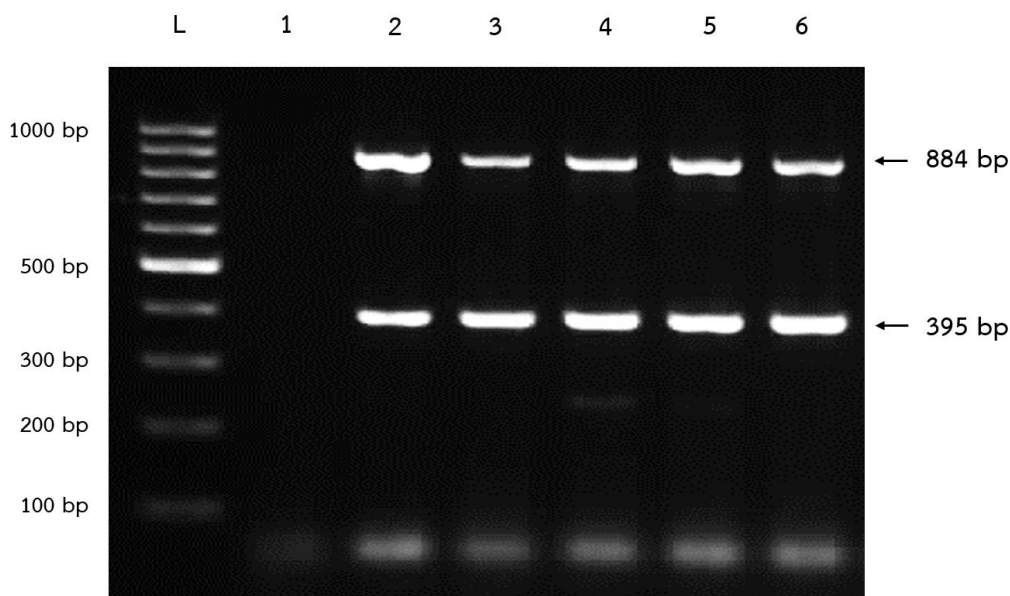
วัดปริมาณผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าปริมาณของผลผลิต PCR ของยีน *gyrA* อยู่ในช่วงระหว่าง 114.97 ถึง 604.72 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 320.02 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วงระหว่าง 1.31 ถึง 1.78 ขณะที่ปริมาณของผลผลิต PCR ของยีน *parC* อยู่ในช่วงระหว่าง 486.82 ถึง

1,684.07 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 905.14 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วงระหว่าง 1.75 ถึง 1.86



รูปที่ 4. 1 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *gyrA* และยีน *uspA* ของเชื้อ *E. coli*

ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือตัวควบคุมลบ แถวที่ 2 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 3 ถึง 6 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก



รูปที่ 4. 2 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *parC* และยีน *uspA* ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือตัวควบคุมลบ แถวที่ 2 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 3 ถึง 6 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทางคลินิก

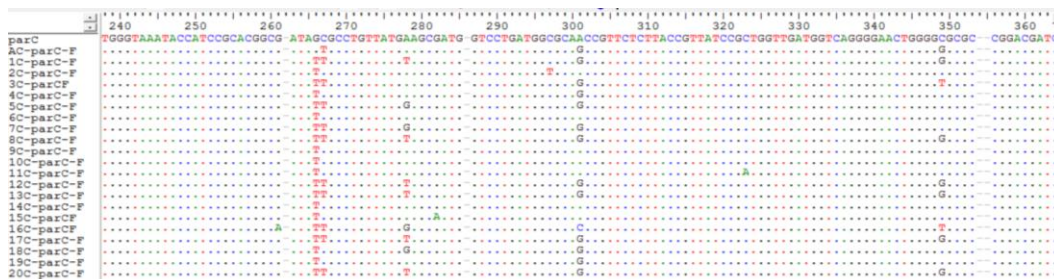
5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *gyrA* และ *parC* ด้วยเทคนิค Sequencing

ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *gyrA* และยีน *parC* ถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sequencing ซึ่งใช้วิธีของ Sanger โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ ผลจากเทคนิค Sequencing ถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 (62) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.1.3 รูปที่ 4.3 และ 4.4 ผลการวิเคราะห์พบการกลายพันธุ์หนึ่งตำแหน่งที่ส่งผลให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโน (Amino acid substitution) ของยีน *gyrA* และยีน *parC* รวมทั้งหมด 8 รูปแบบในเชื้อ *E. coli* จำนวน 99 สายพันธุ์จากจำนวน

ทั้งหมด 111 สายพันธุ์หรือคิดเป็น 89.19 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ได้แก่ Serine83-Leucine (TCG เป็น TTG) Aspartate87-Asparagine (GAC เป็น AAC) และ Aspartate87-Tyrosine (GAC เป็น TAC) และการกลายพันธุ์ของยีน *parC* ได้แก่ Serine80-Isoleucine (AGC เป็น ATC หรือ ATT) Glutamate84-Valine (GAA เป็น GTA) Glutamate84-Glycine (GAA เป็น GGA) Alanine90-Valine (GCG เป็น GTG) และ Alanine108-Threonine (GCC เป็น ACG) อย่างไรก็ตามไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ในเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อ *E. coli* จำนวน 12 สายพันธุ์ซึ่งคิดเป็น 10.81 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)



รูปที่ 4. 3 ตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทางคลินิกกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 (GenBank accession number U00096) ด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.1.3



รูปที่ 4. 4 ตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทางคลินิกกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 (GenBank accession number U00096) ด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.1.3

รายละเอียดของการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนต่างๆ ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงในตารางที่ 4.4 การกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดของยีน *gyrA* คือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Serine (Ser) เป็น Leucine (Leu) จำนวนทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์ (89.19 เปอร์เซ็นต์) การกลายพันธุ์ที่พบมากเป็นอันดับสองคือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 87 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Aspartate (Asp) เป็น Asparagine (Asn) จำนวนทั้งสิ้น 88 สายพันธุ์ (79.28 เปอร์เซ็นต์) การกลายพันธุ์ที่พบมากเป็นอันดับสามคือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 87 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Aspartate เป็น Tyrosine (Tyr) จำนวนทั้งสิ้น 4 สายพันธุ์ (3.60 เปอร์เซ็นต์)

รายละเอียดของการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนต่างๆ ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงในตารางที่ 4.4 การกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Serine เป็น Isoleucine (Ile) จำนวนทั้งสิ้น 92 สายพันธุ์ (82.88 เปอร์เซ็นต์) การกลายพันธุ์ที่พบมากเป็นอันดับสองคือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Glutamate (Glu) เป็น

Valine (Val) จำนวนทั้งสิ้น 35 สายพันธุ์ (31.53 เปอร์เซ็นต์) การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยมากเป็นอันดับสาม คือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Glutamate เป็น Glycine (Gly) จำนวนทั้งสิ้น 10 สายพันธุ์ (9.01 เปอร์เซ็นต์) การกลายพันธุ์อื่นๆ ที่พบบนยีน *parC* ได้แก่ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 90 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Alanine (Ala) เป็น Valine จำนวนทั้งสิ้น 1 สายพันธุ์ (0.90 เปอร์เซ็นต์) และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 108 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Alanine เป็น Threonine (Thr) จำนวนทั้งสิ้น 1 สายพันธุ์ (0.90 เปอร์เซ็นต์)



ตารางที่ 4. 4 รูปแบบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนของยีน *gyrA* และยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน						เชื้อ <i>E. coli</i>
						(จำนวน 111 สายพันธุ์)
ยีน <i>gyrA</i>		ยีน <i>parC</i>				
Ser83	Asp87	Ser80	Glu84	Ala90	Ala108	
						12
Lue						7
Lue	Asn	Ile				44
Lue	Asn	Ile		Val		1
Lue	Asn	Ile			Thr	1
Lue	Tyr	Ile				1
Lue	Asn	Ile	Gly			7
Lue	Asn	Ile	Val			35
Lue	Tyr	Ile	Gly			3

จากตารางที่ 4.4 เชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์บน Quinolones resistance determining regions จำนวนทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์ (89.19 เปอร์เซ็นต์) มีความหลากหลายของจำนวนตำแหน่งที่กลายบนยีน *gyrA* และยีน *parC* ซึ่งสามารถจำแนกได้ดังนี้ เชื้อ *E. coli* จำนวน 7 สายพันธุ์

(6.31 เปอร์เซ็นต์) มีการกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่งโดยเกิดที่ยีน *gyrA* ได้แก่ ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine)

เชื้อ *E. coli* จำนวน 45 สายพันธุ์ (40.54 เปอร์เซ็นต์) มีการกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งโดยเกิดที่ยีน *gyrA* 2 ตำแหน่งและที่ยีน *parC* 1 ตำแหน่ง โดยเชื้อ 44 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine) และตำแหน่งโคดอน 87 (Aspartate87-Asparagine) ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 (Serine80-Isoleucine) ของยีน *parC* และเชื้อ 1 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine) และตำแหน่งโคดอน 87 (Aspartate87-Tyrosine) ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 (Serine80-Isoleucine) ของยีน *parC*

เชื้อ *E. coli* จำนวน 47 สายพันธุ์ (42.34 เปอร์เซ็นต์) มีการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งโดยเกิดที่ยีน *gyrA* 2 ตำแหน่งและที่ยีน *parC* 2 ตำแหน่ง โดยเชื้อ 7 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine) และตำแหน่งโคดอน 87 (Aspartate87-Asparagine) ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 (Serine80-Isoleucine) และตำแหน่งโคดอน 84 (Glutamate84-Glycine) ของยีน *parC* เชื้อ 35 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine) และตำแหน่งโคดอน 87 (Aspartate87-Asparagine) ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 (Serine80-Isoleucine) และตำแหน่งโคดอน 84 (Glutamate84-Valine) ของยีน *parC* เชื้อ 3 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine) และตำแหน่งโคดอน 87 (Aspartate87-Tyrosine) ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 (Serine80-Isoleucine) และตำแหน่งโคดอน 84 (Glutamate84-Glycine) ของยีน *parC* เชื้อ 1 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine) และตำแหน่งโคดอน 87 (Aspartate87-Asparagine) ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 (Serine80-Isoleucine) และตำแหน่งโคดอน 90 (Alanine90-Valine) ของยีน

parC เชื้อ 1 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 (Serine83-Leucine) และตำแหน่งโคดอน 87 (Aspartate87-Asparagine) ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 (Serine80-Isoleucine) และตำแหน่งโคดอน 108 (Alanine108-Threonine) ของยีน *parC* พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* มีจำนวนตำแหน่งที่การกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง อย่างมีนัยสำคัญที่ความน่าจะเป็นทางสถิติที่ระดับเท่ากับ 0.000 ขณะที่เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 3 และ 4 ตำแหน่งมีจำนวนไม่แตกต่างกันที่ความน่าจะเป็นทางสถิติที่ระดับเท่ากับ 0.572

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม Quinolones จำนวนทั้งหมด 92 จาก 111 สายพันธุ์ (82.88 เปอร์เซ็นต์) มีการกลายพันธุ์อย่างน้อย 3 ตำแหน่งโดยเกิดที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* โดยมีรูปแบบของการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว 2 รูปแบบ ได้แก่ แบบที่ 1 การกลายพันธุ์ของ Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Asparagine และ Serine80-Isoleucine ซึ่งพบในเชื้อจำนวน 88 สายพันธุ์ (79.28 เปอร์เซ็นต์) แบบที่ 2 การกลายพันธุ์ของ Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Tyrosine และ Serine80-Isoleucine ซึ่งพบในเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ (3.60 เปอร์เซ็นต์)

6. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตำแหน่งที่กลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* กับการดื้อยา Quinolones

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตำแหน่งที่กลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ต่อการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์บนยีนทั้งสองดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์ (89.19 เปอร์เซ็นต์) จากจำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์ ซึ่งมีรายละเอียดดังที่แสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ พบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง มี

จำนวน 6 สายพันธุ์ที่ไวต่อยา Ciprofloxacin และจำนวน 1 สายพันธุ์ที่ดื้อปานกลางต่อยา Ciprofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อเท่ากับ 0.008 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง 7 สายพันธุ์ดังกล่าวไวต่อยา Levofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 0.06 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งพบว่ามีจำนวน 45 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 4 ถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่จำนวน 10 สายพันธุ์ที่ดื้อปานกลางต่อยา Levofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 3 ถึง 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจำนวน 35 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Levofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 8 ถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 32

เชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งพบว่ามีจำนวน 47 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 6 ถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่ดื้อปานกลางต่อยา Levofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 3 ถึง 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจำนวน 41 สายพันธุ์ที่ ดื้อต่อยา Levofloxacin โดยมีค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 8 ถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 32

พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ 3 และ 4 ตำแหน่งมีความสัมพันธ์กับระดับการดื้อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin อย่างมีนัยสำคัญที่ความน่าจะเป็นทางสถิติที่ระดับเท่ากับ 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับการดื้อยาโดยเฉลี่ยของยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ระหว่างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 3 หรือ 4 ตำแหน่งอย่างมีนัยสำคัญที่ความน่าจะเป็นทางสถิติที่ระดับเท่ากับ 0.988 และ 0.988 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับในเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์หรือมีการกลายพันธุ์เพียง 1 ตำแหน่งไม่มีความแตกต่างของระดับการดื้อยาโดยเฉลี่ยของยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความน่าจะเป็นทางสถิติที่ 1.000 และ 0.999 ตามลำดับ

เชื้อ *E. coli* จำนวน 92 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์อย่างน้อย 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอนที่ 80 ของยีน *parC* โดยพบรูปแบบการกลายพันธุ์ 2 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 การกลายพันธุ์ของ Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Asparagine และ Serine80-Isoleucine แบบที่ 2 การกลายพันธุ์ของ Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Tyrosine และ Serine80-Isoleucine พบว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 83 จาก 92 สายพันธุ์เหล่านี้มีค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่เชื้อ *E. coli* จำนวน 34 จาก 92 สายพันธุ์มีค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4. 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโคดอนที่เกิดการกลายพันธุ์กับค่าความเข้มข้น
น้อยที่สุดของยา Ciprofloxacin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ

การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน		เชื้อ <i>E. coli</i> (จำนวน 111 สายพันธุ์)		ค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ												
<i>gyrA</i>		<i>parC</i>				≤1	1.5	2	3	4	6	8	12	16	24	≥
Ser83	Asp87	Ser80	Glu84	Ala90	Ala108											
						12	10 ¹	2								
Lue						7	6 ²	1								
Lue	Asn	Ile				44			1	1	2	1				39
Lue	Asn	Ile		Val		1										1
Lue	Asn	Ile		Thr		1				1						
Lue	Tyr	Ile				1										1
Lue	Asn	Ile	Gly			7							1			6
Lue	Asn	Ile	Val			35							1			34
Lue	Tyr	Ile	Gly			3									1	2

¹ หมายถึง เชื้อจำนวน 1, 1, 4, 1, 1, 1, 1 สายพันธุ์มีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของยา Ciprofloxacin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.004, 0.008, 0.016, 0.03, 0.06, 0.25, 1 ตามลำดับ

² หมายถึง เชื้อจำนวน 1, 3, 2 สายพันธุ์มีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของยา Ciprofloxacin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.008, 0.016, 1 ตามลำดับ

7. การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR)

เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC*

7.1 การออกแบบ Allele specific primer

Allele specific primer ที่ถูกออกแบบขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 (62) เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ดังกล่าว โดยให้ไพรเมอร์มีปลายด้าน 3' ที่จำเพาะกับเบสคู่สมที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอนที่ 80 และ 84 ของยีน *parC* เพื่อใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอนดังกล่าวของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์ โดยมีไพรเมอร์ *gyrA83F* ทำหน้าที่เป็น Forward primer และไพรเมอร์ *gyrA87R* ทำหน้าที่เป็น Reverse primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ตามลำดับ ดังแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ในรูปที่ 4.5 ขณะที่ไพรเมอร์ *parC80F* ทำหน้าที่เป็น Forward primer และไพรเมอร์ *parC84R* ทำหน้าที่เป็น Reverse primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่ 80 และ 84 ของยีน *parC* ตามลำดับ ดังแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ในรูปที่ 4.6 ไพรเมอร์ทั้งหมดมีความจำเพาะกับเชื้อ *E. coli* ที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา MAS-PCR แต่จะไม่สามารถพบแถบดีเอ็นเอได้หากเชื้อมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนั้นๆ

Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome

GenBank: U00096.3

LOCUS U00096 2628 bp DNA linear BCT 01-AUG-2014

DEFINITION *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655, complete genome.

ACCESSION [U00096](#) REGION: 2336793..2339420

VERSION U00096.3 GI:545778205

DBLINK BioProject: [PRJNA225](#)

BioSample: [SAMN02604091](#)

KEYWORDS .

SOURCE *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655

ORGANISM [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2628)

AUTHORS Blattner,F.R., Plunkett,G. III, Bloch,C.A., Perna,N.T., Burland,V.,
Riley,M., Collado-Vides,J., Glasner,J.D., Rode,C.K., Mayhew,G.F.,
Gregor,J., Davis,N.W., Kirkpatrick,H.A., Goeden,M.A., Rose,D.J.,
Mau,B. and Shao,Y.

