

การประเมินประสิทธิภาพ Multiplex Real-time PCR panel  
สำหรับการตรวจหาชนิดของเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด  
Evaluation of Multiplex Real-time PCR panel to  
detect antimicrobial resistance genes for  
bloodstream infection



กษิติเดช ชื่นชม  
กัลยา กระต่ายเพชร  
จันทิมา รักษาธรรม

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Evaluation of Multiplex Real-time PCR panel to  
detect antimicrobial resistance genes for  
bloodstream infection



Kasidach chuenchom  
Kanlaya Krataipech  
Jantima Raksatham

COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE  
REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTIAL MICROBIOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE





KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสวงวนเวสสำหรับกรเซงงานเพอการศกษาเท่านั้น ไม่นุญาดเหนาไปเซประยชนดานการค้ำ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อกทั้งห้ามมิให้ดัดแอสองเอกสารทุกคร้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2023

หัวข้อสหกิจศึกษา	การประเมินประสิทธิภาพ Multiplex Real-time PCR panel สำหรับการตรวจหายีนดื้อยาต่อเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด Evaluation of Multiplex Real-time PCR panel to detect antimicrobial resistance genes for bloodstream infection
ชื่อนักศึกษา	นาย กชิต์เดช ชื่นชม รหัสนักศึกษา 63050444 นางสาวกัลยา กระจ่ายเพชร รหัสนักศึกษา 63050446 นางสาวจันทิมา รักษาธรรม รหัสนักศึกษา 63050452
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.นิลเนตร อัครวะศิริจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ร.อ.หญิง พิมพ์วรรณ ทองดี (อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า)

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ร.อ.หญิง พิมพ์วรรณ ทองดี ประธานกรรมการ	
พ.อ.ผศ. ธนิต บุญศิริ กรรมการ	
ผศ.ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ผศ.ดร. นิลเนตร อัครวะศิริจินดา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจ	การประเมินประสิทธิภาพ Multiplex Real-time PCR panel สำหรับการตรวจหาเชื้อดื้อยาต่อเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด
ชื่อนักศึกษา	นายกษิต์เดช ชื่นชม รหัสนักศึกษา 63050444
	นางสาวกัลยา กระจ่างเพชร รหัสนักศึกษา 63050446
	นางสาวจันทิมา รักษาธรรม รหัสนักศึกษา 63050452
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ร.อ.หญิง พิมพ์วรรณ ทองดี (อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า)

### บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Resistance, AMR) กำลังเป็นปัญหาที่สำคัญด้านสาธารณสุขทั่วโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนารวมถึงประเทศไทย ภาวะดื้อยาในกระแสเลือดเป็นภาวะวิกฤตและฉุกเฉินที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วย โดยพบอัตราการเสียชีวิตสูงสุด 1 ใน 5 ของอัตราการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก การใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อเพิ่มโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยาได้มากขึ้นทุกครั้งที่มีการใช้ยาอย่างฟุ่มเฟือยและไม่เหมาะสม การรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็วจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ดังนั้น สหกิจศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการประเมินประสิทธิภาพ Multiplex Real-time PCR panel สำหรับการตรวจหาเชื้อดื้อยาต่อเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด โดยตัวอย่างที่ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 35 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากสิ่งแวดล้อม 28 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 5 ตัวอย่าง และใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานเป็นตัวควบคุม (negative control) 2 ตัวอย่าง มาจำลองการติดเชื้อในกระแสเลือด เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบหาเชื้อดื้อยาด้วย QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge กับวิธี Conventional PCR พบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันทั้งหมด 12 ตัวอย่าง, ผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องกันทั้งหมด 18 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อดื้อยาทั้งหมด 3 ตัวอย่าง เนื่องจากใน Panel ไม่ครอบคลุมการตรวจยีนนั้นๆ จากการประเมินพบว่า QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge มีค่า Sensitivity, Specificity, Positive

predictive value และ Negative predictive value เท่ากับ 90.90%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ จากผลการทดสอบที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน เนื่องจาก QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR

Panel Cartridge สามารถตรวจพบยีนได้มากกว่าซึ่งอาจเกิดจากความไวที่สูงกว่าเนื่องจากวิธีนี้ใช้เทคนิค real-time PCR หรืออาจเกิดจากความแตกต่างของ primer ที่ใช้ทดสอบ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหายีนดื้อยาของแบคทีเรียในการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในการตรวจหายีนดื้อยาบางชนิด ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาชุดตรวจให้ครอบคลุมชนิดของยีนดื้อยาต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีการพบได้บ่อยในประเทศไทยนั้นๆ นอกจากนี้การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพอาจยังคงมีความจำเป็นเพื่อยืนยันการแสดงผลของยีนดื้อยาที่พบในแบคทีเรียชนิดนั้นๆ

คำสำคัญ : การดื้อยาต้านจุลชีพ, ยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรีย, ติดเชื้อในกระแสเลือด, QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge, QIAstat-Dx Analyzer 1.0, Multiplex Real-time PCR panel



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Evaluation of Multiplex Real-time PCR panel to detect antimicrobial resistance genes for bloodstream infection
<b>Students</b>	Mr. Kacidach chuenchom Student ID 63050444 Miss Kanlaya Krataipech Student ID 63050446 Miss Jantima Raksatham Student ID 63050452
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Industrial microbiology)
<b>Department</b>	Biology
<b>School</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Academic Year</b>	2023
<b>Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Nilnate Assavasirijinda
<b>Co-Advisor</b>	Capt. Pimwan Thongdee (Instructor, Department of Microbiology Phramongkutklo College of Medicine)

### Abstract

At present, antimicrobial resistance (AMR) is a major public health problem around the world and tends to keep rising, especially in developed and developing countries including Thailand. Sepsis is a crisis and emergency that causes the death of patients with a high mortality rate of 1 in 5 of the global population. The use of inappropriate antimicrobial drugs to treat infections increases the chance of drug resistance in the microorganisms. Precise and rapid treatment is very important for patient management. Therefore, this cooperative study aims to evaluate of the Multiplex Real-time PCR panel to detect antimicrobial resistance genes for bloodstream infection. A total of 35 bacterial samples were used in this experiment which 28 samples from the environment, 5 samples from patients and 2 samples of standard strains of bacteria were used as controls (negative control) to simulate bloodstream infections. When comparing the results of the QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge with the Conventional PCR method, it was found that both methods gave 12 examples are consistent, 18 examples are inconsistent and 3 samples did not detect resistant genes because there was no panel. From the evaluation, it

was found that QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge had sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value valuable 90.90%, 100%, 100% and 100%, respectively. Which from the test results that give inconsistent results because QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge has high sensitivity due to this method based on real-time PCR or the difference of the primer in the panel. From our study, we suggests that QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge can detect antimicrobial resistance genes in bloodstream. However, it has limitations in the detection of some antimicrobial resistance genes. Therefore, the panel of this test kit should be designed to cover the various type of antimicrobial resistance genes that are highly prevalence in that country. Moreover, antimicrobial susceptibility tests might be required to confirm for phenotypic expression of detected antimicrobial resistance genes.

**Keywords** : Antimicrobial resistance, Bacterial resistance genes, Bloodstream infections, QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge, QIAstat-Dx Analyzer 1.0, Multiplex Real-time PCR panel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

สหกิจศึกษาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้รับความกรุณาและอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก ดร. นิลเนตร อัสวะศิริจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจ และ ผศ.ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์นิเทศสหกิจ ในการให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ ตลอดจนการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ร.อ.หญิง พิมพ์วรรณ ทองดี อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่อนุเคราะห์สำหรับเข้าฝึกปฏิบัติงาน ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ขอขอบคุณ พ.อ.ผศ.ธนิต บุญศิริ อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบพระคุณ พ.ท.หญิง พิราภรณ์ จันทนา วิวัฒน์ หัวหน้าแผนกจุลชีววิทยา กองพยาธิวิทยา รพ.พระมงกุฎเกล้า ที่คอยให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดการปฏิบัติสหกิจศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ขอขอบพระคุณ บริษัท Qiagen (ประเทศไทย) จำกัด ในการอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัย นอกจากนี้ยังมีผู้ที่มีความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้เขียนไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

กษิด์เดช ชื่นชม

กัลยา กระต่ายเพชร

จันทิมา รักษาธรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>3</b>
2.1 การดื้อยาต้านจุลชีพ.....	3
2.1.1 คำจำกัดความ.....	3
2.1.2 การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย.....	3
2.1.3 กลไกการดื้อยาต้านจุลชีพในแบคทีเรีย.....	3
2.1.4 สาเหตุของการดื้อยา.....	4
2.2 ยากลุ่ม Beta-lactam.....	4
2.2.1 Penams.....	4
2.2.2 Caphems.....	4
2.2.3 Cephamycins.....	4
2.2.4 Monobactams.....	4
2.2.5 Carbapenems.....	5
2.3 กลไกการดื้อยา Beta-lactam.....	5
2.4 ยากลุ่ม Aminoglycosides.....	5
2.4.1 Amikacin.....	6
2.4.2 Gentamicin.....	6
2.4.3 Kanamycin.....	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านธุรกิจ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4	Neomycin .....	6
2.4.5	Netilmicin .....	6
2.4.6	Paromomycin .....	6
2.4.7	Streptomycin .....	6
2.4.8	Tobramycin .....	6
2.5	กลไกการดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycosides.....	7
2.6	ยีนดื้อยา.....	7
2.6.1	กลไกการถ่ายโอนยีนดื้อยาปฏิชีวนะ .....	7
2.7	การติดเชื้อในกระแสเลือด .....	8
2.7.1	คำจำกัดความ.....	8
2.7.2	ปัจจัยที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ .....	8
2.8	<i>Enterobacteriales</i> .....	9
2.8.1	<i>Enterobacter</i> spp. ....	9
2.8.2	<i>Escherichia coli</i> .....	10
2.8.3	<i>Klebsiella</i> spp. ....	11
2.8.4	<i>Proteus</i> spp. ....	12
2.8.5	<i>Salmonella</i> ssp. ....	13
2.8.6	<i>Serratia</i> spp. ....	14
2.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
2.10	<i>Neisseria meningitidis</i> .....	16
2.11	<i>Haemophilus influenzae</i> .....	17
2.12	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex .....	18
2.13	<i>Bacteroides fragilis</i> .....	19
2.14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	19
2.15	Conventional Polymerase Chain Reaction.....	20
2.15.1	การสกัดแยกดีเอ็นเอ .....	20
2.15.2	เทคนิค PCR .....	21
2.15.2.1	องค์ประกอบในการทำ PCR .....	22
2.15.2.2	ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR .....	23
2.15.2.3	ข้อควรระวังในการทำ PCR การปนเปื้อน (Contamination) .....	23
2.15.3	Agarose gel electrophoresis .....	23
2.16	เทคนิค Multiplex Real-time PCR .....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นแต่กรณีที่ได้รับอนุญาตจากโรงเรียน และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.17 QIAstat-Dx® BCID GN Plus AMR Panel .....	24
2.17.1 QIAstat-Dx Analyzer 1.0 .....	27
2.17.2 QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge .....	27
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....</b>	<b>29</b>
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ .....	29
3.2 การเตรียมตัวอย่าง .....	29
3.3 การวิเคราะห์ยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในเลือด โดยคาร์ทริดจ์ BCID GN Plus AMR Panel Cartridge .....	30
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล .....	30
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....</b>	<b>31</b>
4.1 การเปรียบเทียบผลทดสอบยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียระหว่าง QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge และ วิธี Conventional PCR .....	31
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>38</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	38
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	39
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก .....	50
ภาคผนวก ก .....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย .....	25
2. แสดงยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย 3 กลุ่ม คือ ดื้อยาในกลุ่ม Penicillin, Cephalosporin ดื้อยาในกลุ่ม Carbapenem และ ดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycoside .....	26
3. แสดงการเปรียบเทียบผลทดสอบยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียที่สอดคล้องกันระหว่าง วิธี Conventional PCR และ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge .....	32
4. แสดงการเปรียบเทียบผลทดสอบยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สอดคล้องกันระหว่าง วิธี Conventional PCR และ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge .....	33
5. แสดงการเปรียบเทียบผลทดสอบยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียระหว่าง วิธี Conventional PCR และ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ที่ไม่มี Panel ยีนชนิดนั้นๆ .....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. การแยกชั้นของชั้นน้ำ ชั้นของโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และชั้นของตัวทำละลาย ..... 21	21
2. QIAstat-Dx Analyzer 1.0 ..... 27	27
3. QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ..... 28	28



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
AMR	Antimicrobial resistance
ATP	Adenosine triphosphate
PBP	Penicillin- binding protein
K	Potassium
ESBLs	Extended spectrum beta-lactamases
SHV	Sulfhydryl variable
TEM	Temoniera beta-lactamase
CTX-M	Cefotaximase
PER	Pseudomonas extended resistance beta-lactamas
GES	Guiana extended-spectrum beta-lactamase
VIM	Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase
IMP	Imipenemase
OXA	oxacillinases
CMY	cephamycinase
DHA	Docosahexaenoic Acid
MOX	Moxilin
FOX	Norfloxacin
ACC	Acetylcysteine
RND	Resistance-nodulation-cell division
MATE	Multidrug and toxic compoundextrusion
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
arm	Aminoglycoside resistance methylase
Adem	Acute disseminated encephalomyelitis
MexAB-OprM	Multidrug efflux protein expressed in the Gram-negative <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CRE	Carbapenem Resistant <i>Enterobacteriaceae</i>
IBC	Inflammatory breast cancer
VEB	Vietnamese extended-spectrum beta-lactamase
SFO	Sulfamethoxazole-Resistant dihydropteroate synthase.FoLP
KPCs	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasesที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
HAIs	Hospital-Acquired Infection
NDM	New Delhi metallo- beta-lactamase
bla	Beta-lactamases
PMQR	Plasmid-mediated quinolone resistance
qnr	Quinolone resistance
aac	Aminoglycoside 3-N-acetyltransferase
qepA	Quinolone efflux pump A
oqxA	Quinolone resistance protein
hvKp	Hypervirulent Klebsiella
MDR-Kp	Multidrug resistant Klebsiella
MDR-hv	Multidrug-resistant and hypervirulent <i>Klebsiella</i>
UTIs	Urinary tract infection
CARB	Carbencillinases
IRT	Ivacaftor Response Test
ESCs	Extended-spectrum cephalosporins
mcr	Mobilized colistin resistance
NTS	Non-typhoidal serovars of <i>Salmonella enterica</i>
LPS	Lipopolysaccharide
AmpC	AmpC beta-lactamase
FosA	Fosfomycin
SPM	Sao Paulo Metallo-beta-lactamas
GIM	Guiana extended-spectrum beta-lactamase and metallo-beta-lactamas
PDCs	Pseudomonas-derived cephalosporinases
OprD	Outer Membrane Porin D
MIC	Minimum inhibitory concentration
penA	penicillin-binding protein A
ROB	Robertsonian translocation
NTHi	Non-typeable <i>H. influenzae</i>
hib	<i>Hemophilus influenzae</i> type B
ftsl	Filamenting temperature-sensitive mutant Z

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่าในรูปแบบใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังขอสงวนสิทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและข้อความอ้างอิงจากเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
ABC	<i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> complex
ISAbal	Insertion Sequence common region A
sul	Sulfonamide
PCR	Polymerase chain reaction
DNAs	deoxyribonucleic acid
SYBR Green	SYnthetic Binding Rnabid dy Green
BSC	Biological Safety Cabinet
TSB	Tryptic soy broth
EBC	Exhaled breath condensate
TP	True Positive
FP	False Positive
TN	True Negative
FN	False Negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Resistance, AMR) กำลังเป็นปัญหาที่สำคัญด้านสาธารณสุขทั่วโลก พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนารวมถึงประเทศไทย (กระทรวงสาธารณสุข กรมอนามัย สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม, 2560) เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่มีทั้งเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในชุมชน โดยส่วนใหญ่เป็นโรคติดเชื้อในกระแสเลือด โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเกิดจากหลายส่วน เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปจนเกิดความจำเป็น การปล่อยน้ำหรือสารเหลือใช้จากสถานพยาบาลหรือโรงงานออกไป ส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (วรระฆมน จันทระเบญกุล และคณะ, 2562) จากรายงานสถานการณ์ AMR ทั่วโลกในปี 2562 มีผู้เสียชีวิตจำนวน 4.95 ล้านคน และ 1 ใน 5 ของการเสียชีวิตดังกล่าวเกิดขึ้นกับเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี นอกจากนี้สถานการณ์ AMR ในประเทศไทยปี 2562 มีผู้เสียชีวิตจาก AMR จำนวน 10,800 ราย และพบการเสียชีวิตที่เกี่ยวข้องกับ AMR 43,900 ราย (The Institute for Health Metrics and Evaluation, 2019)

ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นภาวะวิกฤตและฉุกเฉินที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วย โดยพบอัตราการเสียชีวิตสูงสุด 1 ใน 5 ของอัตราการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของผู้ป่วยในโรงพยาบาล และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น (โรงพยาบาลอินทบุรี, 2560) จากข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาล เชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อย เช่น *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* เป็นต้น (ภาณุมาศ ภูมาศและคณะ, 2555) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาต้านจุลชีพที่เป็นปัญหาทางการแพทย์และสาเหตุของโรคติดเชื้อในคนที่พบได้บ่อย เชื้อกลุ่มนี้มีการพัฒนาการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ทำให้การรักษาต้องใช้เวลาในการกำจัดเชื้อ (นิตยา อินทราวัฒนา และมฤติตา วนาภรณ์., 2558)

การใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อ ทำให้โอกาสการเกิดเชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้นทุกครั้งเมื่อมีการใช้ยา ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อโรคมักกลไกการปรับตัวเพื่ออยู่รอด (สุริยะ วงศ์คงคาเทพ และคณะ, 2564) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องในระยะแรกมีความสำคัญมาก เพราะการรักษาอย่างถูกต้องรวดเร็ว จะช่วยลดความรุนแรงของโรคและป้องกันการสูญเสียชีวิตได้ ดังนั้นการตรวจว่าเป็นเอกสารนี้การดื้อยาต้านจุลชีพ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ปรึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อประเมินประสิทธิภาพ Multiplex Real-time PCR panel สำหรับการตรวจหาเชื้อยีสต์ต่อเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ขอบเขตด้านประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ในการศึกษารั้งนี้ได้ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมจากแผนกโรคติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิต สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร จำนวน 28 ตัวอย่าง ตัวอย่างผู้ป่วยจากโรงพยาบาลพระมงกุฎและจากหมู่บ้านระเริง อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 5 ตัวอย่าง และแบคทีเรียที่ตรวจไม่พบยีสต์ยีสต์จำนวน 2 ตัวอย่าง

2) ขอบเขตด้านระยะเวลา ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2566 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2566

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพการตรวจโดยวิธี QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge
2. ทราบข้อจำกัดของการตรวจโดยวิธี QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 การดื้อยาต้านจุลชีพ

#### 2.1.1 คำจำกัดความ

การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial resistance: AMR) คือความสามารถของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา ในการเจริญเติบโตหรืออยู่รอดได้แม้สัมผัสกับยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นมากพอในการฆ่าหรือยับยั้งเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน หรือสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการป้องกัน และรักษาโรค (กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2559)

#### 2.1.2 การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย

แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียตั้งแต่กำเนิด (Intrinsic resistance) หมายถึง การดื้อยาที่เกิดจากความจำเพาะของแบคทีเรียที่ไม่มีส่วนประกอบที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพบางขนานตั้งแต่แรก
2. การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่เกิดภายหลัง (Acquired resistance) หมายถึง การดื้อยาที่มักเกิดจากแบคทีเรียเคยไวต่อยาต้านจุลชีพมาก่อนแล้วแบคทีเรียดังกล่าวกลายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพภายหลังสัมผัสกับยาต้านจุลชีพขนานที่แบคทีเรียเคยไวมาก่อน (วิชญ์ ธรรมลิขิตกุล, 2558)

#### 2.1.3 กลไกการดื้อยาต้านจุลชีพในแบคทีเรีย

แบ่งออกได้เป็น 4 กลไกหลัก ดังนี้

1. การขับยาออกนอกเซลล์ (Expression of efflux pump) แบคทีเรียใช้พลังงานจาก ATP ลำเลียงยาปฏิชีวนะที่เข้ามาในเซลล์ให้ออกไปนอกเซลล์ โดยอาศัยโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า efflux pump เป็นการลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะภายในเซลล์ ทำให้ยาไม่สามารถเข้าถึงเป้าหมายได้
2. การเปลี่ยนแปลงหรือการป้องกันตำแหน่งเป้าหมายของ (Alteration of protection antibiotic target) แบคทีเรียโดยสร้างเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงยาปฏิชีวนะหรือยอยาปฏิชีวนะทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้
3. การสร้างเอนไซม์มาทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยา (Enzymatic inactivation or modification of antibiotic) แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาปฏิชีวนะเข้าไปในเซลล์หรือเข้าไปได้

น้อยลง  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การลดการนำเข้าของยา (Limiting access of antibiotic) ลดการนำเข้าของยาต้านจุลชีพไม่ให้ยาต้านจุลชีพเข้าเซลล์ (สัจมาน ตรันเจริญ และอรัญญา ดวงบุ, 2565)

#### 2.1.4 สาเหตุของการดื้อยา

สาเหตุที่ทำให้คนไทยมีผู้ป่วยเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้นมีหลายสาเหตุ ทั้งจากพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสม (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2560) การที่ใช้ยามากเกินไปจนเชื้อพัฒนาให้สามารถต่อต้านได้ด้วยตัวเอง (รามามาแซนแนล, 2559)

## 2.2 ยากลุ่ม Beta-lactam

ยากลุ่ม beta-lactam มีโครงสร้างที่สำคัญ คือส่วนวงแหวน beta-lactam (beta-lactam ring) ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์สำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericides) โดยจับกับเอนไซม์ transpeptidase ซึ่งมีความสำคัญในการเชื่อม peptidoglycan บนผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายและยังจับกับ penicillin binding protein ที่เยื่อหุ้มเซลล์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ตามมา (มงคล เหล่าอารยะ, 2557)

**2.2.1 Penams** ได้แก่ penicillin จัดเป็นสารที่มี beta-lactam ring เป็นโครงสร้างพื้นฐาน ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์โดยจับกับ penicillin-binding-protein (PBP) ชนิด 1-3 ทำให้ไม่เกิด transpeptidation จึงไม่มีการสร้าง peptidoglycan ก่อให้เกิด autolysis ทำให้เซลล์แตก

**2.2.2 Cephems** ได้แก่ cephalosporin มีฤทธิ์ยับยั้งในการสร้างผนังเซลล์ชนิด PBP 1-3 ยากลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 4 รุ่น ตามการออกฤทธิ์กับแบคทีเรีย รุ่นที่ 1 ได้แก่ cephalothin, cefazolin ใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกบางชนิดแต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase รุ่นที่ 2 ได้แก่ cefuroxime มีประสิทธิภาพดีกว่า cephalosporins รุ่นที่ 1 คือ ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ทำให้มีการออกฤทธิ์กับเชื้อแกรมลบเพิ่มขึ้น รุ่นที่ 3 ได้แก่ cefpodoxime, ceftriaxone มีประสิทธิภาพดีใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก และ รุ่นที่ 4 ได้แก่ cefepime มีฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบและทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase

**2.2.3 Cephamycins** ได้แก่ 7-alpha-methoxy cephalosporins (เช่น cefoxitin)

**2.2.4 Monobactams** เช่น aztreonam เป็นยาในกลุ่ม beta-lactams ที่ออกฤทธิ์ ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแกรมลบ โดยยากลุ่มนี้ทนต่อการทำลายด้วย beta-lactamases การดื้อยาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aztreonam อาจพบในเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่สามารถสร้าง K1 beta-lactamases ไปทำลายยาได้

**2.2.5 Carbapenems** เช่น imipenem และ meropenem เป็นสารที่มี beta-lactam ring ที่ออกฤทธิ์กว้าง โดยยานี้สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีและทนต่อเอนไซม์ beta-lactamases รวมทั้ง extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)

## 2.3 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม Beta-lactam

สาเหตุหลักเกิดจากเชื้อสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (drug inactivation) คือ beta-lactamases โดยเอนไซม์ที่ทำลาย ring ของยาในกลุ่ม beta-lactams ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์กับเชื้อแบคทีเรียได้

เอนไซม์ beta-lactamases แบ่งตามลำดับ amino acid และ substrate ได้เป็น 4 classes คือ class A, B, C และ D enzyme เอนไซม์ beta-lactamases class A, C และ D เป็น serine beta-lactamases ส่วน class B เป็น metallo beta-lactamases

**class A beta-lactamases:** penicillinase และ cephalosporinase เช่น extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) เช่น SHV, TEM, CTX-M, PER และ GES เป็นต้น เอนไซม์ ESBLs เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่ม penicillins, cephalosporins รุ่นที่ 1, 2 และ 3 และ aztreonam (แต่ไม่ดื้อต่อ cephamycins หรือ carbapenems) โดยการ hydrolysis ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ และถูกยับยั้งได้โดย beta-lactamase inhibitors เช่น clavulanic acid

**B beta-lactamases:** metallo beta-lactamase ประกอบด้วยเอนไซม์ carbapenemases เช่น VIM และ IMP-type carbapenemase

**class C beta-lactamases:** chromosomal cephalosporinase สามารถย่อยสลายยาในกลุ่ม 3 cephalosporins ได้แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย caviarkc acid

**class D beta-lactamases:** oxacillinase นอกจากนี้ class D enzyme ยังมีคุณสมบัติเป็น plasmid cephalosporinase เช่น OXA CMY, DHA, MOX, FOX และ ACC (กฤติกา ดำมณี, 2558)

## 2.4 ยากลุ่ม Aminoglycosides

ยากลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ Gentamicin, Amikacin, Kanamycin และ Tobramycin โครงสร้างของยาประกอบด้วยหมู่ amino sugar หรือ non-amino sugar อย่างน้อย 2 หมู่ เชื่อมต่อกับ aminocyclitol ring ด้วยพันธะ glycosidic กลไกการออกฤทธิ์คือยับยั้งการสร้างโปรตีนไรโบโซม เอกสารนี้ที่หน่วยย่อย 30S (30S ribosomal subunit) ส่งผลให้ไรโบโซมทำงานผิดปกติ เซลล์ไม่สามารถสร้างไม่ว่าโปรตีนได้และตายในที่สุด โดยปกติจะประกอบด้วยอะตอมที่มี 2 ประจุ เช่น แมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) และ

แคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ดังนั้นยากลุ่ม aminoglycoside เป็นยาที่มีประจุบวกจะเข้าจับกับโมเลกุลที่มีประจุลบในชั้นผนังเซลล์ มีผลให้ยา มีอัตราการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น (Doi et al., 2016)

**2.4.1 Amikacin** ส่วนใหญ่มักจะใช้สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงคือยาหลายขนาน, แบคทีเรียแกรมลบ ใช้อากาศโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* และ *Serratia* มีเพียงแบคทีเรียแกรมบวกที่มีผลกระทบต่อ amikacin คือเป็นเชื้อ *Staphylococcus* และ *Nocardia* Amikacin ยังสามารถใช้รักษาการติดเชื้ออัมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ใช่วัณโรคและเป็นวัณโรค (Cunha, 2006)

**2.4.2 Gentamicin** ออกฤทธิ์โดยการจับกับ ribosome 30S ทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ผิดปกติ และส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียตาย ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (อารินี ชัชวาลชลธีระ และคณะ, 2556)

**2.4.3 Kanamycin** ออกฤทธิ์โดยจับกับ ribosome 30S ของเชื้อแบคทีเรียและรบกวนการสร้างโปรตีนใช้รักษาแบคทีเรียชนิดแกรมลบชนิดใช้ออกซิเจน ฤทธิ์จะลดลงในภาวะที่ขาดออกซิเจน และไม่มีผลต่อแบคทีเรียพวกไม่ใช้ออกซิเจน ถ้ายาที่มีความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นต่ำมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อต่ำ (ดา นิสาทวีதியานนท์ และคณะ, 2538)

**2.4.4 Neomycin** ที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย โดยจับกับ ribosome 30S ของแบคทีเรียซึ่งโดยทั่วไป neomycin ชนิดรับประทานมักใช้ในการรักษาการติดเชื้อของทางเดินอาหาร และใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ก่อนที่จะทำการผ่าตัดลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน และใช้ในการลดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอมโมเนียในการรักษาโรคตับหรือภาวะการทำงานของตับเสื่อมแล้วทำให้เกิดการทำงานของระบบประสาทเสื่อม นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในการรักษาตา หู และผิวหนัง ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคช่องหูส่วนนอกอีกเสบได้ (อารินี ชัชวาลชลธีระ และคณะ, 2554)

**2.4.5 Netilmicin** การออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้คือตัวยายไปจับกับ ribosome 30S ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดความผิดพลาดในการสังเคราะห์โปรตีนส่งผลให้แบคทีเรียหยุด การเจริญและตายในที่สุด

**2.4.6 Paromomycin** ตัวยายจะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยเข้าไปจับกับ RNA 16s ribosomal RNA ทำให้เชื้ออะมีบาและพยาธิที่ตอบรับกับยานี้หยุดการแพร่พันธุ์และตายลงในที่สุด (อภิัย ราชภฏวจิตร, 2563)

**2.4.7 Streptomycin** ตัวยายจะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในตัวแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต ไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้และตายลง (อภิัย ราชภฏวจิตร, 2564)

**2.4.8 Tobramycin** ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย โดยเข้าจับกับหน่วยย่อย ribosome 30s ของแบคทีเรียทำให้ mRNA ไม่สามารถแปลรหัสพันธุกรรมเพื่อสร้างโปรตีนที่จำเป็นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อการดำรงชีวิตและการเพิ่มจำนวนได้ ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรีนั้นๆตายในที่สุด (อภัย ราชภูริจิตร, 2557)

## 2.5 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม Aminoglycosides

กลไกการต้านทานของแบคทีเรียต่อ aminoglycoside นั้นมีความหลากหลายที่พบมากที่สุดคือการยับยั้งการทำงานของ aminoglycoside โดยกลุ่มเอนไซม์ชื่อ AMEs นอกจากนี้การต้านทาน aminoglycoside สามารถทำได้โดยการกลายพันธุ์ของ ribosome เป้าหมายและโดยทั่วไปการดัดแปลง ribosome โดยกลุ่มเอนไซม์ ribosomal methyltransferase ผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกัน และความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรียอาจเพิ่มขึ้นด้วย การเปลี่ยนแปลงไขมันทำให้เกิดการผลึกกันของ aminoglycoside นอกจากนี้แม้ว่า aminoglycoside จะเข้ามาก็เซลล์แบคทีเรียมาแล้วก็ตาม แต่ความเข้มข้นระหว่างเซลล์ยังคงต่ำเนื่องจากการขับ aminoglycoside ออกจากเซลล์โดย efflux pumps (Tsodikovaa and Labbyb, 2016)

## 2.6 ยีนดื้อยา

### 2.6.1 กลไกการถ่ายโอนยีนดื้อยาปฏิชีวนะ

แบ่งออกเป็น 3 กลไก ดังนี้

1. Conjugation เป็นการถ่ายทอดสารพันธุกรรมหรือพลาสมิดที่มียีนดื้อยา โดยแบคทีเรียมาสัมผัสกัน และมีการถ่ายทอดพลาสมิดผ่านทาง pili หรือ adhesins การถ่ายทอดลักษณะนี้จะเกิดระหว่างแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกัน ส่งผลให้แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่มียีนดื้อยาปฏิชีวนะ เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะขึ้น
2. Transformation เป็นการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียที่มียีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียที่ไม่มียีนดื้อยา โดยสารพันธุกรรมจะถูกปล่อยออกมานอกแบคทีเรียและเข้าไปสู่แบคทีเรียอีกเซลล์ ซึ่งสภาพแวดล้อมรอบแบคทีเรียต้องเหมาะสม การถ่ายทอดสารพันธุกรรมลักษณะนี้เกิดได้ทั้งในแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์
3. Transduction เป็นการเคลื่อนย้ายยีนดื้อยาจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่ง โดยอาศัยไวรัสของแบคทีเรีย (อารยา ข้อคำ, 2563)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 การติดเชื้อในกระแสเลือด

### 2.7.1 คำจำกัดความ

การติดเชื้อในกระแสเลือด คือ การติดเชื้อที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของร่างกาย เชื้อดังกล่าว ได้แก่ จุลชีพต่างๆ เช่น เชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา (อังคณา เกียรติมานะโรจน์, 2564) เชื้อโรคที่มักคือยาปฏิชีวนะ (ยาด้านจุลชีพ) ได้บ่อยและเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญ คือ แบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียมีจำนวนหลายชนิด แบคทีเรีย อาศัยอยู่ทุกแห่งทั้งในคน สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียในคนและสัตว์มักอาศัยอยู่ในลำไส้ ช่องปาก และผิวหนัง โดยแบคทีเรียหลายชนิดมีประโยชน์ต่อร่างกาย และแบคทีเรียหลายชนิดสามารถก่อโรคติดเชื้อได้ (วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, 2557) โดยการติดเชื้อที่อวัยวะต่างๆของร่างกายจะทำให้สามารถเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ เมื่อมีการติดเชื้อในกระแสเลือด ร่างกายของเราจะมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการติดเชื้อหรือต่อพิษของเชื้อโรค ซึ่งจะทำให้เกิดการอักเสบขึ้นทั่วบริเวณของร่างกาย หากมีความรุนแรงมากอาจพัฒนาสู่ภาวะช็อกและทำให้การทำงานของอวัยวะภายในต่างๆ ล้มเหลว มีอันตรายถึงชีวิต จึงจำเป็นต้องได้รับการรักษาอย่างทันที่หัวใจของการดูแลรักษา คือ ความรวดเร็วในการคัดกรองอาการของผู้ป่วยให้ได้รับการตรวจวินิจฉัยและการดูแลรักษาทันที เช่น การให้ยาปฏิชีวนะทันทีภายใน 1 ชั่วโมง (อังคณา เกียรติมานะโรจน์, 2564)

