

รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ P1350161

ชื่อโครงการ: การศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
ที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย

A study of mutated *Burkholderia pseudomallei* isolated from Lower
northeastern part of Thailand

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.ภาวณา พนมเขต
วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข
และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2556

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุขและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556 ภายใต้การควบคุมและกำกับติดตามของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และได้รับการสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือวิจัยจากวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งเป็นต้นสังกัดขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือวิจัย รศ.ดร.สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยให้คำแนะนำในการออกแบบการทดลอง อภิปรายและแปลผลการทดลอง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลร่วมผลิตนักศึกษาแพทย์ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษ และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ ที่อำนวยความสะดวกในการจัดเก็บเชื้อตัวอย่าง ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผศ.ดร.ภาวนา พนมเขต

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อภาษาไทย

Burkholderia pseudomallei คือสาเหตุของโรคติดเชื้อเมลลิออยโดสิสและยา ceftazidime คือยาที่ใช้ในการรักษา อย่างไรก็ตามอัตราการตายก็ยังพบสูงในพื้นที่ระบาดของโรค การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของ *bla*_{PenA} และ *bla*_{OXA} และแนวโน้มของยาปฏิชีวนะของยาในกลุ่ม β -lactam ในเชื้อ *B. pseudomallei* จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เชื้อ *B. pseudomallei* ทั้งหมดจำนวน 1340 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษ และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ ในช่วงระหว่าง เดือนมกราคม 2556 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2558 ถูกนำมาศึกษาความไวของยาด้านจุลชีพต่อเชื้อด้วยวิธี standard disk diffusion และการทำ minimum inhibitory concentration (MIC) เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบดั้งเดิม (conventional polymerase chain reaction) ถูกใช้ในการตรวจหายีนสร้างเอนไซม์ β -lactamase คือ *bla*_{PenA} และ *bla*_{OXA} ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนมากไวต่อยา ceftazidime, piperacillin, cotrimoxazole ciprofloxacin และ imipenem ด้วยวิธี standard disk diffusion มี Cefazidime MIC อยู่ระหว่าง ≤ 1 – ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ และ imipenem MIC อยู่ระหว่าง ≤ 0.5 – ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของยา ceftazidime คือ 2 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และ MIC₅₀ and MIC₉₀ ของยา imipenem คือ ≤ 0.5 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ การตรวจหายีน class D beta-lactamase หรือ oxa ทำโดยใช้ conventional PCR และ gel electrophoresis สามารถตรวจพบยีน oxa ได้ทุกตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *B. pseudomallei* ผลการตรวจสอบลำดับเบส และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยวิธีชีวสารสนเทศพบว่าลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสจากลำดับเบสมีความเหมือน 100 % กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน oxa ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไม่พบการกลายพันธุ์ทั้งในระดับยีนและระดับยีนและโปรตีน oxa ผลการตรวจหายีน *PenA* พบว่าไม่สามารถตรวจพบยีน *PenA* ได้ในทุกโปรตีนตัวอย่างดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาตอนเริ่มต้นของคณะผู้วิจัยสามารถตรวจพบยีน *PenA* ขนาด 300-500 bp ดังนั้นจึงมีความสนใจส่ง amplified product ดังกล่าวไปทำ DNA sequencing เพื่อยืนยันว่าที่พบเป็นยีน *PenA*

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Burkholderia pseudomallei are a causative agent of melioidosis and ceftazidime is the drug of choice for treatment. However, the motility rate is high in endemic areas. This study aimed to investigate an incident of the *bla*_{PenA} and *bla*_{OXA} mutation and tendency of β -lactam antibiotics in *B. pseudomallei* from patients admitted to hospitals in lower North-East Thailand. A total of 1,340 isolates of patients with *B. pseudomallei* admitted to Sappasitthiprasong Hospital, Sisaket Hospital, and Amnatcharoen Hospital between January 2013 and February 2015 were determined for antimicrobial susceptibility by standard disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC). The conventional polymerase chain reaction (PCR) was used for the detection of *bla*_{PenA} and *bla*_{OXA} in β -lactamase genes with the specific primers. Almost all of the clinical isolates of *B. pseudomallei* were susceptible to ceftazidime, piperacillin, cotrimoxazole, ciprofloxacin, and imipenem by the standard disk diffusion test. Cefazidime MIC was ≤ 1 - ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ and imipenem MIC was ≤ 0.5 - ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. MIC₅₀ and MIC₉₀ of ceftazidime were 2 $\mu\text{g/ml}$ and 4 $\mu\text{g/ml}$ respectively, and MIC₅₀ and MIC₉₀ of imipenem were ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and 1 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The conventional PCR followed by gel electrophoresis revealed that only Class D beta-lactamase gene or *oxa* was detected in all DNA samples isolated from *B. pseudomallei*. DNA sequencing followed by amino acid analysis and comparison by the bioinformatic approach found that all translated amino acid sequences showed 100% identity to those reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. This result demonstrated that there were no any mutations in *oxa* gene in *B. pseudomallei*. *PenA* gene was not detected in all DNA samples. However, the *penA* gene with the length of 300-500 bp was detected from the beginning of this study. It is suggested that this amplified product be sent for sequencing to confirm that it is *penA*.

สารบัญเรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
บทนำ	
1. บทนำความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
เนื้อเรื่อง	
1. โรคเมลิออยโดสิส	3
การทบทวนวรรณกรรม	3
1. <i>Burkholderia pseudomallei</i>	3
2. ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Beta-lactams	5
3. การดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactams	6
4. ESBL families	8
5. Multidrug resistance in ESBL producers	9
6. การตรวจหาเอนไซม์และยีนเบต้าแลคตาเมส	10
ระเบียบวิธีวิจัย	11
1. แบบที่เรีย	11
2. การทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพ	11
3. การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ <i>B. Pseudomallei</i>	11
4. การตรวจหายีน Class D oxacillinases (oxa) และ Class A carbapenemases (penA) ในเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	11
5. แผนการทดลอง	12
6. สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล	13
ผลการทดลอง	13
1. การทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพ	13
2. ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีน oxa และ penA ด้วยวิธีการ PCR	17
3. การตรวจหายีน oxa และ penA ในเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> ที่ดื้อยา โดยใช้ไพรเมอร์คู่ใหม่	23
4. ผลการหาลำดับและการวิเคราะห์กรดอะมิโนของยีน oxa	25
5. ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ <i>B. Pseudomallei</i> B001	44
6. ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ <i>B. Pseudomallei</i> B006	45
7. ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ <i>B. Pseudomallei</i> B007	46

สารบัญเรื่อง	หน้า
8. ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ <i>B. Pseudomallei</i> B008	47
ข้อวิจารณ์	48
สรุปการศึกษาตามวัตถุประสงค์	50
สรุปและข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	54

สารบัญตาราง	หน้า
1. แสดงผลinhibition zoneของยาCeftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing	13
2. แสดงผลความไวของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ของยาCeftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion รพ.สรรพสิทธิประสงค์จำนวน 876isolates	14
3. แสดงผลความไวของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ของยาCeftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion รพ.ศรีสะเกษจำนวน 272 isolates	14
4. แสดงผลความไวของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ของยาCeftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion รพ.อำนาจเจริญจำนวน 192 isolates	15
5. แสดงการเปรียบเทียบผลความไวของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ของยาCeftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion ระหว่าง รพ.สรรพสิทธิประสงค์ รพ.ศรีสะเกษและอำนาจเจริญ	16
6. Break point ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ตามเกณฑ์ของ CLSI	16
7. แสดงผลความไวของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ของยาCeftazidime และ Imipenem ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testingที่แยกได้จาก รพ.สรรพสิทธิประสงค์ รพ.ศรีสะเกษและอำนาจเจริญ	16
8. แสดงค่า MIC ₅₀ และ MIC ₉₀ ของยา Ceftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ที่แยกได้จาก รพ. รพ.สรรพสิทธิประสงค์ รพ.ศรีสะเกษและอำนาจเจริญ	17
9. ยีน <i>oxa</i> สำหรับการออกแบบไพรเมอร์	18
10. ยีน <i>penA</i> สำหรับการออกแบบไพรเมอร์	19
11. ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน <i>penA</i> และ <i>oxa</i> ครั้งที่1	19
12. องค์ประกอบน้ำยาในการทำ PCR	19
13. PCRcondition สำหรับยีน <i>penA</i> และ <i>oxa</i>	20
14. ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน <i>oxa</i> และ <i>penA</i> ครั้งที่2	23
15. ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>Oxa</i> และ <i>penA</i> ในเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> จำนวน 22 ไอโซเลต	24

สารบัญภาพ	หน้า
1. ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>oxa</i> จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์ B001-B010	21
2. ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>penA</i> จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์ B001-B010	22

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัยฯ

MIC: Minimal Inhibitory Concentration

ESBL: Extended spectrum beta lactamase

PCR: polymerase chain reaction

บทนำความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยเป็นโรคติดเชื้อจากชุมชนมากเป็นอันดับต้นๆ พบมากในกลุ่มผู้ป่วยที่มีพื้นฐานมีโรคประจำตัว เช่น โรคเบาหวาน โรคโลหิตจาง เป็นต้น และมักพบในประชากรกลุ่มที่มีอาชีพทางเกษตรกรรม ที่มีลักษณะของอาชีพสัมผัสกับดิน เช่น ชาวไร่ ชาวนา เพราะเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถพบได้ในดิน และน้ำ และมีรายงานพบจุลินทรีย์นี้สูงในดินในแถบจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดอุบลราชธานี ในหลายพื้นที่ ปัจจุบันยา Ceftazidime และ Carbapenem เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อเมลิออยโดสิส แม้ปัจจุบันจะพบว่าผลการทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อ ceftazidime ยังอยู่ในเกณฑ์ดี และพบ primary resistance เพียงเล็กน้อย แต่จากการรายงานผู้ป่วยโรคติดเชื้อเมลิออยโดสิสที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime ที่ได้ผลเพียงร้อยละ 30 และยังพบรายงานการเกิดการกลับเป็นซ้ำสูง จากการศึกษาศึกษาเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จำนวน 85 isolates โดยเทคนิคทางโมเลกุล พบว่าเชื้อร้อยละ 85 ขึ้นไปมี Oxa, และ PenA ยีน ซึ่งยีนเหล่านี้ทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ซึ่งส่งผลต่อการใช้ยาในกลุ่ม beta-lactam และจากการศึกษาพบว่า Classical Extended spectrum beta lactamase (ESBL) พัฒนามาจากการกลายพันธุ์ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase เช่น TEM-/SHV-derived ESBL เป็นต้น ทำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ดื้อต่อยาในกลุ่ม beta lactam และ beta lactam inhibitor ทำให้เกิดข้อจำกัดในการเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วย และต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการใช้ยา broad spectrum ที่มีราคาแพง และทำให้การรักษาไม่ได้ผล และส่งผลต่อการพัฒนาตัวยาวงของจุลินทรีย์ในอนาคต ด้วยปัญหาดังกล่าว ทำให้กลุ่มผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาศึกษาเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนใต้ ได้แก่ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โรงพยาบาลศรีสะเกษ โรงพยาบาลยโสธร และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ ด้วยการศึกษาค้นคว้า Minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยาในกลุ่ม beta-lactam ตรวจลำดับเบสและการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เพื่อให้ทราบแนวโน้มของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาในกลุ่ม beta-lactam และพัฒนาการดื้อยาของเชื้อ ในลำดับต่อไป หากพบเชื้อที่กลายพันธุ์ต่อยีนที่สร้าง beta lactamase จะทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR เพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อเหล่านี้ต่อไปในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ทราบปัญหาดังกล่าว และเผยแพร่องค์ความรู้ให้แก่บุคลากรทางการแพทย์ โดยเฉพาะแพทย์ให้ตระหนักถึงการเลือกใช้ยาต้านจุลินทรีย์ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการรักษา ดูแลผู้ป่วย และพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยเชื้อกลายพันธุ์เหล่านี้ ด้วยเทคนิค PCR

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อหาอุบัติการณ์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มียีน Oxa และ PenA ภายพันธุ์
2. เพื่อหาแนวโน้มของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาในกลุ่ม beta lactam
3. เพื่อหาลำดับของกรดอะมิโนที่กลายพันธุ์ของยีน Oxa และ PenA และออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *B. pseudomallei* ภายพันธุ์

