

1. บทนำ (Introduction)

ในปัจจุบันนี้มีสถานการณ์การเกิดโรคติดเชื้อต่าง ๆ มากมายทั่วโลก และที่สำคัญยิ่งไปกว่านั้นก็คือเชื้อก่อโรคต่าง ๆ เหล่านี้ก็ได้สร้างปัญหาที่สำคัญมากคือปัญหาการดื้อยาซึ่งได้เพิ่มสูงขึ้นโดยเกิดจากการที่เชื่อมีการพัฒนาการดื้อต่อยาเพิ่มขึ้นอยู่เสมอ มีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ การดื้อยาอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของเชื่อนั้นๆ หรืออาจเกิดภายใต้ความกดดันของการใช้ยาต้านจุลชีพ (selective pressure) สำหรับสถานการณ์เชื้อก่อโรคที่ดื้อยาในประเทศไทยนั้นพบว่าขณะนี้เชื้อแบคทีเรียหลายสปีชีส์มีการดื้อยาแบบหลายชนิด (multidrug resistance, MDR) และบางสปีชีส์ดื้อยาทุกชนิด ทำให้ปัจจุบันพบโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ เชื้อแบคทีเรียดื้อยาเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งนับวันจะมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ซึ่งส่งผลทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาและอัตราการตายสูงขึ้น

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสและเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคได้ในทุกระบบของร่างกาย ผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลจะมีการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ง่ายและรุนแรง โดยที่เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้น ตามเครื่องมือแพทย์ หรือเครื่องช่วยหายใจ คนที่เกิดการติดเชื้อง่ายได้แก่ผู้ป่วยที่มีแผลอักเสบ แผลไฟไหม้ การติดเชื้อที่ตา ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเนื่องจากสูงอายุหรือได้รับยากดภูมิคุ้มกัน การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลเป็นปัญหาที่พบบ่อยใน Intensive Care Unit (ICU) เนื่องจาก ICU เป็นที่รวมของผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและมีความไวต่อการติดเชื้อ ทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยในโรงพยาบาลสูง การรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นก็จะใช้ยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์กว้างและหลายชนิดร่วมกันในการรักษาเช่น beta-lactams, aminoglycosides และ quinolones ฯลฯ อย่างไรก็ตามเชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบในโรงพยาบาลเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (MDR *P. aeruginosa*) ทำให้การรักษาไม่ได้ผล ในปัจจุบันยาที่จะใช้รักษาการติดเชื้อ MDR *P. aeruginosa* มีไม่มากนัก ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการตายสูง ข้อมูลจากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand: NARST) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระบุว่า เชื้อ *P. aeruginosa* มีการดื้อยาสูงขึ้น ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด

การดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียอาจเกิดขึ้นได้โดย (1). แบบธรรมชาติ (natural หรือ intrinsic resistance) เป็นผลจากคุณสมบัติของเชื้อที่มีอยู่แต่กำเนิดและสามารถถ่ายทอดไปสู่เซลล์รุ่นลูก จึงมีแบบแผนการดื้อยาที่ค่อนข้างแน่นอนสำหรับเชื้อกลุ่มเดียวกัน และ (2). เกิดขึ้นภายหลัง (acquired resistance) เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือสรีรวิทยาของเซลล์ภายหลังการกำเนิดเซลล์ เช่น การกลายพันธุ์ หรือได้รับยีนดื้อยาจากภายนอก เชื้อ MDR *P. aeruginosa* มีกลไกในการดื้อยาหลายกลไกทั้งในแบบ intrinsic และ acquired resistance การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ MDR *P.*

aeruginosa ในโรงพยาบาลทำได้ยากเนื่องจากยีนดื้อยามักพบอยู่บน mobile genetic element ทำให้ความสามารถในการดื้อยาแพร่กระจายไปยังเชื้ออื่นๆ ได้เร็ว ความรู้ในด้านยีนดื้อยาในเชื้อ MDR *P. aeruginosa* และการถ่ายทอดยีนดื้อยา อาจทำให้มีการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ MDR *P. aeruginosa* ได้ดียิ่งขึ้น และอาจส่งผลให้อัตราการตายจากเชื้อ MDR *P. aeruginosa* ลดลงได้

การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาพบอุบัติการณ์และความชุกของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 (20-35%) และ ยา imipenem (15%) ใน ICU โดยตัวเลขนี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงปี ค.ศ.1989-1997 สำหรับการดื้อยากลุ่ม fluoroquinolone (ciprofloxacin และ ofloxacin) พบว่ามีอัตราการดื้อยาสูงขึ้นจากที่ 4% ในปีค.ศ. 1989 ถึงประมาณ 15% ในปีค.ศ.1997 ทั้งในและนอก ICU ในปัจจุบันนี้ยากลุ่มสุดท้ายของการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *P. aeruginosa* คือยากลุ่ม carbapenems ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ดีเป็นเหตุให้มีการใช้ที่สูงมาก จึงทำให้ขณะนี้เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาเหล่านี้เพิ่มสูงขึ้น โดยได้มีการรายงานการพบเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem 21% จาก ICU ในประเทศสหรัฐอเมริกา ในช่วงปี ค.ศ. 1998-2002 และต่อมาในปี ค.ศ. 2003 ก็ได้เพิ่มขึ้นเป็น 24.3% (NNIS, 2004) สำหรับในช่วงปี ค.ศ. 2006-2007 ก็พบว่าการดื้อยา carbapenem ของเชื้อ *P. aeruginosa* เพิ่มขึ้นเป็น 25%

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย โดยการศึกษาการติดเชื้อในโรงพยาบาลศิริราชในระหว่างปี ค.ศ.1983-1986 พบความชุกจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ระหว่าง 22-31% โดยเป็นอันดับหนึ่งของการติดเชื้อทั้งหมด (Danchavijitr and Waitayapiches, 1988) ต่อมาได้มีการศึกษาการติดเชื้อใน ICU ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ศิริราช และรามธิบดี ในปี ค.ศ.1991-1992 เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าการติดเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นอันดับสอง คือ 22% ของการติดเชื้อแกรมลบทั้งหมด ในปี ค.ศ.1998-1999 ก็ได้มีการรายงานถึงความชุกของการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ว่าเป็นอันดับหนึ่งคือ 27% ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (Jayanetra et al.,1994) สำหรับการรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งการศึกษาของโรงพยาบาลโรคตรวอกในปี ค.ศ.1997 พบ MDR *P. aeruginosa* ถึง 15-38% (นลินี และคณะ, 2547) และจากการรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ ในช่วงปี ค.ศ. 2000-2005 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบมากเป็นอันดับสอง (11-12%) และในปี ค.ศ. 2006-2008 ก็ถูกรายงานว่าพบมากเป็นอันดับสาม (10-11%) (NARST, 2009)

การศึกษาความไวของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อยาต้านจุลชีพในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย พบว่ามีแนวโน้มการดื้อยาหลายชนิดเพิ่มขึ้น และมีการดื้อยาในระดับสูงอีกด้วย เชื้อแบคทีเรียที่เคยไวต่อยาแล้วเกิดการดื้อยาในภายหลังนั้น อาจเกิดมาจากการกลายพันธุ์ (mutation) หรือเกิดจากเชื้อได้รับยีนดื้อยา ซึ่งถ่ายทอดจากเชื้อที่ดื้อยาอยู่ก่อนแล้ว โดยกระบวนการ horizontal gene transfer เนื่องจากยีนดื้อยาหลายชนิดมักพบอยู่บน genetic elements ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่ที่พบบ่อยคือยีนดื้อยาเหล่านี้มักจะสอดแทรกใน gene cassette ที่อยู่บน class 1 integron และ integron

มักพบอยู่บน plasmid หรือ transposon จึงทำให้สามารถที่จะพายีนดื้อยาเคลื่อนที่ไปได้ ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยาเหล่านี้ไปยังแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์กันก็ได้ ซึ่ง integron จัดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการแพร่กระจายของยีนดื้อยา ทำให้สามารถที่จะถ่ายทอดยีนดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว

Integrations ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1995 โดย Hall และ Collis พบมากในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็น nosocomial pathogen ซึ่งพบได้ทั่วโลก ซึ่ง integrons จัดเป็น genetic elements ที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถ recruit และรวมส่วนของ gene cassettes เข้าไปแทรกในส่วนของ operon โดยใช้กลไก site-specific recombination (Hall and Collis, 1995) โดย integron นี้อาจพบอยู่บน transposon หรือ conjugative plasmid ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพสามารถแพร่กระจายได้ง่ายและมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันนี้สามารถแบ่ง integrons ออกได้เป็น 8 class (Whittle and Salyers, 2002) โดยแบ่งตามความแตกต่างของลำดับเบสของ integrase gene ที่จะได้เป็นชนิดของเอนไซม์ integrase ที่ต่างกันของแต่ละ class ด้วย โดยเฉพาะ class 1, 2, 3 เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับ gene cassettes ที่มีการดื้อยา (antibiotic resistance)