TITLE The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12

JOURNAL Science 277 (5331), 1453-1462 (1997)

PUBMED [9278503](#)

ORIGIN

1 ATGAGCGACC TTGCGAGAGA AATTACACCG GTCAACATTG AGGAAGAGCT GAAGAGCTCC
61 TATCTGGATT ATGCGATGTC GGTCAATTGTT GGCCGTGCGC TGCCAGATGT CCGAGATGGC
121 CTGAAGCCGG TACACCGTCG CGTACTTTAC GCCATGAACG TACTAGGCAA TGACTGGAAC
181 AAAGCCTATA AAAAATCTGC CCGTGTCTGTT GGTGACGTAA TCGGTAATA ^{gyr.4 83F} CCAATCCCAT
241 GGTGACTCGG CCGTCTATGA CACGATCGTC ^{gyr.4 87R} CGCATGGCGC AGCCATTCTC GCTGCGTTAT
301 ATGCTGGTAG ACGGTCAGGG TAACTTCGGT TCTATCGACG GCGACTCTGC GGCGCAATG
361 CGTTATACGG AAATCCGTCT GGCGAAAATT GCCCATGAAC TGATGGCCGA TCTCGAAAAA
421 GAGACGGTCG ATTTTCGTTGA TAACTATGAC GGCACGGA AAATCCGGA CGTCATGCCA
481 ACCAAAATTC CTAACCTGCT GGTGAACGGT TCTTCCGGTA TCGCCGTAGG TATGGCAACC
541 AACATCCCGC CGCACAACCT GACGGAAGTC ATCAACGGTT GTCTGGCGTA TATTGATGAT
601 GAAGACATCA GCATTGAAGG GCTGATGGAA CACATCCCGG GGCCGGACTT CCCGACGGCG
661 GCAATCATTG ACGGTCGTCG CCGTATTGAA GAAGCTTACC GTACCGGTCG CGGCAAGGTG
721 TATATCCGCG CTCGCGCAGA AGTGGAAAGTT GACGCCAAAA CCGGTCGTGA AACCATTATC
781 GTCCACGAAA TTCCGTATCA GGTAAACAAA GCGCGCCTGA TCGAGAAGAT TGCGGAACTG
841 GTAAAAGAAA AACCGGTGGA AGGCATCAGC GCGCTGCGTG ACGAGTCTGA CAAAGACGGT
901 ATGCGCATCG TGATTGAAGT GAAACCGCAT GCGGTCGGTG AAGTTGTGCT CAACAACCTC
961 TACTCCCAGA CCCAGTTGCA GGTTCCTTTC GGTATCAACA TGGTGGCATT GCACCATGGT
1021 CAGCCGAAGA TCATGAACCT GAAAGACATC ATCGCGGCGT TTGTTCGTCA CCGCCGTGAA
1081 GTGGTGACCC GTCGTAATAT TTTCGAACTG CGTAAAGCTC GCGATCGTGC TCATATCCTT
1141 GAAGCATTAG CCGTGGCGCT GGCGAACATC GACCCGATCA TCGAATGAT CCGTCATGCG
1201 CCGACGCCTG CAGAAGCGAA AACTGCGCTG GTTGCTAATC CGTGGCAGCT GGGCAACGTT
1261 GCCGCGATGC TCGAACGTGC TGGCGACGAT GCTGCGCGTC CGGAATGGCT GGAGCCAGAG
1321 TTCGCGTGC GTGATGGTCT GACTACCTG ACCGAACAGC AAGCTCAGGC GATTCTGGAT
1381 CTGCGTTTGC AGAAACTGAC CCGTCTTGAG CACGAAAAAC TGCTCGACGA ATACAAAGAG
1441 CTGCTGGATC AGATCGCGGA ACTGTTGCGT ATTCTTGGTA GCGCCGATCG TCTGATGGAA
1501 GTGATCCGTG AAGAGCTGGA GCTGGTTCGT GAACAGTTCG GTGACAAACG TCGTACTGAA
1561 ATCACCCCA ACAGCGCAGA CATCAACCTG GAAGATCTGA TCACCAGGA AGATGTGGTC
1621 GTGACGCTCT CTCACCAGG CTACGTTAAG TATCAGCCGC TTTCTGAATA CGAAGCGCAG
1681 CGTCGTGGCG GGAAAGGTAA ATCTGCCGCA CGTATTAAG AAGAAGACTT TATCGACCGA
1741 CTGCTGGTGG CGAACACTCA CGACCATATT CTGTGCTTCT CCAGCCGTGG TCGCGTCTAT

```

1801   TCGATGAAAG TTTATCAGTT GCCGGAAGCC ACTCGTGGCG CGCGCGGTCG TCCGATCGTC
1861   AACCTGCTGC CGCTGGAGCA GGACGAACGT ATCACTGCGA TCCTGCCAGT GACCGAGTTT
1921   GAAGAAGGCG TGAAAGTCTT CATGGCGACC GCTAACGGTA CCGTGAAGAA AACTGTCCTC
1981   ACCGAGTTCA ACCGTCTGCG TACCGCCGGT AAAGTGGCGA TCAAACGGT TGACGGCGAT
2041   GAGCTGATCG GCGTTGACCT GACCAGCGGC GAAGACGAAG TAATGCTGTT CTCCGCTGAA
2101   GGTAAAGTGG TGCCTTTAA AGAGTCTTCT GTCCGTGCGA TGGGCTGCAA CACCACCGGT
2161   GTTCGCGGTA TTCGCTTAGG TGAAGGCGAT AAAGTCGTCT CTCTGATCGT GCCTCGTGGC
2221   GATGGCGCAA TCCTCACC GC AACGCAAAAC GGTACGGTA AACGTACCGC AGTGGCGGAA
2281   TACCCAACCA AGTCGCGTGC GACGAAAGGG GTTATCTCCA TCAAGGTTAC CGAACGTAAC
2341   GGTTTAGTTG TTGGCGCGGT ACAGGTAGAT GACTGCGACC AGATCATGAT GATCACCAGT
2401   GCCGGTACGC TGGTACGTAC TCGCGTTTCG GAAATCAGCA TCGTGGGCGG TAACACCCAG
2461   GCGGTGATCC TCATCCGTAC TGCGGAAGAT GAAAACGTAG TGGGCTGCA ACGTGTGCT
2521   GAACCGGTTG ACGAGGAAGA TCTGGATACC ATCGACGGCA GTGCCGCGGA AGGGGACGAT
2581   GAAATCGCTC CGGAAGTGGG CGTTGACGAC GAGCCAGAAG AAGAATAA

```

รูปที่ 4. 5 ตำแหน่งที่จำเพาะของ Allele specific primer ได้แก่ ไพรมเมอร์ *gyrA83F* และ

ไพรมเมอร์ *gyrA87R* บนยีน *gyrA* รูปดัดแปลงมาจาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>

u00096.3 (112)



Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome

GenBank: U00096.3

LOCUS U00096 2259 bp DNA linear BCT 01-AUG-2014

DEFINITION *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655, complete genome.

ACCESSION [U00096](#) REGION: 3163715..3165973

VERSION U00096.3 GI:545778205

DBLINK BioProject: [PRJNA225](#)

BioSample: [SAMN02604091](#)

KEYWORDS .

SOURCE *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655

ORGANISM [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2259)

AUTHORS Blattner,F.R., Plunkett,G. III, Bloch,C.A., Perna,N.T., Burland,V.,
Riley,M., Collado-Vides,J., Glasner,J.D., Rode,C.K., Mayhew,G.F.,
Gregor,J., Davis,N.W., Kirkpatrick,H.A., Goeden,M.A., Rose,D.J.,
Mau,B. and Shao,Y.

TITLE The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12

JOURNAL Science 277 (5331), 1453-1462 (1997)

PUBMED [9278503](#)

ORIGIN

```

1      AAGTTGAGGA ATCAGAATTA ATGAGCGATA TGGCAGAGCG CCTTGCGCTA CATGAATTTA
61     CGGAAAACGC CTACTTAAAC TACTCCATGT ACGTGATCAT GGACCGTGCG TTGCCGTTTA
121    TTGGTGATGG TCTGAAACCT GTTCAGCGCC GCATTGTGTA TGCGATGTCT GAACTGGGCC
181    TGAATGCCAG CGCCAAATTT AAAAAATCGG CCCGTACCGT CGGTGACGTA CTGGGTAAAATparC
241    ACCATCCGCA CGGCGATAGC GCCTGTTATG AAGCGATGGT CCTGATGGCG CAACCGTTCT
301    CTTACCGTTA TCCGCTGGTT GATGGTCAGG GGAACTTGGGG CGCGCCGGAC GATCCGAAAT
361    CGTTCGCGGC AATGCGTTAC ACCGAATCCC GGTGTGCGAA ATATTCCGAG CTGCTATTGA
421    GCGAGCTGGG GCAGGGGACG GCTGACTGGG TGCCAAACTT CGACGGCACT TTGCAGGAGC
481    CGAAAATGCT ACCTGCCCGT CTGCCAAACA TTTTGCTTAA CGGCACCACC GGTATTGCCG
541    TCGGCATGGC GACCGATATT CCACCGCATA ACCTGCGTGA AGTGGCTCAG GCGGCAATCG
601    CATTAAATCGA CCAGCCGAAA ACCACGCTCG ATCAGCTGCT GGATATCGTG CAGGGGCCGG
661    ATTATCCGAC TGAAGCGGAA ATTATCACTT CGCGCGCCGA GATCCGTAAA ATCTACGAGA
721    ACGGACGTGG TTCAGTGCGT ATGCGCGCGG TGTGGAAGAA AGAAGATGGC GCGGTGGTTA
781    TCAGCGCATT GCCGCATCAG GTTTCAGGTG CGCGCCTACT GGAGCAAATT GCTGCGCAA
841    TCGCAACAA AAAGCTGCCG ATGTTGACG ATCTGCGCGA TGAATCTGAC CACGAGAACC
901    CGACCCGCCT GGTGATTGTG CCGGTTCCA ACCGCGTGGA TATGGATCAG GTGATGAACC
961    ACCTCTTCGC TACCACCGAT CTGAAAAGA GCTATCGTAT TAACCTAAT ATGATCGGTC
1021   TGGATGGTCG TCCGGCGGTG AAAAACTGC TGGAATCCT CTCCGAATGG CTGGTGTTC
1081   GCCGCGATAC CGTGCGCCGC CACTGAACT ATCGTCTGGA GAAAGTCCTC AAGCGCCTGC
1141   ATATCCTCGA AGGTTTGTG GTGGCGTTTC TCAATATCGA CGAAGTGATT GAGATCATTC
1201   GTAATGAAGA TGAACCGAAA CCGCGCTGA TGTCGCGGTT TGGCCTACG GAAACCCAGG
1261   CGGAAGCGAT CCTCGAACTG AACTGCGTC ATCTTGCCAA ACTGGAAGAG ATGAAGATTC
1321   GCGGTGAGCA GAGTGAACTG GAAAAAGAG CCGACAGTT GCAGGGCATT TTGGCTCCG
1381   AGCGTAAAAT GAATAACCTG CTGAAGAAAG AACTGCAGGC AGACCGCAA GCCTACGGTG
1441   ACGATCGTCG TTCGCCGTTG CAGGAACCGG AAGAAGCGAA AGCGATGAGC GAGCACGACA
1501   TGCTGCCGTC TGAACCTGTC ACCATTGTGC TGTCGCAGAT GGGCTGGGTA CGCAGCGCTA
1561   AAGGCCATGA TATCGACGCG CCGGCCTGA ATTATAAAGC GGGTGATAGC TTCAAAGCGG
1621   CGGTGAAAGG TAAGAGCAAC CAACCGGTAG TGTTTGTGTA TTCCACCGGT CGTAGCTATG
1681   CCATGACCC GATTACGCTG CCGTCGGCGC GTGGTCAGGG CGAGCCGCTC ACCGGCAAAT
1741   TAACGTTGCC GCCTGGGGCG ACCGTTGACC ATATGCTGAT GGAAAGCGAC GATCAGAAAC
1801   TGCTGATGGC TTCCGATGCG GGTACGGTT TCGTCTGCAC CTTTAAAGAT CTGGTGGCGC
1861   GTAACCGTGC AGGTAAGGCT TTGATCACCT TACCGAAAA TGCCCATGTT ATGCCGCCGG
1921   TGGTGATTGA AGATGCTTCC GATATGCTGC TGGCAATCAC TCAGGCAGGC CGTATGTTGA
1981   TGTTCCCGGT AAGTGATCTG CCGCAGCTGT CGAAGGGCAA AGGCAACAAG ATTATCAACA
2041   TTCCATCGGC AGAAGCCGCG CGTGGAGAAG ATGGTCTGGC GCAATTGTAC GTTCTGCCGC
2101   CGCAAAGCAC GCTGACCATT CATGTTGGGA AACGCAAAAT TAAACTGCGC CCGGAAGAGT
2161   TACAGAAAGT CACTGGCGAA CGTGGACGCC GCGGTACGTT GATGCGCGGT TTGCAGCGTA
2221   TCGATCGTGT TGAGATCGAC TCTCCTCGCC GTGCCAGCAG CCGTGATAGC

```

รูปที่ 4. 6 ตำแหน่งที่จำเพาะของ Allele specific primer ได้แก่ ไพรมเมอร์ *parC80F* และ

ไพรมเมอร์ *parC84R* บนยีน *parC* รูปดัดแปลงมาจาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>

u00096.3 (112)

7.2 คุณสมบัติและความจำเพาะของ Allele specific primer

ลำดับเบสของ Allele specific primer ได้แก่ ไพรเมอร์ *gyrA83F* ไพรเมอร์ *gyrA87R* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ที่ออกแบบขึ้น ถูกนำไปตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) พบว่า Allele specific primer ที่ถูกออกแบบมีคุณสมบัติ ดังนี้ ไพรเมอร์ *gyrA83F* ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 230 ถึง 671 ประกอบด้วยเบสกวีนิน-ไซโตซีน 55 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature; Tm) 62 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะกับยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ *gyrA87R* ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 24 ถึง 279 ประกอบด้วยเบสกวีนิน-ไซโตซีน 65 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว 64 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะกับยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ *parC80F* ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 218 ถึง 509 ประกอบด้วยเบสกวีนิน-ไซโตซีน 54.55 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว 68 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะกับยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ *parC84R* ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 115 ถึง 270 ประกอบด้วยเบสกวีนิน-ไซโตซีน 60 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว 64 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะกับยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

7.3 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก Allele specific primer ภายหลังสิ้นสุด

ปฏิกิริยา MAS-PCR

ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก Allele specific primer ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา MAS-PCR สามารถพบได้หลายรูปแบบ ดังนี้ เชื้อสายพันธุ์ปกติที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ (Wild type) ของยีน *gyrA* จะพบแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ ได้แก่ 1. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *gyrA* มีขนาดเท่ากับ 647 คู่เบส 2. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส 3. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA83F* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 83 มีขนาดเท่ากับ 443 คู่เบส และ 4. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 87 มีขนาดเท่ากับ 256 คู่เบส ขณะที่เชื้อสายพันธุ์ปกติที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *parC* จะพบแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ ได้แก่ 1. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *parC* มีขนาดเท่ากับ 395 คู่เบส 2. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส 3. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC80F* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 80 มีขนาดเท่ากับ 272 คู่เบส และ 4. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC84R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 84 มีขนาดเท่ากับ 176 คู่เบส

เชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียว จะพบแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ 1. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *gyrA* มีขนาดเท่ากับ 647 คู่เบส 2. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส และ 3. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 87 มีขนาดเท่ากับ 256 คู่เบส โดยไม่พบแถบที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA83F* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 83 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์

เชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 87 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียว จะพบแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ 1. แถบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *gyrA* มีขนาดเท่ากับ 647

คู่เบส 2. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส และ 3. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA83F* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 83 มีขนาดเท่ากับ 443 คู่เบส โดยไม่พบแลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 87 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์

เชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ทั้ง 2 ตำแหน่ง จะพบแลบบของดีเอ็นเอทั้งหมด 2 แลบบ ได้แก่ 1. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *gyrA* มีขนาดเท่ากับ 647 คู่เบส และ 2. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส โดยไม่พบแลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ตามลำดับ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์

เชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* เพียงตำแหน่งเดียว จะพบแลบบของดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แลบบ ได้แก่ 1. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *parC* มีขนาดเท่ากับ 395 คู่เบส 2. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส และ 3. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC84R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 84 มีขนาดเท่ากับ 176 คู่เบส โดยไม่พบแลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC80F* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 80 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์

เชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* เพียงตำแหน่งเดียว จะพบแลบบของดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แลบบ ได้แก่ 1. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *parC* มีขนาดเท่ากับ 395 คู่เบส 2. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส และ 3. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC80F* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 80 มีขนาดเท่ากับ 272 คู่เบส โดยไม่พบแลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC84R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 84 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์

เชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* ทั้ง 2 ตำแหน่ง จะพบแลบบของดีเอ็นเอทั้งหมด 2 แลบบ ได้แก่ 1. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *parC* มีขนาด

เท่ากับ 395 คู่เบส 2. แลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *uspA* มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส โดยไม่พบแลบบที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ตามลำดับ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์

