

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการตรวจคัดกรองเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี disc diffusion

ผลการตรวจคัดกรองเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี disc diffusion ในเชื้อทั้งหมด 4,418 ตัวอย่างมีเชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 104 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.2) โดยส่วนใหญ่ (59 ตัวอย่าง) เป็น *Enterobacter* spp. (ตารางที่ 3.1)

3.2 ผลการตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธีพีโนไทป์

ผลการตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อที่ให้ผลบวกกับวิธีตรวจคัดกรองจำนวน 104 ตัวอย่างพบว่ามีเชื้อ 27 ตัวอย่างให้ผลบวกกับวิธี MHT นอกจากนี้เชื้อ 36 ตัวอย่างให้ผลบวกกับวิธี PBA-carbapenem combined disc แสดงว่าเชื้ออาจผลิตเอนไซม์ class A carbapenemase หรือ AmpC ในเชื้อ 36 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี PBA-carbapenem combined disc พบว่ามี 23 ตัวอย่างให้ผลบวกกับวิธี OX-carbapenem combined disc แปลผลได้ว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ AmpC อีก 13 ตัวอย่างให้ผลบวกกับวิธี PBA-carbapenem combined disc เท่านั้น โดยขนาดของ inhibition zone เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 5-10 มิลลิเมตร นอกจากนี้มีเชื้อ 8 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี EDTA-carbapenem combined disc แปลผลได้ว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ MBL โดยขนาดของ inhibition zone เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 6-19 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.1 และ 3.2 และ ตารางที่ 3.1 และ 3.2)

3.3 การตรวจชนิดของเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี multiplex PCR

ผลการตรวจชนิดของเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี multiplex PCR พบว่ามีเชื้อจำนวน 6 ตัวอย่างเป็น *C. freundii*, *E. coli* และ *K. pneumoniae* ชนิดละ 2 ตัวอย่างตรวจพบยีน *bla_{NDM}* นอกจากนี้มี *K. pneumoniae* อีก 2 ตัวอย่างตรวจพบยีน *bla_{IMP}* แต่ไม่พบตัวอย่างที่มียีน *bla_{KPC}* และ *bla_{OXA-48}* (รูปที่ 3.3 และ ตารางที่ 3.2)

ผลการตรวจหา integron ที่เกี่ยวข้องกับยีน *bla_{IMP}* ใน *K. pneumoniae* ทั้ง 2 ตัวอย่างโดยวิธี PCR ให้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.4 เมื่อการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla_{IMP}* และ integron จาก PCR product ที่ได้พบว่าทั้ง 2 ตัวอย่างเป็น *bla_{IMP-14a}* อยู่บน integron ที่มียีน aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase (*aacA*) อยู่ด้วยเช่นเดียวกับที่รายงานใน *P. aeruginosa* จากโรงพยาบาลศิริราช (GenBank accession no. AY553332) ในขณะที่เป็นยีน *bla_{IMP-14a}* ใน *P. aeruginosa* จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์พบอยู่บน integron ที่มียีน aminoglycoside adenyltransferase (*aadB*) อยู่ด้วย (GenBank accession no. FJ267651) เช่นเดียวกับที่พบใน *P. aeruginosa* จากประเทศไทยซึ่งแยกได้ที่ประเทศนอร์เวย์ (31) (รูปที่ 3.5 และ 3.6)

ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla_{NDM}* จาก PCR product ของเชื้อทั้ง 6 ตัวอย่าง (รูปที่ 3.7) พบว่าเป็นยีน *bla_{NDM-1}* และมียีนรอบข้างเหมือนกับตัวอย่างที่มีรายงานในประเทศอินเดีย (7), ฮองกง (32) และสเปน (33) ซึ่งทางด้าน upstream ของยีน *bla_{NDM-1}* เป็นส่วนของยีน *ISAb125* ส่วนยีน *ble* (bleomycin resistance gene) และ *trpF* (phosphoribosylanthranilate isomerase gene) อยู่ทางด้าน downstream (รูปที่ 3.8)

3.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ

ค่า MIC ต่อยา ertapenem, imipenem และ meropenem ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ NDM-1 อยู่ในช่วง 16-64, 4-16 และ 4-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ IMP-14a ที่มีค่า MIC 2-4, 0.25 และ 0.5-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 3.3) เชื้อทั้ง 8 ตัวอย่างไวต่อยา colistin และ

tiglyccline และมี 5 ตัวอย่างที่ไม่ผลิตเอนไซม์ ESBL ไวต่อยา aztreonam เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ NDM-1 ไวต่อ ยา amikacin ร้อยละ 100 netilmicin ร้อยละ 83.3 gentamicin ร้อยละ 50 และน้อยกว่าร้อยละ 50 ต่อ fluoroquinilones และ trimethoprim/sulfamethoxazon ทุกตัวอย่างดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams ทุก ชนิดที่ทดสอบ ส่วนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ IMP-14a พบว่า Kp-22 ไวต่อยากลุ่ม amoniglycosides และ quinolones ส่วน Kp-34 ดื้อต่อยาสองกลุ่มนี้

3.5 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ดื้อยา

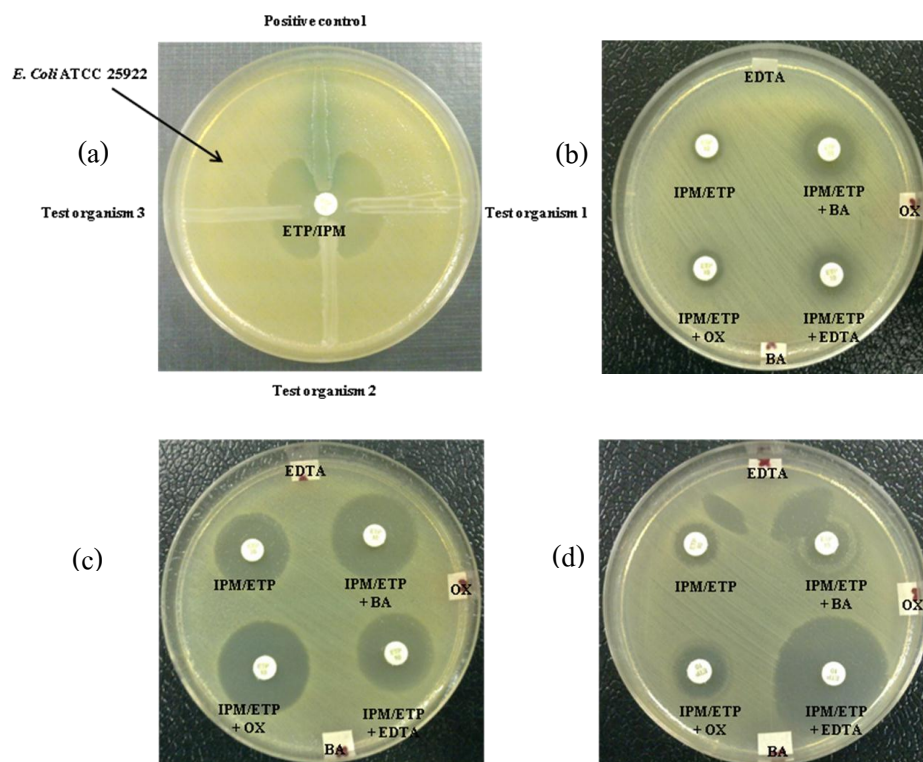
จากการทำ ERIC-PCR โดยใช้ primer ERIC2 อย่างเดียว หรือ ERIC1R คู่กับ ERIC2 ขนาดของ ชิ้นส่วน DNA อยู่ระหว่าง 100 bp ถึง 2 kb และมีจำนวน 6 ถึง 10 แถบ เมื่ออ่านผลด้วยตาเปล่าพบว่าทุก ตัวอย่างมีแถบ DNA แตกต่างกันมากกว่า 1 แถบขึ้นไป ยกเว้น *C. freundii* 2 ตัวอย่างที่ให้แถบของดีเอ็นเอ เหมือนกันทุกแถบ (รูปที่ 3.9)

ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจยืนยันการผลิตเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี modified Hodge และ combined disc และการตรวจชนิดของเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี multiplex PCR

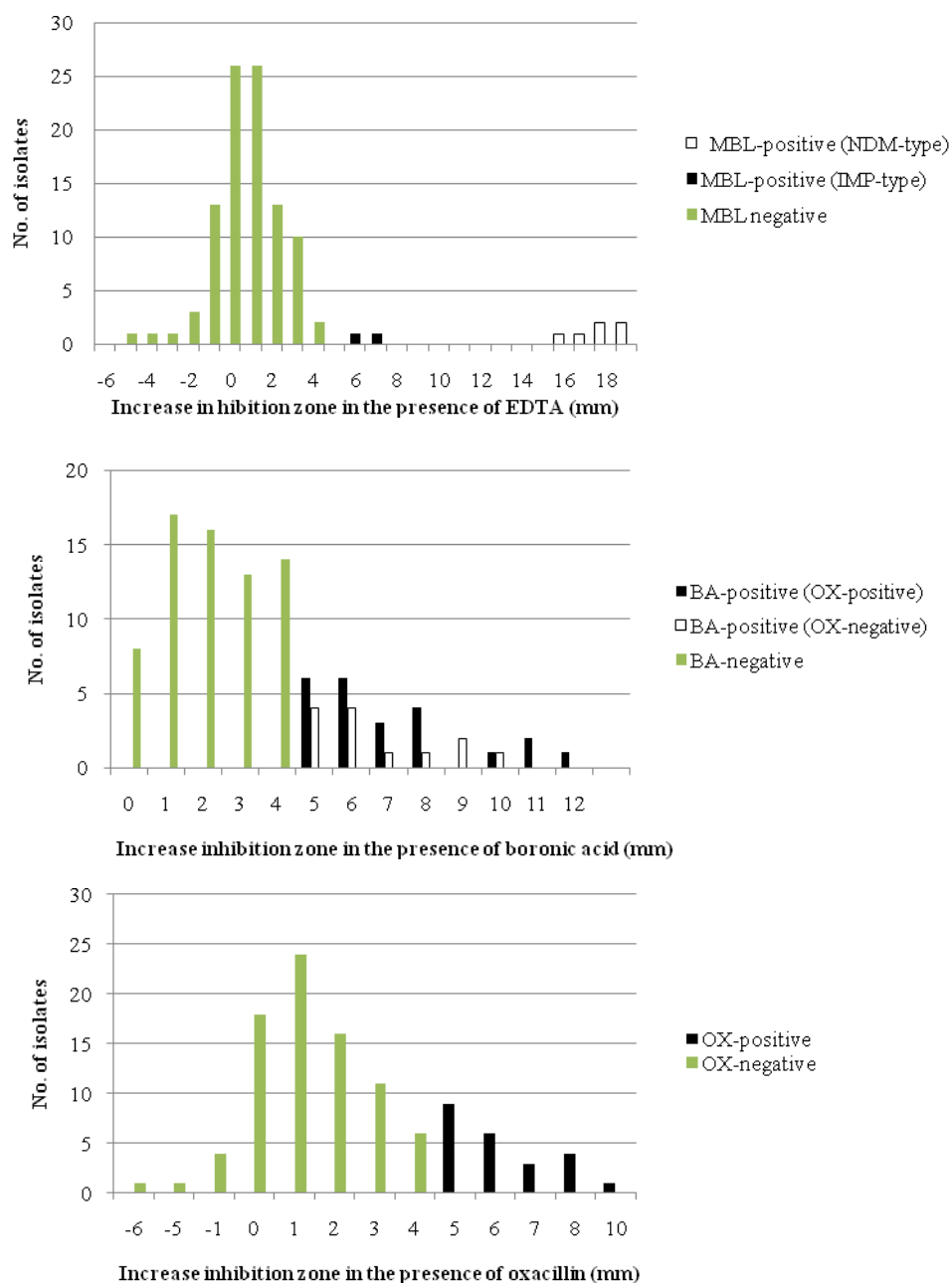
Organisms	No. isolates tested (%)	No. isolates positive by					
		Phenotypic tests ^a				Multiplex PCR ^b	
						positive with	
		MHT	PBA	OXA	EDTA	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMP}
<i>Enterobacter</i> spp.	59 (56.7)	17	31	21	-	-	-
<i>K. pneumonia</i>	12 (11.5)	4	1	-	4	2	2
<i>Klebsiella</i> spp.	12 (11.5)	-	3	1	-	-	-
<i>E. coli</i>	11 (10.6)	3	1	1	2	2	-
<i>M. morganii</i>	6 (5.8)	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i>	2 (1.9)	2	-	-	2	2	-
<i>C. diversus</i>	1 (1.0)	-	-	-	-	-	-
<i>P. rettgeri</i>	1 (1.0)	1	-	-	-	-	-
Total	104 (100)	27	36	23	8	6	2

^aPBA, phenylboronic acid-carbapenem combined disc test; EDTA, EDTA-carbapenem combined disc test; MHT, modified Hodge test; OX, oxacillin-carbapenem combined disc test.

^bTwo sets of multiplex PCR, one for *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} *bla*_{SIM-1} and the other for *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} and *bla*_{OXA-48}.