ในส่วนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในคนนั้นมักจะพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มของ beta-lactam อยู่ใน gene cassette ที่จะแทรกอยู่ใน class 1 integron ซึ่ง class 1 integron นั้นได้ถูกรายงานว่าพบในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดประกอบด้วย *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* และ *Vibrio* ส่วน class 2 integron นั้นมักจะพบอยู่ใน Tn7 family ของ transposons โดยที่ class 2 integron ได้มีการพบในเชื้อ *Acinetobacter*, *Shigella* และ *Salmonella* ส่วน gene cassette ที่มักพบเจอบ่อยๆ ใน class 2 integron นี้ก็คือ *aadA1*, *dfrA1* และ *sat* สำหรับ class 3 integron นั้นได้มีการรายงานการพบในเชื้อ *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas putida* และ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Fluit and Schmitz, 2004) อย่างไรก็ตาม integron ที่มีบทบาทมากในเรื่องการดื้อยาได้แก่ class 1 integron ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (ภาพ 1)

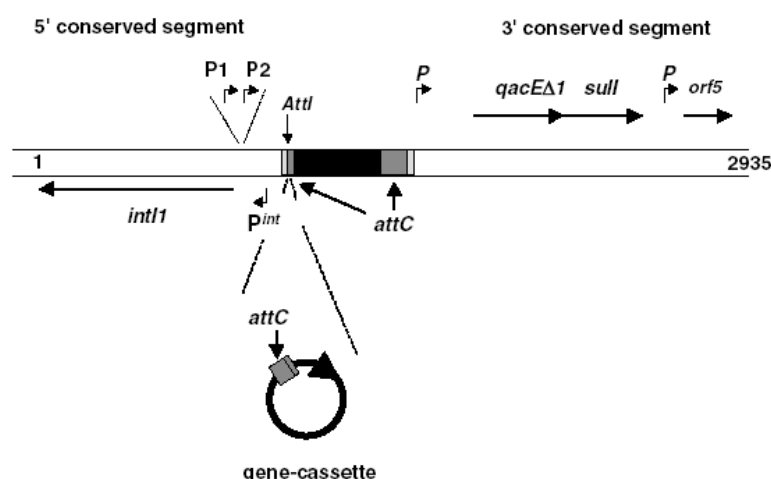
1. 5' conserved sequence (5'-CS) ซึ่งตำแหน่งนี้จะประกอบด้วย *int/1*, attachment site (*att/1*), promoter ซึ่ง *int/1* gene จะทำหน้าที่แปลรหัสได้เป็นเอนไซม์ integrase โดยเอนไซม์นี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันใหม่ของยีนหลังจากที่มีการสอดแทรกของ gene cassettes ส่วน *att/1* นั้นจะทำหน้าที่เป็น recognition site สำหรับเอนไซม์ integrase ที่จะเข้ามาตัดและเชื่อมต่อกับส่วนของ gene cassettes เข้ากับส่วนของ integron สำหรับ promoter นั้น promoters ที่อยู่ใน 5' CS ของ integron ช่วย ทำหน้าที่คล้ายกับเป็น natural expression vector สำหรับ จะช่วยในการแสดงออกของ gene cassette ที่สอดแทรกเข้าไปใน integron

2. Gene cassettes คือกลุ่มของยีนดื้อยาโดยส่วนใหญ่แล้วมักจะเป็นยีนที่ไม่มี promoter หรือมีความเป็น promoter ที่ต่ำ แล้วก็จะตามด้วย attachment site (*attC*) หรือ 59-base element (59-be) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการจดจำตำแหน่งของ integrase ในระหว่างที่เกิด recombination นอกจากนี้ในส่วนนี้ก็ยังจะพบส่วนของ core site (GTTRRRY) และ invert core site (TTRRRY) ด้วย (Recchia and Hall, 1995) ตัวอย่างของ gene cassette ได้แก่

2.1 beta-lactam resistance gene cassettes จะควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ทำให้ดื้อยา beta-lactams (Rowe-Magnus & Mazel, 2002)

2.2 aminoglycoside resistance gene cassettes พบมีประมาณ 21 ชนิด (Rowe-Magnus & Mazel, 1999,) ส่วนใหญ่ gene cassette นี้จะอยู่ในกลุ่ม *aad* gene (aminoglycoside adenylyltransferase family) ทำให้ดื้อต่อยา streptomycin และ spectinomycin (Mazel *et al.* 2000)

3. 3' conserved sequence (3'-CS) โดยทั่วไปแล้วตำแหน่งนี้ก็จะมีส่วนของยีนที่ดื้อต่อ quaternary ammonium compound (*qacEΔ1*), sulphonamide (*sull*, sulfamethoxazole resistant gene) และมีส่วนของ open reading frame (ORF) ที่มีบทบาทต่อการดื้อยาชนิดต่างๆ แบคทีเรียที่มี integron อยู่อาจจะมีความสามารถที่จะพัฒนาการดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิดได้อย่างรวดเร็ว และยังช่วยให้สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาเหล่านี้ไปยังสปีชีส์เดียวกันหรือคนละสปีชีส์ได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่มี integron ที่มียีนดื้อยาจึงเป็นปัญหาที่สำคัญในการใช้ยาต้านจุลชีพได้ในอนาคต (Fluit and Schmitz, 2004)



ภาพ 1 แสดงโครงสร้างบางส่วนของ class 1 integron โดยที่ P1 คือ promoter สำหรับการแปลรหัสของ gene cassettes, P2 คือ promoter ตัวที่สองซึ่งมักจะไมทำงาน, P คือ promoter สำหรับ *qacEΔ* gene และ *sull* gene

(Fluit and Schmitz, 2004)

สำหรับการศึกษายีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ integron ในประเทศไทย นั้น มีรายงานการศึกษาใน สัตว์พบยีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ class 1 integron ในเชื้อ *Escherichia coli* จากสุกรและผู้เลี้ยงสุกรถึง 63.5% และเชื้อเหล่านี้ก็เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิด (Phongpaichit *et al.*, 2007) การศึกษาในเชื้อ *Salmonella enterica* ที่แยกได้จาก ไก่และสุกรในประเทศไทย พบยีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ class 1 integron นั้น มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายการดื้อยา (รุ่งทิพย์ และ พรเพ็ญ, 2551) ส่วน การศึกษายีนดื้อยาในคนพบยีนดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam (bla_{VEB-1} และ bla_{OXA-10}) และ rifampicin (*arr-2*) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ class 1 integron ในเชื้อ *P. aeruginosa* และ Enterobacteriaceae และยีนดื้อยาเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ (Girlich *et al.*, 2001) การศึกษาใน ตัวอย่างอุจจาระของคนก็พบ class 1 integron จากเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิด (Phongpaichit *et al.*, 2008) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้รายงานการตรวจพบยีนที่ดื้อยา imipenem บน class 1 integron ใน เชื้อ *P. aeruginosa* (bla_{IMP-1}) ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่น ๆ ได้เช่นกัน (Boonkerd *et al.*, 2009)

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objective)

เพื่อศึกษายีนดื้อยาบน class 1 integron ในเชื้อ MDR *P. aeruginosa*

3. ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and Methods)

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย (Bacterial isolates)

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ เชื้อ *P. aeruginosa* จำนวนอย่างน้อย 50 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อเหล่านี้ เป็น clinical isolates ที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิด (MDR *P. aeruginosa*) รวมทั้ง ceftazidime และ imipenem

3.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี Disk diffusion test

Disk diffusion test เป็นวิธีการที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยา ในการรายงานผลสามารถ บอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อยาในระดับใด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (Becton, Dickinson and Company., Sparks, MD 21152, USA) บ่มในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วจุ่มลงไปเชื้อที่ เตรียมความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 แล้วทำการ swab เชื้อที่ต้องการทดสอบ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Difco™ Mueller-Hinton agar (Becton, Dickinson and Company., Sparks,

MD 21152, USA) แล้วทำการวาง antibiotic disk (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของ clear zone จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานที่กำหนดไว้ (CLSI, 2007) ซึ่งสามารถแปลผลได้ 3 ระดับคือ R (resistant), I (intermediated) และ S (susceptible)

3.3 การตรวจหา class 1 integron (Detection of class 1 integron) โดยวิธี PCR

สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้วิธี colony PCR โดยเตรียม template ด้วยวิธี boiling method เนื่องจาก integron ในแต่ละ class นั้นจะมีความแตกต่างที่เอนไซม์ integrase ดังนั้นการตรวจหา class 1 integron นี้จะอาศัย specific primer ที่สามารถจับกับ *intI* ได้ (ตาราง 1) ในปฏิกิริยาของการทำ PCR ประกอบด้วย template, 10 μ M forward primer, 10 μ M reverse primer, 5 μ M dNTPs, 1.5 μ M $MgCl_2$, *Taq* polymerase, 10X amplification buffer และ sterile deionized water ปรับปริมาตรรวม 50 μ l สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR สำหรับการตรวจหา *intI* คือ 94 °C 5 นาที 1 รอบ, 94 °C 45 วินาที (denaturing), 48 °C 45 วินาที (annealing), 72 °C 5 นาที (extension) จำนวน 30 รอบ และ 72 °C 10 นาที 1 รอบ หลังจากได้เพิ่มปริมาณแล้ว ทำตรวจผลการ amplification ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ และทำการหาลำดับเบส หลังจากทราบลำดับเบสแล้ว นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่มีรายงาน ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