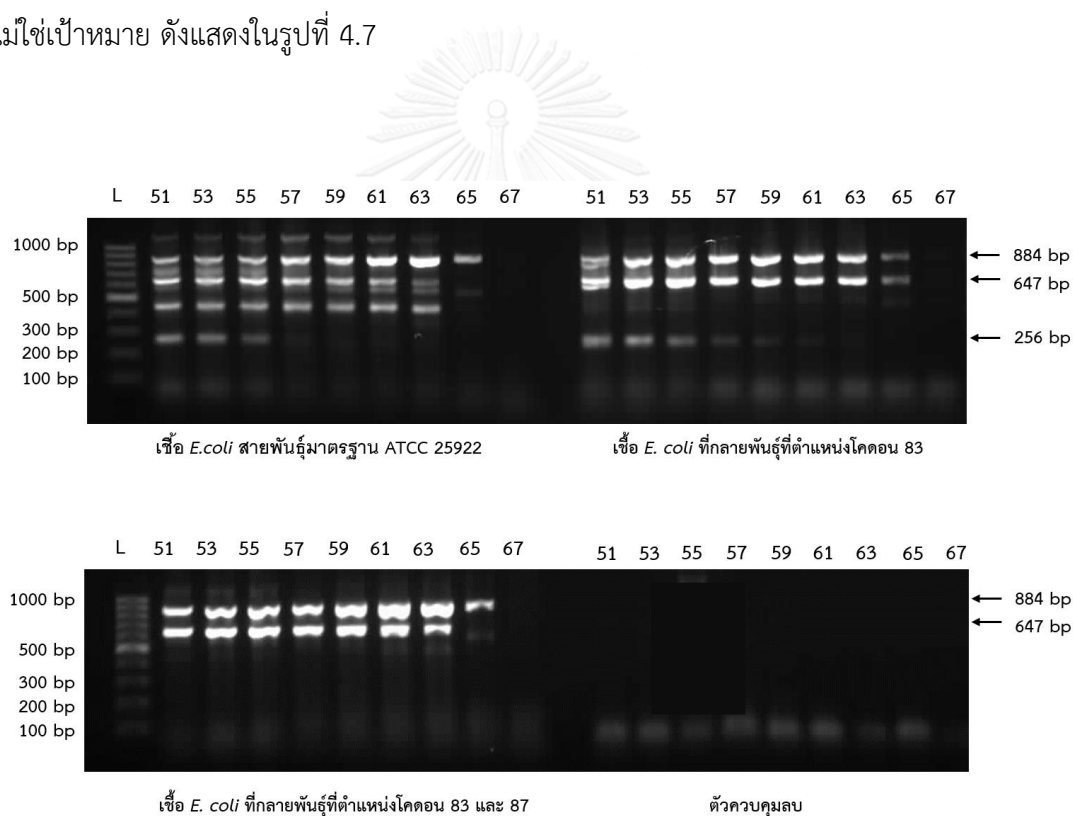
7.4 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA*

ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 3 สายพันธุ์ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR เชื้อ *E. coli* ทั้ง 3 สายพันธุ์ประกอบไปด้วย เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* จำนวน 1 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียว จำนวน 1 สายพันธุ์

7.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 3 สายพันธุ์ ร่วมกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* และไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* โดยทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* เมื่อตรวจสอบ

ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing เป็นอุณหภูมิที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* โดยที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.7



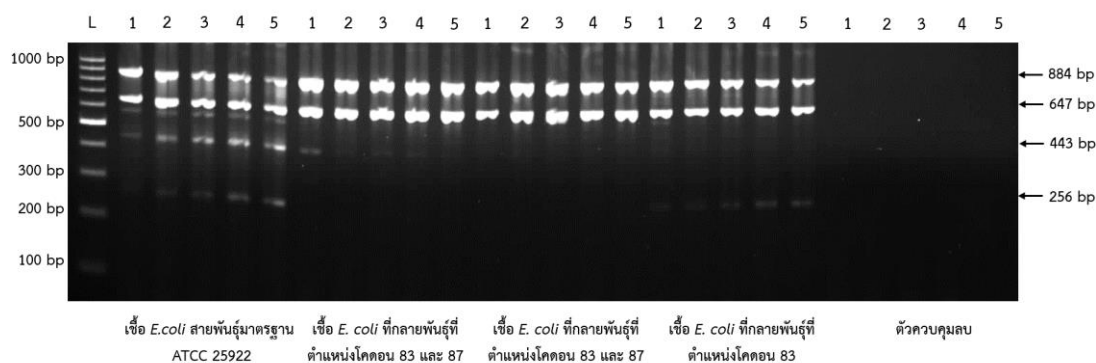
รูปที่ 4. 7 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 3 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

7.4.2 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

เชื้อ *E. coli* อีก 1 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ถูกเพิ่มเข้ามาเป็นตัวแทนร่วมการทดสอบตั้งแต่ขั้นตอนนี้เป็นต้นไป ดังนั้นเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้งหมดมี 4 สายพันธุ์ประกอบไปด้วย เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* จำนวน 2 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียวจำนวน 1 สายพันธุ์

การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ทดสอบกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* ร่วมกับไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 ไมโครโมล และทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* เมื่อตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ พบว่าไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลเป็นความเข้มข้นที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* และสามารถมองเห็น

แถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* โดยที่ความเข้มข้นไพรเมอร์ดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.8

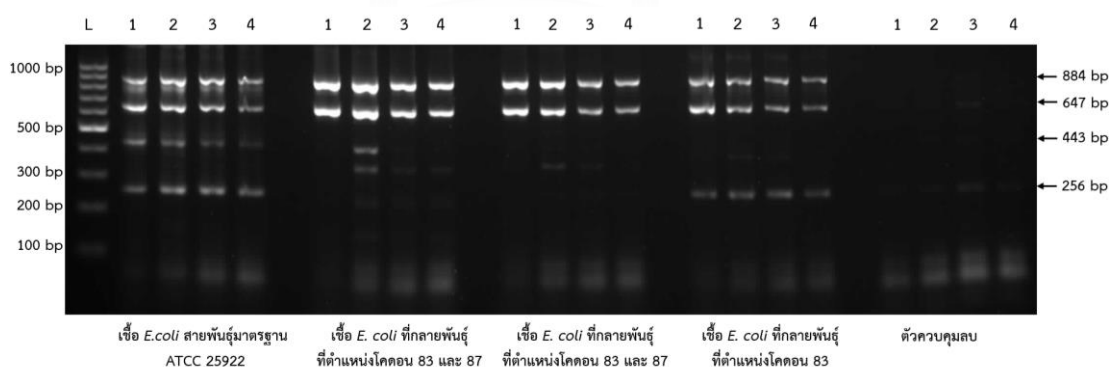


รูปที่ 4. 8 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 ไมโครโมล ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 ของแต่ละชุดการทดสอบคือไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 มิลลิโมล ตามลำดับ

7.4.3 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ร่วมกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* และไพรเมอร์ *gyrA83F* และ

ไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่ความเข้มข้นอย่างละ 1 ไมโครโมล และใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ได้แก่ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 มิลลิโมล ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์อื่น *gyrA* ไพรเมอร์อื่น *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* เมื่อตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ พบว่าแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล เป็นความเข้มข้นที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง โคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* โดยที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.9

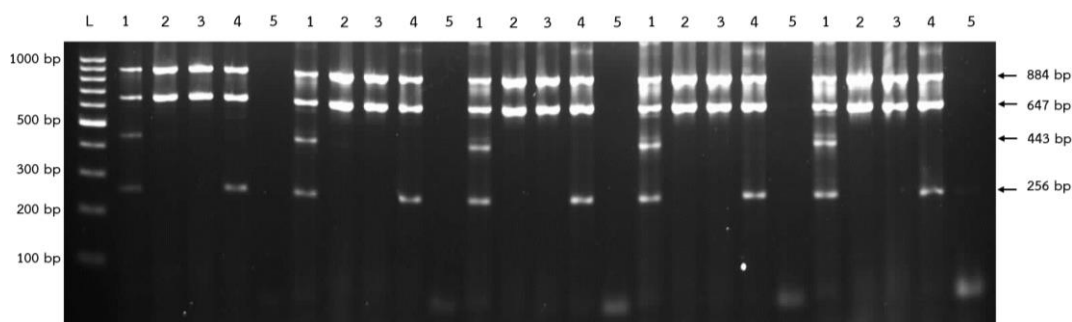


รูปที่ 4. 9 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 มิลลิโมล ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น

2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4 ของแต่ละชุดการทดสอบคือ แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 มิลลิโมล ตามลำดับ

7.4.4 จำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

การทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ร่วมกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* และไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่ความเข้มข้นอย่างละ 1 ไมโครโมล และใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 1.5 มิลลิโมล ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่จำนวนรอบต่างๆ ดังนี้ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* เมื่อตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเท่ากับ 647, 884, 442, 255 คู่เบสตามลำดับ พบว่าจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาคือ 30 รอบ โดยสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* โดยที่จำนวนรอบดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.10



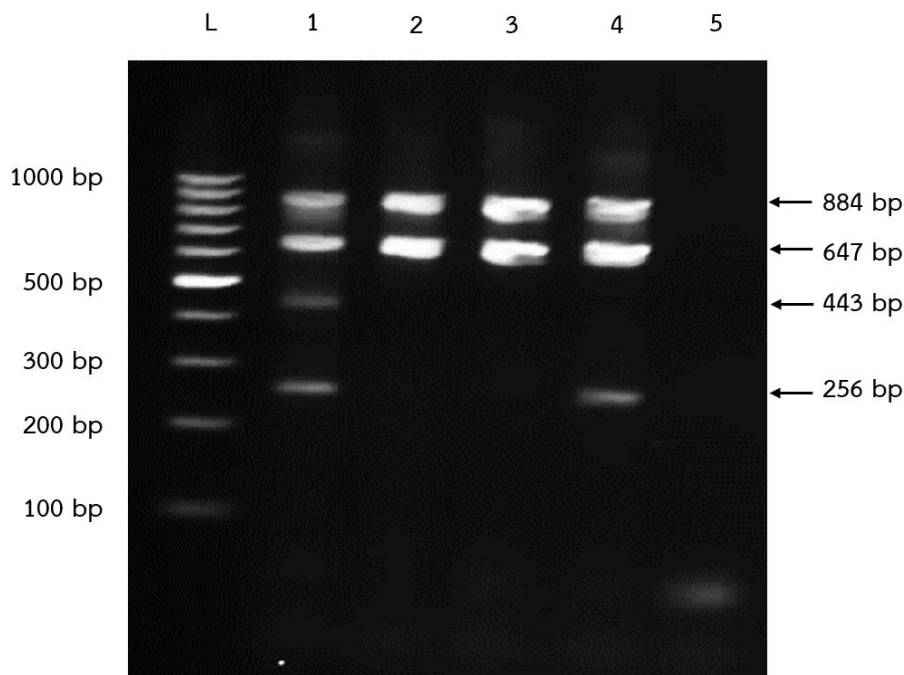
รูปที่ 4. 10 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่จำนวนรอบเท่ากับ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 ของแต่ละชุดการทดสอบคือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 2 และ 3 ของแต่ละชุดการทดสอบคือเชื้อ *E. coli* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 แถวที่ 4 ของแต่ละชุดการทดสอบคือเชื้อ *E. coli* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และแถวที่ 5 ของแต่ละชุดการทดสอบคือตัวควบคุมลบ

7.4.5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA*

ผลการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* ที่ความเข้มข้นอย่างละ 1 ไมโครโมล ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณ 1 ไมโครกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล PCR บัพเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิในขั้นตอน

Annealing เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 รอบ เมื่อตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีความยาวเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ โดยสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอ 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* จำนวน 1 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* จำนวน 2 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* โดยที่สภาวะการทำปฏิกิริยา MAS-PCR นี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.11





รูปที่ 4. 11 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 2 และ 3 คือเชื้อ *E. coli* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 แถวที่ 4 คือเชื้อ *E. coli* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และแถวที่ 5 คือตัวควบคุมลบ

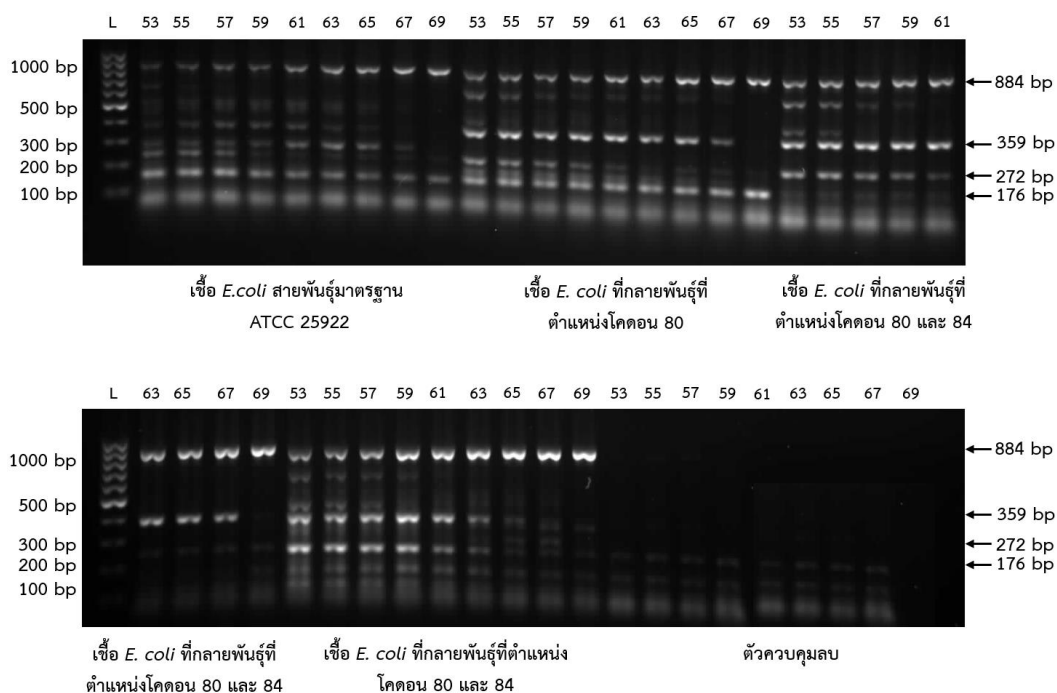
7.5 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *parC*

ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 4 สายพันธุ์ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR เชื้อ *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์ประกอบไปด้วย เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* จำนวน 2 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์

ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* เพียงตำแหน่งเดียวจำนวน 1 สายพันธุ์

7.5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC*

การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* โดยใช้ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ร่วมกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* และไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* โดยทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* เมื่อตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเท่ากับ 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing เป็นอุณหภูมิที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* โดยที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.12

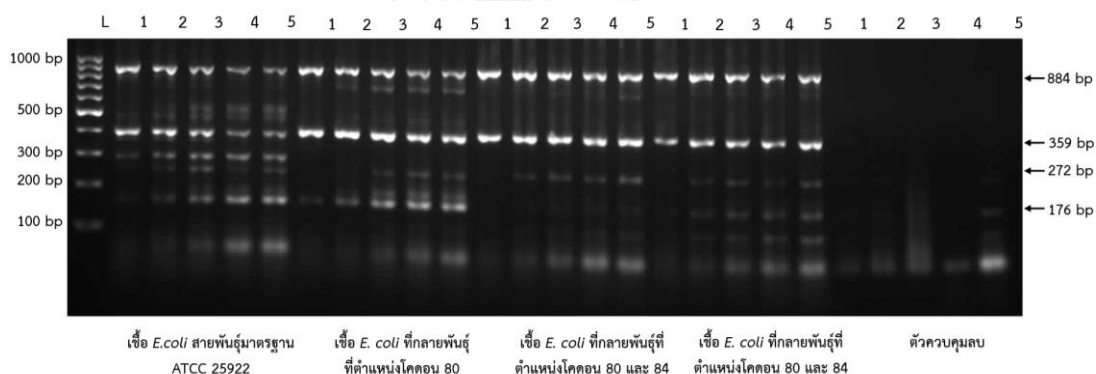


รูปที่ 4. 12 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

7.5.2 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC*

การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ทดสอบกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* และไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 ไมโครโมล และทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ใน

บทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* เมื่อตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบน วุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเท่ากับ 395, 884, 292, 155 คู่เบสตามลำดับ พบว่า ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลเป็นความเข้มข้นที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* โดยที่ความเข้มข้นไพรเมอร์ดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงใน รูปที่ 4.13

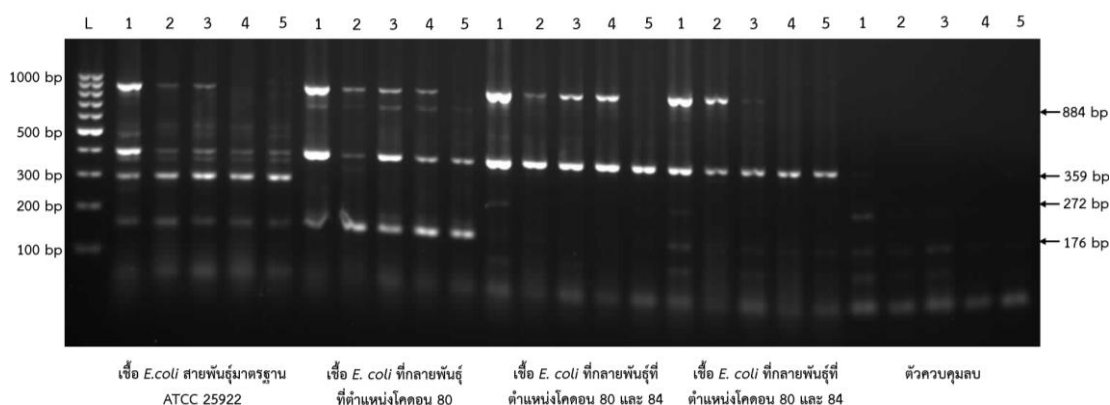


รูปที่ 4. 13 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 ไมโครโมล ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 ของแต่ละชุดการทดสอบคือ ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 ไมโครโมลตามลำดับ

7.5.3 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-

PCR ของยีน *parC*

การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ร่วมกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* และไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ที่ความเข้มข้นอย่างละ 1 ไมโครโมล และใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ได้แก่ 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 มิลลิโมล ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* เมื่อตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเท่ากับ 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ พบว่าแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมล เป็นความเข้มข้นที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* โดยที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.14