รูปที่ 3.1 การตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธีทางฟิโนไทป์ ได้แก่ วิธี modified Hodge (a), วิธี combined disc; phenylboronic acid (PBA) positive (b), PBA และ oxacillin (OX) positive (c), และ EDTA positive (d)

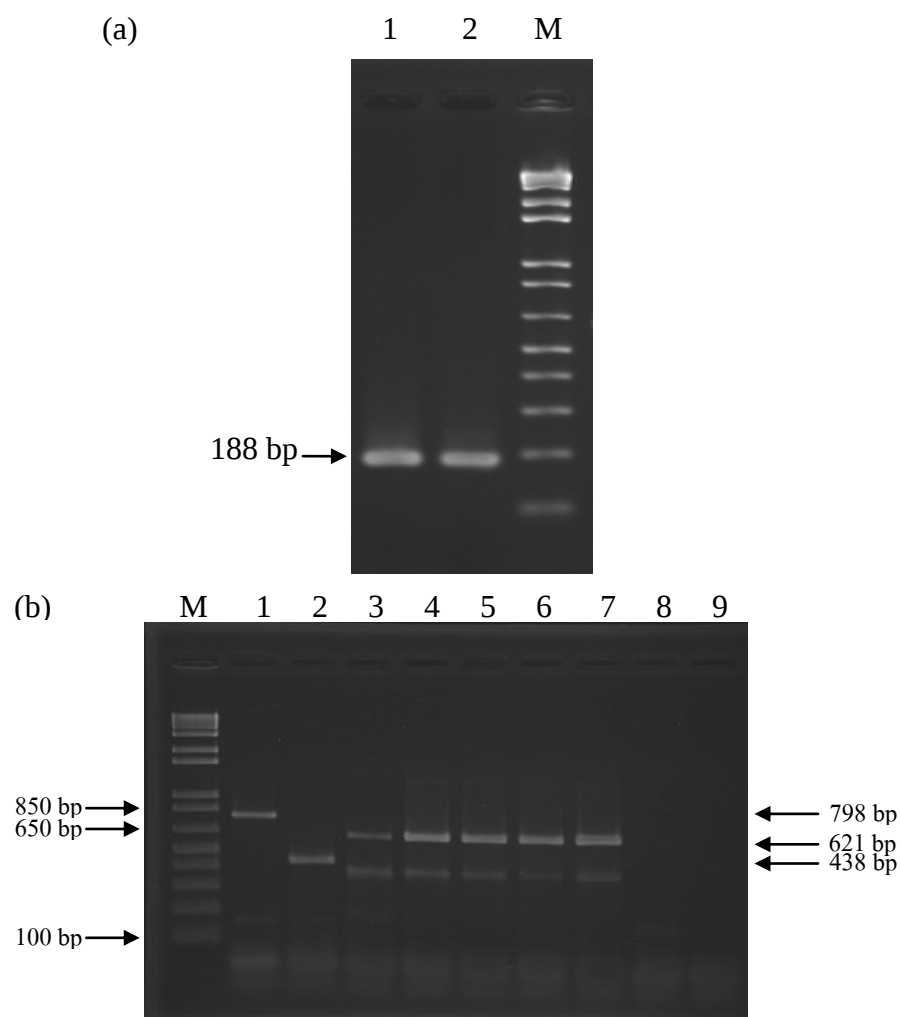


รูปที่ 3.2 การเพิ่มขึ้นของขนาด inhibition zone ของ *Enterobacteriaceae* 104 ตัวอย่างเมื่อทดสอบด้วยวิธี EDTA-, phenylboronic acid (PBA)- และ oxacillin (OX)-carbapenem combined disc

ตารางที่ 3.2 ผลการตรวจคัดกรองเอนไซม์ carbapenemase, modified Hodge, EDTA combined disc และชนิดของยีน β -lactamase ในเชื้อ 8 ตัวอย่างที่ผลิตเอนไซม์ MBL

Organisms isolate no.	Screening test (mm)		EDTA combined disc test (mm) ^a	MHT	carbapenemase genes
	ETP	IPM			
<i>K. pneumoniae</i> Kp-22	17	23	7	+	<i>bla</i> _{IMP-14a}
<i>K. pneumoniae</i> Kp-34	19	28	6	+	<i>bla</i> _{IMP-14a}
<i>C. freundii</i> Cf-55	9	18	18	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>C. freundii</i> Cf-119	10	16	19	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>K. pneumoniae</i> Kp-120	10	17	19	-	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>K. pneumoniae</i> Kp-103	12	16	16	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>E. coli</i> Ec-131	13	16	17	-	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>E. coli</i> Ec-148	13	18	18	+	<i>bla</i> _{NDM-1}

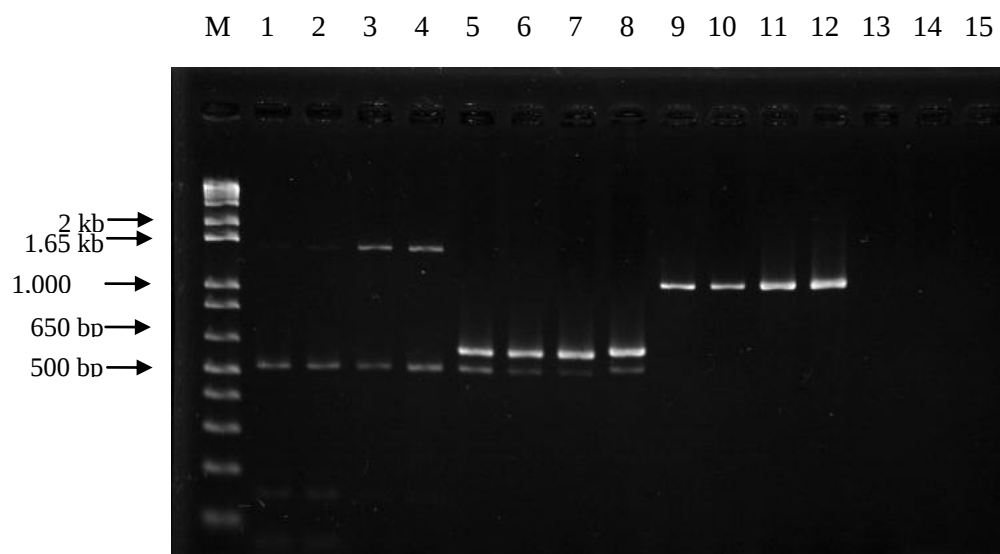
^aIncrease of inhibition zone diameters of the ertapenem disc containing 292 μ g of EDTA compared with that of the ertapenem disc alone.



รูปที่ 3.3 ผลการตรวจหายีน *bla*_{IMP} (a) และ *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} และ *bla*_{OXA-48} โดยวิธี multiplex PCR (b) จากเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae*

(a) Lanes M, 1 kb plus DNA ladder; 1 & 2, *K. pneumoniae* isolates no. 22 และ 34 ตามลำดับ

(b) Lanes M, 1 kb plus DNA ladder; 1 & 8, *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1705 ที่มียีน *bla*_{KPC} และ *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1706 ที่ไม่มียีน *bla*_{KPC} ตามลำดับ; 2, *K. pneumoniae* ที่มียีน *bla*_{OXA-48-like}; 3 ถึง 7, *C. freundii* ที่มียีน *bla*_{NDM}; 9, PCR blank



รูปที่ 3.4 ผลการตรวจหา integron ของเชื้อที่มียีน *bla*_{IMP-14a} (Kp-22 และ Kp-34) โดยใช้ไพรเมอร์ 5' CS คู่กับ 3' CS (lane 1-4), 5'CS คู่กับ IMP-R (lane 5-8) และ IMP-F คู่กับ 3'CS (lane 9-12)

Lane M, 1 kb plus DNA ladder; Lane 1, 2, 5, 6, 9 และ 10, Kp-22; 3, 4, 7, 8, 11 และ 12, Kp-34; และ 13-15, PCR blank control