3.4 การตรวจหา ยีนดื้อยาที่อยู่บน class 1 integron โดยวิธี PCR

เชื้อที่ให้ผลบวกต่อ *intI* จะนำมาตรวจหา ยีนที่อยู่บน class 1 integron โดยใช้ specific primer ที่สามารถจับกับ 5'-CS (forward primer) และ 3'-CS (reverse primer) (ตาราง 1) ในปฏิกิริยาของการทำ PCR นั้นจะเหมือนกับที่ได้ระบุไว้ในข้อ 3.2 แต่จะเพิ่มเวลาในขั้นตอน extension เป็น 5 นาที และเอนไซม์ *Taq* polymerase ที่ใช้จะเป็นเอนไซม์สำหรับ Long PCR product fragment เนื่องจาก ยีนที่อยู่บน class 1 integron นั้นมักจะมีหลายยีน ซึ่งจะทำให้ได้ PCR product ขนาดใหญ่ ทำตรวจผลการ amplification ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ทำการหาลำดับเบส และวิเคราะห์ผลเหมือนกับที่ได้ระบุไว้ในข้อ 3.3

ตารางที่ 1 แสดง Primer ที่ใช้ในการตรวจหา class 1 integron

Primers	Sequences	Expected PCR products (bp.)	References
Int1 F	5'GCA TCC TCG GTT TTC TGG3'	457	Shibata et al.,2003
Int1 R	5'GGT GTG GCG GGC TTC GTG3'		
5'CS	5'GGC ATC CAA GCA GCA AG3'	Variable	Lévesque et al., 1995

4. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results and Discussions)

4.1 การศึกษาความไวของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อยาต้านจุลชีพ

การรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นส่วนใหญ่แล้วมักจะใช้ยาหลายขนานร่วมกัน จึงทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความไวของเชื้อ ต่อยาต้านจุลชีพเหล่านี้ ซึ่งการศึกษาความไวของเชื้อ ต่อยาต้านจุลชีพ จะใช้วิธี Disk diffusion test ยาที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ third generation cephalosporins (ceftazidime), imipenem, ciprofloxacin, นอกจากนั้นยังมีกลุ่ม aminoglycosides (gentamicin, amikacin) อีกด้วย เมื่อทำการวัดขนาดของ inhibition zone แล้วนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ CLSI (CLSI, 2007) ซึ่งจะสามารถแปลผลได้ 3 ระดับคือ เชื้อมีความไวต่อยา (S: susceptible) เชื้อมีความไวต่อยาระดับกลาง (I: intermediate) และเชื้อมีการดื้อยา (R: resistant) ผลการศึกษาแสดงไว้ในตาราง 2 พบว่าเชื้อมีการดื้อต่อยา ceftazidime และ ciprofloxacin คิดเป็นร้อยละ 88 (44/50) และ 90 (45/50) นอกจากนั้นเชื้อส่วนใหญ่ยังมีการดื้อต่อยา imipenem ถึงร้อยละ 62 % (31/50) สำหรับยาในกลุ่ม aminoglycosides นั้น พบว่าเชื้อดื้อต่อยา gentamicin และ amikacin ถึง 80 % (40/50) และ 56 % (28/50) ตามลำดับ

จากผลการศึกษาความไวของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการดื้อต่อยาที่ใช้เป็นตัวเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งยาในกลุ่ม fluoroquinolone, aminoglycoside และ beta-lactam รวมทั้งยา carbapenem ที่ออกฤทธิ์ได้กว้างขวางและถือว่าเป็นที่สูงสุดในปัจจุบัน เชื้อ *P. aeruginosa* ก็ยังพัฒนาตัวเองให้ดื้อและดื้อยาได้ง่าย ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานสถานการณ์ทั้งต่างประเทศและในประเทศ เรื่องการดื้อยา carbapenem และกลุ่มยาอื่นที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* โดยจากการศึกษาของ MYSTIC program Brazil ปี ค.ศ. 2003 ซึ่งเป็นการศึกษาใน 20 โรงพยาบาลของบราซิล พบเชื้อ *P. aeruginosa* มากที่สุดจากเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลและมีอัตราการดื้อต่อยา meropenem 64 % และ ceftazidime 55.8 % (Kiffer *et al.*, 2005) ในปีเดียวกันก็มีการรายงานของ Canadian National Intensive Care Unit พบว่านอกจากเชื้อ *P. aeruginosa* จะมีการดื้อต่อยา meropenem แล้วยังดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 และ 4 คือ ceftriaxone และ cefepime ถึง 30 % และ 10.2 % ตามลำดับ (Zhanel *et al.*, 2008) ในปี ค.ศ. 2006 ก็มีการศึกษาการเฝ้าระวังเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลจากศูนย์การแพทย์ของสหรัฐอเมริกา พบว่า 10.7 % และ 6.4 % ของเชื้อ *P. aeruginosa* มีการดื้อยา imipenem และ meropenem ตามลำดับ (Rhomborg *et al.*, 2007) นอกจากนั้นยังมีการรายงานการดื้อยา imipenem ในเชื้อ *P. aeruginosa* ในระหว่างปี ค.ศ. 2005-2008 จากโรงพยาบาลศูนย์การแพทย์ Malaya ประเทศมาเลเซีย (Khosravi *et al.*, 2010) อีกด้วย สำหรับในประเทศไทยนั้นได้มีการศึกษาผู้ป่วยที่รักษาตัวในหอผู้ป่วย

วิกฤตของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงปี ค.ศ. 2000-2002 ก็พบปัญหาการดื้อยา imipenem ของเชื้อ *P. aeruginosa* ถึง 30.9 % (Thongpiyapoom *et al.*, 2004) ต่อมาได้มีการรายงานจาก ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ (NARST) ถึงการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าในช่วงปีค.ศ. 2000-2005 เชื้อมีอัตราการใช้ดื้อยา imipenem (12.8-15.4 %), meropenem (8.5-15.5 %), ceftazidime (24.6-26.2 %), amikacin (17.9-23.6 %) และ MDR ซึ่งรวมการดื้อยา amikacin, ciprofloxacin และ ceftazidime (33-44.6 %) เป็นต้น (Dejsirilert *et al.*, 2009) ต่อมาก็มีการศึกษา ในเด็กที่อายุต่ำกว่า 15 ปีที่รักษาตัวอยู่ในหอผู้ป่วยวิกฤตในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในปี ค.ศ. 2005 ก็พบปัญหาการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* โดย MDR *P. aeruginosa* พบมากเป็นอันดับสองคือ 55 % ซึ่ง MDR *P. aeruginosa* ทั้งหมดนี้ก็มีการใช้ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ด้วย (Sritippayawan *et al.*, 2009) นอกจากนั้นในปี ค.ศ. 2005-2006 ได้มีการรายงานจากแผนกกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น ว่าพบเชื้อ MDR *P. aeruginosa* ถึง 10.53 % (เสงี่ยม และ พรทิพย์, 2007)

ตาราง 2 แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี Disk diffusion test

ความไวต่อยาต้านจุลชีพ

Isolate	Isolation date	specimens					
			CAZ	IPM	CN	AK	CIP
PA4-458	7/11/2550	pus	R	I	R	R	R
PA4-489	7/11/2550	sputum	R	I	R	S	R
PA546	8/11/2550	sputum	R	R	R	I	R
PA850	13/11/2550	sputum	R	R	R	R	R
PA884	13/11/2550	sputum	R	I	R	I	R
PA935	14/11/2550	sputum	R	I	R	R	R
PA974	14/11/2550	sputum	R	I	R	S	R
PA975	14/11/2550	sputum	R	R	R	S	R
PA1058	15/11/2550	urine	R	I	R	S	R
PA1360	19/11/2550	sputum	R	I	R	R	R
PA1630	19/11/2550	sputum	R	I	R	R	R
PA1775	25/11/2550	sputum	R	S	R	S	R
PA952	12/12/2550	-	R	I	R	R	R
PA953	15/12/2550	-	R	I	R	S	R
PA1691	23/12/2550	sputum	R	R	R	I	R
PA2413	29/12/2550	sputum	R	R	R	R	R
PA2259	30/12/2550	sputum	R	S	R	R	R
PAk90	7/01/2551	blood	R	R	R	R	R
PA321	7/01/2551	sputum	S	I	S	S	S
PA2149	27/01/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA2290	29/01/2551	sputum	R	R	S	S	S
PA195	2/02/2551	sputum	R	I	R	R	R
PA248	3/02/2551	fluid	R	S	R	R	R
PA304	4/02/2551	sputum	S	R	S	S	R
PA923	12/02/2551	sputum	R	R	R	S	R
PA931	12/02/2551	pus	R	R	R	S	R

ตาราง 2 (ต่อ)

Isolate	Isolation date	specimens	ความไวต่อยาต้านจุลชีพ				
			CAZ	IPM	CN	AK	CIP
PA948	12/02/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA966	12/02/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA1266	15/02/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA1304	16/02/2551	sputum	R	I	R	R	R
PA1625	20/02/2551	sputum	S	R	S	S	S