โรคเมลิออยโดสิส

โรคติดเชื้อเมลิออยโดสิส เป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนใต้ มีอัตราการตายและการเกิดเป็นซ้ำสูง ยา ceftazidime เป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย แต่ปัจจุบันก็มีรายงานพบเชื้อดื้อต่อยา ceftazidime และมีเพียงร้อยละ 30 เท่านั้นที่รักษาได้ดี จากการศึกษาเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จำนวน 85 isolates โดยเทคนิคทางโมเลกุล พบว่าเชื้อร้อยละ 85 ขึ้นไปมี Oxa และ PenA ยีน ซึ่งยีนเหล่านี้ทำให้จุลชีพสามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ซึ่งส่งผลต่อการใช้ยาในกลุ่ม beta-lactam และถ้ายีนเหล่านี้มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของลำดับกรดอะมิโน ก็จะนำมาสู่การสร้าง Extended spectrum beta lactamase (ESBL) ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อจุลชีพดื้อต่อยาในกลุ่ม beta lactam และ beta lactam inhibitor ทำให้เกิดข้อจำกัดในการเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วย และการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลชีพในบางลำดับกรดอะมิโนอาจไม่ทำให้เชื้อมีค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยาต้านจุลชีพสูง แต่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับจุลชีพ บางลำดับอาจมีผลต่อการสร้างเอนไซม์เพื่อยับยั้งการทำงานของยา หรือการเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อ receptor สำหรับจับยาทำให้ยาจับที่ receptor เหล่านั้นไม่ได้ ส่งผลให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพไม่ได้ผล แต่ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยความไวของยาต่อยาต้านจุลชีพทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค standard disc diffusion และ MIC ไม่สามารถทำนายลักษณะหรือบอกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ ทำให้เกิดการใช้ยาที่ไม่ได้ผลสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และมีโอกาสทำให้เชื้อจุลชีพพัฒนาดื้อยาสูงขึ้น ที่สำคัญผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลเป็นเวลานาน ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการรักษา และดูแลผู้ป่วยสูงขึ้น ตามลำดับ เพื่อให้ลดปัญหาดังกล่าว การใช้เทคนิคทางโมเลกุลเพื่อตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *B. pseudomallei* จะช่วยให้ทราบการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน หาไพรเมอร์ที่เหมาะสม และจัดทำวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR ทำให้แพทย์สามารถเลือกยาที่เหมาะสม เพื่อให้การรักษาได้ผลเร็วและลดค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วย

การทบทวนวรรณกรรม

Burkholderia pseudomallei

เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่พบมากในดินแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเมลิออยโดสิส เชื้อนี้เป็น Saprophytic bacteria พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน และน้ำ ในถิ่นระบาดพบว่าเชื้อนี้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีมากสามารถแยกเชื้อได้จากดินที่อยู่ลึกลงไปถึง 90 เซนติเมตร (Cheng, 2005) ในฤดูร้อนพบเชื้อสูงกว่าในฤดูฝน ชาวสวนสัมผัสกับดินและน้ำในฤดูฝนจึงมีโอกาสรับเชื้อมากในฤดูฝนจึงมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อและเกิดโรคสูงนอกจากนั้นเชื้อนี้สามารถทนอุณหภูมิต่ำในตู้เย็นได้เป็นเวลาหลายเดือนหรือน้ำกลั่นเป็นเวลานาน และเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเลี้ยงที่มีความเป็นกรด pH 4.5 และที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส ในประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *B. pseudomallei* จากชุมชนหรือ community acquired septicaemia ร้อยละ 20 และมีอาการรุนแรงอัตราการตายสูงร้อยละ 70-80%

(Chaowagul, 1989) ปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกาได้จัดเชื้อนี้ให้อยู่ในกลุ่มซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ Category B ลักษณะทางคลินิกและอาการแสดง อาการและอาการแสดงของโรคคล้ายคลึงกับโรคอื่นๆมากมายเกิดได้กับอวัยวะทุกระบบในร่างกายมีความหลากหลายทางคลินิกมาก ตั้งแต่การติดเชื้อโดยไม่มีอาการการติดเชื้อเฉพาะที่ในอวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง ที่อาจเป็นเรื้อรังจนถึงรุนแรงการติดเชื้อเฉียบพลันในกระแสเลือด คล้ายกับการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ (White, 1989; Chaowagul, 2000; Dance, 2002) ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตในเวลาเพียง 1-3 วัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ร้อยละ 88 จะมีอาการไข้ซึ่งพบร่วมกับอาการสั่นถึงร้อยละ 35.3 นอกจากนั้นจะมีอาการเหมือนอาการติดเชื้อทั่วไป เช่น อ่อนเพลีย ไอแห้งๆหรือไอมีเสมหะ ในรายที่มีอาการรุนแรงจะพบมีการเปลี่ยนแปลงระดับความรู้สึกตัวได้การติดเชื้อในกระแสเลือด พบได้ร้อยละ 65 ของผู้ป่วยทั้งหมด และอาจพบร่วมกับการติดเชื้อของอวัยวะอื่นๆ ในกรณีของ disseminated septicaemia ซึ่งพบการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 แห่งพบได้ร้อยละ 46 สำหรับ non-disseminated septicaemia ซึ่งพบ การติดเชื้อร่วม 1 แห่งพบได้ร้อยละ 10 ส่วน primary infectionที่ไม่พบแหล่งติดเชื้อ จากอวัยวะอื่นพบได้ร้อยละ 9 ผู้ป่วยอาจมีอาการช็อกร่วมด้วย และเสียชีวิตในเวลารวดเร็วอัตราการตายจากภาวะนี้สูงถึงร้อยละ 60-80 และสูงกว่าการติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญ (Leelarasamee, 1989; Chaowagul, 2000) ปอดอักเสบเป็นอาการที่พบได้บ่อยที่สุดประมาณร้อยละ 50 อาจเป็น primary focus หรือพบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือดก็ได้ ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 70 การติดเชื้อในปอดเป็น community acquired pneumonia ที่พบบ่อยที่สุดในผู้ใหญ่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Chaowagul, 2000; White, 2003)

สำหรับผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคเมลิออยโดสิสพบว่าทำให้เกิดภาวะต่อมน้ำลาย parotid อักเสบเป็นฝีได้บ่อยมากจนอาจกล่าวได้ว่า *B. pseudomallei* เป็นสาเหตุของการอักเสบของ ต่อมน้ำลาย parotid ที่พบได้บ่อยที่สุดถึงร้อยละ 30 ของผู้ป่วยเด็กเมลิออยโดสิส

การวินิจฉัยโรคทางคลินิกทำได้ยากเนื่องจากมีอาการและอาการแสดงที่คล้ายคลึง กับโรคอื่นๆ จะต้องอาศัยลักษณะทางคลินิกและพิสูจน์ว่าเกิดจากเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทาง เช่น เสมหะ หนอง หรือเลือด การย้อมสีแกรมเชื้อ *B. pseudomallei* จะติดสีแกรมลบรูปแท่ง โดยจะติดสีเข้มที่ปลายทั้งสองข้าง (bipolar staining) แต่ลักษณะการติดสีดังกล่าวไม่จำเพาะต่อเชื้อนี้อาจพบ ได้ในพวก *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* และ *Pasteurella pestis* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องเพาะเชื้อและวินิจฉัยด้วยการตรวจทางชีวเคมี การย้อมสีแกรมมีความไวเพียงร้อยละ 55 การตรวจเพาะเชื้อโดยทั่วไปต้องใช้เวลาอย่างน้อย 48-72 ชั่วโมง เชื้อมีลักษณะโคโลนีที่เหี่ยวย่น และมีกลิ่นของไอระเหยของดินหลังฝนตกการใช้ Ashdown' selective media จะให้ผลดีกว่า blood agar และ MacConky agar การตรวจทาง serology ให้ผลรวดเร็ว นิยมตรวจด้วยวิธี Indirect Haemagglutination test (IHA) แต่การแปลผลจากค่า cut off titer แตกต่างกันขึ้นกับว่าเป็นถิ่นระบาดของเชื้อหรือไม่ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคเป็นไปด้วยความยากลำบาก ปัจจุบันมีรายงานการใช้ antigen และ antibody ที่มีความจำเพาะมากขึ้นและนำมาพัฒนาด้วยเทคนิคต่างๆเพื่อจะใช้วินิจฉัยโรค

การรักษาโรคเมลิออยโดสิสด้วยยาปฏิชีวนะให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจทั้งๆที่เชื้อไวต่อยาในหลอดทดลอง การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาในหลอดทดลองไม่ว่าจะเป็นทดสอบด้วยวิธีเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพไม่สอดคล้องกับผลการรักษาเสมอไป (Jenny, 2001) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกที่น่าจะมีผลต่อการรักษา เช่น จำนวนของเชื้อโรคหรือการออกฤทธิ์ของยาเป็นเพียง bacteriostatic เป็นต้น ปัจจุบันก็เริ่มมีรายงานการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา เนื่องจากเชื้อมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น สามารถสร้างไบโอฟิล์ม มี chromosome-mediated beta-lactamases encoded gene ที่สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อยับยั้งหรือทำลายยา (Livermore, 1987; Cheung, 2002; Niumsup, 2002; Tribuddharat, 2003) หรือมีการสูญเสีย Penicillin binding protein 3(PBP3) (Chantratita, 2012) โดยพบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยา ceftazidime จะมีการหายไปของยีนที่ encode PBP3 เป็นต้น จากหลายปัจจัยน่าจะนำมาสู่การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล

ยาด้านจุลชีพกลุ่ม Beta-lactams

เป็นยาปฏิชีวนะที่มีความสำคัญในการทำลายเชื้อของโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ มีส่วนประกอบของโครงสร้างเป็น four membered beta-lactam ring ซึ่งโครงสร้างนี้มีบทบาทในการทำลายเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างผนังเซลล์ ที่เรียกว่า penicillin binding proteins (PBPs) ทำให้เชื้อจุลชีพถูกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่

1. **Penicillin** จัดเป็นสารที่มี Beta-lactams ring เป็นโครงสร้างพื้นฐานออกฤทธิ์โดยห้ามการสร้างผนังเซลล์ โดยจับกับ Penicillin-binding-protein ชนิด 1-3 ทำให้ไม่เกิด Transpeptidation จึงไม่มีการสร้าง Peptidoglycan ทำให้มี autolysis ทำให้เซลล์แตก แบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

1.1 Natural penicillins ได้แก่ Penicillin G, Penicillin V ซึ่งยาในกลุ่มนี้ไม่ทนต่อ Penicillinase แต่จะมีประสิทธิภาพสูงต่อเชื้อแกรมบวกและ Spirochete

1.2 Penicillinase resistant penicillin เช่น Methicillin, Oxacillin ใช้ในแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้าง Penicillinase

1.3 Aminopenicillin ไม่ทนต่อ Penicillinase ได้แก่ Ampicillin และ Amoxicillin ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด

1.4 Extended spectrum penicillins ใช้ได้ผลกับ gram negative โดยรวมถึง *Pseudomonas aeruginosa* เช่น Piperacillin

2. **Cephalosporins** เป็นยาในกลุ่ม Beta-lactam ที่ออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ชนิด PBP1-3 ยาในกลุ่มนี้ทนต่อเอนไซม์ Penicillinase ใช้ได้ดีในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบยาในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 4 รุ่นตามความกว้างในการออกฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบและความทนต่อเอนไซม์ Beta-lactamases ดังนี้

2.1 First generation cephalosporins เช่น Cephalothin, Cefazolin ใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมบวกทรงกลมและแกรมลบบางชนิด เช่น *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ Cephalosporinase

2.2 Second generation cephalosporins เช่น Cefuroxime มีประสิทธิภาพดีกว่า First generation cephalosporins คือ หนองเอนไซม์ Cephalosporinase ทำให้มีการออกฤทธิ์กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มขึ้น ส่วน Cefoxitin ซึ่งเป็นยาในรุ่น 2 ซึ่งทนต่อ Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) เพราะเป็นยาในกลุ่ม Cephamycins

2.3 Third generation cephalosporins เช่น Cefpodoxime, Ceftriazone มีประสิทธิภาพดีใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

2.4 Fourth generation cephalosporins เช่น Cefepime มีฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบกว้างกว่าและทนต่อเอนไซม์ Cephalosporinase ได้ดี

3. **Monobactams** เป็นยาในกลุ่ม Beta-lactams ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแกรมลบตรงที่ PBP3 ทำให้เซลล์ยืดและตายในที่สุด โดยยาในกลุ่มนี้ทนต่อการทำลายด้วย Beta-lactamases เช่น Azteronam การดื้อยา Aztreonam อาจพบในเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่สามารถสร้าง K1 beta-lactamases ไปทำลายยาได้

4. **Carbapenems** เป็นสารที่มี Beta lactam ring ที่ออกฤทธิ์กว้างโดยยานี้สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีและทนต่อเอนไซม์ Beta-lactamases รวมทั้ง ESBLs เช่น Imipenem และ Meropenem

ปัจจุบันมีการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ Beta-lactamases เรียกว่า Beta-lactamases inhibitor เช่น clavulanic acid, sulbactam ซึ่งมีคุณสมบัติคือเป็นสารที่ทนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ Beta-lactamases โดยจะใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม Beta lactams เนื่องจากสารนี้มีโครงสร้างคล้ายยาในกลุ่ม Beta-lactams สารนี้จึงไปจับกับเอนไซม์ Beta-lactamases ทำให้ยา Beta-lactams ออกฤทธิ์ได้

การดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactams (Poole, 2004)

กลไกการดื้อยาในกลุ่มนี้มีหลายสาเหตุ ดังนี้

1. การสร้าง beta-lactamases ส่วนใหญ่พบในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบอื่นๆ เช่น *Acinetobacter spp.* *Pseudomonas spp.* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์นี้เป็น hydrolytic enzymes ที่ทำลาย amide bond ของ four membered beta-lactam ring แล้วส่งผลให้ยานั้นหมดประสิทธิภาพ โดยแบ่งคุณสมบัติของ beta-lactamases ตามลำดับ amino acid ดังนี้

1.1 Class A enzyme มีความหลากหลายของเอนไซม์ดังนี้

- Penicillinase พบในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก และเป็นเอนไซม์ที่ย่อยยา Penicillins สามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ด้วย Clavulanic acid
- TEM-1, TEM-2, SHV-1 จัดเป็น restricted spectrum beta-lactamases สามารถย่อยยาในกลุ่ม Penicillins และ Cephalosporins, และ cephalosporinase สามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ด้วย Clavulanic acid
- Numerous SHV and TEM variants, CTX-M-1 to -28, PER-1 & -2, VEB-1, GES-1, IBC-1, several chromosomal enzymes พบในแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ จัดเป็น

extended spectrum beta-lactamases มีคุณสมบัติย่อยยาในกลุ่ม Penicillins, narrow-spectrum and extended –spectrum cephalosporins, monobactams โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid

- TEM-30 to -41, -44, -45, -51, -54 จัดเป็น inhibitor resistant beta-lactamases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยยาในกลุ่ม Penicillins และ Cephalosporins ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid
- TEM-50, -68, -80 จัดเป็น inhibitor resistant extended spectrum beta-lactamases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยยาในกลุ่ม Penicillins และ Narrow spectrum cephalosporins และ extended spectrum cephalosporins กลุ่มที่ low level ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid
- NMC-A, SME-1 to -3, IMI-1, KPC-1 to -3, GES-2, SHV-38 จัดเป็นเอนไซม์กลุ่ม Carbapenemase ย่อยยาในกลุ่ม Penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams และบางครั้งสามารถย่อย extended spectrum beta-lactams ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid

1.2 Class B enzyme ได้แก่ IMP-1 to -13, VIM-1 to -7, SPM-1, และอีกหลายชนิดที่เป็น chromosomal enzymes ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยยาในกลุ่ม beta-lactams ทั้งหมด รวมทั้ง carbapenems และ extended spectrum beta-lactams และ cephalosporins รุ่นที่ 4 เอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid แต่ยับยั้งได้ด้วย EDTA

1.3 Class C enzyme ได้แก่ CMY-2, to -13, LAT-1, MOX-1 & -2, FOX-1 to -6, ACT-1, MIR-1, DHA-1 & -2, ACC-1, CFE-1, และอีกหลายชนิดที่เป็น chromosomal enzymes ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบจัดเป็น expanded spectrum cephalosporinase เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยยาในกลุ่ม penicillins, narrow and extended spectrum cephalosporins, cephamycins และ monobactams เอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid และ EDTA

1.4 Class D enzyme มีหลายชนิด ดังนี้

- 1.4.1 Numerous OXA variants จัดเป็น narrow spectrum penicillinase สามารถย่อยยา penicillins และ cloxacillin เอนไซม์เหล่านี้อาจจะยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid หรือไม่ก็ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย EDTA
- 1.4.2 Several OXA-2 & -10 derivatives, OXA-18, -29, -30, -31, -32, -45 จัดเป็น extended spectrum beta-lactamase ซึ่งสามารถย่อยยาในกลุ่ม penicillins, cloxacillin, extended spectrum beta lactams, และยาในกลุ่ม monobactams บางตัว หรือ cephalosporins รุ่นที่ 4 เอนไซม์เหล่านี้อาจจะยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid หรือไม่ก็ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย EDTA

1.4.3 OXA-23 to -27, -40, -48, -54 จัดเป็น carbapenemase สามารถย่อยยาในกลุ่ม penicillins, oxacillin และ carbapenems เอนไซม์เหล่านี้ถูกยับยั้งได้ด้วย Clavulanic acid แต่ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA

2. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) เป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์กว้างในการ hydrolyze ยาที่เป็น extended spectrum และ cephalosporins รุ่นที่ 3 เกิดจาก plasmid encode อยู่บน chromosomes บ่อยครั้งที่พบร่วมใน integrons ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นอนุพันธ์ของ Class A และ Class D beta lactamases และสามารถยับยั้งได้ด้วย beta –lactamases inhibitors โดยทั่วไปได้ พบมากในแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะในวงศ์ Enterobacteriaceae เอนไซม์เหล่านี้มีรายงานพบได้บ่อยในเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* เชื้อที่สามารถสร้าง ESBL จะต่อต้านยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins รุ่นที่ 1 และ 2 และ cephalosporins รุ่นที่ 3 กลุ่มที่เป็น oxyimino cephalosporins เช่น cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone และกลุ่ม monobactams เช่น aztreonam เชื้อเหล่านี้ยังคงไวเพียวยา cephamycins, cephalosporins รุ่นที่ 4 เช่น cefepime, cefpirome และ carbapenems แต่อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้ก็รักษาเชื้อที่สร้าง ESBL ได้ประสิทธิภาพได้ผลไม่สม่ำเสมอ หรือมีประสิทธิภาพน้อย และนำมาสู่การรักษาที่ล้มเหลว

ESBL families

ในอดีต Classical ESBL พัฒนามาจากเอนไซม์ class A TEM (จาก TEM-1 หรือ TEM-2) และ SHV (จาก SHV-1) และเป็นชนิดที่พบได้บ่อยในกลุ่มของ ESBL ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบในกลุ่มเอนไซม์ class D ESBL เช่น OXA family ได้บ้าง ปัจจุบันมีรายงานการพบ non-TEM, non-SHV, non-OXA ESBL ในแบคทีเรียหลายชนิดทั่วโลก เช่น families BES, GES, PER, TLA, VEB และ CTX-M กลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของ TEM, SHV และ OXA ESBL มักเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ในส่วน narrow spectrum counterparts ซึ่งเอนไซม์ ESBL เหล่านี้มักเป็นลักษณะของ plasmid encoded หรือไม่ก็ mobile ทำให้เกิดการดื้อยาอย่างกว้างตามธรรมชาติปัจจุบันพบ ESBL families ดังนี้

1. TEM-/SHV-derived ESBLs

TEM- derived type ESBL พัฒนามาจาก TEM-1 และ TEM-2 มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Glu 104, Arg164, Gly238 และ Glu240

SHV- derived type ESBL พบได้บ่อยในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความแตกต่างจาก SHV-1 โดยการแทนที่ glycine ที่ตำแหน่งที่ 238 ด้วย serine และตำแหน่ง Glu240 พบได้ใน Enterobacteriaceae และการระบาดของ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* spp.

ซึ่งการแทนที่ที่ตำแหน่ง Arg164 ใน TEM มักพบร่วมกับการดื้อต่อยา ceftazidime และการแทนที่ที่ตำแหน่ง Gly238 มักดื้อต่อ cefotaxime ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการแทนที่ที่ตำแหน่ง Gly238 และ Glu240 ของ SHV-1 จะพบร่วมกับการดื้อต่อ ceftazidime และ cefotaxime

2. OXA-type ESBLs

กลุ่มนี้มีการกลายพันธุ์หลายแบบ เช่น OXA-10 derived ESBLs พบบ่อยว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Gly167 ซึ่งจะทำให้ดื้อต่อยา ceftazidime และ ESBL แบบนี้สามารถพบได้ทั้ง plasmid หรือ chromosomal แต่มักไม่พบร่วมใน classical integrons

3. CTX-M ESBLs

กลุ่มนี้เป็น plasmid encoded CTX-M series ปัจจุบันมีไม่น้อยกว่า 37 variants ที่พบทั่วโลก และมักพบในแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

4. Other ESBLs เช่น PER-1, PER-2, VEB-1

Multidrug resistance in ESBL producers

แบคทีเรียที่สามารถสร้าง ESBL ได้สามารถดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam ตั้งแต่ narrow ถึง broad spectrum เป็นผลมาจาก

1. การที่แบคทีเรียมีการสร้าง AmpC หรือ class C cephalosporinase ซึ่งเป็นสำคัญต่อการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam ในแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ มีทั้ง chromosomal และ plasmid encoded โดย AmpC beta-lactamases พบว่ามีฤทธิ์ต้านต่อ penicillins และ cephalosporins รวมทั้งยาหลายตัวในกลุ่ม oxyiminocephalosporins เช่น cefotaxime, ceftazidime และ cefotetan และยาในกลุ่ม monobactams แต่ยังคงไวต่อ carbapenems และยาบางตัวใน cephalosporins รุ่นที่ 4 เช่น cefepime, ceftipime

- 1.1 Chromosomal AmpC beta-lactamases: พบอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่นๆ เกิดจากการใช้ยาในกลุ่ม beta lactam หลายชนิด โดยเฉพาะยาในกลุ่ม cephalosporins และ carbapenems ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC แต่เอนไซม์นี้จะไม่ hydrolyze ยาในกลุ่ม oxyiminocephalosporins และการแสดงออกของ *ampC* ยีนก็มีอิทธิพลต่อ AmpR regulator และ *ampD* ยีน ทำให้เกิดกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว

1.2 Plasmid encoded AmpC beta-lactamases: การที่แบคทีเรียมี plasmid encoded AmpC beta lactamases ทำให้เพิ่มการดื้อต่อยากลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ beta-lactam แบ่งตามลำดับกรดอะมิโน ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1.2.1 Families of plasmid borne AmpC beta-lactamases

1.2.2 Carbapenemases

1.2.3 Class A carbapenemases

1.2.3 Class B metallo- beta-lactamases

1.2.4 Class D oxacillinases with carbapenemase activity

ในส่วนของเธอชื่อ *B. pseudomallei* ปัจจุบันพบว่าความสามารถในการดื้อต่อยากลุ่ม beta-lactam โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา Ceftazidime มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิด mutation ในยีน beta-lactamase ทั้ง Class A และ Class D beta-lactamase (Sarovich et al. 2012)

การตรวจหาเอนไซม์และยีนเบต้าแลคตาเมส

ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจหา ESBL หลายวิธีส่วนใหญ่เป็นการตรวจหา ESBL ที่สร้างจาก *Klebsiella* ซึ่งเป็น genus ที่พบ ESBL มากที่สุดและสามารถที่จะนำมาใช้ตรวจ ESBL จากเชื้ออื่นๆใน Family Enterobacteriaceae ที่ไม่สร้าง chromosomal beta-lactamase หรือสร้างได้น้อยมากเช่น *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* วิธีการตรวจหาเอนไซม์ชนิดนี้มีหลายวิธี ได้แก่

1. วิธี Double disc โดยอาศัยหลักการว่า ESBL ถูกยับยั้งด้วยสารต้านเบต้าแลคตาเมส
2. วิธี Combination disc ใช้หลักการเดียวกับวิธี disc diffusion โดยเปรียบเทียบ inhibition zone ของแผ่นยาที่มี extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียวกับแผ่นยาที่มี ESC ร่วมกับ clavulanic acid ซึ่งเป็น beta-lactamase inhibitor
3. วิธี dilution ตามวิธีมาตรฐาน broth dilution ของ National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) โดยเปรียบเทียบ MIC ระหว่างหลอดที่ใส่ extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียวกับ MIC ของหลอดที่ใส่ ESC ร่วมกับ clavulanic acid โดยหลักการเช่นเดียวกับวิธี combination disc

นอกจากการตรวจหาเอนไซม์แล้วการตรวจหายีน ESBL โดยอาศัยเทคนิค PCR ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งใน Genus *Klebsiella*, *E. coli* หรือแม้แต่ใน *B. pseudomallei*

ระเบียบวิธีวิจัย

แบคทีเรีย

เก็บเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่ร่วมโครงการ วจินฉัยเชื้อจุลชีพด้วยชุดตรวจทางชีวเคมี และ monoclonal antibody ต่อเชื้อ ตั้งแต่ 1 มกราคม 2556-31 พฤษภาคม 2557 ประมาณ 1,300 isolates รวบรวมเชื้อแบคทีเรียและนำมาทดสอบใน Biosafety level 3 ที่ศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สกัด DNA นำมาทำการทดสอบในระดับโมเลกุลต่อที่วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

การทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพ

ทดสอบค่าความไวของเชื้อจุลชีพต่อยาในกลุ่ม beta-lactam โดยการศึกษา Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยใช้ชุดทดสอบของ Sensititre Non-Fermenter plate (TREK Diagnostic systems, Biosciences Inc., Magellan, USA) ที่มีความเข้มข้นของยาในกลุ่ม beta-lactam ที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 1-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบโดยเลี้ยงใน Ashdown's agar และเลือก 3-5 โคโลนีเขี่ยลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 มิลลิลิตร (ml) แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นดูดมา 10 ไมโครลิตร (μL) ใส่ลงไปในหลอดที่มี Mueller Hinton broth with N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid; 2-(2-[hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]amino)ethane sulfonic acid, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{S}$ (TES) buffer 11 ml ผสมให้เข้ากันดี ดูดเชื้อมา 50 μL ใส่ลงไปใน Sensititre Non-Fermenter plate แล้วนำไปบ่ม 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผล ถ้าหลุมที่มีเชื้อขึ้นจะเห็นการตกตะกอนของเซลล์เป็นกระดุมอยู่ก้นหลุม อ่าน MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการตกตะกอน โดยมีหลุม positive ซึ่งพบตะกอนเซลล์ในหลุมและ negative control ซึ่งไม่พบตะกอนเซลล์ในหลุม Reference strain เป็น *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei*

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โรงพยาบาลศรีสะเกษ และโรงพยาบาลอำนาจเจริญโดยจำนวนเชื้อที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอจะต้องมีคุณสมบัติในการดื้อยา

1.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปยี่ห้อ Genomic Bacterial DNA Extraction kit (RBC, Bioscience, Taiwan) โดยทำการสกัดตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ทุกขั้นตอน

1.3 เก็บรักษา isolated genomic DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่สกัดได้ไว้ในอุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) สำหรับการตรวจหายีน Class D oxacillinases (*oxa*) และ (*penA*)

การตรวจหายีน Class D oxacillinases (*oxa*) และ Class A carbapenemases (*penA*) ในเชื้อ *B. pseudomallei*