IMP-14	GGCATCCAAG	CAGCAAGCGC	GTTACGCCGT	GGGTCGATGT	TTGATGTTAT	GGAGCAGCAA
Kp-22	-----	-----	-----	-GGTCGATGT	TTGATGTTAT	GGAGCAGCAA
Kp-34	-----	-----	-----	--GTCGATGT	TTGATGTTAT	GGAGCAGCAA
	61					*** 120
IMP-14	CGATGTTACG	CAGCAGGGCA	GTCGCCCTAA	AACAAAGTTA	GAAAAGGATA	AGTATGAAAA
Kp-22	CGATGTTACG	CAGCAGGGCA	GTCGCCCTAA	AACAAAGTTA	GAAAAGGATA	AGTATGAAAA
Kp-34	CGATGTTACG	CAGCAGGGCA	GTCGCCCTAA	AACAAAGTTA	GAAAAGGATA	AGTATGAAAA
	121					180
IMP-14	AATTATTTGT	TTTATGTGTA	TTCTTCTTCT	GCAACATTGC	AGTTGCAGAA	GAATCTTTGC
Kp-34	AATTATTTGT	TTTATGTGTA	TTCTTCTTCT	GCAACATTGC	AGTTGCAGAA	GAATCTTTGC
Kp-22	AATTATTTGT	TTTATGTGTA	TTCTTCTTCT	GCAACATTGC	AGTTGCAGAA	GAATCTTTGC
	181					240
IMP-14	CTGATTTAAA	AATTGAGAAG	CTTGAAGAAG	GCGTTTATGT	TCATACTTCG	TTTGAAGAAG
Kp-22	CTGATTTAAA	AATTGAGAAG	CTTGAAGAAG	GCGTTTATGT	TCATACTTCG	TTTGAAGAAG
Kp-34	CTGATTTAAA	AATTGAGAAG	CTTGAAGAAG	GCGTTTATGT	TCATACTTCG	TTTGAAGAAG
	241					300
IMP-14	TTAAAGGTTG	GAGTGTGGTC	ACTAAACACG	GTTTGGTGGT	TCTTGTGAAA	AATGACGCCT
Kp-22	TTAAAGGTTG	GAGTGTGGTC	ACTAAACACG	GTTTGGTGGT	TCTTGTGAAA	AATGACGCCT
Kp-34	TTAAAGGTTG	GAGTGTGGTC	ACTAAACACG	GTTTGGTGGT	TCTTGTGAAA	AATGACGCCT
	301					360
IMP-14	ATCTGATTGA	TACTCCAATT	ACTGCTAAAG	ATACTGAAAA	ATTAGTCAAT	TGGTTTGTTC
Kp-22	ATCTGATTGA	TACTCCAATT	ACTGCTAAAG	ATACTGAAAA	ATTAGTCAAT	TGGTTTGTTC
Kp-34	ATCTGATTGA	TACTCCAATT	ACTGCTAAAG	ATACTGAAAA	ATTAGTCAAT	TGGTTTGTTC
	361					420
IMP-14	AGCGGGGCTA	TAAAAATCAA	GGCAGTATTT	CACACATTTT	CCATGGTGAC	AGTACGGCTG
Kp-22	AGCGGGGCTA	TAAAAATCAA	GGCAGTATTT	CACACATTTT	CCATGGTGAC	AGTACGGCTG
Kp-34	AGCGGGGCTA	TAAAAATCAA	GGCAGTATTT	CACACATTTT	CCATGGTGAC	AGTACGGCTG
	421					480
IMP-14	GAATAGAGTG	GCTTAATTCT	CAATCTATCC	CCACATATGC	TTCTGAATTA	ACAAATGAAC
Kp-22	GAATAGAGTG	GCTTAATTCT	CAATCTATCC	CCACATATGC	TTCTGAATTA	ACAAATGAAC
Kp-34	GAATAGAGTG	GCTTAATTCT	CAATCTATCC	CCACATATGC	TTCTGAATTA	ACAAATGAAC
	481					540
IMP-14	TTCTTAAAAA	AGACAATAAG	GTACAAGCTA	AACACTCTTT	TAATGGGGTT	AGTTATTTCAC
Kp-22	TTCTTAAAAA	AGACAATAAG	GTACAAGCTA	AACACTCTTT	TAATGGGGTT	AGTTATTTCAC
Kp-34	TTCTTAAAAA	AGACAATAAG	GTACAAGCTA	AACACTCTTT	TAATGGGGTT	AGTTATTTCAC
	541					600
IMP-14	TAATTAAAAA	CAAAATTGAA	GTTTTTTATC	CAGGCCCAGG	GCACACTCAA	GATAACGTAG
Kp-22	TAATTAAAAA	CAAAATTGAA	GTTTTTTATC	CAGGCCCAGG	GCACACTCAA	GATAACGTAG
Kp-34	TAATTAAAAA	CAAAATTGAA	GTTTTTTATC	CAGGCCCAGG	GCACACTCAA	GATAACGTAG
	601					660
IMP-14	TGGTTTGGTT	ACCTGAAAAG	AAAATTTTAT	TCGGTGGTTG	CTTTGTGTTA	CCGGACGGTC
Kp-22	TGGTTTGGTT	ACCTGAAAAG	AAAATTTTAT	TCGGTGGTTG	CTTTGTGTTA	CCGGACGGTC
Kp-34	TGGTTTGGTT	ACCTGAAAAG	AAAATTTTAT	TCGGTGGTTG	CTTTGTGTTA	CCGGACGGTC
	661					720
IMP-14	TTGGCTATTT	GGGGGACGCA	AATTTAGAAG	CTTGGCCAAA	GTCCGCTAAA	ATATTAATGT
Kp-22	TTGGCTATTT	GGGGGACGCA	AATTTAGAAG	CTTGGCCAAA	GTCCGCTAAA	ATATTAATGT
Kp-34	TTGGCTATTT	GGGGGACGCA	AATTTAGAAG	CTTGGCCAAA	GTCCGCTAAA	ATATTAATGT
	721					780
IMP-14	CTAAATATGG	TAAAGCAAAA	CTAGTTGTGT	CGAGTCATAG	TGATATTGGA	GATGTATCAC
Kp-22	CTAAATATGG	TAAAGCAAAA	CTAGTTGTGT	CGAGTCATAG	TGATATTGGA	GATGTATCAC
Kp-34	CTAAATATGG	TAAAGCAAAA	CTAGTTGTGT	CGAGTCATAG	TGATATTGGA	GATGTATCAC
	781					840
IMP-14	TCTTGAAACG	TACATGGGAG	CAGGCTGTTA	AAGGGCTGAA	TGAAAGTAAA	AAATCATCAC
Kp-22	TCTTGAAACG	TACATGGGAG	CAGGCTGTTA	AAGGGCTGAA	TGAAAGTAAA	AAATCATCAC
Kp-34	TCTTGAAACG	TACATGGGAG	CAGGCTGTTA	AAGGGCTGAA	TGAAAGTAAA	AAATCATCAC