PA1632	20/02/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA2169	27/02/2551	sputum	R	I	R	R	R
PA2201	27/02/2551	sputum	S	R	S	S	R
PA2354	29/02/2551	-	R	R	S	S	S
PA36	1/03/2551	sputum	S	R	S	S	R
PA128	2/03/2551	pus	R	R	R	R	R
PA181	3/03/2551	sputum	R	I	R	S	R
PA982	12/03/2551	pus	R	R	R	R	R
PA1110	15/03/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA1154	15/03/2551	pus	R	S	R	R	R
PA1361	17/03/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA1410	19/03/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA1868	23/03/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA60	1/04/2551	wound	R	R	R	R	R
PA277	3/04/2551	burn	R	R	R	R	R
PA329	4/04/2551	pus	S	R	S	S	I
PA392	5/04/2551	sputum	R	R	R	R	R
PA398	5/04/2551	pus	R	R	S	S	S
PA460	6/04/2551	-	R	R	I	S	R

หมายเหตุ S: susceptible, I: intermediate, R: resistant

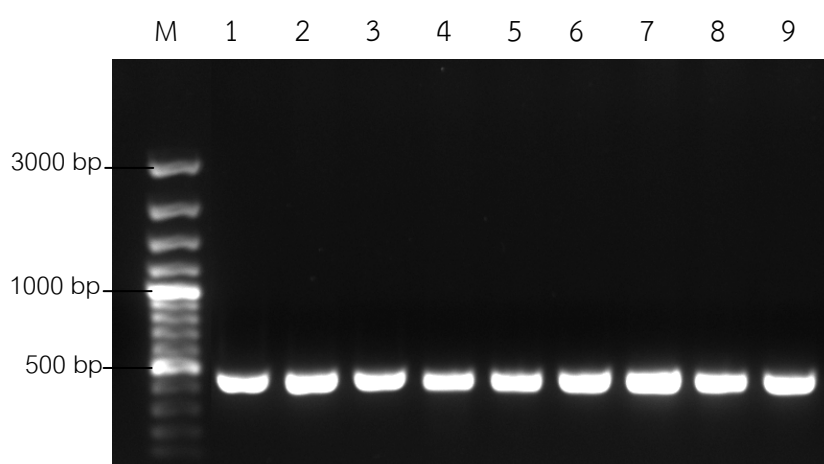
Abbreviations: CAZ (Ceftazidime), IPM (Imipenem), CN (Gentamicin), AK (Amikacin), CIP (Ciprofloxacin)

- : ไม่มีข้อมูล

4.2 การตรวจหา class 1 integron โดยวิธี PCR

ปัจจุบันนี้พบปัญหาว่าเชื้อมีการดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกัน โดยเกิดจากการมี genetic element ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า integron ซึ่งแพร่กระจายมากในหมู่แบคทีเรียแกรมลบ โดย integron สามารถสะสมยีนดื้อยาชนิดต่างๆให้มาเรียงต่อกัน ทำให้สะดวกต่อการสร้างเอนไซม์มาทำลาย ยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกัน และการส่งต่อยีนดื้อยาหลายชนิดไปพร้อมๆกันก็เกิดขึ้นได้ง่ายอีกด้วย และยีนดื้อยาในเชื้อ *P. aeruginosa* มักจะสอดแทรกใน class 1 integron โดยใช้กลไก site-specific recombination ซึ่ง class 1 integron จะประกอบด้วย conserved segment 2 ส่วน คือ 5' conserved segment (5'CS) และ 3' conserved segment (3'CS) นอกจากนั้นยังมีส่วนของ variable region อยู่ระหว่าง 5'CS และ 3'CS ซึ่งเป็น gene cassette ที่มีกลุ่มของยีนดื้อยาชนิดต่างๆ ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำเชื้อ *P. aeruginosa* 50 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาทำการตรวจหา class 1 integron โดยเทคนิค PCR โดยในขั้นตอนแรกจะทำการเพิ่มจำนวนยีน *int1* ซึ่งใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *int1* คือ int1F-int1R primer ผลปรากฏว่ามีเชื้อจำนวน 41 ไอโซเลต ให้ผลบวกกับ int1F-

int1R ได้แก่ PA4-458, PA4-489, PA546, PA850, PA884, PA935, PA974, PA975, PA1058, PA1360, PA1630, PA1775, PA952, PA953, PA1691, PA2413, PA2259, PA90, PA2149, PA2290, PA195, PA248, PA923, PA931, PA948, PA966, PA1266, PA1304, PA1632, PA2169, PA181, PA982, PA1110, PA1154, PA1361, PA1410, PA1868, PA60, PA277, PA392 และ PA460 มีการตรวจพบ PCR product ซึ่งให้ขนาดที่ใกล้เคียงกับ PCR product ของ *int1* คือ ขนาดประมาณ 457 bp (ภาพ 2) ดังนั้นเชื้อทั้ง 41 ไอโซเลตนี้อาจมี *int1* ซึ่งเป็นยีนที่พบบน class 1 integron ตัวอย่างของ *int1* PCR product จึงได้ถูกนำไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาวิเคราะห์ผล ปรากฏว่าให้ความเหมือนกับยีน *int1* เท่ากับ 100 % identity (แสดงดังภาพ 3) แสดงว่าเชื้อเหล่านั้นมี *int1*



ภาพ 2 แสดงขนาดของ PCR product จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *int1* (ขนาดประมาณ 457 bp) ในเชื้อ *P. aeruginosa* บางไอโซเลต บน 1 % agarose gel ใน 0.5x TBE buffer Lane M: 100 bp ladder marker (Fermentas); Lane 1-9: PA850, PA277, PA935, PA4-486, PA2169, PA2259, PA60, PA2149 และ PA974

ตามลำดับ

```

                                10      20      30      40      50
Int1 gene  CTACCTCTCACTAGTGAGGGGCGGCAGCGCATCAAGCGGTGAGCGCACTC
Stop codon
                                60      70      80      90     100
Int1 gene  CGGCACCGCCAACTTTCAGCACATGCGTGTAATCATCGTCGTAGAGACG
                                110     120     130     140     150
Int1 gene  TCGGAATGGCCGAGCAGATCCTGCACGGTTCGAATGTCGTAACCGCTGCG
                                                Int1R
                                160     170     180     190     200
Int1 gene  GAGCAAGGCCGTCGCGAACGAGTGGCGGAGGGTGTGCGGTGTGGCGGGCT
PA884-Int1 -----GGTGTGGCGGGCT
                                210     220     230     240     250
Int1 gene  TCGTGATGCCTGCTTGTTCTACGGCACGTTTGAAGGCGCGCTGAAAGGTC
PA884-Int1 TCGTGATGCCTGCTTGTTCTACGGCACGTTTGAAGGCGCGCTGAAAGGTC
                                260     270     280     290     300
Int1 gene  TGGTCATACATGTGATGGCGACGCACGACACCGCTCCGTGGATCGGTCTGA
PA884-Int1 TGGTCATACATGTGATGGCGACGCACGACACCGCTCCGTGGATCGGTCTGA
                                310     320     330     340     350
Int1 gene  ATGCGTGTGCTGCGCAAAAACCCAGAACACGGCCAGGAATGCCCGGCGC
PA884-Int1 ATGCGTGTGCTGCGCAAAAACCCAGAACACGGCCAGGAATGCCCGGCGC
                                360     370     380     390     400
Int1 gene  .....
PA884-Int1 .....

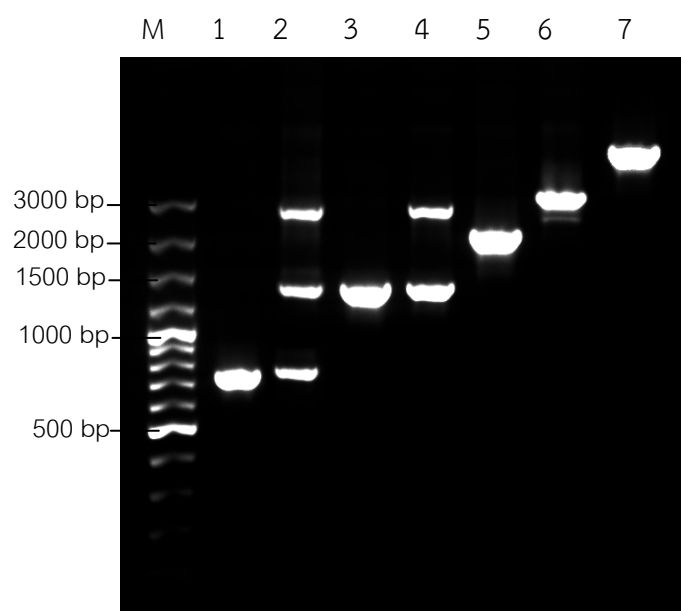
```

Int1 gene	GCGGATACTTCCGCTCAAGGGCGTCGGGAAGCGCAACGCCGCTGCGGCCC
PA884-Int1	GCGGATACTTCCGCTCAAGGGCGTCGGGAAGCGCAACGCCGCTGCGGCCC
	410 420 430 440 450
Int1 gene	
PA884-Int1	TCGGCCTGGTCCTTCAGCCACCATGCCCCTGCACGCGACAGCTGCTCGCG
	460 470 480 490 500
Int1 gene	
PA884-Int1	CAGGCTGGGTGCCAAGCTCTCGGGTAACATCAAGGCCCGATCCTTGGAGC
	510 520 530 540 550
Int1 gene	
PA884-Int1	CCTTGCCCTCCCGCACGATGATCGTGCCGTGATCGAAATCCAGATCCTTG
	560 570 580 590 600
Int1 gene	
PA884-Int1	ACCCGCAGTTGCAAACCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAG
	ACCCGCAGTTGCAAACCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAG
	Int1F

