

การพัฒนาวิธีการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีแนม ของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ด้วยวิธี
Recombinase Polymerase Amplification ในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF CARBAPENEM RESISTANT GENES DETECTION IN *Klebsiella pneumoniae* BY RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION IN QUEEN SIRIKIT
NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH



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

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการตรวจยืนยันเชื้อยาคาร์บาพีเนม ของเชื้อ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ด้วยวิธี Recombinase Polymerase Amplification ในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหाराชินี
โดย	น.ส.สุธาวรรณ มุฑิตานนท์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานัน รัชวงศ์จิรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์)

สุทธาวรณ มุทิตานนท์ : การพัฒนาวิธีการตรวจยีนดื้อยา carbapenem ของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ด้วยวิธี Recombinase Polymerase Amplification ในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี. (DEVELOPMENT OF CARBAPENEM RESISTANT GENES DETECTION IN *Klebsiella pneumoniae* BY RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION IN QUEEN SIRIKIT NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.นันทรี ชัยชนะ วงศาโรจน์

เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases (KPCs) เป็นปัญหาสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลโดยเฉพาะผู้ป่วยเด็ก เนื่องจากมักดื้อยาหลายขนาน ทำให้มียาที่ใช้รักษาได้จำกัด เป็นสาเหตุทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูงขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex Recombinase Polymerase Amplification (multiplex RPA) สำหรับตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ *K. pneumoniae* และเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะกับ วิธี Modified Carbapenem Inactivation Method Test (mCIM) และ วิธี nucleotide sequencing กับตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* ในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึง ธันวาคม 2018 โดยเก็บเชื้อที่ผลการคัดกรองพบดื้อยา carbapenem แบ่งเป็นจาก perianal ในงานเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา จำนวน 129 ตัวอย่าง และจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยเด็ก จำนวน 21 ตัวอย่าง พบให้ผลบวกกับวิธี mCIM จำนวน 149 ตัวอย่าง (99.3%) และพบเป็นยีน bla_{NDM-1} สูงสุดถึงร้อยละ 89.3 รองลงมาคือยีน $bla_{OXA-232}$ ร้อยละ 8 และยีน bla_{NDM-1} ร่วมกับ $bla_{OXA-232}$ ร้อยละ 2 ตามลำดับ เชื้อที่แยกได้จากสิ่งตรวจพบมีการดื้อยาหลายขนาน โดยดื้อยา carbapenem ร่วมกับ gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin ขณะที่เชื้อที่แยกจากแผนกผู้ป่วยต่าง ๆ ในงานเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา พบการแพร่กระจายของยีน bla_{NDM-1} สูงสุดใน 4 แผนก จาก 9 แผนก การพัฒนาเทคนิค multiplex RPA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ที่ 37 °C ภายในเวลา 25 นาที ชัดจำกัดต่ำสุดในการตรวจยีน bla_{NDM} , bla_{VIM} , $bla_{OXA-48-like}$ เท่ากับ 1 ng ยีน bla_{IMP} เท่ากับ 10 ng bla_{KPC} เท่ากับ 0.1 ng ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* และ *Enterococcus faecalis* มีความไวและความจำเพาะในการตรวจหา ยีน bla_{NDM} ร้อยละ 100 (95%CI: 97.34%-100.00% และ 95%CI: 75.29%-100.00%) และ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 100 (95%CI: 78.20%-100.00% และ 95%CI: 97.30%-100.00%) มีค่าความสอดคล้องในระดับดีมาก (k=1) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี mCIM และ วิธี nucleotide sequencing ดังนั้น เทคนิค multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่ใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่รวดเร็ว สามารถนำไปใช้ในการตรวจชนิดยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทางอณูชีววิทยาได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการติดตาม เฝ้าระวัง และควบคุม การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา carbapenemase resistance *Klebsiella pneumoniae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา ภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6076756037 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD:

Sutawan Mutitanon : DEVELOPMENT OF CARBAPENEM RESISTANT GENES DETECTION IN *Klebsiella pneumoniae* BY RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION IN QUEEN SIRIKIT NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH. Advisor: Assoc. Prof. NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D.

Klebsiella pneumoniae producing carbapenemases (KPCs) is a serious problem in nosocomial infection, especially in pediatric patients. Due to KPCs are regularly multi-drug resistance which have limit drug of choice for treatments leading to significant higher mortality. The objective of this study was to develop multiplex Recombinase Polymerase Reaction (multiplex RPA) to detect carbapenemase genes of *K. pneumoniae* and compared sensitivity and specificity with Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) and nucleotide sequencing. *K. pneumoniae* clinical isolates were collected from Queen Sirikit National Institute of Child Health (QSNICH), Thailand, during June to December 2018 comprising of 129 perianal samples of antimicrobial resistant (AMR) surveillance and 21 samples of routine specimens. 149 isolates (99.3%) were positive with mCIM. The bla_{NDM-1} gene (bla_{NDM-1}) was the most prevalence (89.3%) followed by $bla_{OXA-232}$ (8%) and bla_{NDM-1} with $bla_{OXA-232}$ (2%), respectively. The KPCs isolated from routine specimens were multidrug resistance with co-resistance with gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin. While, KPCs isolates from AMR surveillance, the bla_{NDM-1} gene was found highest in four from nine department. The bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} was successfully amplified by multiplex RPA at 37 °C within 25 min. Limit of detection was 1 ng for bla_{NDM} , bla_{VIM} , $bla_{OXA-48-like}$ gene, 10 ng for bla_{IMP} gene and 0.1 ng for bla_{KPC} gene and no cross-reaction with *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* and *Enterococcus faecalis*. The sensitivity and specificity of bla_{NDM} gene was 100% (95%CI: 97.34%-100.00% and 95%CI: 75.29%-100.00%) and $bla_{OXA-48-like}$ was 100% (95%CI: 78.20%-100.00% and 95%CI: 97.30%-100.00%) and had almost perfect agreement ($k=1$) when compared with mCIM and nucleotide sequencing. The developed multiplex RPA is rapid and applicable for detection of carbapenemase genes in low-resource settings. This will be useful for effective treatment, control and surveillance of carbapenemase resistance *Klebsiella pneumoniae*.

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ จึงขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณามอบความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และได้ให้ความอนุเคราะห์ตีเอนเอของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจ และตีเอนเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ แนวความคิด และประสบการณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2563 ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านเพื่อการศึกษาต่อ และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง แห่งคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาต่าง ๆ จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

สุธาวรรณ มุทิตานนท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
3. คำถามของการวิจัย	5
4. สมมติฐาน	5
5. ขอบเขตงานวิจัย.....	5
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
1. คุณลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2. ปัจจัยที่ส่งเสริมต่อการก่อโรคของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i>	9
3. ระบาดวิทยา.....	11
4. การรักษา	13
5. ยา Carbapenem.....	13
6. Carbapenem Resistant <i>Enterobacteriaceae</i> (CRE).....	17

7. โครงสร้างของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase แบ่งตาม Ambler class ของแต่ละเอนไซม์ดังนี้.....	20
8. ระบาดวิทยาของ CRE	23
9. การรักษาการติดเชื้อ CRE	26
10. การป้องกันและควบคุมการระบาดของเชื้อ CRE	27
11. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase	27
11.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับพีโนไทป์.....	27
11.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับจีโนไทป์	35
12. Recombinase polymerase amplification (RPA).....	37
13. การประยุกต์ใช้เทคนิค RPA.....	41
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	42
1. สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์	42
2. เครื่องมือ	42
3. วิธีการทดลอง.....	43
3.1 กลุ่มประชากรและลักษณะของกลุ่มตัวอย่าง	43
3.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้	44
3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase.....	44
3.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM).....	45
3.5 การสกัดสารพันธุกรรม.....	45
3.6 การเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยเทคนิค PCR..	46
3.7 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)	47
3.8 การวิเคราะห์ลำดับเบส	47

3.9 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA.....	48
3.10 การทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA.....	50
3.11 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA.....	50
3.12 การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA.....	54
3.13 การทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA.....	54
3.14 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยก ได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA.....	55
3.15 การคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: NPV) ของเทคนิค multiplex RPA.....	55
3.16 การคำนวณหาค่าความสอดคล้องกันของผลการตรวจของเทคนิค multiplex RPA โดย ใช้สถิติ Kappa.....	57
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	59
1. การตรวจการดื้อยา carbapenem ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i>	59
2. การเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยเทคนิค PCR.....	60
3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>bla</i> _{NDM} และ ยีน <i>bla</i> _{OXA-48-like}	62
4. การเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยเทคนิค singleplex RPA.....	62
4.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA.....	62
4.2 การศึกษาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA.....	63
5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA.....	65

5.1 การศึกษาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA 65

5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA..... 68

5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA..... 68

5.4 การศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA..... 69

5.5 การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA 70

5.6 การทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA 72

5.7 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA..... 73

5.8 การคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: PPV) ของเทคนิค multiplex RPA 75

5.9 การคำนวณหาค่าความสอดคล้องกันของผลการตรวจด้วยเทคนิค multiplex RPA โดยใช้สถิติ Kappa..... 76

6. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ 76

7. การกระจายของยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ในดีเอ็นเอผู้ป่วยและสิ่งตรวจชนิดต่าง ๆ..... 77

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง..... 79

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 89

บรรณานุกรม..... 91

ภาคผนวก..... 103

ประวัติผู้เขียน..... 121

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ความสามารถของยา carbapenem ในการจับชนิดของ Penicillin-Binding Proteins (PBPs)	16
ตารางที่ 2 การแบ่งชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์ carbapenemase	22
ตารางที่ 3 การแปลผลของ mCIM	33
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบวิธีการทดสอบหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับพีโนไทป์วิธีต่าง ๆ.....	34
ตารางที่ 5 ข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธีการตรวจในระดับพีโนไทป์	35
ตารางที่ 6 ตัวอย่างงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคนิค RPA	41
ตารางที่ 7 แสดงการแปลผลของวิธี mCIM ตามมาตรฐาน CLSI	45
ตารางที่ 8 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	47
ตารางที่ 9 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex RPA.....	49
ตารางที่ 10 ความเข้มข้น primer ของ ยีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} และ <i>waaQ</i> ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA	51
ตารางที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิค multiplex RPA เปรียบเทียบกับผลทดสอบด้วยวิธี Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM).....	56
ตารางที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิค multiplex RPA เปรียบเทียบกับผลทดสอบด้วยวิธี sequencing	56
ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจหายีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยวิธี multiplex RPA กับผลการตรวจหายีน <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} ด้วยวิธี sequencing	57
ตารางที่ 14 แสดงผลการตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี multiplex RPA กับเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง และ ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่าง	74

ตารางที่ 15 ผลการคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหา ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ของเชื้อ *K. pneumoniae* เปรียบเทียบกับวิธี sequencing..... 75

ตารางที่ 16 ผลการคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหา ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ของเชื้อ *K. pneumoniae* เปรียบเทียบกับวิธี mCIM..... 76

ตารางที่ 17 แสดงผลการตรวจเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในงานเฝ้าระวังจากแผนกผู้ป่วย และ สิ่งตรวจชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีคัดกรอง Disk diffusion, mCIM และ PCR 78



สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 วิธี string test..... 8

ภาพที่ 2 A) Sequence type ของการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ของเชื้อ *K. pneumoniae* B) Sequence type ของการดื้อยาในกลุ่ม 3rd generation cephalosporin ของเชื้อ *K. pneumoniae* 12

ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม carbapenem ชนิดต่าง ๆ..... 14

ภาพที่ 4 A. ลักษณะโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม penicillin (2) B. ลักษณะโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม carbapenem วงกลมสีแดงแสดงความแตกต่างของยาในกลุ่ม penicillin และยาในกลุ่ม carbapenem 15

ภาพที่ 5 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม β - lactam..... 16

ภาพที่ 6 กลไกการทำลายยาของเอนไซม์ β - lactamase class A, B, C, D โดยที่ภาพ A คือ กลไกการยับยั้งยา β - lactam โดย serine β - lactamase (class A, C, D) และภาพที่ B คือ กลไกการยับยั้งยา β - lactam โดย Mellato β - lactamase (class B)..... 19

ภาพที่ 7 แผนภูมิต้นไม้ของ Ambler class A, B และ D โดยดูจากค่าเฉลี่ยของ GC content และคุณสมบัติทางฟิโนไทป์..... 20

ภาพที่ 8 โครงสร้างของยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48-like} 22

ภาพที่ 9 การแพร่กระจายของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยแบ่งตามภูมิภาคและประเทศ..... 26

ภาพที่ 10 วิธี Modified Hodge test เชื้อตัวอย่างที่ 1 และ 3 Modified Hodge test positive เชื้อตัวอย่าง ที่ 2 Modified Hodge test negative..... 28

ภาพที่ 11 วิธีการทดสอบโดยอาศัยสารยับยั้ง (Inhibition based test) (A) คือแผ่นยา imipenem เพียงอย่างเดียว (B) แผ่นยา imipenem ที่มีสารยับยั้ง EDTA..... 29

ภาพที่ 12 วิธี multidisk diffusion test..... 30

ภาพที่ 13 วิธี Carbapenem inhibition method (CIM) เชื้อตัวอย่าง A CIM positive ส่วนเชื้อตัวอย่าง B CIM negative..... 31

ภาพที่ 14 วิธี CarbaNP..... 32

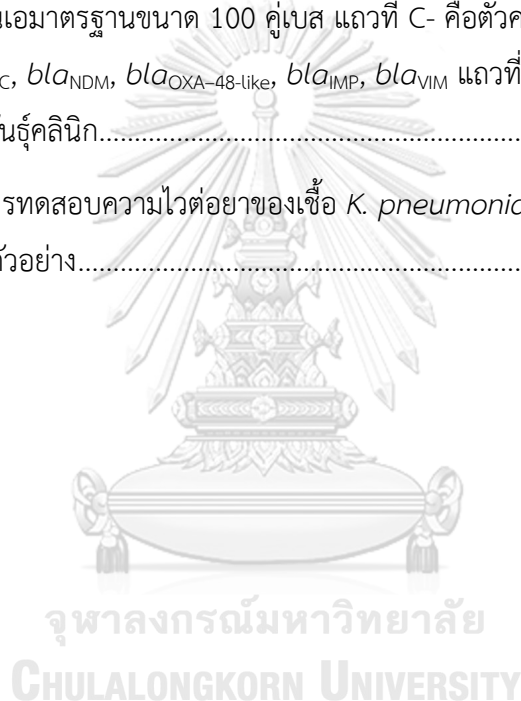
ภาพที่ 15 วิธี mCIM A.) carbapenemase positive B.) carbapenemase negative	33
ภาพที่ 16 กลไกของวิธี Recombinase polymerase amplification (RPA)	37
ภาพที่ 17 กลไกการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี RPA และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Lateral flow.....	39
ภาพที่ 18 แสดงขั้นตอนการเกิด Bridge flocculation.....	40
ภาพที่ 19 แสดงผลการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี Disk diffusion กับยาในกลุ่ม carbapenem ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> จำนวน 150 ตัวอย่าง.....	59
ภาพที่ 20 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี mCIM กับ เชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่ให้ผลดีต่อยา carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง	60
ภาพที่ 21 แสดงผลการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> และ <i>waaQ</i> ด้วยวิธี PCR บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ใน TAE buffer แถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 2 ตัวควบคุมลบ แถวที่ 3-8 คือยีน <i>waaQ</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{NDM}</i> และ <i>bla_{KPC}</i> ตามลำดับ.....	61
ภาพที่ 22 แสดงผลร้อยละของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase แต่ละชนิด ในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่ดีต่อยา carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง; Neg = ไม่พบยีน <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i>	61
ภาพที่ 23 แสดงผลร้อยละของยีน <i>bla_{NDM}</i> และ ยีน <i>bla_{OXA-48-like}</i> แต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ลำดับเบส ในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> ที่ดีต่อยา carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง.....	62
ภาพที่ 24 แสดงผลการศึกษาอนุหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{KPC}-A</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก.....	63
ภาพที่ 25 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ primer ยีน <i>bla_{KPC}-A</i> , <i>bla_{KPC}-B</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 μ M ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก	65
ภาพที่ 26 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> และ <i>waaQ</i> ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่	

ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก.....	67
ภาพที่ 27 แสดงผลการทดสอบอณูพันธุศาสตร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> และ <i>waaQ</i> ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก.....	68
ภาพที่ 28 แสดงผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RPA ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> และ <i>waaQ</i> ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก.....	69
ภาพที่ 29 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก.....	70
ภาพที่ 30 แสดงผลการทดสอบปริมาณดีเอ็นเอยีน <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> ที่น้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก A. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน <i>bla_{NDM}</i> B. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน <i>bla_{VIM}</i> และ <i>bla_{OXA-48-like}</i> C. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน <i>bla_{IMP}</i> D. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน <i>bla_{KPC}</i>	71
ภาพที่ 31 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก แถวที่ 1 คือ <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 2 คือ <i>Streptococcus pneumoniae</i> สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 3 คือ <i>Streptococcus pyogenes</i> สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 4 คือ <i>Haemophilus influenzae</i> สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 5 คือ <i>Acinetobacter baumannii</i> สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 6 คือ <i>Staphylococcus aureus</i> สายพันธุ์มาตรฐาน 25923 แถวที่ 7 คือ <i>Enterococcus faecalis</i> สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 8 คือ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 27853 แถวที่ 9 คือ <i>Proteus mirabilis</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25933 แถวที่ 10 คือ <i>Klebsiella pneumoniae</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC BAA – 1706.....	72

ภาพที่ 32 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวกยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} แถวที่ 1 - 3 และ 5 - 10 คือ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์คลินิกที่ให้ผลบวกกับยีน bla_{NDM} แถวที่ 4 คือ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์คลินิกที่ให้ผลบวกกับยีน $bla_{OXA-48-like}$ 73

ภาพที่ 33 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวกยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} แถวที่ 1-10 คือ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์คลินิก..... 74

ภาพที่ 34 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ จำนวน 21 ตัวอย่าง..... 77



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ชนิดแกรมลบ รูปร่างแท่ง ไม่เคลื่อนที่ สามารถอยู่ในโฮสต์ได้หลากหลาย ตั้งแต่พืชจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถพบได้ในดินและผิวน้ำ โดยปกติ เชื้อ *K. pneumoniae* จะอยู่ที่ผิวหนัง ในจมูก หรือ ช่องคอ โดยไม่แสดงอาการ แต่ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทารก และ คนชรา ทำให้เกิดการติดเชื้อภายในโรงพยาบาลที่รุนแรงเช่น ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ปอดบวม หรือติดเชื้อในกระแสเลือด (1)

การรักษาการติดเชื้อ *K. pneumoniae* ใช้วิธีการรักษาเช่นเดียวกับเชื้อแกรมลบในวงศ์ *Enterobacteriaceae* อื่น โดยจะใช้ยาในกลุ่ม β - lactam ในการรักษาเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเป็นยาที่ผู้ป่วยเกิดอาการแพ้น้อย (2) เชื้อ *K. pneumoniae* โดยปกติจะดื้อยาในกลุ่ม penicillin ตามธรรมชาติ เช่น ampicillin แต่จะไวต่อยาในกลุ่ม 3rd generation cephalosporin เช่น ceftriaxone (3) แต่ในปี 2014 มีการรายงานจาก World Health Organization (WHO) ว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีการดื้อยาเป็นอันดับ 1 ใน 3 ของเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยา (4) ยา carbapenem เป็นยาในกลุ่มที่ถูกจัดให้เป็นตัวเลือกในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ Extended Spectrum β - lactamase (ESBLs) (5, 6) และเป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่ใช้รักษาการติดเชื้อดื้อยาหลายขนาน (7) ยา carbapenem มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับยา β - lactam ชนิดอื่น ๆ คือ ยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan ของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และสามารถทำลายเชื้อได้ทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น imipenem, meropenem, ertapenem โครงสร้างยา carbapenem คล้ายกับยา penicillin คือ มีวงแหวน β - lactam ที่ต่อกับวงแหวน 5 เหลี่ยม C ตำแหน่งที่ 2 กับ 3 จะเชื่อมกันด้วยพันธะคู่ และมี C อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1 แทน sulfur (8) อย่างไรก็ตาม มีการใช้ยา carbapenem กันอย่างแพร่หลายเป็นผลทำให้เกิดเชื้อดื้อยาที่เรียกว่า carbapenem resistance *Enterobacteriaceae* (CRE) (9) โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็น CRE มากที่สุด คือเชื้อ *K. pneumoniae* ในปี 2013 Center for Disease Control and Prevention (CDC) ได้ประกาศว่า CRE เป็นภัยคุกคามเร่งด่วนต่อสุขภาพประชาชนในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา 9,000 ราย พบว่าเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่ง WHO ได้จัดกลุ่มเชื้อดื้อยา carbapenem อยู่ในกลุ่มวิกฤตกลุ่มเดียวกับเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อยา 3rd generation cephalosporin และ *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อยา

carbapenem ซึ่งเป็นกลุ่มที่ต้องหายาปฏิชีวนะใหม่มาทดแทน (10) ข้อมูลจาก National Antimicrobial Resistance Surveillance center (NARST) กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย พบว่า ปี 2017 ถึง 2019 เชื้อ *K. pneumoniae* ตื้อต่อยา carbapenem ร้อยละ 9.5, 11.5 และ 13.3 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี (11) สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ประเทศไทย เป็นโรงพยาบาลตติยภูมิ ขนาด 350 เตียง จากสถิติปี 2017 พบว่าอุบัติการณ์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อสูงสุดเป็นเชื้อ *A. baumannii* รองลงมาคือ *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ และพบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ตื้อต่อยา carbapenem มากที่สุดคือ เชื้อ *K. pneumoniae* คิดเป็นร้อยละ 15 ของเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด ซึ่งมีแนวโน้มที่สูงขึ้น และจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อติดตามเฝ้าระวัง (surveillance) และลดการแพร่กระจายของเชื้อ CRE และใช้เป็นข้อมูลในการคัดแยกผู้ป่วยเด็กที่มีเชื้อ CRE ออกจากผู้ป่วยเด็กอื่น พบว่าร้อยละ 94.3 เป็นเชื้อ *K. pneumoniae*

กลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenem แบ่งเป็น 2 กลไกหลัก คือเชื้อแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ESBLs หรือ AmpC ร่วมกับการสูญเสีย porin หรือมี efflux pump และอีกหนึ่งกลไก คือเชื้อแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ carbapenemase ซึ่งเป็นกลไกหลักที่สำคัญเนื่องจากถูกควบคุมด้วยยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดระหว่างเชื้อแบคทีเรียแกรมลบด้วยกัน ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อยา carbapenem แพร่กระจายอย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์ carbapenemase สามารถแบ่งตามระบบ Ambler ได้ 3 class คือ 1) Ambler class A เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถทำลายยาได้หลายชนิดในกลุ่ม β - lactam แต่จะถูกยับยั้งด้วย boronic acid และ clavulanate ในระดับต่ำ ๆ ซึ่งเอนไซม์ที่พบได้บ่อยและมีการระบาดไปทั่วโลกคือ เอนไซม์ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (bla_{KPC}) 2) Ambler class B เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถทำลายยาในกลุ่ม β - lactam ได้ทุกชนิด ยกเว้น ยา monobactam สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid ซึ่งเอนไซม์ที่พบได้บ่อยในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* คือ เอนไซม์ bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{VIM} 3) Ambler class D หรือ Oxacillinase เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีความสมบัติของการเป็นเอนไซม์ carbapenemase ที่น้อยและไม่ถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid หรือ EDTA แต่สามารถถูกยับยั้งด้วย NaCl เอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น $bla_{OXA-48-like}$ (6, 9, 12, 13) ในประเทศไทยมีการรายงานจาก NARST กระทรวงสาธารณสุข ในปี 2017 พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีอัตราการดื้อยาของกลุ่ม carbapenem ที่สูงขึ้น (11) จากการศึกษาของ Laolerd และคณะ ประเทศไทย ศึกษาเชื้อทั้งหมด 287 ตัวอย่าง ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ด้วยวิธี multiplex PCR พบเชื้อที่มียีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จำนวน 223 ตัวอย่าง และ

ยีนที่พบเป็นอันดับ 1 คือ ยีน bla_{NDM} รองลงมาคือยีน $bla_{OXA-48-like}$, bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ และ ยีน bla_{IMP} ตามลำดับ (14) และงานวิจัยของ Srisrattakarn และคณะ ประเทศไทย ได้ตรวจหายีนที่สร้าง เอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas* spp. พบยีน bla_{NDM} มากที่สุด ถึงร้อยละ 91.24 รองลงมาคือยีน $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 8.03 และยีน bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 0.73 ตามลำดับ (15)

ในปัจจุบัน วิธีที่ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ปี 2019 (16) แนะนำ ในการตรวจหาเอนไซม์ carbapenemase ทางพีโนไทป์ มี 2 วิธีคือ Carba NP และ Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) โดยที่วิธี Carba NP มีหลักการคือ เอนไซม์ carbapenemase ย่อยวงแหวน β -lactam ของยา imipenem เกิดผลผลิตเป็นกรด จากนั้นกรดจะ เปลี่ยนสีของ indicator คือ phenol red จากสีแดงเป็นสีเหลือง วิธีนี้มีข้อดีคือ ใช้เวลาในการทดสอบ ไม่เกิน 2 ชั่วโมง ราคาถูก แต่มีข้อจำกัดคือ มีความไวต่ำในการตรวจหาเอนไซม์ carbapenemase จาก ยีน $bla_{OXA-48-like}$, ต้องการน้ำยาพิเศษในการทดสอบ และ ยา imipenem สลายง่าย (13) อีกหนึ่งวิธี คือ mCIM มีหลักการคือ นำเชื้อแบคทีเรียไปบ่มใน Tryptic Soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็น เวลา 4 ชั่วโมง กับยา meropenem เอนไซม์ carbapenemase จะทำลายยา meropenem ทำให้ ยาหมดฤทธิ์ จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ วิธีนี้เป็นวิธีที่ ง่าย ราคาถูก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ แต่มีข้อจำกัดคือ มีความไวและความจำเพาะต่ำในการตรวจหา เอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ *A. baumannii* (17) ซึ่งการตรวจด้วยวิธีทางพีโนไทป์จะไม่สามารถบอกกลไกที่เกี่ยวข้องในการดื้อยาและระบาดวิทยาได้ วิธีทางจีโนมมีประโยชน์ในการตรวจ ชนิดยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา มีความไว ความจำเพาะสูง รวดเร็ว สามารถใช้ศึกษาทางระบาดวิทยา ของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ (18) เช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และแยกชนิดของยีนด้วย Gel electrophoresis (19), การใช้เทคนิค Real-time Polymerase chain reaction (Real-time PCR) และการหาลำดับเบส (Nucleotide sequencing) ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจระดับจีโนม โดยวิธีที่กล่าวมามีข้อจำกัดคือ อุปกรณ์มีราคาแพง ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการปฏิบัติงาน (20)

เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อ เพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของยีนที่สนใจภายใต้อุณหภูมิเดียว (Isothermal nucleic acid amplification) โดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 37 °C ถึง 42 °C เวลา 20 – 40 นาที โดยวิธี RPA มี

ส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วน คือ recombinase protein (RecA), single-strand DNA binding protein (SSB) และ Sau DNA polymerase ปฏิกริยาเริ่มต้นคือ RecA จะจับกับ primer เกิดเป็น nucleoprotein filament ซึ่งจะจับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สมกัน เกิดการแยกสายในลักษณะ D-loop จากนั้น ssDNA binding protein จะจับบริเวณดีเอ็นเอที่แยกเป็นสายเดี่ยวเพื่อไม่ให้สายดีเอ็นเอกลับมามีคู่กันใหม่ จากนั้น RecA จะหลุดออกจาก nucleoprotein filament ด้วยกระบวนการ ATP hydrolysis และทำการต่อสายดีเอ็นเอด้วยฤทธิ์ของเอนไซม์ Sau DNA polymerase สายดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นจะกลายเป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบในการสร้างสายดีเอ็นเอในรอบถัด ๆ ไป วิธีที่ใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยา RPA มีหลายวิธี เช่น วิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose Gel electrophoresis) วิธีการตรวจวัดการตกตะกอน (Bridge flocculation assay) และวิธี Lateral flow ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการทดสอบ ความเหมาะสมของเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ และงบประมาณ (21) เทคนิค RPA มีจำหน่ายในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจระดับจีโนมได้ทั้งง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาชนิดหลาย ๆ ยีนพร้อมกันได้ (multiplex) สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทาง การตรวจ ณ จุดดูแลผู้ป่วย หรือ การตรวจภาคสนามได้ (22)

ในการศึกษารั้วนี้ได้พัฒนาเทคนิค multiplex RPA สำหรับตรวจแยกชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ที่พบบ่อย (bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM}) ในเชื้อ *K. pneumoniae* และทดสอบความไวและความจำเพาะเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR-sequencing โดยมุ่งหวังว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะมีความสะดวก รวดเร็ว ให้ผลถูกต้องและนำไปใช้ในการตรวจชนิดยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทางอณูชีววิทยาได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการติดตาม เฝ้าระวัง และควบคุม การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา CRE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex RPA สำหรับตรวจหาชนิดยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ *K. pneumoniae*

2.2 เพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของเทคนิค multiplex RPA กับ วิธี mCIM และ sequencing

3. คำถามของการวิจัย

3.1 เทคนิค multiplex RPA สามารถตรวจหา ยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ *K. pneumoniae* ได้หรือไม่

3.2 เทคนิค multiplex RPA มีผลความไวและความจำเพาะแตกต่างจากเทคนิค วิธี mCIM และ sequencing อย่างไร

4. สมมติฐาน

เทคนิค multiplex RPA สามารถตรวจหา ยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ *K. pneumoniae* มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับการตรวจด้วยวิธี mCIM และ sequencing

5. ขอบเขตงานวิจัย

เพาะเลี้ยงเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 150 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในงานประจำวัน ได้แก่ blood, urine, pus, fluid, sputum, tracheal และ perianal ที่เก็บจากงานเฝ้าระวังการดื้อยา ในผู้ป่วยเด็ก ในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ซึ่งเก็บตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึง ธันวาคม 2018 มาทำการจำแนกชนิดโดยการทดสอบทางชีวเคมี และตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี disk diffusion กับยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 3 ชนิด คือ ertapenem 10 µg, imipenem 10 µg, meropenem 10 µg และ ทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี mCIM และแปลผลตามมาตรฐาน CLSI ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อทั้งหมดด้วยวิธีการต้ม และนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยเทคนิค PCR-sequencing และพัฒนาวิธี multiplex RPA ของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ทั้ง 5 ยีน และเพิ่มยีน waaQ ที่จำเพาะกับเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นยีนควบคุมภายใน ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ ความเข้มข้นของ primer อุณหภูมิ ระยะเวลา และความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ ทดสอบหาขีดจำกัดในการตรวจวัด รวมทั้งทำการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี multiplex RPA กับวิธี PCR-sequencing และ mCIM

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

6.1 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbaepenemase โดยใช้เทคนิค multiplex RPA

6.2 สามารถนำเทคนิค multiplex RPA มาใช้ตรวจวิเคราะห์ชนิดยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา carbapenem ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ไม่มีเครื่องเฉพาะทาง ได้ง่าย รวดเร็ว มีความไว ความจำเพาะ สูง

6.3 สามารถตรวจติดตามการแพร่กระจายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา carbapenem การควบคุมเฝ้าระวังการระบาดของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลรวมทั้งการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

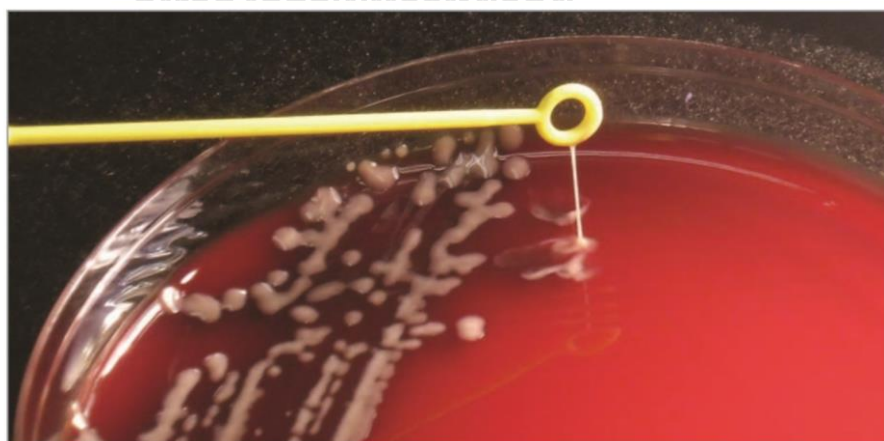
1. คุณลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*

เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* (1) ชนิดแกรมลบ รูปร่างแท่ง ไม่เคลื่อนที่ (3) เป็นเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตสด้วยวิธีการหมัก (Lactose fermenter) สามารถจำแนกเชื้อโดยการทดสอบชีวเคมีซึ่งจะให้ผลบวกกับ Citrate, Urease, Malonate, Lysine decarboxylase และให้ผลลบกับ Ornithine decarboxylase, Indole, Phenylalanine deaminase, Arginine dihydrolase (23) มักเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลและสามารถอยู่ในโฮสต์ได้หลากหลาย ตั้งแต่พืชจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถพบได้ในดินและผิวน้ำ โดยปกติ เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ที่ผิวหนัง ในจมูก หรือช่องคอ แต่ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทารก และ คนชรา จะทำให้เกิดการติดเชื้อภายในโรงพยาบาลที่รุนแรงเช่น ปอดบวม หรือ ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (3) สาเหตุหลักของการติดเชื้อ *K. pneumoniae* ในโรงพยาบาลเกิดจากการสัมผัสกันระหว่างบุคลากรทางการแพทย์กับผู้ป่วย (24)

เชื้อ *K. pneumoniae* โดยปกติจะดื้อยาในกลุ่ม penicillin ตามธรรมชาติ เช่น ยา ampicillin เนื่องจากมีการแสดงออกของยีน SHV β - lactamase อยู่ในจีโนม และจะไวต่อยาในกลุ่ม 3rd generation cephalosporin เช่น ยา ceftriaxone (1, 4) สามารถจำแนกซีโรไทป์ (serotyping) ด้วยเทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา จากการตรวจ K แอนติเจน ในส่วน Capsular Polysaccharide และ O แอนติเจน ในส่วน Lipopolysaccharide มี O แอนติเจน 11 ชนิด และ K แอนติเจน 80 ชนิด (25) เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่มีความโดดเด่นเรื่องการติดเชื้อภายในโรงพยาบาลและการติดเชื้อในชุมชน เช่น ปอดบวม การติดเชื้อในระบบทางปัสสาวะ และ pyogenic liver abscess (PLA) โดยการติดเชื้อภายในโรงพยาบาลที่เกิดมากที่สุดคือ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ พบว่าร้อยละ 97 ของการติดเชื้อมาจากการใส่สายสวน (urinary catheters) ในประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศไต้หวัน เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อที่มักก่อให้เกิด PLA ซึ่งนำไปสู่การเกิดภาวะแทรกซ้อนอย่างรุนแรงเช่น การติดเชื้อในกระแสเลือดและ extrahepatic abscesses (26) ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ยังเป็นเชื้ออันดับหนึ่งในสามของการเกิดปอดบวมซึ่งเกิดขึ้นหลังจาก 48 ชั่วโมง ที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและเป็นสาเหตุของ ventilator – associated pneumonia (VAP) ซึ่งจะเกิดกับผู้ป่วยที่อยู่ intensive care unit (ICU) VAP พบเป็น

ร้อยละ 83 ของการทำให้เกิดปอดบวม โดยมีอัตราการตายจากการเป็นปอดบวมสูงถึงร้อยละ 50 สำหรับการติดเชื้อในชุมชนเริ่มต้นพบในปี 1980 โดยเริ่มมีการรายงานจาก Asian Pacific Rim เกี่ยวกับการติดเชื้อรุนแรงที่มีสาเหตุจากเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เป็น hypervirulence ซึ่งมักจะก่อโรค PLA อุบัติการณ์ของการเกิด PLA พบว่าในปี 1996 – 2004 ในประเทศไต้หวันประชากร 100,000 คน พบผู้ป่วย PLA ร้อยละ 11.1 – 17.6 และพบว่าร้อยละ 3 – 11 ของผู้ป่วย PLA จะมีโอกาสพัฒนาเป็น endophthalmitis ได้ (24)