เพื่อเป็นการตรวจหายีนเป้าหมาย 2 ชนิด คือ *oxa* และ *penA* ซึ่งเป็นยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การดื้อยาในเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นั้นจะต้องต้องการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายและ

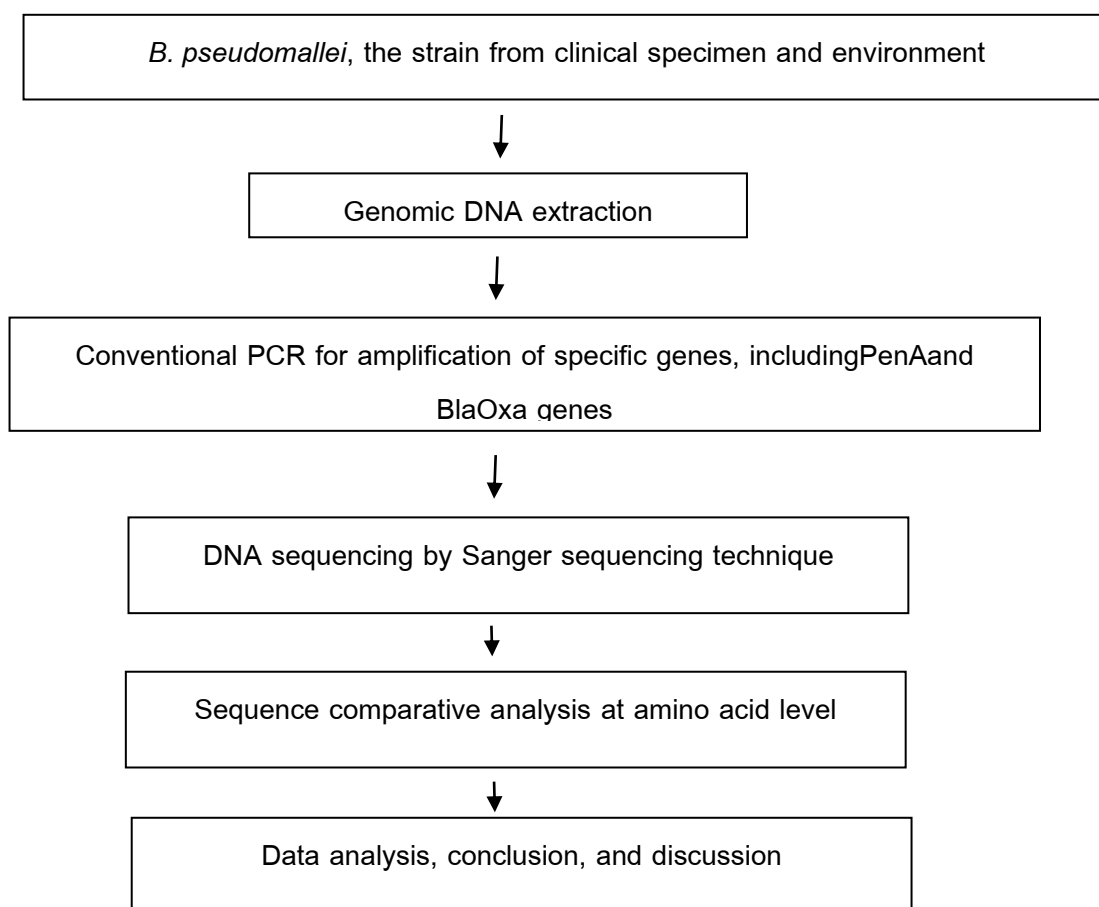
ศึกษาลำดับเบสแต่ละตัว (A, T C, และ G) โดยการทำให้ DNA sequencing ซึ่งสำหรับการทำ PCR นั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนทั้งสองดังกล่าวโดยวิธีการทางชีวสารสนเทศแล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหายีนโดยวิธี conventional PCR ซึ่งมีวิธีการดังนี้

2.1 เก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *oxa* และ *penA* จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) database

2.2 นำนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละชนิด มาทำการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Multiple Sequence Alignment ClustalW Version 1.83 (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)

2.3 นำตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ของแต่ละยีนมาออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป LightCycler® Real-Time PCR (Roche)

แผนการทดลอง



สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

สถานที่ที่ใช้ในการทำวิจัย : วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

แหล่งเก็บเชื้อ: เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษ และ โรงพยาบาลอำนาจเจริญ

ผลการทดลอง

1. การทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพ(Phenotypic study)

1.1 วิธี Standard disk diffusion

เชื้อที่ได้เก็บจากผู้ป่วยทั้งหมด 1340 isolates จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จำนวน 876 isolates โรงพยาบาลศรีสะเกษ จำนวน 272 isolates และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ จำนวน 192 isolates แปลผลความไวตาม M100-S24 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fourth Informational Supplement ดังตารางที่ 1 พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้มีความไวต่อยา SXT ร้อยละ 100 Piperacillin ร้อยละ 98-100 ยา Ceftazidime ร้อยละ 97-99 Imipenem ร้อยละ 98-100 และ Ciprofloxacin ร้อยละ 84-94 (ตารางที่ 2-5)

ตารางที่ 1 แสดงผล inhibition zone ของยา Ceftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing

Antibiotics	Susceptible (mm)	Intermediate (mm)	Resistant (mm)
Ceftazidime 30 µg	≥18	15-17	≤14
Imipenem 10 µg	≥19	16-18	≤15
Piperacillin 100 µg	≥18	-	≤17
SXT 25 µg (trimethoprim- sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg)	≥16	11-15	≤10
Ciprofloxacin 5 µg	≥21	16-20	≤15

ตารางที่ 2 แสดงผลความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ของยา Ceftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion รพ.สรรพสิทธิประสงค์จำนวน 876 isolates

Antibiotics	Susceptible (isolates)	Intermediate (isolates)	Resistant (isolates)
Ceftazidime 30 µg	858 (97.95%)	-	18 (2.05%)
Imipenem 10 µg	867 (98.97%)	-	9 (1.03%)
Piperacillin 100 µg	864 (98.63%)	-	12 (1.37%)
SXT 25 µg (trimethoprim- sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg)	876 (100%)	-	-
Ciprofloxacin 5 µg	736 (84.01%)	-	140 (15.99%)

ตารางที่ 3 แสดงผลความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ของยา Ceftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion รพ.ศรีสะเกษจำนวน 272 isolates

Antibiotics	Susceptible (isolates)	Intermediate (isolates)	Resistant (isolates)
Ceftazidime 30 µg	269 (98.89%)	-	3 (1.11%)
Imipenem 10 µg	269 (98.89%)	-	3 (1.11%)
Piperacillin 100 µg	272 (100%)	-	-
SXT 25 µg (trimethoprim- sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg)	272 (100%)	-	-
Ciprofloxacin 5 µg	249 (91.54%)	15 (5.51%)	8 (2.98%)

ตารางที่ 4 แสดงผลความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ของยา Ceftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion รพ.อำนาจเจริญจำนวน 192 isolates

Antibiotics	Susceptible (isolates)	Intermediate (isolates)	Resistant (isolates)
Ceftazidime 30 µg	191 (99.47%)	-	1 (0.53%)
Imipenem 10 µg	192 (100%)	-	-
Piperacillin 100 µg	192 (100%)	-	-
SXT 25 µg (trimethoprim- sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg)	192 (100%)	-	-
Ciprofloxacin 5 µg	182 (94.79%)	7 (3.64%)	3 (1.57%)

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบผลความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ของยา Ceftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing จากการศึกษาด้วย standard disk diffusion ระหว่าง รพ.สรรพสิทธิประสงค์ รพ.ศรีสะเกษและอำนาจเจริญ

Antibiotics	Susceptible (mm)			Intermediate (mm)			Resistant (mm)		
	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ
Ceftazidime 30 µg	97.95%	98.89%	99.47%	-	-		2.05%	1.11%	0.53%
Imipenem 10 µg	98.97%	98.89%	100%	-	-		1.03%	1.11%	-
Piperacillin 100 µg	98.63%	100%	100%	-	-		1.37%	-	-
SXT 25 µg (trimethoprim- sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg)	100%	100%	100%	-	-		-	-	-
Ciprofloxacin 5 µg	84.01%	91.54%	94.79%	-	5.51%	3.64%	15.99%	2.98%	1.57%

1.2 การทดสอบ Minimal Inhibitory Concentration

เชื้อที่แยกได้จาก รพ.ศรีสะเกษ และ รพ.อำนาจเจริญมีความไวต่อยา Ceftazidime และ Imipenem ร้อยละ 100 ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จาก รพ.สรรพสิทธิประสงค์ มีความไวต่อ Ceftazidime ร้อยละ 96.57 และ Imipenem ร้อยละ 98.40 ในขณะที่ยาอื่นๆไม่มีเกณฑ์ในการแปลผลจึงสรุปเป็นค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ แสดงในตารางที่ 8

การแปลผลตาม CLSI สำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* มี break point ต่อยา ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 6 Break point ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ตามเกณฑ์ของ CLSI

Antibiotics	Susceptible (µg/ml)	Intermediate (µg/ml)	Resistant (µg/ml)
Ceftazidime	≤8	16	≥32
Imipenem	≤4	8	≥16

ตารางที่ 7 แสดงผลความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ของยา Ceftazidime และ Imipenem ตาม Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ที่แยกได้จาก รพ. รพ.สรรพสิทธิประสงค์ รพ.ศรีสะเกษ และอำนาจเจริญ

Antibiotics	Susceptible (µg/ml)			Intermediate (µg/ml)			Resistant (µg/ml)		
	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ
Ceftazidime	846 (96.57%)	272 (100%)	192 (100%)	13 (1.48%)	-		17 (1.95%)	-	
Imipenem	862 (98.40%)	272 (100%)	192 (100%)	9 (1.03%)	-		5 (0.57%)	-	

สำหรับยา Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ไม่มีตารางแปลผล สำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* จึงแสดงผลของ MIC₅₀ และ MIC₉₀ ต่อยา ดังนี้

ตารางที่ 8 แสดงค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของยา Ceftazidime Imipenem Piperacillin SXT และ Ciprofloxacin ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จาก รพ. รพ.สรรพสิทธิประสงค์ รพ.ศรีสะเกษ และ อำนาจเจริญ

Antibiotics	MIC ₅₀ (µg/ml)			MIC ₉₀ (µg/ml)		
	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ	สรรพสิทธิ ประสงค์	ศรีสะเกษ	อำนาจเจริญ
Ceftazidime	2	2	2	4	4	4
Imipenem	≤0.5	≤0.5	≤0.5	1	1	1
Piperacillin	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
SXT	≤1/19	≤1/19	≤1/19	≤1/19	≤1/19	≤1/19
Ciprofloxacin	1	2	1	2	2	2

2. การศึกษายีนที่มีผลต่อการดื้อยา (Genotypic study)

2.1 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีน *oxa* และ *penA* ด้วยวิธีการ PCR

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีน *oxa* และ *penA* ด้วยวิธีการ PCR นั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน โดยยีน *oxa* ได้ทั้งสิ้นจำนวน 17 สาย (ตารางที่9) และยีน *penA* ได้ทั้งหมด 2 สาย (ตารางที่10) ซึ่งพบว่า open reading frame (ORF) ของยีน *oxa* มีขนาด 810 bp และ *penA* มีขนาด 888 bp การออกแบบไพรเมอร์ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม LightCycler® Real-Time PCR (Roche, USA) ซึ่งได้คู่ไพรเมอร์

ตารางที่ 9 ยีน *oxa* สำหรับการออกแบบไพรเมอร์

ยีน	เชื้อ	Accession number
<i>oxa</i>	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	CP000011.2
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR346	AC0J01000001.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain E15	AJ488303.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain 1902a	AJ488302.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> isolate 76161	FJ147202.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain A316	AM263456.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain 979b	AM263455.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain 392f	AM263454.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain 392a	AM263453.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain 365c	AM263452.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain 316c	AM263450.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K42	CP009163.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	AJ632249.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	AJ631966.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> strain BD	CP009210.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> TSV 48	CP009160.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 354a	AGVS01000748.1
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 354e	AHJD01000283.1

ตารางที่ 10 ยีน *penA* สำหรับการออกแบบไพรเมอร์

ยีน	เชื้อ	Accession number
<i>penA</i>	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	CP000011.2
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	NC_006351.1

การออกแบบเบืองต้นคณะผู้วิจัยมุ่งเน้นที่จะเพิ่มจำนวนยีนเฉพาะตรงตำแหน่งที่มักเกิดการกลายพันธุ์ของยีนทั้ง *oxa* และ *penA* จึงได้ออกแบบได้ดังแสดงในตารางที่11 และทดสอบการเพิ่มจำนวนยีนทั้งสอง โดยใช้ PCR component และPCR condition ในตารางที่12 และตารางที่13 ตามลำดับ

ตารางที่11 ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *penA* และ *oxa* ครั้งที่1

Primer	Sequence
Oxa_Forward	5'TGAAATTCCGACACGCGCTG 3'
Oxa_Reverse	5'CGTCCGTATGCCTGCTGAAA 3'
penA_ Forward	5'-GCAGCACATCCAAGATGATGC-3'
penA_ Reverse	5'-GCCGATCGTGTTTCATCGTCTA-3'

ตารางที่12องค์ประกอบน้ำยาในการทำ PCR

Reagents	Final concentration
10X PCR buffer	1X
MgCl ₂ buffer	1.5 mM
dNTP	200 µM
Forward primer	0.2 µM
Reverse primer	0.2 µM
DNA polymerase	1 unit