ภาพ 3 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *int1* gene ในเชื้อ *P. aeruginosa* PA884

4.3 การตรวจหาอินทรีย์ที่อยู่บน class 1 integron โดยวิธี PCR

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 41 ไอโซเลต มีอินทรีย์ *int1* ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ class 1 integron ดังนั้นจึงนำเชื้อเหล่านี้มาวิเคราะห์หาชนิดและจำนวนของ gene cassette ที่อยู่บน class 1 integron โดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ In5'CS-In3'CS primer ที่จำเพาะกับส่วนของ 5'CS และ 3'CS ผลปรากฏว่าพบ PCR product ของ class 1 integron ที่มีขนาดแตกต่างกัน 7 ขนาด คือมีขนาดประมาณ 700 bp, 1300 bp, 1400 bp, 2000 bp, 2600 bp, 3000 bp และ 7000 bp (ภาพ 4) นอกจากนั้นยังพบว่าในเชื้อบางไอโซเลตยังพบ class 1 integron มากกว่า 1 ชนิด (ตาราง 3) คือพบ class 1 integron ที่มี 2 ขนาดอยู่ในเชื้อไอโซเลตเดียวกัน ซึ่งพบในเชื้อ 5 ไอโซเลต ได้แก่ PA1154, PA1775, PA2259, PA974 และ PA953 และยังพบ class 1 integron ที่มีถึง 3 ขนาดอยู่ในเชื้อไอโซเลตเดียวกัน โดยพบในเชื้อ 5 ไอโซเลต ได้แก่ PA1691, PAk90, PA975, PA1266 และ PA181 ดังนั้นจึงสามารถที่จะแบ่งรูปแบบของ class 1 integron ที่พบในเชื้อทั้ง 41 ไอโซเลต ได้ 7 รูปแบบ (ตาราง 3) คือรูปแบบที่ 1, 3, 5, 6 และ 7 จะพบ class 1 integron จำนวน 1 ชนิด ในเชื้อไอโซเลตเดียวกัน คือมีขนาดประมาณ 700 bp, 1300 bp, 2000 bp, 3000 bp และ 7000 bp ตามลำดับ ในรูปแบบที่ 4 จะพบว่ามี 2 ชนิดของ class 1 integron ภายในเชื้อไอโซเลตเดียวกัน คือขนาดประมาณ 1400 bp และ 2600 bp สำหรับรูปแบบที่ 2 พบว่ามี class 1 integron ถึง 3 ชนิดอยู่ในเชื้อไอโซเลตเดียวกัน คือขนาดประมาณ 700 bp, 1400 bp และ 2600 bp เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของ class 1 integron ที่พบมากที่สุดก็คือ รูปแบบที่ 3 โดยพบมากถึง 25 ไอโซเลตจากทั้งหมด 41 ไอโซเลต คิดเป็น 60.97 %



ภาพ 4 แสดงขนาดของ PCR product ของ class 1 integron ทั้ง 7 รูปแบบที่พบในเชื้อ

P. aeruginosa บน 1.0 % agarose gel ใน 0.5x TBE buffer

Lane M: 100 bp ladder marker (Fermentas); Lane 1-7: PA931, PA1266, PA546, PA1154, PA1110, PA277 และ PA966 ตามลำดับ

ตาราง 3 แสดงรูปแบบของ class 1 integron ที่ตรวจพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

Integron types	no. of isolates	isolates	Approximate size of integron (bp)
1	2	PA923, PA931	700
2	5	PA1691, PAk90, PA975 PA1266, PA181	700, 1400, 2600
3	25	PA4-458, PA4-489, PA546, PA850, PA884, PA935, PA1058, PA1360, PA1630, PA952, PA2413, PA2149, PA195, PA248, PA948, PA1304, PA1632, PA2169, PA982, PA1361, PA1410, PA60, PA1868, PA392, PA460	1300
4	5	PA1154, PA1775, PA2259, PA974, PA953	1400, 2600
5	2	PA1110, PA2290	2000
6	1	PA277	3000
7	1	PA966	7000

สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene cassettes บน class 1 integron โดยใช้เทคนิค sequencing แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ ผลปรากฏว่า PCR product ที่มีขนาดต่างกันก็จะพบยีนดื้อยาที่แตกต่างกันด้วย โดย gene cassettes บน class 1 integron ที่พบนี้มีตั้งแต่ 1, 2, 3 และ 7 gene (ภาพ 5) โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.3.1 class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 700 bp ที่พบใน integron รูปแบบที่ 1 และ 2 (ภาพ 5a) เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วก็พบว่ามียีนเพียง 1 ยีนคือ *aadB* ที่ encode เอนไซม์ aminoglycoside adenyltransferase (AAD(2'')) ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อยา gentamicin และ

kanamycin โดยรูปแบบของ gene cassettes ที่พบนี้เคยมีรายงานว่าพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้งในประเทศบราซิล (Fonseca *et al.*, 2006), ฮังการี (Ratkai *et al.*, 2008) และ อิหร่าน (Shahcheraghi *et al.*, 2010) เป็นต้น

4.3.2 class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 1300 bp พบใน integron รูปแบบที่ 3 เพียงรูปแบบเดียว เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบการจัดเรียงตัวของ gene cassettes คือ *aadA6-orfD* (ภาพ 5b) ซึ่ง *aadA6* จะ encode เอนไซม์ aminoglycoside adenylyltransferase (ANT(3'')-Ib) ทำให้เชื้อดื้อต่อยา streptomycin โดยรูปแบบการจัดเรียงตัวของ gene cassettes นี้เคยมีรายงานการพบบน class 1 integron ที่มีขนาด 1300 bp ในเชื้อ *P. aeruginosa* 15 ไอโซเลตที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศจีนในระหว่างปี ค.ศ. 2003-2005 (Gu *et al.*, 2007) และปี ค.ศ. 2007 ก็ยังพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศอิหร่าน (Shahcheraghi *et al.*, 2010) เป็นต้น

4.3.3 class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 1400 bp พบใน integron รูปแบบที่ 2 และ 4 นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์แล้วพบว่าคือยีน *aacA7* แต่พบมีการจัดเรียงตัวแบบ duplicate (*aacA7-aacA7*) (ภาพ 5c) โดยยีนนี้จะ encode เอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase (AAC(6')-Ib) ทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycoside เช่น amikacin และ tobramycin โดย *aacA7* นี้เคยพบบน integron ที่แทรกตัวใน MDR plasmid pBWH301 โดยพบในเชื้อ *Enterobacter* spp. ระหว่างเกิดการแพร่ระบาดของการดื้อยาในโรงพยาบาลที่ประเทศเวเนซุเอลา ซึ่ง *aacA7* อยู่ร่วมกับยีนอื่นด้วยคือ *aacA7-catB3-aadB-oxa2-orfD* (Hopkins *et al.*, 1991 และ Bunny *et al.*, 1995) นอกจากนั้นยังพบ *aacA7* ในเชื้อ *Pseudomonas putida* strain Pp1 ที่พบในประเทศโปรตุเกส ซึ่งพบว่ามีการจัดเรียงตัวอยู่ร่วมกับยีนอื่นคือ *aacA7-bla_{VIM-2}-aacC1-aacA4* บน class 1 integron ด้วย (Santos *et al.*, 2010)

4.3.4 class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 2000 bp พบใน integron รูปแบบที่ 5 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบการจัดเรียงตัวของ gene cassettes คือ *blaP1b-aadA2* (ภาพ 5d) ซึ่ง *blaP1b* จะ encode เอนไซม์ PSE-1/CARB-2 beta-lactamase โดยทำให้เชื้อดื้อต่อยา carbenicillin (Quinteira *et al.*, 2005) และ *aadA2* ก็ encode สำหรับเอนไซม์ aminoglycoside adenylyltransferase (ANT(3'')Ib) ทำให้เชื้อดื้อต่อยา streptomycin (Bito and Susani, 1994) ได้ มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเคยพบ *blaP1b-aadA2* ในเชื้อ *Morganella morganii* (Rojas *et al.*, 2006)

4.3.5 class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 2600 bp พบใน integron รูปแบบที่ 2 และ 4 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบการจัดเรียงตัวของ gene cassettes คือ *aac(3)-Ic-(smr1-like)-cmIA5* (ภาพ 5e) โดยที่ *aac(3)-Ic* จะ encode เอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase (AAC(3)-Ic) และทำให้เชื้อดื้อต่อ gentamicin (Riccio *et al.*, 2003) สำหรับ *smr* จะ encode multidrug resistance protein (SMR family) ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อ toxic compounds หลายชนิด รวมทั้งยาต้านจุลชีพกลุ่ม aminoglycoside (Li *et al.*, 2003) ซึ่งก่อนหน้านี้เคยพบ *smr* ที่อยู่บน