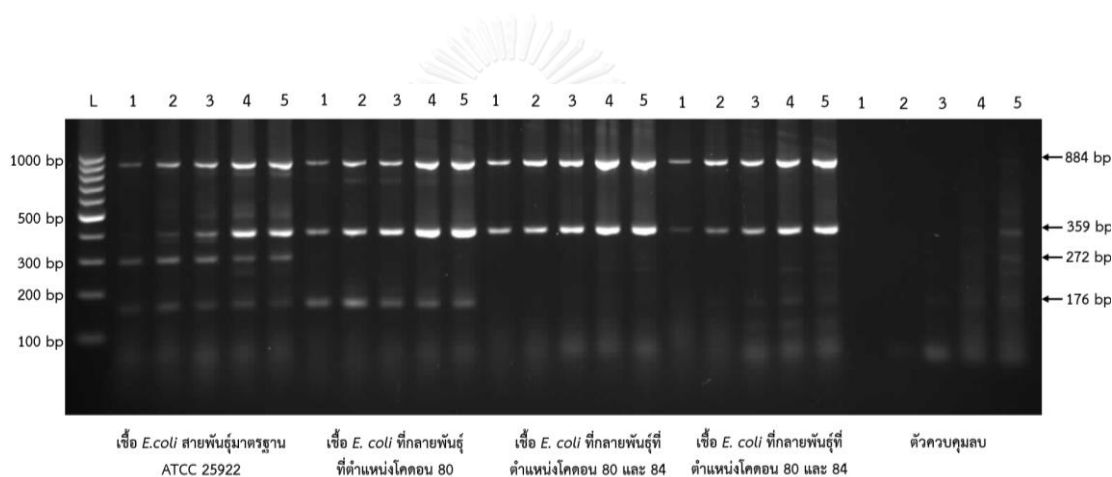


รูปที่ 4. 14 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 มิลลิโมล ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 ของแต่ละชุดการทดสอบคือของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 มิลลิโมลตามลำดับ

7.5.4 จำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC*

การทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ร่วมกับ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* และไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ที่ความเข้มข้นอย่างละ 1 ไมโครโมล และใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 3.0 มิลลิโมล ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่จำนวนรอบต่างๆ ดังนี้ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียสในขั้นตอน Annealing ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* เมื่อตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

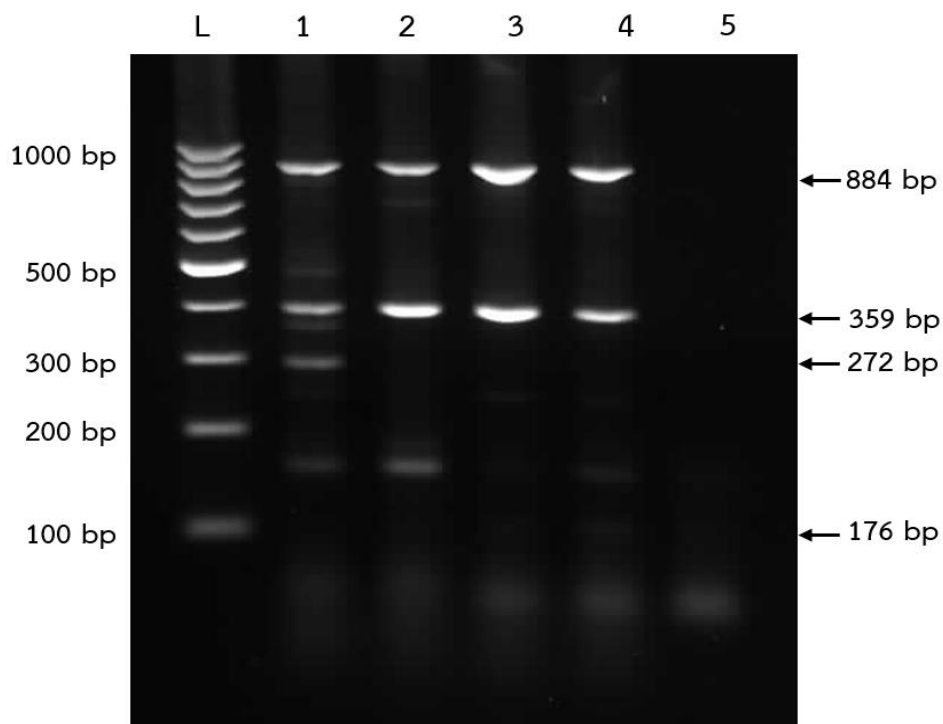
มีขนาดเท่ากับ 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ พบว่าจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาคือ 30 รอบ โดยสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดทั้ง 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* โดยที่จำนวนรอบดังกล่าวไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4. 15 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทดสอบปฏิกิริยาที่จำนวนรอบเท่ากับ 20, 25, 30, 35, 40 รอบ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 ของแต่ละชุดการทดสอบคือจำนวนรอบเท่ากับ 20, 25, 30, 35, 40 รอบตามลำดับ

7.5.5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของ ยีน *parC*

ผลการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ที่ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 ไมโครโมล ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณ 1 ไมโครกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมล ดิออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 400 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing เท่ากับ 61 องศาเซลเซียส และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 รอบ เมื่อตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีความยาวเท่ากับ 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ โดยสามารถมองเห็นแถบ ดีเอ็นเอ 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอ เพียง 3 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* จำนวน 1 สายพันธุ์ และสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยที่สภาวะการทำปฏิกิริยา MAS-PCR นี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4. 16 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 สายพันธุ์ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 2 คือเชื้อ *E. coli* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 แถวที่ 3 และ 4 คือเชื้อ *E. coli* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 และแถวที่ 5 คือตัวควบคุมลบ

8. การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค MAS-PCR

8.1 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ด้วย เทคนิค MAS-PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์ถูกนำมาตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ด้วยเทคนิค MAS-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน

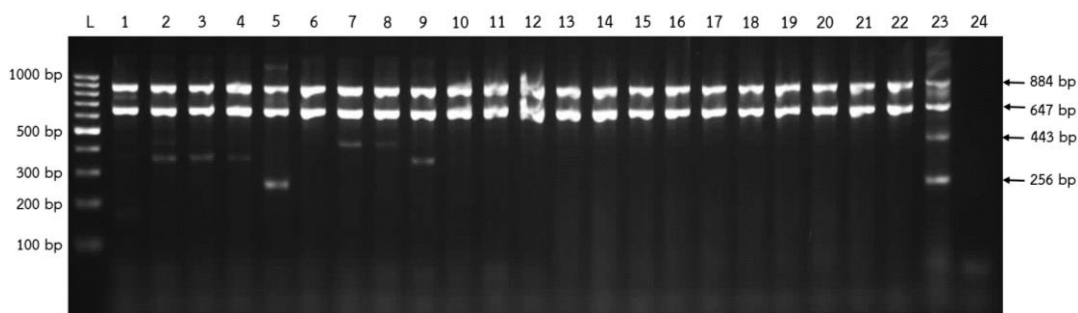
uspA ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* ร่วมกับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ตามผลการทดสอบที่ได้ในข้อ 7.4.5 โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นหลอดควบคุมบวกและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ เมื่อตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีความยาวเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ โดยสามารถมองเห็นแถบ ดีเอ็นเอ 4 แถบ เนื่องจากไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่เป็นตัวควบคุมบวกและเชื้อ *E. coli* จำนวน 12 สายพันธุ์ ขณะที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบ เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 เพียงตำแหน่งเดียว ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 7 สายพันธุ์ สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบ เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 92 สายพันธุ์ และไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอจากหลอดที่เป็นตัวควบคุมลบดังที่สรุปในตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.17 แสดงตัวอย่างแถบ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกภายหลังจากการตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* จากการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4. 7 ตารางสรุปการตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์

จำนวนเชื้อ <i>E. coli</i> 111 สายพันธุ์	ไพรเมอร์ยีน <i>gyrA</i> ให้ ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่ มีขนาดเท่ากับ 647 คู่เบส	ไพรเมอร์ยีน <i>uspA</i> ให้ ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่ มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส	ไพรเมอร์ยีน <i>gyrA83F</i> ให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดเท่ากับ 443 คู่เบส	ไพรเมอร์ยีน <i>gyrA87R</i> ให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดเท่ากับ 256 คู่เบส
12	+ ¹	+	+	+
7	+	+	- ²	+
92	+	+	-	-

¹ หมายถึง พบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา MAS-PCR

² หมายถึง ไม่พบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา MAS-PCR



รูปที่ 4. 17 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ตรวจสอบผลผลิต

MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 ถึง 4 และแถวที่ 6 ถึง 22 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* แถวที่ 5 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* แถวที่ 23 คือ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และ แถวที่ 24 คือตัวควบคุมลบ

8.2 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค MAS-PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์ถูกนำมาตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *parC* ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ด้วยเทคนิค MAS-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ร่วมกับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ตามผลการทดสอบที่ได้ในข้อ 7.5.5 โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นหลอดควบคุมบวกและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ เมื่อตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีความยาวเท่ากับ 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ โดยสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ เนื่องจากไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่เป็นตัวควบคุมบวกและเชื้อ *E. coli* จำนวน 19 สายพันธุ์ ขณะที่สามารถ

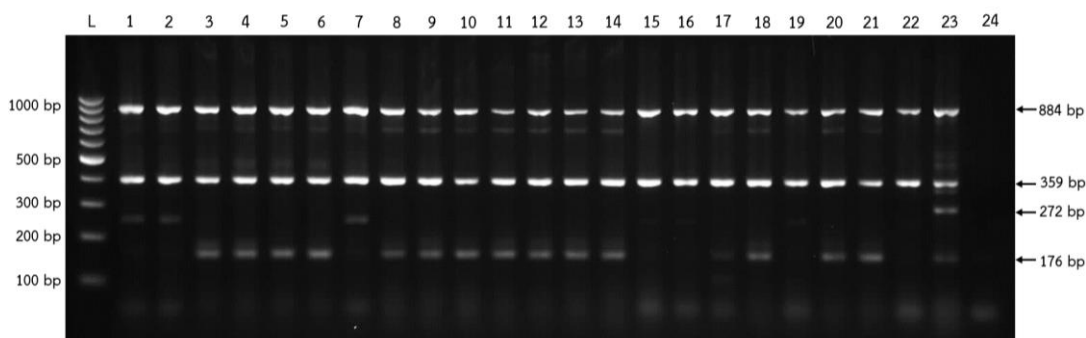
มองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบ เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 เพียงตำแหน่งเดียว ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 47 สายพันธุ์ สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบ เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 45 สายพันธุ์ และไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอจากหลอดที่เป็นตัวควบคุมลบ ดังที่สรุปในตารางที่ 4.8 รูปที่ 4.18 แสดงตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกภายหลังจากการตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* จากการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4. 8 ตารางสรุปการตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์

จำนวนเชื้อ <i>E. coli</i> 111 สายพันธุ์	ไพรเมอร์ยีน <i>parC</i> ให้ ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่ มีขนาดเท่ากับ 395 คู่เบส	ไพรเมอร์ยีน <i>uspA</i> ให้ ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่ มีขนาดเท่ากับ 884 คู่เบส	ไพรเมอร์ยีน <i>parC80F</i> ให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดเท่ากับ 272 คู่เบส	ไพรเมอร์ยีน <i>parC84R</i> ให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดเท่ากับ 176 คู่เบส
19	+ ¹	+	+	+
47	+	+	- ²	+
45	+	+	-	-

¹หมายถึง พบแบนของดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา MAS-PCR

²หมายถึง ไม่พบแบนของดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา MAS-PCR

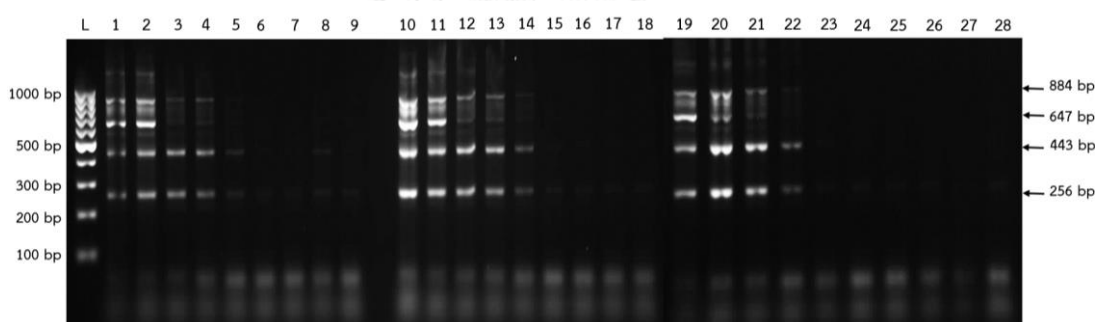


รูปที่ 4. 18 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิก ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1, 2, 7, 15, 16, 19, 22 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* แถวที่ 3 ถึง 6 และ 8 ถึง 14 และ 18, 20, 21 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* แถวที่ 23 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 24 คือตัวควบคุมลบ

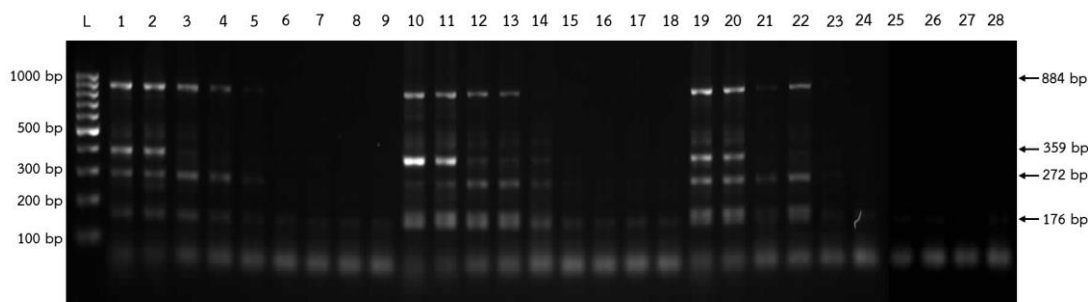
9. ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC*

การทดสอบหาความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และไม่พบการกลายพันธุ์ที่ยีน *gyrA* และยีน *parC* จำนวน 2 สายพันธุ์ ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ถูกนำมาเจือจางเชื้อเป็นลำดับ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000 ถึง 0.00001 นาโนกรัม และถูกใช้เป็นตัวต้นแบบในปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* สำหรับการทำให้ปฏิกิริยาของยีน *gyrA*

และใช้ไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* สำหรับการ
 ทำปฏิกิริยาของยีน *parC* และใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาตามผลการทดสอบที่ได้ในข้อ 7.4.5 และ
 7.5.5 ตามลำดับ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ เมื่อตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR
 ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลผลิต MAS-PCR
 ของยีน *gyrA* มีขนาดเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ ขณะที่ผลผลิต MAS-PCR ของยีน
parC มีขนาดเท่ากับ 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่
 เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* มีค่า
 เท่ากับ 100 นาโนกรัม ดังรูปที่ 4.19 และ 4.20



รูปที่ 4. 19 ผลผลิต MAS-PCR จากการทดสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค
 MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ตรวจสอบผลผลิต
 MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอ
 มาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 ถึง 9 คือดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่
 ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ถึง 0.00001 นาโนกรัมตามลำดับ แถวที่ 10 ถึง 18 คือดีเอ็นเอของเชื้อ
E. coli สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ถึง 0.00001 นาโนกรัมตามลำดับ
 แถวที่ 19 ถึง 27 คือดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000
 ถึง 0.00001 นาโนกรัมตามลำดับ แถวที่ 28 คือตัวควบคุมลบ



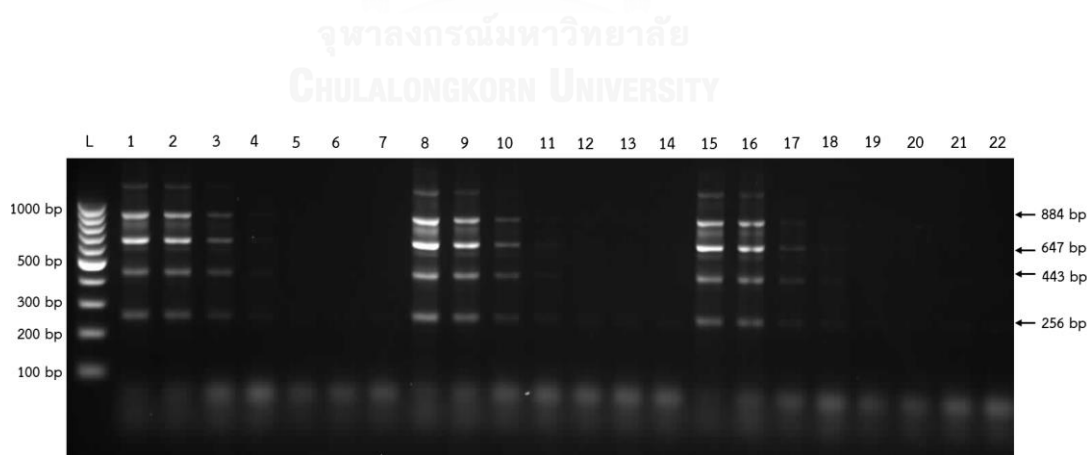
รูปที่ 4. 20 ผลผลิต MAS-PCR จากการทดสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค

MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 ถึง 9 คือดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ถึง 0.00001 นาโนกรัมตามลำดับ แถวที่ 10 ถึง 18 คือดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ถึง 0.00001 นาโนกรัมตามลำดับ แถวที่ 19 ถึง 27 คือดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ถึง 0.00001 นาโนกรัมตามลำดับ แถวที่ 28 คือตัวควบคุมลบ

10. ความไวของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC*

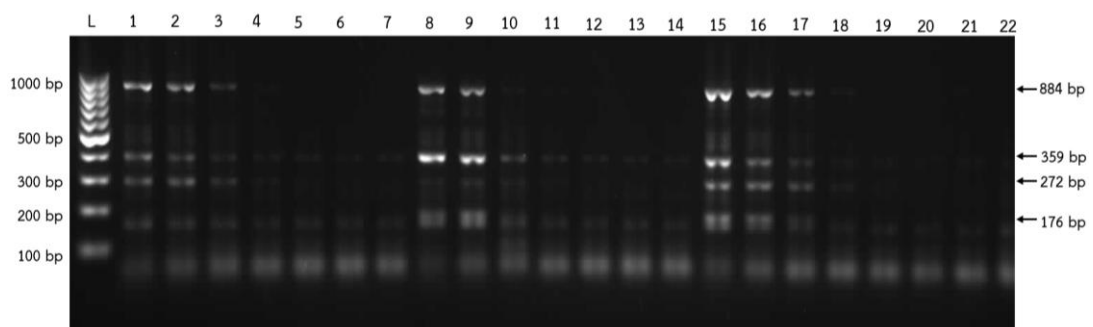
การทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* โดยใช้เชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing และไม่พบการกลายพันธุ์ที่ยีน *gyrA* และยีน *parC* จำนวน 2 สายพันธุ์ เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ถูกเจือจางเชื้อแบบ 10 เท่า ทำให้ได้เชื้อที่มีปริมาณตั้งแต่ 10^8 ถึง 10^2 colony forming unit ต่อมิลลิลิตร เชื้อในแต่ละระดับความเจือจางถูกนำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar เพื่อนับจำนวนโคโลนี และนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F*

และไพรเมอร์ *gyrA87R* สำหรับการทำให้ปฏิกิริยาของยีน *gyrA* และใช้ไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* สำหรับการทำให้ปฏิกิริยาของยีน *parC* และใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาตามผลการทดสอบที่ได้ในข้อ 7.4.5 และ 7.5.5 ตามลำดับ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ เมื่อตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์พบว่าผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* มีขนาดเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ ขณะที่ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* มีขนาดเท่ากับ 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ ปริมาณของเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุดที่เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ได้มีค่าเท่ากับจำนวนเชื้อ (colony forming unit ต่อมิลลิลิตร) ณ ระดับความเจือจางของเชื่อน้อยที่สุดที่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอ 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกจำนวน 2 สายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งทั้งคู่มีค่าเท่ากับ 6.6×10^4 colony forming unit ต่อมิลลิลิตร โดยเป็นจำนวนโคโลนีเชื้อที่นับได้ ณ ระดับความเจือจางเชื้อเท่ากับ 10^7 ดังรูปที่ 4.21 และ 4.22



รูปที่ 4. 21 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* จากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา MAS-PCR ของเชื้อ *E. coli* ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 ถึง 7 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์

มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ระดับความเจือจางของเชื้อเท่ากับ 10^8 ถึง 10^2 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ แถวที่ 8 ถึง 14 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 1 ที่ระดับความเจือจางของเชื้อเท่ากับ 10^8 ถึง 10^2 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ แถวที่ 15 ถึง 21 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 2 ที่ระดับความเจือจางของเชื้อเท่ากับ 10^8 ถึง 10^2 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ แถวที่ 22 คือตัวควบคุมลบ

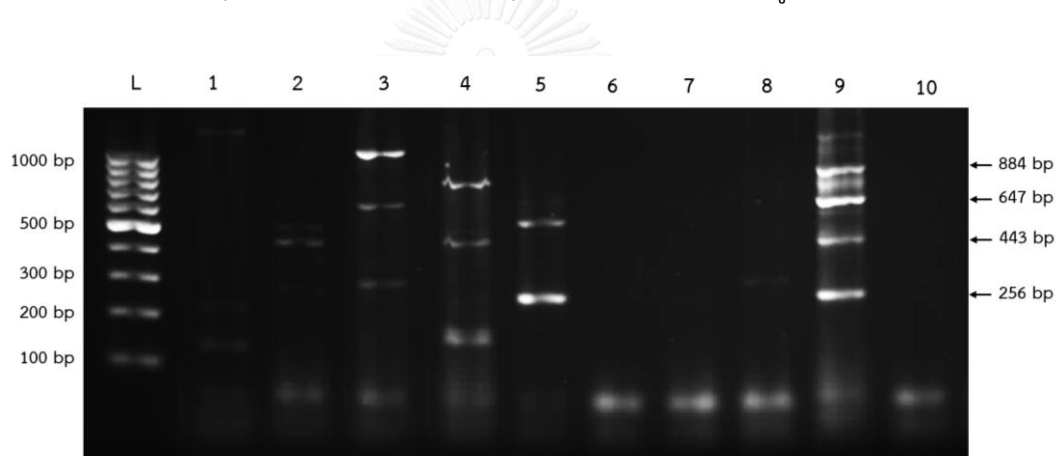


รูปที่ 4. 22 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* จากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา MAS-PCR ของเชื้อ *E. coli* ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 ถึง 7 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่ระดับความเจือจางของเชื้อเท่ากับ 10^8 ถึง 10^2 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ แถวที่ 8 ถึง 14 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 1 ที่ระดับความเจือจางของเชื้อเท่ากับ 10^8 ถึง 10^2 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ แถวที่ 15 ถึง 21 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์คลินิกสายพันธุ์ที่ 2 ที่ระดับความเจือจางของเชื้อเท่ากับ 10^8 ถึง 10^2 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ แถวที่ 22 คือตัวควบคุมลบ

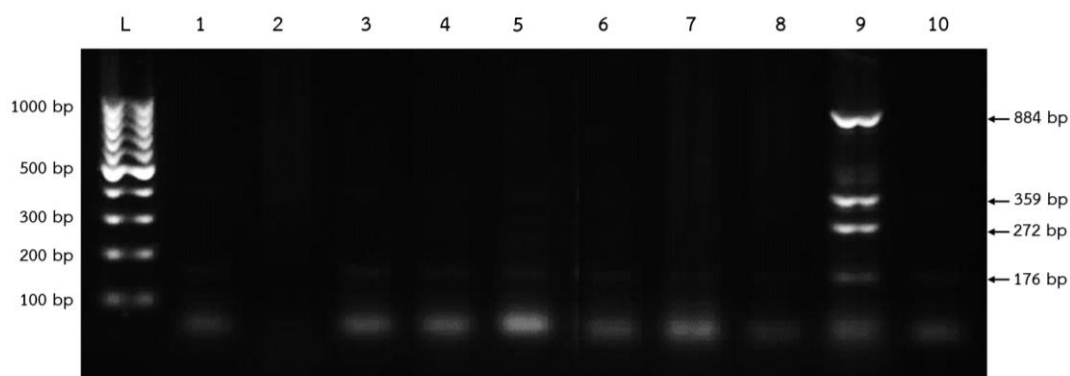
11. ความจำเพาะของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC*

การทดสอบหาความจำเพาะของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ นอกเหนือจากเชื้อ *E. coli* ได้แก่ เชื้อ *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *S. dysenteriae*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila*, *P. mirabilis* ร่วมกับไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* สำหรับการทำให้ปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* และไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* สำหรับการทำให้ปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* และใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาตามผลการทดสอบที่ได้ในข้อ 7.4.5 และ 7.5.5 ตามลำดับ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 เป็นหลอดควบคุมบวกและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ เมื่อตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* จำนวน 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่เป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ แถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 647, 884, 443, 256 คู่เบส ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ยีน *gyrA* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* ตามลำดับ ทั้งนี้ได้พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* ที่มีขนาดเท่ากับ 647 คู่เบสในเชื้อ *K. pneumoniae* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 443 คู่เบสในเชื้อ *S. dysenteriae* และเชื้อ *S. choleraesuis* และพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 256 คู่เบสในเชื้อ *Y. enterocolitica* ดังรูปที่ 4.23 เมื่อวิเคราะห์ความจำเพาะของไพรเมอร์ดังกล่าวด้วยโปรแกรม Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) พบว่าไพรเมอร์ *gyrA* มีความจำเพาะกับเชื้อ *K. pneumoniae* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ *gyrA83F* มีความจำเพาะกับเชื้อ *S. dysenteriae* เท่ากับ 55 ถึง 100

เปอร์เซ็นต์ และไม่พบความจำเพาะกับเชื้อ *S. choleraesuis* ไพรเมอร์ *gyrA*8R มีความจำเพาะกับเชื้อ *Y. enterocolitica* เท่ากับ 80 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันได้พบผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* จำนวน 4 แถบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 ที่เป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 395, 884, 289, 153 คู่เบสซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ยีน *parC* ไพรเมอร์ยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC*80F และไพรเมอร์ *parC*84R ตามลำดับ และไม่พบผลผลิต MAS-PCR ใดๆ ของยีน *parC* ของเชื้อ *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *S. dysenteriae*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila*, *P. mirabilis* ดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4. 23 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *gyrA* จากการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา MAS-PCR ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือเชื้อ *A. hydrophila* แถวที่ 2 คือเชื้อ *S. dysenteriae* แถวที่ 3 คือเชื้อ *K. pneumoniae* แถวที่ 4 คือเชื้อ *S. choleraesuis* แถวที่ 5 คือเชื้อ *Y. enterocolitica* แถวที่ 6 คือเชื้อ *S. aureus* แถวที่ 7 คือเชื้อ *S. pyogenes* แถวที่ 8 คือเชื้อ *P. mirabilis* แถวที่ 9 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และแถวที่ 10 คือตัวควบคุมลบ ตามลำดับ



รูปที่ 4. 24 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *parC* จากการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา

MAS-PCR ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือเชื้อ *S. aureus* แถวที่ 2 คือเชื้อ *A. hydrophila* แถวที่ 3 คือเชื้อ *S. pyogenes* แถวที่ 4 คือเชื้อ *P. mirabilis* แถวที่ 5 คือเชื้อ *K. pneumoniae* แถวที่ 6 คือเชื้อ *S. dysenteriae* แถวที่ 7 คือเชื้อ *S. choleraesuis* แถวที่ 8 คือเชื้อ *Y. enterocolitica* แถวที่ 9 คือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และแถวที่ 10 คือตัวควบคุมลบตามลำดับ

12. ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC*

ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ถูกวิเคราะห์โดยนำผลการตรวจด้วยปฏิกิริยา MAS-PCR ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์มาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยทำการเปรียบเทียบในแต่ละตำแหน่งของการกลายพันธุ์ ได้แก่ ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และ ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84

ของยีน *parC* พบว่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ 96.97, 100, 100, 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 87 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ 100, 100, 100, 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 100, 100, 100, 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 93.33, 98.48, 97.67, 95.59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9



ตารางที่ 4. 9 ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sequencing

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR	ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Sequencing		ความไว	ความจำเพาะ	ค่าทำนายผลบวก	ค่าทำนายผลลบ
	จำนวนเชื้อที่กลายพันธุ์	จำนวนเชื้อที่ไม่กลายพันธุ์				
<i>gyrA83</i> ¹						
พบการกลายพันธุ์	96	0	96.97%	100%	100%	80.00%
ไม่พบการกลายพันธุ์	3	12				
<i>gyrA87</i> ²						
พบการกลายพันธุ์	92	0	100%	100%	100%	100%
ไม่พบการกลายพันธุ์	0	19				
<i>parC80</i> ³						
พบการกลายพันธุ์	92	0	100%	100%	100%	100%
ไม่พบการกลายพันธุ์	0	19				
<i>parC84</i> ⁴						
พบการกลายพันธุ์	42	1	93.33%	98.48%	97.67%	95.59%
ไม่พบการกลายพันธุ์	3	65				

¹ และ ² หมายถึงตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ตามลำดับ

³ และ ⁴ หมายถึงตำแหน่งโคดอนที่ 80 และ 84 ของยีน *parC* ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR โดยการเปรียบเทียบกับผลค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี E-test® พบว่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ 94.74, 62.50, 93.75, 66.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 87 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ 96.84, 100, 100, 84.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 96.84, 100, 100, 84.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 45.26, 100, 100, 23.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10

เมื่อวิเคราะห์ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR โดยการเปรียบเทียบกับผลค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี E-test® พบว่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ 96.74, 63.16, 92.71, 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 87 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ 100, 100, 100, 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 100, 100, 100, 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต่อการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 46.74, 100, 100, 27.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4. 10 ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี E-test®

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR	ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นยา Ciprofloxacin ที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ		ความไว	ความจำเพาะ	ค่าทำนายผลบวก	ค่าทำนายผลลบ
	จำนวนเชื้อที่ติดต่อยา	จำนวนเชื้อที่ไวต่อยา				
<i>gyrA83</i> ¹						
พบการกลายพันธุ์	90	6	94.74%	62.50%	93.75%	66.67%
ไม่พบการกลายพันธุ์	5	10				
<i>gyrA87</i> ²						
พบการกลายพันธุ์	92	0	96.84%	100%	100%	84.21%
ไม่พบการกลายพันธุ์	3	16				
<i>parC80</i> ³						
พบการกลายพันธุ์	92	0	96.84%	100%	100%	84.21%
ไม่พบการกลายพันธุ์	3	16				
<i>parC84</i> ⁴						
พบการกลายพันธุ์	43	0	45.26%	100%	100%	23.53%
ไม่พบการกลายพันธุ์	52	16				

¹ และ ² หมายถึงตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ตามลำดับ

³ และ ⁴ หมายถึงตำแหน่งโคดอนที่ 80 และ 84 ของยีน *parC* ตามลำดับ

ตารางที่ 4. 11 ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี E-test®

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR	ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นยา Levofloxacin ที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการ เจริญของเชื้อ		ความไว	ความจำเพาะ	ค่าทำนาย ผลบวก	ค่าทำนายผล ลบ
	จำนวนเชื้อที่คือต่อยา	จำนวนเชื้อที่ ไวต่อยา				
<i>gyrA83</i> ¹						
พบการกลายพันธุ์	89	7	96.74%	63.16%	92.71%	80%
ไม่พบการกลายพันธุ์	3	12				
<i>gyrA87</i> ²						
พบการกลายพันธุ์	92	0	100%	100%	100%	100%
ไม่พบการกลายพันธุ์	0	19				
<i>parC80</i> ³						
พบการกลายพันธุ์	92	0	100%	100%	100%	100%
ไม่พบการกลายพันธุ์	0	19				
<i>parC84</i> ⁴						
พบการกลายพันธุ์	43	0	46.74%	100%	100%	27.94%
ไม่พบการกลายพันธุ์	49	19				

¹ และ ² หมายถึงตำแหน่งโคดอนที่ 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ตามลำดับ

³ และ ⁴ หมายถึงตำแหน่งโคดอนที่ 80 และ 84 ของยีน *parC* ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์เนื่องจากเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มักตรวจพบและเพาะแยกได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (2, 3) แม้ว่าเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (2) อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถก่อโรคได้ทั้งในระบบทางเดินอาหาร (*Diarrheagenic E. coli*) และนอกระบบทางเดินอาหาร (*Extraintestinal E. coli*) (2) เชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อทั้งในชุมชนและในโรงพยาบาล (29, 30) โดยพบว่าการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในชุมชนและในโรงพยาบาลมีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* มากถึง 80 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (4) จากการศึกษาของ Thamlikitkul และคณะเกี่ยวกับอุบัติการณ์การติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยโรงพยาบาล 4 แห่งในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2543 พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ *E. coli* สูงเป็นอันดับหนึ่ง โดยมีอัตราการติดเชื้อเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (33) สอดคล้องกับข้อมูลของ Chaiwarith และคณะที่ทำการศึกษาอัตราเชื้อดื้อยาของผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลเชียงใหม่ระหว่างปี ค.พ. 2549 ถึง 2552 พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจในผู้ป่วยได้เป็นอันดับหนึ่งจากสิ่งส่งตรวจที่มาจากเลือดและปัสสาวะ (34)

ยากลุ่ม Quinolones เป็นยาปฏิชีวนะสำคัญกลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* (23, 46, 75,) ปัจจุบันพบว่าเชื้อ *E. coli* มีแนวโน้มดื้อต่อยากลุ่มดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น (75) ข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย พบว่าเชื้อ *E. coli* มีแนวโน้มของอัตราการดื้อยาที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยอัตราการดื้อยา Ciprofloxacin เพิ่มขึ้นจาก 29.4 เปอร์เซ็นต์ในปี พ.ศ. 2545 เป็น 54.7 เปอร์เซ็นต์ในปี พ.ศ. 2557 (6) Lu และคณะได้ทำการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับอัตราการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะในกลุ่มประเทศเอเชียแปซิฟิก รวมถึง

ในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552 ถึง พ.ศ. 2553 พบว่าเชื้อมีอัตราการดื้อต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin เท่ากับ 56.8 เปอร์เซ็นต์และ 55.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (113) สอดคล้องกับข้อมูลของโรงพยาบาลรามาริบัติ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2555 ที่พบว่าเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin เท่ากับ 64 และ 63 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (7) การดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ที่พบในเชื้อ *E.coli* จึงเป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่พบได้ในประเทศไทย