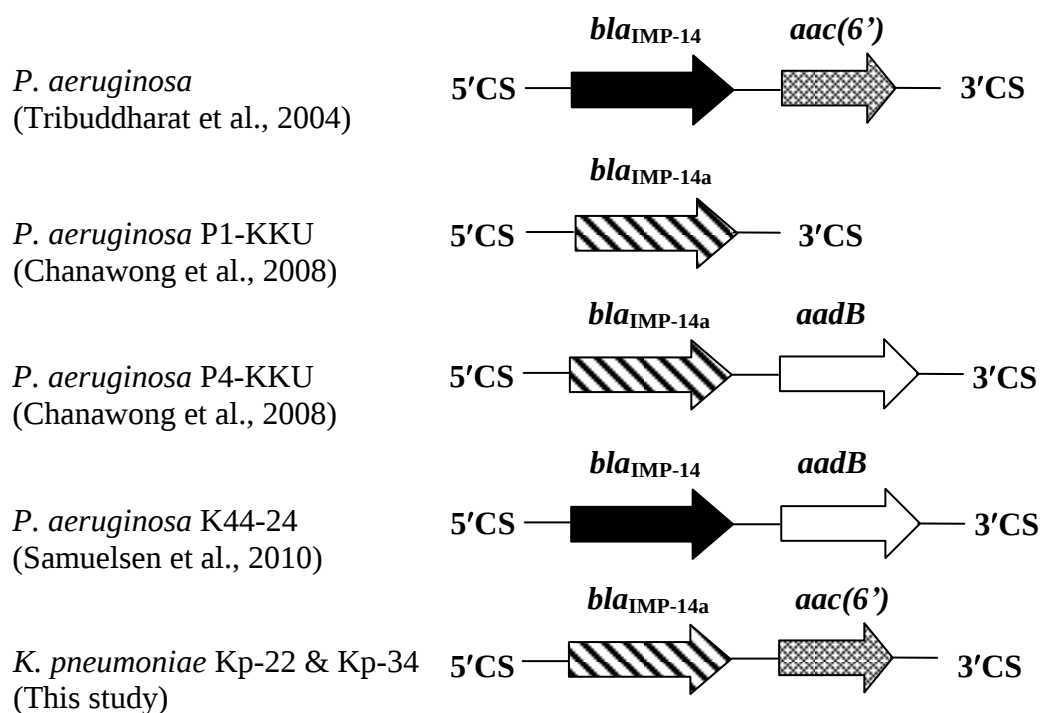
รูปที่ 3.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla*_{IMP-14a} และ integron จาก *K. pneumoniae* isolates Kp-22 และ Kp-34 เปรียบเทียบกับของยีน *bla*_{IMP-14} ซึ่งรายงานโดย Tribuddharat และคณะ (2004) (GenBank accession no. AY553332)

*แสดง start codon และ stop codon; แรเงาแสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla*_{IMP-14a} ที่ต่างจาก *bla*_{IMP-14}