ตารางที่13PCRcondition สำหรับยีน*penA* และ *oxa*

Step	temperature	Time	No. of cycles
Pre-incubation	95 °C	5 min	1
Denaturation	95 °C	30 sec	30
Annealing	55 °C	30 sec	
Extension	72 °C	1 min	
Final extension	72 °C	7 min	1

ผลการทดสอบเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย คือ *penA* และ *oxa* แสดงดังภาพที่ 1 และ 2 โดยสามารถเพิ่มจำนวนยีนทั้งสองได้อย่างจำเพาะโดยยีน *oxa* มีขนาดประมาณ 300 bp (ภาพที่1) และ *penA* (ภาพที่2) มีขนาดประมาณ 500 bp ส่วน โดยการศึกษาพบว่า สำหรับยีน *penA* สามารถตรวจพบได้จำนวน 8 จากตัวอย่างดีเอ็นเอ 10 ตัวอย่าง และสำหรับยีน *oxa* โดยตรวจได้ในทุกตัวอย่าง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้นำเสนอผลการเพิ่มจำนวนยีน ดังกล่าวนี้ให้คณะกรรมการฯ ซึ่งได้ข้อแนะนำที่ดีว่า เห็นควรทำการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ของทั้งยีน *oxa* และ *penA* เพื่อให้ได้ยีนทั้งสองที่สมบูรณ์มากที่สุด ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ ดังแสดง ในตารางที่14



ภาพที่1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน *oxa* จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์

B001-B010

กำหนด

Lane M คือ Hyper DNA ladder IV

Lane 1 และ 2 คือ PCR without template DNA

Lane 3 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 001 strain

Lane 4 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 002 strain

Lane 5 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 003 strain

Lane 6 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 004 strain

Lane 7 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 005 strain

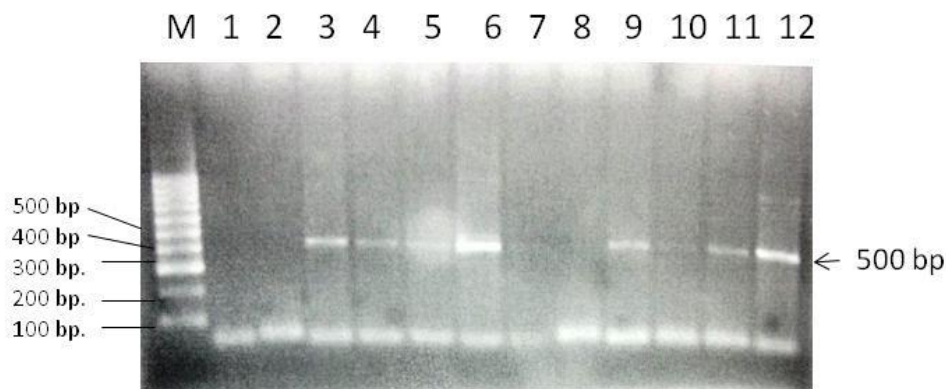
Lane 8 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 006 strain

Lane 9 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 007 strain

Lane 10 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 008 strain

Lane 11 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 009 strain

Lane 12 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 0010 strain



ภาพที่2 ผลการเพิ่มจำนวนยีน *penA* จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์

B001-B010

กำหนด

Lane M คือ Hyper DNA ladder IV

Lane 1 และ 2 คือ PCR without template DNA

Lane 3 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 001 strain

Lane 4 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 002 strain

Lane 5 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 003 strain

Lane 6 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 004 strain

Lane 7 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 005 strain

Lane 8 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 006 strain

Lane 9 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 007 strain

Lane 10 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 008 strain

Lane 11 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 009 strain

Lane 12 คือ Amplified product of *B. pseudomallei* 0010 strain

ตารางที่ 14 ไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *oxa* และ *penA* ครั้งที่ 2

Primer	Sequence	Gene product (bp)
Oxa_Foward	5' ATGAAATTCCGACACGCGCT 3'	761
Oxa_Reverse	5' GTCCGTATGCCGGCTGAAAC 3'	
penA_ Forward	5'-TGAATCATTCTCCGTTGCGC-3	800
penA_ Reverse	5'-TAGACGATGAACACGATCGGC-3'	

2.2 การตรวจหายีน *oxa* และ *penA* ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่ดื้อยา โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ใหม่

คณะผู้วิจัยสามารถคัดแยกเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษ และโรงพยาบาลอำนาจเจริญ ได้จำนวนทั้งสิ้น 1,340 ไอโซเลต โดยในจำนวนนี้มีเชื้อที่ดื้อ (resistant) ต่อยา Ceftazidime จำนวน 17 ไอโซเลต ($MIC \geq 32 \mu g/ml$) ดื้อต่อยา Imipenem จำนวน 5 ไอโซเลต ($MIC \geq 16 \mu g/ml$) รวมทั้งสิ้น 22 ไอโซเลต นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ดื้อต่อยาระดับปานกลาง (intermediate) ดื้อต่อยา Ceftazidime จำนวน 13 ไอโซเลต ($MIC 16 \mu g/ml$) ดื้อต่อยา Imipenem จำนวน 9 ไอโซเลต ($MIC 8 \mu g/ml$) รวมทั้งสิ้น 22 ไอโซเลต และสามารถสกัด genomic DNA ที่มีคุณภาพดี คือมีค่า optical density at 260/280 อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 ซึ่งเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการตรวจสอบยีนได้

ผลการทดสอบเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย คือ *oxa* และ *penA* จากตัวอย่าง genomic DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 22 ไอโซเลตโดยวิธีการ PCR และใช้ condition ตามตารางที่ 2 พบว่าสามารถตรวจพบและเพิ่มจำนวนยีน *oxa* ได้ในทุกไอโซเลตโดยมีขนาดของ amplified product ที่มีขนาดเท่ากัน คือขนาดประมาณ 750 bp เทียบกับ DNA marker ในขณะที่เดียวกันก็ไม่สามารถตรวจพบยีน *penA* ได้ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลการเพิ่มจำนวนยีน Oxa และ penA ในเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 22 ไอโซเลต

<i>B. pseudomallei</i> (ไอโซเลต)	ยีน		<i>B. pseudomallei</i> (ไอโซเลต)	ยีน	
	Oxa	PenA		Oxa	PenA
B534	+	-	B061	+	-
B107	+	-	B062	+	-
B130	+	-	B074	+	-
B141	+	-	B081	+	-
B208	+	-	B089	+	-
B211	+	-	B090	+	-
B230	+	-	B092	+	-
B232	+	-	B096	+	-
B234	+	-	B110	+	-
B242	+	-			
B270	+	-			
B279	+	-			
B283	+	-			

+ หมายถึง ตรวจพบยีน

- หมายถึง ตรวจไม่พบยีน

คณะผู้วิจัยได้ทำการส่ง amplified product ของยีน oxa จำนวน 19 ไอโซเลตไปทำ DNA sequencing ส่วนอีก 3 ไอโซเลต คือ B093 B107 และ B141 ไม่ได้ส่งทำ DNA sequencing เนื่องจากในขณะนั้นคุณภาพ amplified product ไม่เพียงพอสำหรับทำ sequencing ซึ่งผลการหาลำดับและการวิเคราะห์กรดอะมิโนของยีน oxa ทั้ง 19 ไอโซเลต มีดังนี้

ผลการหาลำดับและการวิเคราะห์กรดอะมิโนของยีน *oxa*

1. *B. pseudomallei* B130

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 222 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B130 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B130 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *B. pseudomallei* K96243 ทุกประการ คือ 100% identity ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 222 AA.

>B130

```
LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDPVLPYR
DSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVSGDPGQN
NGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTTLADGTVWHGKTGVSYP
ADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTL
```

Alignments

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 460 bits (1184), Expect = 7e-162, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 222/222 (100%), Positives = 222/222 (100%), Gaps = 0/222 (0%)

Query	1	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTL	222
		ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTL	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTL	234

2. *B. pseudomallei*B208

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 223 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B208 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B208 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain 1026b) ทุกประการ ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 223 AA.

>B208

```
LLGCIAASAH AKTICTAIAD AGTGKLLLQD GDCGRRASPA STFKIAISLM GYDAGFLRNE
HDPVLPYRDS YIAWGGEAWK QPTDPTRWLK YSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVSGDPGQN
NGLDRAWIGS SLQISPLEQL EFLGKMLDRK LPVSPTAVDM TERIVESTTL
ADGTVVHGKT GVSYP I ADG TRDWARGSGW FVGWIVRGKQ TLV
```

Alignments

1. A0A0H3HWPX8 (A0A0H3HWPX8_BURP2)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain 1026b) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 461 bits (1186), Expect = 4e-162, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 223/223 (100%), Positives = 223/223 (100%), Gaps = 0/223 (0%)

Query	1	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQD	GDCGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQD	GDCGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQD	GDCGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLK	YSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLK	YSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLK	YSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQL	EFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQL	EFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQL	EFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYP	LLADGTRDWARGSGWFVGWIVRGKQTLV	223
		ADGTVVHGKTGVSYP	LLADGTRDWARGSGWFVGWIVRGKQTLV	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYP	LLADGTRDWARGSGWFVGWIVRGKQTLV	235

3. *B. pseudomallei*B211

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 231 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B211 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B211 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain 1026b) ทุกประการคือ 100% identity ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 231 AA.

>B211

```
LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDEADGTVVHGKT
GVSYPPLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDEADGTVVHGKT
```

Alignments

1. A0A0H3HWWX8 (A0A0H3HWWX8_BURP2)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain 1026b) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 478 bits (1229), Expect = 2e-168, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 231/231 (100%), Positives = 231/231 (100%), Gaps = 0/231 (0%)

Query	1	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDE	231
		ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDE	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDE	243

4. *B. pseudomallei*B230

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 3 (ORF3) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 234 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B230 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B230 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain 1026b) ทุกประการคือ 100% identity (231/231) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF3: 234 AA.

>B230

```
GNPLLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFL
RNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFG
YGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVES
TTLADGTVVHGKTGVSYP LLDGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDE
```

Alignments

1. A0A0H3HWX8 (A0A0H3HWX8_BURP2)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain 1026b) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 477 bits (1228), Expect = 2e-168, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 231/231 (100%), Positives = 231/231 (100%), Gaps = 0/231 (0%)

```
Query 4 LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE 63
      LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
Sbjct 13 LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE 72

Query 64 HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN 123
      HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
Sbjct 73 HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN 132

Query 124 ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL 183
      ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
Sbjct 133 ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL 192

Query 184 ADGTVVHGKTGVSYP LLDGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDE 234
      ADGTVVHGKTGVSYP LLDGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDE
Sbjct 193 ADGTVVHGKTGVSYP LLDGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDE 243
```

5. *B. pseudomallei*B232

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 3 (ORF3) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 242 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B232 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B232 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain 1026b) ทุกประการคือ 100% identity 240/240 ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF3: 242 AA.

>B232

```
LLG CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPV SAGI
TD
```

Alignments

1. A0A0H3HWX8 (A0A0H3HWX8_BURP2) 

Beta-lactamase OS=*Burkholderia pseudomallei* (strain 1026b) GN=oxa PE=3 SV=1

Length=269

align

Clustal W (multiple alignment) ▼

ส่ง

Score = 495 bits (1274), Expect = 3e-175, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 240/240 (100%), Positives = 240/240 (100%), Gaps = 0/240 (0%)

Query	1	LLG CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLG CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLG CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPV SAGI	240
		ADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPV SAGI	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPV SAGI	252

6. *B. pseudomallei*B234

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 1 (ORF1) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 241 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B234 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B232 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain 1026b) ทุกประการคือ 100% identity 239/239 ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF1: 241 AA.