### 2.7.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดนั้นมี 3 ปัจจัย ดังนี้

- 1) ความเจ็บป่วย เมื่อร่างกายอ่อนแอและภูมิคุ้มกันต่ำก็จะทำให้ไม่สามารถต่อสู้กับเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ
- 2) ผู้ที่มีโรคประจำตัว เช่น โรคตับแข็ง เนื่องจากตับจะเป็นตัวกรองเชื้อโรคไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย เมื่อตับไม่สามารถทำงานได้ เชื้อโรคก็จะสามารถผ่านเข้าไปในกระแสเลือดได้ง่ายขึ้น หรือเป็นโรคเบาหวาน เนื่องจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ที่เป็นเบาหวานจะทำให้มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีหน้าที่ต่อสู้กับเชื้อโรคเสียไป นอกจากนี้ในเด็กเล็กและผู้สูงอายุจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในกระแสเลือดได้มากกว่าคนหนุ่มสาวแม้ว่าไม่มีโรคประจำตัว เนื่องจากมีภูมิคุ้มกันต่ำ
- 3) สาเหตุอื่นๆ เช่น การรักษาผู้ป่วยโดยการใช้อุปกรณ์ต่างๆ เข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย ได้แก่ การสวนทวาร การสวนปัสสาวะ และการใช้สายสวนหลอดเลือด ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น (อังคณา เกียรติมานะโรจน์, 2564)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 Enterobacterales

คือ ลำดับ (Order) ของแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และมีรูปร่างคล้ายแท่งที่หลากหลาย ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียจำนวนมากที่แพร่เชื้อไปยังผู้คน ลำดับ *Enterobacterales* ประกอบด้วยวงศ์ *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae*, *Yersiniaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae* และอื่น ๆ ตัวอย่างของเชื้อโรคในลำดับ *Enterobacterales* ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. เป็นต้น

*Enterobacterales* หลายชนิดจำเป็นสำหรับการย่อยอาหารและจะไม่เป็นอันตรายเมื่อมีอยู่ในทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเหล่านี้อาจทำให้เกิดการติดเชื้อร้ายแรงเมื่ออยู่นอกระบบทางเดินอาหาร บางสายพันธุ์ของลำดับ *Enterobacterales* อาจเกิดความต้านทานต่อกุ่มยาปฏิชีวนะที่เรียกว่า carbapenems สิ่งเหล่านี้เรียกว่า *Enterobacterales* ที่ทนต่อ carbapenem (CRE) (Adeolu et al., 2016)

### 2.8.1 *Enterobacter* spp.

แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน อยู่ในสกุล *Enterobacter* มีแบคทีเรียก่อโรคและดื้อยาที่สำคัญได้รับการอธิบายครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 สมาชิกกลุ่มนี้ได้รับการพิสูจน์ว่ามีความซับซ้อนมากขึ้น อันเนื่องมาจากการวิวัฒนาการที่เพิ่มมากขึ้นทางจีโนมโทปและพีโนโทป ปัจจุบันนี้มี 22 สปีชีส์อยู่ในสกุล *Enterobacter* สปีชีส์เหล่านี้ได้รับการรายงานว่าเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสในพืช สัตว์ และมนุษย์ ความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของแบคทีเรียนี้ยังไม่ค่อยชัดเจน เนื่องจากปัจจุบันมีการดำเนินงานในสาขานี้จำนวนจำกัด ในทางตรงกันข้าม มีการศึกษาความต้านทานต่อสารต้านจุลชีพอย่างกว้างขวางเมื่อรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะสามารถจัดการกลไกการดื้อยาที่แตกต่างกันผ่านยีนควบคุมที่หลากหลายและปรับการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ รวมถึงเอนไซม์ (beta-lactamases) หรือตัวขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น พอริน และปั๊มขับยา (Regli et al., 2019) ชนิดของ *Enterobacter cloacae* complex พบได้อย่างกว้างขวางในธรรมชาติ ประกอบด้วย 6 สายพันธุ์: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* และ *Enterobacter nimipressuralis*

*E. cloacae* เป็น *Enterobacter* spp. ที่พบมากที่สุด ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อเหล่านี้ในทางตรงกันข้าม มีการตีพิมพ์จำนวนมากเกี่ยวกับคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์เหล่านี้ ในความเป็นจริง เชื้อเหล่านี้มีความสามารถในการผลิต AmpC beta-lactamases มากเกินไป การศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวกับความไวต่อยาต้านจุลชีพมุ่งเน้นไปที่ *E. cloacae*, *E. hormaechei* และ *E. asburiae* (Mezzatesta et al., 2012) การดื้อยาของ *Enterobacter* spp. ต่อยาปฏิชีวนะ beta-lactam เกิดจากการผลิตมากเกินไปของ chromosomal

AmpC beta-lactamase ในทศวรรษที่ผ่านมา การผลิตพลาสมิดเป็นสื่อกลางให้ extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) ได้รับการยอมรับว่าเป็นกลไกที่สำคัญเพิ่มเติมในการต้านทานสมาชิกในวงศ์ Enterobacteriaceae รวมถึงเชื้อทางคลินิกของ *Enterobacter* spp. ESBL ที่พบบ่อยที่สุดในเชื้อ *Enterobacter* spp. ที่แยกได้ทางคลินิก คือ TEM, SHV และ CTX-M ที่อยู่ในกลุ่ม beta-lactamases อย่างไรก็ตาม เมื่อเร็ว ๆ นี้ ESBL อื่น ๆ เพิ่งได้รับการรายงานใน *Enterobacter* spp. รวมถึง IBC-1 ซึ่งตรวจพบใน *Enterobacter cloacae* ที่แยกได้ในกรีซ VEB-1 ซึ่งพบในเชื้อ *E. cloacae* และ *Enterobacter sakazakii* ที่แยกได้ทางคลินิกในกรุงเทพฯ ประเทศไทย และ SFO-1 ซึ่งตรวจพบในเชื้อ *E. cloacae* ที่แยกได้ในญี่ปุ่น ความชุกของ ESBLs ในวงศ์ Enterobacteriaceae อาจแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ (Schlesinger et al., 2005) การศึกษาทั่วโลกรายงานว่าการดื้อยา carbapenem ใน *E. cloacae* complex นี้ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการผลิต *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs) สถาบันสุขภาพแห่งชาติในโคลอมเบีย รายงานว่าระหว่างปี 2012 ถึง 2018 90% ของเชื้อที่แยกได้ซึ่งก่อให้เกิด HAIs มีความทนทานต่อ carbapenems ในจำนวนนี้ 17% เป็นเชื้อ *E. cloacae* complex ที่แยกได้ ซึ่งเป็นอันดับสองที่มีการรายงานบ่อยที่สุด 94% ของสิ่งเหล่านี้ต้านทาน carbapenems และ 67% ผลิต KPC ตามด้วย VIM 3.5% และ NDM 2.2% สิ่งนี้เน้นถึงความสำคัญของ *E. cloacae* ที่ผลิต KPC ในโคลอมเบีย (Falco et al., 2021)

### 2.8.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* หรือ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคืบ พบมากในอุจจาระแต่ไม่พบในปัสสาวะ (เกษร เทพแบ่ง, 2561) โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่รับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ *E. coli* ลูกล่า เข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น และมีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารหรือน้ำดื่ม ทั้งนี้ เชื้อ *E. coli* ที่สามารถก่อโรคอุจจาระร่วง (Diarrheagenic *E. coli*) จะมีกลไกการก่อโรคและสามารถสร้างสารพิษได้แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น เชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ enterotoxin ทำให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ หรือเชื้อ Enterohaemorrhagic *E. coli* ที่สร้างสารพิษ Shiga ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด ก่อให้เกิดกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตกและไตวายเฉียบพลัน (กระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2557)

การดื้อยาหลายขนาดในเชื้อ *E. coli* กลายเป็นปัญหาที่น่ากังวลซึ่งพบได้มากขึ้นในมนุษย์และสัตว์แพทย์ศาสตร์ทั่วโลก ซึ่งเชื้อ *E. coli* มีความไวต่อสารต้านจุลชีพที่เกี่ยวข้องทางคลินิกเกือบไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมด แต่เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการสะสมยีนดื้อยาได้ดี โดยส่วนใหญ่เกิดจากการถ่ายทอดยีนในแนวนอน (horizontal gene transfer) ในวงศ์ Enterobacteriaceae เชื้อ *E. coli* ทำหน้าที่เป็นผู้ให้และผู้รับยีนดื้อยา ดังนั้นจึงสามารถได้รับยีนดื้อยาจากแบคทีเรียชนิดอื่น แต่ยังสามารถส่งต่อยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ กลไกที่เป็นปัญหามากที่สุดของ *E. coli* คือการสร้าง extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) (Polrel et al., 2018) ESBLs คือ เอนไซม์เบต้าแลคทาเมสชนิดขยายเอนไซม์นี้สามารถสลายยาในกลุ่ม beta-lactams ได้แก่ Penicillins, Narrow-spectrum extended-spectrum cephalosporin และ Monobactams (บุญชูธรรม วัชรอุตสาห, 2558) การดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์แต่ลักษณะที่ปรากฏออกมาอาจเป็นผลจากการที่เชื้อมียีนที่ควบคุมการดื้อยาด้านจุลชีพพร้อมด้วย ซึ่งยีนที่ควบคุมการดื้อยาของเชื้อที่พบบ่อย ได้แก่ beta-lactamase class A ประกอบด้วยยีนกลุ่ม CTX-M, SHV และ TEM ที่พบได้บนพลาสมิด โดยยีนที่อยู่บนพลาสมิดนี้สามารถส่งผ่านไปยังเชื้อชนิดเดียวกันหรือเชื้อต่างสายพันธุ์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันได้ ทำให้เกิดเชื้อดื้อยาแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว (วนารัตน์ บารมีรังสิกุล และคณะ, 2561)

จากรายงานการศึกษาการระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลทั่วโลกของเชื้อ *E. coli* ที่ผลิต carbapenemase จาก 36 ประเทศ ในช่วงปี 2558-2560 carbapenemase ที่พบบ่อยที่สุดคือ OXA-48 (44%) รองลงมาคือ NDM (32%), KPC (21%), VIM (2%) และ IMP (1%) (Peirano et al., 2022) และ การศึกษาที่เปรียบเทียบ AmpC ที่เข้ารหัสด้วยพลาสมิด จากเชื้อ *E. coli* ในเนื้อสัตว์ปีกและเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมนุษย์ พบไอโซเลตที่มี ยีน AmpC (*bla*<sub>CMY-2</sub>) ที่อยู่บนพลาสมิดประเภทเดียวกัน การค้นพบยีนต้านทานและพลาสมิดชนิดเดียวกันบนเนื้อสัตว์ปีกและในมนุษย์อาจสะท้อนถึงการแพร่กระจายที่ซับซ้อนมากกว่าการแพร่เชื้อจากอาหาร เช่น ผ่านการปนเปื้อนของสิ่งแวดล้อม (Voets et al., 2013) และพบยีน plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) 6 ยีน (*qnrB*, *qnrS*, *aac(6)*'lb-cr, *qepA*, *oqxA* และ *oqxB*) ที่เป็นสื่อกลางในการต้านทาน fluoroquinolones ทั้ง *E. coli* และ *Klebsiella* spp. ทำให้เกิดความต้านทาน fluoroquinolones ในระดับต่ำ (Kariuki et al., 2023)

### 2.8.3 *Klebsiella* spp.

*Klebsiella* spp. เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ มีแคปซูล ไม่เคลื่อนที่ มีรูปร่างเป็นแท่ง อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae แพร่หลายในธรรมชาติและสามารถพบได้ใน น้ำผิวดิน ดิน บนพืช และในลำไส้ของมนุษย์ที่มีสุขภาพดีและสัตว์ต่างๆ เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสที่มักพบในจมูก คอ ผิวหนัง และลำไส้ของคนที่มีสุขภาพดี แต่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลายชนิด เช่น ปอดอักเสบ เนื้อเยื่ออ่อน และแผลผ่าตัด การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด และการติดเชื้อแบคทีเรียสกุล *Klebsiella* ประกอบด้วยสปีชีส์ที่หลากหลาย (Dong et al., 2022) รวมถึง *Klebsiella pneumoniae* species complex KpSC ประกอบด้วย *K. pneumoniae* sensu stricto, *K. quasipneumoniae* quasipneumoniae, *K. variicola* subsp. variicola, *K. quasipneumoniae*

*similipneumoniae*, *K. variicola* subsp. *K. quasivariicola* และ *K. Africana* ซึ่ง *Klebsiella* เป็นที่รู้จักกันดีในด้านความสามารถในการรับสารพันธุกรรมผ่านทาง การถ่ายโอนยีนแนวราบ และการ ได้มาขององค์ประกอบทางพันธุกรรมได้นำไปสู่การพัฒนา กลุ่ม *Klebsiella* สองกลุ่มคือ hypervirulent Kp (hvKp) และ multidrug resistant Kp (MDR-Kp) *Klebsiella* เป็นเชื้อประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และแสดงถึงความเสี่ยงที่สำคัญสำหรับการพัฒนาในภายหลัง ในการติดเชื้อในบุคคลที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถแยกสายพันธุ์ ได้จากอาหารและสิ่งแวดล้อมที่มีลักษณะคล้ายกับสายพันธุ์ทางคลินิก การบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนคือสาเหตุที่เป็นไปได้ของการติดเชื้อทางเดินอาหาร

*Klebsiella* ได้รับการศึกษาเป็นอย่างมาก จากการศึกษาพบว่า *Klebsiella* มีความชุกในสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมากโดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางทะเล ซึ่ง *Klebsiella* spp. มีช่องทางการแพร่เชื้อ ได้หลายเส้นทางต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น ผ่านจากดินและน้ำเสีย ที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมทางทะเล (Håkonsholm et al., 2022) *Klebsiella* spp. ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการได้รับ องค์ประกอบทางพันธุกรรมและการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพหรือลักษณะของ ความรุนแรง ซึ่งเรียกว่า multidrug-resistant and hypervirulent (MDR-hv) *Klebsiella* spp. MDR-hv *Klebsiella* spp. มีความรุนแรงสูงและต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ด้วยยีน NDM (NDM-1, NDM-5, and NDM-7), IMP, SIM, VIM (VIM-1 and VIM-2), และ OXA-48 ก่อให้เกิดการ ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Dong et al., 2022)

#### 2.8.4 *Proteus* spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ที่อยู่ใน *Enterobacteriales* ที่พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และยังแพร่หลายในดินและน้ำในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมาจากการปนเปื้อนในอุจจาระ ได้รับการยอมรับทางการแพทย์มากที่สุดว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ปัจจุบัน สกุล *Proteus* ประกอบด้วย *P. mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus cibarius*, *Proteus terrae* และ *Proteus hauseri* ซึ่ง *P. mirabilis* เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้บ่อยที่สุดจาก ตัวอย่างทางคลินิก โดย 90% มาจากการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (UTIs) แต่ยังมีมาจากการติดเชื้อนอก ลำไส้ด้วย เช่น ระบบทางเดินหายใจ ตา หู จมูก ผิวหนัง แผลไหม้ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกอักเสบ และการติดเชื้อที่บาดแผล *P. mirabilis* และ *P. vulgaris* มีความทนทานต่อ polymyxins (colistin), nitrofurans, tigecycline และ tetracycline โดยธรรมชาติ *P. mirabilis* ไม่ผลิต beta-lactamase ที่เข้ารหัสด้วยโครโมโซมใดๆ ส่งผลให้มีความไวต่อ beta-lactam ทั้งหมดอย่างสมบูรณ์

ปัจจุบัน *P. mirabilis* ที่แยกได้ ได้รับการอธิบายด้วยยีนต้านทานที่ได้มาหลายตัวที่เข้ารหัสด้วย narrow spectrum beta-lactamases TEM, SHV, CARB, IRT (อนุพันธ์ TEM ที่ดื้อต่อสารยับยั้ง), ได้รับ cephalosporinase CMY, ACC-1, ESBL ประเภท TEM/SHV, CTX-M, VEB, PER, carbapenemases ความชุกของ carbapenemases ใน *P. mirabilis* ยังคงต่ำ แต่มีแนวโน้มที่จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้วางใจใช้ประโยชน์ในกรณีใดๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นทั่วโลก เมื่อเวลาผ่านไป KPC-2 carbapenemase ใน *P. mirabilis* ได้รับการรายงานครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาในปี 2008 มีการศึกษาบางส่วนจากประเทศจีน 2010 และบราซิล 2015 การได้มาของยีน metallo-beta-lactamase เช่นยีน *bla<sub>VIM-like</sub>* เกิดขึ้นในกรีซในปี 2006 ในอิตาลีปี 2008 และล่าสุดในบัลแกเรีย มีรายงาน *P. mirabilis* ที่ผลิต IMP ได้รับการระบุจากการศึกษาในสหรัฐอเมริกา และพบ *P. mirabilis* ที่แยกได้ ผลิต OXA-48 นั้นมาจากนอกจากนี้พบ OXA carbapenemases บางชนิด เช่น OXA-23 หรือ OXA-58-type ที่มีต้นกำเนิดจาก *Acinetobacter* spp. ตอนนี้กำลังเกิดขึ้นในเชื้อ *P. mirabilis* ที่แยกได้ (Girlich et al., 2020)