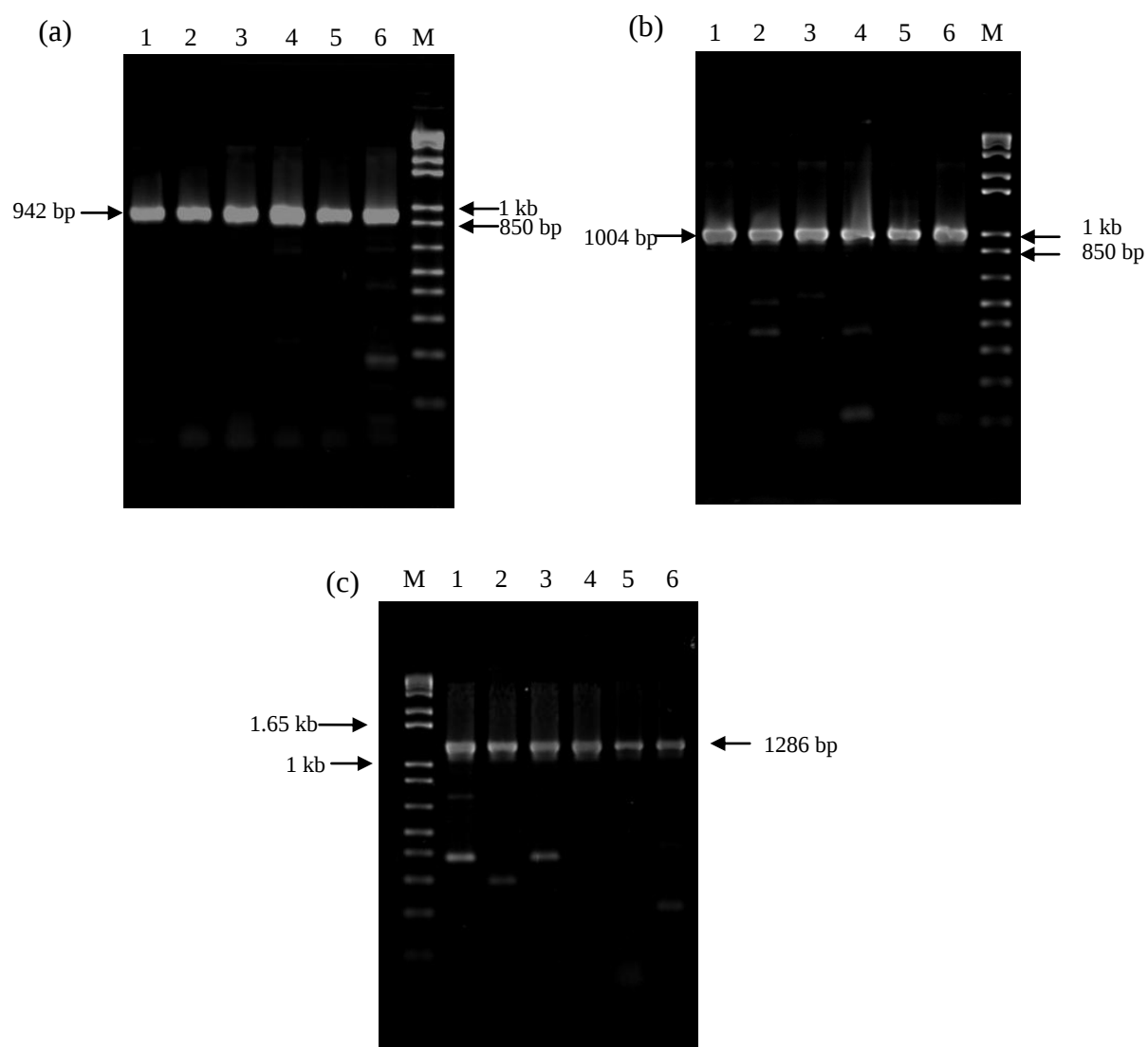
	841	***				900
IMP-14	AGCCAAGCGA	CTAAATTTCT	AACAAGGCGC	TTCAGCACCG	CGCACTTCGT	GCGCTCGACA
Kp-22	AGCCAAGCGA	CTAAATTTCT	AACAAGGCGC	TTCAGCACCG	CGCACTTCGT	GCGCTCGACA
Kp-34	AGCCAAGCGA	CTAAATTTCT	AACAAGGCGC	TTCAGCACCG	CGCACTTCGT	GCGCTCGACA
	901					960
IMP-14	GTTCGTAAGC	CGCTTTTTTG	TGGTTTTGCT	ACGCAAAAGG	TTTCCACAAA	AAATCAACTT
Kp-22	GTTCGTAAGC	CGCTTTTTTG	TGGTTTTGCT	ACGCAAAAGG	TTTCCACAAA	AAATCAACTT
Kp-34	GTTCGTAAGC	CGCTTTTTTG	TGGTTTTGCT	ACGCAAAAGG	TTTCCACAAA	AAATCAACTT
	961					1020
IMP-14	ACAAACTGCG	GCTGAGCTTA	ACGTTAGAAG	GCCCAGGCTA	TGCAGTACTC	CATTGCGTCG
Kp-22	ACAAACTGCG	GCTGAGCTTA	ACGTTAGAAG	GCCCAGGCTA	TGCAGTACTC	CATTGCGTCG
Kp-34	ACAAACTGCG	GCTGAGCTTA	ACGTTAGAAG	GCCCAGGCTA	TGCAGTACTC	CATTGCGTCG
	1021					1080
IMP-14	GTTTCGTGTTT	CGGATACATC	TGATTGGTTA	CGCCTTCGCA	ATCTCCTGTG	GGAAGGGGAT
Kp-22	GTTTCGTGTTT	CGGATACATC	TGATTGGTTA	CGCCTTCGCA	ATCTCCTGTG	GGAAGGGGAT
Kp-34	GTTTCGTGTTT	CGGATACATC	TGATTGGTTA	CGCCTTCGCA	ATCTCCTGTG	GGAAGGGGAT
	1081					1140
IMP-14	GACCACGAAA	CCGAGATCGC	CCAGTTTTTC	GCCGGAGCCC	TGGCCGAGCC	CAACGAAGTG
Kp-22	GACCACGAAA	CCGAGATCGC	CCAGTTTTTC	GCCGGAGCCC	TGGCCGAGCC	CAACGAAGTG
Kp-34	GACCACGAAA	CCGAGATCGC	CCAGTTTTTC	GCCGGAGCCC	TGGCCGAGCC	CAACGAAGTG
	1141					1200
IMP-14	CTGGTAGCCC	ATGATGATGC	GGGGGCCGTT	GTTGGGCATG	TCGAGTTATC	CATCCGCGAG
Kp-22	CTGGTAGCCC	ATGATGATGC	GGGGGCCGTT	GTTGGGCATG	TCGAGTTATC	CATCCGCGAG
Kp-34	CTGGTAGCCC	ATGATGATGC	GGGGGCCGTT	GTTGGGCATG	TCGAGTTATC	CATCCGCGAG
	1201					1260
IMP-14	GATGTGCGAG	GGCTGGAGGG	CATCAGAGCG	GGCTATATCG	AAGGCCTGTA	CATCGAGGAG
Kp-22	GATGTGCGAG	GGCTGGAGGG	CATCAGAGCG	GGCTATATCG	AAGGCCTGTA	CATCGAGGAG
Kp-34	GATGTGCGAG	GGCTGGAGGG	CATCAGAGCG	GGCTATATCG	AAGGCCTGTA	CATCGAGGAG
	1261					1320
IMP-14	GCCCATCGCT	CGTCCAGCGT	CGCGACGCG	TTACTACGGC	ACTCCGAGCA	ATGGGCCCAA
Kp-22	GCCCATCGCT	CGTCCAGCGT	CGCGACGCG	TTACTACGGC	ACTCCGAGCA	ATGGGCCCAA
Kp-34	GCCCATCGCT	CGTCCAGCGT	CGCGACGCG	TTACTACGGC	ACTCCGAGCA	ATGGGCCCAA
	1321					1380
IMP-14	AGTCAGGGAT	GCCGGGCGTT	TGCATCGGAT	CGAGAGGATC	GCCTGATCAT	CCATAAGCGG
Kp-22	AGTCAGGGAT	GCCGGGCGTT	TGCATCGGAT	CGAGAGGATC	GCCTGATCAT	CCATAAGCGG
Kp-34	AGTCAGGGAT	GCCGGGCGTT	TGCATCGGAT	CGAGAGGATC	GCCTGATCAT	CCATAAGCGG
	1381					1440
IMP-14	TTTTCTGTGA	GTCCGCTTTC	TAACCCCTTCA	TTCCAGCGGA	CCGCCTTCGG	CGGCCGCTGA
Kp-22	TTTTCTGTGA	GTCCGCTTTC	TAACCCCTTCA	TTCCAGCGGA	CCGCCTTCGG	CGGCCGCTGA
Kp-34	TTTTCTGTGA	GTCCGCTTTC	TAACCCCTTCA	TTCCAGCGGA	CCGCCTTCGG	CGGCCGCTGA
	1441					1500
IMP-14	ATTTGAACGT	TAGATGCACT	AAGCACATAA	TTGCTCACAG	CCAAACTATC	AGGTCAAGTC
Kp-22	ATTTGAACGT	TAGATGCACT	AAGCACATAA	TTGCTCACAG	C-----	-----
Kp-34	ATTTGAACGT	TAGATGCACT	AAGCACATA-	-----	-----	-----
IMP-14	TGCTT	1505				
Kp-34	----					
Kp-22	----					

รูปที่ 3.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla*_{IMP-14a} และ integron จาก *K. pneumoniae* isolates Kp-22 และ Kp-34 เปรียบเทียบกับของยีน *bla*_{IMP-14} ซึ่งรายงานโดย Tribuddharat และคณะ (2004) (GenBank accession no. AY553332) (ต่อ)

*แสดง start codon และ stop codon; แรเงาแสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla*_{IMP-14a} ที่ต่างจาก *bla*_{IMP-14}



รูปที่ 3.6 ยีน *bla*_{IMP-14a} และ integron จาก *K. pneumoniae* isolates Kp-22 และ Kp-34 เปรียบเทียบกับยีน *bla*_{IMP-14} และ integron ของ *P. aeruginosa* จากโรงพยาบาลศิริราช (GenBank accession no. AY553332) และ *P. aeruginosa* จากประเทศไทยไปประเทศนอร์เวย์ (31) และยีน *bla*_{IMP-14-a} และ integron ของ *P. aeruginosa* จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ (GenBank accession no. FJ267651)



รูปที่ 3.7 ผลการตรวจหายีนบริเวณรอบข้างของเชื้อที่มียีน *bla*_{NDM-1} จำนวน 6 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ IS125D-F คู่กับ NDM-R (a), NDM-F คู่กับ Ble-R (b) และ NDM-F คู่กับ TrpF-R

Lane M, 1 kb plus DNA ladder; 1, Cf-55; 2, Kp-103; 3, Cf-119; 4, Kp-120; 5, Ec-131; 6, Ec148