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่เป็น hypervirulence (hvKP) มักเป็นสาเหตุของการเกิด liver abscesses ในทวีป Asia Pacific เช่น ประเทศไต้หวัน เกาหลี เวียดนาม ลักษณะของเชื้อสามารถแยกได้จากความสามารถในการก่อโรคที่ทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงและตำแหน่งในการติดเชื้อ ลักษณะทางกายภาพของเชื้อที่สำคัญคือ hypermucoviscous สามารถทดสอบได้ด้วยวิธี string test โดยใช้ลูปแตะโคโลนีขึ้นจะเห็นเชื้อเหนียวยืดยาวมากกว่า 5 mm. ดังภาพที่ 1 hvKp มีชนิดของ K antigen ที่สำคัญคือ K1 และ K2 capsule ซึ่ง K1 capsule จะเกี่ยวข้องกับ sequence type 23 (K1/ST23) โดย K1/ST23 มีถิ่นที่เกี่ยวกับการแสดงออกของพีโนไทป์ของ hypermucoviscous และการดูดซึมธาตุเหล็กที่มากกว่าชนิดอื่น จากการศึกษาในหนูทดลองพบว่า K1 capsule มีปัจจัยในการก่อโรคมมากกว่า non – K1 ส่วน K2 capsule และ non K1 – K2 capsule มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของ sequence type มากขึ้น และมีถิ่นที่มีความรุนแรงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ K1 capsule (27, 28)



ภาพที่ 1 วิธี string test (27)

2. ปัจจัยที่ส่งเสริมต่อการก่อโรคของเชื้อ *K. pneumoniae*

เชื้อ *K. pneumoniae* มีปัจจัยความรุนแรงที่ส่งเสริมต่อการก่อโรคได้หลายปัจจัย ดังนี้ (25, 29, 30)

2.1 Capsular Polysaccharide (CPS)

การสังเคราะห์ Capsular Polysaccharide จะเกี่ยวข้องกับยีนหลายชนิดบน cps โคลัส โดยมีส่วนประกอบคือ หน่วยน้ำตาลหลาย ๆ หน่วยมาต่อกันเป็น complex (polysaccharide) มีความเป็นกรด ซึ่งชนิดของหน่วยน้ำตาลและชนิดของรูปแบบพันธะทางเคมีจะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรค การสร้าง Capsular Polysaccharide ของเชื้อแบคทีเรียมีประโยชน์ในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ เช่น serum bactericidal กระบวนการ phagocytosis ทำให้ antibody บางชนิดอ่อนฤทธิ์ ทำปฏิกิริยากับ antibody, complement, extracellular matrices และ surface receptor (Toll – like receptor) ของเซลล์โฮสต์ ป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่คุกคามเช่น ความแห้งแล้ง หรือ มีความร้อนมาก และช่วยให้เชื้อสร้าง biofilm ได้ง่ายขึ้น ปัจจุบันการจำแนกซีโรไทป์ (serotyping) ด้วยเทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา จากการตรวจ K แอนติเจน ในส่วน Capsular Polysaccharide มีการระบุของชนิด CPS อยู่ 80 ชนิด ซึ่งชนิดที่พบบมากที่สุดคือชนิด K2

2.2 Lipopolysaccharide (LPS)

LPS ของเชื้อ *K. pneumoniae* จะเหมือนกับเชื้ออื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ซึ่งจะประกอบไปด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ คือ 1. hydrophobic lipid A ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ outer leaflet 2. Core oligosaccharide ซึ่งเป็นส่วนที่เชื่อมระหว่าง lipid A กับ O antigen 3. O antigen (O chain) เป็นสายยาวซึ่งแต่ละชนิดของ LPS จะทำหน้าที่เป็น antigenic epitope และ เหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune response) ในส่วน lipid A เป็น endotoxin ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้โดยเฉพาะ Toll – like receptor 4 (TLR4) บน macrophage, dendritic cell, epithelial cell และ เซลล์อื่น ๆ ส่วนของ Core oligosaccharide ของ LPS ซึ่งเชื่อม O antigen กับโมเลกุล lipid A จะประกอบด้วย mono-, di- or oligosaccharides (รวมถึง 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid: Kdo) ทำให้มีประจุลบ O antigen ประกอบด้วย saccharide หลาย ๆ หน่วยมาต่อกัน ก่อตัวเป็นชั้น polysaccharide ขยายได้ถึง 30 นาโนเมตร ปกคลุมบนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำจะขึ้นอยู่โครงสร้างของ LPS ในปัจจุบันสามารถจำแนกซีโรไทป์ (serotyping) ด้วยเทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา จากการตรวจ O แอนติเจน พบทั้งหมด 11 ชนิด จากการศึกษพบว่า

ร้อยละ 90 ของเชื้อแบคทีเรียจากประเทศเดนมาร์ก สเปน และสหรัฐอเมริกา ให้ผลบวกกับ O antigen ชนิดที่พบมากที่สุดคือ O1

2.3. Adherence Factor

ช่วยในการยึดเกาะเซลล์เช่น endothelial cell เซลล์กระเพาะปัสสาวะ และ เซลล์ในระบบทางเดินหายใจ fimbriae type 1 และ type 3 เป็น adhesive factor ที่สำคัญเพราะมีความเกี่ยวข้องในการสร้าง biofilm โครงสร้างของ fimbriae type 1 และ type 3 สามารถเกาะ epithelial cell ในระหว่างที่บุกเข้าเซลล์โฮสต์ fimbriae type 1 ของเชื้อ *K. pneumoniae* ไม่สามารถพบในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้สำหรับ fimbriae type 3 สามารถพบในเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์คลินิกและสายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อม สามารถเป็นตัวกลางในการยึดเกาะกับเซลล์หลายชนิด รวมถึงเซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์กระเพาะปัสสาวะ เซลล์กระเพาะปัสสาวะ เซลล์แก้ม และเซลล์ระบบทางเดินหายใจ

2.4. Siderophores

เชื้อสร้างและหลั่ง iron – chelating compounds เพื่อที่จะรับเหล็กจาก iron – binding protein จากโฮสต์ มี 2 ชนิด คือ 1. enterochelin เป็นโมเลกุลชนิด catechol ที่มีวงแหวน phenolic สามารถจับกับเหล็กได้ดีที่สุด 2. Aerobactin เป็นโมเลกุล hydroxamate การได้รับเหล็กเป็นขั้นตอนสำคัญในการก่อโรคของเชื้อเพราะเหล็กเป็นปัจจัยในการเกิดเมแทบอลิซึม เมื่อเชื้อแบคทีเรียมีธาตุเหล็กต่ำจะเกิดการแสดงออกของ siderophores เพิ่มขึ้น เมื่อเหล็กจับกับ siderophores ตัวรับที่อยู่บนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรียจะรับรู้และสามารถดึงเหล็กเข้ามาใช้งานได้

2.5. Urease

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ หรือ สารพิษได้ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญของความรุนแรงในการก่อโรค เชื้อ *K. pneumoniae* ส่วนใหญ่จะสามารถผลิต urease ได้ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอีกชนิดหนึ่งในการก่อโรคโดยเฉพาในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะการใส่สายสวนเป็นระยะเวลาอันยาวนานเป็นผลทำให้เกิดหินปูนเกาะติดรอบนอกของสายสวนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อที่ผลิต urease อย่าง *K. pneumoniae* โดเนเชื้อจะสร้างแอมโมเนียจากยูเรียทำให้ค่า pH ของปัสสาวะสูงขึ้น สร้างคริสตัลแคลเซียมและแมกนีเซียมฟอสเฟตในปัสสาวะ และสามารถพัฒนาการสร้าง biofilm ในสายสวน

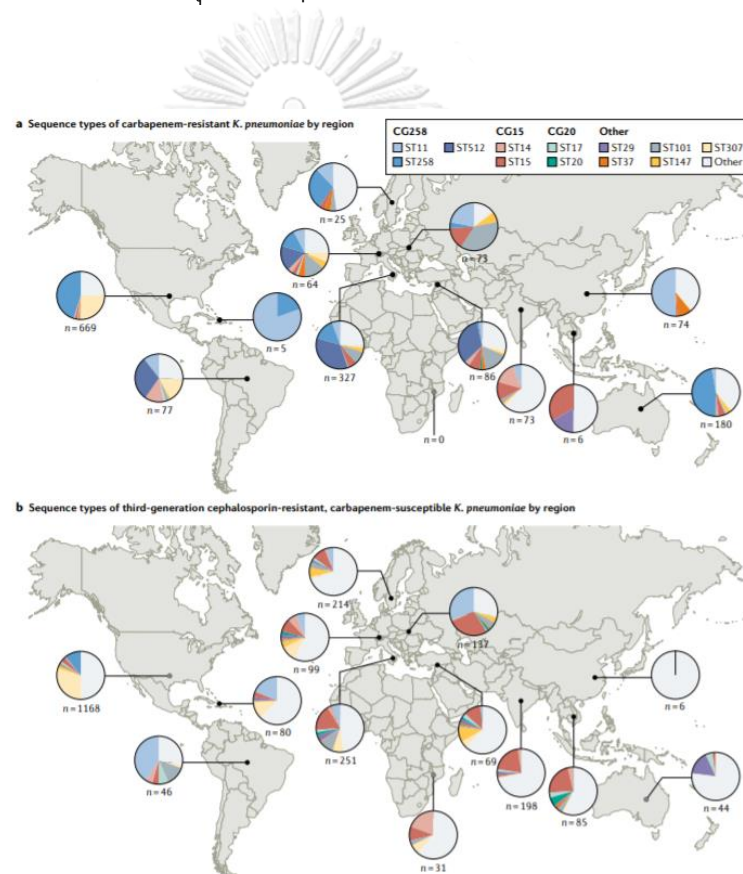
2.6 Biofilm

Biofilm เป็น extracellular polymeric substance ที่ป้องกันเชื้อแบคทีเรียจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์เช่นการ opsonization และ phagocytosis เป็นผลทำให้สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ยากขึ้น สามารถพบ biofilm ได้บ่อยในบริเวณพื้นผิวเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแบบถาวร ทำให้ความไวต่อยาลดลง และมักเกิดในผู้ป่วยที่ใส่สายทางการแพทย์ การสร้าง biofilm ของเชื้อแบคทีเรียยังเป็นผลทำให้การปลูกถ่ายอวัยวะล้มเหลวและทำให้อุปกรณ์ทางการแพทย์มีอายุการใช้งานที่สั้น การสร้าง biofilm ของเชื้อ *K. pneumoniae* มีความสำคัญต่อการก่อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่มีพลาสมิดติดต่อต้านจุลชีพ โดยตัวกลางในการสร้าง biofilm คือ Type 3 fimbriae

3. ระบาดวิทยา

เชื้อ *K. pneumoniae* ปกติจะเป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ที่ผิวหนังหรือในจมูก สามารถก่อโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย จากการศึกษาของ Lei Tian ประเทศจีน พบว่าในปี 2014 – 2016 เชื้อ *K. pneumoniae* ติดอันดับหนึ่งในสามของการติดเชื้อในกระแสเลือดพบมีการติดเชื้อมากกว่า 500 ครั้งต่อปี (31) และพบว่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.4 เป็นร้อยละ 13.4 (32) ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลร้อยละ 9.9 ในโรงพยาบาล 183 แห่งในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นอันดับสามรองจาก *Clostridioides (Clostridium) difficile* และ *Staphylococcus aureus* และพบเป็นอันดับสองของการติดเชื้อในกระแสเลือด (Bloodstream infection: BSI) รองจากเชื้อ *Escherichia coli* (33) เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด และอัตราการเสียชีวิตในประเทศสิงคโปร์สูงถึงร้อยละ 20 – 26 และพบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นอันดับสามรองจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในกระแสเลือดสูงถึงร้อยละ 45 (28) จากการศึกษาของ Rhodes และคณะ ปี 2019 ได้ศึกษาสถิติของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดตั้งแต่ปี 2007 - 2014 จาก 20 โรงพยาบาล ในประเทศไทย พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* เป็น 1 ใน 10 ของการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (34) การศึกษาของ Silpaarcha และคณะ ปี 2018 ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็น endogenous endophthalmitis (EE) พบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสูงถึงร้อยละ 48 และเชื้อที่พบมากที่สุดคือ *K. pneumoniae* (35) จากการศึกษาของ Pirvani และคณะ ปี 2020 ประเทศปากีสถาน พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบปัสสาวะเป็นอันดับสองรองจาก *E. coli* (36) การตรวจติดตามและการเฝ้าระวัง

(surveillance) การแพร่กระจายของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อดื้อยาหลายขนานเป็นกระบวนการที่สำคัญ (37) การศึกษาระบาดวิทยาได้มีการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาอย่างเทคนิค multilocus sequence typing (MLST) โดยแสดงผลออกมาในรูปแบบ clonal groups (CGs) และ sequence types (STs) พบว่าเชื้อที่มีการระบาดส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน ซึ่งในแต่ละประเทศจะมีความหลากหลายของ STs ที่แตกต่างกันไป ดังภาพที่ 2 เช่น ในประเทศเคนยา และประเทศออสเตรเลียพบการระบาดของเชื้อ *K. pneumoniae* ชนิด ST70 และ ST323 และเป็นผลทำให้เกิดการดื้อยาหลายขนานด้วย (MDR) (38) และจากการศึกษาของ Zhang และคณะ ในประเทศจีนพบชนิด ST11 สูงที่สุดและทำให้ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem อีกด้วย (37)



ภาพที่ 2 A) Sequence type ของการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ของเชื้อ *K. pneumoniae* B) Sequence type ของการดื้อยาในกลุ่ม 3rd generation cephalosporin ของเชื้อ *K. pneumoniae*

(37)

4. การรักษา

การรักษาเช่นเดียวกับเชื้อแกรมลบในวงศ์ *Enterobacteriaceae* อื่น โดยจะใช้ยาในกลุ่ม β -lactam ในการรักษาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 65 จากการใช้ยาทั้งหมด เนื่องจากเป็นยาที่ผู้ป่วยเกิดอาการแพ้ยาน้อย ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ยาในกลุ่ม cephalosporin คิดเป็นร้อยละ 47.49 ของยาในกลุ่ม β -lactam ทั้งหมด รองลงมาคือยา broad spectrum penicillin คิดเป็นร้อยละ 36.54 และยา carbapenem คิดเป็นร้อยละ 11.20 ทำให้มีการใช้ยา cephalosporin กันอย่างแพร่หลายจึงเกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในกลุ่ม cephalosporin โดยการสร้างเอนไซม์ ESBL มาทำลายยา โดยข้อมูลจาก NARST กระทรวงสาธารณสุขพบว่าในปี 2019 เชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อต่อยา cefotaxime และ ceftazidime อยู่ที่ร้อยละ 48 และร้อยละ 37 ตามลำดับ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการรักษาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL จะพิจารณาให้ใช้ยาในกลุ่ม carbapenem อย่างไรก็ตาม มีการใช้ยา carbapenem กันอย่างแพร่หลายเป็นผลทำให้เกิดเชื้อดื้อยา carbapenem โดยข้อมูลจาก NARST กระทรวงสาธารณสุขปี 2017 – 2019 พบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อต่อยา carbapenem คิดเป็นร้อยละ 9.5, 11.5 และ 13.3 ซึ่งมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้น (2, 9, 11) จากการศึกษาของ Ling และคณะ ประเทศสิงคโปร์ ปี 2015 พบเชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem สูงถึงร้อยละ 42.2 (39) การศึกษาของ Precit ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี 2020 ได้ทำ CRE surveillance พบเชื้อ *K. pneumoniae* สูงที่สุดถึงร้อยละ 39 (40) และจากการศึกษาของ Qi Wang ประเทศจีน พบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา carbapenem สูงถึงร้อยละ 66.68 (41)

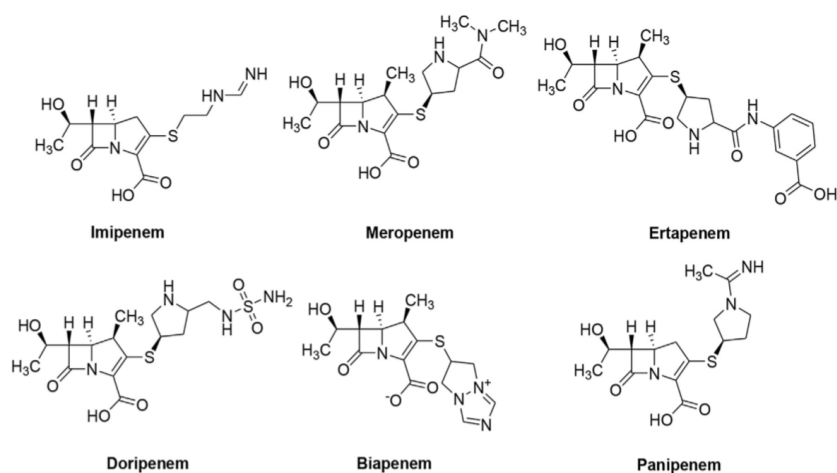
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ยา Carbapenem

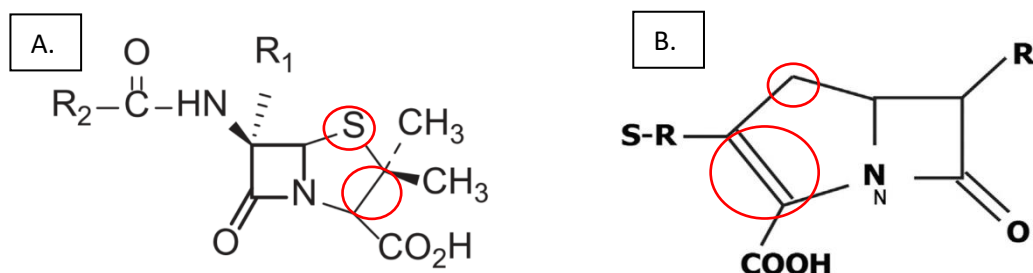
ในปลายปี 1960 มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ β -lactamase เกิดขึ้น ทำให้เริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับ β -lactamase inhibitor โดยในปี 1976 มีการค้นพบ β -lactamase inhibitor ตัวแรก คือ olivanic acid ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากเชื้อ *Streptomyces clavuligerus* โดย olivanic acid เป็นโครงสร้างหลักของยา carbapenem มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ได้กว้าง แต่เนื่องจาก โครงสร้างทางเคมีไม่เสถียรและมีความสามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้น้อยต่อมามีการค้นพบ β -lactamase inhibitor เพิ่มอีก 2 ชนิด คือ clavulanic acid และ thienamycin โดย thienamycin กลายเป็นยา carbapenem ตัวแรกและเป็นต้นแบบของยาในกลุ่ม carbapenem ยา thienamycin สกัดจากเชื้อ *Streptomyces cattleya* มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียที่กว้างและเป็น β -lactamase inhibitor สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, methicillin

หรือ oxacillin – susceptible *Staphylococcus aureus* และ *Streptococci* แต่ thienamycin ไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสารละลาย วัตถุประสงค์ความเป็นเบส (pH > 8.0) และเกิดปฏิกิริยากับ nucleophiles ได้สูง เช่น hydroxylamine, cysteine อนุพันธ์ที่มีความเสถียรมากขึ้นคือ อนุพันธ์ N – formimidoyl (Imipenem) และ panipenem สามารถจับกับ Penicillin Binding Protein (PBPs) และทนต่อเอนไซม์ β – lactamase แต่ถูกยับยั้งได้ด้วยเอนไซม์ dehydropeptidase I (DHP – I) ที่พบในไตของมนุษย์ ดังนั้นจึงต้องใช้ยาร่วมกับตัวยับยั้ง คือ cilastatin หรือ betamipron (42) ข้อดีของ cilastatin นอกจากที่จะยับยั้งเอนไซม์ DHP – I แล้ว ยังสามารถที่จะลดอาการเป็นพิษที่ไตได้เมื่อเทียบกับการให้ยา imipenem อย่างเดียว (43) ในเวลาต่อมาได้มีการพัฒนา ยา carbapenem ที่มีความเสถียรมากขึ้น ออกฤทธิ์ได้กว้างมากขึ้น เช่น meropenem, biapenem, ertapenem และ doripenem โดยการเติมหมู่ methyl เข้าไปที่ตำแหน่ง 1 – β ทำให้สามารถป้องกันการสลายด้วยเอนไซม์ DHP – I ได้ (42) ซึ่งยาแต่ละชนิดมีโครงสร้างดังภาพที่ 3

โครงสร้าง ยา carbapenem คล้ายกับยา penicillin ประกอบด้วย unsaturated 5 – membered ring ต่อกับวงแหวน β – lactam ความแตกต่างระหว่าง penicillin และ carbapenem ตรงตำแหน่ง C2 กับ C3 จะเป็นพันธะคู่ และ คาร์บอนจะไปแทนที่ sulfur ตรงตำแหน่ง C1 ซึ่ง คาร์บอนนี้จะมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ และความสามารถในการทนต่อเอนไซม์ β – lactamase (42) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม carbapenem ชนิดต่าง ๆ (8)

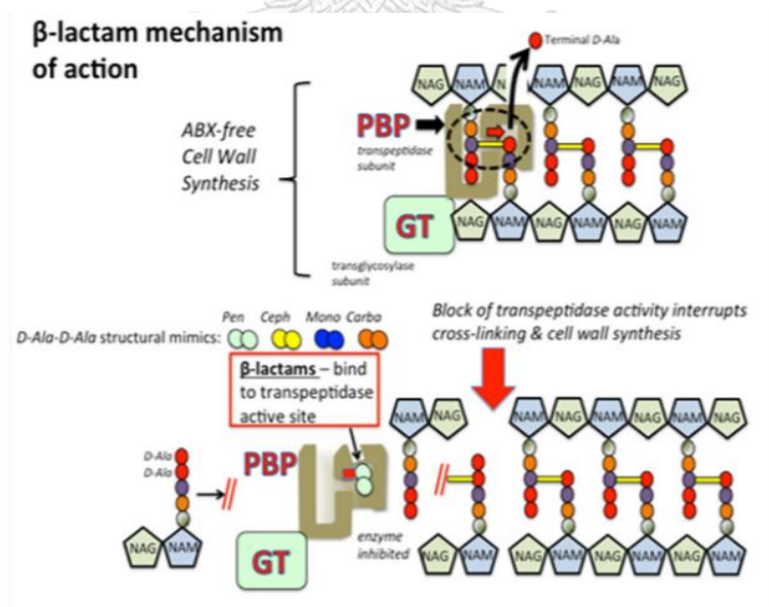


ภาพที่ 4 A. ลักษณะโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม penicillin (2) B. ลักษณะโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม carbapenem (5) วงกลมสีแดงแสดงถึงความแตกต่างของยาในกลุ่ม penicillin และยาในกลุ่ม carbapenem

กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม carbapenem มีการออกฤทธิ์ที่คล้ายกับยา β - lactam กลุ่มอื่น ๆ คือ ยาจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจับกับ Penicillin-Binding Proteins (PBPs) โดย PBPs จะเป็นตัวเชื่อมในขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างผนังเซลล์ (transpeptidation) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย ยา β - lactam จะมีลักษณะที่คล้ายกับ D-alanyl-D-alanine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวสุดท้ายของ N-acetyl muramic acid (NAM)/N-acetyl glucosamine (NAG) เพราะความคล้ายระหว่าง β - lactam กับ D - alanyl - D - alanine ยา β - lactam สามารถไปจับบริเวณ active site ของ PBPs แบบถาวร ทำให้ PBPs ไม่สามารถเชื่อม peptidoglycan ให้แข็งแรงได้ เป็นผลให้เซลล์แตกและตายในที่สุด ดังภาพที่ 5 ซึ่งยา carbapenem แต่ละชนิด มีความสามารถจับกับ PBPs ที่ตำแหน่งต่างๆ ได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 ยา carbapenem สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีเมื่อจับกับ PBP1a, 1b และ 2 ซึ่งเป็นเป้าหมายเดียวกับยาในกลุ่ม aminopenicillin และ cephalosporin และสามารถทำลายแบคทีเรียโดยที่ไม่ทำให้เกิดการอักเสบอีกด้วย (6, 44)

ตารางที่ 1 ความสามารถของยา carbapenem ในการจับชนิดของ Penicillin-Binding Proteins (PBPs) ดัดแปลงจาก (45)

ชนิดของยา carbapenem	ชนิดของ Penicillin-Binding Proteins (PBPs)
imipenem	PBPs2
meropenem	PBPs2, PBPs1a และ PBPs1b
ertapenem	PBP2, PBP1a และ PBP1b
doripenem	PBPs3 ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> PBPs1, 2 และ 4 ของเชื้อ <i>S. aureus</i> PBPs2 ของเชื้อ <i>E. coli</i>
biapenem	PBPs1a และ 1b ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> PBPs1 และ 3 ของเชื้อ <i>S. aureus</i> PBPs1a, 2 and 4 ของเชื้อ <i>E. coli</i>
Tebipenem	PBPs1a, 2b และ 3 ของเชื้อ <i>Streptococcus pneumoniae</i>



ภาพที่ 5 กลไกการออกฤทธิ์ของยา กลุ่ม β - lactam (46)

6. Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE)

Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) เกิดจากการแพร่ระบาดของเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทำลายยา β - lactam โดยเฉพาะยาในกลุ่ม cephalosporin จึงจำเป็นต้องใช้ยา carbapenem ในการรักษาเพิ่มมากขึ้น แต่ในปี 1990 ที่ประเทศญี่ปุ่น ได้มีการพบเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยา carbapenem โดยพบการสร้างเอนไซม์กลุ่ม metallo - β - lactamase (MBL) ชนิด bla_{IMP-1} ซึ่งสามารถทำลายยาในกลุ่ม carbapenem และยีนนี้อยู่บนพลาสมิดทำให้สามารถถ่ายโอนไปยังเชื้ออื่น ๆ ได้ ต่อมา มีการค้นพบยีน bla_{VIM} และยีนชนิดอื่น ๆ ในกลุ่ม MBL เพิ่มขึ้น โดยเริ่มต้นพบจากเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศอิตาลี และพบในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1996 มีการพบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา carbapenem โดยการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ต่อมาเรียกเอนไซม์นี้ว่า *K. pneumoniae* carbapenemase (bla_{KPC}) ซึ่งยีนที่สร้างเอนไซม์ bla_{KPC} จะอยู่บน plasmid และสามารถถ่ายโอนไปยังเชื้ออื่น ๆ ได้ ในขณะที่ bla_{KPC} กำลังแพร่ระบาดในหลาย ๆ ประเทศ ได้มีการพบยีน $bla_{OXA-48-like}$ เกิดขึ้น และพบมากในเชื้อ *K. pneumoniae* ในแถบประเทศ Mediterranean ในปี 2000 และมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก (47) ในปัจจุบัน Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า CRE ไว้ว่า เชื้อแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) กับยา ertapenem มากกว่าหรือเท่ากับ 2 $\mu\text{g/ml}$ และมีค่า MIC ต่อยา doripenem, meropenem หรือ imipenem มากกว่าหรือเท่ากับ 4 $\mu\text{g/ml}$ โดยกลไกหลักที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเป็น CRE มี 2 กลไกหลักคือ แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ESBL หรือ AmpC ร่วมกับการสูญเสีย porin หรือมี efflux pump อีกกลไกหนึ่งซึ่งส่วนใหญ่จะพบคือ เชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (5, 7, 9) ซึ่งเอนไซม์สามารถแบ่งตามระบบ Ambler ได้ 3 class ดังนี้ (6, 13, 48-50)

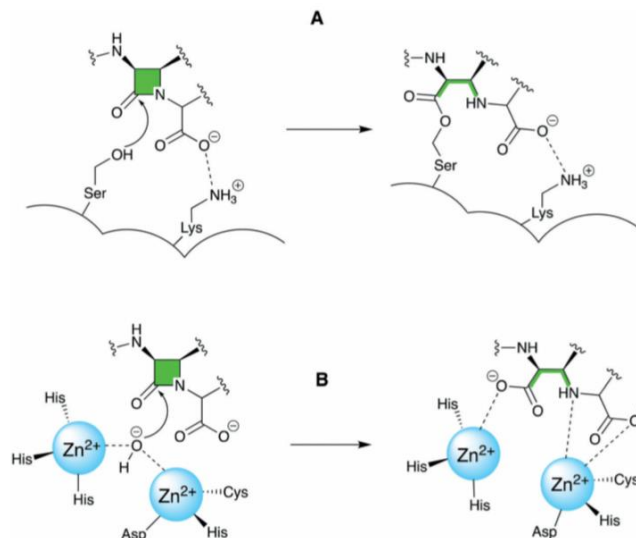
6.1 Ambler class A เป็น serine active enzyme คือ กลไกในการทำลายยาจะเกี่ยวข้องกับ serine active site ตำแหน่ง 70 เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถทำลายยาได้หลากหลายในกลุ่ม β - lactam เช่น penicillin, cephalosporin, carbapenem และ aztreonam เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถถูกยับยั้งด้วย boronic acid และถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanate ในระดับต่ำ ๆ ซึ่งเอนไซม์ที่พบได้บ่อยและมีการระบาดไปทั่วโลกคือ เอนไซม์ *K. pneumoniae* carbapenemase (bla_{KPC}) เป็นเอนไซม์ที่พบในพลาสมิด โดยพบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ bla_{KPC} ครั้งแรกในปี 1996 ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นชนิด bla_{KPC-2} ในปัจจุบันพบเอนไซม์ bla_{KPC} ถึง 7 ชนิด (bla_{KPC-2} ถึง bla_{KPC-12})

เอนไซม์ bla_{KPC} นอกจากที่จะทำลายยา β - lactam ได้ทุกชนิดแล้วยังสามารถที่จะต่อต้านยาในกลุ่ม fluoroquinolones, aminoglycosides และ trimethoprim – sulfamethoxazole ทำให้เกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนานที่เรียกว่า Multidrug Resistant Organism (MDROs)

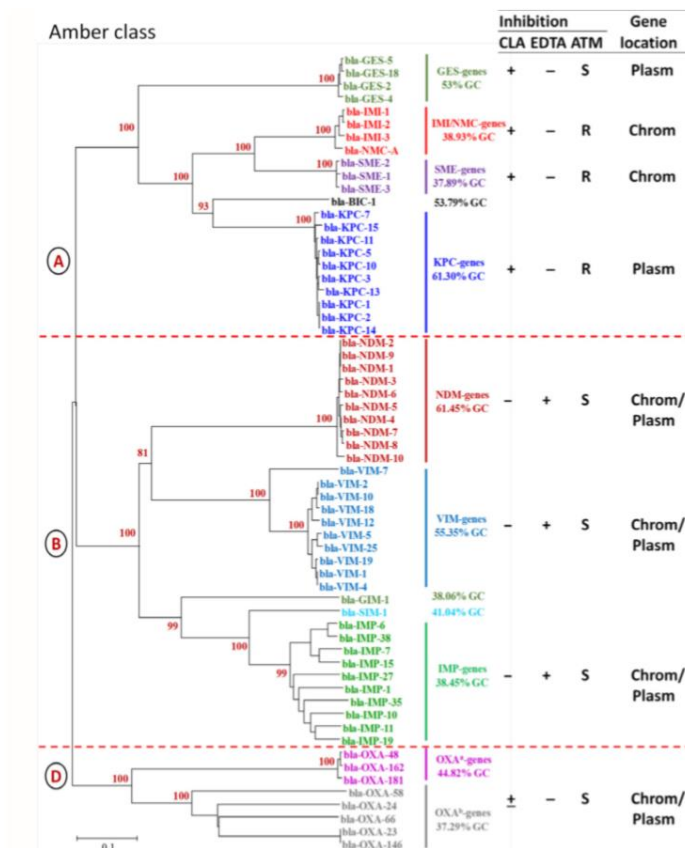
6.2 Ambler class B หรือ Metallo β - lactamase (MBL) เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถทำลายยาในกลุ่ม β - lactam ได้ทุกชนิด ยกเว้นยาในกลุ่ม monobactam โดยกลไกทำลายยาจะต้องการ Zinc ion ในการทำปฏิกิริยา เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะไม่ถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid แต่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ dipicolinic acid (DPA) การค้นพบครั้งแรกของเอนไซม์กลุ่มนี้พบในเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมและเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเช่น *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งมียีน MBL อยู่ในโครโมโซม แต่ในปี 1990 มีการถ่ายโอนยีน MBL สู่อินทรีย์ *Pseudomonas* spp. และเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ซึ่งชนิดของ MBL ที่พบในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ได้แก่ Imipenemase (bla_{IMP}) เป็นเอนไซม์ที่ถ่ายทอดทางพลาสมิดที่พบเป็นครั้งแรกในกลุ่มของ MBL สามารถพบได้ในเชื้อ *Pseudomonas* spp., *Anicetobacter* spp., *Enterobacteriaceae* ซึ่งชนิดแรกที่พบคือเอนไซม์ bla_{IMP-1} ในเชื้อ *Serratia marcescens* ในปัจจุบัน เอนไซม์ bla_{IMP} มีทั้งหมด 33 ชนิดที่ระบอบไปทั่วโลก เอนไซม์ถัดไปคือ Verona integron – encode Metallo β - lactamase (bla_{VIM}) ซึ่งพบ bla_{VIM-1} ครั้งแรกในปี 1997 ในประเทศอิตาลี ต่อมามีการพบ bla_{VIM-2} จากเชื้อ *P. aeruginosa* ในปัจจุบันพบว่าเอนไซม์ bla_{VIM} ทั้งหมด 33 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะพบจากเชื้อ *P. aeruginosa* และพบได้น้อยในเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ในปี 2008 เอนไซม์ New Delhi Metallo β - lactamase (bla_{NDM}) ถูกพบครั้งแรกในประเทศสวีเดนจากผู้ป่วยสวีเดนที่ก่อนหน้านี้ได้รักษาอยู่ที่โรงพยาบาลประเทศอินเดีย ในปัจจุบันเอนไซม์ bla_{NDM} มีทั้งหมด 16 ชนิด ซึ่ง bla_{NDM-1} จะพบได้มากที่สุดที่สุดในเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* และพบ bla_{NDM-2} ได้บ้างในเชื้อ *A. baumannii*

6.3 Ambler class D หรือ Oxacillinase เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความหลากหลาย และเป็นเอนไซม์ที่พบได้บ่อยในเชื้อ *A. baumannii* ในปัจจุบันมีทั้งหมด 232 ชนิด แต่มีบางชนิดเท่านั้นที่เป็นเอนไซม์ carbapenemase มีฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม carbapenem ได้น้อยและไม่ถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid หรือ EDTA แต่สามารถถูกยับยั้งด้วย NaCl สามารถแบ่งกลุ่มได้ 12 subclass คือ $bla_{Oxa-23-like}$, $bla_{Oxa-40-like}$, $bla_{Oxa-51-like}$, $bla_{Oxa-58-like}$, $bla_{Oxa-134a-like}$, $bla_{Oxa-143-like}$, $bla_{Oxa-211-like}$, $bla_{Oxa-213}$, $bla_{Oxa-214-like}$, $bla_{Oxa-229-like}$, $bla_{Oxa235-like}$ และ $bla_{Oxa-48-like}$ ชนิดที่พบมากที่สุดคือ

$bla_{\text{Oxa-48-like}}$ และพบได้เฉพาะใน *Enterobacteriaceae* โดยประกอบไปด้วยเอนไซม์ $bla_{\text{Oxa-48}}$, $bla_{\text{Oxa-48b}}$, $bla_{\text{Oxa-162}}$, $bla_{\text{Oxa-163}}$, $bla_{\text{Oxa-181}}$, $bla_{\text{Oxa-199}}$, $bla_{\text{Oxa-204}}$, $bla_{\text{Oxa-232}}$, $bla_{\text{Oxa-244}}$, $bla_{\text{Oxa-245}}$ และ $bla_{\text{Oxa-247}}$



ภาพที่ 6 กลไกการทำลายยาของเอนไซม์ β - lactamase class A, B, C, D โดยที่ภาพ A คือ กลไกการยับยั้งยา β - lactam โดย serine β - lactamase (class A, C, D) และภาพที่ B คือ กลไกการยับยั้งยา β - lactam โดย metallo β - lactamase (class B) (51)



ภาพที่ 7 แผนภูมิต้นไม้ของ Ambler class A, B และ D โดยดูจากค่าเฉลี่ยของ GC content และคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (52)

7. โครงสร้างของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase แบ่งตาม Ambler class ของแต่ละเอนไซม์ดังนี้