### 2.8.5 *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* เคลื่อนที่โดยอาศัยแส้รอบตัว (peritrichous flagella) และอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ (Mthembu et al., 2021) เจริญได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน (Giannella, 1996) เชื้อ *Salmonella* สามารถติดต่อจากสัตว์มาสู่คนและสัตว์อื่นๆ เช่น หนู สัตว์ปีก แมลง วัว ควาย สุนัข แมว และม้า สำหรับการติดเชื้อในคนนั้นส่วนมากจะได้รับเชื้อมาจากน้ำและอาหาร และบางครั้งอาจเกิดจากสัตว์เลี้ยงที่อาศัยตามบ้านเรือน ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ที่เรียกว่า salmonellosis อาการจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนแล้วประมาณ 6-48 ชั่วโมง และจะมีอาการอยู่ในระหว่าง 1-5 วัน เมื่อร่างกายเราได้รับเชื้อ *Salmonella* เข้าสู่ร่างกาย เชื้อโรคจะมุ่งเข้าสู่เซลล์น้ำเหลืองของลำไส้เล็กและจะเจริญแบ่งตัวที่นั่นในขณะนี้จะยังไม่มีอาการอะไร เป็นระยะฟักตัว ต่อมาเชื้อจะแพร่เข้าสู่กระแสเลือดและกระจายต่างๆของร่างกาย ผู้ป่วยจะเริ่มแสดงอาการ เชื้อ *Salmonella* มีหลายชนิด จึงทำให้การติดเชื้อและอาการของโรคแตกต่างกันตามไปด้วย โรคที่เกิดจาก *Salmonella* ที่สำคัญได้แก่ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) โรคโลหิตเป็นพิษ (Septicemia) และไข้ไทฟอยด์ (Typhoid fever) (กระทรวงอุตสาหกรรม สถาบันอาหาร, 2554)

โดยเชื้อก่อโรคที่สำคัญได้แก่ *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* เชื้อนี้มักติดต่อผ่านทางกรกินอาหารที่ปนเปื้อนจากเนื้อสัตว์หรือมูลสัตว์ โดยมีสัตว์เป็นตัวกลางสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อมาสู่คนและเป็นแหล่งสะสมของเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม extended-spectrum cephalosporins (ESCs) และ/หรือ fluoroquinolones ซึ่งสาเหตุของการดื้อยาอาจเกิดจากการใช้สารต้านจุลชีพเกินความจำเป็นโดยไม่มีการควบคุมการใช้ที่เหมาะสมทั้งในคนและปศุสัตว์ ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาตั้งที่มีการรายงานในหลายพื้นที่ทั่วโลก (ณรงค์ นวลเมือง และ อักษรกร คำมาสุข, 2561) ปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับการดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* ต่อยากลุ่ม cephalosporins ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อสร้างเอนไซม์ beta-lactamases เช่น CTX-M, TEM, OXA และ SHV เพื่อทำลาย beta-lactam ring ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Giannella, 1996) และมี

ยีนที่ต้านทานต่อ colistin (mcr-1 ถึง mcr-9) และ carbapenem (bla<sub>VIM-1</sub>, bla<sub>NDM-1</sub> และ bla<sub>NDM-5</sub>) ซึ่งได้รับการตรวจพบจากสัตว์ปีก สุกร และเชื้อ Salmonella ที่แยกได้จากมนุษย์ (Mthembu et al., 2021) นอกจากนี้มีรายงานที่เกี่ยวกับ Non-typhoidal serovars of *Salmonella enterica* (NTS) มีการตรวจพบเชื้อที่แยกได้จากมนุษย์ สัตว์เลี้ยง ปศุสัตว์ สัตว์ป่า และอาหารแล้ว พบ carbapenemase 5 ชนิดที่มีความสำคัญทางคลินิกที่สำคัญ ได้แก่ KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (class A), IMP (imipenemase), NDM (New Delhi metallo- beta-lactamase), VIM (Verona integron-encoded metallo- beta-lactamase) (class B) และ OXA-48 (oxacillinase class D) ได้รับการรายงานใน NTS (Fernández, 2018) นอกจากนี้พบเชื้อ *S. Typhimurium* ที่แยกได้ทางคลินิกในฮ่องกง ช่วงปี 2548-2554 มีความต้านทานต่อ ciprofloxacin (CIP) มากขึ้น จากการศึกษาพบว่า oqxAB และ aac (6') Ib-cr ถูกเข้ารหัสบนพลาสมิดที่มีขนาดต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดการต้านทาน CIP เพิ่มขึ้นใน *Salmonella* ที่แยกได้ทางคลินิก ในประเทศฮ่องกง (Wong et al., 2014)

#### 2.8.6 *Serratia* spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน และเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ (Fusco et al., 2018) มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และพบในน้ำและดิน เช่นเดียวกับพืช แมลง มนุษย์ และสัตว์อื่นๆ สกุล *Serratia* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และประกอบด้วยอย่างน้อย 14 สปีชีส์ พบ *S. marcescens* เป็นสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์มากที่สุด เดิมทีถือว่าไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ปัจจุบันได้รับการยอมรับว่าเป็นเชื้อโรคในโรงพยาบาลที่สำคัญที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะได้ การติดเชื้อในกระแสเลือดรวมทั้งเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ และการติดเชื้อประเภทอื่นๆ อีกมากมาย มีการระบุปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงหลายประการของ *S. marcescens* รวมถึง hemolysin, proteinase, lipopolysaccharide (LPS), fimbriae และ siderophores คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของ *S. marcescens* คือการต่อสู้สารต้านจุลชีพจากภายในและได้รับมา เชื้อที่แยกได้จำนวนมากมีปัจจัยทางพันธุกรรมที่เข้ารหัสด้วยโครโมโซมและพลาสมิด ซึ่งระบุการต่อสู้ยาปฏิชีวนะหลายชนิด รวมถึง beta-lactamase แบบขยายสเปกตรัม หรือ metallo beta-lactamase (Iguchi et al., 2014) เมื่อเข้าสู่กระแสเลือด สารเอนโดท็อกซินจะถูกปล่อยออกมาซึ่งทำให้เกิดไข้ ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ และการแข็งตัวของเลือดในหลอดเลือดที่แพร่กระจาย อย่างไรก็ตาม อาการจะขึ้นอยู่กับบริเวณที่ติดเชื้อ ตัวอย่างเช่นผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Serratia* อาจมีไข้ หนาวสั่น ช็อค และหายใจลำบาก การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะจะไม่แสดงอาการสำหรับผู้ติดเชื้อ 30–50% โดยส่วนที่เหลือจะมีไข้ ปัสสาวะบ่อย ปัสสาวะลำบาก หรือปวดเมื่อปัสสาวะ หูชั้นกลางอักเสบทำให้เกิดอาการปวดหู สูญเสียการได้ยิน และน้ำมูก (Golemi, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*S. marcescens* พบ Metallo-beta-lactamases ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้ประกอบด้วย carbapenemases IMP (imipenemase), VIM (Verona Integron-encoded metallo-beta-actamase) และ NDM (New Delhi metallo beta-lactamase) และมักถูกส่งผ่านพลาสมิด (Carreon et al., 2023) นอกจากนี้ AmpC (class C beta-lactamase), aminoglycoside acetyltransferase แต่ละชนิดมีความจำเพาะของสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน และเอนไซม์ที่ยับยั้ง fosfomycin (FosA) จะถูกเข้ารหัสบนโครโมโซมของแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้น ลักษณะโดยรวมของยีนต้านทานที่ถูกเข้ารหัสด้วยโครโมโซมจึงมีความคล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ในแต่ละสายพันธุ์แม้จะมีต้นกำเนิดที่แตกต่างกัน (Iguchi et al., 2014)

## 2.9 *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ และระบบไหลเวียนโลหิต *P. aeruginosa* สามารถพบทั่วไปในธรรมชาติ เจริญได้ดีในที่มีความชื้นสูง ปกติพบได้ในดินและ น้ำ โดยเฉพาะในน้ำจืด อ่างเก็บน้ำในชุมชน เช่น อ่างน้ำร้อน และสระว่ายน้ำ อาศัยอยู่ได้บ้างบริเวณผิวหนัง หูชั้นนอก ทางเดินหายใจส่วนบนหรือลำไส้ของคน ยกเว้นในผู้ป่วยที่มีภาวะโรคร่วมที่รุนแรงหรือผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง จะมีโอกาสพบได้มากกว่า โดยส่วนใหญ่จะเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล การเกิดโรคส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย เช่น ภาวะ neutropenia การได้รับยาที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน และอาจรวมถึงการที่ระบบป้องกันทางกายภาพของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียถูกทำลาย เช่น การใส่สายสวนปัสสาวะ การใส่เครื่องช่วยหายใจโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใส่เครื่องช่วยหายใจจะทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือเกิดอันตรายต่อเซลล์ และทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* สัมผัสโดยตรงกับ epithelial cells ในระบบทางเดินหายใจ (สุนทรี เขียนทอง, 2546 ; Wilson and Pandey, 2023) *P. aeruginosa* ผลิต beta-lactamases หลายตัว จำแนกตาม Ambler class A – D ที่พบมากที่สุดคือ penicillinase อยู่ใน molecular class A serine beta-lactamases (*Pseudomonas*-specific enzymes (PSE), carbenicillinases (CARB), TEM family) โดยที่ PSE มีมากที่สุด ใน Class A รวมถึง Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) ที่พบได้น้อย อย่างเช่น TEM, SHV, CTX-M, PER, GES และ IBC และ Ambler Class B Carbapenemases ใน *P. aeruginosa* ประกอบด้วย 4 ตระกูลหลัก คือ IMP, VIM, SPM และ GIM นอกจากนี้ carbapenemases แล้ว กลไกต้านทาน beta-lactam อีกตัวใน *P. aeruginosa* คือการผลิตเอนไซม์ Chromosomal AmpC หรือที่เรียกว่า *Pseudomonas*-derived cephalosporinases (PDCs) และภาวะ AmpC depression ใน *P. aeruginosa* มักจะนำไปสู่การดื้อยา cefepime, ceftazidime และ tazobactam แต่มีผลกระทบต่อความไวต่อยา carbapenem เว้นไม่ว่าการแต่จะมาพร้อมกับกลไกการต้านทานเพิ่มเติม (เช่น การผลิตมากเกินไปของปั๊มไหลออก, OprD ลดลง

และ/หรือการผลิต Class A/Class B carbapenemase (Coyne et al., 2022) carbapenemases ประเภท OXA ไม่ค่อยถูกระบุใน *P. aeruginosa* และมีรายงานพบในสายพันธุ์ต่อไปนี้ คือ *P. aeruginosa* ที่ผลิต OXA-40 ในสเปน, *P. aeruginosa* ที่ผลิต OXA-48 ในอินเดีย, *P. aeruginosa* ที่ผลิต OXA-181 ในสหราชอาณาจักร และ *P. aeruginosa* ที่ผลิต OXA-198 ในเบลเยียม (Yoon and Jeong, 2021)

## 2.10 *Neisseria meningitidis*

เป็นเชื้อแบคทีเรีย แกรมลบ รูปร่างกลมคล้ายเม็ดธัญรี้งตัวกันอยู่เป็นคู่ๆ โดยหันด้านเรียบเข้าหากัน ไม่สร้างสปอร์ แบ่งเป็น 13 serogroups ได้แก่ A,B,C,D,E29,H,I,K,L,W-135,X,Y และ Z ระยะฟักตัว ประมาณ 2-10 วัน โดยเฉลี่ย 3-4 วัน (กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2562) *N. meningitidis* จะตายภายในไม่กี่ชั่วโมงบนพื้นผิว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 35–37 °C สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด เช่น blood agar, trypticase soy agar, supplemented chocolate agar, and Mueller-Hinton agar (Rouphael and Stephens, 2012) เชื้อ *N. meningitidis* ก่อให้เกิดโรคไขกาทหลังแอน มีชื่อทางการแพทย์ว่า Meningococemia (การติดเชื้อไขกาทหลังแอนในเลือด) หรือ Meningococcal meningitis (เยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อไขกาทหลังแอน) สามารถถ่ายทอดได้โดยทางเดินหายใจ ผ่านการไอ, จาม, เสมหะ น้ำมูก น้ำลาย ไปสู่ผู้ใกล้ชิด ผู้ที่มีปัจจัยภายในตนเองผิดปกติบางอย่าง เช่น ร่างกายไม่สร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคนี้อ หรือ เชื้อสามารถเล็ดลอดเข้าสู่กระแสโลหิต หรือระบบประสาทส่วนกลางได้ จึงก่อให้เกิดโรครุนแรง (ยงค์รุ่งเรือง, 2560) จากผลศึกษาที่ผ่านมา *N. meningitidis* ติดต่อผ่านการสูดดมละอองทางเดินหายใจขนาดใหญ่ของมนุษย์ แต่ความเสี่ยงจากการบนเบื้อนบนพื้นผิวสิ่งแวดล้อมยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptococcus pneumoniae* และ *Acinetobacter baumannii* เชื้อ *N.meningitidis* จะมีการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วบนพื้นผิว แก้ว หรือโลหะ แต่ยังคงมีชีวิตได้นานถึง 72 ชั่วโมง และการห่อหุ้ม (Encapsulation) ไม่ได้มีผลต่อการอยู่รอดของ *N.meningitidis* บนพื้นผิวในสิ่งแวดล้อม (Tzeng et al., 2013)

ในอดีตการดื้อยาต้านจุลชีพพบได้น้อยใน *N. meningitidis* ในขณะที่มีรายงานการแยกเชื้อที่มีความไวต่อ penicillin ลดลงในหลายประเทศ เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีการระบุสายพันธุ์ *N. meningitidis* ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin และ penicillin ในหลายกรณีของสหรัฐอเมริกา (Potts, 2021) จากรายงานการดื้อยา penicillin ใน *N. meningitidis* อาจเกิดจากการมียีน *bla* ที่เข้ารหัสการผลิต beta-lactamases ส่งผลให้ค่า MIC ของ penicillin > 2 มก./ลิตร กลไกอีกประการหนึ่งของการดื้อต่อ penicillin เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน *penA* ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน PBP2 และลดความไวหรือความต้านทานต่อ penicillin ลง โดยมีค่า MIC ของ penicillin  $\geq 0.5$  มก./ลิตร (Tsang,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ความไว้สำหรับใช้ในการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเอาไปทำประโยชน์อื่นใด การดื้อยาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2018) และจากการวิเคราะห์ระบุไอโซเลตที่เกี่ยวข้องกับสายวิวัฒนาการด้วย ยีน *bla*ROB-1 ที่รวบรวมจาก 7 ประเทศ การวิเคราะห์นี้จำกัดเฉพาะข้อมูลที่เคยเผยแพร่ผ่าน PubMLST ซึ่งไอโซเลตที่ประกอบด้วย *bla*ROB-1 ทั้งหมดมีลำดับ *bla*ROB-1 ที่เหมือนกัน บ่งชี้การขยายตัวของสายพันธุ์เดียวที่อาจได้รับยีนจาก *H. influenzae* อย่างไรก็ดีตามการได้มาของ beta-lactamases ใหม่ยังคงหาได้ยากใน *N. meningitidis* และยีน *bla*TEM-1 นั้นยังคงพบได้ยากในกลุ่ม *N. meningitidis* ที่แยกได้ (Potts, 2021)

penicillin ได้รับการยอมรับว่าเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคไขกัภาพหลังแอน และไขกัภาพหลังแอนเป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่มีปัญหาน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในด้านของการดื้อยาปฏิชีวนะและยังคงมีรายงานเกี่ยวกับการดื้อยาจำนวนน้อย (Oppenheim, 1997)

## 2.11 *Haemophilus influenzae*

*Haemophilus influenzae* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็น coccobacillus แกรมลบแบบแคปโนฟิลิกแบบไม่ใช้ออกซิเจนขนาดเล็กอยู่ในวงศ์ Pasteurellaceae เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ โรคติดเชื้อในมนุษย์ เช่น การติดเชื้อทางเดินหายใจ โรคหูน้ำหนวก ไซนัสอักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โดยเฉพาะในผู้ป่วยเด็ก *H. influenzae* สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่อหุ้มและกลุ่มที่ไม่ใช่แคปซูล (non-typeable *H. influenzae*; NTHi) ในบรรดาสายพันธุ์ที่ถูกห่อหุ้ม สายพันธุ์ประเภท b (Hib) นั้นเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อรุนแรง (Romanelli et al., 2018) แม้ว่าเชื้อ *H. influenzae* จะพบในมนุษย์เป็นหลัก แต่ก็สามารถอยู่รอดได้ในช่วงเวลาสั้นๆ ในสิ่งแวดล้อมเช่น บนพื้นผิว ในละอองทางเดินหายใจ หรือในสารคัดหลั่งทางเดินหายใจที่ถูกขับออกไปในอากาศเมื่อมีคนไอหรือจาม อย่างไรก็ตาม การอยู่รอดภายนอกร่างกายมนุษย์นั้นจำกัดเมื่อเทียบกับเชื้อโรคอื่นๆ (Othman et al., 2014) การรักษาหลักสำหรับการติดเชื้อ *H. influenzae* คือ ampicillin ซึ่งอยู่ใน beta-lactams สิ่งเหล่านี้จะรบกวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของผนังเซลล์ กลไกการต้านทานที่สำคัญคือการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ที่สามารถ hydrolyse beta-lactams หรือการปรับเปลี่ยนเป้าหมายผ่านการเปลี่ยนแปลงในลำดับ Penicillin-binding proteins เชื้อก่อโรคแกรมลบที่ดื้อยาหลายชนิดที่มีความเสี่ยงสูงส่วนใหญ่จนถึงปัจจุบันได้รับ beta-lactamase ซึ่งส่วนใหญ่แพร่กระจายผ่านองค์ประกอบที่เคลื่อนที่ได้ (Heinz, 2018)