>B234

```
FAGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLLQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
R
```

Alignments

1. A0A0H3HMX8 (A0A0H3HMX8_BURP2)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain 1026b) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 494 bits (1272), Expect = 7e-175, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 239/239 (100%), Positives = 239/239 (100%), Gaps = 0/239 (0%)

Query	3	G	C	I	A	A	S	A	H	A	K	T	I	C	T	A	I	A	D	A	G	T	G	K	L	L	L	Q	D	G	D	C	G	R	R	A	S	P	A	S	T	F	K	I	A	I	S	L	M	G	Y	D	A	G	F	L	R	N	E	H	D	62
		G	C	I	A	A	S	A	H	A	K	T	I	C	T	A	I	A	D	A	G	T	G	K	L	L	L	Q	D	G	D	C	G	R	R	A	S	P	A	S	T	F	K	I	A	I	S	L	M	G	Y	D	A	G	F	L	R	N	E	H	D	74
Sbjct	15	G	C	I	A	A	S	A	H	A	K	T	I	C	T	A	I	A	D	A	G	T	G	K	L	L	L	Q	D	G	D	C	G	R	R	A	S	P	A	S	T	F	K	I	A	I	S	L	M	G	Y	D	A	G	F	L	R	N	E	H	D	74
Query	63	P	V	L	P	Y	R	D	S	Y	I	A	W	G	G	E	A	N	K	Q	P	T	D	P	T	R	W	L	K	Y	S	V	V	W	Y	S	Q	Q	V	A	H	H	L	G	A	Q	R	F	A	Q	Y	A	K	A	F	G	Y	G	N	A	D	122
		P	V	L	P	Y	R	D	S	Y	I	A	W	G	G	E	A	N	K	Q	P	T	D	P	T	R	W	L	K	Y	S	V	V	W	Y	S	Q	Q	V	A	H	H	L	G	A	Q	R	F	A	Q	Y	A	K	A	F	G	Y	G	N	A	D	134
Sbjct	75	P	V	L	P	Y	R	D	S	Y	I	A	W	G	G	E	A	N	K	Q	P	T	D	P	T	R	W	L	K	Y	S	V	V	W	Y	S	Q	Q	V	A	H	H	L	G	A	Q	R	F	A	Q	Y	A	K	A	F	G	Y	G	N	A	D	134
Query	123	V	S	G	D	P	G	Q	N	N	G	L	D	R	A	W	I	G	S	S	L	Q	I	S	P	L	E	Q	L	E	F	L	G	K	M	L	D	R	K	L	P	V	S	P	T	A	V	D	M	T	E	R	I	V	E	S	T	T	L	A	D	182
		V	S	G	D	P	G	Q	N	N	G	L	D	R	A	W	I	G	S	S	L	Q	I	S	P	L	E	Q	L	E	F	L	G	K	M	L	D	R	K	L	P	V	S	P	T	A	V	D	M	T	E	R	I	V	E	S	T	T	L	A	D	194
Sbjct	135	V	S	G	D	P	G	Q	N	N	G	L	D	R	A	W	I	G	S	S	L	Q	I	S	P	L	E	Q	L	E	F	L	G	K	M	L	D	R	K	L	P	V	S	P	T	A	V	D	M	T	E	R	I	V	E	S	T	T	L	A	D	194
Query	183	G	T	V	V	H	G	K	T	G	V	S	Y	P	L	A	D	G	T	R	D	W	A	R	G	S	G	W	F	V	G	W	I	V	R	G	K	Q	T	L	V	F	A	R	L	T	Q	D	E	R	K	Q	P	V	S	A	G	I	R	241		
		G	T	V	V	H	G	K	T	G	V	S	Y	P	L	A	D	G	T	R	D	W	A	R	G	S	G	W	F	V	G	W	I	V	R	G	K	Q	T	L	V	F	A	R	L	T	Q	D	E	R	K	Q	P	V	S	A	G	I	R	253		
Sbjct	195	G	T	V	V	H	G	K	T	G	V	S	Y	P	L	A	D	G	T	R	D	W	A	R	G	S	G	W	F	V	G	W	I	V	R	G	K	Q	T	L	V	F	A	R	L	T	Q	D	E	R	K	Q	P	V	S	A	G	I	R	253		

7. *B. pseudomallei*B242

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 246 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B242 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B242 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) ทุกประการคือ 239/241 (99%) ซึ่งกรดอะมิโนสองตัวแรกที่มีความต่างอาจเกิดจากผลการอ่านลำดับเบสช่วงต้นมีความผิดพลาดทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 246 AA.

>B242

```
GGILLGICIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGF
LRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAF
GYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVE
STTLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWVIRGKQTLVFARLTQDERKQPV
SAGKTD
```

Alignments

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 495 bits (1274), Expect = 4e-175, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 239/241 (99%), Positives = 240/241 (99%), Gaps = 0/241 (0%)

```
Query 3 ILLGICIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR 62
      +LLGICIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR
Sbjct 11 FVLLGICIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR 70

Query 63 NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY 122
      NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY
Sbjct 71 NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY 130

Query 123 GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST 182
      GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST
Sbjct 131 GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST 190

Query 183 TLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWVIRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA 242
      TLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWVIRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
Sbjct 191 TLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWVIRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA 250

Query 243 G 243
      G
Sbjct 251 G 251
```

8. *B. pseudomallei*B279

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 1 (ORF1) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 244 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B279 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B279 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* Pakistan9 คือ 241/242 (99%) กรดอะมิโนตัวแรกที่มีความต่างอาจเกิดจากผลการอ่านลำดับเบสช่วงต้นมีความผิดพลาดทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF1: 244 AA.

>B279

```
ILLLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR
NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY
GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVEST
TLADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
GIPD
```

Alignments

1. A0A0E1UKN7 (A0A0E1UKN7_BURPE)  align

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei Pakistan 9 GN=oxa PE=3 SV=1

Length=269

Clustal W (multiple alignment)  

Score = 495 bits (1275), Expect = 3e-175, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 240/242 (99%), Positives = 241/242 (99%), Gaps = 0/242 (0%)

Query	1	ILLLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR	60
		+LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR	
Sbjct	11	FVLLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR	70
Query	61	NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY	120
		NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY	
Sbjct	71	NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY	130
Query	121	GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVEST	180
		GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVEST	
Sbjct	131	GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVEST	190
Query	181	TLADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	240
		TLADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	
Sbjct	191	TLADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	250
Query	241	GI	242
		GI	
Sbjct	251	GI	252

9. *B. pseudomallei*B283

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 240 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B283 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B283 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* Pakistan9 คือ 240/240 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 240 AA.

>B283

```
LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAgi
```

Alignments

1. A0A0E1UKN7 (A0A0E1UKN7_BURPE)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei Pakistan 9 GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 495 bits (1275), Expect = 2e-175, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 240/240 (100%), Positives = 240/240 (100%), Gaps = 0/240 (0%)

Query	1	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAgi	240
		ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAgi	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWVFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAgi	252

10. *B. pseudomallei*B534

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 241 amino acid (aa.) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B534 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B534 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* คือ 240/241 (99%) กรดอะมิโน 1 ตัวที่มีความต่างอาจเกิดจากผลการอ่านลำดับเบสช่วงปลายอาจมีความผิดพลาดทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 241 AA.

>B534

```
LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPSTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYPLLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAAGL
~
```

Alignments

1. A0A167F5I6 (A0A167F5I6_BURPE)

Class D beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei GN=AQ841_24090 PE=4 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 497 bits (1280), Expect = 4e-176, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 240/241 (99%), Positives = 241/241 (100%), Gaps = 0/241 (0%)

Query 1 LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPSTFKIAISLMGYDAGFLRNE 60
Sbjct 13 LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPSTFKIAISLMGYDAGFLRNE 72

Query 61 HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN 120
Sbjct 73 HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN 132

Query 121 ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL 180
Sbjct 133 ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL 192

Query 181 ADGTVVHGKTGVSYPLLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAAGL 240
Sbjct 193 ADGTVVHGKTGVSYPLLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAAGL 252

Query 241 R 241
Sbjct 253 R 253

11. *B. pseudomallei*B061

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 238 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B061 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B061 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) คือ 238/238 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 238 AA.

>B061

```
CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDPVLPYRDSYIAW
GGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIG
SSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTTLADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGS
GWFVGVWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIR
```

Alignments

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=*Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 493 bits (1269), Expect = 2e-174, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 238/238 (100%), Positives = 238/238 (100%), Gaps = 0/238 (0%)

Query	1	CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDP	60
		CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDP	
Sbjct	16	CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDP	75
Query	61	VLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADV	120
		VLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADV	
Sbjct	76	VLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADV	135
Query	121	SGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTTLADG	180
		SGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTTLADG	
Sbjct	136	SGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTTLADG	195
Query	181	TVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGVGVWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIR	238
		TVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGVGVWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIR	
Sbjct	196	TVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGVGVWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIR	253

12. *B. pseudomallei*B062

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 239 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B062กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B062 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* คือ 237/237(100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 239 AA.

>B062

CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDPVLPYRDSYIAW
GGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIG
SSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADGTVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGW
FVVGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAITD

Alignments

1. A0A167F5I6 (A0A167F5I6_BURPE) 

Class D beta-lactamase OS=*Burkholderia pseudomallei* GN=AQ841_24090 PE=4 SV=1

Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 491 bits (1263), Expect = 1e-173, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 237/237 (100%), Positives = 237/237 (100%), Gaps = 0/237 (0%)

Query	1	CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDP	60
		CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDP	
Sbjct	16	CIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDP	75
Query	61	VLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADV	120
		VLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADV	
Sbjct	76	VLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADV	135
Query	121	SGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADG	180
		SGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADG	
Sbjct	136	SGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADG	195
Query	181	TVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAI	237
		TVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAI	
Sbjct	196	TVVHGKTGVSYPPLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAI	252

13. *B. pseudomallei*B074

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 243 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B074กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B074 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) คือ 243/243 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 243 AA.

>B074

```
FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR
NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY
GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST
TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
```

Alignments

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=*Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 502 bits (1293), Expect = 4e-178, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 243/243 (100%), Positives = 243/243 (100%), Gaps = 0/243 (0%)

Query	1	FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR	60
		FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR	
Sbjct	11	FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR	70
Query	61	NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY	120
		NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY	
Sbjct	71	NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY	130
Query	121	GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST	180
		GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST	
Sbjct	131	GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST	190
Query	181	TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	240
		TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	
Sbjct	191	TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	250
Query	241	GIR	243
		GIR	
Sbjct	251	GIR	253

14. *B. pseudomallei*B081

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 241 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B081กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B081 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* คือ 237/237 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 241 AA.

>B081

```
LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSPDY
.
```

Alignments

1. A0A167F5I6 (A0A167F5I6_BURPE) 

Class D beta-lactamase OS=*Burkholderia pseudomallei* GN=AQ841_24090 PE=4 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment) ▼

ส่ง

Score = 490 bits (1261), Expect = 3e-173, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 237/237 (100%), Positives = 237/237 (100%), Gaps = 0/237 (0%)

Query	1	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVS	237
		ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVS	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVS	249

15. *B. pseudomallei*B090

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 241 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B090กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B090 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* คือ 241/241 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้เช้นกับไอโซเลตอื่นๆ

ORF2: 241 AA.

>B090

```
LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIGI
```

Alignments

1. A0A167F5I6 (A0A167F5I6_BURPE)

Class D beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei GN=AQ841_24090 PE=4 SV=1

Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 498 bits (1283), Expect = 1e-176, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 241/241 (100%), Positives = 241/241 (100%), Gaps = 0/241 (0%)

Query	1	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIGI	240
		ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIGI	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAIGI	252
Query	241	R	241
		R	
Sbjct	253	R	253

16. *B. pseudomallei*B092

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 237 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B092กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B092 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) คือ 234/234 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้เช้นกับไอโซเลตอื่นๆ

ORF2: 237 AA.

>B092

```
IAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDPV
LPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVS
GDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADGT
VHKGKTGVSYPPLLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSAAYG
```

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1

Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 484 bits (1245), Expect = 7e-171, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 234/234 (100%), Positives = 234/234 (100%), Gaps = 0/234 (0%)

Query	1	IAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDPV	60
		IAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDPV	
Sbjct	17	IAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHDPV	76
Query	61	LPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVS	120
		LPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVS	
Sbjct	77	LPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNADVS	136
Query	121	GDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADGT	180
		GDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADGT	
Sbjct	137	GDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLADGT	196
Query	181	VHKGKTGVSYPPLLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	234
		VHKGKTGVSYPPLLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	
Sbjct	197	VHKGKTGVSYPPLLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	250

17. *B. pseudomallei*B096

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 1 (ORF1) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 243 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B096 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B096 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) คือ 243/243 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้เช่นกันกับไอโซเลตอื่นๆ

ORF1: 243 AA.

>B096

```
FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR
NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY
GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST
TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
```

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 502 bits (1293), Expect = 4e-178, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 243/243 (100%), Positives = 243/243 (100%), Gaps = 0/243 (0%)

```
Query 1 FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR 60
      FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR
Sbjct 11 FVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR 70

Query 61 NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY 120
      NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY
Sbjct 71 NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYVWYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY 130

Query 121 GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST 180
      GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST
Sbjct 131 GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVEST 190

Query 181 TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA 240
      TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
Sbjct 191 TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA 250

Query 241 GIR 243
      GIR
Sbjct 251 GIR 253
```

18. *B. pseudomallei*B110

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 1 (ORF1) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 242 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B110 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B110 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* Pakistan 9 คือ 238/238 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้เช้นกับไอโซเลตอื่นๆ

ORF1: 242 AA.

>B110

```
IRFAGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLR
NEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGY
GNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVEST
TLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
GI
```

Alignments

1. A0A0E1UKN7 (A0A0E1UKN7_BURPE)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei Pakistan 9 GN=oxa PE=3 SV=1

Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 492 bits (1267), Expect = 4e-174, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 238/238 (100%), Positives = 238/238 (100%), Gaps = 0/238 (0%)

Query	5	GCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHD	64
		GCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHD	
Sbjct	15	GCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNEHD	74
Query	65	PVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNAD	124
		PVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNAD	
Sbjct	75	PVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGNAD	134
Query	125	VSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLD	184
		VSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLD	
Sbjct	135	VSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIVESTTLD	194
Query	185	GTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	242
		GTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	
Sbjct	195	GTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	252

19. *B. pseudomallei*B270

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 1 (ORF1) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 242 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B270 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B270 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (strain K96243) คือ 239/239 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้เช่นกับไอโซเลตอื่นๆ

ORF1: 242 AA.