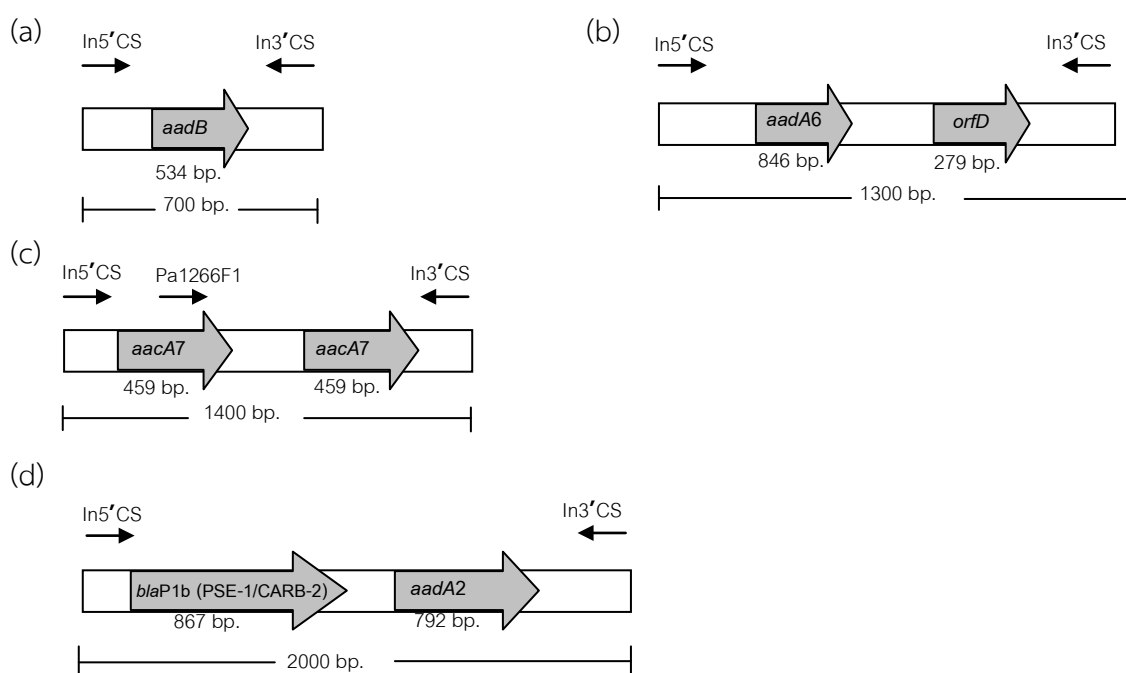
integron ด้วยคือ *smr1* ในเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* จำนวน 6 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่ Kaohsiung Medical University Hospital ในปี ค.ศ. 2002 (Chang *et al.*, 2004) สำหรับสิ่งที่น่าสนใจคือ *smr* ที่พบในการศึกษานี้เมื่อนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับ *smr1* ถึง 98.74 % โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 4 ตำแหน่งในยีนนี้คือ G → A (ตำแหน่งที่ 40), C → T (ตำแหน่งที่ 255), G → T (ตำแหน่งที่ 261) และ C → T (ตำแหน่งที่ 303) เมื่อวิเคราะห์ถึงระดับกรดอะมิโนพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ SMR1 ถึง 98.94 % โดยที่กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นคือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 14 เปลี่ยนจาก Valine (Val,V) → Isoleucine (Ile,I) แสดงดังภาพ 6 ซึ่ง *smr1-like* ที่พบนี้ไม่เคยมีพบมาก่อนเมื่อเปรียบเทียบกับยีนและกรดอะมิโนที่มีอยู่ใน GenBank สำหรับ *cmlA5* ก็ encode chloramphenicol resistance protein ซึ่งการเรียงตัว *aac(3)-Ic-cmlA5* ก็เคยมีรายงานการพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในตุรกี (Ozgumus *et al.*, 2007)

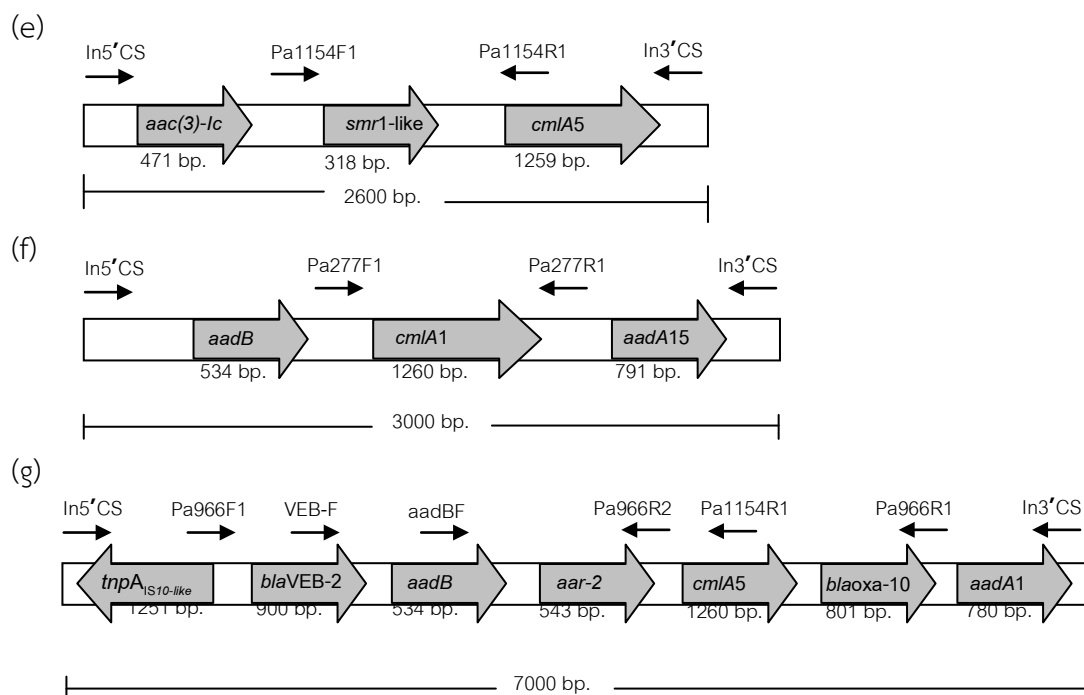
4.3.6 class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 3000 bp พบใน integron รูปแบบที่ 6 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบการจัดเรียงตัวของ gene cassettes คือ *aadB-cmlA1-aadA15* (ภาพ 5f) โดย *aadB* ก็ทำให้เชื้อดื้อยา gentamicin และ kanamycin สำหรับ *cmlA1* และ *aadA15* ก็ทำให้เชื้อดื้อต่อยา chloramphenicol และ streptomycin ตามลำดับ ซึ่งเคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ถึงการพบ *aadA15* ในประเทศได้เห็นว่าพบการจัดเรียงตัวของยีน *catB3-bla_{OXA-10}-aadA15* บน class 1 integron ในเชื้อ *P. aeruginosa* (Yan *et al.*, 2006)

4.3.7 class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 7000 bp ที่พบใน integron รูปแบบที่ 7 นั้นพบในเชื้อ 1 ไอโซเลต คือ PA966 เมื่อนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่ามี การจัดเรียงตัวของ gene cassettes คือ *tnpA_{IS10-like}-bla_{VEB-2}-aadB-arr-(2)-cmlA5-bla_{OXA-10}-aadA1* (ภาพ 5g) บริเวณ upstream ก่อนถึงตำแหน่งของ *bla_{VEB-2}* gene cassette พบยีน *tnpA* เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วปรากฏว่ามีความเหมือน 100 % identity กับ *tnpA_{IS10-like}* (GenBank accession no. AY536743) โดย *IS10-like* เป็น insertion sequence ที่มีบทบาทเป็น transposable element ซึ่งจะ encode เอนไซม์ transposase ที่ถูกใช้สำหรับการเคลื่อนที่และทำให้สามารถที่จะแทรกไปยัง target molecule ได้ (Chandler and Mahillon, 2002) หลังจากตำแหน่งของ *tnpA_{IS10-like}* ก็จะพบยีน *bla_{VEB-2}* ซึ่งเป็น ESBL ชนิดหนึ่ง สำหรับในประเทศไทยเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่า มักพบ *IS1999* อยู่บริเวณ upstream ก่อนถึงตำแหน่งของ *bla_{VEB}* (Girlich *et al.*, 2002) นอกจากนั้น promoter ของ *IS1999* ยังช่วยเพิ่มการแสดงออกของ *bla_{VEB-1}* ในเชื้อ *P. aeruginosa* อีกด้วย (Aubert *et al.*, 2003) ในการศึกษานี้พบว่า *tnpA_{IS10-like}* ในเชื้อ *P. aeruginosa* มีความคล้ายคลึงกับ *IS1999* ถึง 99% identity โดยนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 2 ตำแหน่งภายในยีน คือเปลี่ยนจาก A → G ในตำแหน่งที่ 910 และเปลี่ยนจาก A → C ในตำแหน่งที่ 1235 ซึ่งก็ตรงกับการรายงานของ Mahillon และ

Chandler ปี ค.ศ. 1998 ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า *tnpA*_{IS10-like} จะไปทำหน้าที่เป็น promoter เพิ่มการแสดงออกของ *bla*_{VEB-2} ในเชื้อ PA966 ได้