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *E. coli* จำนวน 111 สายพันธุ์ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลรามาริบัติ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในช่วงระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2557 โดยเชื้อส่วนใหญ่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะคิดเป็น 83.78 เปอร์เซ็นต์ เชื้อทั้งหมดได้ผ่านการทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ด้วยวิธี Disk diffusion method สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา Ciprofloxacin และ Levofloxacin จำนวน 19 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin จำนวน 92 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อทั้งหมดจำนวน 111 สายพันธุ์มาทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ด้วยวิธี E-test® พบว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 16 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion method และพบเชื้อ *E. coli* จำนวน 3 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ดื้อปานกลางต่อยา Ciprofloxacin ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion method ในขณะที่เชื้อ *E. coli* จำนวน 76 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion method และพบเชื้อ *E. coli* จำนวน 16 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่ดื้อปานกลางต่อยา Levofloxacin ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion การทดสอบความไวต่อยา

ปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standards Institute ปี ค.ศ. 2013 ได้แก่ วิธี Broth dilution method วิธี Agar dilution method และวิธี Disk diffusion method (2) แม้ว่าวิธี Disk diffusion method จะเป็นวิธีที่มีราคาประหยัด มีขั้นตอนการทดสอบที่สะดวกและให้ผลที่น่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ตามวิธีการทดสอบดังกล่าวให้ผลการทดสอบแต่เพียงเชิงคุณภาพจึงไม่สามารถจำแนกเชื้อที่มีการดื้อยาในระดับต่ำได้ (114) ขณะที่วิธี E-test® เป็นการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเช่นเดียวกับวิธี Broth dilution method และ Agar dilution method จึงสามารถแสดงให้เห็นถึงระดับความเข้มข้นของยาที่ละเอียดกว่าค่าที่ได้จากการทดสอบด้วย Disk diffusion method (114) วิธี E-test® เป็นวิธีที่เตรียมการทดสอบง่าย ไม่ยุ่งยาก และให้ประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากวิธี Broth dilution method เมื่อใช้ทำการทดสอบความไวของยา Ciprofloxacin ต่อเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบรูปแท่งที่ก่อโรคในลำไส้รวมถึงเชื้อ *E. coli* (78) และวิธี Disk diffusion method เมื่อใช้ทำการทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ต่อเชื้อ *Salmonella enterica* (115) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามวิธี E-test® มีข้อจําอยู่บางประการ ได้แก่ ราคาที่ค่อนข้างสูงและให้ความไวของการทดสอบที่ค่อนข้างต่ำหากเชื้อที่ใช้ทดสอบมีปริมาณน้อย เป็นต้น (78)

ยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin เป็นยาในกลุ่มที่ 2 และกลุ่ม 3 ของยาในกลุ่ม Quinolones ตามลำดับ (8) ยาทั้งสองชนิดนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ในการฆ่าทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยยาเข้าจับกับเอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA topoisomerase IV ส่งผลให้เกิดการขัดขวางกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ (51) และทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการตายแบบ Apoptosis (54) ยา Ciprofloxacin เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* (116) และออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบรูปแท่งได้ดีที่สุดในบรรดาในกลุ่ม

Quinolones (116) เนื่องจากโมเลกุลของหมู่ Piperazine ณ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 ในโครงสร้างของยา (49) ขณะที่ยา Levofloxacin สามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่าในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (54) เนื่องจากโมเลกุลของหมู่ Aminopyrrolidine ณ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 ในโครงสร้างยา (49) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายา Ciprofloxacin มีค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่ายา Levofloxacin ทั้งในการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทางคลินิกซึ่งสัมพันธ์กับข้อมูลที่ได้อธิบายข้างต้น

การใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็นเป็นสาเหตุสำคัญที่กระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อต่อยา (49) กลไกการดื้อยาที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อ *E. coli* ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones คือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายของยา เนื่องจากเกิดจากการกลายพันธุ์ในส่วนของ Quinolone resistance determining regions (61) ซึ่งได้แก่ การกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *gyrB* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DNA gyrase หรือการกลายพันธุ์ของยีน *parC* และยีน *parE* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DNA topoisomerase IV (55) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลำดับเบสบริเวณ Quinolone resistance determining regions ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Sanger sequencing เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* โดยยีนทั้งสองดังกล่าวเป็นยีนหลักที่พบการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ของเชื้อ *E. coli* (49) พบว่า 85 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones มีสาเหตุจากกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ในขณะที่เชื้อจำนวน 45.6 เปอร์เซ็นต์มีสาเหตุจากกลายพันธุ์ของยีน *parC* (62) ซึ่งการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่เป็นสาเหตุของการดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* (11, 62) เมื่อ

ยากลุ่ม Quinolone เข้าสู่ภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียยาจะเข้าจับกับโปรตีน GyrA ของเอนไซม์ DNA gyrase ในระหว่างการออกฤทธิ์ ดังนั้นหากเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีน GyrA ภายในเอนไซม์ดังกล่าวจะส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของยา ขณะที่โปรตีน ParC มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโปรตีน GyrA และเป็นเป้าหมายที่สำคัญของยาในการออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ DNA topoisomerase IV (49, 117) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ของยีน *gyrB* และยีน *parE* พบว่ามีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม Quinolones ที่น้อยกว่ายีน *gyrA* และยีน *parC* ตามลำดับ (64, 117)

ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 111 สายพันธุ์พบว่ามีเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ/หรือยีน *parC* จำนวนทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์หรือเท่ากับ 89.19 เปอร์เซ็นต์ โดยพบการกลายพันธุ์แบบจุดเดี่ยวทั้งหมด 8 รูปแบบซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุของการดื้อยากลุ่ม Quinolones ของเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งสิ้น 6 รูปแบบ ดังนี้ การกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ได้แก่ Serine83-Leucine (TCG เป็น TTG) Aspartate87-Asparagine (GAC เป็น AAC) และ Aspartate87-Tyrosine (GAC เป็น TAC) และการกลายพันธุ์ของยีน *parC* ได้แก่ Serine80-Isoleucine (AGC เป็น ATC หรือ ATT) Glutamate84-Valine (GAA เป็น GTA) Glutamate84-Glycine (GAA เป็น GGA) และเป็นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนอื่นๆ ที่พบไม่บ่อยจำนวน 2 รูปแบบ ดังนี้ การกลายพันธุ์ของยีน *parC* ได้แก่ Alanine90-Valine (GCG เป็น GTG) และ Alanine108-Threonine (GCG เป็น ACG) ในปัจจุบันการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 90 และ/หรือ 108 ของยีน *parC* โดยปราศจากการกลายพันธุ์ร่วมกับตำแหน่งอื่นๆ ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงความสัมพันธ์กับการดื้อยากลุ่ม Quinolones อย่างไรก็ตามพบว่าการกลายพันธุ์ของโคดอน 2 ตำแหน่งดังกล่าวของยีน *parC* ร่วมกันกับตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* มีความสัมพันธ์กับการดื้อระดับสูงของยากลุ่ม Quinolones (61)

ในเชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์จำนวนทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์แบบจุดเดียวของยีน *gyrA* มากกว่ายีน *parC* โดยพบรูปแบบการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอน Serine83-Leucine ของยีน *gyrA* มากเป็นอันดับหนึ่ง ตำแหน่งโคดอน Serine80-Isoleucine ของยีน *parC* มากเป็นอันดับสอง ตำแหน่งโคดอน Aspartate87-Asparagine ของยีน *gyrA* มากเป็นอันดับสาม ตำแหน่งโคดอน Glutamate84-Valine ของยีน *parC* มากเป็นอันดับสี่ ตำแหน่งโคดอน Glutamate84-Glycine ของยีน *parC* มากเป็นอันดับห้า ตำแหน่งโคดอน Aspartate87-Tyrosine ของยีน *gyrA* มากเป็นอันดับหก ซึ่งสอดคล้องกับความถี่ของรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบในการศึกษาลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Ciprofloxacin จำนวน 80 สายพันธุ์ของ Nam และคณะในปี ค.ศ. 2013 ที่ประเทศเกาหลี (11) เชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่มีการกลายพันธุ์ร่วมกันมากกว่า 1 ตำแหน่งขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งที่เกิดขึ้นร่วมกันที่ยีน *gyrA* 2 ตำแหน่งและที่ยีน *parC* 2 ตำแหน่งมากที่สุด และพบการกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งที่เกิดขึ้นร่วมกันที่ยีน *gyrA* 2 ตำแหน่งและที่ยีน *parC* 1 ตำแหน่งรองลงมา ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อมักเกิดการกลายพันธุ์ร่วมกันระหว่างยีน *gyrA* และยีน *parC* มากกว่า 1 ตำแหน่งขึ้นไป โดยพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ร่วมกันกับที่ตำแหน่งโคดอน 80 และ/หรือ 84 ของยีน *parC* เป็นหลัก (59, 61)

ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าเชื้อ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียวยังคงไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ดังกล่าวส่งผลให้เชื้อมีระดับค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในอดีตของ Aoike และคณะ (62) พบว่าเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นอย่างน้อย 3 ตำแหน่งซึ่งประกอบไปด้วยการ

กลายพันธุ์ร่วมกันที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* โดยมีรูปแบบการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 รูปแบบ ได้แก่ 1). รูปแบบการกลายพันธุ์ร่วมกันที่ตำแหน่งโคดอน Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Asparagine และ Serine80-Isoleucine ซึ่งพบมากที่สุด และ 2). รูปแบบการกลายพันธุ์ร่วมกันที่ตำแหน่งโคดอน Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Tyrosine และ Serine80-Isoleucine ทั้ง 2 รูปแบบของการกลายพันธุ์ร่วมกันที่พบมีความสัมพันธ์กับการดื้อระดับสูงต่อยากลุ่ม Quinolones ในเชื้อ *E. coli* (59, 118)

เชื้อ *E. coli* จำนวน 83 จาก 92 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ร่วมกันอย่างน้อย 3 ตำแหน่งดังอธิบายข้างต้นดื้อระดับสูงต่อยา Ciprofloxacin (ค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่เชื้อ *E. coli* จำนวน 34 จาก 92 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ร่วมกันอย่างน้อย 3 ตำแหน่งดังอธิบายข้างต้นดื้อระดับสูงต่อยา Levofloxacin (ค่าความเข้มข้นของยา Levofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) การที่ยา Levofloxacin มีประสิทธิภาพดีกว่ายา Ciprofloxacin ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยากลุ่ม Quinolones ที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* อาจเนื่องจากการมีหมู่ Methoxy ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 8 ในโครงสร้างของยา ทำให้ยาออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น (119)

แม้ว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียวสามารถก่อให้เกิดการดื้อต่อยา Quinolones ได้ อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ร่วมกับตำแหน่งอื่นๆ ของยีน *gyrA* และ/หรือยีน *parC* พบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับการดื้อต่อยา Quinolones ที่เพิ่มสูงขึ้น (59, 118) ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับทฤษฎีที่อธิบายระดับการดื้อยากลุ่ม Quinolones ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการกลายพันธุ์ร่วมกันหลายตำแหน่งของ Quinolone resistance determining regions แม้กระนั้น

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 และ/หรือโคดอน 90 หรือโคดอน 108 ของยีน *parC* พบว่ามีความสัมพันธ์น้อยกับการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones (10) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ DNA gyrase เป็นเป้าหมายหลักที่ยากลุ่ม Quinolones เข้ามาจับเพื่อยับยั้งกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (54) ดังนั้นจึงสังเกตเห็นการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* มากกว่ายีน *parC* ในเชื้อ *E. coli*

การศึกษาที่ผ่านมาของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ร่วมกันอย่างน้อย 3 ตำแหน่งดังอธิบายข้างต้น พบระดับการดื้อระดับสูงต่อยากลุ่ม Quinolones (ค่าความเข้มข้นของยา Ciprofloxacin น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงมากกว่าหรือเท่ากับ 128 ถึง 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Broth dilution method หรือ Agar dilution method (59, 119) ระดับสูงสุดของค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่สามารถวัดได้ในการศึกษาค้างนี้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องมาจากข้อจำกัดของการทดสอบด้วยวิธี E-test® ที่มีระดับสูงสุดของความเข้มข้นยาเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นหากทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธีอื่นที่สามารถเตรียมความเข้มข้นของยาให้มีระดับสูงได้มากกว่านี้ เช่น Broth dilution method อาจพบว่าการกลายพันธุ์ของเชื้อที่เกิดขึ้นในการศึกษาค้างนี้สัมพันธ์กับระดับการดื้อยาที่สูงกว่าที่พบเมื่อทดสอบด้วยวิธี E-test®

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้ศึกษาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย (32, 120) เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวให้ความไวในการทดสอบค่อนข้างสูง ใช้ระยะเวลาสั้นสามารถทดสอบกับเชื้อที่ไม่มีชีวิตได้ นอกจากนั้นยังสามารถใช้ศึกษากลไกที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาได้อีกด้วย (32, 120, 121) เช่น การใช้เทคนิค Polymerase chain reaction-Restriction fragment

length polymorphism เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* และยีน *parC* ในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* (16) การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ด้วยวิธี Single-strand conformational polymorphism analysis (17) และการใช้เทคนิค Mismatch amplification mutation assay PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์บนยีน *gyrA* ในเชื้อ *Campylobacter jejuni* (121)

การศึกษารังนี้ได้นำพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการดื้อต่อยากลุ่ม Quinolones ของเชื้อ *E. coli* ที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* เทคนิค MAS-PCR เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาจากเทคนิค PCR (122) โดยนำหลักการของ Multiplex PCR เข้ามาประยุกต์ใช้ร่วมในเทคนิค AS-PCR ทำให้สามารถใช้ในการตรวจสอบหาการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลายตำแหน่งได้ภายในหนึ่งปฏิกิริยาทดสอบ ในปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่ต้องการตรวจหาการกลายพันธุ์ (ยีน *gyrA* หรือยีน *parC*) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนควบคุมภายใน (ยีน *uspA*) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน (ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 สำหรับยีน *gyrA* หรือตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 สำหรับยีน *parC*) (62) โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่มีการกลายพันธุ์ถูกออกแบบให้ปลายด้าน 3' สามารถจับอย่างจำเพาะกับลำดับเบสที่ปกติ ณ ตำแหน่งที่ต้องการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนนั้น (91) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วไพรเมอร์ดังกล่าวจะสามารถจับแบบคู่สมกับลำดับเบสที่ปกติและสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งสามารถตรวจสอบพบผลผลิตจากปฏิกิริยาบนวุ้นอะกาโรส ขณะที่ไพรเมอร์จะไม่สามารถจับแบบคู่สมกับลำดับเบสที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้ไม่สามารถพบผลผลิตจากปฏิกิริยาบนวุ้นอะกาโรส (91)

ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* จำเป็นจะต้องให้เกิดผลผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน เนื่องจากตำแหน่งการกลายพันธุ์ทั้งสองจุดของยีน *gyrA* (ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87) หรือยีน *parC* (ตำแหน่งโคดอน 80 และ 84) มีระยะที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดผลผลิตที่มีขนาดใกล้เคียงกันจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้เมื่อตรวจสอบบนวุ้นอะกาโรส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vadwai และคณะในปี คศ. 2012 ที่ทำการศึกษารกลายพันธุ์ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ติดต่อยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Fluorquinolones และยา Aminoglycoside ด้วยเทคนิค MAS-PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ *katG* 315 Reverse primer ไพรเมอร์ *rpoB* 531 Forward primer ไพรเมอร์ *gyrA* 94 Forward primer และไพรเมอร์ *rrs* 1401 Reverse primer เป็น Allele specific primer ที่จำเพาะกับโคดอน 315 ของยีน *katG* โคดอน 531 ของยีน *rpoB* โคดอน 94 ของยีน *gyrA* และโคดอน 1401 ของยีน *rrs* ตามลำดับ (100) การศึกษาครั้งนี้ออกแบบให้ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* เป็น Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* ตามลำดับ ขณะที่ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* เป็น Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะกับโคดอนที่ 80 และ 84 ของยีน *parC* ตามลำดับ การออกแบบ Allele specific primer ของแต่ละยีนดังกล่าวให้มีทิศทางการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทางตรงกันข้าม ทำให้ผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* ของยีน *gyrA* มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจนเท่ากับ 443 และ 256 คู่เบสตามลำดับ และผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* ของยีน *parC* มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจนเท่ากับ 272 และ 176 คู่เบสตามลำดับ Allele specific primer ที่ถูกออกแบบทั้งหมดมีความยาวเท่ากับ 20 คู่เบส อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ *parC80F* ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์กับเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ และเมื่อออกแบบเพิ่มความยาวของไพรเมอร์ให้เท่ากับ 22 คู่เบส

ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์กับเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ขนาดยาวจะมีความจำเพาะมากกว่าไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้น (122) ไพรเมอร์ *parC80F* ที่มีความยาวเท่ากับ 22 คู่เบสจึงสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นตรงตำแหน่งที่จำเพาะกับคู่สมได้

นอกเหนือจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแล้ว การปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR อาทิเช่น อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม มีส่วนสำคัญในการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพเนื่องจากมีผลต่อความไวและความจำเพาะของปฏิกิริยา (80) อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา MAS-PCR มีความสำคัญต่อการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (123) ในปฏิกิริยา PCR ทั่วไปนิยมใช้ อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing อยู่ในช่วง 56 ถึง 60 องศาเซลเซียส (80) ในการศึกษาครั้งนี้การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing ของปฏิกิริยา MAS-PCR พิจารณาจากอุณหภูมิหลอมเหลวของ Allele specific primer แต่ละตัว และทดสอบกับอุณหภูมิในช่วงอุณหภูมিরะหว่าง 51 ถึง 67 องศาเซลเซียสสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* อุณหภูมিরะหว่าง 53 ถึง 69 องศาเซลเซียสสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* โดยพบว่าอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* และ *parC* เท่ากับ 55 และ 61 องศาเซลเซียสตามลำดับ

ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา MAS-PCR มีความสำคัญต่อการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (123) หากสัดส่วนของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบ (Primer-to-template ratio) มีค่าสูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิด Primer dimer ในทางตรงกันข้ามหากมีค่าน้อย

เกินไปอาจยับยั้งปฏิกิริยาได้ (80) ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละตัวที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ทั่วไปมีค่าเท่ากับ 0.1 ถึง 0.5 ไมโครโมล ทั้งนี้สามารถปรับความเข้มข้นให้มากขึ้นหรือน้อยลงได้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสม (80) ในการศึกษาครั้งนี้การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละตัวของปฏิกิริยา MAS-PCR ได้พิจารณาความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 ไมโครโมล พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* และยีน *parC* เท่ากับ 1 และ 0.2 ไมโครโมลตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (104)

แมกนีเซียมคลอไรด์มีส่วนช่วยในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และจับกับดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเพื่อเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างสายดีเอ็นเอ (124) โดยทั่วไปความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 1.5 ถึง 2 มิลลิโมล ทั้งนี้สามารถปรับความเข้มข้นให้มากขึ้นหรือน้อยลงได้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อสัดส่วนของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และปริมาณดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตในปฏิกิริยา (80) ในการศึกษาครั้งนี้การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ของปฏิกิริยา MAS-PCR ได้พิจารณาช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 มิลลิโมลสำหรับยีน *gyrA* และ 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 มิลลิโมลสำหรับยีน *parC* พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* และยีน *parC* เท่ากับ 1.5 และ 3.0 มิลลิโมลตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (104, 107)

ในการทำปฏิกิริยา PCR ทั่วไปหากใช้จำนวนรอบที่มากเกินไปอาจส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะ ในทางกลับกันหากใช้จำนวนรอบที่น้อยเกินไปอาจพบจำนวนผลผลิต PCR ที่ต่ำ (125) การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR โดยพิจารณาจำนวนรอบเท่ากับ 20, 25, 30, 35, 40 รอบสำหรับยีน *gyrA* และยีน *parC* พบว่าจำนวนรอบที่เหมาะสม

ที่สุดสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* และยีน *parC* เท่ากับ 30 รอบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (46,79) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ ความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต และความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ตามการศึกษาของ Oram และคณะ (104) และของ Vila และคณะ (107) และพบว่ามีความเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* และยีน *parC* เมื่อนำมาทดสอบร่วมกับการหาสถานะที่เหมาะสมของอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา

เทคนิค MAS-PCR ได้ถูกพัฒนาอย่างแพร่หลายเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ *M. tuberculosis* (100, 101, 126) ตัวอย่างเช่น การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 ของยีน *katG* โคดอน 531 ของยีน *rpoB* โคดอน 94 ของยีน *gyrA* และโคดอน 1401 ของยีน *rrs* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Fluoroquinolones และยา Aminoglycoside ตามลำดับ ในเชื้อ *M. tuberculosis* (100) และพบว่ามีประสิทธิภาพดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Sequencing (100, 127) เทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจวินิจฉัยพบการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sequencing การศึกษาก่อนหน้าของ Kim และคณะได้ทำการพัฒนาเทคนิค Multiplex real-time PCR เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 91 ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones พบว่ามีความสอดคล้องกับเทคนิค Sequencing มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (81) แม้ว่าเทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นจะสามารถตรวจพบการ

กลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 87 และ 80 ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ตามลำดับของเชื้อทุกสายพันธุ์ (ความไวเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามเทคนิค MAS-PCR ไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอน Serine83-Leucine (TCG เป็น TTG) ของยีน *gyrA* ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 3 สายพันธุ์ (ความไวเท่ากับ 96.97 เปอร์เซ็นต์) ตำแหน่งโคดอน Glutamate84-Valine (GAA เป็น GTA) ของยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 2 สายพันธุ์ และตำแหน่งโคดอน Glutamate84-Glycine (GAA เป็น GGA) ของยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 1 สายพันธุ์ (ความไวเท่ากับ 93.33 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้ อาจเกิดจาก Allele specific primer ที่ถูกออกแบบมีปลายด้าน 3' ที่ไม่สามารถจำแนกการเปลี่ยนแปลงเบสเพียงหนึ่งจุดระหว่างลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ออกจากลำดับเบสปกติได้ การออกแบบ Allele specific primer ให้มีปลายด้าน 3' ที่มีเบสคู่สมจำเพาะกับเบสที่ไม่มีการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นอีก 1 ถึง 3 เบส อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการจำแนกระหว่างลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ออกจากลำดับเบสปกติได้ (107) อย่างไรก็ตามเทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา Quinolones ได้อย่างถูกต้องทั้งหมด 111 สายพันธุ์ (ความจำเพาะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบด้วยวิธี Sequencing ยกเว้นตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* ที่เทคนิค MAS-PCR ให้ผลบวกปลอมในเชื้อ *E. coli* จำนวน 1 สายพันธุ์ (ความจำเพาะเท่ากับ 98.48 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ด้วยวิธี E-test® พบว่าเทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถตรวจวินิจฉัยพบการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* ตามลำดับของเชื้อทุกสายพันธุ์ (ความไว

เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามเทคนิค MAS-PCR มีความไวในการตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* ค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าเพียง 45.26 และ 46.74 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ตามลำดับ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เพียงตำแหน่งเดียวสามารถทำให้เชื้อ *E. coli* ตีต่อยากลุ่ม Quinolones ได้ ในขณะที่เดียวกันพบว่ายีน *gyrA* เป็นเป้าหมายหลักของยา กลุ่ม Quinolone ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (59, 81) จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อ *E. coli* จำนวน 52 และ 49 สายพันธุ์ที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* ตีต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามเทคนิค MAS-PCR ให้ผลในการตรวจพบการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าวสอดคล้องกับผลจากเทคนิค Sequencing

เทคนิค MAS-PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* ในเชื้อ *E. coli* ที่ตีต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin ได้อย่างถูกต้องทั้งหมดทุกสายพันธุ์ (ความจำเพาะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) ยกเว้น ณ ตำแหน่งโคดอนที่ 83 ของยีน *gyrA* ที่มีความจำเพาะเพียง 62.50 และ 63.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แม้ว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 6 และ 7 สายพันธุ์ที่ถูกตรวจพบการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอนที่ 83 ของยีน *gyrA* ด้วยเทคนิค MAS-PCR ยังคงไวต่อยาทั้งสองชนิด แต่พบว่าเชื้อบางสายพันธุ์มีค่าความค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น (62)

เทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตำแหน่งที่อยู่บนยีน *gyrA* และยีน *parC* ของเชื้อ *E. coli* ได้ที่ความเข้มข้นตีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุด (Limit of detection) เท่ากับ 100 นาโนกรัม ขณะเดียวกันเมื่อนำเทคนิค MAS-PCR มาทดสอบหาปริมาณของเชื้อ *E. coli* น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองได้มีค่าเท่ากับ 6.6×10^4 colony forming

unit ต่อมิลลิลิตร Hegde และคณะได้ทำการพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR เพื่อจำแนกเชื้อ Diarrheageinc *E. coli* ออกจากกันโดยยีนที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และทำการเปรียบเทียบ ปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ระหว่างการทดสอบด้วยเทคนิค Multiplex PCR และ Single PCR พบว่าปริมาณเชื้อน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้มีค่าเท่ากับ 10^5 และ 10^3 colony forming unit ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (128) การทดสอบด้วยเทคนิคที่ใช้หลักการ Multiplex PCR อาจมีความไวของปฏิกิริยาที่ต่ำกว่าการทดสอบที่ใช้หลักการ PCR ปกติ (129) ทั้งนี้เนื่องมาจากมี ปัจจัยของการเกิด PCR bias รบกวนน้อยกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งจำนวนของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา (126)

เมื่อนำเทคนิค MAS-PCR มาทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ อื่นๆ พบว่าไพรเมอร์ในปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* มีความจำเพาะที่สูงโดยไม่สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ได้ ขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *K. pneumoniae* ไพรเมอร์ *gyrA83F* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต้นแบบของเชื้อ *S. dysenteriae* และเชื้อ *S. choleraesuis* และไพรเมอร์ *gyrA87R* สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *Y. enterocolitica* เชื้อทั้งหมดดังกล่าวอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับเชื้อ *E. coli* จึงมีลำดับเบสบางส่วนที่อาจมีความคล้ายกัน (2) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *uspA* ของเชื้อ *E. coli* เป็นยีนควบคุม ภายในร่วมด้วยจึงสามารถจำแนกผลผลิตที่เป็นของเชื้อ *E. coli* ออกจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ได้ ยีน *uspA* ควบคุมการสร้าง Universal stress protein หรือโปรตีน Usp Chen และคณะได้ ทำการศึกษาลำดับเบสที่จำเพาะบริเวณยีน *uspA* พบว่าสามารถใช้จำแนกเชื้อ *E. coli* ออกจาก แบคทีเรียแกรมลบได้อย่างมีประสิทธิภาพ (105)

เทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นไม่ได้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *gyrB* และยีน *parC* ซึ่งอยู่บน Quinolone resistance determining regions รวมไปถึงกลไกการดื้อยาของกลุ่ม Quinolones อื่นๆ ได้แก่ การเพิ่มการขับยาออกสู่นอกเซลล์ การสร้างโปรตีนเพื่อป้องกันการเข้าจับของตัวยา และการสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายฤทธิ์ของยา (8, 61) เนื่องมาจากการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* เป็นตำแหน่งหลักที่สัมพันธ์กับการดื้อยาของกลุ่ม Quinolones ของเชื้อ *E. coli* ประมาณ 98 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถให้ข้อมูลบ่งชี้กลไกการดื้อยาของเชื้อได้อย่างเพียงพอและมีประสิทธิภาพ (61) ในการศึกษาครั้งนี้ได้พยายามปรับการทดสอบ MAS-PCR ของยีนทั้งสองให้อยู่ในหลอดทดลองเดียวกัน เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการทำปฏิกิริยา แต่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับอุณหภูมิหลอมเหลวของไพรเมอร์ของยีนทั้งสองที่มีความแตกต่างกันมาก ซึ่งทำให้สภาวะในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีนทั้งสองไม่สามารถใช้สภาวะเดียวกันได้ (122) จากผลความไวและความจำเพาะที่ดีของเทคนิค MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้น สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่โคดอนหลักได้ครบทั้ง 4 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ouabdesselam และคณะซึ่งใช้เทคนิค Single-strand conformational polymorphism analysis ตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้เฉพาะในยีน *gyrA* แต่ไม่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีน *parC* (17) เทคนิค MAS-PCR เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและขั้นตอนไม่ยุ่งยาก เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Nakao และคณะที่ทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* และ *parC* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism ซึ่งใช้ระยะเวลาและขั้นตอนที่มากกว่า (16) อีกทั้งยังมีราคาประหยัดกว่าเทคนิค Sequencing ซึ่งมีราคาสูงและต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงกว่า (130)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้หาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งโคดอนที่กลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และยีน *parC* กับการดื้อยา Ciprofloxacin และ Levofloxacin และพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์แบบจุดเดียว ณ ตำแหน่งโคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และตำแหน่งโคดอน 80 และ 84 ของยีน *parC* ซึ่งเป็นกลไกหลักของการดื้อยาในกลุ่ม Quinolones ในเชื้อ *E. coli* จำนวนทั้งหมด 111 สายพันธุ์ จากการทดสอบความไวต่อยา Ciprofloxacin และยา Levofloxacin พบว่าเชื้อไวต่อยาทั้งสองชนิดจำนวน 16 และ 19 สายพันธุ์ ดื้อปานกลางต่อยาทั้งสองชนิดจำนวน 3 และ 16 สายพันธุ์ และดื้อต่อยาทั้งสองชนิดจำนวน 92 และ 76 สายพันธุ์ตามลำดับ เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีน *gyrA* และยีน *parC* ด้วยเทคนิค Sequencing พบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์บนยีนดังกล่าวจำนวน 99 สายพันธุ์ (89.19 เปอร์เซ็นต์) โดยพบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 8 รูปแบบ ได้แก่ Serine83-Leucine ซึ่งพบมากเป็นอันดับหนึ่ง และ Aspartate87-Asparagine Aspartate87-Tyrosine Serine80-Isoleucine Glutamate84-Valine Glutamate84-Glycine Alanine90-Valine และ Alanine108-Threonine เชื้อจำนวนจำนวน 92 สายพันธุ์ (82.88 เปอร์เซ็นต์) มีการกลายพันธุ์รวมอย่างน้อย 3 ตำแหน่งที่โคดอน 83 และ 87 ของยีน *gyrA* และที่ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* ดังนี้ Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Asparagine และ Serine80-Isoleucine พบในเชื้อจำนวน 88 สายพันธุ์ (79.28 เปอร์เซ็นต์) และ Serine83-Leucine ร่วมกับ Aspartate87-Tyrosine และ Serine80-Isoleucine พบในเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ (3.60 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งการกลายพันธุ์รูปแบบดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการดื้อระดับสูงต่อยา Ciprofloxacin และ/หรือยา Levofloxacin

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *gyrA* ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gyrA* และยีน *uspA* ไพรเมอร์ *gyrA83F* และไพรเมอร์ *gyrA87R* อย่างละ 1 ไมโครโมล ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิโมล ดิออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต 200 ไมโครโมล PCR บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1.5 ยูนิต ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2.5 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาได้ผลผลิต MAS-PCR ของไพรเมอร์แต่ละตัวมีขนาด 647, 884, 443, 256 คู่เบสตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *parC* ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *parC* และยีน *uspA* ไพรเมอร์ *parC80F* และไพรเมอร์ *parC84R* อย่างละ 0.2 ไมโครโมล ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 3.0 มิลลิโมล ดิออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต 400 ไมโครโมล บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปฏิกิริยา MAS-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาได้ผลผลิต MAS-PCR ของไพรเมอร์แต่ละตัวมีขนาด 395, 884, 272, 176 คู่เบสตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค MAS-PCR กับเทคนิค Sequencing พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเมื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เท่ากับ 96.97, 100, 100, 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตำแหน่งโคดอน 87 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ

100, 100, 100, 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 100, 100, 100, 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 93.33, 98.48, 97.67, 95.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค MAS-PCR กับการทดสอบความไวต่อยาในกลุ่ม Quinolones พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเมื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 83 ของยีน *gyrA* เท่ากับ 94.74, 62.50 ถึง 63.16, 92.71-93.75, 66.67-80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตำแหน่งโคดอน 87 ของยีน *gyrA* มีค่าเท่ากับ 96.84 ถึง 100, 100, 100, 84.21 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตำแหน่งโคดอน 80 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 96.84 ถึง 100, 100, 100, 84.21 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตำแหน่งโคดอน 84 ของยีน *parC* มีค่าเท่ากับ 45.26 ถึง 46.74, 100, 100, 23.53 ถึง 27.9 เปอร์เซ็นต์ เทคนิค MAS-PCR เป็นเทคนิคที่มีขั้นตอนการทดสอบที่สะดวก ไม่ซับซ้อน ใช้เวลาในการทดสอบน้อย สามารถทำการทดสอบได้ที่ละหลายๆ และให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยหากการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยา Quinolone เชื้อ *E. coli*

รายการอ้างอิง

1. Mahon CR, Manuselis G. *Enterobacteriaceae*. In: Mahon CR, Manuselis G , editors. Textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: W.B. saunders company; 2000. p. 463-510.
2. Nataro JP, Bopp CA, Fields PA, Kaper JB, Strockbine NA. *Escherichia Shigella and Salmonella*. In: Verssalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock, editors. Manual of clinical microbiology. 2. 10 ed. Washigton DC: ASM press; 2011. p. 603-13.
3. Engelkirk P, Engelkirk J. Laboratory diagnosis of infectious disease. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
4. Goering RV, Dockrell HM, Wakelin D, Zuckerman M, Chiodini PL, Roitt IM. Mim's medical microbiology. 4th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008.
5. Gootz TD, Brighty KE. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. In: Andraiole VT, editor. The quinolones. 2nd ed. California: Academic press; 1998.
6. National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand Antibiogram 2000-2015 [Internet]. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Department of Medical Sciences Ministry of Public Health Thailand; [cited 2015 Aug 1]. Available from <http://narst.dmsc.moph.go.th/>


7. Ramathibodi antibiogram application. Ramathibodi antibiogram version 0.8: [cited 2013 Aug 1]. Available from <http://ramabio.blogspot.com>
8. Finch R, Greenwood D, Whitley R, Norrby SR. Antibiotic and chemotherapy. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2010.
9. Lautenbach E, Metlay JP, Mao X, Han X, Fishman NO, Bilker WB, et al. The prevalence of fluoroquinolone resistance mechanisms in colonizing *Escherichia coli* isolates recovered from hospitalized patients. Clin Infect Dis 2010;51(3): 280-5.
10. Christiansen N, Nielsen L, Jakobsen L, Stegger M, Hansen LH, Frimodt-Moller N. Fluoroquinolone resistance mechanisms in urinary tract pathogenic *Escherichia coli* isolated during rapidly increasing fluoroquinolone consumption in a low-use country. Microb Drug Resist 2011;17(3):395-406.
11. Nam YS, Cho SY, Yang HY, Park KS, Jang JH, Kim YT, et al. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. Int J Antimicrob Agents 2013;42(2):126-9.
12. Furlaneto-Maia L, Rocha KR, Siqueira VL, Furlaneto MC. Comparison between automated system and PCR-based method for identification and antimicrobial susceptibility profile of clinical *Enterococcus spp.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2014;56(2):91-103.

13. Oh KH, Kim SB, Park MS, Cho SH. Development of a one-step PCR assay with nine primer pairs for the detection of five diarrheagenic *Escherichia coli* types. *J Microbiol Biotechnol* 2014;24(6):862-8.
14. Snyder GM, Thom KA, Furuno JP, Perencevich EN, Roghmann MC, Strauss SM, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococci* by healthcare workers on infection control gown and gloves. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(7):583-9.
15. Abdi-Hachesoo B, Asasi K, Sharifiyazdi H. Rapid detection of *Escherichia coli gyrA* and *parC* mutants in one-day-old broiler chicks in Iran. *Vet Ital* 2013;49(3):291-7.
16. Nakano R, Okamoto R, Nakano A, Nagano N, Abe M, Tansho-Nagakawa S, et al. Rapid assay for detecting *gyrA* and *parC* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Methods* 2013;94(3):213-6.
17. Ouabdesselam S, Hooper DC, Tankovic J, Soussy CJ. Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single *gyrA* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(8):1667-70.

18. Ward KN, McCartney AC, Thakker B. Notes on medical microbiology: including virology, mycology and parasitology. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 2008.
19. Shiomi D, Mori H, Niki H. Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Commun Integr Biol* 2009;2(3):219-20.
20. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30(3):382-403.
21. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 1997;41(3):667-710.
22. Machado J, Grimont F, Grimont PA. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res Microbiol* 2000;151(7):535-46.
23. Walker TS. Microbiology. Philadelphia: WB Saunders; 1998.
24. Forbes BA, Sahm DF, AS W. Diagnosis microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007.
25. Remis RS, MacDonald KL, Riley LW, Puhf ND, Wells JG, Davis BR, et al. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann Intern Med* 1984;101(5):624-6.
26. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(2):123-40.

27. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol* 2005;295(6-7):455-62.
28. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* 2007;4(2):134-63.
29. Toval F, Köhler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2014;52(2):407-18.
30. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA . *Medical microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Saunder; 2013.
31. Nelson KE, Williams C. *Infectious Disease Epidemiology: Theory And Practice*. *Am J Epidemiol* 2008;167(8):1014-15.
32. วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, อิสยา จันทรวินยานุชิต, พรทิพย์ พึ่งม่วง, สมหญิง งามอรุเลิศ, สุมลรัตน์ ชูวงศ์วัฒน์. การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์. ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2556.
33. Thamlikitkul V, Jintanothaitavorn D, Sathitmethakul R, Vaithayaphichet S, Trakulsomboon S, Danchaivijitr S. Bacterial infections in hospitalized patients in Thailand in 1997 and 2000. *J Med Assoc Thai* 2001;84(5):666-73.
34. Chaiwarith R, Nuntachit N, Chittawatanarat K, Bunchoo M, Supparatpinyo K, Oberdorfer P. Surveillance of Antimicrobial Resistance among Bacterial Pathogens Isolated from Hospitalized Patients at Chiang Mai University Hospital 2006-2009. *J Infect Dis* 2011;28:36-44.

35. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 2013;26(4):822-80.
36. สุวณี สุภเชษฐ์, มาลัย วรวิจิตร. แบคทีเรียพื้นฐาน.กรุงเทพมหานคร : 2545.
37. Holland JL, Louie L, Simor AE, Louie M. PCR Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Directly from Stools: Evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. J Clin Microbiol 2000;38(11):4108-13.
38. Mackenzie AMR, Lebel P OE, Rowe PC, Hyde L, Chan F, Johnson W, et al. Sensitivities and specificities of premier *E. coli* O157 and premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of Infection with verotoxin (shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1998;36(6):1608-11.
39. มาลัย วรวิจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณมา ตระกูลสมบุญ, สุรางค์ เดชศิริเลิศ. คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป .กรุงเทพมหานคร; 2557.
40. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004;99(6):545-52.
41. Bando SY, Trabulsi LR, Moreira-Filho CA. Genetic relationship of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes among the enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroup. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(2):169-74.

42. Gomez TAT, Toledo MRF, Trabulsi LR, Trabulsi LR, Wood PK, Morris JG. DNA probes for identification of enteroinvasive *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1987;25(10):2025-27.
43. March SB, Ratnam S. Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. J Clin Microbiol 1989;27(7):1675-7.
44. Kumar V, Gupta RK, Kewalramani H, Sikhwal Y, Sharma M, Nayar S. Genetic differentiation of *Escherichia coli* strains isolated from the urinary tract infected patients. International Journal of Microbiology and Allied Sciences 2015;2(1): 17-22.
45. Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995;33(8):2188-91.
46. Walker R, Whittlesea C. Clinical pharmacy and therapeutics. 5 ed. London: Churchill Livingstone; 2011. 
47. World Health Organization. WHO model prescribing information drugs used in bacterial infections 2001;39.
48. Schaumann R, Rodloff AC. Activities of quinolones against obligately anaerobic bacteria. Anti-Infective Agents 2007;6(1):49-56.
49. Emami S, Shafiee A, Foroumadi A. Quinolones recent structural and clinical developments. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2005;4(3):123-36.
50. Somasundaram S, Manivanan K. An overview of Fluoroquinolones. Annual review & research in biology 2013;3(3):296-313.

51. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones action and resistance updated. *Curr Top Med Chem* 2009;9(11):981-98.
52. Fabrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2009;2(1):40-61.
53. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(2):385-92.
54. Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(4):256-80.
55. Levine C, Hiasa H, Marians KJ. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400(1-3):29-43.
56. Nöllmann M, Crisona NJ, Arimondo PB. Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase from in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie* 2007;89(4):490-9.
57. Corbett KD, Schoeffler AJ, Thomsen ND, Berger JM. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol* 2005;351(3):545-61.
58. Bergan T. Pharmacokinetics of the fluoroquinolones. In: Andraiole VT, editor. *The quinolones*. California: Academic press; 1998. p. 143-82.
59. Minarinil LAR, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *BrazJMicrobiol* 2012;43(4):1309-14.

60. Scheld WM. Maintaining fluoroquinolone class efficacy review of influencing factors. *Emerg Infect Dis* 2003;9(1):1-9.
61. Cavaco LM, Frimodt-Moller N, Hasman H, Guardabassi L, Nielsen L, Aarestrup FM. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist* 2008;14(2):163-9.
62. Aoike N, Saga T, Sakata R, Yoshizumi A, Kimura S, Iwata M, et al. Molecular characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolates in Japan relationship between sequence types and mutation patterns of quinolone resistance-determining regions analyzed by pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2013;51(6):1692-8.
63. Uchida Y, Mochimaru T, Morokuma Y, Kiyosuke M, Fujise M, Eto F, et al. Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(4):387-9.
64. Takahashi A, Muratani T, Yasuda M, Takahashi S, Monden K, Ishikawa K, et al. Genetic profiles of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* isolates obtained from patients with cystitis phylogeny virulence factors PAI_{usp} subtypes and mutation patterns. *J Clin Microbiol* 2009;47(3):791-5.

65. Baudry-Simner PJ, Singh A, Karlowsky JA, Hoban DJ, Zhanel GG. Mechanisms of reduced susceptibility to ciprofloxacin in *Escherichia coli* isolates from Canadian hospitals. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2012;23(3):60-4.
66. Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(4):879-85.
67. Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJ. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(10):2380-6.
68. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1001-5.
69. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(6):1271-2.
70. Fendukly F, Karlsson I, Hanson HS, Kronvall G, Dornbusch K. Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *APMIS* 2003;111(9):857-66.

71. Lindgren PK, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(10):3222-32.
72. Lee YJ, Cho JK, Kim KS, Tak RB, Kim AR, Kim JW, et al. Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *J Microbio* 2005;43(5):391-7.
73. Vanni M, Meucci V, Tognetti R, Cagnardi P, Montesissa C, Piccirillo A, et al. Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poult Sci* 2014;93(4):856-63.
74. Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012;2012(2012).
75. Asensio A, Alvarez-Espejo T, Fernandez-Crehuet J, Ramos A, Vaque-Rafart J, Bishopberger C, et al. Trends in yearly prevalence of third-generation cephalosporin and fluoroquinolone resistant *Enterobacteriaceae* infections and antimicrobial use in Spanish hospitals Spain 1999 to 2010. *Euro Surveill* 2011;16(40).
76. Sianglum W, Wonglumsom W, Srimanote P, Kittiniyom K. Analysis of *gyrA* mutations related to quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates originating from pet, human, vegetable and ice in Bangkok and vicinity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38(6):1095-101.

77. Ortiz JH. Manual of antimicrobial susceptibility testing. In: Coyle MB, editor. American Society for Microbiology; 2005. p. 35-53.
78. Ogbolu DO, Terry-Alli OA, Daini OA, Olabiyi FA, Igharo EA. Comparison of E-test with other conventional susceptibility testing methods for ciprofloxacin and gentamicin against gram negative enteric bacilli. Afr J Med Med Sci 2012;41(2):135-40.
79. Fasching CE, Tenover FC, Slama TG, Fisher LM, Sreedharan S, Oram M, et al. GyrA mutations in ciprofloxacin-resistant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Indiana Minnesota and Tennessee. J Infect Dis 1991;164(5):976-9.
80. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction a practical approach. J Clin Lab Anal 2002;16:47-51.
81. Kim J, Jeon S, Kim H, Park M, Kim S, Kim S. Multiplex real time polymerase chain reaction based method for the rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in Quinolone resistant *Escherichia coli* and *Shigella spp.* Osong Public Health Res Perspect 2012;3(2):113-7.
82. Hayashi K. PCR-SSCP a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods Appl 1991;1(1):34-8.
83. Eaves DJ, Liebana E, Woodward MJ, Piddock LJ. Detection of *gyrA* Mutations in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica* by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. J Clin Microbiol 2002;40(11):4121-5.

84. Butler JM, Reeder DJ. Detection of DNA polymorphisms using PCR-RFLP and capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2001;163:49-56.
85. Ngoi ST, Thong KL. High resolution melting analysis for rapid mutation screening in gyrase and topoisomerase IV genes in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Biomed Res Int* 2014;2014(2014).
86. França LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* 2002;35(2):169-200.
87. Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, Song YS. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet* 2011;12(6):443-51.
88. Darawi MN, Ai-Vyrn C, Ramasamy K, Hua PP, Pin TM, Kamaruzzaman SB, et al. Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Med Genet* 2013;14(27):14-27.
89. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol* 2003;5(2):43-60.
90. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17(7):2503-16.
91. Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W, et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods* 2012;8(1):34.

92. Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy transfer labeled primers. *Genome Res* 2001;11(1):163-9.
93. Wareham DW, Umoren I, Khanna P, Gordon NC. Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for rapid detection of the *aac(6')-Ib-cr* quinolone resistance gene. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(5):467-7.
94. Nishizawa T, Suzuki H, Umezawa A, Muraoka H, Iwasaki E, Masaoka T, et al. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):303-5.
95. Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. Allele-specific PCR in SNP Genotyping. In: Antron AK, editor. *Single nucleotide polymorphisms method and protocol*. New York: Humana press; 2009. p. 415-25.
96. Nichols RA, Moore JE, HV S. A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium* positive human faeces for outbreak investigations. *J Microbiol Methods* 2006;65(3):512-24.
97. Bi R, Zhang AM, Yu D, Chen D, YG. Y. Screening the three LHON primary mutations in the general Chinese population by using an optimized multiplex allele-specific PCR. *Clin Chim Acta* 2010;411(21-22):1671-4.

98. Ahmad S, Khan Z, Hagen F, JF M. Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. *Environ Res* 2014;133:20-6.
99. Bagheri M, Rad IA. A Multiplex allele specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) for the Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A. *Maedica Buchar* 2011;6(6):3-9.
100. Vadwai V, Shetty A, Rodrigues C. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. *Tuberculosis* 2012;92(3):236-42.
101. Yang Z, Durmaz R, Yang D, Gunal S, Zhang L, Foxman B, et al. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53(3):201-8.
102. ปุญญพัฒน์ ไชยเมล์. การกำหนดขนาดตัวอย่างสำหรับการวิจัยเชิงพรรณนาในงานสาธารณสุข. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ* 2556;16(2):10-18
103. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23
104. Oram M, Fisher LM. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(2):387-9.

105. Chen J, Griffiths MW. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett Appl Microbiol* 1998;27(6):369-71.
106. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Anta MT. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(2):491-3.
107. J Vila, J Ruiz, P Goñi, A Marcos, Anta TJ. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(5):1201-3.
108. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
109. Kim KH , Cho JI, Cheung CY, Lim JM, Cho S, Cho DH, et al. Development of multiplex PCR assays to identify *Escherichia coli* pathogenic genes in food. *Food Sci Biotechnol* 2010;19(5):1205-10.
110. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1375-7.
111. Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatr*. 2007;96(3):338-41.

112. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 1997; [cited 2015 Nov 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/u00096>.
113. Lu PL, Liu YC, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the asia-pacific region: 2009-2010 results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:37-43.
114. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 2009;49(11):1749-55.
115. Deak E, Hindler JA, Skov R, Sjölund-Karlsson M, Sokovic A, Humphries RM. Performance of Etest and disk diffusion for detection of ciprofloxacin and levofloxacin resistance in *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol* 2015;53(1):298-301.
116. Landry E, Sulz L, Bell A, Rathgeber L, Balogh H. Urinary tract infections leading initiatives in selecting empiric outpatient treatment (UTILISE). *Can J Hosp Pharm* 2014;67(2):116-25.
117. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25(5):358-73.

118. Fu Y , Zhang W , Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. BMC Infectious Diseases 2013;13(8).
119. Lu T, Zhao X, Li X, Drlica-Wagner A, Wang JY, Domagala J, et al. Enhancement of fluoroquinolone activity by C-8 halogen and methoxy moieties: action against a gyrase resistance mutant of *Mycobacterium smegmatis* and a gyrase-topoisomerase IV double mutant of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(10):2703-9.
120. Aarts HJ, Boumedine KS, Nesme X, Cloeckert A. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. Vet Res 2001;32(3-4):363-80.
121. Zirstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. J Clin Microbiol 1999;37(10):3276-80.
122. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. PCR Methods Appl 1993;3(3):30-7.
123. Sipos R, Székely AJ, Palatinszky M, Révész S, Márialigeti K, Nikolausz M. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. FEMS Microbiol Ecol 2007;60(2):341-50.

124. Besseris GJ. A Fast-and-Robust Profiler for Improving Polymerase Chain Reaction Diagnostics. PLoS One 2014;9:9.
125. Wu JY, Jiang XT, Jiang YX, Lu SY, Zou F, Zhou HW. Effects of polymerase, template dilution and cycle number on PCR based 16 S rRNA diversity analysis using the deep sequencing method. BMC Microbiology 2010;10:255.
126. Imperiale BR, Cataldi AA, Morcillo NS. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. Int J Tuberc Lung Dis 2011;15(4):496-501.
127. Chia BS, Lanzas F, Rifat D, Herrera A, Kim EY, Sailer C, et al. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. PLoS One 2012;7(7):e40456.
128. Hegde A, Ballal M, Shenoy S. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Indian J Med Microbiol 2012;30(3):279-84.
129. Wadowsky RM, Michaels RH, Libert T, Kingsley LA, Ehrlich GD. Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. J Clin Microbiol 1996;34(11):2645-9.
130. Valadan R, Sharifiyazdi H, MirzaeiAffiliated A, Hedayatian K. Development of a multiplex allele-specific PCR assay for rapid screening of Lactoferrin TATA box polymorphisms. Comp Clin Patho 2013;22(6):1241-4.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tripicase soy agar (TSA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth จำนวน 30 กรัม และ agar bacteriological (agar No.1) จำนวน 15 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิตร ผสมจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 มิลลิตรลงในจานพลาสติกโดยใช้เครื่องปั๊มอัตโนมัติ ทิ้งไว้จนแข็งและผิวน้ำแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth จำนวน 21 กรัม และ agar bacteriological (agar No.1) จำนวน 15 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิตร ผสมจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 มิลลิตรลงในจานพลาสติกโดยใช้เครื่องปั๊มอัตโนมัติ ทิ้งไว้จนแข็งและผิวน้ำแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. วิธีเตรียม Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

ละลายทริสเบส (Tris base) จำนวน 121.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิตร ปรับค่า pH โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ค่า pH เท่ากับ 8.0 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. วิธีเตรียม EDTA ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

ละลาย EDTA จำนวน 136.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วยกรด โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้ได้ pH เท่ากับ 8.0 ผสมให้เข้ากันจน EDTA ละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. วิธีเตรียม Tris EDTA บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 เท่า (10x TE buffer)

ผสม Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0 (ที่เตรียมได้จากข้อ 1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เข้ากับ EDTA ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 (ที่เตรียมได้จากข้อ 2) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 197.6 มิลลิลิตร

6. วิธีเตรียม TBE ความเข้มข้น 10 เท่า (10x TBE)

ละลายทริสเบส จำนวน 108 กรัม กรดบอริก จำนวน 55 กรัม และ EDTA ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 (ที่เตรียมได้จากข้อ 2) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว สุกัลยาณี อ่อนสีแดง เกิดวันที่ 14 เมษายน พ.ศ. 2526 ที่แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2549 และในปี 2555 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์ ระดับโมเลกุลทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