>B270

```
LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE
HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN
ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL
ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFVGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA
TD
```

Alignments

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1
Length=269

align

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 494 bits (1273), Expect = 5e-175, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 239/239 (100%), Positives = 239/239 (100%), Gaps = 0/239 (0%)

Query	1	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	60
		LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	
Sbjct	13	LLGCIAASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCGRASPASTFKIAISLMGYDAGFLRNE	72
Query	61	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	120
		HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	
Sbjct	73	HDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKAFGYGN	132
Query	121	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	180
		ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	
Sbjct	133	ADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTERIVESTTL	192
Query	181	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFVGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	239
		ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFVGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	
Sbjct	193	ADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFVGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQPVSA	251

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการส่ง amplified PCR product ของยีน *oxa* ของเชื้อ *B. pseudomallei* ไอโซเลต คือ B001, B006, B007 และ B008 ที่ไม่มี phenotype ของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะไปทำ DNA sequencing และทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีน *oxa* จากทุกไอโซเลต คือ B001, B006, B007 และ B008 ไม่พบการกลายพันธุ์โดยอ่านผลการวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับ

ลำดับเบสของยีน *oxa* ในฐานข้อมูล โดยให้ค่าความเหมือน เท่ากับ 100 identity ซึ่งมีรายละเอียดผลการวิเคราะห์ ดังนี้

ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ *B.pseudomallei* B001

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 243 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B001 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B001 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* Pakistan 9 คือ 243/243 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 243 AA.

>B001

```
SSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAG
FLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKA
FGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIV
ESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQP
```

1. A0A0E1UKN7 (A0A0E1UKN7_BURPE) 

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei Pakistan 9 GN=oxa PE=3 SV=1 Clustal W (multiple alignment) 

Length=269

Score = 501 bits (1290), Expect = 1e-177, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 243/243 (100%), Positives = 243/243 (100%), Gaps = 0/243 (0%)

Query	1	SSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAG	60
		SSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAG	
Sbjct	8	SSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYDAG	67
Query	61	FLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKA	120
		FLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKA	
Sbjct	68	FLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVWVYSQQVAHHLGAQRFAQYAKA	127
Query	121	FGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIV	180
		FGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIV	
Sbjct	128	FGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTERIV	187
Query	181	ESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQP	240
		ESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQP	
Sbjct	188	ESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERKQP	247
Query	241	VSA	243
		VSA	
Sbjct	248	VSA	250

ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ *B.pseudomallei*B006

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 245 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B006กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B006 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* K96243 คือ 245/245 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 245 AA.

>B006

```
ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYD
AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA
KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER
IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK
QPVSA
```

Alignments

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1

Length=269

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Score = 505 bits (1300), Expect = 4e-179, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 245/245 (100%), Positives = 245/245 (100%), Gaps = 0/245 (0%)

```
Query 1  ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYD 60
          ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYD
Sbjct 6  ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGCRRASPASTFKIAISLMGYD 65

Query 61  AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA 120
          AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA
Sbjct 66  AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA 125

Query 121 KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER 180
          KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER
Sbjct 126 KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER 185

Query 181 IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK 240
          IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK
Sbjct 186 IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK 245

Query 241 QPVSA 245
          QPVSA
Sbjct 246 QPVSA 250
```

ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ *B.pseudomallei* B007

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 2 (ORF2) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 245 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B007 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B007 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* K96243 คือ 245/245 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 245 AA.

>B007

```
ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYD
AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA
KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER
IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK
QPVSA
```

Alignments

1. H7C757 (H7C757_BURPS)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei (strain K96243) GN=oxa PE=3 SV=1

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Length=269

Score = 505 bits (1300), Expect = 4e-179, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 245/245 (100%), Positives = 245/245 (100%), Gaps = 0/245 (0%)

```
Query 1 ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYD 60
ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYD
Sbjct 6 ALSSAFVLLGCIASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQDGDGRRASPASTFKIAISLMGYD 65

Query 61 AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA 120
AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA
Sbjct 66 AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLYKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA 125

Query 121 KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER 180
KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER
Sbjct 126 KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER 185

Query 181 IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK 240
IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK
Sbjct 186 IVESTTLADGTVVHGKTGVSYPILLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK 245

Query 241 QPVS 245
QPVS
Sbjct 246 QPVS 250
```

ผลการวิเคราะห์ sequenced Oxa ของเชื้อ *B.pseudomallei* B008

ในการวิเคราะห์การอ่านกรดอะมิโน สามารถ translate ลำดับ sequenced DNA แล้วอ่านกรดอะมิโนได้ที่ Open reading frame 3 (ORF3) ดังแสดงในกรอบภาพด้านล่างซึ่งได้กรดอะมิโนจำนวน 245 amino acid ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B008 กับลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLASTP (version 2.2.31+) โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB database พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ B008 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโน Oxa ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* Pakistan 9 คือ 245/245 (100%) ดังนั้น จึงไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อไอโซเลตนี้

ORF2: 245 AA.

>B008

```
ALSSAFVLLGCI AASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYD
AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA
KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLNRKLPVSPTAVDMTER
IVESTTLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK
OPVSA
```

Alignments

1. A0A0E1UKN7 (A0A0E1UKN7_BURPE)

Beta-lactamase OS=Burkholderia pseudomallei Pakistan 9 GN=oxa PE=3 SV=1

Clustal W (multiple alignment)

ส่ง

Length=269

Score = 504 bits (1298), Expect = 7e-179, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 245/245 (100%), Positives = 245/245 (100%), Gaps = 0/245 (0%)

```
Query 1 ALSSAFVLLGCI AASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYD 60
ALSSAFVLLGCI AASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYD
Sbjct 6 ALSSAFVLLGCI AASAHAKTICTAIADAGTGKLLVQD GDCGRRASPASTFKIAISLMGYD 65
```

```
Query 61 AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA 120
AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA
Sbjct 66 AGFLRNEHDPVLPYRDSYIAWGGEAWKQPTDPTRWLKYSVVWYSQQVAHHLGAQRFAQYA 125
```

```
Query 121 KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTER 180
KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTER
Sbjct 126 KAFGYGNADVSGDPGQNNGLDRAWIGSSLQISPLEQLEFLGKMLDRKLPVSPTAVDMTER 185
```

```
Query 181 IVESTTLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK 240
IVESTTLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK
Sbjct 186 IVESTTLADGTVVHGKTGVSYP LLADGTRDWARGSGWFGWIVRGKQTLVFARLTQDERK 245
```

```
Query 241 QPVSA 245
```

```
QPVSA
```

```
Sbjct 246 QPVSA 250
```

ข้อวิจารณ์

Ceftazidime เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *B. pseudomallei* แต่ปัจจุบันพบรายงานว่าผลทางคลินิกไม่สัมพันธ์กันกับผลการตรวจความไวจากทางห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาในปี 2012 พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ไวต่อยา ceftazidime ร้อยละ 100 ด้วย MIC 1-2 µg/ml แต่การรักษาด้วยยา ceftazidime ได้ผลเพียงร้อยละ 30 (Pawana et al 2011) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ความไวต่อ Ceftazidime ร้อยละ 96.57 และ Imipenem ร้อยละ 98.40 ซึ่งเชื้อ *B. pseudomallei* มีแนวโน้มดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา โดยมีค่า ceftazidime MIC ≤ 1 - ≥ 32 µg/ml และ Imipenem MIC ≤ 0.5 - ≥ 8 µg/ml จากผลการทดสอบ MIC พบเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime และ Imipenem ร้อยละ 1.95 และ 0.57 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime และ Imipenem ด้วยการตรวจ MIC ไม่พบการดื้อยาตรวจวิธี standard disk diffusion ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจความไวของยาปฏิชีวนะในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สำหรับยา trimethoprim-sulfamethoxazole ที่ใช้รักษาโรคเม็ดเลือดแดงโตสเพื่อป้องกันการเกิดการกลับเป็นซ้ำและให้ผู้ป่วยรับประทานติดต่อกัน 20 สัปดาห์พบว่ายังมีความไวร้อยละ 100 ในขณะที่ ciprofloxacin มีความไวร้อยละ 84.01-94.79 ซึ่งมีค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ $\leq 1/19$ µg/ml สำหรับยาที่เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อชนิดนี้ เช่น piperacillin มีความไวร้อยละ 98.63-100 ซึ่งมีค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ≤ 8 µg/ml

การทดลองจากหลายห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีการกลายพันธุ์ ทั้ง class A หรือ class D β -lactamases (Ho et al, 2002, Niumsup et al, 2002, Tribuddharat et al 2003) ซึ่งในปัจจุบันนี้พบการรายงานเอนไซม์ β -lactamases ที่ผลิตจากยีน 2 ชนิด คือ *Bla*_{penA} และ *Bla*_{OXA} ใน *B. pseudomallei* *Bla*_{penA} คือ ยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่มี putative twin arginine translocase (TAT) และสร้าง class A β -lactamases โดยจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวทำให้เกิดการดื้อต่อยา ceftazidime ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime (Godfrey et al, 1991, Tribuddharat et al 2003, Samet al, 2009) แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ class A β -lactamases ก็ไวต่อ clavulanic acid inhibitor ซึ่ง *penA* พบรายงานว่าทำให้ดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam หลายชนิด สามารถพบได้ทั้งใน *Escherichia coli* และ แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบอื่นๆ (Cheung et al, 2002, Tribuddharat et al 2003) มีการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ *penA* ใน *B. pseudomallei* (Cheung et al, 2002) และจากการออกแบบไพรเมอร์จากตารางที่ 1 พบ *penA* ใน *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเม็ดเลือดแดงโตสที่รับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิ์ประสงค์มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งเชื่อกันว่าไวต่อยา ceftazidime และ imipenem ด้วยวิธี standard disk diffusion และการทดสอบ MIC ผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime แต่อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยที่หายมีเพียงร้อยละ 30.3 เมื่อมีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ตามตารางที่ 2 ในการเพิ่มจำนวนยีน และใช้หลักการในเลือกใช้สายพันธุ์มาทดสอบ โดยพิจารณาจากสายพันธุ์ให้ค่า MIC ที่อยู่ในระดับสูง พบว่าไม่สามารถตรวจหา ยีน *penA* ซึ่งมีขนาด 1,000 bp เลยและถึงแม้คณะผู้วิจัยจะทำการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ให้ทำการเพิ่มจำนวนยีน *penA* ที่มีขนาดเล็กลง คือ ประมาณ 800 bp ก็ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ทั้งนี้สังเกตได้ว่ายีน *penA* ขนาดเต็ม open reading

frame ไม่ค่อยพบรายงานในฐานข้อมูล NCBI อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจในการส่งยีน *penA* ที่มีขนาด 300-500 bp (รูปที่2) ที่เพิ่มจำนวนได้ในครั้งแรกไปทำ DNA sequencing ต่อไปแม้ว่าจะพบ case report ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา ceftazidime และพบว่าการรักษาล้มเหลวไม่ได้ผล เนื่องจากพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง P167 ของ *penA* โดยลักษณะการดื้อต่อ ceftazidime เป็นแบบ sup-population ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากหลังจากผู้ป่วยได้รับยา ceftazidime มาแล้ว 17 วัน ทำให้เชื่อเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง P167 (P167S mutation) ภายใต้ภาวะการรักษาด้วยยา ceftazidime (Sarovich, 2012) แต่จากการศึกษานี้ไม่พบยีน *penA* ซึ่งมีขนาด 1,000 bp และ 800 bp เลยในตัวอย่างเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 1,340 isolates

OXA type β -lactamases จัดเป็น class D β -lactamases ซึ่งมักพบใน *Pseudomonas aeruginosa* (Weldhagen, 2004) และสามารถผลิตได้ในแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบหลายชนิด โดยเอนไซม์นี้สามารถ hydrolyzes ยา oxacillin ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อ Staphylococcus แต่เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid น้อย (Nuno, 2014) มีการศึกษาพบ OXA-57 D β -lactamases จากเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้งที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม (Keith, 2005) ตลอดจนพบใน *Burkholderia thailandensis* การพบ OXA-57 D β -lactamases ที่กลายพันธุ์ ส่งผลต่อการดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam จากการศึกษาดูพบยีน Oxa ได้เกือบทุกไอโซเลต จึงมีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่ครอบคลุม open reading frame (ORF) ของทั้งยีน *oxa* โดย ORF ของยีน *oxa* มีขนาด 810 bp ซึ่งจากการศึกษารั้งนี้เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime และ Imipenem ตรวจพบยีน *oxa* ทุกไอโซเลต แต่ไม่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *oxa*

จากการศึกษาพบเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime และ Imipenem ร้อยละ 1.95 และ 0.57 ตามลำดับ และเชื้อที่ดื้อยาดังกล่าวตรวจพบยีน *oxa* แต่ไม่พบยีน *penA* ซึ่งมีขนาด 1,000 bp และ 800 bp เมื่อนำ DNA จากเชื้อเหล่านี้ไปทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโน พบว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *oxa* ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อเหล่านี้ อาจจะมีการดื้อยาดังกล่าวด้วยกลไกอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลง penicillin binding protein (PBP) หรือการลดการแสดงออกของ PBP3 การผลักรยาออกจากเซลล์ เป็นต้น (Chantratita et al, 2012)