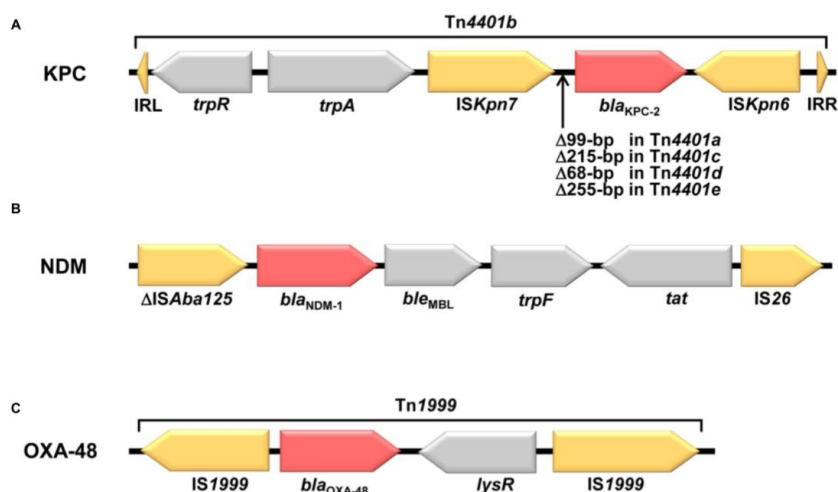
7.1 Ambler class A พบว่าเอนไซม์ *bla*_{KPC} เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่สุดและแพร่ระบาดไปทั่วโลก โดยถ่ายทอดผ่านพลาสมิดที่หลากหลาย เช่น IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR, ColE1 แต่พลาสมิดที่สำคัญคือ IncF กับ FII_K replicons ซึ่ง IncF จะมียีนที่อยู่หลายชนิด เช่น aminoglycosides, tetracyclines, quinolones, trimethoprim และ sulfonamide ยีน *bla*_{KPC} มีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ transposon โดย Tn4401 มีขนาด 10 kb ประกอบด้วย transposase gene, resolvase gene, *bla*_{KPC} gene และ insertion sequence 2 ชนิดคือ ISKpn6 และ ISKpn7 ซึ่ง transposon นี้สามารถที่จะคอนจูเกตเข้าไปได้ในหลาย ๆ พลาสมิด Tn4401 มี 5 isoform เกิดจากการ deletion ในตำแหน่งต่าง ๆ คือ a (deletion ตำแหน่งที่ 99 bp) b (ไม่มีการ deletion) c (deletion ตำแหน่งที่ 215 bp) d (deletion ตำแหน่งที่ 68 bp) และ e (deletion

ตำแหน่งที่ 255 bp) ซึ่งความหลากหลายของชนิด Tn4401 ทำให้ยีน bla_{KPC} ที่มีความแตกต่างกัน เช่น Tn4401a จะพบว่ามียีน bla_{KPC-3} และพบในพลาสมิดชนิด IncFII_{K2} (49) (ภาพที่ 8)

7.2 Ambler class B (MBL) ยีน bla_{IMP} และ bla_{VIM} จะพบใน class I integron ร่วมกับยีน ตัวยาในกลุ่ม aminoglycoside (aacA4, aadA1, aadB), class D β - lactamase (OXA gene), antiseptic resistance (qac Δ G) หรือ ยีนตัวยาในกลุ่ม chloramphenicol (catB) ซึ่ง class I integron มีความสำคัญในการแพร่กระจายยีน bla_{IMP} และ bla_{VIM} ทำให้เชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* เกิดการดื้อยาและแพร่ระบาดไปทั่วโลก สำหรับยีน bla_{NDM} เป็นยีนลำดับสุดท้ายที่พบในกลุ่ม MBL ยีน bla_{NDM-1} พบระบาดไปทั่วโลกมากที่สุด โดยมีการศึกษาโครงสร้างของยีนจากเชื้อ *A. baumannii* พบว่าประกอบด้วย ISAbA 125 อยู่ทั้ง 2 ด้านของ transposon Tn125 ซึ่ง transposon Tn125 จะมียีน bla_{NDM-1} อยู่ ส่วนเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* จะมี ISAbA 125 อยู่ทั้ง 2 ด้าน หรือ อยู่ด้านใดด้านหนึ่งและอยู่ในส่วนของ upstream สำหรับยีน ble_{MBL} เป็นยีนดื้อยา bleomycin ซึ่งจะพบร่วมกับยีน bla_{NDM-1} โดยจะควบคุมอัตราการกลายพันธุ์ของ RecA – dependent และเป็นส่วนที่ทำให้ยีน bla_{NDM-1} มีความมั่นคงมากขึ้น โครงสร้างยีน bla_{NDM-1} ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* จะเหมือนกับเชื้อ *P. aeruginosa* พบยีน bla_{NDM} ในเชื้อ *K. pneumoniae* ใน plasmid ที่หลากหลาย เช่น IncA/C, IncII, IncN, IncL/M และ IncX ซึ่งพลาสมิดที่มีความสำคัญในการแพร่กระจายยีน bla_{NDM-1} คือ IncA/C นอกจากจะมียีน bla_{NDM-1} แล้ว ยังมียีนดื้อยาชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น 16S rRNA methylases (RmtA และ RmtC) เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside, CMY type β - lactamase เกี่ยวข้องกับการดื้อยา cephalosporin และ QnrA เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม quinolone (49, 53) (ภาพที่ 8)

7.3 Ambler class D (Oxacillinase) ยีน $bla_{OXA-48-like}$ จะไม่เหมือนกับยีน bla_{KPC} และ bla_{NDM} โดยยีน $bla_{OXA-48-like}$ จะพบเฉพาะบนพลาสมิดชนิด IncL/M ในกลุ่มของ IncL ซึ่งจะแตกต่างกับพลาสมิด IncA/C ของยีน bla_{NDM-1} เพราะ pOXA-48a จะมียีน $bla_{OXA-48-like}$ เพียงชนิดเดียวเท่านั้น อัตราการส่งผ่านพลาสมิดของ pOXA-48a มีอัตราที่สูงมาก ทำให้สามารถแพร่กระจายเข้าสู่เชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ได้สูง ในปัจจุบันพบยีน $bla_{OXA-48-like}$ อยู่บนพลาสมิดอื่น ๆ เช่น IncA/C, IncH และ Tn 1999 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ pOXA-48a พบว่าอัตราการส่งผ่านยีนของ Tn 1999 มีอัตราการส่งผ่านที่น้อยกว่า (49) โครงสร้างของ พลาสมิด Tn 1999 ประกอบด้วย IS1999 ทางด้าน upstream และ downstream ของยีน $bla_{OXA-48-like}$ ซึ่ง Tn1999 มีหลายชนิดโดยมีความแตกต่างกันตรงการแทรกเข้าไปของ IS1R Tn1999.2 เกิดจากการแทรกของ IS1R เข้าไปใน IS1999

ทางด้าน upstream และ Tn1999.3 เกิดจากการแทรกของ IS1R เข้าไปใน IS1999 ทางด้าน downstream (50) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 โครงสร้างของยีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* และ *bla_{OXA-48-like}* (49)

ตารางที่ 2 การแบ่งชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์ carbapenemase ดัดแปลงจาก (6, 48, 54)

Ambler class	Functional class	ตำแหน่งการออกฤทธิ์ (Active site)	ตัวอย่างของเอนไซม์	ตัวยับยั้ง	เชื้อที่พบเอนไซม์มากในวงศ์ <i>Enterobacteriaceae</i>	กลุ่มของยา β -lactam ที่เอนไซม์สามารถทำลายได้
A	2f	Serine	<i>bla_{KPC}</i>	clavulanate, tazobactam, sulbactam, boronic acid	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp.	ทำลายยา β -lactam ได้ทุกชนิด
B	3	Zinc	<i>bla_{NDM}</i> <i>bla_{VIM}</i> <i>bla_{IMP}</i>	EDTA	NDM (<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>) VIM และ IMP (<i>K. pneumoniae</i>)	ทำลายยา β -lactam ได้ทุกชนิด ยกเว้น aztreonam
D	2d	Serine	<i>bla_{OXA-48-like}</i>	NaCl	<i>K. pneumoniae</i>	Penicillin และ carbapenem

8. ระบาดวิทยาของ CRE

เนื่องจากยา carbapenem เป็นยาทางเลือกอันดับแรกที่ใช้รักษาเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถปรับตัวและสร้างเอนไซม์มาทำลายยา carbapenem ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่มีการดื้อยา carbapenem มากที่สุดในวงศ์ *Enterobacteriaceae* (CRE) คือเชื้อ *K. pneumoniae* ในปี 2013 CDC ได้ประกาศว่า CRE เป็นภัยคุกคามเร่งด่วนต่อสุขภาพประชาชนในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา 9,000 ราย พบว่าเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งแต่ละรูปแบบการดื้อยาในแต่ละภูมิภาคแตกต่างกันไป เช่น ในประเทศอินเดีย ร้อยละ 57 เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ประเทศกรีซ ในปี 2014 มีการรายงานเชื้อดื้อยา carbapenem ซึ่งร้อยละ 60 เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ประเทศสิงคโปร์ ปี 2015 พบเชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อยา carbapenem สูงถึงร้อยละ 42.2 ในช่วงปี 2010 - 2014 ประเทศมาเลเซีย พบเชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อยา carbapenem เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.5 เป็นร้อยละ 1.6 และมีแนวโน้มสูงขึ้น ในประเทศไทย ปี 2015 จากการศึกษาของ Thongkoom และคณะ โรงพยาบาลราชวิถี พบเชื้อ CRE สูงถึงร้อยละ 5.8 และเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* มากที่สุดถึงร้อยละ 70.56 การศึกษาของ Netikul และคณะพบเชื้อ CRE ร้อยละ 1.4 และเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* สูงถึงร้อยละ 19.9 ในปี 2019 จากการศึกษาของ Shanmugakani และคณะ พบเชื้อ CRE สูงถึงร้อยละ 8.7 และพบเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* สูงที่สุด การแพร่ระบาดของยีนดื้อยาแบ่งตามชนิดของยีนได้ดังนี้ (7, 9, 24, 39, 48, 55-65) (ภาพที่ 9)

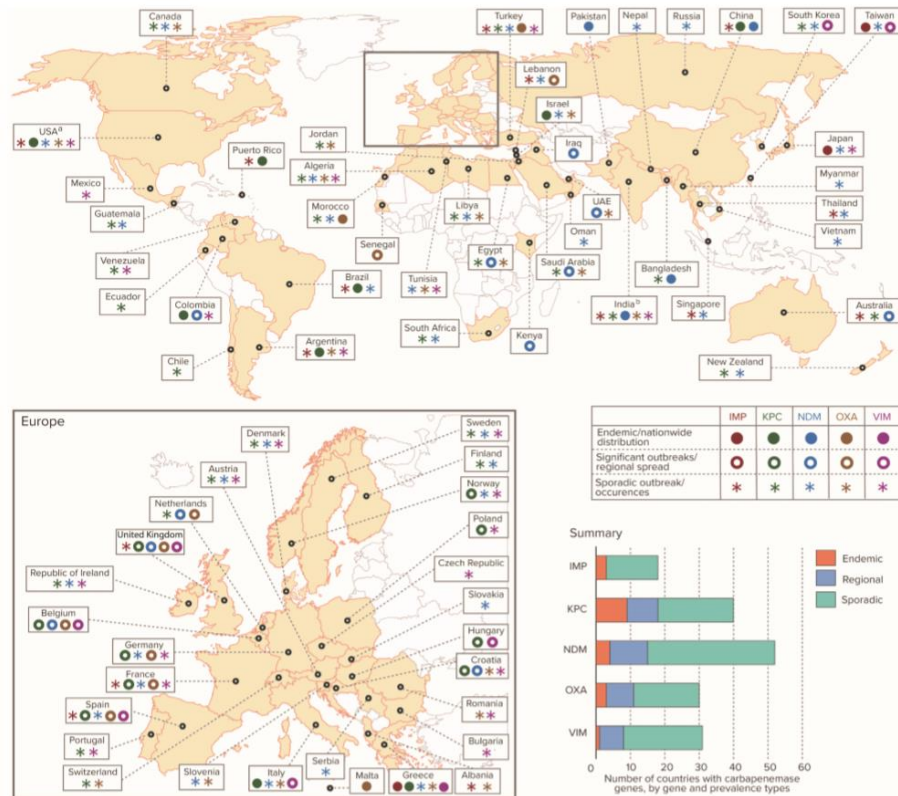
ยีน bla_{KPC} พบมากในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ประเทศที่มีการแพร่ระบาดมาก เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา บราซิล โคลัมเบีย อิตาลี กรีซ และจีน และมีรายงานการระบาดเพิ่มมากขึ้นในประเทศ สเปน ฝรั่งเศส เยอรมนี อังกฤษ และประเทศทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย เกาหลีใต้ ในสหรัฐอเมริกาจากการสำรวจติดตามเผ่าระวังเชื้อดื้อยา พบว่ามีเชื้อที่สร้างเอนไซม์ bla_{KPC} ในระหว่างปี 2007 ถึง 2009 ดังนี้ร้อยละ 5.9, 4.9, 5.7 ตามลำดับ และเอนไซม์ชนิดที่พบมากที่สุดคือ เอนไซม์ bla_{KPC-2} และ bla_{KPC-3} ซึ่งพบมากในเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลกคือ clonal complex (CC) 258 และ sequence type (ST) ที่พบบ่อยคือ ST 258 พบมากในประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วน ST อื่น ๆ เช่น ST11, ST437 พบได้ในประเทศจีนและบราซิล ST512 พบได้ในประเทศอิสราเอลและอิตาลี การศึกษาในประเทศจีน ปี 2020 ได้ทำการศึกษายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ *K. pneumoniae* พบยีน bla_{KPC} สูงถึงร้อยละ 58.1 และเป็นชนิด bla_{KPC-2}

ยีน bla_{NDM} พบแพร่ระบาดมากในประเทศอินเดีย ชนิดที่แพร่ระบาดมากที่สุดคือ bla_{NDM-1} โดยมีข้อมูลจาก Monitoring Antimicrobial Resistance Trend 2019 Program ประเทศอินเดีย พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 235 ตัวอย่าง มี 66 ตัวอย่าง (28 %) มียีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งร้อยละ 50 เป็นยีน bla_{NDM-1} ข้อมูลจากโรงพยาบาล 2 แห่งในประเทศปากีสถาน พบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* มียีน bla_{NDM} จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระ คิดเป็น 18.5 จากงานวิจัยของโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ 1,700 เตียง ในประเทศสิงคโปร์ ปี 2015 พบเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* มียีน bla_{NDM-1} สูงถึงร้อยละ 44.4 ข้อมูลจาก SMART global surveillance พบยีน bla_{NDM} เป็นหนึ่งในสามของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ที่พบมากที่สุด และข้อมูลจาก EuSCAPE survey พบเชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อยา carbapenem ร้อยละ 7.7 และ *E. coli* ดื้อยา carbapenem ร้อยละ 10.3 ทั้งหมดเกิดจากยีน bla_{NDM}

เอนไซม์ในกลุ่ม MBL อื่น ๆ เช่น bla_{IMP} และ bla_{VIM} จะพบได้น้อยกว่า bla_{NDM} เอนไซม์ bla_{IMP} จะพบมากในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และออสเตรเลีย การศึกษาในปี 2002 จากโรงพยาบาลขนาด 900 เตียง ในประเทศไต้หวันทางใต้ พบยีน bla_{IMP-8} ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* จำนวน 29 ตัวอย่าง จาก 1,261 ตัวอย่าง การศึกษาปี 2017 ประเทศญี่ปุ่น พบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยา carbapenem จำนวน 17 ตัวอย่าง จาก 4,875 ตัวอย่าง ซึ่งยีนที่พบทั้งหมดคือ bla_{IMP-6} และการศึกษาของประเทศออสเตรเลียโดยเก็บข้อมูลในปี 2009 ถึง 2014 พบยีน bla_{IMP-4} ถึงร้อยละ 82.7 เอนไซม์ bla_{VIM} ชนิดที่พบมากในปัจจุบันคือ bla_{VIM-1} และ bla_{VIM-2} โดยจะพบมากในประเทศกรีซและอิตาลี ข้อมูลจาก multinational European survey ปี 2008 ถึง 2011 ในประเทศกรีซ พบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยา carbapenem จากยีน bla_{VIM-1} สูงถึงร้อยละ 98.9

ยีน $bla_{OXA-48-like}$ พบเป็นอันดับสามของการแพร่ระบาด เป็นยีนที่อยู่บนพลาสมิดสามารถส่งไปให้เชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ได้ พบใน *K. pneumoniae* มากที่สุด พบระบาดมากในแถบยุโรป แถบเมดิเตอร์เรเนียน ตุรกี รวมไปถึง แอฟริกาเหนือ และเริ่มมีการรายงานการระบาดเพิ่มขึ้นเป็นระยะ ๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษากายของ Irmak Baran และคณะ ประเทศตุรกี พบเชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อต่อยา carbapenem สูงที่สุดและพบยีน bla_{OXA-48} สูงถึงร้อยละ 47.51 ในประเทศโมร็อกโกพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จากยีน bla_{OXA-48} สูงถึงร้อยละ 81.81 ในประเทศอิหร่านพบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* สร้างเอนไซม์ carbapenemase จากยีน $bla_{OXA-48-like}$ สูงถึงร้อยละ 72.8 และในประเทศอียิปต์พบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* สร้างเอนไซม์ carbapenemase จากยีน $bla_{OXA-48-like}$ สูงถึงร้อยละ 33.3

จากการศึกษาระบาดของวิทยาของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase พบว่ามีความแตกต่างของลักษณะทางจีโนมไทป์ในแต่ละประเทศ ยกตัวอย่างเช่น ประเทศสิงคโปร์พบยีน bla_{NDM-1} มากที่สุดจากเชื้อ *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* และ *Citrobacter* spp. จำนวนทั้งหมด 41 ตัวอย่าง ประเทศมาเลเซียพบ bla_{NDM-1} มากที่สุดเช่นเดียวกัน (66) การศึกษาเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จากโรงพยาบาลในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี 2010 – 2013 ด้วยวิธี multiplex PCR และ sequencing พบว่าเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase มากที่สุดคือเชื้อ *K. pneumoniae* และพบยีน bla_{IMP} มากที่สุด (62) ในประเทศแอฟริกาใต้ตั้งแต่ปี 2015 – 2016 พบยีน bla_{NDM} และ $bla_{OXA-48-like}$ มากที่สุด (67) ในประเทศไทยจากงานวิจัย Laolerd และคณะ ประเทศไทย ปี 2018 ที่ตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* พบยีน bla_{NDM} มากที่สุดถึงร้อยละ 46.64 รองลงมาคือ $bla_{OXA-48-like}$ และ bla_{NDM} ร่วมกับ และ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 25.11 และ bla_{IMP} ร้อยละ 3.14 ตามลำดับ (14) และงานวิจัยของ Srisrattakarn และคณะ ประเทศไทย ปี 2016 ได้ตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas* spp. พบยีน bla_{NDM} มากที่สุดถึงร้อยละ 91.24 รองลงมาคือ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 8.03 และ bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 0.73 ตามลำดับ (15) การศึกษาของ Jin และคณะ ในโรงพยาบาล Yanbian แผนกผู้ป่วยเด็ก ประเทศจีน ปี 2020 ได้ตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จากเชื้อ *K. pneumoniae* พบยีน bla_{KPC-2} มากที่สุดสูงถึงร้อยละ 57.14 ถัดมาคือ bla_{NDM-1} ร้อยละ 42.86 (68) การศึกษาของ Kumudunie และคณะ ประเทศศรีลังกา ปี 2020 ได้ทำการตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จากเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* พบ $bla_{OXA-48-like}$ มากที่สุดถึงร้อยละ 88.9 ถัดมาคือ bla_{NDM} ร้อยละ 14.8 และ bla_{KPC} ร้อยละ 3.7 ตามลำดับ (69)



ภาพที่ 9 การแพร่กระจายของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยแบ่งตามภูมิภาคและประเทศ (48)

9. การรักษาการติดเชื้อ CRE

ในปัจจุบันยาทางเลือกสำหรับรักษาการติดเชื้อ CRE มีตัวเลือกที่จำกัด ยาที่ได้รับการพิจารณาในการรักษาคือยา polymyxins (colistin หรือ polymyxins B) และ tigecycline ยา carbapenem ยังสามารถรักษาเชื้อ CRE ได้ โดยใช้ยากับเชื้อ CRE ที่มีค่า MIC ที่ต่ำ หรือใช้ยา carbapenem ปริมาณที่สูง ร่วมกับยาที่ต้าน CRE อื่น ๆ ซึ่งยาที่นิยมในการรักษาการติดเชื้อ CRE มีดังนี้ (54, 70)

9.1 Tigecycline เป็นยาในกลุ่ม glycylycylcline ตัวแรกที่ได้รับการอนุมัติในการใช้รักษาการติดเชื้อ CRE ซึ่งมีการรายงานจากประเทศแอฟริกา ตะวันออกกลาง และ ยุโรป ว่าอัตราเชื้อ CRE ที่ไวต่อยา tigecycline เท่ากับร้อยละ 95 และ 89 ยา tigecycline มักใช้ร่วมกับยาอื่น ๆ เช่น ยา colistin, aminoglycosides และ meropenem หากใช้ยา tigecycline เพียงตัวเดียวจะไม่สามารถยับยั้งเชื้อ CRE ที่สร้างเอนไซม์ *bla_{KPC}* ได้ ยา tigecycline ไม่ทำให้เกิด nephrotoxic เมื่อเปรียบเทียบกับยาชนิดอื่น เช่น polymyxins และ ยา aminoglycosides

9.2 Polymyxins (รวมถึง polymyxins E/colistin และ polymyxins B) เป็นยาที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็น MDR ยา polymyxins เป็นยาที่ใช้รักษาเชื้อ CRE อย่างกว้างขวาง แต่ยา polymyxins ยังมีข้อจำกัดคือ ยาสามารถเหนี่ยวนำทำให้เกิด nephrotoxicity และ neurotoxicity ถ้ามีการใช้ยาเป็นระยะเวลาสั้นเกินไป การรักษาด้วยยา polymyxins เพียงอย่างเดียวจะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้จึงต้องใช้ยาร่วมกับยากลุ่มอื่น

9.3 Aminoglycosides เช่น amikacin, gentamicin เป็นยาที่นิยมใช้ร่วมกับยาชนิดอื่น ๆ ในการรักษาเชื้อ CRE ยาในกลุ่มนี้จะไม่สามารถรักษาเชื้อที่สามารถสร้าง 16s rRNA methyltransferase ซึ่งมีอยู่ในเชื้อที่มียีน *bla_{NDM}* หรือบางครั้งสามารถพบได้ในยีน *bla_{KPC}*

9.4 Eravacycline เป็นยาใหม่ในกลุ่ม fluorocycline ซึ่งมีโครงสร้างที่คล้ายกับยา tigecycline ยา eravacycline สามารถทำลายเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL, *bla_{KPC}* และ *bla_{OXA}* เชื้อ *A. baumannii* ที่เป็น MDR และ เชื้อ *S. maltophilia* อย่างไรก็ตามยา eravacycline มีประสิทธิภาพน้อยกว่ายา levofloxacin ในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และ การให้ยา eravacycline แบบรับประทานพบว่าสามารถดูดซึมในร่างกายได้น้อยและมีประสิทธิภาพที่ลดลงเมื่อเทียบกับยา levofloxacin แบบรับประทาน

10. การป้องกันและควบคุมการระบาดของเชื้อ CRE

การควบคุมการติดเชื้อที่รวดเร็วและเหมาะสม จะต้องมีการดำเนินการให้ได้ทันเวลา มีการวางแผนล่วงหน้าโดยละเอียดสำหรับการจัดการผู้ป่วยที่มีเชื้อดื้อยาหลายขนาน ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ CRE ควรได้รับการตรวจคัดกรองและแยกตัวออกไปให้เร็วที่สุด ผลกระทบส่วนใหญ่จะเป็นผู้ที่มีเชื้อดื้อยาแต่ไม่แสดงอาการทำให้เกิดการแพร่กระจายไปยังผู้ป่วยรายอื่น การเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจอุจจาระ หรือ perianal ช่วยในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา ในบางครั้งมีการใช้สิ่งส่งตรวจจากบาดแผลหรือระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยบางคน (71)

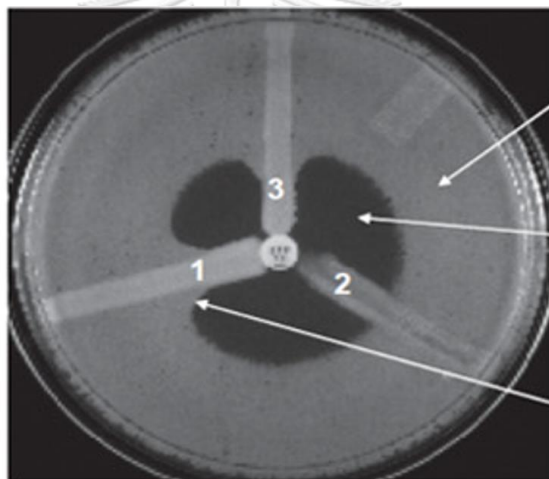
11. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase

11.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับฟีโนไทป์

เป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก แผลผล่ง่าย แต่ยังคงมีความไวความจำเพาะต่ำสำหรับบางยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase เมื่อเทียบกับวิธีทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับจีโนไทป์ วิธีในการทดสอบหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับฟีโนไทป์มีดังนี้ (13, 16, 47, 72, 73)

11.1.1 วิธี Modified Hodge test

หลักการคือ ป้ายเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem (*E. coli* ATCC 25922) บน MHA และวางยา ertapenem หรือ meropenem ไว้ตรงกลาง ชีดเชื้อที่ต้องการทดสอบจากตั้งฉากกับยาที่วางไว้ บ่มที่ อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์ carbapenemase เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 จะสามารถเจริญเข้าไปใกล้ยาได้มีลักษณะเป็น cloverleaf (ภาพที่ 10) วิธีนี้มีข้อดีคือ ง่าย สะดวก ไม่ ใช้อุปกรณ์หรือน้ำยาพิเศษ แต่มีข้อจำกัดคือ สามารถเกิดผลบวกปลอมได้จากเชื้อแบคทีเรียที่สร้าง เอนไซม์ ESBL หรือ AmpC และมีความไวต่ำในการตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จากยีน *bla_{NDM}* อย่างไรก็ตาม CLSI ตั้งแต่ ปี 2018 ได้ยกเลิกวิธีนี้

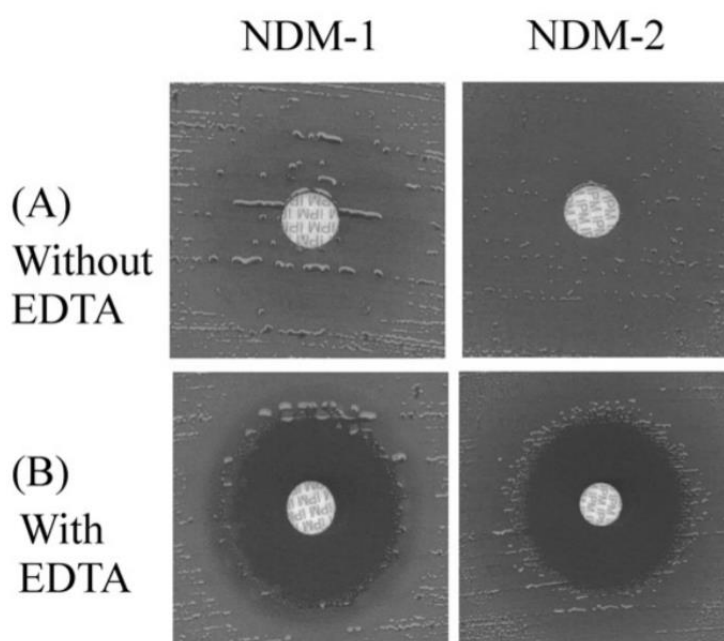


ภาพที่ 10 วิธี Modified Hodge test เชื้อตัวอย่างที่ 1 และ 3 Modified Hodge test positive
เชื้อตัวอย่าง ที่ 2 Modified Hodge test negative (17)

11.1.2 การทดสอบโดยอาศัยสารยับยั้ง (Inhibition based test)

ตัวยับยั้งเอนไซม์ carbapenemase จะทำให้เอนไซม์ carbapenemase มีฤทธิ์ลดลงและทำให้ไวต่อยาในกลุ่ม β - lactam มากขึ้น โดยสารยับยั้งจะทำให้ขนาด inhibition zone กว้างกว่าการใช้ยา carbapenem เพียงอย่างเดียว วิธีการนี้มีหลายเทคนิค เช่น เทคนิค combined disk test คือการดูความแตกต่างของขนาด inhibition zone ของแผ่นยาที่มีตัวยับยั้งกับเม็ดยาที่ไม่มีตัวยับยั้ง ดังภาพที่ 11 เทคนิค double-disk synergy test (disk approximation method) คือการวางแผ่นยาที่มีตัวยับยั้งกับแผ่นยาที่ไม่มีตัวยับยั้งห่างกัน 10 mm. จากขอบของเม็ดยา แล้วดูการเสริมฤทธิ์ของยา

เทคนิค E test strip คือการเทียบค่า MIC ระหว่าง strip ที่มีสารยับยั้งกับมียา carbapenem เพียงอย่างเดียว เช่น สารยับยั้ง EDTA ใช้ตรวจหาเอนไซม์กลุ่ม MBL หรือ Phenylboronic acid (PBA) ใช้ตรวจหาเอนไซม์ bla_{KPC} เทคนิค boronic acid inhibition test ใช้ boronic acid ในการทดสอบเพื่อตรวจหาเอนไซม์ β - lactamase class C ซึ่ง boronic acid สามารถที่จะยับยั้งเอนไซม์ bla_{KPC} ได้ด้วย ถ้าขนาดของแผ่นยาที่มีตัวยับยั้งกับเม็ดยาที่ไม่มีตัวยับยั้งต่างกันมากกว่าหรือเท่ากับ 5 mm. จะถือว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ bla_{KPC}



ภาพที่ 11 วิธีการทดสอบโดยอาศัยสารยับยั้ง (Inhibition based test) (A) คือแผ่นยา imipenem เพียงอย่างเดียว (B) แผ่นยา imipenem ที่มีสารยับยั้ง EDTA (74)

11.1.3 วิธี multidisk diffusion test

เป็นการใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดเพื่อตรวจหาชนิดของเอนไซม์หลายชนิดพร้อม ๆ กัน โดยตัวยับยั้งแต่ละชนิดจะยับยั้งเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เช่น PBA (ยับยั้ง bla_{KPC} และ AmpC), EDTA หรือ dipicolinic acid (ยับยั้ง MBL), clavulanate (ยับยั้ง ESBL), cloxacillin (ยับยั้ง AmpC) และเพิ่ม temocillin ในการตรวจหาเอนไซม์ $bla_{OXA-48-like}$ ดังภาพที่ 12 วิธีนี้มีความไวระหว่างร้อยละ 90 – 100 เป็นวิธีที่ไม่แพงและง่ายในการทำ แต่มีข้อจำกัดคือ ในบางครั้งถ้าเชื้อมีกลไกในการดื้อยามากกว่า 1 กลไก จะทำให้การแปลผลยากและมีความซับซ้อน



ภาพที่ 12 วิธี multidisk diffusion test (75)

11.1.4 UV – spectrophotometry

มีหลักการคือ เปรียบเทียบความแตกต่างของเอนไซม์ที่สลายยา imipenem กับยา imipenem เพียงอย่างเดียว โดยการวัดปริมาณการสลายยาที่ความยาวคลื่น 297 nm และวิเคราะห์ค่าความชันของ absorbance ต่อเวลาที่ วิธีนี้สามารถที่จะตรวจหาการดื้อยา carbapenem ด้วยกลไกการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ได้ มีความไวที่ร้อยละ 100 และความจำเพาะที่ร้อยละ 98.5 ราคาถูกและสามารถตรวจเอนไซม์ carbapenemase ได้ทุกชนิด ข้อเสียคือ ต้องใช้เครื่องที่จำเพาะ

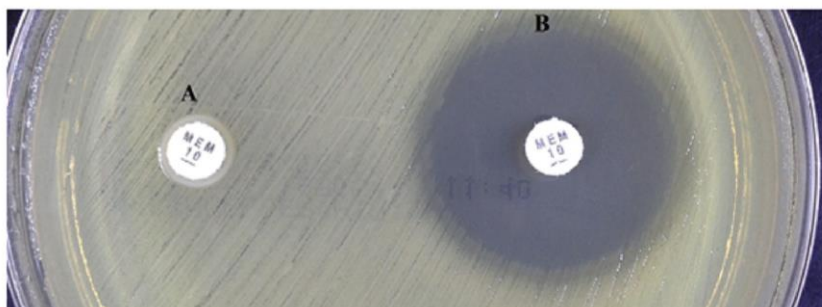
11.1.5 Mass spectrometry

ในปัจจุบัน Matrix – assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI – TOF) ถูกนำมาใช้ในการระบุเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในห้องปฏิบัติการทั่วไป ในปี 2011 มีการนำ MALDI – TOF มาใช้ในการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ carbapenemase โดย MALDI – TOF จะตรวจวัดผลผลิตของยา carbapenem ที่ถูกเอนไซม์สลาย ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase สเปกตรัมของยา carbapenem ที่ถูกเอนไซม์สลายจะมีการเปลี่ยนแปลงไป +18Da จากสเปกตรัมของยา carbapenem ที่ยังไม่ถูกสลาย

วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 95 ใช้เวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง ข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการแปลผลของสเปกตรัม

11.1.6 Carbapenem inhibition method (CIM)

หลักการคือ ใส่ยา meropenem ลงไปในสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ บ่มไว้ 2 ชั่วโมง ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase ยา meropenem จะถูกทำลายในทางตรงกันข้าม ถ้าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase ยา meropenem จะยังสามารถออกฤทธิ์ได้อยู่ และเมื่อนำยา meropenem ออกจากสารละลายมาวางบน MHA ที่มีเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem บำยอยู่ บ่มไว้ 1 คืน แล้วนำมาวัด inhibition zone ที่เกิดขึ้น ถ้ามีขนาด inhibition zone เท่ากับ 6 mm. จะแปลผลว่า CIM positive แต่ถ้ามีขนาด inhibition zone \geq 20 mm. จะแปลผลว่า CIM negative ดังภาพที่ 13 วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง ราคาถูก และง่ายต่อการแปลผล แต่มีข้อจำกัดคือ มีความไวในการตรวจเชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยยีน *bla_{OXA-48}* ต่ำ

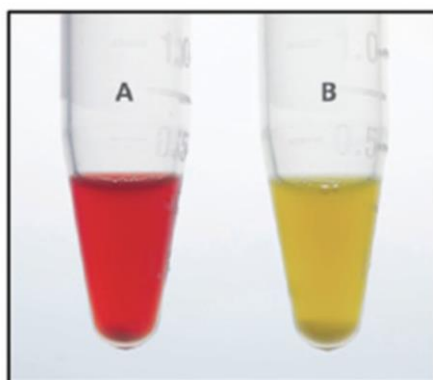


ภาพที่ 13 วิธี Carbapenem inhibition method (CIM) เชื้อตัวอย่าง A CIM positive ส่วนเชื้อตัวอย่าง B CIM negative (72)

11.1.7 CarbaNP

หลักการคือ การย่อย β - lactam ring ของยาในกลุ่ม imipenem ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ pH indicator จากสีแดงเป็นสีเหลืองหรือสีส้ม ดังภาพที่ 14 ความไวความจำเพาะในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Pseudomonas* spp. คิดเป็นร้อยละ 100 และร้อยละ 94 ตามลำดับ สำหรับ

เชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* มีความไวเท่ากับร้อยละ 73 – 100 และมีความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 วิธีนี้ใช้เวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง ราคาถูก และไม่ต้องการอุปกรณ์พิเศษในการทดสอบ แต่มีข้อจำกัดคือพบผลลบปลอมในเชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ที่มีฤทธิ์ในการทำลายยาต้าน โดยเฉพาะ bla_{OXA-48} ที่พบในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* วิธีนี้เป็นวิธีที่ CLSI ในปี 2019 แนะนำ



ภาพที่ 14 วิธี CarbaNP (17)