	961					1020
NDM-1 (DVR22)	TCACTGAATA	CTCGTCCTAG	AAAGGCGTTA	GATTGGCTTA	CACCATTAGA	GAAATTTGCT
Ec-148	-----	-----	-----	-----	-----	-----TTGCT
	1021					1080
NDM-1 (DVR22)	CAGCTTGTG	ATTATCATAT	GGCTTTTGAA	ACTGTGCGAC	CTCATGTTTG	AATTGCGCCC
Ec-148	CAGCTTGTG	ATTATCATAT	GGCTTTTGAA	ACTGTGCGAC	CTCATGTTTG	AATTGCGCCC
	1081					1140
NDM-1 (DVR22)	ATATTTTTCG	TACAGTGAAC	CAAATTAAGA	TCATCTATTT	ACTAGGCCTC	GCATTTGCGG
Ec-148	ATATTTTTCG	TACAGTGAAC	CAAATTAAGA	TCATCTATTT	ACTAGGCCTC	GCATTTGCGG
	1141			***		1200
NDM-1 (DVR22)	GGTTTTTAAT	GCTGAATAAA	AGGAAAACCT	GATGGAATTG	CCCAATATTA	TGCACCCGGT
Ec-148	GGTTTTTAAT	GCTGAATAAA	AGGAAAACCT	GATGGAATTG	CCCAATATTA	TGCACCCGGT
	1201					1260
NDM-1 (DVR22)	CGCGAAGCTG	AGCACCAGCAT	TAGCCGCTGC	ATTGATGCTG	AGCGGGTGCA	TGCCCGGTGA
Ec-148	CGCGAAGCTG	AGCACCAGCAT	TAGCCGCTGC	ATTGATGCTG	AGCGGGTGCA	TGCCCGGTGA
	1261					1320
NDM-1 (DVR22)	AATCCGCCCC	ACGATTGGCC	AGCAAATGGA	AACTGGCGAC	CAACGGTTTG	GCGATCTGGT
Ec-148	AATCCGCCCC	ACGATTGGCC	AGCAAATGGA	AACTGGCGAC	CAACGGTTTG	GCGATCTGGT
	1321					1380
NDM-1 (DVR22)	TTTCCGCCAG	CTCGCACCAG	ATGTCTGGCA	GCACACTTCC	TATCTCGACA	TGCCGGGTTT
Ec-148	TTTCCGCCAG	CTCGCACCAG	ATGTCTGGCA	GCACACTTCC	TATCTCGACA	TGCCGGGTTT
	1381					1440
NDM-1 (DVR22)	CGGGGCAGTC	GCTTCCAACG	GTTTGATCGT	CAGGGATGGC	GGCCGCGTGC	TGGTGGTCGA
Ec-148	CGGGGCAGTC	GCTTCCAACG	GTTTGATCGT	CAGGGATGGC	GGCCGCGTGC	TGGTGGTCGA
	1441					1500
NDM-1 (DVR22)	TACCGCCTGG	ACCGATGACC	AGACCGCCCA	GATCCTCAAC	TGGATCAAGC	AGGAGATCAA
Ec-148	TACCGCCTGG	ACCGATGACC	AGACCGCCCA	GATCCTCAAC	TGGATCAAGC	AGGAGATCAA
	1501					1560
NDM-1 (DVR22)	CCTGCCGGTC	GCGCTGGCGG	TGGTGACTCA	CGCGCATCAG	GACAAGATGG	GCGGTATGGA
Ec-148	CCTGCCGGTC	GCGCTGGCGG	TGGTGACTCA	CGCGCATCAG	GACAAGATGG	GCGGTATGGA
	1561					1620
NDM-1 (DVR22)	CGCGCTGCAT	GCGGCGGGGA	TTGCGACTTA	TGCCAATGCG	TTGTGCAACC	AGCTTGCCCC
Ec-148	CGCGCTGCAT	GCGGCGGGGA	TTGCGACTTA	TGCCAATGCG	TTGTGCAACC	AGCTTGCCCC
	1621					1680
NDM-1 (DVR22)	GCAAGAGGGG	ATGGTTGCGG	CGCAACACAG	CCTGACTTTC	GCCGCCAATG	GCTGGGTCTGA
Ec-148	GCAAGAGGGG	ATGGTTGCGG	CGCAACACAG	CCTGACTTTC	GCCGCCAATG	GCTGGGTCTGA
	1681					1740
NDM-1 (DVR22)	ACCAGCAACC	GCGCCCAACT	TTGGCCCGCT	CAAGGTATTT	TACCCCGGCC	CCGGCCACAC
Ec-148	ACCAGCAACC	GCGCCCAACT	TTGGCCCGCT	CAAGGTATTT	TACCCCGGCC	CCGGCCACAC
	1741					1800
NDM-1 (DVR22)	CAGTGACAAT	ATCACCCTTG	GGATCGACGG	CACCGACATC	GCTTTTGGTG	GCTGCCTGAT
Ec-148	CAGTGACAAT	ATCACCCTTG	GGATCGACGG	CACCGACATC	GCTTTTGGTG	GCTGCCTGAT
	1801					1860
NDM-1 (DVR22)	CAAGGACAGC	AAGGCCAAGT	CGCTCGGCAA	TCTCGGTGAT	GCCGACACTG	AGCACTACGC
Ec-148	CAAGGACAGC	AAGGCCAAGT	CGCTCGGCAA	TCTCGGTGAT	GCCGACACTG	AGCACTACGC
	1861					1920
NDM-1 (DVR22)	CGCGTCAGCG	CGCGCGTTTG	GTGCGGCGTT	CCCCAAGGCC	AGCATGATCG	TGATGAGCCA
Ec-148	CGCGTCAGCG	CGCGCGTTTG	GTGCGGCGTT	CCCCAAGGCC	AGCATGATCG	TGATGAGCCA
	1921					1980
NDM-1 (DVR22)	TTCCGCCCCC	GATAGCCGCG	CCGCAATCAC	TCATACGGCC	CGCATGGCCG	ACAAGCTGCG
Ec-148	TTCCGCCCCC	GATAGCCGCG	CCGCAATCAC	TCATACGGCC	CGCATGGCCG	ACAAGCTGCG
	1981					2040

NDM-1 (DVR22)	CTGAGCCATG	GCTGACCACG	TCACCCCAAA	TCTGCCATCG	CGCGATTTTC	ATGTGACAGA
Ec-148	CTGAGCCATG	GCTGACCACG	TCACCCCAAA	TCTGCCATCG	CGCGATTTTC	ATGTGACAGA
	2041					2100
NDM-1 (DVR22)	GGCGTTTTAT	GCGAAGCTGG	GCTTTGCGAC	GAGTTGGAAG	GATCGCGGCT	GGATGATCCT
Ec-148	GGCGTTTTAT	GCGAAGCTGG	GCTTTGCGAC	GAGTTGGAAG	GATCGCGGCT	GGATGATCCT
	2101					2160
NDM-1 (DVR22)	GCAGCGCGGC	GGTTTGACGC	TCGAATTCTT	CCCCTATCCT	GACCTCGACC	CAGCTACGAG
Ec-148	GCAGCGCGGC	GGTTTGACGC	TCGAATTCTT	CCCCTATCCT	GACCTCGACC	CAGCTACGAG
	2161					2220
NDM-1 (DVR22)	CTCGTTCGGC	TGTTGCCTGC	GGTTGGATGA	TCTCGATGCC	ATGGTGGCAT	TGGTGAACGC
Ec-148	CTCGTTCGGC	TGTTGCCTGC	GGTTGGATGA	TCTCGATGCC	ATGGTGGCAT	TGGTGAACGC