สรุปการศึกษาตามวัตถุประสงค์

1. ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *oxa* และ *penA* ในเชื้อ *B. pseudomallei*
 1. พบ *oxa* ยีน ในเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime และยา imipenem ด้วยการตรวจ MIC
 2. ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *oxa* ในเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime และยา imipenem
 3. พบยีน *penA* เกือบร้อยละ 90 ในเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อตรวจด้วยวิธี conventional PCR ที่มีไพรเมอร์ขนาด 300-500 bp
 4. ไม่พบ *penA* ยีนในเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ตรวจด้วยวิธี conventional PCR ที่มีไพรเมอร์ขนาด 800-1000 bp
2. เชื้อ *B. pseudomallei* มีแนวโน้มมีความไวลดลงในยา ceftazidime และ imipenem
3. ไม่สามารถหาลำดับของกรดอะมิโนที่กลายพันธุ์ของยีน *oxa* และ *penA* ได้เนื่องจากไม่พบการกลายพันธุ์ เป็นไปได้ว่าเชื้อที่มีการดื้อต่อ ceftazidime และ imipenem อาจจะมีกลไกการดื้อยาจากกลไกอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลง penicillin binding protein (PBP) การผลักรยาออกจากเซลล์ เป็นต้น ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปงานทั้งหมดที่ได้ดำเนินงานเกี่ยวกับการตรวจหายีนและการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *oxa* และ *penA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลศรีสะเกษและโรงพยาบาลอำนาจเจริญ โดยได้สกัด genomic DNA จากเชื้อ *B. pseudomallei* ไอโซเลตต่างๆ โดยเริ่มแรกนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มจำนวนยีนทั้งสองในเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกตัวอย่าง ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบยีน *oxa* และ *penA* ได้เกือบทุกไอโซเลต โดยหลักการและเหตุผลที่คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมาใช้ตอนเริ่มต้นของการดำเนินงานวิจัยนั้น เพื่อมุ่งเน้นให้ครอบคลุมเฉพาะตำแหน่งที่มีการรายงานการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) เท่านั้น ตัวอย่างเช่น ยีน *penA* ซึ่งมักพบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งกรดอะมิโนตำแหน่ง 69 และ 167 โดยในตำแหน่ง 69 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก cysteine (C) เป็น tyrosine (Y) และการกลายพันธุ์ในตำแหน่งกรดอะมิโนตำแหน่ง 167 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Proline (P) เป็น Serine (S) (Ambler et al., 1991) นอกจากนี้ยังพบการขาดหายไป (deletion) ของกรดอะมิโน glutamine ในตำแหน่งกรดอะมิโน 168 (Yi et al., 2012) เป็นต้น ส่วนยีน *oxa* นั้น ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กันระหว่างตำแหน่งกลายพันธุ์กับการดื้อยา ceftazidime พบในตำแหน่ง K232N และ S104P ของยีน *oxa42* และ *oxa43* ตามลำดับ โดยการกลายพันธุ์ในตำแหน่งกรดอะมิโนตำแหน่ง 104 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Serine (S) ไปเป็น Proline (P) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยีนที่ได้ไม่ครอบคลุมตำแหน่ง open reading frame (ORF) คณะผู้วิจัยจึงดำเนินการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่เพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่งดังกล่าวของยีนทั้งสอง

คณะกรรมการฯเห็นควรให้ทำการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ที่ครอบคลุม open reading frame (ORF) ของทั้งยีน *oxa* และ *penA* โดย ORF ของยีน *Oxa* มีขนาด 810 bp และ *penA* มีขนาด 888 bp โดยผลการตรวจหายีน *oxa* และ *penA* ในเชื้อที่มีฟีโนไทป์ดื้อต่อยา พบว่าสามารถตรวจพบยีน *oxa* ได้ในทุกไอโซเลตที่มีฟีโนไทป์ดื้อยา ในขณะที่เดียวกันก็ไม่สามารถตรวจพบยีน *penA* ได้ในทุกไอโซเลตเช่นเดียวกัน ผลการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *oxa* และนำมาหาลำดับกรดอะมิโน พบว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *oxa* ทั้งนี้ เนื่องจากผลการทำ amino acid sequence alignment ของยีน *oxa* จากแบคทีเรียทุกไอโซเลต พบมีความเหมือน 100% identity กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *oxa* ในฐานข้อมูล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei* ที่มีฟีโนไทป์ดื้อยาในงานวิจัยครั้งนี้ไม่มีการกลายพันธุ์ ส่วนยีน *penA* ไม่สามารถตรวจพบได้ทั้ง ORF อย่างไรก็ตาม partial sequence ของยีน *penA* ที่สามารถตรวจพบในช่วงแรกของการศึกษา (ประมาณ 500 bp) น่ามีความสนใจในการส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*1991; 276: 269–270.
2. Chaowagul, W., White, N.J., Dance, D.A., Wattanagoon, Y., Naigowit, P., Davis, T.M., Looareesuwan, S. & Pitakwatchara, N. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis*1989; 159, 890-99.
3. Chaowagul, W. Recent advances in the treatment of severe melioidosis. *Acta Tropica*2000; 74, 133-37.
4. Chantratita N., Rho DA., Sim B., Wuthiekanum V., Limmathurotsakul D., Amornchai P., Thanwisai A., Chua HH., Ooi WF. And Peacock SJ. Antimicrobial resistance to ceftazidime involving loss of penicillin-binding protein 3 in *Burkholderia pseudomallei*. *PNAS*2012; 108, 17165-17170.
5. Cheng, A.C. & Currie, B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev*2005; 18, 383-416.
6. Cheung, T.K., Ho, P.L., Woo, P.C., Yuen, K.Y. & Chau, P.Y. Cloning and expression of class A beta-lactamase gene blaA (BPS) in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46, 1132-1135.
7. Dance, D.A. Melioidosis. *Curr Opin Infect Dis*2002; 15, 127-32.
8. Godfrey AJ, Wong S, Dance DA, Chaowagul W, Bryan LE. *Pseudomonas pseudomallei* resistance to beta-lactam antibiotics due to alterations in the chromosomally encoded beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1635-1640.
9. Ho PL, Cheung TK, Yam WC, Yuen KY. Characterization of a laboratory generated variant of BPS beta-lactamase from *Burkholderia pseudomallei* that hydrolyses cetazidime. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 723-726.
10. Jenny Adam, W.J., Lum, G., Fisher, D.A. & Currie, B.J. Antibiotic susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* from tropical northern Australia and implications for therapy of melioidosis. *Int J Antimicrob Agents*2001; 17, 109-113.
11. Keith KE, Oyston PC, Crossett B, Fairweather NF, Titball RW , Walsh TR. Et al. Functional characterization of OXA-57, a class D- β -lactamase from *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1639-1641.
12. Leelarasamee, A., & Bovornkitti S. (1989). Melioidosis: review and update. *Rev Infect Dis*1989; 11, 413-25.

13. Livermore, D.M., Chau, P.Y., Wong, A.I. & Leung, Y.K. β -lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20, 313-321.
14. Niumsup P, Wuthiekanum V. Cloning of the class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime susceptible and resistant strains. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 445-455.
15. Nuno TA, Jed FF. Acquired class D β -lactamases. *Antibiotics* 2014; 3: 398-434.
16. Panomket P, Wanrum S, Jittimanee J, Teerawatanasuk N, Nilsakul J, Nuntalohit. S. 2011. Susceptibility of ceftazidime to *Burkholderia pseudomallei* found in patients in Sappasitprasong Hospital. *J Med Tech Phy Ther* 2011; 23: 265-273.
17. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *CMLS* 2004; 61, 2200-2223.
18. Sam IC, See HK, Puthuchear SD. Variations in ceftazidime and amoxicillin-clavulanate susceptibilities within a clonal infection of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1556-1558.
19. Sarovich DS, Price EP, Limmathurotsakul D, Cook JM, Schulze Alex, Wolken SR, Keim P, Peacock SJ, Pearson T. Development of ceftazidime resistance in an acute *Burkholderia pseudomallei* infection. *Infect Drug Resist* 2012; 5: 129-132.
20. Sarovich DS, Price EP, Von Schulze AT, Cook JM, Mayo M, Watson LM, Richardson L, Seymour ML, Tuanyok A, Engelthaler DM, Pearson T, Peacock SJ, Currie BJ, Keim P, Wagner DM. Characterization of ceftazidime resistance mechanisms in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Australia. *PLoS One* 2012; 7:e30789. doi: 10.1371
21. Tribuddharat C, Moore RA, Baker P, Woods DE. *Burkholderia pseudomallei* class A β -lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2082-2087.
22. Weldhagen GF. Sequence selective recognition of extended spectrum beta-lactamase GES-2 by a competitive, peptide nucleic based multiplex PCR assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3402-6.
23. White, N.J., Dance, D.A., Chaowagul, W., Wattanagoon, Y., Wuthiekanun, V., & Pitakwatchara, N. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. *Lancet* 1989; 2: 697-701.
24. White N.J. Melioidosis. *Lancet* 2003; 361, 1715-22.
25. Yi H, Kim K, Cho KH, Jung O, Kim HS. Substrate spectrum extension of PenA in *Burkholderia thailandensis* with a single amino acid deletion, Glu168del. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012; 56: 4005–4008.

ภาคผนวก

คณะผู้วิจัย

หัวหน้ากลุ่มวิจัย

ชื่อ (นางสาว/นาง/นาย)(ไทย) ปาวนา พนมเขต

(อังกฤษ) Pawana Panomket

ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์

ระดับการศึกษาสูงสุดปริญญาเอก

ความชำนาญ/ประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *B. pseudomallei* และเชื้อดื้อยา 8 ปี

หน่วยงานต้นสังกัด วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สถานที่ติดต่อ 85 ถนนสกลมารค์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ต.ศรีโคโล อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 045-353900 ต่อ 5843

โทรสาร 045-353928

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 081-2025723

อีเมล panomketp@yahoo.com

หน้าที่ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ เขียนโครงร่างโครงการ ออกแบบการทดลอง ทำวิจัย สรุปผล และเขียน Manuscript

คิดเป็นสัดส่วน 50% (โปรตรระบุเป็นจำนวนเต็ม โดยหากรวมสัดส่วนของผู้วิจัยทุกท่านแล้วต้องไม่เกิน 100%)

ผู้ร่วมวิจัย 1

ชื่อ (นางสาว/นาง/นาย)(ไทย) สุรศักดิ์ แว่นรัมย์

(อังกฤษ) Surasak Wanrum

ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์

ระดับการศึกษาสูงสุดปริญญาเอก

ความชำนาญ/ประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเทคนิคทางโมเลกุลทางการแพทย์ 8 ปี

หน่วยงานต้นสังกัด วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สถานที่ติดต่อ 85 ถนนสกลมารค์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ต.ศรีโคโล อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 045-353900 ต่อ 5847

โทรสาร 045-353928

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 081-5457311

อีเมล mdsurawa@ubu.ac.th

หน้าที่ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ ออกแบบไพรเมอร์ ทำการทดลองในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการ วิจัยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล สรุปผลการทดลองทางสถิติ

คิดเป็นสัดส่วน 5% (โปรตรระบุเป็นจำนวนเต็ม โดยหากรวมสัดส่วนของผู้วิจัยทุกท่านแล้วต้องไม่เกิน 100%)

ผู้ร่วมวิจัย 2

ชื่อ (นางสาว/นาง/นาย)(ไทย)แพทย์หญิงศุทธิณี ธีราช
(อังกฤษ)Sutthini Tirat

ตำแหน่งอาจารย์

ระดับการศึกษาสูงสุดวุฒิปริญญาโทวิทยาศาสตรบัณฑิตและเวชบำบัดวิกฤต

ความชำนาญ/ประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับโรคติดเชื้อในเด็ก ทบทวนวรรณกรรมและประวัติผู้ป่วย 8 ปี

หน่วยงานต้นสังกัด วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สถานที่ติดต่อ 85 ถนนสถลมารค วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ต.ศรีโคโล อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 045-353900 ต่อ 5857

โทรสาร 045-353928

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 087-7139889

อีเมล sutthini.t@gmail.com

หน้าที่ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ ทบทวนวรรณกรรมและประวัติผู้ป่วย

คิดเป็นสัดส่วน 3% (โปรดระบุเป็นจำนวนเต็ม โดยหากรวมสัดส่วนของผู้วิจัยทุกท่านแล้วต้องไม่เกิน 100%)

ผู้ร่วมวิจัย 3

ชื่อ (นางสาว/นาง/นาย)(ไทย)จุฑารัตน์ จิตติมณี
(อังกฤษ)Jutharat Jittimanee

ตำแหน่งอาจารย์

ระดับการศึกษาสูงสุดปริญญาเอก

ความชำนาญ/ประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเทคนิคทางโมเลกุลทางการแพทย์ 7 ปี

หน่วยงานต้นสังกัด วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สถานที่ติดต่อ 85 ถนนสถลมารค วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ต.ศรีโคโล อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 045-353900 ต่อ 5858

โทรสาร 045-353928

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 084-9566240

อีเมล jutharat_manee@yahoo.com

หน้าที่ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ สกัด DNA จากแบคทีเรีย

คิดเป็นสัดส่วน 2% (โปรดระบุเป็นจำนวนเต็ม โดยหากรวมสัดส่วนของผู้วิจัยทุกท่านแล้วต้องไม่เกิน 100%)

ผู้ร่วมวิจัย 4

ชื่อ (นางสาว/นาง/นาย)(ไทย)มารุตพงศ์ ปัญญา

(อังกฤษ)Marutpong Panya

ตำแหน่งอาจารย์

ระดับการศึกษาสูงสุดปริญญาเอก

ความชำนาญ/ประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเทคนิคทางโมเลกุลทางการแพทย์ 5 ปี

หน่วยงานต้นสังกัด วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สถานที่ติดต่อ 85 ถนนสถลมารค วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ต.ศรีโคตร อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 045-353900 ต่อ 5852

โทรสาร 045-353928

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 081-3895189

อีเมล marutpong@gmail.com

หน้าที่ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ ออกแบบโปรแกรม ทำการทดลองในส่วนที่เกี่ยวกับการ

วินิจฉัยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

คิดเป็นสัดส่วน 40% (โปรตรระบุเป็นจำนวนเต็ม โดยหากรวมสัดส่วนของผู้วิจัยทุกท่านแล้วต้องไม่เกิน

100%)