11.1.8 Modified carbapenem inhibition method (mCIM)

จะมีหลักการที่คล้ายกับวิธี CIM แต่แบคทีเรียที่ต้องการจะศึกษาจะใส่ลงใน tryptic soy broth (TSB) และ ใช้เวลาในการบ่ม 4 ชั่วโมง แล้วแปลผล inhibition zone ตาม CLSI ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 15 วิธีนี้ได้รับการรับรองจาก CLSI ในปี 2019 มีความไวและความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 99 สำหรับในการตรวจหาเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ทั้ง 5 ยีน คือ bla_{VIM} , bla_{OXA-48} , bla_{IMP} , bla_{KPC} , bla_{NDM} แต่มีความไวความจำเพาะในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จากเชื้อ *A. baumannii* ที่ต่ำ โดยมีความไวร้อยละ 80 และมีความจำเพาะร้อยละ 53 โดย CLSI ไม่แนะนำวิธีนี้กับเชื้อ *A. baumannii*

ตารางที่ 3 การแปลผลของ mCIM

Inhibition zone	การแปลผล
6 – 15 mm.	เชื่อมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (carbapenemase positive)
16 – 18 mm.	เชื่ออาจจะมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase หรือไม่มีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (carbapenemase indeterminate)
≥ 19 mm.	เชื่อไม่มีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (carbapenemase negative)



ภาพที่ 15 วิธี mCIM A.) carbapenemase positive B.) carbapenemase negative (17)

ความแตกต่างของวิธีการทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับพีโนไทป์วิธีต่าง ๆ ดังสรุปในตารางที่ 4 และข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละ ดังสรุปในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบวิธีการทดสอบหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับฟีโนไทป์วิธีต่าง ๆ (18)

วิธีการทดสอบ	ความไวและความจำเพาะ	ระยะเวลาในการออกผล (Turnaround time)	วัตถุประสงค์	ความสามารถในการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการ
Broth microdilution MBL	> 90 %	2 วัน	ตรวจหาเอนไซม์ในกลุ่ม MBL	น้อย - ปานกลาง
MIC strip (E test <i>bla</i> _{KPC} และ E test MBL)	70 – 90 %	2 วัน	ตรวจหาเอนไซม์ <i>bla</i> _{KPC} และ MBL	ปานกลาง (มีชุดการทดสอบใช้สำหรับงานวิจัยเท่านั้น)
Multidisk mechanism testing	> 90 %	2 วัน	ตรวจหาการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ carbapenemase	ปานกลาง (มีชุดการทดสอบใช้สำหรับงานวิจัยเท่านั้น)
Modified Hodge test	70 – 90 %	2 วัน	ตรวจหาการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ carbapenemase	สูง
CarbaNP	70 – 90 %	ภายใน 1 วัน	ตรวจหาการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ carbapenemase	ปานกลาง (วิธีที่ CLSI แนะนำ)
Carbapenemase inactivation method	> 90 %	2 วัน	ตรวจหาการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ carbapenemase	สูง
MALDI – TOF MS	> 90 %	ภายใน 1 วัน	ตรวจหาการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ carbapenemase	น้อย - ปานกลาง

ตารางที่ 5 ข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธีการตรวจในระดับพีโนไทป์

วิธีการทดสอบ	ข้อดี	ข้อจำกัด
Broth microdilution MBL, MIC strip (E test KPC และ E test MBL)	ราคาไม่แพง, ง่ายต่อการทำ, ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ หรือน้ำยาพิเศษ	ตรวจหาได้เฉพาะเอนไซม์ <i>bla_{KPC}</i> กับ MBL และมีความจำเพาะต่ำเมื่อเชื่อมีการสร้าง AmpC
Multidisk mechanism testing	ราคาไม่แพง, ง่ายต่อการทำ, ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ หรือน้ำยาพิเศษ	ถ้าเชื่อมีกลไกในการดื้อยา มากกว่า 1 กลไก จะทำให้การแปลผลยากและมีความซับซ้อน
Modified Hodge test	ราคาไม่แพง, ง่ายต่อการทำ, ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ หรือน้ำยาพิเศษ	ความไวต่ำในการตรวจหาเอนไซม์ <i>bla_{NDM}</i> และเกิดผลบวกปลอมเมื่อเชื่อมีการสร้าง AmpC หรือ ESBL
CarbaNP	ราคาไม่แพง, ง่ายต่อการทำ, ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ หรือน้ำยาพิเศษ, ใช้เวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง	ความไวต่ำในการตรวจหาเอนไซม์ จากยีน <i>bla_{OXA-48}</i>
Carbapenemase inactivation method	ราคาไม่แพง, ง่ายต่อการทำ, ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ หรือน้ำยาพิเศษ	ความไวต่ำในการตรวจหาเอนไซม์ จากยีน <i>bla_{OXA-48}</i>
MALDI – TOF MS	มีความไวและความจำเพาะสูง, ใช้เวลาในการตรวจไม่เกิน 4 ชั่วโมง	เครื่องมือมีราคาแพงและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการแปลผลของสเปกตรัม
MCIM	ราคาถูกและง่ายต่อการแปลผล ไม่ใช้อุปกรณ์หรือน้ำยาพิเศษ มีความไวและความจำเพาะสูง	ความไวความจำเพาะต่ำในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จากเชื้อ <i>A. baumannii</i>

11.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับจีโนไทป์

วิธีการทดสอบในระดับจีโนไทป์เป็นวิธีอ้างอิงมาตรฐานสำหรับการทดสอบหาแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และการทำ sequencing วิธีการทดสอบในระดับจีโนไทป์มีความจำเพาะมากกว่าวิธีการทดสอบในระดับฟีโนไทป์

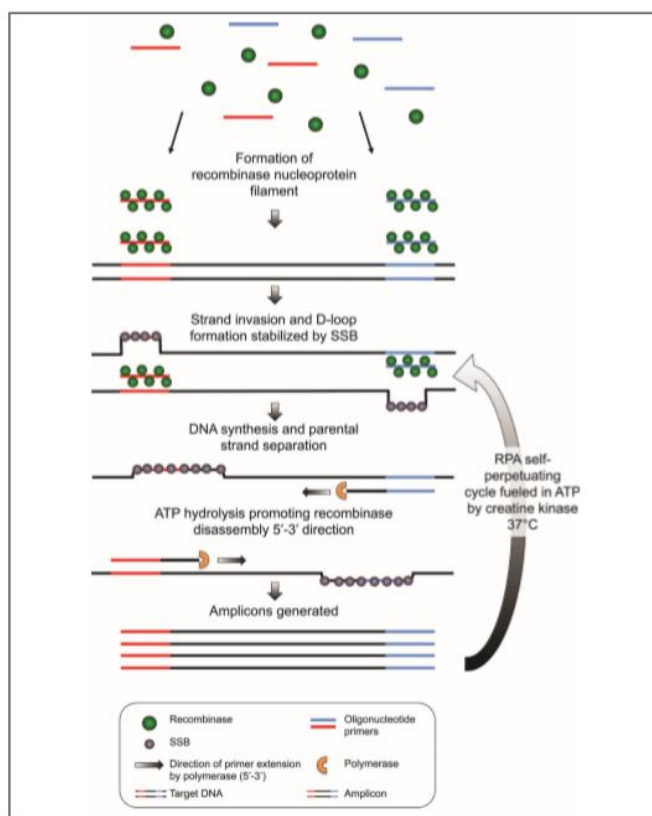
แต่วิธีการทดสอบในระดับจีโนมไทป์มีข้อด้อยคือ ต้องใช้เครื่องมือที่เฉพาะและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ ทำให้ไม่สามารถใช้กับห้องปฏิบัติการที่มีขนาดเล็กได้ (20, 21) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับจีโนมไทป์มีหลากหลายเทคนิค เช่น เทคนิค PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มสารพันธุกรรมได้เป็นพันล้าน copy จาก สารพันธุกรรมเป้าหมายเพียง 1 โมเลกุล ภายในเวลา 2 – 3 ชั่วโมง จากการศึกษาของ Laolerd และคณะ ในประเทศไทย และการศึกษาของ Ling และคณะ ประเทศสิงคโปร์ ตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยเทคนิค PCR ยีนที่พบมากที่สุดคือ ยีน *bla_{NDM}* (14, 39)

เทคนิค Real time PCR โดยติดฉลากสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งที่ต้องการตรวจวัดได้และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที Monteiro และคณะได้ทดสอบหายีน *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* และ *bla_{NDM}* ด้วยเทคนิค multiplex real time PCR เทียบกับเทคนิค PCR sequencing พบว่าให้ผลความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 (20) แต่มีข้อจำกัดคือ สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารยับยั้งที่อยู่ในตัวอย่างเหมือนกับเทคนิค PCR เช่น ฮีโมโกลบินหรือยูเรีย ต้องใช้เครื่องมือที่เฉพาะและใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ เครื่องมือมีราคาแพง (76)

เทคนิค Loop – mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียวโดยมีการใช้ primer 2 ชุดที่มีความแตกต่าง 6 ตำแหน่ง Cheng และคณะได้ทดสอบหายีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}* และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยตาเปล่าโดยการใส่สี SYBR green ลงไป หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะกับเทคนิค PCR sequencing พบว่ายีนที่พบมากที่สุดคือยีน *bla_{NDM}* และยีน *bla_{KPC}* และให้ผลความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับ PCR sequencing (77) ข้อดีของเทคนิค LAMP สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้ภายใน 1 ชั่วโมง สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา ปริสิต เชื้อไมโครพลาสมา และสามารถประยุกต์ใช้ตรวจมะเร็งได้ แต่มีข้อจำกัดคือ การออกแบบ primer เนื่องจาก primer ที่ใช้มี 2 ชุดและมีความแตกต่าง 6 ตำแหน่งทำให้เกิดความซับซ้อน และบางครั้งอาจทำให้เกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะได้ (78)

12. Recombinase polymerase amplification (RPA)

เป็นหนึ่งในวิธีของ isothermal amplification พัฒนาโดย Piepenburg และคณะ ในปี 2006 RPA มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้เป็นพันล้าน ภายใน 20 – 40 นาที และใช้อุณหภูมิระหว่าง 37 °C ถึง 42 °C โดยวิธี RPA จะมีส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วนคือ recombinase protein (RecA), single-strand DNA binding protein (SSB) และ Sau DNA polymerase เริ่มจาก RecA จับกับ primer เป็น nucleoprotein filament ซึ่งจะเป็นตัวสแกนหาดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีเบสคู่สมกัน และแยกสายดีเอ็นเอบริเวณที่จับเป็นลักษณะ D-loop โดยจะมี ssDNA binding protein ช่วยตรึงสายไว้เพื่อไม่ให้สายดีเอ็นเอกลับมาจับกันอีก จากนั้น RecA จะหลุดออกจาก nucleoprotein filament โดยกระบวนการ ATP hydrolysis เอนไซม์ Sau DNA polymerase จะทำการต่อสายดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งจะเป็นต้นแบบในการสร้างสายดีเอ็นเอในรอบถัดไป (22) ดังภาพที่ 16



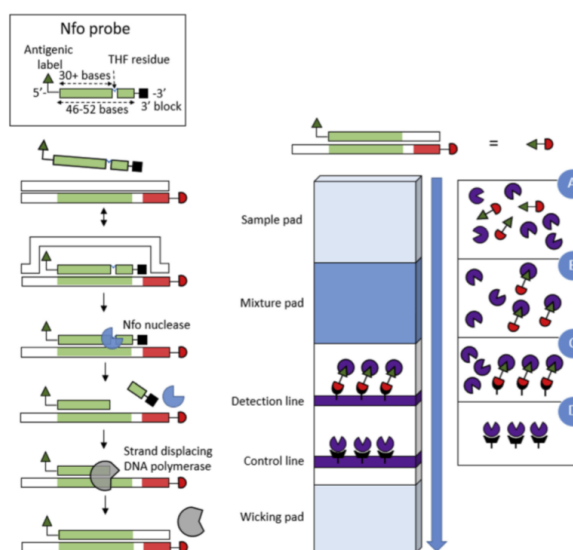
ภาพที่ 16 กลไกของวิธี Recombinase polymerase amplification (RPA) (22)

พารามิเตอร์ที่สำคัญของ เทคนิค RPA เริ่มต้นจากการออกแบบ primer ซึ่ง primer จะต้องมีความยาวระหว่าง 30 – 35 bp ถ้า primer มีความยาวที่มากเกินไป (> 45 bp) จะทำให้เกิด primer dimer ได้ (79) มีหลาย ๆ การศึกษาพบว่าสามารถใช้ primer PCR ปกติมาทำ RPA ได้และมีประสิทธิภาพที่ดี primer ไม่ควรมี GC น้อยกว่าร้อยละ 30 หรือ มากกว่าร้อยละ 70 เพราะจะทำให้ primer จับกันเองเกิด 2nd structure เทคนิค RPA สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้มากถึง 1.5 kb แต่ขนาดที่เหมาะสมคือ 100 – 200 bp สำหรับอุณหภูมิ ปฏิกิริยา RPA สามารถเกิดได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 22 – 45 °C อย่างไรก็ตามการศึกษามากส่วนใหญพบว่าอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 37 – 42 °C ปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถตรวจพบได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นระยะเวลาที่ใช้ประมาณ 20 นาที (21) แต่เทคนิค RPA ยังมีข้อจำกัดคือ จะต้องทำความสะอาดบริสุทธิ์ผลผลิต RPA (Purification) ก่อนที่จะตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose Gel electrophoresis และวิธี Lateral flow เทคนิค RPA จะสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ถ้ามีความเข้มข้นของสารพันธุกรรมต้นแบบที่มากเกินไป ทำให้เกิด primer dimer ในปฏิกิริยาได้หากใส่ความเข้มข้นของสารพันธุกรรมต้นแบบนี้มากเกินไป (21, 80) และ RPA มีผลเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปโดยบริษัท TwistDx ซึ่งใช้ในงานวิจัยเท่านั้น สามารถเพิ่มสารพันธุกรรมได้ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ในชุดน้ำยาประกอบด้วย lyophilized RPA reagent pellets, 1X reaction buffer, แมกนีเซียมอะซิเตต (magnesium acetate), ตัวควบคุมผลบวก (positive control DNA), ตัวควบคุม primer (control primers) และตัวควบคุมสัญญาณ (probe) (22) การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RPA มีหลายวิธี ดังนี้ (21, 81-83)

12.1 วิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose Gel electrophoresis) มีหลักการคือดีเอ็นเอที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางคือ วุ้นอะกาโรส ถ้าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ และความเข้มข้นของวุ้นอะกาโรสจะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ หลังจากเสร็จสิ้นการทำ Agarose Gel electrophoresis สามารถอ่านผลได้โดยนำวุ้นอะกาโรสมาย้อมสีที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้เช่น ethidium bromide หรือ SYBR Green ดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ แต่มีการทำให้ผลิตภัณฑ์ RPA มีความบริสุทธิ์ก่อนเพื่อป้องกันการเกิด smear band บน gel

12.2 วิธี Lateral flow เป็นวิธีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า รวดเร็ว และสามารถแยกชนิดของผลิตภัณฑ์ได้ บริษัทผู้จัดจำหน่ายได้พัฒนาชุดทดสอบ TwistAmp[®] nfo kit เพื่อใช้ในการตรวจวัดด้วยวิธี lateral flow โดย probe ที่ใช้ควรมีความยาว 46 – 52 bp และติดฉลากด้วย antigenic ที่

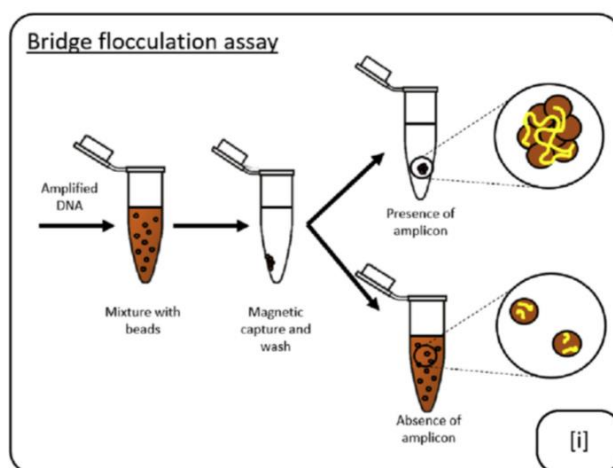
ปลายด้าน 5' ส่วนปลายด้าน 3' จะติดฉลากด้วย polymerase extension blocking group ซึ่ง antigenic ที่นิยมใช้คือ carboxyfluorescein group (FAM) และ primer ที่ใช้จะติดฉลากด้วย biotin เมื่อเกิดการจับกันของ primer และ สารพันธุกรรม เอนไซม์ nfo cleaves จะตัดสายบริเวณ THF residue ของ probe ทำให้เอนไซม์ Bsu polymerase เข้ามาจับเพื่อต่อสายสารพันธุกรรมได้ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ RPA ที่มีปลายข้างหนึ่งติดฉลากด้วย Biotin เมื่อหยดลงบนชุดทดสอบ Lateral flow บริเวณ Sample pad ที่มีสี α FAM – Gold อยู่ ผลิตภัณฑ์ RPA จะจับกันอย่างจำเพาะกับ FAM เมื่อล้างด้วย buffer จะเคลื่อนที่ไปยัง Detection line และ จะจับได้กับ antibody ที่อยู่บน Detection line เกิดเป็นแถบสีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นสี α FAM – Gold ที่ไม่ได้ใช้ในปฏิกิริยาจะจับกับ α FAM – Gold antibody ที่อยู่ตรง Control line ซึ่งเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะแสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 กลไกการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี RPA และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Lateral flow (21)

12.3 วิธีการตรวจวัดการตกตะกอน (Bridge flocculation assay) เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้อุปกรณ์สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมืออุปกรณ์น้อย ในการทำปฏิกิริยา Bridge flocculation จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ ค่า pH และความยาวของสารพันธุกรรมโดยจะต้องมีความยาวอย่างน้อย 100 bp เพื่อให้สามารถเชื่อมอนุภาพโพลิเมอร์และเกิดการ

จัดกันตกตะกอนได้ ข้อดีคือ สามารถอ่านผลได้ชัดเจน รวดเร็ว แต่ข้อด้อยคือจะมีขั้นตอนของการเติมสารภายหลังปฏิกิริยาอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดงขั้นตอนการเกิด Bridge flocculation (21)

12.4 การตรวจวัดจากการเปลี่ยนแปลงสี (Colorimetric detection) เป็นวิธีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดย primer จะติดฉลากด้วย biotin และจะติดตามปฏิกิริยาได้ด้วยเอนไซม์ streptavidin – HRP, TMB และ H_2O_2 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี ซึ่งความเข้มข้นของสีจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารพันธุกรรม วิธีนี้มีข้อเสียคือ สามารถเกิดการรบกวนของปฏิกิริยาและมีการปนเปื้อนได้ง่าย

12.5 วิธีการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I โดยมีหลักการคือ สี SYBR Green I เป็น fluorescence จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายคู่ตรง minor groove สีจะเข้าไปทำปฏิกิริยาและทำให้เกิดแสงสีเขียว ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หากไม่มีผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือมีสารพันธุกรรมต้นแบบสายเดี่ยวจะไม่เกิดการเรืองแสง สี SYBR Green I สามารถเรืองแสงได้ 800 ถึง 1,000 เท่าเมื่อจับกับดีเอ็นเอสายคู่ ทำให้มีความไวสูงในการตรวจสอบผลผลิต แต่มีข้อจำกัดคือ หากในปฏิกิริยาเกิด primer dimer หรือเกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะจะทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวอ่านผลได้ยาก

13. การประยุกต์ใช้เทคนิค RPA

Piepenburg และคณะ เป็นผู้ริเริ่มพัฒนาเทคนิค RPA โดยใช้ตรวจหาเชื้อ methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยใช้สารพันธุกรรมน้อยกว่า 10 copies และใช้เวลา น้อยกว่า 30 นาที (84) หลังจากนั้นได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค RPA ในการตรวจวินิจฉัยต่าง ๆ ดัง ตัวอย่างในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตัวอย่างงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคนิค RPA

เชื้อจุลินทรีย์	สารพันธุกรรมเป้าหมาย	สิ่งส่งตรวจ	ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที)	อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (°C)	Limit of detection	เอกสารอ้างอิง
MRSA	dsDNA	Genomic DNA	น้อยกว่า 30	37	10 copies	(84)
Cryptosporidium	dsDNA	อุจจาระ	30	37	1 – 10 copies	(85)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	dsDNA	ปัสสาวะ	10	38	50 copies	(86)
<i>Listeria monocytogenes</i>	dsDNA	Genomic DNA จาก เนื้อหมู, ไก่	20	37	1360 CFU/ml	(87)
<i>Campylobacter jejuni</i>	dsDNA	ไข่, เนื้อไก่	20	45	1 – 10 ³ CFU/ml	(88)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	dsDNA	Cell lines	20	37	25 copies	(89)
<i>Schistosoma japonicum</i>	dsDNA	อุจจาระ	20	39	5 fg	(90)
ยีนดื้อยา <i>bla</i> _{CTX-M-15} จากเชื้อ <i>E. coli</i>	dsDNA	เซลล์เพาะเลี้ยง	15	39	5.6 fg	(91)
ยีน IS6110 จากเชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB)	dsDNA	ระบบทางเดินหายใจ	20	39	6.25 fg	(92)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์

สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วยชุดน้ำยาเอนไซม์ Taq polymerase และ Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) สั่งซื้อจากบริษัท New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา Primer สั่งสังเคราะห์จากบริษัท U2Bio, สาธารณรัฐเกาหลี

สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA) ประกอบด้วยชุดน้ำยา RPA TwistAmp® Basic สั่งซื้อ จากบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ Primer สั่งสังเคราะห์จากบริษัท U2Bio จำกัด สาธารณรัฐเกาหลี ชุด NucleoSpin® Gel and PCR clean up สั่งซื้อจากบริษัท MACHEREY – NAGEL จำกัด, เยอรมนี

สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis ประกอบด้วย Le agarose สั่งซื้อจากบริษัท VWR international จำกัด, สหรัฐอเมริกา ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา 6X Loading dye สั่งซื้อจากบริษัท New England Biolabs จำกัด, สหรัฐอเมริกา Ultrapure dye สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา

2. เครื่องมือ

เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่าง จากบริษัท Eppendorf เยอรมนี เครื่องผสมสาร จากบริษัท Genie2, สหรัฐอเมริกา เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) จากบริษัท SensoQuest เยอรมนี เครื่องแยกวิเคราะห์สารพันธุกรรมในแนวนอน (Gel electrophoresis) จากบริษัท Labnet, สหรัฐอเมริกา เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบนาโน (Nanodrop™ spectrometer) จากบริษัท Thermal Scientific, สหรัฐอเมริกา Auto pipette จากบริษัท Gilson, ฝรั่งเศส Microcentrifuge tube (1.5 mL) จากบริษัท Watson, ญี่ปุ่น PCR tube (0.2 mL) จากบริษัท Cell – Nest, จีน Glassware จากบริษัท Pyrex, สหรัฐอเมริกา Pipette tip (10, 200, 1000 µl) จากบริษัท Wuxi NEST Biotechnology, จีน

3. วิธีการทดลอง

3.1 กลุ่มประชากรและลักษณะของกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่าง โดยใช้สูตร Buderer (93) กำหนดค่าคาดหวังที่ $1 - \alpha$ ดังนี้

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความไว

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

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

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความจำเพาะ

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

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

การแทนค่าในสูตร

$$TN+FN = \frac{1.96^2 \times 0.99(1-0.99)}{0.05^2} = 15.2$$

$$N1 = \frac{15.2}{0.115} = 132$$

$$N2 = \frac{15.2}{1-0.115} = 17$$

เมื่อ $N1$ และ $N2$ = ขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้

W = ค่าผิดพลาดสูงสุดที่ยอมรับได้

P = ค่าเฉลี่ยความชุกของการติดเชื้อดื้อยา

Z = ระดับความเชื่อมั่นที่ผู้วิจัยกำหนดไว้ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

SN = ค่าความไวของการทดสอบด้วยวิธี nucleotide sequencing

SP = ค่าความจำเพาะของการทดสอบด้วยวิธี nucleotide sequencing

จากการคำนวณจากสูตร Buderer โดยใช้ข้อมูลตัวแปรจาก ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (NARST) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเชื้อ $K.$

pneumoniae ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem ร้อยละ 11.5 และจากงานวิจัยของ Naas และคณะ (94) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจแยกชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี DNA Microarray และวิธี PCR ร่วมกับ Nucleotide sequencing พบว่าวิธี Nucleotide sequencing มีค่าความไวและความจำเพาะต่อการตรวจยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} ร้อยละ 100 และยีน $bla_{OXA-48-like}$ มีความไวร้อยละ 95 และความจำเพาะร้อยละ 100 การศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดค่าความหวังใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยกำหนดค่าความจำเพาะและค่าความไวที่ร้อยละ 99 เมื่อคำนวณแล้วขนาดกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษาโดยการแทนค่าในสูตรพบว่า $N1 > N2$ ขนาดตัวอย่างมีจำนวนเท่ากับ 132 ตัวอย่าง

3.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

K. pneumoniae จำนวน 200 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ที่ให้ผลดื้อยา carbapenem จากการตรวจคัดกรอง จำนวน 150 ตัวอย่าง เก็บระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง ธันวาคม 2018 โดยแบ่งเป็น perianal ในงานเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา จำนวน 129 ตัวอย่าง และจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยเด็ก จำนวน 21 ตัวอย่าง ดังนี้ เลือด จำนวน 3 ตัวอย่าง ปัสสาวะ จำนวน 3 ตัวอย่าง หนองแผล จำนวน 3 ตัวอย่าง เสมหะ จำนวน 2 ตัวอย่าง tracheal จำนวน 7 ตัวอย่าง ปลายสายสวนต่าง ๆ จำนวน 2 ตัวอย่าง และน้ำในช่องท้อง จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ใช้วิธี disk diffusion กับยาในกลุ่ม carbapenem 3 ชนิด คือ ertapenem 10 μ g, imipenem 10 μ g, meropenem 10 μ g และแปลผลความไวต่อยาตามมาตรฐาน CLSI ปี 2019 เชื้อที่มี inhibition zone ของ ertapenem \leq 18 mm. imipenem \leq 19 mm. meropenem \leq 19 mm. แปลผลได้ว่าเชื้ออาจจะมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase และ เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่าง เก็บระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึง มีนาคม 2020 จากสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี จำนวน 25 ตัวอย่าง และได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี จำนวน 25 ตัวอย่าง ทำการเก็บรักษาเชื้อ ใน skim milk ที่มี 10 % glycerol ที่อุณหภูมิ -70°C

3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase

นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เก็บรักษาใน skim milk ที่มี 10 % glycerol มาเพาะเลี้ยง บน MacConkey agar จากนั้นป้อนที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบยืนยันการ

สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) กับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยา carbapenem ด้วยวิธีการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ต่อไป

3.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM)

นำ loop ที่ปราศจากเชื้อขนาด 1 μ l เชื้อเชื้อ *K. pneumoniae* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ใส่ลงใน Tryptic Soy broth (TSB) 2 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร 10 – 15 วินาที จากนั้นคืบแผ่นยา meropenem 10 μ g ใส่ลงไปในแต่ละหลอด แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง \pm 15 นาที ก่อนจะครบเวลา 4 ชั่วโมง เตรียม *Escherichia coli* ATCC 25922 ใส่ลงในน้ำเกลือแล้วปรับปริมาณเชื้อโดยเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นป้ายเชื้อลงบน Muller–Hinton agar ใช้ loop เชื้อแผ่นยา meropenem ออกมาจากหลอดที่บ่มไว้ วางลงบน Muller–Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง วัดขนาดของ inhibition zone และแปลผลตามมาตรฐาน CLSI ดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงการแปลผลของวิธี mCIM ตามมาตรฐาน CLSI

Inhibition zone (mm.)	การแปลผล
6 – 15 mm.	เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase (carbapenemase positive)
\geq 19 mm.	เชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase (carbapenemase negative)
16 – 18 mm.	เชื้ออาจจะมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase หรือไม่มีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (carbapenemase indeterminate) ควรทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธีอื่น ถ้ามีขนาด inhibition zone \geq 19 mm. และมีโคโลนีของเชื้ออยู่ภายใน ให้แปลผลว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase

3.5 การสกัดสารพันธุกรรม

นำ loop ที่ปราศจากเชื้อขนาด 1 μ l เชื้อเชื้อ *K. pneumoniae* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ใส่ลงใน Tryptic Soy broth (TSB) 4 ml ที่มียา meropenem ความเข้มข้น 4

µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 6 – 8 ชั่วโมง ดูดเชื้อปริมาตร 1.5 ml ใส่ใน microtube บั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนใส เติม TE buffer ปริมาตร 300 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เวลา 10 นาที จากนั้นนำมาบั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส 300 µl ถ่ายใส่ในหลอดใหม่ วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop™ spectrometer (Thermal Scientific, สหรัฐอเมริกา) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร อัตราส่วนควรอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ -20 °C

3.6 การเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยเทคนิค PCR

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* เป็นยีนควบคุมภายใน โดยใช้ primer ดังสรุปในตารางที่ 8 แต่ละหลอด ประกอบด้วย 1X PCR buffer, dNTP ความเข้มข้น 0.2 mM, primer *bla*_{KPC} *bla*_{NDM} และ *waaQ* ความเข้มข้นหลอดละ 0.2 µM และ primer *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VIM} ความเข้มข้นหลอดละ 0.1 µM, Taq polymerase ความเข้มข้น 1.25 U และดีเอ็นเอแม่แบบ 50 – 100 ng ปริมาตร 1 µl ในปริมาตรรวมทั้งหมด 30 µl สภาพปฏิบัติการดังนี้ Pre denature อุณหภูมิ 94 °C, 10 นาที, 40 รอบ ของ 94 °C, เวลา 30 วินาที, ใช้ อุณหภูมิ annealing ตามชนิด primer ดังนี้ *waaQ* ที่ 58 °C, 1 นาที, *bla*_{OXA-48-like} และ *bla*_{NDM} ที่ 52 °C, 1 นาที, *bla*_{IMP} และ *bla*_{KPC} ที่ 55 °C, 1 นาที, *bla*_{VIM} ที่ 57 °C, 1 นาที, ต่อด้วย 72 °C, 50 วินาที และ สุดท้ายที่ 72 °C, 5 นาที โดยมีหลอดควบคุมบวก คือ ดีเอ็นเอ *bla*_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA-1705, *bla*_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, *bla*_{OXA-48-like} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, *bla*_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ *bla*_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 8 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Target gene	Sequence	ขนาด product	อ้างอิง
<i>bla_{KPC}</i>	5' - GTCAGTGTATCGCCGTCTAGTTC - 3' 5' -TGGTGGGCCAATAGATGATT- 3'	909	(95)
<i>bla_{IMP}</i>	5' - AAGGCGTTTATGTTTCATACTTCG - 3' 5' - TTTAACCGCCTGCTCTAATGTAA - 3'	605	
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	5' - TTGGTGGCATCGATTATCGG - 3' 5' - GAGCACTTCTTTTGTGATGGC - 3'	743	(96)
<i>bla_{VIM}</i>	5' - ATTGGTCTATTTGACCGCGTC - 3' 5' - TGCTACTCAACGACTGAGCG - 3'	780	
<i>bla_{NDM}</i>	5' - CACCTCATGTTTGAATTCGCC - 3' 5' - CTCTGTCACATCGAAATCGC - 3'	943	(14)
waaQ	5' - ATCATGGCGACATGCTGCT - 3' 5' - CGGCGATCGACACCATAAAT - 3'	151	ออกแบบในการศึกษานี้

3.7 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

เตรียมวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 % ใน Tris - acetate EDTA (TAE) buffer ปริมาณความเข้มข้น 1 เท่า และสี ultrapure dye ปริมาตร 0.125 μ l จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ปริมาตร 5 μ l ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 1 μ l แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 45 นาที ตรวจสอบผลโดยใช้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Biorad, สหรัฐอเมริกา) สังเกตจากแถบสีดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นวุ้นเทียบขนาดกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพ

3.8 การวิเคราะห์ลำดับเบส

เตรียมผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6 ปริมาตร 10 - 15 μ l ความเข้มข้น 150 - 200 ng/ μ l และ Forward primer ของยีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* ความเข้มข้น 10 μ M ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท U2Bio จำกัด ประเทศเกาหลี นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อสำหรับแต่ละยีนดังนี้ ยีน *bla_{KPC}* เทียบกับ *K. pneumoniae* A1759 accession number MH909338.1 ยีน *bla_{NDM}* เทียบกับ เชื้อ *Klebsiella aerogenes* CR33 accession number

MK450349.1 ยีน *bla_{VIM}* เทียบกับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* JUPA4001 accession number LC467967.1 ยีน *bla_{IMP}* เทียบกับ เชื้อ *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* SQ049 accession number MK088089.1 ยีน *bla_{OXA-48-like}* เทียบกับเชื้อ *K. pneumoniae* Kp67 accession number MK680005.1 โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) และโปรแกรม Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)

3.9 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA

3.9.1 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA

ทดสอบปฏิกิริยา RPA ด้วยผลิตภัณฑ์ชุด TwistAmp Basic reaction kit ของบริษัท TwistDx จำกัด ประเทศอังกฤษ ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RPA โดยทำการทดสอบกับ primer ที่จำเพาะต่อยีน *bla_{KPC}-A*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}* ดังสรุปในตารางที่ 9 แยกทดสอบ primer แต่ละคู่ในแต่ละหลอดปฏิกิริยา ใช้ความเข้มข้น primer ที่ 0.48 μ M ผสมกับน้ำยา rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ l ผสมด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลาย ปริมาตร 47.5 μ l ใส่ลงใน Freeze-dried tube เติมดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/ μ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เติม MgAC ความเข้มข้น 280 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 และ 42 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 20 นาที หลอดควบคุมบวกคือดีเอ็นเอ *bla_{KPC}* จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA – 1705, *bla_{NDM}* จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, *bla_{OXA-48-like}* จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, *bla_{IMP}* จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ *bla_{VIM}* จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 % ใน Tris – acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 45 นาที และเลือกอุณหภูมิที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}* ที่ชัดเจนที่สุด

ตารางที่ 9 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex RPA

Target gene	Sequence	ขนาด product	อ้างอิง
<i>bla</i> _{NDM}	5' – GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC – 3' 5' – CGGAATGGCTCATCACGATC – 3'	621 bp	(19)
<i>bla</i> _{IMP}	5' – GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC – 3' 5' – GGTTTAAAYAAAACAACCACC – 3'	232 bp	
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	5' – GCGTGGTTAAGGATGAACAC – 3' 5' – CATCAAGTTCAACCCAACCG – 3'	438 bp	
<i>bla</i> _{VIM}	5' – GATGGTGTGGTTCGCATA – 3' 5' – CGAATGCGCAGCACCAG – 3'	390 bp	
<i>bla</i> _{KPC-A}	5' – CGTCTAGTTCTGCTGCTTG – 3' 5' – CTTGTCATCCTTGTAGGCG – 3'	798 bp	
<i>bla</i> _{KPC-B}	5' – TAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCAT – 3' 5' – GTGCAATACAGTGATAACGCCGCCCAAT – 3'	304 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
<i>bla</i> _{KPC-C}	5' – TGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGC – 3' 5' – ATTGGCGGCGGCGTTATCACTGTATTGCAC – 3'	271 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
<i>waaQ-A</i>	5' – ATCATGGCGACATGCTGCT – 3' 5' – CGGCGATCGACACCATAAAT – 3'	151 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
<i>waaQ-B</i>	5' – TATGGAGACCGAGCTGTGGCCGAATATGGT – 3' 5' – TTTGGCATAGGCTTTGGCGGAACGTTCCGGA – 3'	112 bp	ออกแบบในการศึกษานี้

3.9.2 การทดสอบความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA

ทดสอบความเข้มข้นของ primer ยีน *bla*_{KPC-A}, *bla*_{KPC-B}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP} และ *bla*_{VIM} ที่เหมาะสมโดยแยก primer แต่ละยีนในแต่ละหลอดปฏิกิริยา ทดสอบความเข้มข้น primer แต่ละคู่ที่ 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 μ M ตามลำดับ ผสมกับน้ำยา rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ l ผสมด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 47.5 μ l ใส่ลงใน Freeze-dried tube เติมน้ำดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/ μ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เติม MgAC ความ

เข้มข้น 280 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 μ l บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมดังข้อ 3.9.1 เป็นเวลา 20 นาที หลอดควบคุมบวกคือดีเอ็นเอ bla_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA – 1705, bla_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, $bla_{OXA-48-like}$ จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, bla_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ bla_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2 % ใน Tris – acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 45 นาที และเลือกความเข้มข้นของ primer ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} และ bla_{VIM} ที่ชัดเจนที่สุด