รูปที่ 3.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla*_{NDM-1} จาก *E. coli* isolates Ec-148 เปรียบเทียบกับของยีน *bla*_{NDM-1} ซึ่งรายงานโดย Sole และคณะ (2011) (GenBank accession no. JF922606)

*แสดง start codon และ stop codon

	2221					2280
NDM-1 (DVR22)	GGCGGGAGCC	GAGGAAAAAA	GCACCGGCTG	GCCGCGCTTC	AAAGCTCCGC	AACTGGAGGC
Ec-148	GGCGGGAGCC	GAGGAAAAAA	GCACCGGCTG	GCCGCGCTTC	AAAGCTCCGC	AACTGGAGGC
	2281					2340
NDM-1 (DVR22)	GAGCGGCCTG	AGGATCGGCT	ACCTGATCGA	TCCCGACTGC	ACGCTGGTGC	GGCTGATCCA
Ec-148	GAGCGGCCTG	AGGATCGGCT	ACCTGATCGA	TCCCGACTGC	ACGCTGGTGC	GGCTGATCCA
	2341					2400
NDM-1 (DVR22)	GAACCCCGAC	TGACCGCATG	CCCGCGAAAA	TCAAGATTTG	CGGGATCAGC	ACACCCGAGG
Ec-148	GAACCCCGAC	TGACCGCATG	CCCGCGAAAA	TCAAGATTTG	CGGGATCAGC	ACACCCGAGG
	2401					2460
NDM-1 (DVR22)	CGCTCGATGC	GACCATCGCG	GCGCGGGCGG	ACTATGCCGG	GTTGGTGTTC	TATCCAGCGT
Ec-148	CGCTCGATGC	GACCATCGCG	GCGCGGGCGG	ACTATGCCGG	GTTGGTGTTC	TATCCAGCGT
	2461					2520
NDM-1 (DVR22)	CGCCCCGTGC	GGTTACGTCG	AATGTCGCGG	GCGCTTTGAC	ATCGCGCGCA	GCTGGCCAGA
Ec-148	CGCCCCGTGC	GGTTACGTCG	AATGTCGCGG	GCGCTTTGAC	ATCGCGCGCA	GCTGGCCAGA
	2521					2580
NDM-1 (DVR22)	TCGCCATGGT	CGGTTTGTTC	GTCGATGCGG	ATGATGCTGT	CATCGCCGAC	GCACTGGTGG
Ec-148	TCGCCATGGT	CGGTTTGTTC	GTCGAT----	-----	-----	-----

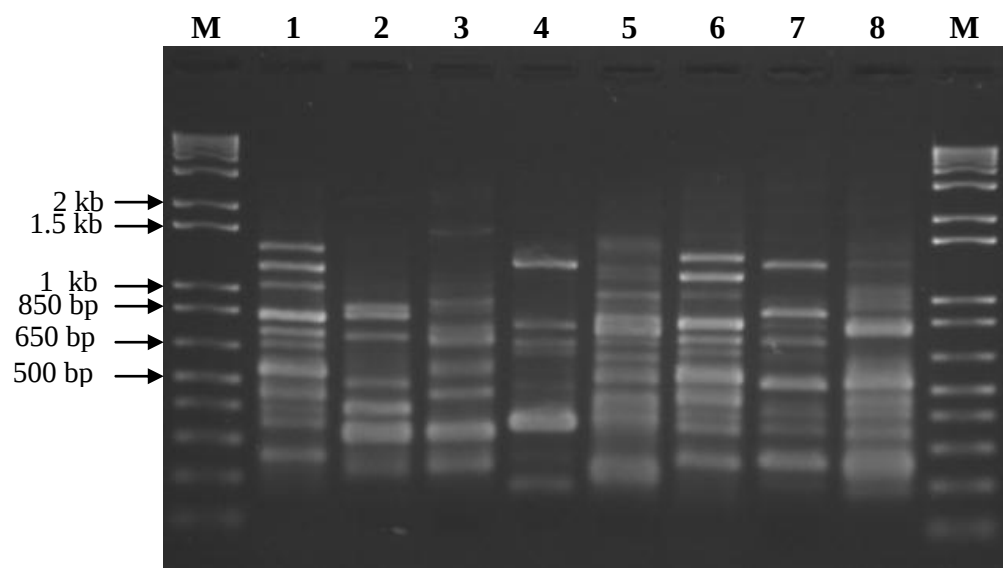
รูปที่ 3.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla*_{NDM-1} จาก *E. coli* isolates Ec-148 เปรียบเทียบกับของยีน *bla*_{NDM-1} ซึ่งรายงานโดย Sole และคณะ (2011) (GenBank accession no. JF922606) (ต่อ)

*แสดง start codon และ stop codon

ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL

Organisms isolate no.	Carbapenemase genes	MICs (mg/L)			Antimicrobial susceptibility by disk diffusion test											
		ETP	IPM	MEM	ATM	AK	CN	NET	NA	OFX	NFX	CIP	LEV	SXT	CT	TGC
<i>K. pneumoniae</i> Kp-22	<i>bla_{IMP-14a}</i>	2	0.25	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>K. pneumoniae</i> Kp-34	<i>bla_{IMP-14a}</i>	4	0.25	0.5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>C. freundii</i> Cf-55	<i>bla_{NDM-1}</i>	64	8	8	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>C. freundii</i> Cf-119	<i>bla_{NDM-1}</i>	64	8	8	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>K. pneumoniae</i> Kp-120	<i>bla_{NDM-1}</i>	16	4	4	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>K. pneumoniae</i> Kp-103	<i>bla_{NDM-1}</i>	32	8	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> Ec-131	<i>bla_{NDM-1}</i>	16	4	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> Ec-148	<i>bla_{NDM-1}</i>	16	4	4	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S

AK, 30-μg amikacin; ATM, 30-μg aztreonam; CIP, 5-μg ciprofloxacin; CN, 10-μg gentamicin; CT, 10-μg colistin; ETP, 10-μg ertapenem; IPM, 10-μg imipenem; LEV, 5-μg levofloxacin; MEM, 10-μg meropenem; NA, 30-μg nalidixic acid; NET, 30-μg netilmicin; NFX, 10-μg norfloxacin; OFX, 5-μg ofloxacin; SXT, 1.25/23.75-μg trimethoprim/sulfamethoxazole; TGC, 15-μg tigecycline.



รูปที่ 3.9 DNA fingerprint ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL จำนวน 8 ตัวอย่างโดยเทคนิค ERIC-PCR

Lane M, 1 kb plus DNA ladder; 1 & 6, *C. freundii* isolates no. 55 และ 119 ตามลำดับ; 2 & 3, *E. coli* isolates no. 131 และ 148 ตามลำดับ; 4, 5, 6, 7 & 8, *K. pneumoniae* isolates no. 103, 120, 22 และ 34 ตามลำดับ