สำหรับ *bla*_{VEB-2} จะทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยา ceftazidime ในอัตราที่สูง โดย *bla*_{VEB-2} ที่อยู่บน class 1 integron นี้เคยมีรายงานการพบในเชื้อ *P. aeruginosa* 2 ไอโซเลต ที่ดื้อยา ceftazidime สูง ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราช (Girlich *et al.*, 2002) ซึ่ง *bla*_{VEB-2} ที่พบในไอโซเลต PA966 นี้ก็มีการดื้อต่อยา ceftazidime แสดงว่า *bla*_{VEB-2} มีบทบาทในการทำให้เชื้อดื้อต่อยา ceftazidime นอกจากนั้นยังพบยีน *aadB*, *arr-2* และ *cmlA5* ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา gentamicin, rifampin และ chloramphenicol ตามลำดับ ถัดมาพบยีน *bla*_{OXA-10} ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อ β -lactam อื่นอีกด้วย และยีน *aadA1* ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา streptomycin ซึ่งรูปแบบการจัดเรียงตัวของ gene cassettes ที่พบนี้ คือ *tnpA*_{IS10-like}-*bla*_{VEB-2}-*aadB*-*arr*(2)-*cmlA5*-*bla*_{OXA-10}-*aadA1* มีความคล้ายคลึงกับที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้แล้วในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราช โดยมีการจัดเรียงตัวของ gene cassettes เหมือนกัน แต่ต่างกันตรงตำแหน่งของ insertion sequence ที่เปลี่ยนจาก *tnpA*_{IS10-like} เป็น *tnpA*_{IS1999} เท่านั้น (Girlich *et al.*, 2002) แสดงให้เห็นว่าบริเวณ upstream ก่อนถึงตำแหน่ง *veb-2* cassette นั้นนอกจากที่มักจะพบเป็น IS1999 แล้วยังสามารถพบได้เป็น IS10-like อีกด้วย





ภาพ 5 แสดงรูปแบบของ gene cassettes ที่อยู่บน class 1 integron ที่มีขนาดต่างกัน โดยที่
 → คือทิศทางของ primer และ ⇨ คือทิศทางของ gene จาก start codon ไปยัง stop codon

smr1(AF406792)	MGWIYLLILAGVFEVGVPGVLKMAQTPETRWSGIGVAVAFMTVSGFLLWLA
smr-PA1154	I.....
	60 70 80 90 100
smr1(AF406792)	
smr-PA1154	QRQIPIGTAYAVWTGIGAAGTFFVGVLYYGDPTSFFRYMGVALIAGVIT
	
	
smr1(AF406792)	LKLAH*
smr-PA1154	*

ภาพ 6 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SMR1-like จากเชื้อ *P. aeruginosa* PA1154 กับ SMR1 ที่พบในเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* เครื่องหมาย . คือตำแหน่งกรดอะมิโนที่เหมือนกัน บริเวณที่แรเงาสีเทา คือ ตำแหน่งกรดอะมิโนของ SMR1-like จากเชื้อ *P. aeruginosa* PA1154 ที่ต่างจาก SMR1 ที่พบในเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia*

จากผลการศึกษาอินทรีย์ใน class 1 integron ในเชื้อทั้งหมด 41 ไอโซเลต สามารถสรุปรูปแบบของอินทรีย์ที่พบและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ ดังแสดงในตาราง 4 แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของอินทรีย์ที่พบและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นการดื้อยาหลายชนิดในเชื้อ *P. aeruginosa* จึงอาจเป็นไปได้ที่เกิดจากอินทรีย์ที่พบเป็นส่วนหนึ่งของ class 1 integron

ตาราง 4 แสดงความสัมพันธ์ของอินทรีย์ที่พบในเชื้อ *P. aeruginosa* กับรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ

อินทรีย์	เชื้อ	รูปแบบการดื้อยา
Integron type 1 (700 bp)		
-700 bp: <i>aadB</i> (CN ^r)	PA923	CN ^r
	PA931	CN ^r
Integron type 2 (700 bp, 1400 bp, 2600 bp)		
-700 bp: <i>aadB</i> (CN ^r)	PA1691	CN ^r
-1400 bp: <i>aacA7-aacA7</i> (AK ^r)	PAk90	CN ^r , AK ^r
-2600 bp: <i>aac(3)-Ic-(smr1-like)-cmlA5</i> (CN ^r , C ^{r*})	PA975	CN ^r
	PA1266	CN ^r , AK ^r
	PA181	CN ^r
Integron type 3 (1300 bp)		
-1300 bp: <i>aadA6-orfD</i> (S ^{r*})	PA4-458, PA4-489, PA546, PA850, PA884, PA935, PA1058, PA1360, PA1630, PA952,	- (เนื่องจาก ไม่ได้ทำการ

PA2413, PA2149, ทดสอบกับ
 PA195, PA248, Streptomycin)
 PA948, PA1304,
 PA1632, PA2169,
 PA982, PA1361
 PA1410, PA460,
 PA60, PA392, PA1868

ตาราง 4 (ต่อ)

ยีนดื้อยา	เชื้อ	รูปแบบการดื้อยา
Integron type 4 (1400 bp, 2600 bp)		
-1400 bp: <i>aacA7-aacA7</i> (AK ^r)	PA1154	CN ^r , AK ^r
-2600 bp: <i>aac(3)-Ic-(smr1-like)-cmlA5</i> (CN ^r , C ^{r*})	PA1775	CN ^r
	PA2259	CN ^r , AK ^r
	PA974	CN ^r
	PA953	CN ^r
Integron type 5 (2000 bp)		
-2000 bp: <i>blaP1b-aadA2</i> (Cb ^{r*} , S ^{r*})	PA1110- PA398	} (เนื่องจากไม่ได้ทำการ ทดสอบกับยา Carbenicillin และ Streptomycin)
Integron type 6 (3000 bp)		
-3000 bp: <i>aadB-cmlA1-aadA15</i> (CN ^r , C ^{r*} , S ^{r*})	PA277	CN ^r
Integron type 7 (7000 bp)		
-7000 bp: <i>tnpA</i> _{IS10-like} - <i>bla</i> _{VEB-2} - <i>aadB-arr</i> -(2)- <i>cmlA5-bla</i> _{OXA-10} - <i>aadA1</i> (CAZ ^r , CN ^r , RIF ^{r*} , TIC ^r , PRL ^r , C ^{r*} , S ^{r*})	PA966	CAZ ^r , CN ^r , TIC ^r , PRL ^r

หมายเหตุ [†] คือ resistant , * คือ ยาต้านจุลชีพที่ไม่ได้ทำการทดสอบในงานวิจัยนี้

Abbreviations: AK (Amikacin), C (Chloramphenicol), CAZ (Ceftazidime), Cb (Carbenicillin), CN (Gentamicin), PRL (Piperacillin), RIF (Rifampin), TIC (Ticarcillin), S (Streptomycin)

5. บทสรุป (Summary)

การศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 50 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลใน จังหวัดพิษณุโลก ด้วยการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ โดยวิธี Disk diffusion test พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการดื้อยาที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ceftazidime imipenem, ciprofloxacin, gentamicin และ amikacin) แสดงถึงว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการดื้อยาหลายขนานที่มีประสิทธิภาพในการรักษาในปัจจุบัน เนื่องจากการดื้อยาหลายชนิดในเชื้อ *P. aeruginosa* เกิดจากยีนดื้อยาซึ่งส่วนใหญ่มักพบบน class 1 integron จึงตรวจหา class 1 integron โดยใช้ primer จำเพาะกับยีน *int1* พบว่าเชื้อจำนวน 41 ไอโซเลตให้ผลบวกกับ *int1* ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ class 1 integron ดังนั้นจึงนำเชื้อเหล่านี้มาวิเคราะห์หา gene cassette ที่อยู่บน class 1 integron ผลปรากฏว่าพบ PCR product ของ class 1 integron ที่มีขนาดแตกต่างกัน 7 ขนาด คือมีขนาดประมาณ 700 bp, 1300 bp, 1400 bp, 2000 bp, 2600 bp, 3000 bp และ 7000 bp นอกจากนั้นยังสามารถที่จะแบ่งรูปแบบของ class 1 integron ที่พบในเชื้อทั้ง 41 ไอโซเลต ได้ 7 รูปแบบอีกด้วย เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของ class 1 integron ที่พบมากที่สุดก็คือ รูปแบบที่ 3 (มี 1 integron ที่มีขนาด PCR product ประมาณ 1300 bp) โดยพบมากถึง 25 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 60.97

สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene cassettes บน class 1 integron พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วจะพบยีนในกลุ่มของ *aad* gene (*aadB*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA6* และ *aadA15*) และกลุ่ม *aac* gene (*aacA7* และ *aac(3)-Ic*) ซึ่งจะ encode เอนไซม์ aminoglycoside adenylyltransferase และ aminoglycoside acetyltransferase ตามลำดับ ซึ่งจะทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycoside นอกจากนั้นยังมีการตรวจพบยีนในกลุ่ม beta-lactamase ได้แก่ *blaP1b*, *bla_{VEB-2}* และ *bla_{OXA-10}* ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา carbenicillin, ceftazidime และยากลุ่ม beta-lactam อีกด้วย และเป็นที่น่าสนใจว่าการจัดเรียงตัวของยีนบน class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 7000 bp ที่พบในเชื้อ PA966 นี้ มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันมากกับ class 1 integron ที่พบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราชในปี ค.ศ.1999 โดยการจัดเรียงตัวของยีนที่พบในเชื้อ PA966 คือ *tnpA* _{IS10-like}-*bla_{VEB-2}*-*aadB*-*arr(2)*-*cmlA5*-*bla_{OXA-10}*-*aadA1* ซึ่งแตกต่างกับที่พบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราชเพียงแค่ตำแหน่งของ insertion sequence ที่