3.10 การทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA

การทำบริสุทธิ์ผลผลิต multiplex RPA ด้วยผลิตภัณฑ์ชุด NucleoSpin Gel and PCR clean up ของบริษัท MACHEREY – NAGEL จำกัด ประเทศเยอรมนี โดยผสมผลผลิต multiplex RPA ปริมาตร 50 μ l กับน้ำยา binding buffer NT1 ปริมาตร 100 μ l อัตราส่วน (1 : 2) จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน purified column บันทึความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนใส เติมน้ำ Wash buffer NT3 ปริมาตร 700 μ l บันทึความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่มีส่วนใส ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง และบันทึครั้งที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำส่วนคอลัมน์ใส่ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติมน้ำยา Elution buffer NE ปริมาตร 30 μ l ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และนำไปบันทึที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนคอลัมน์ออก เก็บรักษาผลผลิต multiplex RPA บริสุทธิ์ที่ -20 °C เพื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสต่อไป

3.11 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

3.11.1 การศึกษาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบความเข้มข้นของ primer ยีน bla_{KPC} -C, bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} , waaQ -A และ waaQ -B ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยการเพิ่ม primer ที่ละคู่ลงไปปฏิกิริยา ใช้ primer ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังตารางที่ 10 ผสมกับน้ำยา rehydration buffer ปริมาตร 29.5 ผสมด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 47.5 μ l ใส่ลงใน Freeze-dried

tube μl เติมดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μl และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เติม MgAC ความเข้มข้น 280 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที หลอดควบคุมบวกคือดีเอ็นเอ *bla*_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA – 1705, *bla*_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, *bla*_{OXA-48-like} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, *bla*_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ *bla*_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 3 % ใน Tris – acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 60 นาที และเลือกความเข้มข้นของ primer ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ครบทั้ง 6 ยีน และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด

ตารางที่ 10 ความเข้มข้น primer ของ ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA

Primer ชุดที่	ความเข้มข้น
1.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.4 μM)
2.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.4 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.4 μM)
3.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.4 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.4 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.4 μM)
4.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.4 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.4 μM)
5.	<i>bla</i> _{NDM} (0.6 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.4 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.4 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.6 μM)
6.	<i>bla</i> _{NDM} (0.6 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.2 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.4 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.6 μM)
7.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.1 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.3 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.6 μM)
8.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.1 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.3 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.7 μM) + <i>bla</i> _{KPC} -C (0.1 μM)
9.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.1 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.3 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.6 μM) + <i>bla</i> _{KPC} -C (0.1 μM) + <i>waaQ</i> -A (0.1 μM)
10.	<i>bla</i> _{NDM} (0.5 μM) + <i>bla</i> _{OXA-48-like} (0.1 μM) + <i>bla</i> _{IMP} (0.3 μM) + <i>bla</i> _{VIM} (0.6 μM) + <i>bla</i> _{KPC} -C (0.05 μM) + <i>waaQ</i> -A (0.2 μM)

Primer ชุดที่	ความเข้มข้น
11.	bla_{NDM} (0.4 μ M) + $bla_{OXA-48-like}$ (0.1 μ M) + bla_{IMP} (0.3 μ M) + bla_{VIM} (0.6 μ M) + bla_{KPC-C} (0.05 μ M)
12.	bla_{NDM} (0.4 μ M) + $bla_{OXA-48-like}$ (0.1 μ M) + bla_{IMP} (0.3 μ M) + bla_{VIM} (0.6 μ M) + bla_{KPC-C} (0.05 μ M) + waaQ -B (0.2 μ M)
13.	bla_{NDM} (0.3 μ M) + $bla_{OXA-48-like}$ (0.1 μ M) + bla_{IMP} (0.2 μ M) + bla_{VIM} (0.6 μ M) + bla_{KPC-C} (0.025 μ M) + waaQ -B (0.2 μ M)

3.11.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ยีน bla_{KPC-C} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ waaQ -B ที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.1 ผสมกับน้ำยา rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ l จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 47.5 μ l ใส่ลงใน Freeze-dried tube เติมดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผสมด้วยเครื่องผสมสาร เติม MgAC ความเข้มข้น 280 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 36, 37, 38, 39, 40 °C เป็นเวลา 20 นาที หลอดควบคุมบวกคือดีเอ็นเอ bla_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA – 1705, bla_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, $bla_{OXA-48-like}$ จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, bla_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ bla_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยาผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 3 % ใน Tris – acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 60 นาที และเลือกอุณหภูมิที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ waaQ ครบทั้ง 6 ยีน และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด

3.11.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ยีน bla_{KPC-C} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ waaQ -B ที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.1 ผสมกับน้ำยา rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ l จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 47.5 μ l ใส่ลงใน Freeze-dried tube เติมดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผสมด้วย

เครื่องผสมสาร เติม MgAC ความเข้มข้น 280 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 μ l บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อที่ 3.11.2 เป็นเวลา 15, 20, 25, 30 นาที หลอดควบคุมบวกคือดีเอ็นเอ bla_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA-1705, bla_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, $bla_{OXA-48-like}$ จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, bla_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ bla_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 3 % ใน Tris – acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 60 นาที และเลือกเวลาที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ waaQ ครบทั้ง 6 ยีน และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด

3.11.4 การศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ waaQ ที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.1 ผสมกับน้ำยา rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μ l ผสมด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 47.5 μ l ใส่ลงใน Freeze-dried tube เติมดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 75 ng/ μ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเติม MgAC ความเข้มข้น 280 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 μ l บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อที่ 3.11.2 เป็นเวลาตามข้อ 3.11.3 หลอดควบคุมบวกคือดีเอ็นเอ bla_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA – 1705, bla_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, $bla_{OXA-48-like}$ จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, bla_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ bla_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 3 % ใน Tris – acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 60 นาที และเลือกความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ waaQ ครบทั้ง 6 ยีน และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด

3.12 การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA

ทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA โดยใช้ดีเอ็นเอ *bla*_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA - 1705, *bla*_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, *bla*_{OXA-48-like} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, *bla*_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ *bla*_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 โดยเจือจางดีเอ็นเอสิบเท่า (10 - fold dilution) ตั้งแต่ความเข้มข้น 10 ng ถึง 10 pg และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบทำปฏิกิริยา multiplex RPA โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.11 ทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 3 % ใน Tris - acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 60 นาที

3.13 การทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA

ทดสอบความจำเพาะของวิธี multiplex RPA โดยใช้ดีเอ็นเอควบคุมลบที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์คลินิก, *Proteus mirabilis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25933, *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC BAA - 1706, *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 25923 , *Streptococcus pneumoniae* สายพันธุ์คลินิก, *Streptococcus pyogenes* สายพันธุ์คลินิก, *Haemophilus influenzae* สายพันธุ์คลินิก และ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์คลินิก โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา multiplex RPA ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.11 หลอดควบคุมบวกคือ *bla*_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA - 1705, *bla*_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, *bla*_{OXA-48-like} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, *bla*_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ *bla*_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 จากนั้นทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ดังข้อ 3.10 และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 3 % ใน Tris - acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 60 นาที

3.14 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA

นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน carbapenemase จำนวน 150 ตัวอย่าง และ ไม่มียีน carbapenemase จำนวน 50 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย มาสกัดดีเอ็นเอตั้งข้อ 3.5 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา multiplex RPA ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.11 หลอดควบคุมบวกคือ ดีเอ็นเอ *bla*_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA – 1705 , *bla*_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, *bla*_{OXA-48-like} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, *bla*_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ *bla*_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นทำปฏิกิริยาผลผลิต RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 3 % ใน Tris – acetate EDTA (TAE) buffer แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 60 นาที

3.15 การคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: NPV) ของเทคนิค multiplex RPA

การคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: NPV) ของเทคนิค multiplex RPA โดยเปรียบเทียบผลการตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยวิธี multiplex RPA กับผลการตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยวิธีมาตรฐาน mCIM และ sequencing ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม MEDCALC® (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) และดังตารางที่ 10 และ 11 (97)

ตารางที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิค multiplex RPA เปรียบเทียบกับ
ผลทดสอบด้วยวิธี Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM)

	ผลทดสอบเป็นบวกด้วยวิธี mCIM	ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธี mCIM
ผลทดสอบเป็นบวกด้วยวิธี multiplex RPA	ผลบวกจริง (TP) a	ผลบวกปลอม (FP) b
ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธี multiplex RPA	ผลลบปลอม (FN) c	ผลลบจริง (TN) d

ตารางที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิค multiplex RPA เปรียบเทียบกับ
ผลทดสอบด้วยวิธี sequencing

	ผลทดสอบเป็นบวกด้วยวิธี sequencing	ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธี sequencing
ผลทดสอบเป็นบวกด้วยวิธี multiplex RPA	ผลบวกจริง (TP) a	ผลบวกปลอม (FP) b
ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธี multiplex RPA	ผลลบปลอม (FN) c	ผลลบจริง (TN) d

สมการในการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ มีดังนี้ (98)

$$\text{ค่าความไว} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{ค่าความจำเพาะ} = \frac{d}{b+d}$$

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

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

3.16 การคำนวณหาค่าความสอดคล้องกันของผลการตรวจของเทคนิค multiplex RPA โดยใช้สถิติ Kappa

ทำการวิเคราะห์ความสอดคล้องกันของผลการตรวจหายีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยวิธี multiplex RPA กับผลการตรวจหายีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยวิธี sequencing โดยใช้ค่าสถิติ Kappa ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม GraphPad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>) ดังตารางที่ 12 โดยค่าที่ได้จะมีค่า 0-1 และประเมินความสอดคล้องกันดังนี้ (99)

- น้อยกว่า 0 หมายถึง ไม่มีความสอดคล้องกัน (Poor)
- 0-0.20 หมายถึง มีความสอดคล้องกันเล็กน้อย (Slight agreement)
- 0.21– 0.40 หมายถึง มีความสอดคล้องกันพอใช้ (Fair agreement)
- 0.41–0.60 หมายถึง มีความสอดคล้องกันปานกลาง (Moderate agreement)
- 0.61–0.80 หมายถึง มีความสอดคล้องกันดี (Substantial agreement)
- 0.81–1 หมายถึง มีความสอดคล้องกันดีมาก (Almost perfect agreement)

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจหายีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยวิธี multiplex RPA กับผลการตรวจหายีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยวิธี sequencing

	ผลทดสอบเป็นบวกด้วยวิธี sequencing	ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธี sequencing	ผลรวม
ผลทดสอบเป็นบวกด้วยวิธี multiplex RPA	ผลบวกจริง (TP) a	ผลบวกปลอม (FP) b	(a+b)
ผลทดสอบเป็นลบด้วยวิธี multiplex RPA	ผลลบปลอม (FN) c	ผลลบจริง (TN) d	(c+d)
ผลรวม	(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

สูตรการคำนวณหาค่าความสอดคล้องกันโดยใช้สถิติ Kappa (100)

$$\text{Kappa}(K) = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

$$\text{โดยที่ } P_0 = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

$$P_e = \frac{(a+b)(a+c) + (c+d)(b+d)}{(a+b+c+d)^2}$$

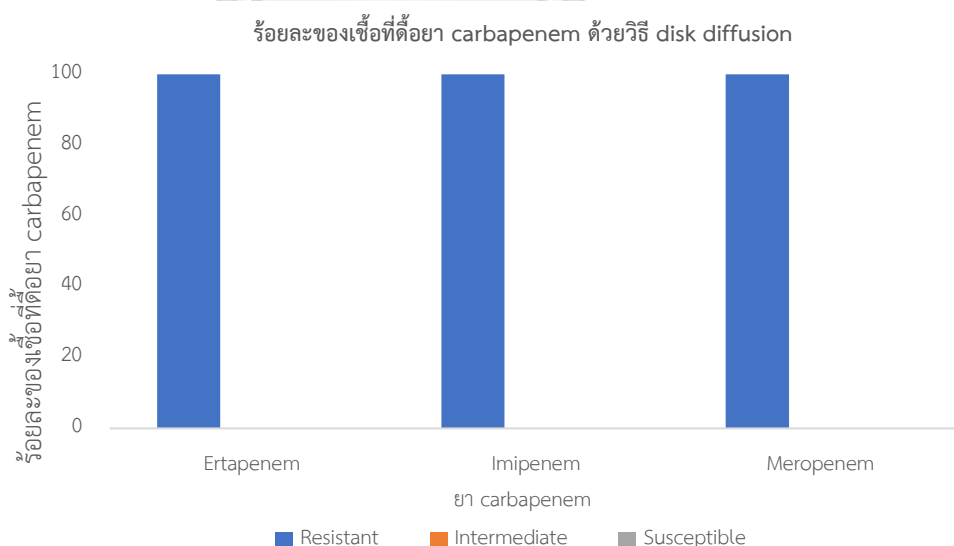


บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

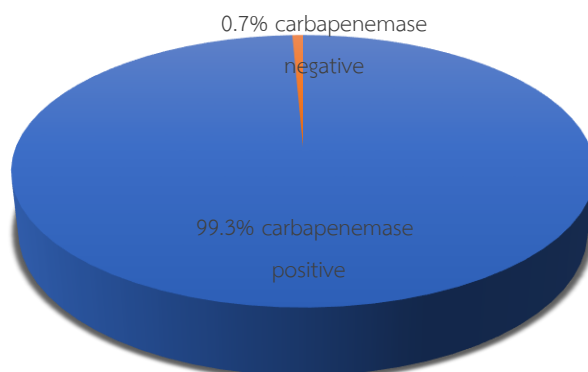
1. การตรวจการดื้อยา carbapenem ของเชื้อ *K. pneumoniae*

ทำการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี disk diffusion กับยาในกลุ่ม carbapenem 3 ชนิด คือ ertapenem 10 μ g, imipenem 10 μ g, meropenem 10 μ g กับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี และเก็บเชื้อที่ดื้อยา carbapenem ทั้ง 3 ชนิด จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นสิ่งส่งตรวจจากงานเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา จำนวน 129 ตัวอย่าง และจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยเด็ก 21 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 19 และเก็บเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อจากสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี จำนวน 25 ตัวอย่าง และ ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลรามารัตินี จำนวน 25 ตัวอย่าง นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ให้ผลดื้อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง มาทำการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) พบว่า วิธี mCIM ให้ผลบวกจำนวน 149 ตัวอย่าง (99.3 %) และ ให้ผลลบจำนวน 1 ตัวอย่าง (0.7 %) ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 19 แสดงผลการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี Disk diffusion กับยาในกลุ่ม carbapenem ของเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 150 ตัวอย่าง

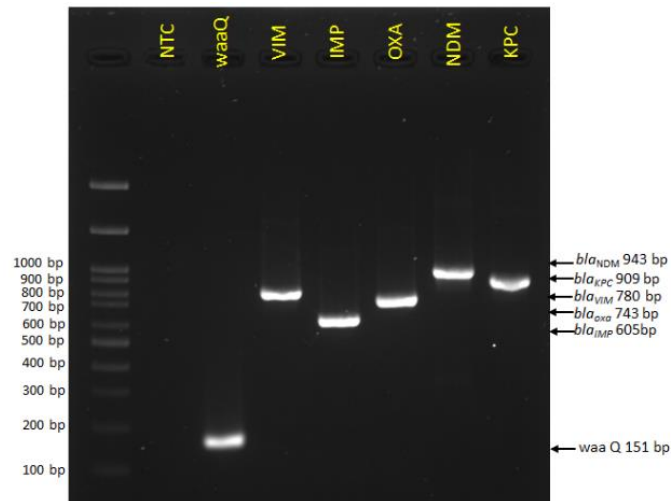
ผลการทดสอบ mCIM ของเชื้อ *K. pneumoniae*



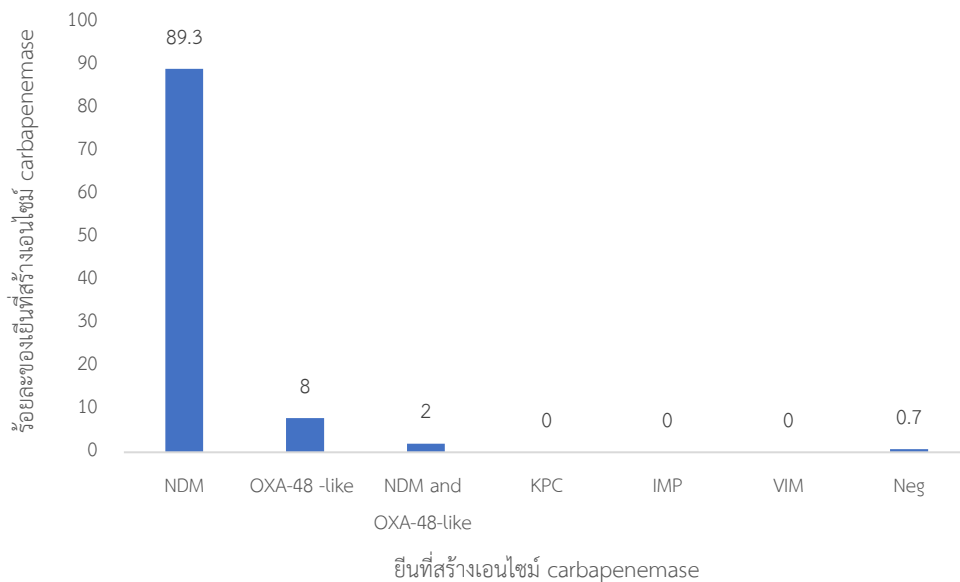
ภาพที่ 20 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี mCIM กับ เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ให้ผลต่อยา carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง

2. การเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ต่อยา carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง และนำมาเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ $waaQ$ เป็นยีนควบคุมภายใน ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะแต่ละยีนที่แสดงในตารางที่ 7 และขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังข้อ 3.6 หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและหลอดควบคุมบวกคือ ดีเอ็นเอ bla_{KPC} จากเชื้อ *K. pneumoniae* BAA – 1705, bla_{NDM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP261, $bla_{OXA-48-like}$ จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP22, bla_{IMP} จากเชื้อ *K. pneumoniae* RAKP56 และ bla_{VIM} จากเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC13440 และตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ผลผลิตของการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยวิธี PCR ให้ผลผลิตขนาด 909 bp, 943 bp, 743 bp, 605 bp, 780 bp ตามลำดับ และยีน $waaQ$ ให้ผลผลิต 151 bp ตามที่คาดหวังไว้ ดังภาพที่ 21 เชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 150 ตัวอย่าง พบยีน bla_{NDM} จำนวน 134 ตัวอย่าง (89.3 %) รองลงมาคือ ยีน $bla_{OXA-48-like}$ จำนวน 12 ตัวอย่าง (8 %) พบยีนร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดคือ bla_{NDM} และ $bla_{OXA-48-like}$ จำนวน 3 ตัวอย่าง (2 %) และไม่พบผลผลิตยีนดีเอ็นเอทั้ง 5 ยีน จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.7 %) ดังภาพที่ 22



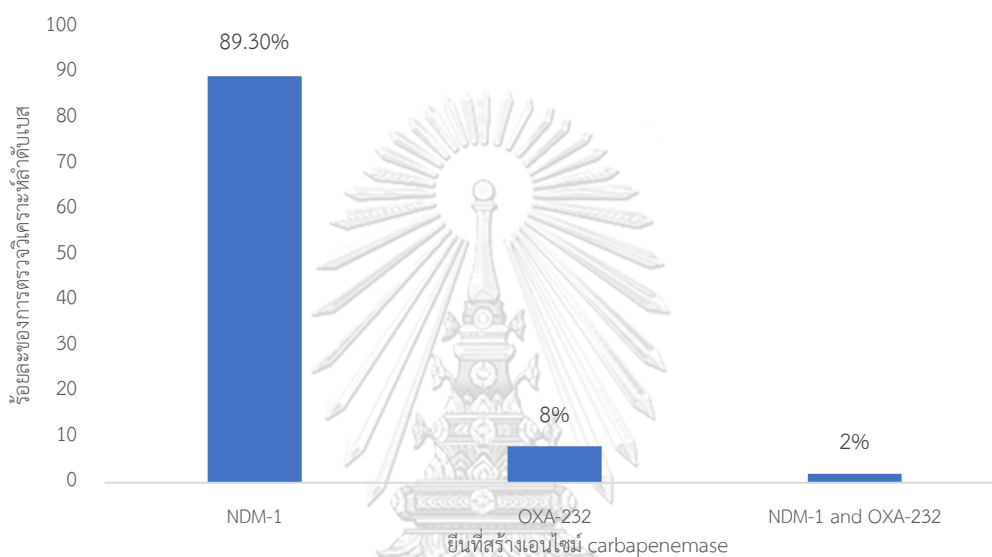
ภาพที่ 21 แสดงผลการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ด้วยวิธี PCR บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ใน TAE buffer แลวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แลวที่ 2 ตัวควบคุมลบ แลวที่ 3-8 คือยีน *waaQ*, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{NDM} และ *bla*_{KPC} ตามลำดับ



ภาพที่ 22 แสดงผลร้อยละของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase แต่ละชนิด ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยา carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง; Neg = ไม่พบยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}

3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน bla_{NDM} และ ยีน $bla_{OXA-48-like}$

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จำนวน 149 ตัวอย่าง พบยีน bla_{NDM} ชนิด bla_{NDM-1} จำนวน 134 ตัวอย่าง (89.3 %) รองลงมาคือยีน $bla_{OXA-232}$ จำนวน 12 ตัวอย่าง (8 %) พบยีนร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดคือ bla_{NDM-1} และ $bla_{OXA-232}$ จำนวน 3 ตัวอย่าง (2 %) ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 แสดงผลร้อยละของยีน bla_{NDM} และ ยีน $bla_{OXA-48-like}$ แต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ลำดับเบส ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ื้อยา carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง

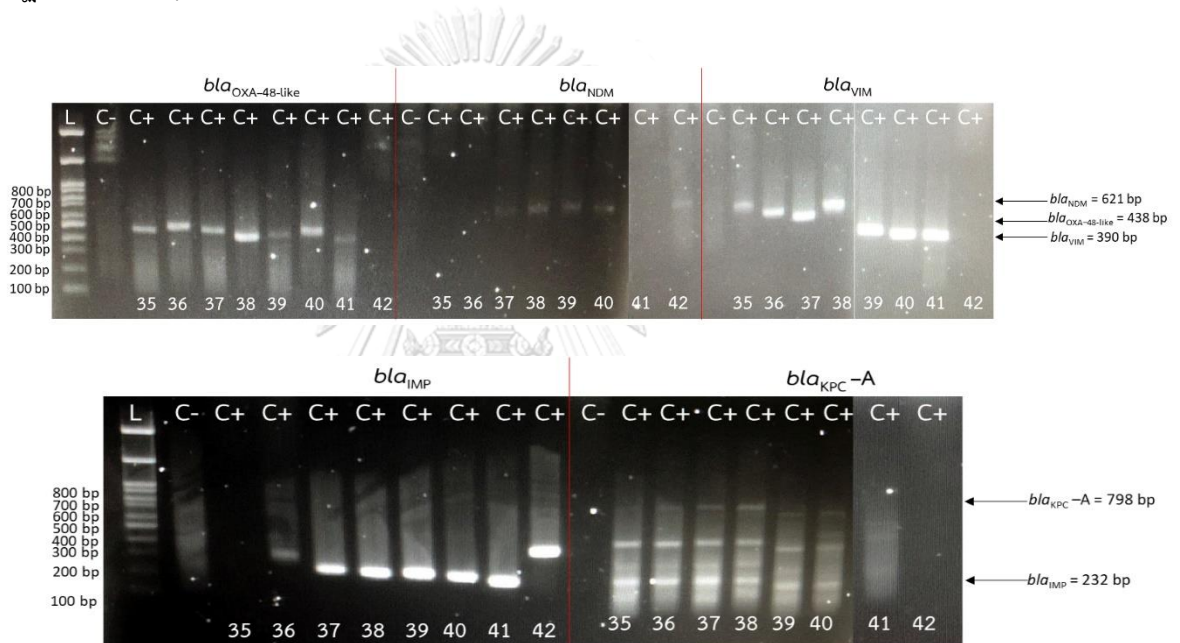
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4. การเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยเทคนิค singleplex RPA

4.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA

ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} เท่ากับ 0.48 μ M ทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/ μ l และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 และ 42 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 20 นาที พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เห็นผลผลิต RPA ชัดเจนมีดังนี้ ยีน $bla_{OXA-48-like}$ พบผลผลิต RPA ขนาด 438 bp ที่อุณหภูมิ 35 - 41 $^{\circ}$ C และไม่พบผลผลิต RPA ที่อุณหภูมิ 42 $^{\circ}$ C ยีน

*bla*_{NDM} พบผลผลิต RPA ขนาด 621 bp ที่อุณหภูมิ 37 - 40 °C, 42 °C และไม่พบผลผลิต RPA ที่อุณหภูมิ 41 °C ยืนยัน *bla*_{VIM} พบผลผลิต RPA ขนาด 390 bp ที่อุณหภูมิ 35 - 41 °C ไม่พบผลผลิต RPA ที่อุณหภูมิ 42 °C และพบว่าเกิด band shift ที่อุณหภูมิ 35 - 38 °C ยืนยัน *bla*_{IMP} พบผลผลิต RPA ขนาด 232 bp ที่อุณหภูมิ 36 - 42 °C ไม่พบผลผลิต RPA ที่อุณหภูมิ 35 °C และมีผลผลิต RPA ที่ไม่ตรงกับขนาดที่ออกแบบที่อุณหภูมิ 37-41 °C ยืนยัน *bla*_{KPC}-A พบผลผลิต RPA ขนาด 798 bp ที่อุณหภูมิ 36 - 40 °C และไม่พบผลผลิต RPA ที่อุณหภูมิ 41 - 42 °C ดังภาพที่ 24 แต่ยืนยัน *bla*_{KPC}-A มี nonspecific band ขึ้นทุกอุณหภูมิ จึงทำการออกแบบ primer ใหม่ การศึกษานี้จึงเลือกใช้ใช้อุณหภูมิที่ 37 °C ในการทำปฏิกิริยา multiplex RPA ต่อไป เนื่องจากให้ผลผลิต RPA ที่ชัดเจนทั้ง 4 ยีน

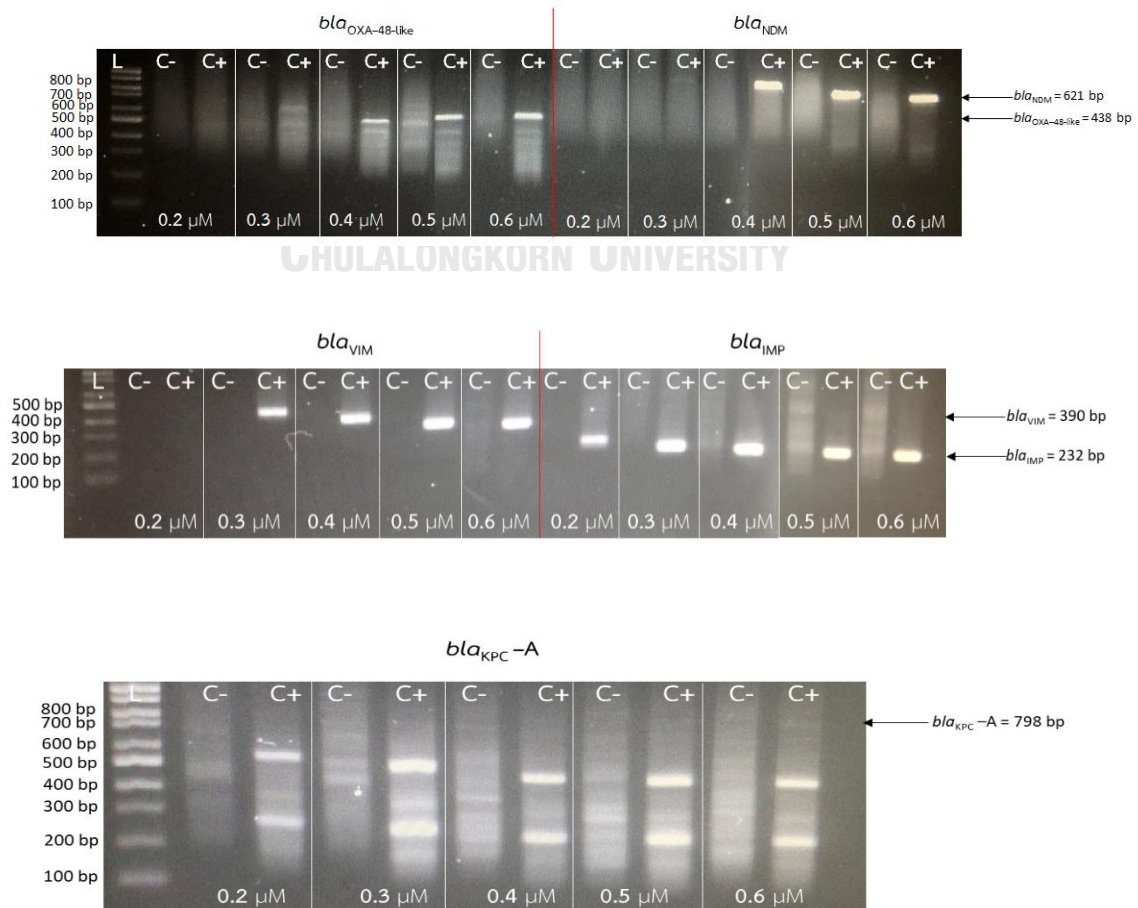


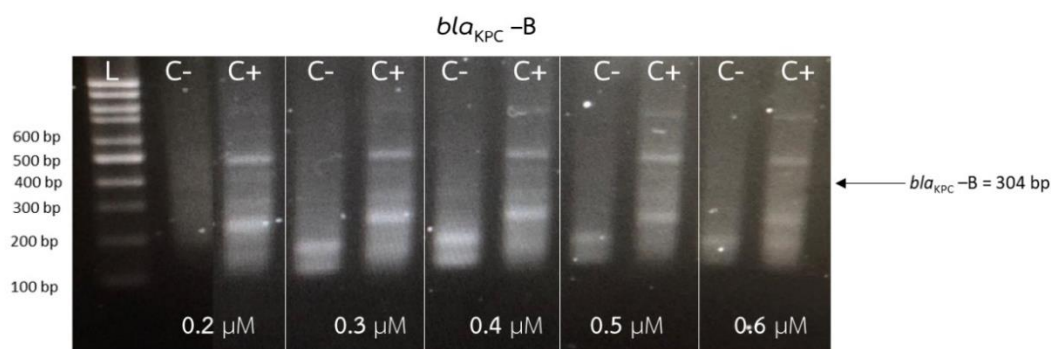
ภาพที่ 24 แสดงผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}-A, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA

ทดสอบความเข้มข้นของ primer ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RPA ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 μ M ตามลำดับ ทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/ μ l และหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่

อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที พบว่าความเข้มข้น primer ที่ให้ผลผลิตชัดเจนมีดังนี้ ยีน *bla*_{OXA-48-like} พบผลผลิต RPA ขนาด 438 bp ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4-0.6 μ M และไม่พบผลผลิต RPA ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.2-0.3 μ M ยีน *bla*_{NDM} พบผลผลิต RPA ขนาด 621 bp ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4-0.6 μ M และไม่พบผลผลิต RPA ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.2-0.3 μ M ยีน *bla*_{VIM} พบผลผลิต RPA ขนาด 390 bp ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.3-0.6 μ M และไม่พบผลผลิต RPA ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.2 μ M ยีน *bla*_{IMP} พบผลผลิต RPA ขนาด 232 bp ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.2-0.6 μ M ยีน *bla*_{KPC-A} พบผลผลิต RPA ขนาด 798 bp ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M และไม่พบผลผลิต RPA ที่ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.2-0.5 μ M แต่ยีน *bla*_{KPC-A} มี nonspecific band ขึ้นทุกความเข้มข้น primer จึงทำการออกแบบ primer ครั้งที่ 2 เป็น primer *bla*_{KPC-B} ผลการทดสอบความเข้มข้น primer *bla*_{KPC-B} พบว่ามี nonspecific band ขึ้นทุกความเข้มข้น primer และพบผลผลิต RPA ที่บาง จึงทำการออกแบบ primer ใหม่ การศึกษานี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้น primer ดังนี้ ยีน *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 0.4 μ M *bla*_{NDM} เท่ากับ 0.5 μ M *bla*_{VIM} เท่ากับ 0.4 μ M *bla*_{IMP} เท่ากับ 0.4 μ M มาทำปฏิกิริยา multiplex RPA เนื่องจากให้ผลผลิต RPA ที่ชัดเจน ดังภาพที่ 25





ภาพที่ 25 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ primer ยีน *bla*_{KPC}-A, *bla*_{KPC}-B, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 μ M ด้วยปฏิกิริยา singleplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ใน TAE buffer แฉกที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แฉกที่ C- คือตัวควบคุมลบ แฉกที่ C+ คือตัวควบคุมบวก

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

5.1 การศึกษาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบความเข้มข้นของ primer ยีน *bla*_{KPC}-C, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, waaQ -A และ waaQ -B ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยการใส่ primer เพิ่มทีละคู่ลงไปในการปฏิกิริยา ดังตารางที่ 10 ทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 20 นาที ผลดังภาพที่ 26 พบว่า primer ชุดที่ 1 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M) พบผลผลิตครบทั้ง 2 ยีน คือ *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48-like} ขนาด 621 bp และ 438 bp ตามที่คาดหวังไว้

primer ชุดที่ 2 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M) พบผลผลิตครบทั้ง 3 ยีน โดยมี *bla*_{VIM} เพิ่มขึ้นขนาด 390 bp

primer ชุดที่ 3 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M) พบผลผลิตเพียง 3 ยีน จาก 4 ยีน โดยมียีน *bla*_{IMP} เพิ่มขึ้นขนาด 232 bp แต่ไม่พบผลผลิต *bla*_{VIM},

primer ชุดที่ 4 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M) พบผลผลิตครบทั้ง 3 ยีน แต่ *bla*_{NDM} มีผลผลิตที่จาง

primer ชุดที่ 5 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M) พบผลผลิตครบทั้ง 4 ยีน แต่ *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} และ *bla*_{VIM} ให้ผลผลิตที่จาง

primer ชุดที่ 6 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.2 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M) พบผลผลิตครบทั้ง 4 ยีน แต่ *bla*_{VIM} ให้ผลผลิตที่จาง และมี nonspecific band ที่หลุดควบคุมลบ

primer ชุดที่ 7 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.3 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M) พบผลผลิตชัดเจนทั้ง 4 ยีน แต่มี nonspecific band

primer ชุดที่ 8 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.3 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.7 μ M + *bla*_{KPC}-C ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M) พบผลผลิตครบทั้ง 5 ยีน โดยมียีน *bla*_{KPC}-C เพิ่มขึ้น ขนาด 271 bp แต่ *bla*_{VIM} ให้ผลผลิตที่จาง

primer ชุดที่ 9 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.3 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M + *bla*_{KPC}-C ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M + *waaQ*-A ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M) พบผลผลิตชัดเจนเพียง 4 ยีน จาก 6 ยีน คือ *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP} แต่ไม่เกิดผลผลิต *bla*_{VIM} และ *waaQ*-A

primer ชุดที่ 10 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.5 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.3 μ M + *bla*_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.6 μ M + *bla*_{KPC}-C ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.05 μ M + *waaQ*-A ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.2 μ M) พบผลผลิตชัดเจนเพียง 4 ยีน จาก 6 ยีน คือ *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP} แต่ไม่เกิดผลผลิต *bla*_{VIM} และ *waaQ*-A เช่นเดียวกับชุดที่ 9