*H. influenzae* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อทางเดินหายใจเป็นหลัก สามารถพัฒนาความต้านทานยาปฏิชีวนะได้ การดื้อต่อยา *H. influenzae* มักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่ส่งผลต่อความไวต่อยาปฏิชีวนะบางชนิด การดื้อต่อ ampicillin ที่ใช้ beta-lactamase ที่เป็นสื่อกลางของ beta-lactamase ใน *H. influenzae* และ beta-lactamase ถูกระบุว่าเป็น TEM ในปี 1981 มีการรายงานการมีอยู่ของ beta-lactamase ใน *H. influenzae* ซึ่งต่อมาเรียกว่า ROB-1 ทั้งสองคือ พลาสมิดสื่อกลาง class A seine beta-lactamases ที่คล้ายกันของสารตั้งต้นที่ทำให้

ต้านทานต่อ ampicillin และจะถูกยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยสารยับยั้ง beta-lactamase เช่น clavulanate การต้านทานของ ampicillin ที่ใช้ beta-lactamase มักจะตรวจพบได้ง่าย เนื่องจากสายพันธุ์ที่เป็นบวกสำหรับเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะแสดง ampicillin MICs ที่สูงกว่า (Tristram et al., 2007)

การดื้อยาของกลุ่ม aminopenicillins ของเชื้อ *H. influenzae* มีสองกลไกคือ 1. Enzymatic inactivation คือการสร้างเอนไซม์ beta-lactamases เพื่อทำลายยาในกลุ่ม beta-lactams โดยยีน *blaTEM-1*, *blaROB-1* กลไกนี้เป็นกลไกหลักของการดื้อยา 2. Alter target site คือการเปลี่ยนแปลงของ PBP3 โดยเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *ftsI* เป็นกลไกการดื้อยาแบบ beta-lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) ในประเทศไทยพบเชื้อ *H. Influenzae* ดื้อยาในกลุ่ม aminopenicillins ด้วยกลไกการสร้าง beta-lactamases (41%) และกลไกการเปลี่ยนแปลงของ PBP3 (4%) (วรรณชน จันทรเบญจกุล และคณะ, 2562)

## 2.12 *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex (ABC) เป็นกลุ่มของเชื้อโรคฉวยโอกาสที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางฟีโนไทป์ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุของแบคทีเรียและโรคปอดบวมที่ได้มาจากโรงพยาบาล การติดเชื้อจากชุมชนพบได้น้อย แต่อาจเกิดขึ้นได้ในคนไข้ที่มีโรคร่วม อายุมาก เบาหวาน โรคปอดหรือไตเรื้อรัง มะเร็ง หรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง ตำแหน่งที่พบบ่อยที่สุดของการติดเชื้อ ได้แก่ กระแสเลือด บาดแผลที่ผิวหนัง/เนื้อเยื่ออ่อน/การผ่าตัด โรคปอดบวมที่เกี่ยวข้องกับเครื่องช่วยหายใจ ขั้นตอนทางกระดูกและข้อหรือการผ่าตัดระบบประสาท และทางเดินปัสสาวะ สายพันธุ์ *Acinetobacter* มีความทนทานต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ในบรรดาสมาชิก ABC complex นั้น *A. baumannii*, *A. pittii* และ *A. nosocomialis* เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้บ่อยที่สุด สายพันธุ์ *A. calcoaceticus* ก็ถูกแยกออกเช่นกันแต่ไม่บ่อยนัก *A. baumannii* เป็นสายพันธุ์พบบ่อยและสำคัญที่สุดของ *Acinetobacter* (Mezzatesta et al., 2012)

เชื้อ *A. Baumannii* สามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamases ทำลายยาได้หลายชนิด ได้แก่

1. ยีน *ampC* พบอยู่บนโครโมโซมของเชื้อ *A. baumannii* ทุกสายพันธุ์ เชื้อจึงดื้อยาในกลุ่ม cephalosporins โดยธรรมชาติ โดยการแสดงออกเป็นแบบ inducible ซึ่งจะมีการแสดงออกมาขึ้นเมื่อได้รับยาที่เป็น strong inducer หรือมี insertion sequence เช่น ISAba1 อยู่หน้ายีน *ampC*
2. ESBLs ยีนที่สร้างส่วนใหญ่พบบนพลาสมิด ได้แก่ VEB, PER และ GES

3. carbapenemases เป็นกลไกหลักของการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems สำหรับเชื้อ *A. baumannii* เอนไซม์ ที่ พบบ่อยมีสองกลุ่มคือ MBLs (IMP, VIM, SIM และ NDM) และ OXA-type

เอกสารนี้ carbapenemases ซึ่งพบได้บ่อยที่สุด ที่พบในเชื้อ *A. baumannii* ได้แก่ OXA-23, OXA-24, OXA-48 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

51 และ OXA-58 โดย bla<sub>oxa-51</sub> อยู่บนโครโมโซม และพบได้ในเชื้อ *A. baumannii* เกือบทุกสายพันธุ์ โดยเอนไซม์จะทำลายยาได้ในระดับต่ำ ส่วน class A carbapenemases มีรายงานไม่บ่อย แต่พบได้บ้างเช่น GES-14 หรือ KPC (วรรณชน จันทระเบญจกุล, 2562)

### 2.13 *Bacteroides fragilis*

เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบไม่ใช้ออกซิเจน ภายในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์มีแบคทีเรียในร่างกายนานที่สุดและสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่เป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน ในจำนวนนี้ประมาณ 25% เป็นสายพันธุ์ของ *Bacteroides*. *B. fragilis* เป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ปกติของลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Elsaghir, 2023) *B. fragilis* เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่พบได้บ่อยที่สุด ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อในกระแสเลือดและมีความสัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตที่สูง (Ogane, 2020) มีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับเชื้อ *B. fragilis* ที่แยกได้ ซึ่งพบดื้อต่อยาปฏิชีวนะ beta-lactam หลายชนิด กลไกหลักของการดื้อ beta-lactam ใน *B. fragilis* คือการผลิต beta-lactamase กลุ่ม beta-lactamase ที่พบบ่อยคือ Cephalosporin (Rogres, 1993 ; Cuchur, 1986) จากรายงานในอดีต การทดสอบ *Bacteroides* ทางคลินิก พบ TEM beta-lactamase gene ที่ทำให้ดื้อต่อ ampicillin (Soong et al., 1984) และ *B. fragilis* สามารถทนต่อ penicillin ได้ มีระดับความไวต่อ cefoxitin, moxifloxacin และ clindamycin ต่ำ ในขณะที่มีอัตราความไวสูงต่อ piperacillin/tazobactam, meropenem และ metronidazole นอกจากนี้มีรายงานที่พบ *B. fragilis* ที่ดื้อต่อยา imipenem ในโครเอเชีย และการติดเชื้อ *B. fragilis* มักเป็นส่วนหนึ่งของการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อโรคหลายชนิด (polymicrobial infection) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผ่าตัด การอักเสบ หรือการบาดเจ็บ และมักส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในช่องท้อง (Cuhural, 1986 ; Elsaghir, 2023)

### 2.14 *Stenotrophomonas maltophilia*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีรูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยมีแฟลเจลลา สามารถคงอยู่ในสภาพแวดล้อมน้ำที่มีสารอาหารต่ำได้ ลักษณะการเจริญเติบโตของ *S. maltophilia* เป็นแบคทีเรียที่มีปฏิริยาออกซิเดส (Brook, 2012) *S. maltophilia* มีอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำ ดิน และพืช นอกจากนั้นนำมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเชื้อ *S. maltophilia* สามารถนำไปสู่การติดเชื้อได้ นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีโรคปอดเรื้อรัง โรคมะเร็งและเอชไอวีและการเกาะติดของสิ่งมีชีวิตนี้กับพื้นผิวที่ไม่มีชีวิต เช่น การปลูกถ่ายทางการแพทย์และสายสวน แสดงถึงความเสี่ยงที่ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล การติดเชื้อ มีความเกี่ยวข้องกับการเจ็บป่วยและอัตราการเสียชีวิตสูงในบุคคลที่มี

ภูมิคุ้มกันบกพร่องและร่างกายอ่อนแออย่างรุนแรง (Oliveira-Garcia et al., 2002) ระเบียบด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*S. maltophilia* สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะในวงกว้างหลายชนิดตามธรรมชาติ (รวมถึง carbapenems ทั้งหมด) เนื่องจากการผลิตโครโมโซม metallo-beta-lactamases ทำให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อเป็นเรื่องยากมาก *S. Maltophilia* มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและไม่สามารถกำจัดได้ ซึ่งทำให้การป้องกันทำได้ยากมากเช่นกัน (Denton et al., 1998)

*S. maltophilia* เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่ติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยส่วนใหญ่เกิดในผู้ป่วยที่เป็นโรคเดิม โดยมีความเกี่ยวข้องข้องเป็นพิเศษในกรณีของผู้ป่วยโรคซิสติกไฟโบรซิส การศึกษาและการวิเคราะห์ทางคลินิกที่แยกได้แสดงให้เห็นว่า *S. maltophilia* ที่มีระดับความต้านทานที่สูงขึ้น เนื่องจากการกลายพันธุ์หรือการได้รับยีนต้านทานนั้นเกิดขึ้นไม่บ่อยนัก หนึ่งในยาด้านจุลชีพ ที่ใช้ในการรักษา *S. maltophilia* คือ co-trimoxazole เมื่อไม่นานมานี้พบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่ต้านทานต่อ cotrimoxazole ได้เพิ่มขึ้น การมีอยู่ของยีน *sul* (*sul1* และ *sul2*) ได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการดื้อต่อ co-trimoxazole (Sánchez and Martínez, 2018)

## 2.15 Conventional Polymerase Chain Reaction

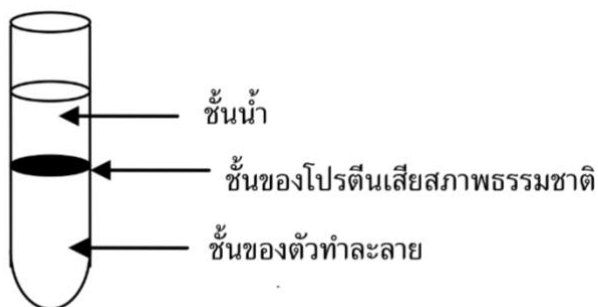
### 2.15.1 การสกัดแยกดีเอ็นเอ

การสกัดแยกดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอของสัตว์ชั้นสูงพบอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์และไม่อยู่ในรูปโมเลกุลอิสระ แต่รวมตัวจับอยู่กับ โปรตีนพวกฮิสโตน (histone) และนอนฮิสโตน (non-histone) การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ จึงมีลำดับขั้นตอนดังนี้

1. การทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์แตก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งมีเกลือและ EDTA ผสมอยู่ด้วย เกลือช่วยให้ดีเอ็นเอมีเสถียรภาพและละลายได้ดี ขึ้นกว่าการละลายในน้ำกลั่นธรรมดา ความเข้มข้นของเกลือไม่ควรต่ำกว่า 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้พันธะ ไฮโดรเจน ระหว่างสายดีเอ็นเอคู่สมมีความแข็งแรงขึ้น ส่วน EDTA จะจับกับไดวาเลนต์ ไอออน เช่น แมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$ ) และแมงกานีสไอออน ( $Mn^{2+}$ ) ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease) นอกจากนี้อาจเติมซิเตรท (citrate) เพื่อเป็น chelating agent ร่วมกับ EDTA ด้วย พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เป็นค่าเล็กน้อย (pH 8) เพื่อลดแรงดึงดูดทางประจุไฟฟ้าระหว่างดีเอ็นเอกับเบสิกฮิสโตน นอกจากนี้ที่พีเอชค่อนข้างสูงนี้ยังช่วยยับยั้งการทำงานของนิวคลีเอส (nuclease) และช่วยทำให้โปรตีนบางส่วนเสียสภาพธรรมชาติไป

2. การแยกโปรตีนที่จับกับดีเอ็นเอออกมา โดยการใช้สารซักฟอก เช่น SDS (sodium dodecyl sulfate) ทำลายพันธะที่จับกันระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีน และทำให้ดีออกซีไรโบนิวคลีเอสและโปรตีนอื่นๆ เสียสภาพธรรมชาติ อาจเติมโปรติเอสลงไปเพื่อช่วยในการย่อยสลายโปรตีน

3. การแยกดีเอ็นเอออกจากซีโมเลกุลอื่นๆ โปรตีนถูกกำจัดออกโดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอกซาลีนเฟินอล (phenol) คลอโรฟอร์ม-ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (chloroform-isoamyl alcohol) หลังการปั่นไม่ผ่านการเหวี่ยงเสร็จสิ้น สารละลายในหลอดทดลองจะแยกตัวเป็น 3 ชั้น ดังรูป เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การแยกชั้นของชั้นน้ำ ชั้นของโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และชั้นของตัวทำละลาย

ที่มา : จาก <https://biochem.flas.kps.ku.ac.th/01402312/document164/01402312-13-Nucleic-acid-protocol-164.pdf>

โปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติแล้ว รวมตัวอยู่ระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์และชั้นน้ำ คลอโรฟอร์มทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติส่วนไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ลดการเกิดฟองและช่วยทำให้เกิดชั้นขึ้น ระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายอินทรีย์

ดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในชั้นน้ำถูกแยกออกมาได้โดยการตกตะกอนด้วย 95% เอทานอล เนื่องจาก ดีเอ็นเอ เป็นโมเลกุลที่มีประจุ การผสมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในการละลายที่ดีเอ็นเอละลายอยู่ จะลดความมีขั้ว ของสารละลายทำให้การละลายของดีเอ็นเอลดลงมาก ดีเอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ในรูปของเส้นใย ซึ่งเก็บได้โดยใช้แท่งแก้วหมุนวนช้าๆ สายดีเอ็นเอจะพันติดกับแท่งแก้วขึ้นมา นำดีเอ็นเอที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นหรือ TE บัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl pH 7.6 1 mM EDTA) ในกรณีที่ต้องการ ดีเอ็นเอบริสุทธิ์มากขึ้น อาจนำดีเอ็นเอที่ละลายได้นี้กลับไปกำจัดโปรตีนที่ยังคงเหลืออยู่ด้วยการใช้ คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อีก ทำซ้ำจนพบว่าไม่มีชั้นโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้น ระหว่างชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ต้องมีอัตราส่วนค่าการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตรและที่ 280 นาโนเมตร (A260/A280) ไม่น้อยกว่า 1.8 - 1.9 ในกรณีที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอยังคงมีโปรตีนหรือฟีนอลที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดปนเปื้อนอยู่ (ชัยวัฒน์ วามวรรธน์, 2564)

### 2.15.2 เทคนิค PCR

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วน DNA ที่สนใจในหลอดทดลอง มีหลักการพื้นฐานเลียนแบบธรรมชาติของขบวนการ DNA replication โดยปฏิกิริยา ลูกโซ่ของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ DNA เป็น 2 เท่า ในทุกๆ รอบของปฏิกิริยา (วัชร อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.15.2.1 องค์ประกอบในการทำ PCR

1. Template หรือ DNA ตั้งต้น (ในกรณีที่ template ตั้งต้นเป็น RNA จะต้องเพิ่มอีกขั้นตอนหนึ่งคือการสร้างสาย complementary DNA (cDNA) โดยใช้ RNA เป็นต้นแบบ หรือการทำอีกสายขึ้นมาคู่กับ RNA นั้นเองเพื่อให้เป็นสายคู่ที่จะเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ได้ จะเรียกขั้นตอนในช่วงนี้ว่า Reverse transcription (RT) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นจึงนำสาย cDNA ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ขั้นตอน PCR ต่อไป)

2. Primers เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) สายสั้นๆ นิยมใช้ความยาวประมาณ 20-24 bp และมีองค์ประกอบของ G และ C ระหว่าง 40-60% จะเป็นตัวเริ่มต้นของการสร้าง DNA สายใหม่ในบริเวณช่วง DNA template หรือยีนที่เราต้องการ โดย primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทั่วไปจะมี 2 เส้นคือ forward primer และ reverse primer โดย primers ที่ดีจะต้องมีค่า  $T_m$  ของทั้งสองเส้นเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR ของ primer แต่ละเส้นอยู่ในช่วง 0.1-2.0  $\mu\text{M}$

3. Thermostable DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสาย DNA เส้นใหม่หรือ PCR product ในตำแหน่งยีนที่ต้องการ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติอีกประการหนึ่ง คือการตรวจสอบความผิดพลาดของการสร้าง DNA สายใหม่ (5'  $\rightarrow$  3' exonuclease) หรือ proofreading activity โดยเอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงโดยเอนไซม์ที่นิยมใช้มากที่สุดในงาน PCR คือ Taq DNA polymerase แต่ถ้าต้องการความถูกต้องของการสร้างสาย DNA อาจใช้ Pfu DNA polymerase ในปฏิกิริยา PCR