เปลี่ยนจาก *tnpA*_{IS10-like} เป็น *tnpA*_{IS1999} เท่านั้น สำหรับยีนดื้อยาที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งคือ *smr* ที่พบบน class 1 integron ที่มีขนาดประมาณ 2600 bp เมื่อนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *smr1* ถึง 98.74% เมื่อวิเคราะห์ถึงระดับกรดอะมิโนพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ SMR1 ถึง 98.94% โดยที่กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นคือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 14 เปลี่ยนจาก Valine (Val,V) → Isoleucine (Ile,I) ซึ่ง *smr1-like* ที่พบนี้ไม่เคยมีพบมาก่อนเมื่อเปรียบเทียบกับยีนและกรดอะมิโนที่มีอยู่ใน GenBank

เมื่อศึกษายีนดื้อยาใน class 1 integron ในเชื้อทั้งหมด 41 ไอโซเลต แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของยีนดื้อยาที่พบและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อมีความสัมพันธ์กัน โดยการดื้อยาหลายชนิดในเชื้อ *P. aeruginosa* เกิดจากการที่เชื้อสร้างเอนไซม์ออกมาทำลายยา โดยยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เหล่านั้นส่วนหนึ่งพบบน class 1 integron ซึ่งสามารถสะสมยีนดื้อยาชนิดต่างๆ ให้มาเรียงต่อกัน ทำให้สะดวกต่อการสร้างเอนไซม์มาทำลายยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกัน ดังนั้นยีนดื้อยาที่อยู่บน class 1 integron จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการแพร่กระจายของยีนดื้อยา ทำให้เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกันและทำให้สามารถที่จะถ่ายทอดยีนดื้อยาได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย

นลินี อัครโกศล, ชุภณา สวนกระต่าย, ธวัชชัย จริยะเศรษฐพงศ์, เพ็ญจันทร์ เซษฐโชติศักดิ์ และ พรรณทิพย์ ฉายากุล. (2547). โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก 2 (หน้า 75). สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ : โฮลิสติก แพบลิชชิง.

รุ่งทิพย์ ขวนชื่น และพรเพ็ญ พัฒนโสภณ. (2551). การตรวจหาและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาในเชื้อซาลโมเนลล่าที่แยกได้จากไก่และสุกรในประเทศไทย : รายงานวิจัย 2551. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสงี่ยม สกุนี และ พรทิพย์ คำอ้วน. (2007). โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ในแผนกกุมารเวชกรรมโรงพยาบาลขอนแก่น. ขอนแก่นวารสาร, 31, 143-55.

Aubert D, Naas T & Nordmann P. (2003). IS1999 increases expression of the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 185, 5314–9.

Bito A and Susani M. (1994). Revised analysis of *aadA2* gene of plasmid pSa. Antimicrob. Agents Chemother, 38, 1172–5.

Boonkerd N, Pibalpakdi P, Tiloklurs M, Niumsup PR. (2009). Class 1 integron containing metallo beta-lactamase gene bla (IMP-1) in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. J Infect Chemother. 15(4):257-61.

Bunny KL, Hall RM & Stokes HW. (1995). New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and a chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. Antimicrob Agent Chemother, 39, 686-93.

Chandler M and Mahillon J. (2002). Insertion sequences revisited. In Craig NL, Craigie R, Gellert M & Lambowitz AM (ed.), Mobile DNA II (p. 305–366) ASM Press, Washington: D.C.

Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM and Wu WJ. (2004). Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 53, 518-21.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-S17.

Danchavijitr S and Waitayapichet S. (1988). Prevalence of nosocomial infection in Siriraj Hospital. J Med Assoc Thai. 71(Suppl 3), 5-10.

Dejsirilert S, Suankratay C, Trakulsomboon S, Thongmali O, Sawanpanyalert P, Aswapokee N, et al. (2009). National Antimicrobial Resistance Surveillance, Thailand (NARST) data among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand from 2000 to 2005. J Med Assoc Thai. 92, 68-75.

Fluit AC and Schmitz FJ. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 10, 272-288.

Fonseca EL, Vieira VV and Vicente ACP. (2006). Diversity of integron arrangements and occurrence of new gene cassettes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Brazil. GenBank accession no. DQ139277. Unpublished.

Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P. (2001). Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol.* 39(1):175-82.

Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M and Nordmann P. (2002). Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis.* 34, 603–11.

Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, et al. (2007). Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *J Clin Microbiol.* 45, 241-3.

Hall RM and Collis CM. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 15, 593–600.

Hopkins JD, Flores A, del Pilar Pla M, Lester S & O'Brien TF. (1991). Nosocomial spread of an amikacin resistance gene on both a mobilized, nonconjugative plasmid and a conjugative plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1605–11.

Jayanetra P, Lulitanond A, Leelarasamee A, Janyapoon K, Chongthaloeng A, Naweewitpadung K. (1994). A study of antimicrobial resistance among gram-negative bacteria in patients hospitalized in the ICU of university hospitals. *J Infect Dis Antimicrob Agent.* 11, 9-11.

Khosravi Y, Tay ST & Vadivelu J. (2010). Metallo beta-lactamase-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia: detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2, and VIM-11. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 67, 294-66.

Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. (2005). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis.* 9, 216-24.

Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(1): 185-91.

Li XZ, Poole K. and Nikaido H. (2003). Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agent Chemother.* 47, 27–33.

Mahillon J and Chandler M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 725-74.

Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(6):1568-74.

National Nosocomial Infection Surveillance System. (2004). National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*, 32, 470-85.

National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Percent susceptibility. Retrieved June 1, 2009, from <http://narst.dmsc.moph.go.th/>.

Ozgunum OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K & Koksai I. (2007). Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo beta-lactamase gene in a university hospital in Turkey. *Microb Drug Resist.* 13, 191-8.

Phongpaichit S, Liamthong S, Mathew AG, Chethanond U. (2007). Prevalence of class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* from pigs and pig farmers in Thailand. *J Food Prot.* 70 (2): 292-9.

Phongpaichit S, Wuttananupan K, Samasanti W. (2008). Class 1 integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* isolates from human stools. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 39 (2): 279-87.

Quinteira S, Sousa J.C and Peixe L. (2005). Characterization of In100, a new integron carrying a metallo-beta-lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. . *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 451–3.

Ratkai C, Quinterira S, Grosso F, Nagy E and Peixe L. (2008). Characterization of class I integrons from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Hungary. GenBank accession no. EU746497. Unpublished.

Recchia GD and Hall RM. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol*, 141, 3015-3027.

Rhomberg PR, Deshpande LM, Kirby JT and Jones RN. (2007). Activity of meropenem as serine carbapenemase sevelve in US Medical Centers: monitoring report from the MYSTIC Program (2006). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59. 425–32.

Riccio ML, Docquier JD, Dell'Amico E, Luzzaro F, Amicosante G and Rossolini GM. (2003). Novel 3-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 1746-8.

Rojas L, Vinuesa T, Tubau F, Truchero C, Benz R and Vinas M. (2006). Integron presence in a multiresistant *Morganella morganii* isolate. *Int J Antimicrob Agents.* 27, 505-12.

Rowe-Magnus DA and Mazel D. (1999). Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol.* 2(5): 483-8.

Rowe-Magnus DA and Mazel D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol.* 292(2):115-25.

Santos C, Caetano T, Ferreira S and Mendo S. (2010). Tn5090-like class 1 integron carrying *bla_{VIM-2}* in a *Pseudomonas putida* strain from Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 16, 1558-61.

Shahcheraghi F, Badmasti F and Nikbin V. (2010). Molecular characterization of class 1 integrons in MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical settings in Iran, Tehran. *FEMS Immuno Med Microbiol.* 58, 421-5.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 41(12): 5407-13.

Sritippayawan S, Sri-singh K, Prapphal N, Samransamruajkit R and Deerojanawong J. (2008). Multidrug-resistant hospital-associated infections in a pediatric intensive care unit: a cross-sectional survey in a Thai university hospital. *Int J Infect Dis.* 13, 506-12.

Thongpiyapoom S, Narong MN, Suwalak N, Jamulitrat S, Intaraksa P, Boonrat J, et al. (2004). Device-associated infections and patterns of antimicrobial resistance in a medical-surgical intensive care unit in a university hospital in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 87, 819-24.

Whittle G and Salyers AA. (2002). Bacterial transposons-an increasingly diverse group of elements. In Streips UN & Yasbin RE (eds.), *Modern microbial genetics* (2nd ed., p.404). New York: Wiley-Liss

Yan H, Shi L, Yamasaki S, Li X, Cao Y, Li L, et al. (2007). A plasmidic class 1 integron from five *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains harbored *aacA4* and nonsense-mutated *cmIA1* gene cassettes. *J Health Sci.* 53, 750-5.

Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Tailor F, et al. (2008). Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 1430-7.