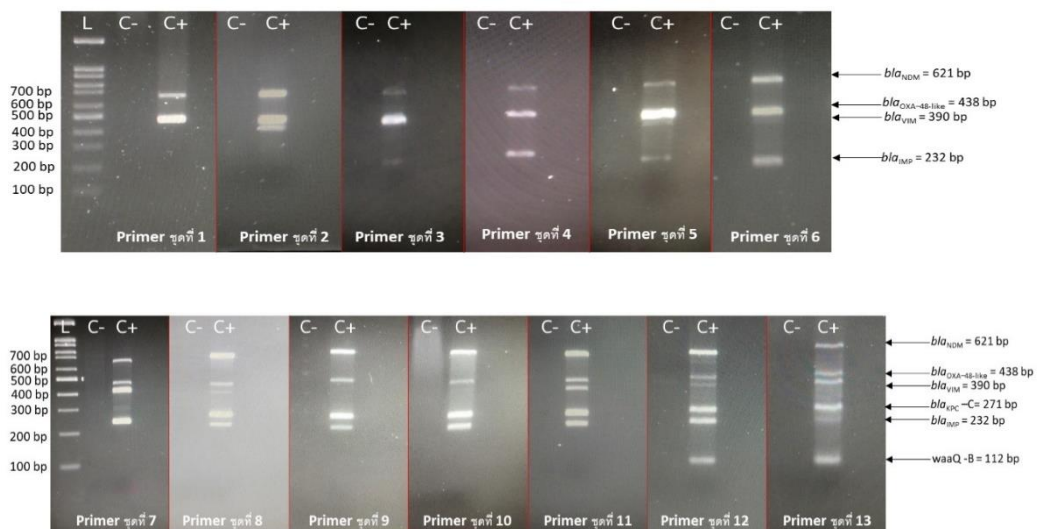
primer ชุดที่ 11 (*bla*_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.4 μ M + *bla*_{OXA-48-like} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.1 μ M + *bla*_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.3 μ M + *bla*_{VIM} ความ

เข้มข้น primer เท่ากับ $0.6 \mu\text{M}$ + bla_{KPC} -C ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.05 \mu\text{M}$) พบผลผลิตชัดเจนครบทั้ง 5 ยีน

primer ชุดที่ 12 (bla_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.4 \mu\text{M}$ + $bla_{OXA-48-like}$ ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.1 \mu\text{M}$ + bla_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.3 \mu\text{M}$ + bla_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.6 \mu\text{M}$ + bla_{KPC} -C ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.05 \mu\text{M}$ + $waaQ$ -B ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.2 \mu\text{M}$) พบผลผลิตชัดเจนครบทั้ง 6 ยีน โดยมียีน $waaQ$ -B เพิ่มขึ้นขนาด 112 bp แต่ผลผลิต $bla_{OXA-48-like}$, bla_{VIM} ให้ผลผลิตที่จางและมี nonspecific band ที่หลอดควบคุมลบ

primer ชุดที่ 13 (bla_{NDM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.3 \mu\text{M}$ + $bla_{OXA-48-like}$ ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.1 \mu\text{M}$ + bla_{IMP} ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.2 \mu\text{M}$ + bla_{VIM} ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.6 \mu\text{M}$ + bla_{KPC} -C ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.025 \mu\text{M}$ + $waaQ$ -B ความเข้มข้น primer เท่ากับ $0.2 \mu\text{M}$) พบผลผลิตชัดเจนครบทั้ง 6 ยีน และไม่มี nonspecific band

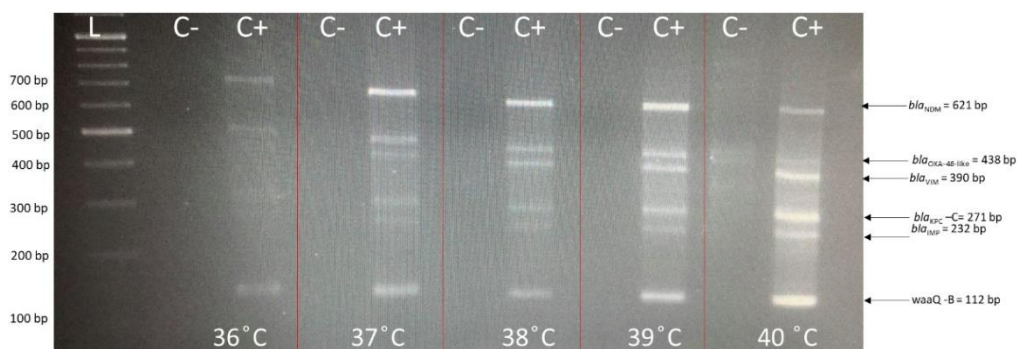
ดังนั้นความเข้มข้น primer ที่เหมาะสมสำหรับ multiplex RPA คือ ยีน bla_{VIM} เท่ากับ $0.6 \mu\text{M}$, bla_{NDM} เท่ากับ $0.3 \mu\text{M}$, bla_{IMP} และ $waaQ$ -B เท่ากับ $0.2 \mu\text{M}$, $bla_{OXA-48-like}$ เท่ากับ $0.1 \mu\text{M}$ และ bla_{KPC} -C เท่ากับ $0.025 \mu\text{M}$



ภาพที่ 26 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ $waaQ$ ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก

5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ยีน *bla*_{VIM} เท่ากับ 0.6 μ M, *bla*_{NDM} เท่ากับ 0.3 μ M, *bla*_{IMP} และ *waaQ*-B เท่ากับ 0.2 μ M, *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 0.1 μ M และ *bla*_{KPC}-C เท่ากับ 0.025 μ M ทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μ l บ่มที่อุณหภูมิ 36, 37, 38, 39, 40 °C เวลา 20 นาที ผลดังภาพที่ 27 พบว่าอุณหภูมิที่ 36 °C ให้ผลผลิตจากทั้ง 6 ยีน อุณหภูมิที่ 37 - 40 °C ให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 6 ยีน คือ *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ขนาด 271 bp, 621bp, 438 bp, 232 bp, 390 bp และ 112 bp ตามที่คาดหวังไว้ ที่อุณหภูมิ 40 °C พบ nonspecific band ที่หลอดควบคุมลบ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 37 °C สำหรับทำปฏิกิริยา multiplex RPA

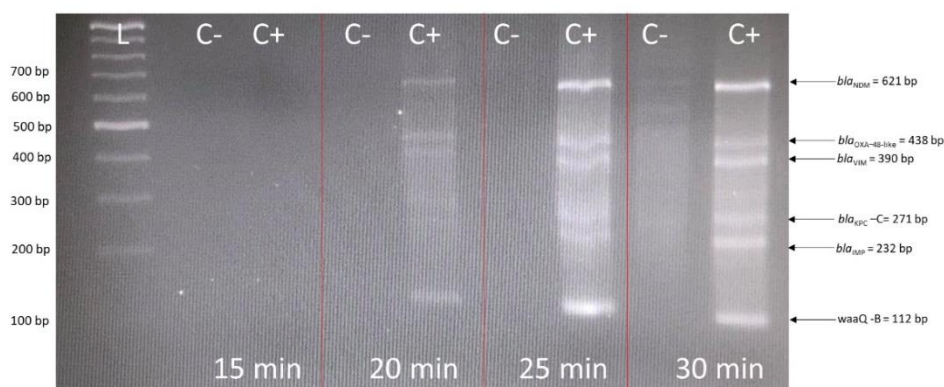


ภาพที่ 27 แสดงผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก

5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ยีน *bla*_{VIM} เท่ากับ 0.6 μ M, *bla*_{NDM} เท่ากับ 0.3 μ M, *bla*_{IMP} และ *waaQ*-B เท่ากับ 0.2 μ M, *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 0.1 μ M และ *bla*_{KPC}-C เท่ากับ 0.025 μ M ทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่เวลา 15, 20, 25, 30 นาที ตามลำดับ ดังภาพที่ 28 พบว่าเวลาที่ 15 นาที ไม่มีผลผลิตเกิดขึ้น เวลาที่ 20 นาที เกิดผลผลิตจาก ทั้ง 6 ยีน เวลาที่ 25 และ 30 นาที

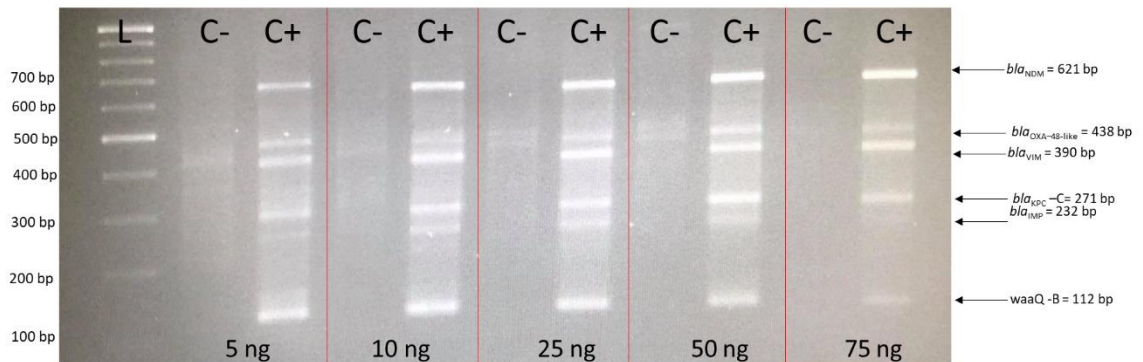
พบผลผลิตชัดเจนทั้ง 6 ยีน คือ *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ขนาด 271 bp, 621bp, 438 bp, 232 bp, 390 bp และ 112 bp ตามที่คาดหวังไว้ แต่เวลาที่ 30 นาที มี nonspecific band ในหลอดควบคุมลบ ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา multiplex RPA คือ 25 นาที



ภาพที่ 28 แสดงผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RPA ในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก

5.4 การศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA

ทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ยีน *bla*_{VIM} เท่ากับ 0.6 μ M, *bla*_{NDM} เท่ากับ 0.3 μ M, *bla*_{IMP} และ *waaQ-B* เท่ากับ 0.2 μ M, *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 0.1 μ M และ *bla*_{KPC-C} เท่ากับ 0.025 μ M เติมดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 75 ng/ μ l ปั่นที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 25 นาที ผลดังภาพที่ 29 พบว่า ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 10, 25 และ 50 ng/ μ l พบ nonspecific band ที่หลอดควบคุมลบ ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 5 และ 75 ng/ μ l ให้ผลผลิตทั้ง 6 ยีน คือ *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ขนาด 271 bp, 621bp, 438 bp, 232 bp, 390 bp และ 112 bp ตามลำดับ ตามที่คาดหวังไว้ แต่ *bla*_{IMP} ให้ผลผลิตจางกว่ายีนอื่น ๆ ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 10, 25 ng/ μ l ให้ผลผลิตทั้ง 6 ยีน แต่ *bla*_{OXA-48-like} ให้ผลผลิตจางกว่ายีนอื่น ๆ ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μ l ให้ผลผลิตชัดเจนทั้ง 6 ยีน ดังนั้น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA คือความเข้มข้น 50 ng/ μ l

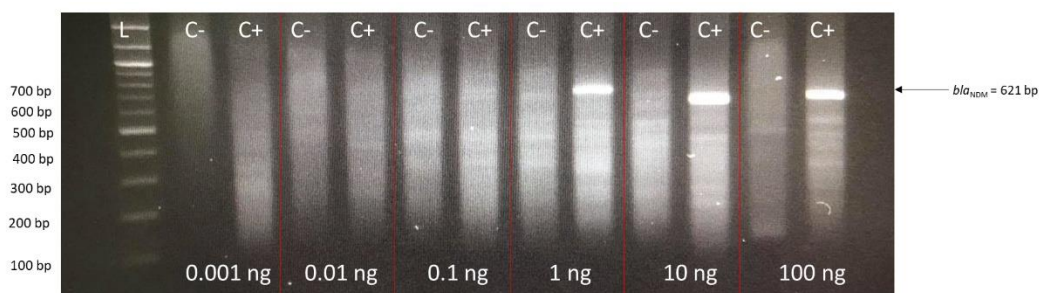


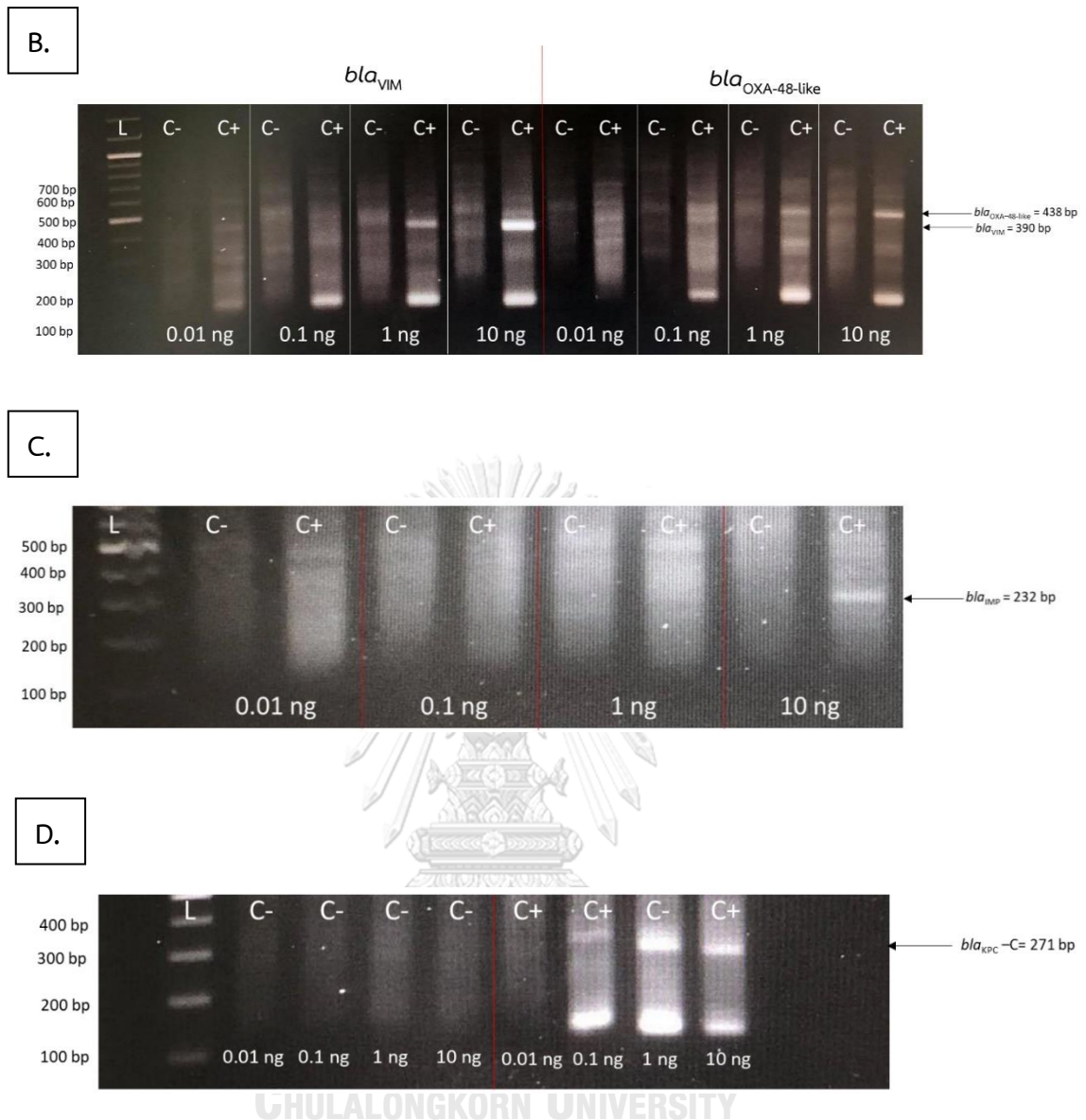
ภาพที่ 29 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA บนอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก

5.5 การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA

ทดสอบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ที่เหมาะสมของยีน *bla*_{VIM} เท่ากับ 0.6 μ M *bla*_{NDM} เท่ากับ 0.3 μ M *bla*_{IMP} และ *waaQ* เท่ากับ 0.2 μ M *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 0.1 μ M *bla*_{KPC} เท่ากับ 0.025 μ M เจือจางดีเอ็นเอต้นแบบสิบเท่า (10-fold dilution) ตั้งแต่ความเข้มข้น 10 ng ถึง 10 pg บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 25 นาที พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 1 ng ดังภาพที่ 30A และ 30B ตามลำดับ ยีน *bla*_{IMP} เท่ากับ 10 ng ดังภาพที่ 30C *bla*_{KPC} เท่ากับ 0.1 ng ดังภาพที่ 30D

A.

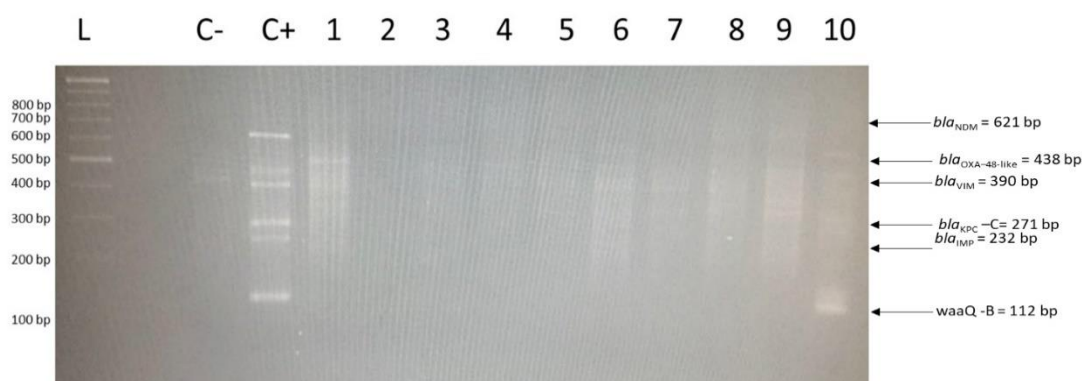




ภาพที่ 30 แสดงผลการทดสอบปริมาณดีเอ็นเอยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ที่น้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก A. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน *bla*_{NDM} B. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน *bla*_{VIM} และ *bla*_{OXA-48-like} C. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน *bla*_{IMP} D. ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดของยีน *bla*_{KPC}

5.6 การทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA

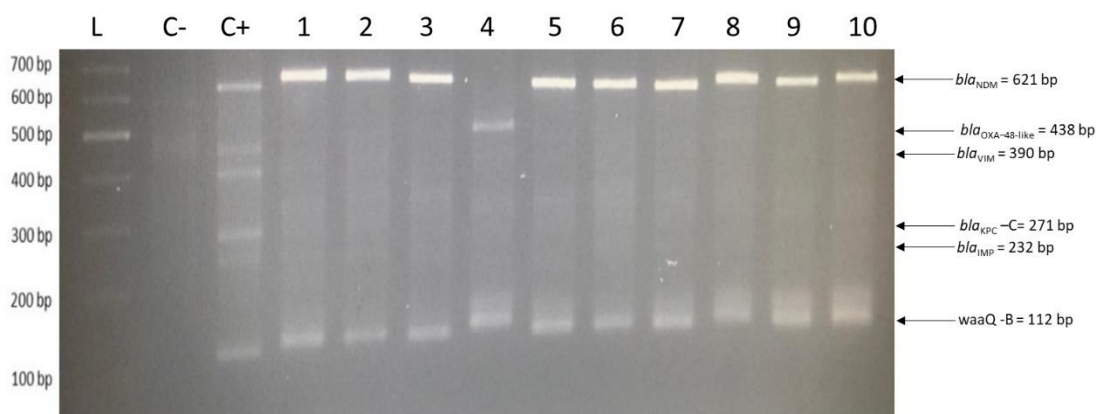
ทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ที่เหมาะสมของยีน bla_{VIM} เท่ากับ $0.6 \mu\text{M}$ bla_{NDM} เท่ากับ $0.3 \mu\text{M}$ bla_{IMP} และ $waaQ$ เท่ากับ $0.2 \mu\text{M}$ $bla_{OXA-48-like}$ เท่ากับ $0.1 \mu\text{M}$ bla_{KPC} เท่ากับ $0.025 \mu\text{M}$ ทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 25 นาที พบว่า ไม่พบผลผลิต RPA ทั้ง 6 ยีน กับดีเอ็นเอของ *Escherichia coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์คลินิก, *Proteus mirabilis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25933 *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 25923, *Streptococcus pneumoniae* สายพันธุ์คลินิก, *Streptococcus pyogenes* สายพันธุ์คลินิก, *Haemophilus influenzae* สายพันธุ์คลินิก และ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์คลินิก พบเฉพาะผลผลิต RPA ยีน $waaQ$ กับดีเอ็นเอ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC BAA – 1706 เนื่องจากเป็นยีนควบคุมภายใน ดังภาพที่ 31



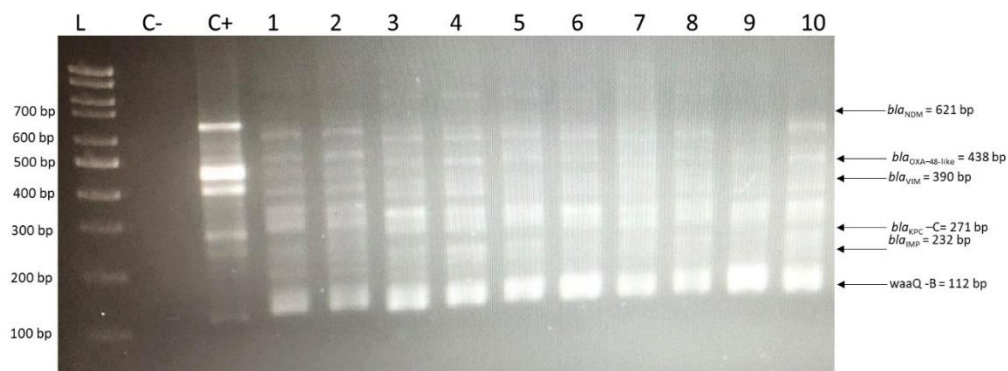
ภาพที่ 31 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวก แถวที่ 1 คือ *Escherichia coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แถวที่ 2 คือ *Streptococcus pneumoniae* สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 3 คือ *Streptococcus pyogenes* สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 4 คือ *Haemophilus influenzae* สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 5 คือ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 6 คือ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 25923 แถวที่ 7 คือ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์คลินิก แถวที่ 8 คือ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 27853 แถวที่ 9 คือ *Proteus mirabilis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25933 แถวที่ 10 คือ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC BAA – 1706

5.7 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA

นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย ที่ผลการตรวจคัดกรองดื้อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง และ ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ด้วยปฏิกิริยา multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ที่เหมาะสมของยีน *bla*_{VIM} เท่ากับ 0.6 μ M *bla*_{NDM} เท่ากับ 0.3 μ M *bla*_{IMP} และ *waaQ* เท่ากับ 0.2 μ M *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 0.1 μ M *bla*_{KPC} เท่ากับ 0.025 μ M ทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/ μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 25 นาที พบว่าเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง เป็นยีน *bla*_{NDM} จำนวน 134 ตัวอย่าง (89.3 %) รองลงมาคือยีน *bla*_{OXA-48-like} จำนวน 12 ตัวอย่าง (8 %) พบยีนร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดคือ *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48-like} จำนวน 3 ตัวอย่าง (2 %) และไม่พบผลผลิตยีนดื้อยาทั้ง 5 ยีน จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.7 %) ดังภาพที่ 32 และในตารางที่ 14 สำหรับเชื้อที่ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่างไม่พบผลผลิต RPA กับยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} พบเฉพาะผลผลิต RPA ของยีน *waaQ* เพียงอย่างเดียว และพบ nonspecific band ที่หลุดตัวอย่างเชื้อไม่ดื้อยา carbapenem ดังภาพที่ 33



ภาพที่ 32 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือตัวควบคุมบวกยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} แถวที่ 1 - 3 และ 5 - 10 คือ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์คลินิกที่ให้ผลบวกกับยีน *bla*_{NDM} แถวที่ 4 คือ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์คลินิกที่ให้ผลบวกกับยีน *bla*_{OXA-48-like}



ภาพที่ 33 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่มียีน carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex RPA บนอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 % ใน TAE buffer แถวที่ L ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ C- คือตัวควบคุมลบ แถวที่ C+ คือคือตัวควบคุมบวกยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} แถวที่ 1-10 คือ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์คลินิก

ตารางที่ 14 แสดงผลการตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี multiplex RPA กับเชื้อ *K. pneumoniae* ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง และ ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่าง

ยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase	การตรวจคัดกรองดื้อยาในกลุ่ม carbapenem (150 ตัวอย่าง)	การตรวจคัดกรองไม่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem (50 ตัวอย่าง)
bla_{NDM}	134 ตัวอย่าง	-
$bla_{OXA-48-like}$	12 ตัวอย่าง	-
bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$	3 ตัวอย่าง	-
bla_{KPC}	-	-
bla_{VIM}	-	-
bla_{IMP}	-	-
ไม่พบผลผลิตยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM}	1 ตัวอย่าง	50 ตัวอย่าง

5.8 การคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: PPV) ของเทคนิค multiplex RPA

ผลการคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของเทคนิค multiplex RPA พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหา ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} กับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง และ ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่า ยีน *bla*_{NDM} มีค่าความไวร้อยละ 100 (95%CI: 97.34% - 100.00%) ความจำเพาะร้อยละ 100 (95%CI :75.29% - 100.00%) ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบมีค่าเท่ากับร้อยละ 100 ยีน *bla*_{OXA-48-like} มีค่าความไวร้อยละ 100 (95%CI: 78.20% - 100.00%) ความจำเพาะร้อยละ 100 (95%CI: 97.30% - 100.00%) ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบมีค่าเท่ากับร้อยละ 100 ของเทคนิค multiplex RPA เปรียบเทียบกับวิธี sequencing และวิธี mCIM แสดงดังตารางที่ 15 และ 16 ไม่สามารถคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ได้ เนื่องจากไม่มีตัวอย่างที่พบยีนดังกล่าว

ตารางที่ 15 ผลการคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของ เทคนิค multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหา ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ของเชื้อ *K. pneumoniae* เปรียบเทียบกับวิธี sequencing

ผลการทดสอบด้วยวิธี multiplex RPA	ผลการทดสอบด้วยวิธี PCR				ความ ไว	ความจำเพาะ	ค่า ทำนาย ผลบวก	ค่า ทำนาย ผลลบ	
	<i>bla</i> _{NDM}		<i>bla</i> _{OXA-48-like}						ร้อยละ
	พบยีน <i>bla</i> _{NDM}	ไม่พบยีน <i>bla</i> _{NDM}	พบยีน <i>bla</i> _{OXA-48-like}	ไม่พบยีน <i>bla</i> _{OXA-48-like}					
พบยีน <i>bla</i> _{NDM}	137	0			100	100	100	100	
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{NDM}	0	13							
<i>bla</i> _{OXA-48-like}									
พบยีน <i>bla</i> _{OXA-48-like}			15	0	100	100	100	100	
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{OXA-48-like}			0	135					

ตารางที่ 16 ผลการคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ของเชื้อ *K. pneumoniae* เปรียบเทียบกับวิธี mCIM

ผลการทดสอบด้วยวิธี multiplex RPA	ผลการทดสอบด้วยวิธี mCIM		ความไว	ความจำเพาะ	ค่าทำนาย ผลบวก	ค่าทำนาย ผลลบ
	Carbapenemase บวก	Carbapenemase ลบ				
<i>bla</i> _{NDM}						
พบยีน <i>bla</i> _{NDM}	137	0	100	100	100	100
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{NDM}	0	13				
<i>bla</i> _{OXA-48-like}						
พบยีน <i>bla</i> _{OXA-48-like}	15	0	100	100	100	100
ไม่พบยีน <i>bla</i> _{OXA-48-like}	0	135				

5.9 การคำนวณหาค่าความสอดคล้องกันของผลการตรวจด้วยเทคนิค multiplex RPA

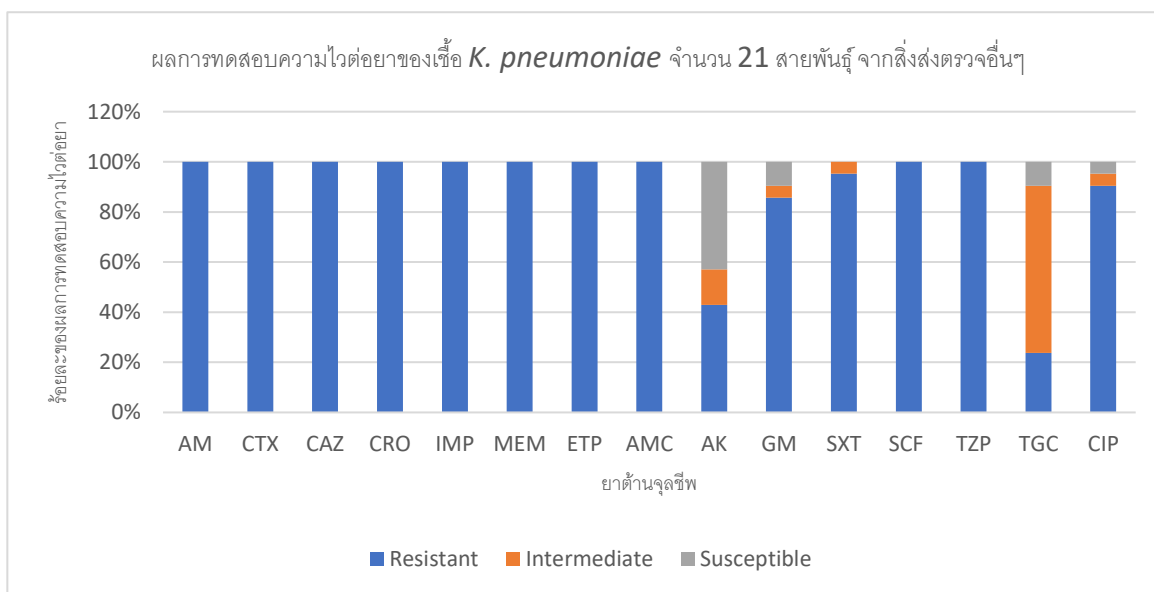
โดยใช้สถิติ Kappa

ทำการทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยวิธี multiplex RPA กับวิธี sequencing โดยใช้ค่าสถิติ Kappa (k) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ายีน *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48-like} มีค่า k = 1 (95%CI 1.00 – 1.00) แสดงว่าวิธี multiplex RPA มีความสอดคล้องกับวิธี sequencing ในระดับดีมาก (ค่าอยู่ระหว่าง 0.8-1)

6. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ

ผลจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ จำนวน 21 ตัวอย่าง ดังนี้ เลือด จำนวน 3 ตัวอย่าง, ปัสสาวะ จำนวน 3 ตัวอย่าง, หนองแผล จำนวน 3 ตัวอย่าง, เสมหะ จำนวน 2 ตัวอย่าง, tracheal จำนวน 7 ตัวอย่าง, ปลายสายสวนต่าง ๆ จำนวน 2 ตัวอย่าง และน้ำในช่องท้อง จำนวน 1 ตัวอย่าง กับยา ampicillin (AM), Cefotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Ceftriaxone (CRO), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Ertapenem (ETP), Amoxicillin/clavulanic acid (AMC), Amikacin (AK), Gentamicin (GM), Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), Cefoperazone/sulbactam (SCF), Piperacillin/tazobactam (TZP), Tigecycline (TGC), Ciprofloxacin (CIP) พบว่าให้ผลคือ

ยาร้อยละ 100 กับยา AM, CTX, CAZ, CRO, IMP, MEM, ETP, AMC, SCF, TZP รองลงมาคือ SXT, CIP ต่ำยามากกว่าร้อยละ 90 ดังภาพที่ 34



ภาพที่ 34 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ จำนวน 21 ตัวอย่าง

7. การกระจายของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ในดีเอ็นเอผู้ป่วยและสิ่งตรวจชนิดต่าง ๆ

สิ่งตรวจ perianal ในงานเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา จำนวน 129 ตัวอย่าง พบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในแผนกผู้ป่วยจำนวน 9 แผนก ดังนี้ พบสูงที่สุดที่แผนก A จำนวน 49 ตัวอย่าง โดยเป็นยีน bla_{NDM} จำนวน 47 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 95.9 และ $bla_{OXA-48-like}$ จำนวน 1 ตัวอย่าง รองลงมาคือแผนก B จำนวน 35 ตัวอย่าง โดยเป็นยีน bla_{NDM} จำนวน 33 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 94.3 และ $bla_{OXA-48-like}$ จำนวน 2 ตัวอย่าง แผนก C จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 แผนก D จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 ขณะที่ตัวอย่างสิ่งตรวจผู้ป่วย จำนวน 21 ตัวอย่าง พบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase สูงสุดใน tracheal จำนวน 7 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 17

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

สถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อ carbapenem resistance *Enterobacteriaceae* (CRE) ยังคงเป็นปัญหาที่บุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุขเป็นอย่างมาก (40) ในปี 2013 Center for Disease Control and Prevention (CDC) ได้ประกาศว่า CRE เป็นภัยคุกคามเร่งด่วนต่อสุขภาพประชาชนในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่เป็น CRE เพิ่มขึ้นสี่เท่าในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ข้อมูลจาก National Antimicrobial Resistance Surveillance center (NARST) กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย พบว่า ปี 2017 ถึง 2019 เชื้อ *K. pneumoniae* ต่อดื้อยา carbapenem ร้อยละ 9.5, 11.5 และ 13.3 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี (11)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ที่ให้ผลดื้อยาจากการตรวจคัดกรอง ด้วยวิธี disk diffusion จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยผลการตรวจคัดกรองพบดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ทั้ง 3 ชนิด คือ ertapenem 10 µg, imipenem 10 µg, meropenem 10 µg ผลการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี mCIM พบว่าให้ผลบวกจำนวน 149 ตัวอย่าง (99.3 %) และให้ผลลบจำนวน 1 ตัวอย่าง (0.7 %) ซึ่งน่าจะเกิดจากการดื้อยาด้วยกลไกอื่นที่ไม่ใช่กลไกการสร้างเอนไซม์ carbapenemase เช่น การสร้างเอนไซม์ ESBL หรือ AmpC ที่มากเกินไปร่วมกับการสูญเสีย porin หรือมี efflux pump (101) เชื้อ *Enterobacter* spp. ซึ่งมีการแสดงออกของโครโมโซมชนิด AmpC ที่ผลิตเอนไซม์ cephalosporinase มากเกินไป มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ porin ชนิด OmpF และ OmpC ทำให้ไม่สามารถนำยาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้เกิดการดื้อยา carbapenem และสามารถพบกลไกนี้ได้ในเชื้อ *Serratia* spp., *Citrobacter freundii* และ *Morganella morganii* แต่ไม่พบกลไกนี้ในเชื้อที่ไม่มี AmpC บนโครโมโซม เช่น *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* แต่พบการได้รับพลาสมิดยีน AmpC ที่มีการแสดงออกมากเกินไปส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ porin ชนิด OmpK35 และ OmpK36 ของเชื้อ *K. pneumoniae* หรือ OmpF และ OmpC ของเชื้อ *E. coli* ทำให้เกิดการดื้อยา carbapenem ได้เช่นกัน ในทำนองเดียวกัน ถ้ามีพลาสมิดยีน ESBL มากเกินไป มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ porin เกิดการดื้อยา carbapenem โดยพบมากในเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* จากงานวิจัยของ Wise และคณะ ปี 2018 ได้ทำการศึกษาเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยา carbapenem ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ primer 4 ชุด ดังนี้ primer สำหรับยีนที่สร้างเอนไซม์ ESBL, ยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase, ยีนที่สร้าง AmpC และ สำหรับแยกชนิดกลุ่มยีน *bla*_{CTX}-

สำหรับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่มีผลผลิตของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน OmpK35 and OmpK36 พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยา carbapenem จำนวน 1,702 ตัวอย่าง ดื้อยา carbapenem ด้วยกลไกการสร้างเอนไซม์ carbapenemase สูงถึงร้อยละ 61.7 (1,142 ตัวอย่าง) และดื้อยา carbapenem ด้วยกลไกการสร้าง ESBL หรือ AmpC ร่วมกับการสูญเสีย porin ร้อยละ 28.61 (487 ตัวอย่าง) (101) จะเห็นได้ว่ากลไกการดื้อยา carbapenem โดยการสร้างเอนไซม์ carbapenemase พบได้มากกว่ากลไกการสร้าง ESBL หรือ AmpC ร่วมกับการสูญเสีย porin และยังเป็นกลไกที่สำคัญในการแพร่ระบาดของเชื้อ CRE อีกด้วย