4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ A, T, C, G ที่จะใช้ในการสร้าง PCR product สายใหม่

5. PCR buffer และองค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยา PCR โดย PCR buffer จะช่วยให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดย buffer จะสอดคล้องกับชนิดของ DNA polymerase ที่ใช้ องค์ประกอบอื่นๆ ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ  $\text{MgCl}_2$  ซึ่งทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ polymerase และมีผลต่อประสิทธิภาพของการทำปฏิกิริยา น้ำที่ใช้ในการทำ PCR ก็มีความสำคัญเช่นกัน ควรใช้น้ำที่ปราศจาก DNase หรือ RNase และไม่มีการปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อแบคทีเรียที่อาจมี enzyme nuclease ที่ทำลาย DNA template และ primers รวมถึงรบกวนปฏิกิริยา PCR ด้วย นอกจากนี้ในการทำ PCR อาจมีการเติมสารเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ลงไปด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำ PCR โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่ template มีองค์ประกอบของเบส G และ C มาก (GC-rich template) หรือ ต้องการเพิ่มปริมาณ PCR product ขนาดยาวๆ (long PCR product) เช่น DMSO, DTT, BSA, betaine เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.15.2.2 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

โดยทั่วไป ขั้นตอนในการทำ PCR มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation step เป็นขั้นตอนแยกสาย DNA template สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing step เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง เพื่อให้ primers ในปฏิกิริยา PCR เข้าจับกับ DNA template ในตำแหน่งที่จำเพาะ เพื่อเตรียมที่จะสร้าง PCR product ใหม่ ขั้นตอนนี้จะใช้ อุณหภูมิในช่วงประมาณ 50-55 องศา เซลเซียส โดยอุณหภูมิในช่วงนี้จะขึ้นกับค่า  $T_m$  ของ primers ที่ใช้โดยทั่วไป annealing temperature จะมีค่าต่ำกว่า  $T_m$  เฉลี่ยของ primers ทั้งสองประมาณ 3-5 องศาเซลเซียส

3. Extension step เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่โดยเริ่มจากจุดต้นของ primers ใน DNA template แต่ละข้างโดยการนำ dNTPs ต่างๆ มาต่อกันในลักษณะที่คู่สมกับ DNA template ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยจะต้องใช้อุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ ยกตัวอย่างเช่นการใช้ Taq DNA polymerase จะใช้อุณหภูมิในช่วงที่เหมาะสมคือ 70-75 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้คือ 72 องศาเซลเซียส (ชัยวัฒน์ วามวรรรัตน์, 2564)

### 2.15.2.3 ข้อควรระวังในการทำ PCR การปนเปื้อน (Contamination)

ถึงแม้ว่าเทคนิค PCR จะเป็นวิธีสามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้มากหลายล้านเท่า แต่ก็สามารถเพิ่ม DNA ที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้มากเช่นกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอม การปนเปื้อนอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การสกัดแยก DNA หรือจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ครั้งก่อน (carry over contamination) ซึ่งมักจะอยู่ในรูปละอองลอย (aerosol) ที่มักเกิดขึ้นขณะการเปิด-ปิดฝาหลอด และการปั่นตกตะกอน ละอองลอยนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่างๆ ในห้องปฏิบัติการทั้งอุปกรณ์ เครื่องมือและวัสดุต่างๆ รวมทั้งผิวหนัง ผง และมือผู้ปฏิบัติการได้ ดังนั้น จึงควรมีการระวังการปนเปื้อนชนิด carry over contamination (ศุภยficiอบรมกิปไทย, 2560)

### 2.15.3 Agarose gel electrophoresis

เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จึงเป็น เทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัด ใช้แยกดีเอ็นเอขนาด 0.2-50 กิโลเบส นอกจากนั้นยังมีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้ โดยที่เทคนิคอื่น ๆ เช่น การหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient centrifugation) ไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอ (DNA fragments) บนเจล หลังแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว ทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการไม่ว่ากั ย้อมอะกาโรสเจลด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ซึ่งเอธิเดียมโบรไมด์จะสอดแทรก

(intercalate) ของดีเอ็นเอ ตรวจสอบหาสารเชิงซ้อนของเอริเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ ระหว่างเกลียว (ethidium bromide-DNA complex) โดยดูการเรืองแสง (fluorescence) ในช่วงคลื่น ของแสง อัลตราไวโอเล็ต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้ (นวลฉวี เวชประสิทธิ์, 2549)

## 2.16 เทคนิค Multiplex Real-time PCR

เทคนิค Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิคพื้นฐานของ PCR โดยให้สามารถเพิ่มขยายหลายๆ target DNAs ด้วย primers หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน (วัชลี อรรถทิพพหลคุณ และ มนตรี อรรถทิพพหลคุณ, 2536) และเทคนิคแบบ Real time PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ขยายปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบและอ่านผลในเวลาเดียวกัน ใช้ทดสอบตัวอย่างในเชิงปริมาณ การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบจะใช้สัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์ในการส่งสัญญาณออกมา ตัวส่งสัญญาณสีที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ 1. สีเรืองแสงที่ไม่เฉพาะเจาะจง เช่น สีเขียวของสาร SYBR green ที่จับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ 2. โพรบติดสีที่จำเพาะต่อลำดับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยโพรบถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเรืองแสงและส่งสัญญาณแสง ไปยังเครื่องรับสัญญาณที่สามารถจับสัญญาณดังกล่าวในแต่ละรอบได้ (ทฤษฎี คำหล่อ และคณะ, 2564)

## 2.17 QIAstat-Dx® BCID GN Plus AMR Panel Cartridge

QIAstat-Dx เป็นเครื่องมืออัตโนมัติเพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในการตรวจครั้งเดียวด้วยเทคนิค Real-time PCR ตัวเครื่องประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนควบคุมการทำงาน (Operational module) และส่วนวิเคราะห์ผล (Analytical module) โดยสามารถเชื่อมต่อกับส่วนวิเคราะห์ผล (Analytical module) ได้สูงสุด 4 เครื่อง ต่อส่วนควบคุมการทำงาน (Operational module) 1 เครื่อง

QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge คือการทดสอบในหลอดทดลองแบบ qualitative multiplex real-time PCR มีการออกแบบมาเพื่อใช้กับ QIAstat-Dx Analyzer 1.0

QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge สามารถตรวจจับและระบุแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Pan *Enterobacteriales* พร้อมกับตรวจยีนดื้อยาต้านจุลชีพได้อีก 18 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ซึ่งในการทดสอบจะใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยและใช้เวลาในการทดสอบน้อย ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง สามารถตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างได้ 2 รูปแบบ คือ 1. ตัวอย่างจากสารแขวนลอยโคโลนิบริสุทธ์ในน้ำเกลือ 2. ตัวอย่างจาก Blood Culture ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ทั้งหมดจะดำเนินการอัตโนมัติโดย QIAstat-Dx Analyzer 1.0 ตัวอย่างจะถูกรวบรวมและบรรจุลงใน QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ด้วยตนเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

เชื้อเป้าหมาย
<i>Enterobacter</i> spp. ( <i>E. amnigena</i> (formerly <i>E. amnigenus</i> ), <i>P. gergoviae</i> (formerly <i>E. gergoviae</i> ), <i>E. aerogenes</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. cloacae</i> (subsp. <i>cloacae</i> and <i>dissolvens</i> ), <i>E. hormaechei</i> (subsp. <i>hoffmannii</i> , <i>oharae</i> , <i>steigerwaltii</i> and <i>xianfangensis</i> ), <i>E. bugandensis</i> , <i>E. cancerogenus</i> , <i>E. chengduensis</i> , <i>E. kobei</i> , <i>E. roggenkampii</i> , <i>E. sichuanensis</i> , <i>L. nimipressuralis</i> (formerly <i>E. nimipressuralis</i> )
<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella</i> spp. ( <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. aerogenes</i> , <i>K. variicola</i> )
<i>Proteus</i> spp. ( <i>P. mirabilis</i> , <i>P. hauseri</i> , <i>P. cibarius</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. penneri</i> )
<i>Salmonella</i> spp ( <i>S. enterica</i> (including subsp/serovar. <i>galinarum</i> , and <i>typhimurium</i> ), <i>S. bongori</i> )
<i>Serratia</i> spp. ( <i>S. marcescens</i> , <i>S. ficaria</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. plymuthica</i> )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> complex ( <i>A. baumannii</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>A. calcoaceticus</i> )
<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Enterobacterales</i> ( <i>Citrobacter</i> , <i>Cronobacter</i> , <i>Enterobacter</i> (including <i>E. ludwigii</i> ), <i>Escherichia</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Morgenella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> (including <i>S. odorifera</i> and <i>S. rubidaea</i> )

หมายเหตุ : เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงเล็บคือเชื้อที่ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge สามารถตรวจพบได้ แต่จะรายงานผลเฉพาะสกุลของแบคทีเรีย เช่น *Klebsiella pneumoniae* จะเอกสารนี้รายงานผลเป็น *Klebsiella* spp. ช่างงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงเอนไซม์ของยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย 3 กลุ่ม คือ ดื้อยากลุ่ม Penicillin, Cephalosporin ดื้อยากลุ่ม Carbapenem และ ดื้อยากลุ่ม Aminoglycoside

ดื้อยากลุ่ม Penicillin, Cephalosporin	
ESBL (Ambler Class A)	
CTX-M	PER
GES	VEB
SHV	TEM
Class C beta-lactamase	
AmpC (CMY/LAT/DHA/FOX)	
ดื้อยากลุ่ม Carbapenem	
Carbapenem (Class A) Group	
KPC	
Carbapenem (Class B) Group	
IMP	VIM
NDM	SPM
Carbapenem/Oxacillinase (Class D) Group	
OXA-58	OXA-48 like
OXA-23	OXA-24/40
ดื้อยากลุ่ม Aminoglycoside	
ArmA	Aac (6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.17.1 QIAstat-Dx Analyzer 1.0

ประกอบด้วย Operational Module และ Analytical Module การทำงานประกอบด้วย องค์ประกอบที่ให้การเชื่อมต่อกับ Analytical Module และช่วยให้ผู้ใช้โต้ตอบกับ QIAstat-Dx Analyzer 1.0 ได้ Analytical Module ประกอบด้วย Hardware และ Software สำหรับการทดสอบ และวิเคราะห์ตัวอย่าง ซึ่งจะวิเคราะห์โดย Micro-fluidics ที่ทำงานด้วยแรงลม ซึ่งภายใน Module จะบรรจุตัวกรองอากาศสำหรับอากาศเข้า-ออก ภายใน QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge จะมีการดำเนินการหลายขั้นตอนโดยใช้แรงลมเพื่อถ่ายโอนตัวอย่างและของเหลวผ่านห้อง ถ่ายเทไปยังห้องที่ต้องการ หลังจากการทดสอบ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge จะปิดอยู่ตลอดเวลาช่วยเพิ่มความปลอดภัยในการทิ้ง



รูปที่ 2.2 QIAstat-Dx Analyzer 1.0

### 2.17.2 QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge

เป็นอุปกรณ์พลาสติกแบบใช้ครั้งเดียวทิ้ง สามารถตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุลแบบอัตโนมัติ สำหรับการตรวจหาแบคทีเรียแกรมลบและสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งภายในจะบรรจุรีเอเจนต์ทั้งหมดที่จำเป็นต่อการทดสอบอยู่ภายใน QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ผู้ทดสอบไม่จำเป็นต้องสัมผัสหรือจัดการกับรีเอเจนต์ใดๆ ในระหว่างทดสอบ รีเอเจนต์จะได้รับการจัดการภายใน QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ใน Analytical Module ของ QIAstat-Dx Analyzer 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge

### ขั้นตอนที่เกิดขึ้นภายใน Cartridge

1. ทำเป็นสารแขวนลอยอีกครั้งในการควบคุมภายใน
2. การสลายเซลล์โดยใช้วิธีทางกลและ/หรือทางเคมี
3. การทำให้กรดนิวคลีอิกบริสุทธิ์โดยใช้เมมเบรน
4. การผสมกรดนิวคลีอิกบริสุทธิ์กับรีเอเจนต์ในสภาพผงแห้ง
5. การถ่ายโอนส่วนผสมของ eluate/master ในส่วนแบ่งตามที่กำหนดไปยังห้องปฏิกิริยาต่างๆ
6. การทดสอบแบบ multiplex real-time PCR ภายในห้องปฏิกิริยาแต่ละห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet, BSC)
2. เครื่องเพาะเชื้อในเลือดแบบอัตโนมัติ BACTEC™ FX
3. เครื่อง QIAstat-Dx Analyzer 1.0
4. ตลับ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge
5. เครื่องวัดความขุ่น (Turbidity meter)
6. ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับผู้ใหญ่ BACTEC Plus Aerobic/F (Hemoculture)
7. เลือดครบส่วน (Whole blood)
8. กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร (Syringe)
9. กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร (Syringe)
10. หัวเข็มฉีดยาขนาด 18G x 1 นิ้ว (1.2 x 25 mm) (Hypodermic needle)
11. เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (Inoculation loop)
12. ปิเปตต์แบบปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Pipette transfer)
13. ปิเปตต์แบบปริมาตร 300 ไมโครลิตร (Pipette transfer)
14. หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Micro-centrifuge tube)
15. หลอดทดลอง (Test tube)
16. แอลกอฮอล์แผ่นทำความสะอาด 70% (Alcohol pad)

#### 3.2 การเตรียมตัวอย่าง

ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างจากแผนกโรคติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิต สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร 28 ตัวอย่าง ผู้ป่วยจากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า 2 ตัวอย่าง และหมู่บ้านระเริง อำเภอวังน้ำเขียว 3 ตัวอย่าง และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 35 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) (BECTON DICKINSON (THAILAND) LIMITED) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อให้เท่ากับ  $1.0 \text{ McFarland}$  ( $3 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ ) ใส่เชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับผู้ใหญ่ BACTEC Plus Aerobic/F (BECTON DICKINSON (THAILAND) LIMITED) และใส่เลือดครบส่วน 9 มิลลิลิตรลงในขวดเพาะเชื้อจากเลือด จากนั้นนำขวดเพาะเชื้อใส่ในเครื่องเพาะเชื้อในเลือดแบบอัตโนมัติ BD™ BACTEC™ (BECTON DICKINSON (THAILAND) LIMITED) ที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 การวิเคราะห์ยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในเลือด โดย QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge

เมื่อขวด hemoculture ให้ผลเป็นบวก (positive) ให้นำเลือดในขวด hemoculture ใส่หลอด microcentrifuge อย่างน้อย 100 ไมโครลิตร และใช้ปิเปตต์ดูดเลือด 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge และใส่ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ลงในเครื่อง QIAstat-Dx Analyzer 1.0 เครื่องจะทำการทดสอบตัวอย่างภายในเครื่องโดยอัตโนมัติเมื่อกรอกข้อมูลครบถ้วน

### 3.4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลที่ได้จากการทดสอบกับ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value) และ ค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value) เปรียบเทียบกับวิธี Conventional PCR ดังสมการที่ (1), (2), (3) และ (4)

$$\% \text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP+FN} \dots\dots\dots(1)$$

$$\% \text{Specificity} = \frac{TN}{TN+FP} \dots\dots\dots(2)$$

$$\% \text{PPV} = \frac{TP}{TP+FP} \dots\dots\dots(3)$$

$$\% \text{NPV} = \frac{TN}{TN+FN} \dots\dots\dots(4)$$

หมายเหตุ : TP (True Positive) = ผลบวกจริง

FP (False Positive) = ผลบวกปลอม

TN (True Negative) = ผลลบจริง

FN (False Negative) = ผลลบปลอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การเปรียบเทียบผลทดสอบยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียระหว่าง QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge และ วิธี Conventional PCR

จากการทดลองตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในเลือดโดย QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ซึ่งได้ตัวอย่างจากแผนกโรคติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิต สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร จำนวน 28 ตัวอย่าง ตัวอย่างผู้ป่วยจากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าและจากหมู่บ้านระเริง อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัด นครราชสีมาจำนวน 5 ตัวอย่าง และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 2 ตัวอย่าง มาจำลองการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงใน TSB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อให้เป็น 1.0 McFarland และใส่ในขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับผู้ใหญ่ 1 มิลลิลิตร พร้อมกับเลือดครบส่วน 9 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำใส่ในเครื่องเพาะเชื้อในเลือดแบบอัตโนมัติ BD™ BACTEC™ เมื่อผลเลือดเป็นบวก (positive)ให้นำเลือดใส่ใน QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge 100 ไมโครลิตร และนำ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ใส่ใน QIAstat-Dx Analyzer1.0 เพื่อทำการวิเคราะห์ เมื่อเครื่องทำการวิเคราะห์เสร็จ จึงทำการบันทึกผลการทดสอบ ซึ่งผลการทดสอบที่ได้แสดงใน ตารางที่ 3, 4 และ 5

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลทดสอบยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียที่สอดคล้องกันระหว่าง วิธี Conventional PCR และ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge

No.	Pathogens	EBC		mcr-3		OXA		CTX-M		GES		SHV		VEB		TEM		AmpC		NDM		OXA-23		OXA-48 like		armA		acc (6')-lb		Source	
		PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.		
3	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment
5	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment
10	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
16	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
21	<i>Enterobacter spp.</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
22	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
24	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
25	<i>Klebsiella spp.</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
26	<i>Enterobacter spp.</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
28	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
32	<i>Klebsiella spp.</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	Patient	
33	<i>Klebsiella spp.</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	Patient	

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบผลทดสอบยีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สอดคล้องกันระหว่าง วิธี Conventional PCR และ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge

No.	Pathogens	EBC		mcr-3		OXA		CTX-M		GES		SHV		VEB		TEM		AmpC		NDM		OXA-23		OXA-48 like		armA		acc (6')-Ib		Source	
		PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.		
4	<i>Escherichia coli</i>	neg	neg	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment
6	<i>Klebsiella</i> spp.	neg	nd	neg	nd	pos	nd	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos	Environment	
7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	Environment	
8	<i>Klebsiella</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	Environment	
9	<i>Enterobacter</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
11	<i>Klebsiella</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg	Environment	
12	<i>Enterobacter</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	Environment	
13	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
14	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	pos	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment	
15	<i>Klebsiella</i> spp.	neg	nd	neg	nd	pos	nd	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	Environment	
17	<i>Escherichia coli</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	Environment	

No.	Pathogens	EBC		mcr-3		OXA		CTX-M		GES	SHV		VEB		TEM		AmpC		NDM		OXA-23		OXA-48 like		armA		acc (6')-lb		Source		
		PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.	PCR	Q.st.
18	<i>Acinetobacter baumannii</i>	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment
19	<i>Enterobacter</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment
23	<i>Enterobacter</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Environment
27	<i>Enterobacter</i> spp.	neg	nd	neg	nd	pos	nd	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	Environment
29	<i>Klebsiella</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Patient
30	<i>Klebsiella</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos	Patient
31	<i>Klebsiella</i> spp.	neg	nd	neg	nd	neg	nd	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	Patient



ผลการเปรียบเทียบการทดสอบระหว่าง QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge และ Conventional PCR จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย ทั้งหมด 33 ตัวอย่าง พบว่าการตรวจหาเชื้อและยีนดื้อยาที่มีความสอดคล้องกัน มีทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 3, 5, 10, 16, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 32 และ 33 ดังแสดงตารางที่ 3

ผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องกัน มีทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 27, 29, 30 และ 31 ดังแสดงตารางที่ 4

ผลการทดสอบ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ตรวจไม่พบยีนดื้อยาต่างจากวิธี Conventional PCR ที่สามารถตรวจพบได้ เนื่องจาก QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ไม่มี Panel ของยีนชนิดนั้นๆ มีทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 20 ดังแสดงตารางที่ 5

การประเมินประสิทธิภาพของ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ในการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับวิธี Conventional PCR จำนวน 33 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างให้ผลบวกจริง 30 ตัวอย่าง และให้ผลลบปลอมเพียง 3 ตัวอย่างเท่านั้น เมื่อนำมาคำนวณหาค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV มีค่าเท่ากับ 90.90%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ

การเปรียบเทียบผลการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียโดย QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge และ Conventional PCR สามารถแบ่งผลการทดสอบได้ 3 แบบ คือ 1.ตรวจพบยีนดื้อยาที่มีความสอดคล้องกัน 2. ตรวจพบยีนดื้อยาไม่มีความสอดคล้องกัน 3. QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ตรวจไม่พบยีนดื้อยาเนื่องจากไม่มี Panel ยีนนั้นๆ

จากผลการทดสอบของ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ตรวจพบยีนดื้อยามากกว่าวิธี Conventional PCR นั้น สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากหลายปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย เช่น เกิดจาก QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge เป็นเทคนิค Multiplex Real-time PCR ซึ่งมีความไวและจำเพาะสูงจึงสามารถตรวจพบยีนได้มากกว่า รวมทั้งชนิดของ primer ที่ใช้มีความแตกต่างกัน

ผลการตรวจที่ไม่พบยีนดื้อยาด้านจุลชีพของ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge แต่ผลจากวิธี Conventional PCR ตรวจพบยีนดื้อยาได้ เกิดจาก QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ไม่มี primer สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนนั้นๆ เช่น EBC ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน Class C beta-lactemase ได้แก่ AmpC หรือ cephalosporinase เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม cephalosporin ได้ดีเนื่องจากมีความจำเพาะต่อยากลุ่มนี้ พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้อยู่บนโครโมโซม ปัจจุบันพบว่ามียีนที่สร้างเอนไซม์นี้อยู่บนพลาสมิดด้วยซึ่ง EBC อยู่กลุ่มเดียวกับ FOX และ DHA (สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์, 2560) แต่ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อจำกัดตรวจหายีนได้เพียง 18 ยีนเท่านั้น แสดงตารางที่ 2 จึงทำให้ตรวจไม่พบ OXA เป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน Class D carbapenemase ปัจจุบันพบ OXA-type carbapenemase มากกว่า 45 type (พิราภรณ์ จันทนาวิวัฒน์ และคณะ, 2559) ซึ่ง QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ตรวจได้เพียง OXA-23, OXA-48 like, OXA-24/40 และ OXA-58 ดังนั้นถ้าเป็นยีนที่นอกเหนือจากนี้ จะไม่สามารถตรวจพบได้ และยีน mcr-3 เป็นยีนสัมพันธ์กับการดื้อยา Colistin บนพลาสมิด นอกจากนี้ Colistin เป็นยาลำดับท้ายๆ สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาเกือบทุกขนาน (บุญชูธรรม รัชชอุตสาห์, 2562) แต่เนื่องจาก QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ตรวจยีนดื้อยาได้แคในกลุ่ม Beta-lactam และ Aminoglycoside เท่านั้นจึงทำให้ตรวจไม่พบยีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองประเมินประสิทธิภาพการตรวจหายีนดื้อยาเชื้อแบคทีเรียในเลือด โดยใช้ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ที่สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 13 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 1 และยีนดื้อยาทั้งหมด 18 ตัว คือยีนดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam และยาในกลุ่ม aminoglycosides ดังแสดงในตารางที่ 2 เปรียบเทียบกับวิธี Conventional PCR ที่ตรวจเฉพาะยีนดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam ซึ่งผลการทดสอบวิธี Conventional PCR ได้รับความอนุเคราะห์มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS) โดยตัวอย่างที่ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 35 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากสิ่งแวดล้อม 28 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 5 ตัวอย่าง และใช้แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานเป็นตัวควบคุม (negative control) 2 ตัวอย่าง

จากการประเมินประสิทธิภาพการตรวจหายีนดื้อยาจากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย พบว่า QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge มีค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV มีค่าเท่ากับ 90.90%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ และเมื่อนำทั้ง 2 วิธีมาเปรียบเทียบกันพบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ไม่มีความสอดคล้องกัน 18 ตัวอย่าง และ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge ตรวจไม่พบยีนดื้อยาเนื่องจากไม่มี Panel ยีนนั้นๆ 3 ตัวอย่าง ผลการทดสอบที่ไม่มีความสอดคล้องกันเกิดจากหลายปัจจัย เช่น QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge มีความไวและจำเพาะสูง หรือ primer ที่ใช้มีความต่างกัน เป็นต้น

จากการเปรียบเทียบ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge และ Conventional PCR พบว่า QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge นั้นมีข้อดีคือมีกระบวนการทำงานแค่ครั้งเดียวภายใน QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge มีความไวและจำเพาะสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างเร็ว ช่วยลดขั้นตอนในการทำงานและลดระยะเวลาในการวินิจฉัยการติดเชื้อดื้อยา นอกจากนี้อุปกรณ์มีการใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ แต่มีข้อเสียคือราคาค่อนข้างสูงกว่าวิธี Conventional PCR และมีข้อจำกัดในการตรวจหายีนได้เพียง 18 ยีนในกลุ่ม beta-lactam และ aminoglycosides ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาชุดตรวจให้ครอบคลุมชนิดของยีนดื้อยาต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีการพบได้บ่อยในประเทศนั้นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการดำเนินงานวิจัย พบว่าผลการทดสอบหาเชื้อยาบางชนิด ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการทดสอบได้ เนื่องจากยีนเป้าหมายที่ QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR Panel Cartridge สามารถทดสอบได้ไม่ครอบคลุมยีนนั้นๆ ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบเพิ่มเติมอีกครั้งทั้ง 2 วิธี และควรมีการตรวจยืนยันด้วยวิธี Antimicrobial susceptibility test หรือ PCR เพื่อความถูกต้องและแม่นยำของผลการทดสอบ รวมทั้งควรมีการพัฒนาประสิทธิภาพในการตรวจยีนดื้อยาเป้าหมายให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้นต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2559. แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ.2560-2564.

<http://narst.dmsc.moph.go.th/documentation/AMR%20strategy%202560-2564.pdf>

กระทรวงสาธารณสุข กรมควบคุมโรค. 2562. ไข้กาฬหลังแอ่น (*Meningococcal Meningitis*, Meningococemia).

[https://ddc.moph.go.th/disease\\_detail.php?d=19](https://ddc.moph.go.th/disease_detail.php?d=19)

กระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2557. *Escherichai coli*.

[http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact\\_sheet/12\\_57.pdf](http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/12_57.pdf)

กระทรวงสาธารณสุข กรมอนามัย สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม. 2565. แนวทางการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล.

[https://env.anamai.moph.go.th/web-upload/11xc410600758f76a9b83604e779b2d1de5/m\\_magazine/343/4298/file\\_download/8fb4be4ae3ecff1582a6de13b9f143d2.pdf](https://env.anamai.moph.go.th/web-upload/11xc410600758f76a9b83604e779b2d1de5/m_magazine/343/4298/file_download/8fb4be4ae3ecff1582a6de13b9f143d2.pdf)

กระทรวงอุตสาหกรรม สถาบันอาหาร. 2554. จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค *Salmonella*.

[https://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/salmonella\\_2.pdf](https://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/salmonella_2.pdf)

กฤติกา ดำมูณี. 2558. ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

<http://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2010/10258>

เกษร เทพแพง. 2561. รู้จักกับเชื้ออีโคไล (*Escherichai coli*). สำนักความปลอดภัยแรงงาน.

<https://news.thairoyalfrozen.com/wp-content/uploads/2018/12/Escherichia-coli.pdf>

ชัยวัฒน์ วามวรรรัตน์. 2564 กรดนิวคลีอิก.

<https://biochem.flas.kps.ku.ac.th/01402312/document164/01402312-13-Nucleic-acid-protocol-164.pdf>

เอกสารนี้ ณรงค์ นวลเมือง และอักษรกร คำมาสุข. 2561. การดื้อยา Extended-spectrum beta-lactams และ cephalosporins และ Fluoroquinolones ของเชื้อ *Salmonella* spp.: กลไกการดื้อยา

และระบาดวิทยา. วารสารเทคนิคการแพทย์. 46(2):

<https://he01.tcithaijo.org/index.php/jmt-amtt/article/view/200927>

ดา นิสาทวีดิยานนท์, วรา พินิชเกรียงไกร, วิลาร์ตัน คำเมือง, อรรวรรณ นวีภาพ, ศิรินทร หยิบโชค  
อนันต์ และสุรชนี เศวตสิลา. 2538. การศึกษาระดับของยาปฏิชีวนะในซีรัมปลาการ์ปและผล  
ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์. 9(1): 17-29.

<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/jhealthres/article/download/189585/132760/>

ทฤษฎี คำหล่อ, กรวรรณ ศรีงาม, ศุภมิตร เมฆฉาย, วัชรพงศ์ นรพัลลภ และนิภา โชคสัจจะวาที.

2564. การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ที่มีความแม่นยำสูง สำหรับประเมิน  
สัดส่วนเพศของอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคนม. วารสารเกษตร. 37(1): 75-87.

นวลฉวี เวชประสิทธิ์. 2549. บทปฏิบัติการที่ 2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรีย.

ปฏิบัติการพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

[http://old-book.ru.ac.th/e-book/b/BT333\(L\)\(49\)/BT333\(L\)\(49\).pdf](http://old-book.ru.ac.th/e-book/b/BT333(L)(49)/BT333(L)(49).pdf)

นิตยา อินทราวัฒนา และมูทิตา วนาภรณ์. 2558. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและสถานการณการคือ  
ยา. Journal of Medicine and Health Sciences. 22: 81-92.

<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/jmhs/article/view/58642/48352>

บุญขันธ์ วังษ์อุตสาห. 2562. การดื้อยาโคลิสตินของแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่แยกได้  
จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

[https://digital.library.tu.ac.th/tu\\_dc/frontend/Info/item/dc:187028](https://digital.library.tu.ac.th/tu_dc/frontend/Info/item/dc:187028)

บุญขันธ์ วังษ์อุตสาห. 2558. เชื้อ *Escherichai coli* และ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่  
สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่แยกได้จากสิ่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรีตั้งแต่ปี 2552-  
2556. วารสารวิชาการ รพศ/รพท เขต 4. 17(3): 222-229.

<http://www.ayhosp.go.th/ayh/images/Knowledge/JOHS/johs-y17v03s08.pdf>

พิราภรณ์ จันทนาวิวัฒน์, สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร, อัญชลี วิศวะโกคา, วรดา สโมสรสุข และเสกสรรค  
สโมสรสุข. 2559. ความชุกชนิดของยีน OXA-type ในเชื้อ Carbapenem-Resistant  
*Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในหอผู้ป่วยวิกฤตโรงพยาบาลพระมงกุฎ  
เกล้า. เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด, 28(2): 120-128.

ภาณุมาศ ภูมาศ, ดวงรัตน์ โพธิ์, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, อาทร ลีวไพบูลย์, ภูษิต ประคองสาย และสุพล  
ลิมวัฒนานนท์. 2555. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุล  
ชีพในประเทศไทย: กรณีศึกษาเบื้องต้น. วารสารวิจัย ระบบสาธารณสุข. 6(3): 352-360.

<https://kb.hsri.or.th/dspace/bitstream/handle/11228/3699/hsri-journal-v6n3-p352-360.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือสงวนลิขสิทธิ์โดยเจ้าของข้อมูลนั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มงคล เหล่าอารยะ. 2557. การแพ้ยาต้านจุลชีพกลุ่ม beta-lactam. **เชียงใหม่เวชสาร**. 53(4): 193-209.

<https://www.thaiscience.info/journals/Article/CMMJ/10972629.pdf>

ยงค์ รงค์รุ่งเรือง. 2560. โรคไข้กาฬหลังแอ่น. **มหาวิทยาลัยมหิดล**.

<https://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=703>

รามาชแนล. 2559. อาการดื้อยากับความเข้าใจผิดของคนทั่วไป.

<https://www.rama.mahidol.ac.th/ramachannel/article/%E0%B8%AD%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%94%E0%B8%94>

โรงพยาบาลอินทร์บุรี. 2560. การติดเชื้อแบคทีเรีย 8 ชนิดในกระแสเลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลอินทร์บุรี.

<http://www.inb.moph.go.th/MyPDF/8type.pdf>

วนารัตน์ บารมีรังสิกุล, เสาวลักษณ์ พาดัง และสาธุทิ บุญสังข์. 2561. ความชุก ยีนดื้อยา และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichai coli* ที่สร้างเอนไซม์ ที่มีฤทธิ์ขยายการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactams สายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและสุกรในภาค ตะวันตกของประเทศไทย ปี 2559-2561.

<https://region7.dld.go.th/webnew/images/region7-2563/Yuttasat/vichakan63/full.pdf>

วรรมณ จันทรบญกุล, สุพร อนุกุลเรืองกิตติ, ธันยวีร์ ภูธนกิจ และชัชณ พันธ์เจริญ. 2562. Drug-Resistant Organisms in Pediatrics: Diagnosis and Treatment.

<https://ped.md.chula.ac.th/wp-content/uploads/2020/01/Drug-resistant-organisms-in-pediatrics.pdf>

วัลลี อัดถพิพพหลคุณ และมนตรี อัดถพิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎี&การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology.

<https://www.si.mahidol.ac.th/department/Biochemistry/home/SIBB505/PCR%20reference%203.pdf>

วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. 2557. เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ(ยาต้านจุลชีพ)และการควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ. **เวชบันทึกศิริราช**. 7(1): 26-29.

<https://he02.tci-thaijo.org/index.php/simedbull/article/view/81559>

วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. 2558. คู่มือ การควบคุมและป้องกันแบคทีเรียยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาล.

<https://www.hsri.or.th/sites/default/files/attachment/book2.pdf>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์ฝึกอบรมกบไทย. 2560. โครงการสัมมนา เรื่อง การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อทางเดินหายใจและ  
อุบัติใหม่ด้วยเทคนิค Multiplex Real-Time PCR Technique.

[http://www.mtc.or.th/file\\_cpd/file1\\_2285.pdf](http://www.mtc.or.th/file_cpd/file1_2285.pdf)

สัจมาน ตรันเจริญ และอรัญญา ดวงบุ. 2565. แนวทางการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในระบอบัด  
น้ำเสียโรงพยาบาล.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. 2560. พฤติกรรมต้นเหตุเชื้อดื้อยา.