การตรวจวิเคราะห์ชนิดยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยเทคนิค PCR และใช้ยีน *waaQ* ที่จำเพาะกับเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นยีนควบคุมภายใน ยีน *waaQ* ถอดรหัสเป็น inner-core LPS heptosyl III transferase มีหน้าที่ในการสร้าง lipopolysaccharide ในเชื้อ *K. pneumoniae* (102) ในเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 150 ตัวอย่าง พบยีน *bla*_{NDM} สูงที่สุดคือจำนวน 134 ตัวอย่าง (89.3 %) รองลงมาคือยีน *bla*_{OXA-48-like} จำนวน 12 ตัวอย่าง (8 %) พบยีนร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดคือ *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48-like} จำนวน 3 ตัวอย่าง (2 %) และไม่พบผลผลิตยีนดื้อยาทั้ง 5 ยีน จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.7 %) และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *bla*_{NDM} และ ยีน *bla*_{OXA-48-like} พบว่ายีน *bla*_{NDM} เป็นชนิด *bla*_{NDM-1} ทั้งหมด และ *bla*_{OXA-48-like} เป็นชนิด *bla*_{OXA-232} ทั้งหมด ซึ่งเกณฑ์ mCIM ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกเชื้อที่เข้าเกณฑ์ดื้อยา (ขนาดโซน 6-15 mm) เพียงอย่างเดียว จึงอาจทำให้ตรวจไม่พบเชื้อที่มียีนดื้อยา carbapenem ที่ให้ผล mCIM indeterminate (ขนาดโซน 16-18 mm หรือ ≥ 19 mm ที่มีโคโลนีขนาดเล็กขึ้นภายในโซน) เช่นยีน *bla*_{OXA-48-like} (16) ทำให้อัตราการพบยีนบางชนิดต่ำกว่าความเป็นจริงได้ ผลการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยเทคนิค PCR ให้ผลที่สอดคล้องตรงกันกับวิธี mCIM จากงานวิจัยของ Kuchibiro และคณะ ปี 2018 ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ระหว่างวิธี mCIM กับ Modified Hodge test (MHT), Carba NP test และ carbapenem inactivation method (CIM) ในเชื้อ CRE จำนวน 107 ตัวอย่าง ดังนี้ *K. pneumoniae* 54 ตัวอย่าง, *Serratia marcescens* 17 ตัวอย่าง, *E. coli* 18 ตัวอย่าง, *E. cloacae* 5 ตัวอย่าง, *C. freundii* 2 ตัวอย่าง และ *E. aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri* อย่างละ 1 ตัวอย่าง ตรวจยืนยันด้วยเทคนิค PCR sequencing พบว่าวิธี mCIM ให้ผลความไวและความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 99 (16) แสดงให้เห็นว่าวิธี mCIM เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในระดับพีโนไทป์ ผลการศึกษาที่

ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Laolerd และคณะ ประเทศไทย ปี 2018 ที่ตรวจหาเอ็นที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยเทคนิค multiplex PCR และวิเคราะห์ลำดับเบส ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* พบยีน bla_{NDM} มากที่สุดถึงร้อยละ 46.64 โดยพบใน *K. pneumoniae* สูงที่สุดถึง ร้อยละ 27.80 รองลงมา *E. coli* ร้อยละ 9.87 พบยีน $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 25.11 โดยพบใน *K. pneumoniae* สูงที่สุดถึงร้อยละ 21.97 รองลงมา *E. coli* ร้อยละ 1.79 พบยีน bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 25.11 โดยพบใน *K. pneumoniae* สูงที่สุดถึงร้อยละ 24.66 รองลงมาคือ *E. coli* ร้อยละ 0.45 และพบ bla_{IMP} ร้อยละ 3.14 พบในเชื้อ *E. cloacae* ร้อยละ 2.24 รองลงมาคือ *K. pneumoniae* ร้อยละ 0.9 (14) งานวิจัยของ Srisrattakarn และคณะ ปี 2016 ได้ตรวจหาเอ็นที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* จาก 3 โรงพยาบาล ในประเทศไทย พบยีน bla_{NDM} มากที่สุด ถึงร้อยละ 91.24 พบเชื้อ *K. pneumoniae* สูงที่สุดถึงร้อยละ 86.4 รองลงมาคือ *E. coli* ร้อยละ 7.2 พบยีน $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 8.03 โดยพบในเชื้อ *K. pneumoniae* สูงที่สุดถึงร้อยละ 81.82 รองลงมาคือ *E. coli* ร้อยละ 18.18 พบยีน bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 0.73 ตามลำดับ (15) ขณะทำงานวิจัยของ Liu และคณะ ประเทศจีน ปี 2019 ได้ตรวจหาเอ็นที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยเทคนิค PCR พบยีน bla_{KPC} มากที่สุดถึงร้อยละ 72.2 รองลงมาคือ bla_{NDM} ร้อยละ 22.2 และ bla_{IMP} ร้อยละ 11.1 ตามลำดับ (103) งานวิจัยของ Zhou และคณะ ประเทศจีน ปี 2020 ตรวจหาเอ็นที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จาก 17 โรงพยาบาล ด้วยเทคนิค PCR พบยีน bla_{KPC} สูงถึงร้อยละ 79.4 รองลงมาคือ bla_{NDM} ร้อยละ 19.6 (104) งานวิจัยของ Kumuduniea และคณะ ประเทศศรีลังกา ปี 2020 ได้ตรวจหาเอ็นที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยเทคนิค multiplex PCR พบยีน $bla_{OXA-48-like}$ สูงถึงร้อยละ 88.9 รองลงมาคือ bla_{NDM} ร้อยละ 14.8 และ bla_{KPC} ร้อยละ 3.7 ตามลำดับ (69) แสดงให้เห็นว่ายีนดื้อยาในแต่ละประเทศอาจมีความแตกต่างกันขึ้นกับระบาดวิทยาของแต่ละพื้นที่

การพัฒนาเทคนิค multiplex RPA ในการเพิ่มปริมาณยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} และ *waaQ* ในการศึกษาคั้งนี้พบว่าความเข้มข้น primer ที่เหมาะสมของยีน bla_{VIM} เท่ากับ 0.6 μ M bla_{NDM} เท่ากับ 0.3 μ M bla_{IMP} และ *waaQ* เท่ากับ 0.2 μ M $bla_{OXA-48-like}$ เท่ากับ 0.1 μ M bla_{KPC} เท่ากับ 0.025 μ M อย่างไรก็ตามคู่มือน้ำยา TwistAmp แนะนำให้ใช้ความเข้มข้น primer แต่ละเส้นเท่ากับ 0.15 nM – 0.6 μ M และความเข้มข้น primer ทั้งหมดในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.75 - 2 μ M (105) พบว่ายีน bla_{KPC} ใช้ความเข้มข้น primer เพียง 0.025 μ M ซึ่งน้อยกว่าที่แนะนำมาก และความเข้มข้น primer ทั้งหมดในปฏิกิริยาเท่ากับ 1.225 μ M ซึ่งเกินกว่าที่กำหนดไว้ประมาณ

2 เท่า อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าความเข้มข้น primer จะไม่เป็นไปตามที่ชุดน้ำยาแนะนำ แต่เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยา Multiplex RPA ในการเพิ่มปริมาณยีนทั้ง 6 ยีนพร้อมกัน และให้ผลผลิตชัดเจน ใกล้เคียงกัน ไม่มี non-specific หากความเข้มข้น primer น้อยเกินไปพบว่าจะทำให้เกิดผลผลิตที่น้อยหรือเห็นผลผลิตไม่ชัดเจน แต่ถ้าความเข้มข้น primer มากเกินไปจะทำให้เกิด primer dimer หรือทำให้เกิด nonspecific product ได้ ข้อดีของปฏิกิริยา multiplex คือเป็นการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายหลาย ๆ ยีนพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ทำให้ลดเวลา ขั้นตอน ในการทำปฏิกิริยา ประหยัดน้ำยา อุปกรณ์พลาสติกสิ้นเปลืองต่าง ๆ และงบประมาณในการตรวจวิเคราะห์ (79) แต่การออกแบบ primer จะต้องมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากที่สุดและใช้ความเข้มข้น primer ที่เหมาะสม ถ้า primer ไม่มีความจำเพาะและความเข้มข้น primer ที่ใช้ไม่เหมาะสม จะทำให้เกิด primer dimer หรือผลผลิตที่ไม่จำเพาะ (106) อุณหภูมิของ multiplex RPA ที่ทำให้เห็นผลผลิตชัดเจนคือ 37 - 40 °C แต่เลือกใช้อุณหภูมิ 37 °C เนื่องจากเห็นผลผลิตชัดเจน และสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องมือชนิดอื่นในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งใช้อุณหภูมิร่างกายในการทำปฏิกิริยาได้ (81) อุณหภูมิที่แนะนำในชุดน้ำยาคือ 37 - 42 °C ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้ลายเอนไซม์ในน้ำยา RPA อุณหภูมิต่ำเกินไปอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะน้อยลงกว่าปกติ เวลาที่เหมาะสมในการศึกษานี้คือ 25 นาที ซึ่งเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา RPA จะขึ้นอยู่กับจำนวนของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยปกติจะใช้เวลาที่ 20 - 40 นาที (21, 81) จากการศึกษพบว่าถ้าเวลาน้อยเกินไปจะได้ผลผลิต RPA น้อย เวลามากเกินไปจะเกิด nonspecific band ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA อยู่ที่ 50 ng/ μ l พบว่าถ้าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบนี้มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตได้น้อยและต้องใช้เวลาที่นานขึ้น ซึ่งความเข้มข้น primer อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบจะมีความแตกต่างกันในแต่ละงานวิจัยเช่น Rubio และคณะ ได้ทำการตรวจหายีนของเชื้อ *Yersinia pestis* และ *Francisella tularensis* ด้วยวิธี duplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer ของเชื้อ *Y. pestis* เท่ากับ 100 nM และใช้ความเข้มข้น primer ของเชื้อ *F. tularensis* เท่ากับ 1000 nM อุณหภูมิ 37 °C เวลา 30 นาที (107) Kersting และคณะ ได้ทำการตรวจหายีนของเชื้อ *Legionella pneumophila* และ *Streptococcus pneumoniae* ด้วยวิธี multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.48 μ M ที่อุณหภูมิ 38 °C เวลา 25 นาที และใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบเพียง 500 pg (108) Hassan และคณะ ได้ทำการตรวจหายีนของเชื้อ *Theileria annulata* และ *Theileria orientalis* ด้วยวิธี multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.48 μ M ที่อุณหภูมิ 39 °C เวลา 25 นาที ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตร 3 μ l (109) Kersting และคณะ ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella enterica* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus (MRSA) ด้วยวิธี multiplex RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer เท่ากับ 360 nM, 340 nM และ 300 nM ตามลำดับ อุณหภูมิที่ 38 °C เวลา 40 นาที ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเท่ากับ 250 pg (110) พบว่า หากผลผลิต RPA ผ่านการทำบริสุทธิ์ไม่ดี จะทำให้มีโปรตีนในปฏิกิริยา RPA ปนเปื้อนมาก ส่งผลให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในวุ้นอะกาโรสซาลง ทำให้เห็นขนาดผลผลิตผิดไปจากที่คาดหวังได้ (81)

การทดสอบขีดจำกัดต่ำสุดของปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้โดยวิธี multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้น พบว่า ยีน *bla_{KPC}* เท่ากับ 0.1 ng ยีน *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}* เท่ากับ 1 ng ยีน *bla_{IMP}* เท่ากับ 10 ng พบว่าขีดจำกัดของ การตรวจวัดแต่ละยีนในปฏิกิริยา multiplex RPA แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากความเข้มข้น primer แตกต่างกัน และประสิทธิภาพของ primer ในการจับกับยีนเป้าหมายที่ต่างกัน หากความเข้มข้น primer น้อย หรือ ประสิทธิภาพของ primer ในการจับกับยีนเป้าหมายไม่ดี หรือ primer จับกันเอง อาจทำให้ขีดจำกัดในการตรวจวัดต่ำ อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ใช้เทคนิค multiplex RPA ยังมีไม่มากนัก และยังไม่มียานวิจัยที่ใช้ primer มากถึง 6 คู่ เช่นงานวิจัยนี้ Singpanomchai และคณะ ได้ทำการตรวจหายีน IS6110 และ IS1081 ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex ด้วยเทคนิค RPA ใช้ความเข้มข้น primer เท่ากับ 0.48 μmol/L อุณหภูมิ 37 °C และใช้เวลาเพียง 15 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA บน 1.5 % อะกาโรส พบว่าปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดของยีน IS6110 และ IS1081 เท่ากับ 0.005 และ 0.00005 ng ตามลำดับ (111) Rosser และคณะ ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Schistosoma haematobium* ด้วยเทคนิค RPA ใช้ความเข้มข้น primer เท่ากับ 10 μM อุณหภูมิ 37 °C เวลา 30 นาที และตรวจสอบผลผลิต RPA บน 4 % อะกาโรส พบว่าดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 100 fg (112) Xu และคณะ ได้ทำการตรวจหายีน *mcr-1* ซึ่งเป็นยีนดื้อยา colistin ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ความเข้มข้น primer 0.48 μM อุณหภูมิ 37 °C 30 นาที พบว่าดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 100 fg (113) การตรวจยีน CRE ด้วยเทคนิคอื่น ๆ พบมีขีดจำกัดที่ต่างกัน เช่น งานวิจัยของ Srisrattakarn และคณะ ปี 2017 ได้ทำการตรวจหายีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* จากเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas* spp. ด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี hydroxynaphthol blue พบว่าดีเอ็นเอต่ำสุดของยีน *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP-14}* และ *bla_{KPC}* เท่ากับ 10², 10, 10², 10² และ 10² CFU/ml ตามลำดับ (114) Choi และคณะ ปี 2020 ได้ทำการตรวจหายีน *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GES}* จากเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ด้วยวิธี multiplex real-time PCR พบว่าดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 2 × 10² CFU/ml (115) และงานวิจัยของ Shanmugakani และคณะ ได้

ทำการตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP} จากเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ด้วยวิธี PCR-Dipstick พบว่าดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 10² CFU/ml (116) โดยพบว่าขีดจำกัดต่ำสุดของปริมาณดีเอ็นเอในการทดสอบยีนชนิดต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอาจเกิดจากความเข้มข้น primer อุณหภูมิ เวลาที่ใช้และวิธีการตรวจสอบผลผลิตที่มีความแตกต่างกัน ขีดจำกัดต่ำสุดของปริมาณดีเอ็นเอสามารถเพิ่มขึ้นได้จากการแยกปฏิกิริยา multiplex RPA ออกเป็นชุดยีน โดยดูจากความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase เช่น การศึกษาครั้งนี้พบยีน *bla*_{NDM} สูงสุด ถัดมาคือ *bla*_{OXA-48-like} จึงสามารถแยกชุดการตรวจออกเป็น 2 ชุดคือ ยีน *bla*_{NDM} กับ *bla*_{OXA-48-like} และ ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ซึ่งการแยกจำนวน multiplex RPA ลดลงจะทำให้ primer มีโอกาสจับดีเอ็นเอต้นแบบได้มากขึ้น อาจจะช่วยเพิ่มขีดจำกัดต่ำสุดของปริมาณดีเอ็นเอได้

การทดสอบความจำเพาะของ multiplex RPA พบว่ามีความจำเพาะทั้ง 6 ยีน โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์คลินิกจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งความจำเพาะของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับ การออกแบบ primer จะต้องออกแบบให้มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากที่สุด ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้ออื่น (106) การตรวจยีน CRE ด้วยเทคนิคอื่น ๆ พบมีความจำเพาะเช่นเดียวกัน งานวิจัยของ Cheng และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค LAMP ในการตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} โดยทดสอบความจำเพาะกับเชื้อมาตรฐาน 4 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *K. pneumoniae* ATCC 70060 พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ (77) Song และคณะ ปี 2019 ได้พัฒนาเทคนิค DNA Microarray ในการตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{DIM} โดยทดสอบกับเชื้อมาตรฐานจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecium* ATCC 35667, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 9007 พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ (117)

การตรวจยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และยีน และ *waaQ* ด้วยเทคนิค multiplex RPA ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ให้ผลดี้อย่า carbapenem จำนวน 150 ตัวอย่าง พบยีน *bla*_{NDM} จำนวน 134 ตัวอย่าง (89.3 %) ยีน *bla*_{OXA-48-like} จำนวน 12 ตัวอย่าง (8 %) พบยีนร่วมกัน

มากกว่า 1 ชนิดคือ bla_{NDM} และ $bla_{OXA-48-like}$ จำนวน 3 ตัวอย่าง (2 %) และไม่พบผลผลิตยีน จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.7 %) รวม 149 ตัวอย่าง ผลสอดคล้องกับ PCR และ วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส และ สอดคล้องกับเทคนิค mCIM ขณะที่เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ดื้อยา carbapenem จำนวน 50 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบยีนดื้อยา carbapenem พบเฉพาะยีน waaQ ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายใน และพบ nonspecific band อาจเนื่องมาจากในหลอดที่ให้ผลลบซึ่งไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายมาแย่งจับกับ primer ทำให้ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาที่มีจำนวนถึง 6 คู่ มีโอกาสจับกันเองและเกิด non-specific เมื่อคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive value: NPV) ของเทคนิค multiplex RPA โดยเปรียบเทียบกับวิธี mCIM และ วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า ยีน bla_{NDM} มีค่าความไวร้อยละ 100 (95%CI: 97.34% - 100.00%) ความจำเพาะร้อยละ 100 (95%CI: 75.29% - 100.00%) ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบมีค่าเท่ากับร้อยละ 100 ยีน $bla_{OXA-48-like}$ มีค่าความไวร้อยละ 100 (95%CI: 78.20% - 100.00%) ความจำเพาะร้อยละ 100 (95%CI: 97.30% - 100.00%) ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบมีค่าเท่ากับร้อยละ 100 ค่าความสอดคล้องกันของวิธี multiplex RPA กับวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสมีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก (ค่า k อยู่ระหว่าง 0.8-1) (95%CI 1.00 - 1.00) แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ และหาค่าความสอดคล้องกับยีน bla_{KPC} , bla_{IMP} และ bla_{VIM} ได้ เนื่องจากไม่มีตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ให้ผลบวกกับยีนเหล่านี้ ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cheng และคณะ ปี 2014 ได้พัฒนาวิธี Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ในการตรวจยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{VIM} ตรวจสอบผลด้วยตาเปล่าโดยการใช้ SYBR Green พบว่ามีความไว ความจำเพาะร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับ PCR sequencing (77) Uwamino และคณะ ปี 2017 ตรวจหายีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{VIM} ด้วยวิธี Xpert Carba-R Assay ใช้หลักการ Real time PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PCR พบว่ามีความไวร้อยละ 92.9 และความจำเพาะร้อยละ 100 (118)

แนวทางในการรักษาเชื้อแกรมลบในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ของสถาบันสุขภาพเด็ก แห่งชาติมหานาคินี้ จะใช้ยาในกลุ่ม 3rd generation cephalosporin เป็นอันดับแรก ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถดื้อยาในกลุ่ม cephalosporin ซึ่งแพทย์จะพิจารณาใช้ยาในกลุ่ม carbapenem ในการรักษา ทำให้มีการใช้ยา carbapenem มากขึ้น เป็นผลทำให้เกิดเชื้อดื้อยา carbapenem มากขึ้นด้วย จากสถิติของสถาบันฯ ปี 2017 พบเชื้อ *K. pneumoniae* (ESBL) สูงถึงร้อยละ 54.28 และพบเชื้อ *K.*

pneumoniae ตื้อยา carbapenem สูงถึงร้อยละ 15 ของเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด และพบ อัตราการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจสูงถึงร้อยละ 26.62 การศึกษารูปแบบการตื้อยาปฏิชีวนะของ เชื้อ *K. pneumoniae* ที่มีเอนไซม์ carbapenemase จากตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ จำนวน 21 ตัวอย่าง ด้วยวิธี disk diffusion พบการตื้อยา beta lactam ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycoside, folate pathway inhibitor, Quinolones โดยพบว่าตื้อยาร้อยละ 100 กับยา ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, ertapenem, amoxicillin/clavulanic acid, Cefoperazone/sulbactam และ Piperacillin/tazobactam ตื้อยา trimethoprim-sulfamethoxazole ร้อยละ 95.24, ciprofloxacin ร้อยละ 90.84 และ gentamicin ร้อยละ 85.71 ตามลำดับ เชื้อที่ตื้อยา carbapenem จึงเป็นเชื้อตื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance) ทำให้มี ยาที่ใช้รักษาได้จำกัด พบเชื้อ CRE ที่ตื้อยาหลายขนานในงานวิจัยอื่น ๆ เช่นกัน เช่น Liu และคณะ ที่ได้ทำการทดสอบความไวต่อยากับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ตื้อต่อยา carbapenem ด้วยวิธี MIC พบว่าตื้อยา ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ceftriaxone, cefepime, ertapenem, meropenem ให้ผลตื้อยาร้อยละ 100 ยา Piperacillin/tazobactam, imipenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin ตื้อยาร้อยละ 95.2, 95.2, 71.4, 83.3, 80.9 ตามลำดับ (103) Han และ คณะ ปี 2020 ประเทศจีน ได้ทำการทดสอบความไวต่อยากับเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ตื้อยา carbapenem ด้วยวิธี MIC พบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ตื้อยา cephalosporin, piperacillin, cefoperazone-sulbactam, piperacillin-tazobactam, aztreonam และ carbapenems (119) เนื่องจากยีนตื้อยา carbapenemase อยู่บนพลาสมิด ซึ่งอาจมียีนตื้อยาชนิดอื่นอยู่บนพลาสมิดร่วม ด้วยทำให้สามารถถ่ายทอดยีนตื้อยาร่วมกันได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Poirel และคณะ ปี 2011 ได้ ศึกษาการตื้อยา carbapenem ของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ให้ผลบวกกับยีนชนิด *bla_{NDM}* พบว่าบนพลาสมิดมียีนตื้อยาชนิดอื่นร่วมด้วยโดยส่วนใหญ่จะพบยีนตื้อยา ESBL โดยเฉพาะชนิด *bla_{CTX-M-15}* และยีน 16S RNA methylase ซึ่งทำให้เกิดการตื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside โดยชนิด ของยีนที่พบมีความแตกต่างกันเช่น *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* สามารถพบยีนตื้อยาในกลุ่ม quinolone ได้บ้างคือยีนชนิด *aac(6')-Ib-cr* ซึ่งทำให้ความไวต่อยา ciprofloxacin ลดลงและยีน *qepA* ซึ่งเป็นยีน ที่ทำให้เกิดการปั๊มยาออกจากเซลล์ (120) Hassan และคณะปี 2020 ได้ทำการศึกษายีนตื้อยาจำนวน 32 ชนิดของเชื้อ *E. coli* ที่ตื้อยา carbapenem และเป็นเชื้อตื้อยาหลายขนาน จำนวน 21 ตัวอย่าง พบยีน *bla_{NDM-11}* สูงที่สุดทำให้เกิดการตื้อยา carbapenem ร่วมกับยีนตื้อยาชนิดอื่นที่พบมากที่สุด ดังนี้ *bla_{TEM-220}*, *bla_{CTX-M-15}* (ตื้อยา cephalosporin), *rmtB*, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id (ตื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside), *sul1*, *sul2*, (ตื้อยาในกลุ่ม sulfonamide), *mphA* (ตื้อยาในกลุ่ม macrolide), *ErmB*

(ตัวยากลุ่ม lincosamide, macrolide, streptogramin-b), *TetA* (ตัวยากลุ่ม tetracycline) (121) จากการศึกษาพบว่าสิ่งตรวจที่พบเชื้อตัวยาคือ CRE มากที่สุด คือ tracheal สอดคล้องกับ Kumudunia และคณะ ปี 2020 ที่ได้ทำการตรวจหาเชื้อตัวยาคือ CRE จากสิ่งส่งตรวจดังนี้ เลือด ปัสสาวะ สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ หนองแผล และ sterile fluid ตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วย mCIM และตรวจยืนยันด้วยวิธี multiplex PCR พบเชื้อ CRE สูงที่สุดในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ ร้อยละ 20.8 (69) Fang และคณะ ปี 2019 ได้ทำการตรวจหา *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยวิธี multiplex PCR พบเชื้อ CRE ร้อยละ 3.6 ซึ่งพบในสิ่งส่งตรวจระบบทางเดินหายใจมากที่สุดถึงร้อยละ 42.6 ถัดมาคือ ปัสสาวะร้อยละ 25.5 (122) ขณะที่ Precit และคณะ ปี 2020 ที่ได้ทำการตรวจหาเชื้อ CRE จากสิ่งส่งตรวจดังนี้ ปัสสาวะ เลือด สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ หนองแผล และอุจจาระ ตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วย mCIM และตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR พบเชื้อ CRE สูงที่สุดในปัสสาวะถึงร้อยละ 51.5 (40)

การศึกษาการกระจายของเชื้อตัวยาคือ carbapenem ในหอผู้ป่วย 9 แผนก ซึ่งตั้งอยู่ในตึกผู้ป่วย 2 ตึก พบเชื้อ CRE ชนิด *bla*_{NDM} มากที่สุด 4 อันดับ คือ แผนก A, B, C และ D โดยพบว่า แผนก A อยู่ใกล้กับแผนก B ในตึกเดียวกัน และแผนก C อยู่ใกล้กับแผนก D ในอีกตึกหนึ่ง คาดว่าเชื้อที่แพร่กระจายในหอผู้ป่วยทั้ง 2 ตึกน่าจะเกิดจากการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาจีโนมของเชื้อที่ระบาดด้วยวิธี multilocus sequence tag (MLST) หรือวิธี genotyping อื่น ๆ เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อที่ระบาดได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น (123) งานวิจัยของ Pan และคณะ ที่ทำการศึกษาระบาดวิทยาการแพร่กระจายของเชื้อ CRE ในผู้ป่วยเด็ก เมืองเซี่ยงไฮ้ ประเทศจีน ปี 2019 พบเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* จำนวนเท่ากันคือ ร้อยละ 37.5 พบ *bla*_{NDM} สูงที่สุดในเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ถึงร้อยละ 66.67 และ 75 ตามลำดับ (124) Precit และคณะ ปี 2020 ที่ได้ทำการศึกษาระบาดวิทยาการแพร่กระจายของเชื้อ CRE พบเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นอันดับหนึ่งสูงถึงร้อยละ 39 และพบ *bla*_{KPC} มากที่สุดถึงร้อยละ 47 (40) ซึ่งสาเหตุหลักที่สำคัญคือ การใช้ยาต้านจุลชีพ และการแพร่เชื้อจากผู้ป่วยสู่ผู้ป่วย เช่นจากผู้ป่วยรายอื่น ๆ ในแผนก หรือผ่านเจ้าหน้าที่ทางการแพทย์ สภากาชาดล้อม หรืออุปกรณ์ที่ใช้ร่วมกัน ซึ่งการเฝ้าระวังการติดต่อยามีความจำเป็นและควรทำทุกโรงพยาบาลเพื่อตรวจคัดแยกผู้ป่วยที่มีเชื้อตัวยาคือออกจากผู้ป่วยอื่น เพื่อลดความเสี่ยงในการแพร่กระจายเชื้อตัวยาคือ (125)

วิธี multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ที่พบบ่อย ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* สามารถจำแนกชนิดของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ได้รวดเร็ว สะดวก และ ง่ายกว่า วิธีการตรวจทางพีโนไทป์ด้วยวิธี Disk diffusion และ วิธี mCIM ที่ต้องมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ใช้เวลาทดสอบนานถึง 24 ชั่วโมง ขณะที่วิธี CarbaNP ในการทดสอบต้องมีการเตรียมน้ำยาพิเศษและการอ่านผลของการเปลี่ยนสีอาจไม่ชัดเจน (13) การตรวจจีโนไทป์ด้วยวิธี multiplex RPA ไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทางอณูชีววิทยา และ รวดเร็วกว่าวิธี PCR สามารถตรวจหายีน carbapenemase ภายในระยะเวลา 25 นาที ซึ่งในอนาคต อาจพัฒนาการตรวจวัดผลด้วยวิธี lateral flow strip ซึ่งจะรวดเร็วมากยิ่งขึ้นกว่าวิธี Gel electrophoresis ที่ต้องมีขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ผลผลิต RPA ก่อนนำผลผลิตไปตรวจวิเคราะห์ด้วย Gel electrophoresis เทคนิค multiplex RPA ที่พัฒนาขึ้นจะเป็นประโยชน์ทางระบาดวิทยาในการ ติดตาม ฝ้าระวัง และควบคุม การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา CRE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้านี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase จำนวน 5 ยีนคือ ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และยีน *waaQ* ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายในด้วยเทคนิค multiplex RPA โดยสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาดังนี้ ใช้ความเข้มข้น primer ของยีน *bla*_{VIM} เท่ากับ 0.6 μ M *bla*_{NDM} เท่ากับ 0.3 μ M *bla*_{IMP} และ *waaQ* เท่ากับ 0.2 μ M *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 0.1 μ M *bla*_{KPC} เท่ากับ 0.025 μ M อุณหภูมิ 37 °C เวลา 25 นาที และความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเท่ากับ 50 ng/ μ l ขนาดผลผลิตยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *waaQ* ดังนี้ 271 bp, 621bp, 438 bp, 232 bp, 390 bp และ 112 bp ตามลำดับขีดจำกัดต่ำสุดของปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้พบว่า ยีน *bla*_{KPC} เท่ากับ 0.1 ng ยีน *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48-like} เท่ากับ 1 ng ยีน *bla*_{IMP} เท่ากับ 10 ng มีความจำเพาะไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* และ *Enterococcus faecalis*

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค multiplex RPA ในการตรวจหายีน *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48-like} กับวิธี mCIM และวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ 100 % และมีความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ระดับดีมาก แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าความสอดคล้องกัน ในการตรวจหายีน *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} และ *bla*_{VIM} ได้ เนื่องจากตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* ไม่มียีนดื้อยาที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase เหล่านี้ จึงควรมีการเก็บตัวอย่างในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ทั้งนี้เทคนิค multiplex RPA เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะ และใช้เวลาในการทดสอบที่รวดเร็ว จึงเหมาะที่จะประยุกต์ใช้ในการตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทางอนุชีววิทยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการติดตาม ฝ้าระวัง และควบคุม การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา CRE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. Trends Microbiol. 2016;24(12):944-56.
2. Bush K, Bradford PA. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(8).
3. Doorduijn DJ, Rooijackers SH, van Schaik W, Bardoel BW. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. Immunobiology. 2016;221(10):1102-9.
4. Henson SP, Boinett CJ, Ellington MJ, Kagia N, Mwarumba S, Nyongesa S, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* invasive infections over a decade at Kilifi County Hospital in Kenya. Int J Med Microbiol. 2017;307(7):422-9.
5. Alizadeh N, Rezaee MA, Kafil HS, Barhaghi MHS, Memar MY, Milani M, et al. Detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* by chromogenic screening media. J Microbiol Methods. 2018;153:40-4.
6. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! Trends Mol Med. 2012;18(5):263-72.
7. Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Drug Resist Updat. 2016;29:30-46.
8. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. Eur J Med Chem. 2017;131:185-95.
9. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2016;15:20.
10. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 2014 [cited 2019 February 20]. Available from: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
11. NARST Antimicrobial Resistance 2000-2019 2019 [cited 2019 February 21]. Available from: <http://narst.dmsc.moph.go.th/>
12. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of

carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2017;55(8):2321-33.

13. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods*. 2014;107:106-18.

14. Laolerd W, Akeda Y, Preeyanon L, Ratthawongjirakul P, Santanirand P. Carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Bangkok, Thailand, and their detection by the Carba NP and modified carbapenem inactivation method Tests. *Microb Drug Resist*. 2018;24(7):1006-11.

15. Srisrattakarn A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Piyapatthanakul S, et al. Modification and evaluation of the Carba NP test by use of paper strip for simple and rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(7):117.

16. PA W. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019;M100-S27.

17. Pranita D, Tamma PJS. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11):1-13.

18. Lutgring JD, Limbago BM. The Problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-*Enterobacteriaceae* detection. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):529-34.

19. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119-23.

20. Hrabak J, Chudackova E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):839-53.

21. Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018;98:19-35.

22. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin Chem*. 2016;62(7):947-58.

23. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley Carter GP, Asbury MA, RIDDLE C, et al. Biochemical Identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* Isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol*. 1985;21:46-76.

24. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:4.
25. Wu M, Li X. *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2015. p. 1547-64.
26. Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363(20).
27. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013;4(2):107-18.
28. Chew KL, Lin RTP, Teo JWP. *Klebsiella pneumoniae* in Singapore: hypervirulent infections and the carbapenemase Threat. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:515.
29. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(10):1002-5.
30. Opoku-Temeng C, Kobayashi SD, DeLeo FR. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1360-6.
31. Tian L, Sun Z, Zhang Z. Antimicrobial resistance of pathogens causing nosocomial bloodstream infection in Hubei Province, China, from 2014 to 2016: a multicenter retrospective study. *BMC Public Health*. 2018;18(1):1121.
32. Wang B, Zhang P, Li Y, Wang Y. *Klebsiella pneumoniae*-induced multiple invasive abscesses: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(39):e17362.
33. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014;370(13):1198-208.
34. Rhodes J, Jorakate P, Makprasert S, Sangwichian O, Kaewpan A, Akarachotpong T, et al. Population-based bloodstream infection surveillance in rural Thailand, 2007-2014. *BMC Public Health*. 2019;19(Suppl 3):521.
35. Silpa-Archa S, Ponwong A, Preble JM, Foster CS. Culture-positive endogenous endophthalmitis: An eleven-year retrospective study in the central region of Thailand. *Ocul Immunol Inflamm*. 2018;26(4):533-42.

36. Pirkani GS, Awan MA, Abbas F, Din M. Culture and PCR based detection of bacteria causing urinary tract infection in urine specimen. *Pak J Med Sci.* 2020;36(3):391-5.
37. Zhang R, Liu L, Zhou H, Chan EW, Li J, Fang Y, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Strains in China. *EBioMedicine.* 2017;19:98-106.
38. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(6):344-59.
39. Ling ML, Tee YM, Tan SG, Amin IM, How KB, Tan KY, et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2015;4:26.
40. Precit MR, Kauber K, Glover WA, Weissman SJ, Robinson T, Tran M, et al. Statewide surveillance of carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Washington state, October 2012-December 2017. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020:1-7.
41. Wang Q, Wang X, Wang J, Ouyang P, Jin C, Wang R, et al. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Data From a longitudinal large-scale CRE Study in China (2012-2016). *Clin Infect Dis.* 2018;67(suppl_2):S196-S205.
42. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943-60.
43. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11(4):529-44.
44. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(5):525-33.
45. George G, Zhanel RW, Leanne Dilay, Kristjan Thomson, Ethan Rubinstein, Daryl J. Hoban, Ayman M. Noreddin and James A. Karlowsky. Comparative review of the carbapenems. *Drugs.* 2007;67(7):1027-52
46. Zango M, Shawai A, Shamsuddin I. A review on β -lactam antibiotic drug resistance. *MOJ Drug Design Development & Therapy.* 2019;3(2):52-8.

47. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Lab Med. 2017;37(2):303-15.
48. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: The impact and evolution of a global menace. J Infect Dis. 2017;215(suppl_1):S28-S36.
49. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. Front Microbiol. 2016;7:895.
50. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):241-63.
51. Tehrani K, Martin NI. beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations: an update. Medchemcomm. 2018;9(9):1439-56.
52. Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect. 2014;20(9):831-8.
53. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. Biomed Res Int. 2014;2014:249856.
54. Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. Front Microbiol. 2019;10:80.
55. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(1):74-84.
56. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the community: a scoping review. Int J Antimicrob Agents. 2017;50(2):127-34.
57. Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Virulence. 2017;8(4):460-9.
58. Wang B, Pan F, Wang C, Zhao W, Sun Y, Zhang T, et al. Molecular epidemiology of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a paediatric hospital in China. Int J Infect Dis. 2020;93:311-9.

59. Hsu LY, Apisarnthanarak A, Khan E, Suwantararat N, Ghafur A, Tambyah PA. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacteriaceae* in South and Southeast Asia. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):1-22.
60. Netikul T, Kiratisin P. Genetic Characterization of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and the Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340 at a University Hospital in Thailand. *PLoS One.* 2015;10(9):e0139116.
61. Shanmugakani RK, Akeda Y, Sugawara Y, Laolerd W, Chaihongsa N, Sirichot S, et al. PCR-Dipstick-Oriented Surveillance and Characterization of mcr-1- and Carbapenemase-Carrying *Enterobacteriaceae* in a Thai Hospital. *Front Microbiol.* 2019;10:149.
62. Ohno Y, Nakamura A, Hashimoto E, Matsutani H, Abe N, Fukuda S, et al. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a primary care hospital in Japan, 2010-2013. *J Infect Chemother.* 2017;23(4):224-9.
63. Wu YF, Tang G, Qiao F, McNally A, Zonga Z. NDM Metallo-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2):1-45.
64. Alizadeh N, Ahangarzadeh Rezaee M, Samadi Kafil H, Hasani A, Soroush Barhaghi MH, Milani M, et al. Evaluation of resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Infect Drug Resist.* 2020;13:1377-85.
65. Ghaith DM, Mohamed ZK, Farahat MG, Aboukasem Shahin W, Mohamed HO. Colonization of intestinal microbiota with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in paediatric intensive care units in Cairo, Egypt. *Arab J Gastroenterol.* 2019;20(1):19-22.
66. Suwantararat N, Carroll KC. Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant gram-negative bacteria in southeast asia. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2016;5:15.
67. Thomas TSM, Duse AG. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) and comparison of the phenotypic versus genotypic screening tests for the detection of carbapenemases at a tertiary level, academic hospital in Johannesburg, South Africa. *Southern African Journal of Infectious Diseases.* 2018:1-7.