[www.thaihealth.or.th/พฤติกรรมต้นเหตุเชื้อดื้อ-2/](http://www.thaihealth.or.th/พฤติกรรมต้นเหตุเชื้อดื้อ-2/)

สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์. 2560. โครงการ Molecular characterization of genotypes, virulence  
factors, gene transfer and copper transport system of *Acinetobacter  
baumannii*. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

[https://elibrary.trf.or.th/project\\_content.asp?PJID=RSA5780015](https://elibrary.trf.or.th/project_content.asp?PJID=RSA5780015)

สุนทรีย์ เจียนทอง. 2546. ปัจจัยเสี่ยงและผลการรักษาโรคติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อ  
ต่อยา Imipenem และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อดังกล่าว. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหา  
บัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่,

<http://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2010/6938>

สุริยะ วงศ์คงคาเทพ, อมรรัตน์ วิจิตรลีลา, ญัฐวรรณ พลละวูทิโหมทัย, ปรีชาติ บุญรอด, นันทิยา สม  
เจตนากุล และนิริมา สุ่มประดิษฐ์. 2564. คู่มือการประเมิน การจัดการดื้อยาต้านจุลชีพอย่าง  
บูรณาการในโรงพยาบาล (EE-AMR Tool, Thailand).

<https://kb.hsri.or.th/dspace/handle/11228/5684?locale-attribute=th>

อภัย ราชภูริวิจิตร. 2557. โทบรามัยซิน (Tobramycin).

<https://haamor.com/โทบรามัยซิน>

อภัย ราชภูริวิจิตร. 2563. ยาพาโรโมมัยซิน (Paromomycin).

<https://haamor.com/ยาพาโรโมมัยซิน>

อภัย ราชภูริวิจิตร. 2564. สเตربتอิมัยซิน (Streptomycin).

<https://haamor.com/สเตربتอิมัยซิน>

อังคณา เกียรติมานะโรจน์. 2564. การพัฒนารูปแบบการดูแลผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด  
โรงพยาบาลลาปางปทุม. วารสารวิชาการสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดมหาสารคาม. 5(9):

27.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
<https://thaidj.org/index.php/AJMP/article/view/9945/8818>  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อารยา ข้อคำ. 2563. ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 27(2): 125-139

<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/jmhs/article/download/244782/166171/864571>

อารินี ชัชวาลชลธีระ, กมลชัย ตรงวานิชนาม, จิรภัทร อรุโณรัตน์, โชติกา สิริวัลย์ลักษณ์ และธารทิพย์ รุ่งแสง. 2554. ผลการต้านจุลชีพของยานีโอไมซิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากช่องหูส่วนนอกอักเสบที่เพาะแยกได้จากสุนัข. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.* 21: 69-77.

[https://vet.kku.ac.th/journal/jy2007no.2\\_2013no.%201/09reprint%20no.1.2011/8Arinee%202.pdf](https://vet.kku.ac.th/journal/jy2007no.2_2013no.%201/09reprint%20no.1.2011/8Arinee%202.pdf)

อารินี ชัชวาลชลธีระ, กมลชัย ตรงวานิชนาม, พันทิพา บุญเกิด, สุนันทา สุขพัฒน์ และศิรินทรา โภคา พาณิชย์. 2556. การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูอักเสบในสุนัขของยาเจนตามัยซินและโพลีมิกซิน บี. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.* 23(1): 119-128.

[https://vet.kku.ac.th/journal/jy2007no.2\\_2013no.%201/13reprint%20no.1.2013/11.%20Arinee%202.pdf](https://vet.kku.ac.th/journal/jy2007no.2_2013no.%201/13reprint%20no.1.2013/11.%20Arinee%202.pdf)

Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S. and Gupta, R. S. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 66: 5575-5599.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>

Brooke, J. S. 2012. “*Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen”. *Clinical Microbiology Reviews*. 25(1): 241.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22232370/>

Carreon, F., Mora, K., Barrera, I. and Andrade, A. 2023. *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review.

*PeerJ*.

<https://doi.org/10.7717/peerj.14399>

*Clinical Infectious Diseases*. 24: 98-101.

[https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement\\_1.S98](https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement_1.S98)

Cuchural, JR. J. G., Malamy, M. H. and Tally, F.P. 1986. Beta-Lactamase-Mediated Imipenem Resistance in *Bacteroides fragilis*. *ANTIMICROB. AGENTS*

เอกสารนี้เป็นเอกสารของโรงเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CHEMOTHER. 30(5): 645-648.

<https://doi.org/10.1128/aac.30.5.645>

Cunha, B. A. 2006. New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited. **Med Clin North Am.** 90(6):1089-1070.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17116438/>

Coyne, A. K., Ghali, A. E., Holger, D., Rebold, N. and Rybak, M. J. 2022. Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infectious Diseases and Therapy.** 11(2); 661–682.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8960490/>

Denton, M. and Kerr, K. G. 1998. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clin Microbiol Rev.** 11(1): 57–80.

<https://doi.org/10.1128%2Fcmr.11.1.57>

Doi, Y., Wachino, J. I. and Arakawa, Y. 2016. “Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases”. **Infectious Disease Clinics of North America.** 30(2): 523-537.

<https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>

Dong, N., Yang, X., Chan, W. and Chen, S. 2022. *Klebsiella* species: Taxonomy hypervirulence and multidrug resistance. **eBioMedicine.**

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>

Elsaghir, H. and Reddivari, A. K. R. R. 2023. *Bacteroides Fragilis*. **StatPearls.**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553032/>

Falco, A., Guerrero, D., García, I., Correa, A., Rivera, S. and Olaya, M. B., et al. 2021. Molecular Characterization of KPC-2-Producing *Enterobacter cloacae* Complex Isolates from Cali, Colombia. **Antibiotics.** 10(6): 694.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics10060694>

Fusco, V., Abriouel, H., Benomar, N., Kabisch, J., Chieffi, D., Cho, G. S. and Franz C. M. A. P. 2018. “Chapter 10 - Opportunistic Food-Borne Pathogens”. **Food Safety and Preservation.** 269-306.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814956-0.00010-X>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Girlich, D., Bonnin, R. A., Dortet, L. and Naas, T. 2020. Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. **frontiers in microbiology**. 11: 256.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7046756/>
- Golemi-Kotra Dasantila. 2008. “*Serratia*, *Edwardsiella* and *Morganella* Infections. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. 1-6.  
<https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.63827-9>
- Håkonsholm, F., Hetland, M., Svanevik, C., Lunestad, B., Löhr, I. and Marathe, N. 2022. “Insights into the genetic diversity, antibiotic resistance and pathogenic potential of *Klebsiella pneumoniae* from the Norwegian marine environment using whole-genome analysis”. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113967>
- Heinz Eva. 2018. The return of Pfeiffer’s bacillus: Rising incidence of ampicillin Resistance in *Haemophilus influenzae*. **Microb Genom**. 4(9):  
<https://doi.org/10.1099%2Fmgen.0.000214>
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Kurokawa, K., Oshima, K. et al. 2014. “Genome Evolution and Plasticity of *Serratia marcescens*, an Important Multidrug-Resistant Nosocomial Pathogen” **Genome Biol. Evol.** 6(8): 2096-2110.  
<https://doi.org/10.1093%2Fgbe%2Fevu160>
- Kariuki, K., Diakhate, M. M., Musembi, S., Tornberg-Belanger, S. N., Rwigy, D., Mutuma, T., Mutuku, E., Tickell, K. D., Soge, S. O., Singa, O. B., Walson, J. L., Pavlinac, P. B. and Kariuki, S. 2023. Plasmid-mediated quinolone resistance genes detected in Ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolated from children under five years at hospital discharge, Kenya. **BMC Microbiology**. 23(1): 129.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-023-02849-2>
- Mezzatesta, M. L., Gona, F. and Stefani S. 2012. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbio**. 7(7): 887-902.  
<https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>

เอกสารนี้ Mthembu, T. P., Zishiri, O. T. and El-Zowalaty, M. E. 2021. Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance in Food Chain and Livestock-Associated

*Salmonella* Species. **Animals**. 11(3): 872.

<https://doi.org/10.3390/ani11030872>

Ogane, K., Taramoto, N., Kodana, M., Onodera, A., Imai, K., Sakai, J., Kawamura, T. et al. 2020. Antimicrobial susceptibility and prevalence of resistance gene in *Bacteroides fragilis* isolated from blood culture bottles in two tertiary care hospitals in Japan. **Anaerobe**. 64: 102215.

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102215>

Oliveira-Garcia, D., Agnol, M., Rosales, M., Azzuzs, A., Martinez, M. and Girón, J. 2002. Characterization of Flagella Produced by Clinical Strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Emerg Infect Dis**. 8(9), 918–923.

<https://doi.org/10.3201%2Feid0809.010535>

Oppenheim, B. A. 1997. Antibiotic Resistance in *Neisseria meningitidis*.

[https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement\\_1.S98](https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement_1.S98)

Othman, M., Schirra, H., McEwan, A. and Kappler, U. 2014. Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolomic and genomic analysis. **Front Microbiol**. 5: 69.

<https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2014.00069>

Peirano, G., Chen, L., Nobrega, D. Finn, T. J., Kreiswirth, B. N., Vinney, R. D. and Pitout, J. J. D. 2022. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Escherichia coli*, 2015–2017. **Emerg Infect Dis**. 28(5): 924-931.

<https://doi.org/10.3201%2Feid2805.212535>

Polrel, P., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P. and Schwarz, S. 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **MicrobiolSpectrum**. 6(4):

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>

Potts, C. C., Retchless, A. C., McNamara, L. A., Marasini, D., Reese, N., Swint, S., Hu, F. et al. 2021. Acquisition of Ciprofloxacin Resistance Among an Expanding Clade of  $\beta$ -Lactamase-Positive, Serogroup Y *Neisseria meningitidis* in the United States. **Clinical Infectious Diseases**. 73: 1185–1193.

<https://doi.org/10.1093/cid/ciab358>

Giannella, R. A. 1996. Chapter 21 *Salmonella*. **Medical Microbiological**. 4th edition.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่... อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Regli, A. D., Lavigne, J. P. and Pagès, J. M. 2019. *Enterobacter* spp. Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology**. 32(4):  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6750132/>
- Rogers, M. B., Parker, A. C. and Smith, C. J. 1993. Cloning and Characterization of the Endogenous Cephalosporinase Gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* Reveals a New Subgroup of Ambler Class A -Lactamases. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. 37: 2391-2400.  
<https://doi.org/10.1128%2Faac.37.11.2391>
- Romaneli, M. T., Tresoldi, A. T., Pereira, R. M., Garcia, M. T., Hofling, C. C. and Resende, M. R. 2018. Invasive Non-type B *Haemophilus influenzae* disease: report of eight cases. **Rev Paul Pediatr**. 37(2): 156-160.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651304/>
- Rouphael, N. G. and Stephens, D. S. 2012. *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology. **Methods in Molecular Biology**. 799: 1-20.  
[https://doi.org/10.1007%2F978-1-61779-346-2\\_1](https://doi.org/10.1007%2F978-1-61779-346-2_1)
- Sánchez, M. and Martínez, J. 2018. Overexpression of the Efflux Pumps SmeVWX and SmeDEF Is a Major Cause of Resistance to Co-trimoxazole in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrob Agents Chemother**.  
<https://doi.org/10.1128%2FAAC.00301-18>
- Schlesinger, J., Venezia, S. N., Chmelnitsky, I., Münz, O. H., Leavitt, A. Gold, H. et al. 2005. Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacter* Isolates Obtained in Tel Aviv, Israel. **Antimicrobial chemotherapy**. 49(3): 1150–1156.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC549242/>
- Soong, T. W., Ho, B., Thong, T. W., Ng, H. C., Ng, S. C. and Yap, E. H. 1984. CHARACTERIZATION OF PLASMIDS FROM CLINICAL ISOLATES OF BACTEROIDES. **SINGAPORE MEDICAL JOURNAL**. 25: 146-151.  
<http://smj.sma.org.sg/2503/2503smj4.pdf>

The Institute for Health Metrics and Evaluation. 2019. The burden of antimicrobial resistance (AMR) in Thailand.

[https://www.healthdata.org/sites/default/files/files/Projects/GRAM/Thailand\\_0.pdf](https://www.healthdata.org/sites/default/files/files/Projects/GRAM/Thailand_0.pdf)  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโครงการวิจัยเพื่อการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับสุขภาพ  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ก็ตาม อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tristram, S., Jacobs, M. and Appelbaum, P. 2007. “Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*” **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**. 368–389.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865592/pdf/0040-06.pdf>
- Tsang, R. S. S., Ahmad, T., Jamieson, F. B. and Tyrrell, G.J. 2018. WGS analysis of a penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* strain containing a chromosomal ROB-1  $\beta$ -lactamase gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 74, 22-28.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dky391>
- Tsodikova, S. G. Labby, K. J. 2016. “Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives”. **Medchemcomm**. 7(1): 11–27.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752126/>
- Tzeng, Y. L., Martin, L. E. and Stephen, D. S. 2013. Environmental survival of *Neisseria meningitidis*. **Epidemiology & Infection**. 142: 187-190.  
<https://doi.org/10.1017/S095026881300085X>
- Voetsh, G. M., Fluit, A. C., Scharringa, J., Schapendonk, C., Munckhof, T., Hall, M. A. and Stuart, J.C. 2013. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**. 167: 359-362.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.001>
- Wilson, M. G. and Pandey, S. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*. **StatPearls**.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>
- Wong, M. H., Chan, E. W., Liu, L. Z. and Chen, S. 2014. PMQR genes *oqxAB* and *aac(6)Ib-cr* accelerate the development of fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhimurium*. **Front Microbiol**. 5: 521.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00521>
- Yoon, E. J. and Jeong, S. H. 2021. Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Front Microbiol**.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614058>



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### สูตรอาหาร Tryptic soy broth (TSB)

Pancreatic Digest of Casein 17.0 g

Papacies Digest of Soybean 3.0 g

Dextrose 2.5 g

Sodium Chloride 5.0 g

Dipotassium Phosphate 2.5 g

Final pH  $7.3 \pm 0.2$  สูตรเตรียมอาหารสำเร็จรูป ชั่งอาหาร 30.0 g ในการเตรียมอาหาร 1,000 ml. และนำไปฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## หนังสือแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน

ข้าพเจ้า (ผู้รับมอบหมาย) ร.อ. นพวิฑู พิงก์วรรณ ทองดี ตำแหน่ง อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชา  
บริษัท (ชื่อบริษัท) ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระจอมเกล้า  
ตั้งอยู่ที่ (ที่อยู่บริษัท) 317 ต.ราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม. 10400

ได้รับนักศึกษา ชื่อ นพกษิณีเดชา ชื่นชม รหัสนักศึกษา 63050444 ของ  
สาขาวิชา ..... ภาควิชา จุลชีววิทยา ๑๓๓๖๖๖๖๖ คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เข้าร่วมโครงการสหกิจศึกษา ณ สถานที่ข้างต้น ระหว่าง  
วันที่ ๑๓ ก.ค. ๖๖ ถึงวันที่ ๑๓ ต.ค. ๖๖ ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นความลับทางการค้าและเป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ในกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ได้ ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาเท่านั้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ออกสู่สาธารณะได้

ในกรณีที่มีการพิจารณาโครงการ/ผลงาน ดังกล่าวเข้าร่วมประกวด/แข่งขัน โครงการ/ผลงาน สหกิจศึกษาในทุก  
ระดับ ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงดังนี้

- อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ
- ไม่อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ

(ลงชื่อ) ..... ผู้แสดงเจตจำนง

(พิมพ์ชื่อจริง) ..... ทองดี

(ลงชื่อ) ..... ผู้แทนภาควิชา/คณะ

(พิมพ์ชื่อ) ..... นพวิฑู พิงก์วรรณ

(ลงชื่อ) ..... พยาน

(.....)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หนังสือแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน

ข้าพเจ้า (ผู้รับมอบหมาย) ร.อ. นณิว คิมพ็ววรรณ ทองดี ตำแหน่ง อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา อภม.  
บริษัท (ชื่อบริษัท) ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า  
ตั้งอยู่ที่ (ที่อยู่บริษัท) 317 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม 10400

ได้รับนักศึกษา ชื่อ น.ส. นันทิมา รักษาธรรม รหัสนักศึกษา 63050452 ของ  
สาขาวิชา - ภาควิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เข้าร่วมโครงการสหกิจศึกษา ณ สถานที่ข้างต้น ระหว่าง  
วันที่ 3 ก.ค. 66 ถึงวันที่ 31 ต.ค. 66 ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นความลับทางการค้าและเป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ในกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ได้ ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาเท่านั้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่หรือออกสู่สาธารณะได้

ในกรณีที่มีการพิจารณาโครงการ/ผลงาน ดังกล่าวเข้าร่วมประกวด/แข่งขัน โครงการ/ผลงาน สหกิจศึกษาในทุก  
ระดับ ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงดังนี้

- อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ
- ไม่อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ

(ลงชื่อ) ร.อ. นณิว คิมพ็ววรรณ ทองดี ผู้แสดงเจตจำนง

( นณิว คิมพ็ววรรณ ทองดี )

(ลงชื่อ) นณิว คิมพ็ววรรณ ทองดี ผู้แทนภาควิชา/คณะ

( นณิว คิมพ็ววรรณ ทองดี )

(ลงชื่อ) \_\_\_\_\_ พยาน

( \_\_\_\_\_ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้