68. Jin C, Shi R, Jiang X, Zhou F, Qiang J, An C. Epidemic characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Pediatric Intensive Care Unit of Yanbian University Hospital, China. *Infect Drug Resist.* 2020;13:1439-46.
69. Kumudunie WGM, Wijesooriya LI, Namalie KD, Sunil-Chandra NP, Wijayasinghe YS. Epidemiology of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in Sri Lanka: First evidence of *bla*_{KPC} harboring *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Public Health.* 2020.
70. Peri AM, Doi Y, Potoski BA, Harris PNA, Paterson DL, Righi E. Antimicrobial treatment challenges in the era of carbapenem resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019.
71. Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015;277(5):501-12.
72. Aguirre-Quinonero A, Martinez-Martinez L. Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Infect Chemother.* 2017;23(1):1-11.
73. Butler-Wu SM, Abbott AN. Is This the Carbapenemase test we've been waiting for? A multicenter evaluation of the modified carbapenem inactivation method. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2309-12.
74. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo-beta-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1419-21.
75. Roh KH, Lee CK, Sohn JW, Song W, Yong D, Lee K. Isolation of a *Klebsiella pneumoniae* isolate of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Korea. *Korean J Lab Med.* 2011;31(4):298-301.
76. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29(3):151-9.
77. Cheng C, Zheng F, Rui Y. Rapid detection of *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *Microb Drug Resist.* 2014;20(6):533-8.
78. Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosens Bioelectron.* 2015;64:196-211.

79. Mayboroda O, Katakis I, O'Sullivan CK. Multiplexed isothermal nucleic acid amplification. *Anal Biochem.* 2018;545:20-30.
80. Qi H, Yue S, Bi S, Ding C, Song W. Isothermal exponential amplification techniques: From basic principles to applications in electrochemical biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2018;110:207-17.
81. Li J, Macdonald J, von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst.* 2018;144(1):31-67.
82. Xiang D, Zhai K, Xiang W, Wang L. Highly sensitive fluorescence quantitative detection of specific DNA sequences with molecular beacons and nucleic acid dye SYBR Green I. *Talanta.* 2014;129:249-53.
83. Ylmaz M, Ozic C, Gok I. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* 2012.
84. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006;4(7):e204.
85. Crannell ZA, Castellanos-Gonzalez A, Irani A, Rohrman B, White AC, Richards-Kortum R. Nucleic acid test to diagnose cryptosporidiosis: lab assessment in animal and patient specimens. *Anal Chem.* 2014;86(5):2565-71.
86. Krolov K, Frolova J, Tudoran O, Suhorutsenko J, Lehto T, Sibul H, et al. Sensitive and rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by recombinase polymerase amplification directly from urine samples. *J Mol Diagn.* 2014;16(1):127-35.
87. Silva G, Oyekanmi J, Nkere CK, Bomer M, Kumar PL, Seal SE. Rapid detection of potyviruses from crude plant extracts. *Anal Biochem.* 2018;546:17-22.
88. Kim JY, Lee J-L. Development of a multiplex real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for rapid quantitative detection of *Campylobacter coli* and *jejuni* from eggs and chicken products. *Food Control.* 2017;73:1247-55.
89. Liu W, Liu HX, Zhang L, Hou XX, Wan KL, Hao Q. A Novel Isothermal Assay of *Borrelia burgdorferi* by Recombinase Polymerase Amplification with Lateral Flow Detection. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8).

90. Sun K, Xing W, Yu X, Fu W, Wang Y, Zou M, et al. Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for rapid and visual detection of *Schistosoma japonicum*. *Parasit Vectors*. 2016;9:476.
91. Kalsi S, Valiadi M, Tsaloglou MN, Parry-Jones L, Jacobs A, Watson R, et al. Rapid and sensitive detection of antibiotic resistance on a programmable digital microfluidic platform. *Lab Chip*. 2015;15(14):3065-75.
92. Boyle DS, McNERney R, Teng Low H, Leader BT, Perez-Osorio AC, Meyer JC, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification. *PLoS One*. 2014;9(8):e103091.
93. Nancy M. FB, MS. Statistical Methodology: I. Incorporating the Prevalence of Disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Acad Emerg Med*. 1996;3:895-900.
94. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(8):1865-9.
95. Bae IK, Kang HK, Jang IH, Lee W, Kim K, Kim JO, et al. Detection of carbapenemases in clinical *Enterobacteriaceae* Isolates Using the VITEK AST-N202 Card. *Infect Chemother*. 2015;47(3):167-74.
96. Iraz M, Ozad Duzgun A, Sandalli C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A, et al. Distribution of beta-lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Ann Lab Med*. 2015;35(6):595-601.
97. Rajul Parikh MAM, MS; Shefali Parikh, MD; G Chandra Sekhar, MD; Ravi Thomas, MD Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol* 2008;56:45-50.
98. Rajul Parikh AM, Shefali Parikh, G Chandra Sekhar, Ravi Thomas Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol*. 2008;56:45-50.
99. Rigby AS. Statistical methods in epidemiology. v. Towards an understanding of the kappa coefficient. *Disabil Rehabil*. 2000;22(8):339-44.

100. Hong H, Choi Y, Hahn S, Park SK, Park BJ. Nomogram for sample size calculation on a straightforward basis for the kappa statistic. *Ann Epidemiol.* 2014;24(9):673-80.
101. Wise MG, Horvath E, Young K, Sahn DF, Kazmierczak KM. Global survey of *Klebsiella pneumoniae* major porins from ertapenem non-susceptible isolates lacking carbapenemases. *Journal of Medical Microbiology.* 2018;67(3):289-95.
102. Pechorsky A, Nitzan Y, Lazarovitch T. Identification of pathogenic bacteria in blood cultures: comparison between conventional and PCR methods. *J Microbiol Methods.* 2009;78(3):325-30.
103. Liu Q, Liu L, Li Y, Chen X, Yan Q, Liu WE. Fecal carriage and epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among hospitalized patients in a university hospital. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3935-42.
104. Zhou H, Zhang K, Chen W, Chen J, Zheng J, Liu C, et al. Epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* collected from 17 hospitals in Nanjing district of China. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020;9:15.
105. TwistDx. TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual [Available from: <https://www.twistdx.co.uk/en/support/rpa-assay-design-2>].
106. Elfath M, Elnifro A, Robert J, Cooper, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):559–70.
107. Jauset-Rubio M, Tomaso H, El-Shahawi MS, Bashammakh AS, Al-Youbi AO, O'Sullivan CK. Duplex Lateral Flow Assay for the Simultaneous Detection of *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Anal Chem.* 2018;90(21):12745-51.
108. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. A recombinase polymerase amplification assay for the diagnosis of atypical pneumonia. *Anal Biochem.* 2018;550:54-60.
109. Hassan MA, Liu J, Sajid MS, Rashid M, Mahmood A, Abbas Q, et al. Simultaneous detection of *Theileria annulata* and *Theileria orientalis* infections using recombinase polymerase amplification. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9(4):1002-5.
110. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Mikrochim Acta.* 2014;181(13-14):1715-23.

111. Singpanomchai N, Akeda Y, Tomono K, Tamaru A, Santanirand P, Ratthawongjirakul P. Naked eye detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by recombinase polymerase amplification-SYBR green I assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;33(2).
112. Rosser A, Rollinson D, Forrest M, Webster BL. Isothermal Recombinase Polymerase amplification (RPA) of *Schistosoma haematobium* DNA and oligochromatographic lateral flow detection. *Parasit Vectors*. 2015;8:446.
113. Xu J, Wang X, Yang L, Kan B, Lu X. Rapid detection of mcr-1 by recombinase polymerase amplification. *J Med Microbiol*. 2018;67(12):1682-8.
114. Srisrattakarn A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Saenjamla P, et al. Rapid and simple identification of carbapenemase genes, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP-14} and *bla*_{KPC} groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(7):130.
115. Choi JA, Bae SM, Kim JW, Lee KJ. Development of a two triplex real-time polymerase chain reaction for rapid detection of six carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*. *Osong Public Health Res Perspect*. 2020;11(1):53-9.
116. Shanmugakani RK, Yamamoto N, Sakamoto N, Hagiya H, Yoshida H, Takeuchi D, Sugawara Y, et al. PCR-Dipstick chromatography for differential detection of carbapenemase genes directly in stool specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(6):1-4.
117. Song Y, Dou F, He S, Zhou Y, Liu Q. Laboratory and clinical evaluation of DNA microarray for the detection of carbapenemase genes in gram-negative bacteria from hospitalized patients. *Biomed Res Int*. 2019;2019:8219748.
118. Uwamino Y, Sugita K, Hasegawa N, Nishimura T, Fujiwara H, Iwata S. Rapid detection and typing of carbapenemase genes from carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected in a Japanese hospital using the Xpert Carba-R Assay. *Jpn J Infect Dis*. 2017;70(1):124-5.
119. Han R, Shi Q, Wu S, Yin D, Peng M, Dong D, et al. Dissemination of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) among carbapenem-resistant

Enterobacteriaceae isolated from adult and children patients in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:314.

120. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5403-7.

121. Hassan R, Tantawy M, Gouda NA, Elzayat MG, Gabra S, Nabih A, et al. Genotypic characterization of multiple drug resistant *Escherichia coli* isolates from a pediatric cancer hospital in Egypt. *Sci Rep.* 2020;10(1):4165.

122. Fang L, Lu X, Xu H, Ma X, Chen Y, Liu Y, et al. Epidemiology and risk factors for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* colonisation and infections: case-controlled study from an academic medical center in a southern area of China. *Pathog Dis.* 2019;77(4).

123. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96.

124. Pan F, Tian D, Wang B, Zhao W, Qin H, Zhang T, et al. Fecal carriage and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from outpatient children in Shanghai. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):678.

125. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Who, When, and How? *Virulence.* 2017;8(4):417-26.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยา

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Oxoid™)

อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar 51.5 g ในน้ำ 1,000 ml จากนั้นละลายอาหารเลี้ยงเชื้อและนำเข้า autoclave ที่ 121 °C 15 นาที

1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (Oxoid™)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar 38 g ในน้ำ 1,000 ml จากนั้นละลายอาหารเลี้ยงเชื้อและนำเข้า autoclave ที่ 121 °C 15 นาที

1.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth 30 g ในน้ำ 1,000 ml จากนั้นละลายอาหารเลี้ยงเชื้อและนำเข้า autoclave ที่ 121 °C 15 นาที แบ่งใส่หลอดละ 4 ml

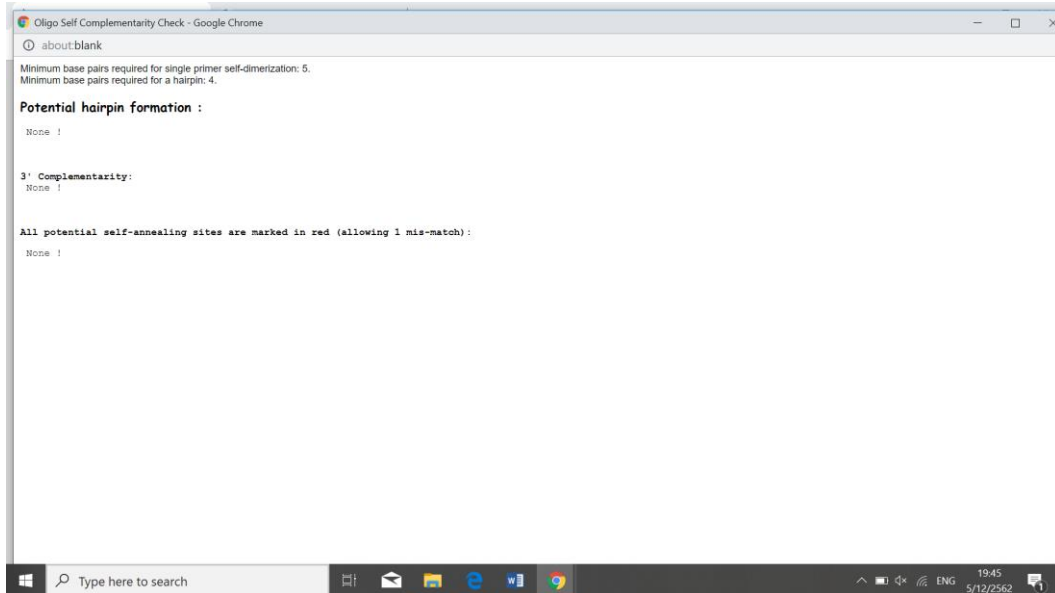
1.3 เตรียมน้ำยา TE buffer

- 1M Tris-Cl (pH 8) 1 ml
- 0.5 EDTA (pH 8) 1 ml
- ปรับระดับน้ำถึง 1,000 ml

1.4 เตรียมน้ำยา 50X TAE buffer

- Tris base 242 g
- acetic acid ปริมาตร 57.1 ml
- 0.5 M EDTA (pH 8) ปริมาตร 100 ml
- ปรับระดับน้ำถึง 1,000 ml

2. ผลการออกแบบ primer ยีน *bla_{KPC}-C* และ *waaQ* -B ตรวจสอบการเกิด hairpin ด้วยโปรแกรม OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) พบว่าไม่เกิด hairpin และทดสอบความจำเพาะด้วยโปรแกรม Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่ามีความจำเพาะ

Primer ยืนยัน bla_{KPC} F -C

Oligo Self Complementarity Check - Google Chrome
about:blank

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

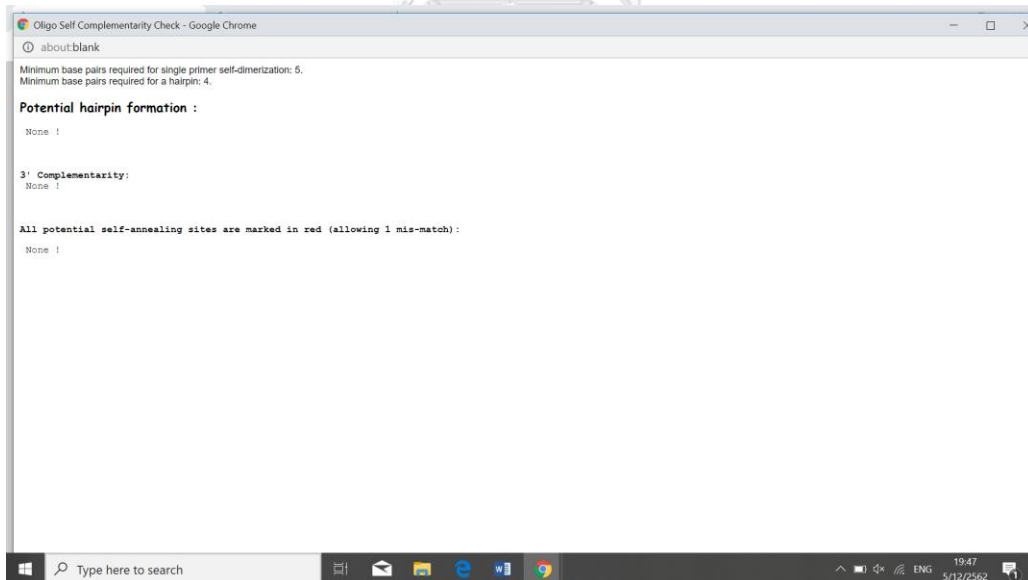
Potential hairpin formation :
None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):
None !

Type here to search

19:45
5/12/2562

Primer ยืนยัน bla_{KPC} R -C

Oligo Self Complementarity Check - Google Chrome
about:blank

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :
None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):
None !

Type here to search

19:47
5/12/2562

primer ยีน waaQ F -B

Oligo Self Complementarity Check - Google Chrome

about:blank

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :
None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):
None !

The screenshot shows a web browser window with a white background and black text. The text is organized into sections with bold headers. The results are all 'None !', indicating no self-complementarity issues were found for the primer.

primer ยีน waaQ R -B

Oligo Self Complementarity Check - Google Chrome

about:blank

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :
None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):
None !

This screenshot is identical to the one above, showing the same tool interface and results for a different primer, waaQ R -B.

ยีน *bla_{KPC}-C*

Accession	Score	Score	Cover	value	Ident
Expression vector pUC57-Kan-blaKPC-2 DNA, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain 39427 plasmid pKPN39427.2, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Escherichia coli strain EC600 plasmid p17ZR-91-TC1, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain 17ZR-91 plasmid p17ZR-91-IncFII-114, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Escherichia coli strain NRZ-56857 carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase KPC-60 (blaKPC) gene, blaKPC-60 allele, complete cds	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain 1099927 plasmid carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase KPC-59 (blaKPC) gene, blaKPC-59 allele, complete cds	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain 1106489 plasmid inhibitor-resistant class A beta-lactamase KPC-58 (blaKPC) gene, blaKPC-58 allele, complete cds	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain ZZ100 plasmid pZZ100-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain 12478 plasmid p12478-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain W09308 plasmid pW09308-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain BJ108 plasmid pBJ108-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain BJ20 plasmid pBJ20-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain A1750 plasmid pA1750-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain A1743 plasmid pA1743-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain 71221 plasmid p71221-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella quasipneumoniae strain KP18-31 plasmid pKP18-31-IMP-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Citrobacter sp. strain 172116965 plasmid p116965-KPC, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae N859 unnamed blaKPC gene for inhibitor-resistant class A beta-lactamase KPC-50, complete CDS	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Pseudomonas aeruginosa strain Hangzhou-61 KPC family beta-lactamase (blaKPC) gene, partial cds	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain F16KP0075 plasmid pF16KP0075-3, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain B16KP0226 plasmid pB16KP0226-2, complete sequence	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%

ยีน *waaQ -B*

Accession	Score	Score	Cover	value	Ident
Klebsiella pneumoniae strain KP20194a chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194a2 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194b chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194c4 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194c5 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194c3 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194d chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194e chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194f chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194c chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain KP20194b2 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain MS14393 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain 39427 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain WSHVKP chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain NMBU-W07E18 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain BA2275 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae SMKP03 DNA, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain E16KP0102 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain D16KP0122 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%
Klebsiella pneumoniae strain N16-03892 chromosome, complete genome	60.0	60.0	100%	3e-06	100.00%

3. ผลการตรวจ Hetero – dimer primer สำหรับ multiplex RPA ด้วยโปรแกรม Oligo Analyzer
(<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer/>)

Primer	ตำแหน่งที่จับกันได้
IMP F กับ IMP R	4
IMP F กับ VIM F	3
IMP F กับ VIM R	3
IMP F กับ OXA F	6
IMP F กับ OXA R	4
IMP F กับ NDM F	3
IMP F กับ NDM R	4
IMP R กับ VIM F	5
IMP R กับ VIM R	3
IMP R กับ OXA F	6
IMP R กับ OXA R	4
IMP R กับ NDM F	5
IMP R กับ NDM R	3
VIM F กับ VIM R	5
VIM F กับ OXA F	3
VIM F กับ OXA R	4
VIM F กับ NDM F	4
VIM F กับ NDM R	3
VIM R กับ OXA F	4
VIM R กับ OXA R	2
VIM R กับ NDM F	5
VIM R กับ NDM R	3
OXA F กับ OXA R	5
OXA F กับ NDM F	3
OXA F กับ NDM R	5
OXA R กับ NDM F	4

OXA R กั๊น NDM R	3
NDM F กั๊น NDM R	4
waaQ F -B กั๊น waaQ R -B	5
waaQ F -B กั๊น IMP F -B	4
waaQ F -B กั๊น IMP R	4
waaQ F -B กั๊น VIM F	4
waaQ F -B กั๊น VIM R	4
waaQ F -B กั๊น OXA F	3
waaQ F -B กั๊น OXA R	3
waaQ F -B กั๊น NDM F	3
waaQ F -B กั๊น NDM R	4
waaQ F -B กั๊น KPC F	4
waaQ F -B กั๊น KPC R	4
waaQ R -B กั๊น IMP F	4
waaQ R -B กั๊น IMP R	4
waaQ R -B กั๊น VIM F	3
waaQ R -B กั๊น VIM R	4
waaQ R -B กั๊น OXA F	4
waaQ R -B กั๊น OXA R	4
waaQ R -B กั๊น NDM F	3
waaQ R -B กั๊น NDM R	4
waaQ R -B กั๊น KPC F	4
waaQ R -B กั๊น KPC R	4
KPC F -C กั๊น KPC R -C	4
KPC F -C กั๊น IMP F	3
KPC F -C กั๊น IMP R	3
KPC F -C กั๊น VIM F	4
KPC F -C กั๊น VIM R	4
KPC F -C กั๊น OXA F	4
KPC F -C กั๊น OXA R	4

KPC F -C กั๊บ NDM F	3
KPC F -C กั๊บ NDM R	4
KPC R -C กั๊บ IMP F	4
KPC R -C กั๊บ IMP R	4
KPC R -C กั๊บ VIM F	3
KPC R -C กั๊บ VIM R	3
KPC R -C กั๊บ OXA F	3
KPC R -C กั๊บ OXA R	4
KPC R -C กั๊บ NDM F	2
KPC R -C กั๊บ NDM R	3

4. ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR ยีน bla_{NDM} และ $bla_{OXA-48-like}$ โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่ามีความคล้ายกันที่ระดับร้อยละ 98-100

The screenshot shows a BLASTN search results page with the following table of results:

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain NF415 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1701	1701	91%	0.0	99.78%	KF951457.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF175 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1700	1700	91%	0.0	99.78%	KJ018844.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF179 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1700	1700	91%	0.0	99.78%	KJ018843.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF162 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1700	1700	91%	0.0	100.00%	KJ018842.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF132 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1700	1700	91%	0.0	99.78%	KJ018839.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF402 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1700	1700	91%	0.0	99.78%	KJ018815.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF270 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1700	1700	91%	0.0	99.78%	KJ018813.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF609 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1698	1698	91%	0.0	99.78%	KJ018847.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF406 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1698	1698	91%	0.0	99.78%	KJ018819.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NF271 beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1698	1698	91%	0.0	99.78%	KJ018814.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain NF177 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1698	1698	91%	0.0	99.78%	KF951469.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain NF421 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1698	1698	91%	0.0	99.78%	KF951464.1
<input checked="" type="checkbox"/> Providencia rettgeri strain NF193 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1698	1698	91%	0.0	99.78%	KF951462.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain NF188 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1698	1698	91%	0.0	99.78%	KF951456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain NF204 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1696	1696	91%	0.0	99.78%	KF951468.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain NF414 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1696	1696	91%	0.0	99.78%	KF951465.1
<input checked="" type="checkbox"/> Providencia rettgeri strain NF442 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds	1696	1696	91%	0.0	99.78%	KF951466.1

NCBI Blast:Nucleotide Sequence x Escherichia coli isolate E566 plas x +

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_589298588

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain NF415 metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM-1) gene, complete cds
Sequence ID: KP39437.1 Length: 944 Number of Matches: 1

Range 1: 17 to 943 GetBlast GetAlign

Score	Expect	Ident	Gaps	Strain
1701 bits(921)	0.0	99.99(799%)	0(97.0%)	blast/1
Query 18	ATTACGATCCTCTTACTAGGCTCGCATTTCGGGGTTTTAATGCTGAATAAAGG	77		
Sbjct 17	ATTACGATCCTCTTACTAGGCTCGCATTTCGGGGTTTTAATGCTGAATAAAGG	76		
Query 78	AAAACTGATGGAATTGCCCAATATTATGCCCGGTGGGAAGCTGAGCACCAGATTAG	137		
Sbjct 77	AAAACTGATGGAATTGCCCAATATTATGCCCGGTGGGAAGCTGAGCACCAGATTAG	136		
Query 138	CCGCTGATTTGCTGAGCGGGTGCATGCCCGTGAATCCGCCGACGATTTGGCCAGC	197		
Sbjct 137	CCGCTGATTTGCTGAGCGGGTGCATGCCCGTGAATCCGCCGACGATTTGGCCAGC	196		
Query 198	AAATGGAACCTGGGACCAAGGTTTGGGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCGATTG	257		
Sbjct 197	AAATGGAACCTGGGACCAAGGTTTGGGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCGATTG	256		
Query 258	TCTGGAGCAGACTCTCTATCTGACATCCCGGTTTCGGGCAATGCTCCACAGGTT	317		
Sbjct 257	TCTGGAGCAGACTCTCTATCTGACATCCCGGTTTCGGGCAATGCTCCACAGGTT	316		
Query 318	TGATGCTCAGGATGAGCGCGGCTGCTGGTGGTGCATACCGCTGGACGATGACAGA	377		
Sbjct 317	TGATGCTCAGGATGAGCGCGGCTGCTGGTGGTGCATACCGCTGGACGATGACAGA	376		
Query 378	CCGCCAGATCTCAATGGATCAAGCAGGAGATCAACCTCCCGCTGCGCTGGCGGTGG	437		
Sbjct 377	CCGCCAGATCTCAATGGATCAAGCAGGAGATCAACCTCCCGCTGCGCTGGCGGTGG	436		
Query 438	TGACTCAGCGGCTCAGGACAGATGGCGGATATGGAGCGCTGATCGGCGGGGATTG	497		
Sbjct 437	TGACTCAGCGGCTCAGGACAGATGGCGGATATGGAGCGCTGATCGGCGGGGATTG	496		
Query 498	CGACTATGCAATGCTTTCTGCAACAGCTTCCCGCAAGAGGGATTTGTCGGGCT	557		
Sbjct 497	CGACTATGCAATGCTTTCTGCAACAGCTTCCCGCAAGAGGGATTTGTCGGGCT	556		
Query 558	AAGCAGCTGATTTTGGCGCATGATGCTGGTGGTGGAGCAGCAGCGCCCAATTTG	617		
Sbjct 557	AAGCAGCTGATTTTGGCGCATGATGCTGGTGGTGGAGCAGCAGCGCCCAATTTG	616		
Query 618	GCCGCTCAGGATTTTACCGCGCCCGCCGACGCTGATGATACCTGTGGG	677		
Sbjct 617	GCCGCTCAGGATTTTACCGCGCCCGCCGACGCTGATGATACCTGTGGG	676		
Query 678	TGGAGGACCACTGCTTTGGTGGCTGCTGATCAGGACAGCAGCAGGATGCG	737		
Sbjct 677	TGGAGGACCACTGCTTTGGTGGCTGCTGATCAGGACAGCAGCAGGATGCG	736		
Query 738	TGGGCACTCGGATGCGGACACTGACGCTACGCGGCTCAGCGCGGCTTGGTG	797		
Sbjct 737	TGGGCACTCGGATGCGGACACTGACGCTACGCGGCTCAGCGCGGCTTGGTG	796		
Query 798	CGCGTCCCAAGCCGACATGCTGATGACCTTCCCGCCGATGCGCGCCG	857		
Sbjct 797	CGCGTCCCAAGCCGACATGCTGATGACCTTCCCGCCGATGCGCGCCG	856		
Query 858	CAATCACTACAGCGCCGATGGCGCAAGCTGGCTGACGATGGTGAACCACTCA	917		
Sbjct 857	CAATCACTACAGCGCCGATGGCGCAAGCTGGCTGACGATGGTGAACCACTCA	916		
Query 918	CCCCCAATCTGCATCGGCTGCTGGG	944		
Sbjct 917	CCCCCAATCTGCATCGGCTGCTGGG	943		

NCBI Blast:Nucleotide Sequence x multiplesquencealignment - kr x +

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Escherichia coli isolate E566 plasmid pE566-OXA-232, complete sequence	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MT312220.1
Klebsiella pneumoniae plasmid Carhapenemase(OXA-232)_ColiKP3, complete sequence	1227	1227	90%	0.0	98.70%	CP050165.1
Klebsiella pneumoniae strain WSD411 plasmid pWSD411_7, complete sequence	1227	1227	90%	0.0	98.70%	CP045680.1
Escherichia coli strain Ec62 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654469.1
Escherichia coli strain Ec61 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654468.1
Escherichia coli strain Ec59 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654467.1
Escherichia coli strain Ec58 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654466.1
Escherichia coli strain Ec57 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654465.1
Escherichia coli strain Ec53 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654463.1
Escherichia coli strain Ec52 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654462.1
Escherichia coli strain Ec51 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654461.1
Escherichia coli strain Ec50 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654460.1
Escherichia coli strain Ec49 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654459.1
Escherichia coli strain Ec48 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654458.1
Escherichia coli strain Ec47 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654457.1
Escherichia coli strain Ec46 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654456.1
Escherichia coli strain Ec45 OXA-48 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-232 (blaOXA) gene, blaOXA-232 allele, cor	1227	1227	90%	0.0	98.70%	MN654455.1

Feedback

Type here to search

NCBI Blast:Nucleotide Sequence x Escherichia coli isolate E566 plasmid pE566-OXA-232, complete sequence

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1839331524

Escherichia coli isolate E566 plasmid pE566-OXA-232, complete sequence
Sequence ID: [MT312220.1](#) Length: 6027 Number of Matches: 1

Range 1: 2026 to 2716 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identifies	Gaps	Strand
1227 bits(664)	0.0	683/692(99%)	2/692(0%)	Plus/Minus

Query 23 AAAGTTGGAAATGCTCACTATAC TGAACATAAATC -CAGGGCGTAGTGTGCTTGGAAATG 81
Sbjct 2716 AAAGTTGGAAATGCTCACTT TAC TGAACATAAATCACAGGGCGTAGTGTGCTTGGAAATG 2657

Query 82 AGAATAAGCAGCAAGGATTTACCAATAATCTATACGGCCGAACCAAGCAATTTTACCCG 141
Sbjct 2656 AGAATAAGCAGCAAGGATTTACCAATAATCTTAAACGGCCGAACCAAGCAATTTTACCCG 2597

Query 142 CATCTACCTTTAAAATCCCAATAGCTTGATCGCCCTCGATTGGGGGTGGTTAAGGATG 201
Sbjct 2596 CATCTACCTTTAAAATCCCAATAGCTTGATCGCCCTCGATTGGGGGTGGTTAAGGATG 2537

Query 202 AACACCAAGTCTTTAAGTGGGATGGACAGACCGGTGATTCGCCGCTTGGAACTGTACCC 261
Sbjct 2536 AACACCAAGTCTTTAAGTGGGATGGACAGACCGGTGATTCGCCGCTTGGAACTGTACCC 2477

Query 262 ATGACTTAATACCGCGATGAAGTACTCAGTTGTGCTGTTTATCAAGAAATTCGCCGCC 321
Sbjct 2476 ATGACTTAATACCGCGATGAAGTACTCAGTTGTGCTGTTTATCAAGAAATTCGCCGCC 2417

Query 322 AAATGGTGAGGCAGTATGAGTAAAATGCTCACGCCCTTCGATTATGGCAATGAGGATA 381
Sbjct 2416 AAATGGTGAGGCAGTATGAGTAAAATGCTCACGCCCTTCGATTATGGCAATGAGGATA 2357

Query 382 TCTCGGGCAATGATGACAGTTTTTGGCTCGATGGTGTATTCCGATTCGGCTACCCAGC 441
Sbjct 2356 TCTCGGGCAATGATGACAGTTTTTGGCTCGATGGTGTATTCCGATTCGGCTACCCAGC 2297

Query 442 AAATCGCTTTTTTACGCAAGCTGATCACAAACAGCTGCACGTTTCGAGCGTAGTCAGC 501
Sbjct 2296 AAATCGCTTTTTTACGCAAGCTGATCACAAACAGCTGCACGTTTCGAGCGTAGTCAGC 2237

Query 502 GCATCGTGAACCAAGC CATGCTGACCGAAGCAATGGCGACTATATTATTCGGCTAATA 561
Sbjct 2236 GCATCGTGAACCAAGC CATGCTGACCGAAGCAATGGCGACTATATTATTCGGCTAATA 2177

Query 562 CCGGACTCAGC TAGTATCGAACC TAGATTGGCTGGTGGTTGGTTGGTTGAAC TTG 621
Sbjct 2176 CCGGACTCAGC TAGTATCGAACC TAGATTGGCTGGTGGTTGGTTGGTTGAAC TTG 2117

Query 622 ATGATAATGTGTGTTTTTGGCGATGATGGGATGCCACATCGGATGGTTAGGGC 681
Sbjct 2116 ATGATAATGTGTGTTTTTGGCGATGATGGGATGCCACATCGGATGGTTAGGGC 2057

Query 682 TGGCCCAAGCCATCAAAAAGAAAGTGTCAA 713
Sbjct 2056 TGGCCCAAGCCATCAAAA -AGAAGTGTCAA 2026

5. ตารางแสดงผลการทดสอบความไวต่อยา ertapenem (ETP) 10 µg, imipenem (IMP) 10 µg, meropenem (MEM) 10 µg ด้วยวิธี disk diffusion ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี mCIM ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี sequencing และผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ด้วยเทคนิค multiplex RPA

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
1	8	8	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
2	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
3	8	10	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
4	9	11	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
5	8	9	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
6	8	10	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
7	6	7	18	14 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
8	6	12	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
9	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1} ร่วมกับ <i>bla</i> _{OXA-232}	+	+	-	-	-
10	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
11	11	13	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
12	8	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
13	8	8	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
14	6	11	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
15	15	15	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
16	6	9	15	15 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
17	6	6	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
18	6	9	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
19	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1} ร่วมกับ <i>bla</i> _{OXA-232}	+	+	-	-	-
20	6	6	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
21	6	6	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
22	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
23	6	6	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
24	6	8	14	13 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
25	6	15	20	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
26	11	11	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
27	10	15	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
28	6	6	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
29	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
30	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
31	8	11	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
32	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
33	7	8	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
34	6	10	15	15 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
35	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
36	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
37	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
38	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
39	8	10	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
40	6	8	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
41	8	11	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
42	6	8	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
43	6	8	16	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
44	8	10	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
45	10	10	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
46	10	10	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
47	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
48	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
49	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
50	6	10	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
51	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
52	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
53	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
54	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
55	6	6	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
56	9	11	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
57	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
58	8	11	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
59	6	10	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
60	9	10	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
61	9	10	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
62	10	10	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
63	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
64	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
65	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
66	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
67	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
68	6	13	19	11 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
69	8	12	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
70	8	14	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
71	6	6	6	12 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
72	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
73	6	6	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
74	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
75	6	6	14	14 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
76	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
77	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
78	6	6	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
79	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
80	12	14	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
81	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
82	13	12	13	19 mm. (-)	-	-	-	-	-	-
83	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
84	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
85	6	6	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
86	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
87	6	6	6	14 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
88	6	8	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
89	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
90	10	15	19	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
91	10	11	15	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
92	9	10	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
93	10	11	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
94	9	13	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
95	12	13	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
96	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
97	10	12	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
98	8	12	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
99	10	12	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
100	6	6	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
101	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
102	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
103	6	6	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
104	7	8	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
105	8	8	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
106	6	6	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
107	9	11	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
108	9	11	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
109	9	10	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
110	9	11	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
111	10	12	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
112	10	11	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
113	10	10	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
114	11	13	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
115	10	11	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
116	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
117	6	9	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
118	11	11	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
119	10	10	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
120	10	10	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
121	8	8	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
122	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
123	6	6	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
124	6	6	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
125	8	8	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
126	9	13	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
127	10	10	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
128	9	10	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
129	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
130	6	11	9	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
131	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1} ร่วมกับ <i>bla</i> _{OXA-232}	+	+	-	-	-
132	6	6	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
133	6	8	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-

Sample	Antimicrobial susceptibility (mm.)			mCIM	PCR sequencing	multiplex RPA				
	ETP	MEM	IMP			<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
134	8	8	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
135	8	8	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
136	8	12	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
137	8	8	8	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
138	8	10	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
139	8	13	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
140	10	10	12	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
141	6	6	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
142	6	11	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
143	6	10	16	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
144	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
145	6	6	13	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-
146	8	12	11	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
147	6	12	10	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
148	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
149	6	6	6	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{NDM-1}	+	-	-	-	-
150	6	6	14	6 mm. (+)	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	+	-	-	-

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุธาวรรณ มุทิตานนท์
วัน เดือน ปี เกิด	3 มีนาคม 2537
สถานที่เกิด	ชลบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ที่อยู่ปัจจุบัน	136 ถ.สุขุมวิท ต.ศรีราชา อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี 20110



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY