

ศึกษาเอนไซม์ OXA-type Carbapenemase และ integrons
ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ต่อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร
จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย

นางสาวทิพวรรณ หมิ่นหนู

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF OXA-TYPE CARBAPENEMASE AND INTEGRONS
IN MULTIDRUG RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*
FROM BAMRASNARADURA INFECTIOUS DISEASES INSTITUTE,
NONTHABURI, THAILAND

Miss Tippawan Muennoo



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ศึกษาเอนไซม์ OXA-type Carbapenemase และ integrons ในเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i> ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย
โดย	นางสาวทิพวรรณ หมื่นหนู
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.รัชนีพร ดิยะวิสุทธิศรี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวนรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.รัชนีพร ดิยะวิสุทธิศรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์)

ทิพวรรณ หมื่นหนู : ศึกษาเอนไซม์ OXA-type Carbapenemase และ integrons ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย (STUDY OF OXA-TYPE CARBAPENEMASE AND INTEGRONS IN MULTIDRUG RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* FROM BAMRASNARADURA INFECTIOUS DISEASES INSTITUTE, NONTHABURI, THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.รัชนีพร ตียะวิสุทธิ์ศรี, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง, 88 หน้า.

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบก่อให้เกิดการติดเชื้อในหลายระบบ นับเป็นเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญในระบบสาธารณสุขทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบอัตราการดื้อยาสูง ทำให้ยากกลุ่มสำคัญที่ใช้รักษาการติดเชื้อได้แก่ carbapenem ถูกใช้อย่างมีข้อจำกัด กลไกหลักที่สำคัญที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มนี้คือ การสร้างเอนไซม์ β -lactamase มาทำลายยา ซึ่งเชื่อนี้จะพบการสร้างเอนไซม์กลุ่ม OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs) เป็นจำนวนมาก ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบหาเอนไซม์ CHDLs และยีน class 1 integron โดยวิธีลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 100 สายพันธุ์ และศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) โดยเก็บตัวอย่างเชื้อแบบสุ่มจากสถาบันบำราศนราดูร จ.นนทบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2558 ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ทุกสายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (multidrug resistant) โดยพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบดื้อยา cefotaxime, ceftazidime และยา piperacillin ร้อยละ 100 ส่วนกลุ่มยา carbapenem (imipenem และ meropenem) ดื้อยาร้อยละ 99 ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบยีน bla_{OXA-51} ร้อยละ 100 รองลงมาคือยีน bla_{OXA-23} ร้อยละ 97 แต่ไม่พบยีน bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-58} นอกจากนี้ยังพบยีน class1 integron ร้อยละ 23 พบว่าผลศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี PFGE แบ่งกลุ่มเชื้อได้ 18 Pulsotype โดยมี Pulsotype 1 ร้อยละ 54 ซึ่งให้ผลบวก bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} และให้ผลลบกับ Class I Integron กลุ่มรองลงมาได้แก่ Pulsotype 2 ร้อยละ 11 ซึ่งให้ผลบวก bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} และให้ผลบวก Class I Integron โดยในแต่ละ Pulsotype ที่พบนั้นมีการกระจายไปในหลายหอผู้ป่วย เนื่องมาจากการเคลื่อนย้ายผู้ป่วยจากหอหนึ่งไปสู่อีกหอหนึ่ง การสับเปลี่ยนหน้าที่กันของเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ หรือการใช้เครื่องมือทางการแพทย์ร่วมกัน จึงทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อจนยากแก่การควบคุมในปัจจุบัน

ภาควิชา	เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ปีการศึกษา 2558

5576668737 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS: ACINETOBACTER BAUMANNII / OXA-TYPE CARBAPENEMASE

TIPPAWAN MUENNOO: STUDY OF OXA-TYPE CARBAPENEMASE AND INTEGRONS IN MULTIDRUG RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* FROM BAMRASNARADURA INFECTIOUS DISEASES INSTITUTE, NONTHABURI, THAILAND. ADVISOR: RACHANEEPORN TIYAWISUTSRI, Ph.D., CO-ADVISOR: KHAEMAPORN BOONBUMRUNG, Ph.D., 88 pp.

Acinetobacter baumannii is a gram negative bacteria that causes opportunistic and nosocomial infections, which are associated with elevated morbidity and mortality worldwide including Thailand. *A. baumannii* has increasing rate of resistance to many antibiotics especially carbapenem. The main mechanism of antibiotic resistance is the producing β -Lactamase enzyme that destroys β -Lactam structure, which the most important enzyme is OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs). We studied the prevalence of CHDLs enzymes and class I Integron by polymerase chain reaction (PCR) and the clonal diversity by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in 100 isolates of *A. baumannii* from Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute during 2012-2015. All of isolates were resistant to cefotaxime, ceftazidime, and piperacillin. For carbapenem (Imipenem and Meropenem), the resistance rate was 99%. The *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} and class I Integron were detected 100, 97 and 23%, respectively. No *bla*_{OXA-24} and *bla*_{OXA-58} were detected in any *A. baumannii* isolates. Eighteen pulsotypes (PT) were identified by PFGE. The predominant PT was PT1 (54.00%) that *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} were found but no class I Integron. In PT2 (11.00%), *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} and class I Integron were found. This study found that PT was spread to many wards in this institute. This might be because of transferring of patient, healthcare workers or medical instruments among wards bringing about to a spreading of multidrug resistant *A. baumannii* isolates

Department: Transfusion Medicine and Student's Signature

Clinical Microbiology Advisor's Signature

Field of Study: Molecular Science of Co-Advisor's Signature

Medical Microbiology and

Immunology

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาของ อาจารย์ ดร. รัชนีพร ตียะวิสุทธิ์ศรี ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ อาจารย์ ดร. เขมาภรณ์ บุญบำรุง ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ทั้งสองท่านคอยให้คำปรึกษา อธิบายชี้แนะ ให้กำลังใจ และช่วยเหลือในทุกๆ ขั้นตอน ตลอดจนคอยเสนอแนะให้เกิดแนวคิดต่างๆ ในการแก้ปัญหาตลอดระยะเวลาของการทำวิจัยด้วยดีตลอดระยะเวลาในการทำการศึกษาค้นคว้าวิจัย ณ โอกาสนี้จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัชวงศ์จิรกุล ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ ตลอดจน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. นริศรา จันทราทิตย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย ในการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่มอบเงินทุนสนับสนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์หลักสูตรวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน สำหรับความกรุณาในการอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และสถานที่ทำวิจัย

ขอขอบพระคุณกลุ่มงานจุลชีววิทยาคลินิก และกลุ่มงานวินโรคขั้นสูง กลุ่มปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์และอ้างอิงด้านโรคติดเชื้อ สถาบันบำราศนราดูร จ.นนทบุรี สำหรับการอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ ข้อมูล เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ทำวิจัย ตลอดจนบุคลากรในกลุ่มงานทุกท่าน ที่คอยแนะนำ ช่วยเหลือ ปฏิบัติงานแทน และให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณคุณชนกปรกรณ์ เกตุวรวิชัย และเจ้าหน้าที่บุคลากรของคณะสหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือต่างๆในการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว หมั่นหนู ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่าน ที่คอยสนับสนุน ผลักดัน ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจ ตลอดระยะเวลาที่เข้าศึกษาอย่างดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์.....	4
3. สมมติฐานของการวิจัย.....	4
4. ขอบเขตการวิจัย.....	5
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	6
2. ยากลุ่ม β -Lactam.....	9
3. การดื้อยาของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	10
4. <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>bla</i> _{OXA-24 like} , <i>bla</i> _{OXA-51 like} , และ <i>bla</i> _{OXA-58 like}	14
5. Integron.....	15
6. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	17
7. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	22
1. เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	22

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	22
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	22
2.2 สารเคมี.....	23
3. วิธีการวิจัย	26
3.1 การเก็บรวบรวมเชื้อ <i>A. baumannii</i> ดื้อยาหลายชนิด.....	26
3.2 การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยวิธี disk diffusion.....	26
3.3 การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ เชื้อ <i>A. baumannii</i>	27
3.4 การตรวจหาความชุกของยีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase (CHDLs) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> ดื้อยาหลายชนิด โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis.....	28
3.5 การตรวจหาความชุกของยีนกลุ่ม Class 1 integrons ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> ดื้อยาหลายชนิด โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis.....	29
3.6 การศึกษาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	31
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	34
1. ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i>	34
2. ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial Susceptibility Testing) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i>	37
3. ผลการทดสอบหาความชุกของยีน <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-58} ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส.....	41
4. ผลการทดสอบหาความชุกของ class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	46
5. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการทดสอบหาความชุกของยีน <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-58} และ Class I Integron.....	48

6. ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) . 51	
7. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ผลการทดสอบหาความชุกของยีน <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-58} และยีนใน Class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และผลการหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	55
8. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและหอผู้ป่วย ทำการศึกษาแยกในแต่ละปี.....	62
9. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและชนิดสิ่งส่งตรวจ.....	65
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	67
1. สรุปผลการวิจัย.....	67
2. อภิปรายผล.....	70
3. ข้อเสนอแนะ	76
รายการอ้างอิง	77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	88

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าการแปลผลการทดสอบความไวทางด้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp.....	27
ตารางที่ 3.2 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase ของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	28
ตารางที่ 3.3 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน class 1 integron ยีน <i>Int1</i> ยีน <i>qacEΔ1</i> และ ยีน <i>Sul1</i> ของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	30
ตารางที่ 4.1 แสดงรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ทั้ง 100 สายพันธุ์.....	39
ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในรูปแบบต่างๆ กับผลการหาความชุกของยีน <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-58} และยีนใน Class I Integron.....	50
ตารางที่ 4.3 แสดงผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i> 100 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) พิจารณาร่วมกับรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการหาความชุกของยีน <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-58} และ Class I Integron และหอผู้ป่วย.....	59

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 แสดงเชื้อ *Acinetobacter baumannii*..... 6

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะการติดสีแกรมของ *Acinetobacter baumannii* 7

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของยา β -lactams 11

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ Integron และการเข้าร่วมตัว (integration) ของ gene cassette (Gc) ใน Integron 15

รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของ class1 integron 16

รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส..... 18

รูปที่ 2.7 ทิศทางสนามไฟฟ้า Pulsed Field Gel Electrophoresis..... 20

รูปที่ 4.1 แสดงจำนวนเชื้อ *A. baumannii* ด้วยยาปฏิชีวนะหลายชนิดจำนวน 100 สายพันธุ์ จำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ 34

รูปที่ 4.2 แสดงเชื้อ *A. baumannii* ด้วยยาปฏิชีวนะหลายชนิด จำนวน 100 สายพันธุ์ จำแนกตามหอผู้ป่วย..... 36

รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดงผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 10 ชนิดโดยวิธี disk diffusion ของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์..... 38

รูปที่ 4.4 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23} ด้วยปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส..... 42

รูปที่ 4.5 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-24} ด้วยปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส..... 43

รูปที่ 4.6 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-51} ด้วยปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส..... 44

รูปที่ 4.7 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-58} ด้วยปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส 45

รูปที่ 4.8 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส 47

รูปที่ 4.9 แสดงภาพถ่ายดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ApaI ด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis 53

รูปที่ 4.10 แสดงการวิเคราะห์ผลการจัด Pulsotype ด้วยโปรแกรม BioNumerics Version 7.5 .. 54

รูปที่ 4.11 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดใน Pulsotype1-6 และหอผู้ป่วย..... 61

รูปที่ 4.12 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จำนวน 38 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2555 และหอผู้ป่วย 63

รูปที่ 4.13 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จำนวน 24 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2556 และหอผู้ป่วย 63

รูปที่ 4.14 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จำนวน 38 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2557-2558 และหอผู้ป่วย 64

รูปที่ 4.15 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดใน Pulsotype1-6 และชนิดสิ่งส่งตรวจ 66

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย พบว่าเชื่อนี้มักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อที่ปอด กระแสเลือด ระบบทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และเยื่อหุ้มช่องท้องอักเสบ สำหรับประเทศไทยพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยในช่วง 15 ปีที่ผ่านมาพบว่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2 - 4 เป็นร้อยละ 10 - 30 (1) และจากข้อมูลสถานการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* ใน 5 ปีที่ผ่านมา ตั้งแต่ พ.ศ. 2552 - พ.ศ. 2557 ของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (National Antimicrobial Resistant Surveillance in Thailand : NARST) พบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.85 มาเป็น 10.94 และพบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นจุลชีพที่พบบ่อยโดยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในอันดับที่ 3 ของเชื้อก่อโรคทั้งหมดที่ตรวจพบ (2) นอกจากนี้เชื่อนี้ยังมีการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด และทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้มีอัตราการตายสูง (2)

การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* พัฒนาการดื้อยาจากหลายกลไกผ่านทางโครโมโซมและพลาสมิด (1) ปัจจุบันพบว่าปัญหาที่สำคัญคือเชื้อ *A. baumannii* มีการดื้อยาหลายชนิด (Multidrug resistant : MDR) โดยเกณฑ์ในการจัดว่าเป็นเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดคือ เชื้อต้องดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่า 2 กลุ่มจากยาที่ใช้ทดสอบความไว 5 กลุ่ม ได้แก่ Cephalosporins (ceftazidime หรือ cefepime), Carbapenems (imipenem หรือ meropenem), Ampicillin/sulbactam, Fluoroquinolone (ciprofloxacin หรือ levofloxacin) และ Aminoglycosides (gentamicin, tobramycin หรือ amikacin) โดยในช่วงเวลาที่ผ่านมาการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* นิยมใช้ยาในกลุ่ม Carbapenem จนเป็นเหตุให้ปัจจุบันมีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenem เพิ่มมากขึ้น (3) จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขในช่วง 16 ปีที่ผ่านมาตั้งแต่ พ.ศ. 2541 - 2556 พบว่าความไวต่อยาในกลุ่ม Carbapenem (imipenem) ของเชื้อ *A. baumannii* ลดลงจากร้อยละ 98 ในปี พ.ศ. 2541 เหลือเพียงร้อยละ 33.1 ในปี พ.ศ. 2556 ขณะที่ยา meropenem เริ่มมีข้อมูลในช่วงปีพ.ศ. 2550 จนถึงปัจจุบันและมีความไวอยู่ในช่วงร้อยละ 28 - 33 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อ *A.*

baumannii มีความไวต่อยาในกลุ่ม Carbapenem ลดลงจากอดีตเป็นอย่างมาก (2) ยา carbapenem เป็นยาในกลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อนี้ หากมีการดื้อยาในกลุ่มนี้จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการรักษาการติดเชื้อ เนื่องจากเป็นยาขนานสุดท้าย (last resort antibiotic) ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (4) ทำให้ต้องเปลี่ยนยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ ซึ่งในปัจจุบันแทบจะไม่มียาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาและอาจต้องรอการพัฒนาใหม่ๆ ที่ให้การรักษาได้ดี มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรที่ใช้ในการรักษามากขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากผู้ป่วยต้องรักษาในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลาเพิ่มขึ้น จึงนับว่าเชื้อ *A. baumannii* นี้เป็นเชื้อที่สำคัญที่ควรจะควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อและลดอัตราการก่อโรคในผู้ป่วยเป็นอย่างยิ่ง

กลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* นั้นมีหลายกลไก ได้แก่ การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา การลดการนำยาเข้าสู่บริเวณที่เป็นเป้าหมาย การเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมายซึ่งยาจะเข้าไปจับ และการขับยาออกจากเซลล์ ซึ่งเชื้อสามารถเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพโดยอาศัยกลไกใดกลไกหนึ่ง หรืออาจเกิดพร้อมๆ กันในหลายๆ กลไกได้ โดยกลไกที่พบบ่อยและสำคัญที่สุดคือ การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ β -lactamase (3) ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างวงแหวนของยาในกลุ่ม β -lactam ทำให้ยาเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีไม่สามารถจับกับ target proteins คือ Penicillin-binding proteins (PBPs) ที่อยู่บน cell membrane ของเชื้อ ส่งผลให้ยาไม่สามารถทำงานต่อไปได้ และไม่สามารถออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ ทำให้เชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase เกิดการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam (5) ปัจจุบันเอนไซม์ β -lactamase สามารถจำแนกตามโครงสร้างระดับโมเลกุล (Molecular classification) ตามระบบของ Amber ออกเป็น 4 กลุ่มคือ A, B, C และ D โดยเอนไซม์ class B ตำแหน่งออกฤทธิ์ต้องอาศัย Zn^{2+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เรียกเอนไซม์ class นี้ว่า metallo β -lactamase (MBL) (6) เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งได้ด้วย Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) ตัวอย่างของเอนไซม์ MBL ได้แก่ NDM-1, IMP, SPM, VIM, SIM เป็นต้น (6) ส่วนเอนไซม์ class A, C และ D มีตำแหน่งออกฤทธิ์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine (serine β -lactamase) เนื่องจากยาในกลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษา *A. baumannii* ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดคือ ยา Carbapenem ดังนั้นเอนไซม์ β -lactamase ทำให้จากการดื้อยา Carbapenem มีชื่อเรียกว่า carbapenemase

เอนไซม์ carbapenemase ที่ทำให้เกิดการดื้อยา Carbapenem ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่สำคัญมี 2 ชนิด ได้แก่ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs) และ metallo- β -lactamases (MBLs) (3) โดยเอนไซม์กลุ่ม CHDLs พบได้บ่อยในเชื้อ *Acinetobacter* spp. สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้มากกว่า 10 กลุ่ม แต่ที่พบบ่อยใน

เชื้อ *A. baumannii* ได้แก่ bla_{OXA-23} like, $bla_{OXA-24/40}$ like, bla_{OXA-51} like, bla_{OXA-58} like และ $bla_{OXA-143}$ like (4) จากการศึกษาหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ CHDLs (OXA) ในแต่ละภูมิภาคในโลกจะ ให้ผลที่แตกต่างกันออกไป โดยประเทศแอฟริกาใต้มีความชุกของยีน bla_{OXA-51} สูงที่สุดคือร้อยละ 80 ในขณะที่ยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-58} พบร้อยละ 52.2 และ 1 ตามลำดับ ส่วนประเทศ อิหร่านพบความชุกของยีน bla_{OXA-51} สูงที่สุดคือร้อยละ 100 ยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-58} พบร้อยละ 36.5, 26 และ 15 ตามลำดับ (5) ในขณะที่ ประเทศมาเลเซียพบยีน bla_{OXA-51} และ bla_{OXA-23} ร้อยละ 100 และ 75.9 ตามลำดับ (7) สำหรับการศึกษาในประเทศไทยยังมีการรายงานไม่มากนักและสายพันธุ์ที่ศึกษามีจำนวนน้อย จากการศึกษาของ Mendes RE และคณะในกลุ่มประเทศ เอเชียแปซิฟิกจำนวน 10 ประเทศพบว่าในประเทศไทยเชื้อ *A. baumannii* มียีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-58} ผลการศึกษาของ Thapa B และคณะ (8) ในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 37 สายพันธุ์จากโรงพยาบาลศิริราชพบเพียงยีน bla_{OXA-23} ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจากโรงพยาบาลพุทธชินราชในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 13 สายพันธุ์ (9) ส่วนการศึกษาของ Jumron N. และคณะ (10) ในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 26 สายพันธุ์จากโรงพยาบาลรามารามาศิพความชุกของยีน bla_{OXA-23} สูงที่สุดคือร้อยละ 84.26 ยีน bla_{OXA-51} , bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-58} พบร้อยละ 62.93, 50 และ 7.69 ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* นั้นจากการศึกษาในประเทศไทยพบยีน bla_{IMP} (8),(10) ส่วนเอนไซม์ New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) ที่พบใหม่นั้นสร้างจากยีน bla_{NDM-1} โดยมีรายงานการพบในเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* จากประเทศอินเดีย ปากีสถาน สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา เคนยา ญี่ปุ่น แคนาดา เบลเยียม เนเธอร์แลนด์ ใต้หวัน และสิงคโปร์ เป็นต้น (11) สำหรับเชื้อ *A. baumannii* พบยีน bla_{NDM-1} ร่วมกับ bla_{OXA-23} จากตัวอย่างตรวจในประเทศอินเดีย (12) นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานพบยีน bla_{NDM-1} จากเชื้อ *A. baumannii* ประเทศไทย

โดยวิธีการตรวจความไวต่อยาปฏิชีวนะทางห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลทั่วไปนั้นนิยมใช้วิธี Double disk synergy test (DDST) และ Modified Hodge test สำหรับการตรวจหาเอนไซม์ MBLs และ Carbapenemase ชนิดอื่นตามลำดับ (12) โดยทั้งสองวิธียังไม่มีแนวทางมาตรฐาน สำหรับการตรวจ การยืนยันการสร้างเอนไซม์ MBLs และ Carbapenemase นั้นต้องอาศัยการตรวจหายีนในระดับจีโนมไทป์ เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *A. baumannii* มักถ่ายทอดยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamases โดยยีนที่อยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) โดยเฉพาะ integron (13) ซึ่งจะช่วยให้เกิดการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยพบ class 1 integron มากที่สุด (14)

ด้วยเหตุนี้ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาความชุกของยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases 4 ชนิดได้แก่ยีน *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Carbapenem ซึ่งเป็นยากลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* และหาความสัมพันธ์ของ integrons โดยเฉพาะ class 1 integron ได้แก่ยีน *Int1* ยีน *qacE Δ 1* และยีน *sul1* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อในแต่ละตัวอย่าง ด้วยวิธี Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความชุกของเชื้อดื้อยาภายในสถานพยาบาล และสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อภายในหออภิบาลผู้ป่วยในโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังช่วยในการจัดการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาลต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like} และ *bla*_{OXA-58 like} ในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ class1 Integron กับเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย

3. สมมติฐานของการวิจัย

1. ความชุกของยีน *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like} และ *bla*_{OXA-58 like} ในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆในประเทศไทย และแตกต่างจากการศึกษาในประเทศอื่นๆ
2. Class1 Integron น่าจะมีความสัมพันธ์กับเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร
3. เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร ที่ตรวจพบยีนดื้อยา ชนิดเดียวกัน น่าจะมีความสัมพันธ์กัน

4. ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs) ได้แก่ยีน *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like} และ *bla*_{OXA-58 like} รวมทั้งศึกษาความชุกของยีน Class I Integron ในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิด ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ เสมหะ ปัสสาวะ หนองจากแผล เลือด ซึ้นเนื้อ น้ำล้างปอด และน้ำจากการเจาะหลอดลม ที่เก็บในปี พ.ศ.2555 ถึงปี พ.ศ. 2558 จำนวน 100 ตัวอย่าง รวมทั้งศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อทั้งหมดด้วยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis เพื่อให้ทราบความเกี่ยวข้องทางสายพันธุ์ว่ามีต้นกำเนิดมาจากที่เดียวกันหรือไม่

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

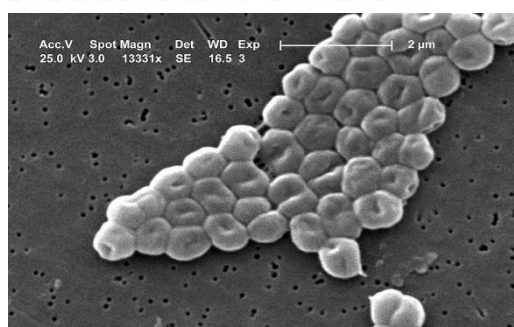
1. ทราบความชุกของยีน *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like} และ *bla*_{OXA-58 like} ในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี, ประเทศไทย
2. ทราบความสัมพันธ์ของ class1 Integron กับเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย
3. ทราบความสัมพันธ์ทาง genetic ของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิด ที่ตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like} และ *bla*_{OXA-58 like} ในแต่ละสายพันธุ์ของสถาบันบำราศนราดูร จากการศึกษาด้วยวิธี Pulse Field Gel Electrophoresis

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลมแท่ง (cocci) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) สร้างแคปซูล ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาล (non-fermenter) มีขนาดประมาณ 1.0 - 1.5 X 1.5 μm (3) ดีเอ็นเอของเชื้อประกอบไปด้วยเบส G + เบส C ประมาณร้อยละ 39-47 (15) จัดอยู่ใน family *Moraxellaceae* โดยเชื้อ *Acinetobacter* มีรูปร่างและการติดสีแกรมคล้ายกับเชื้อ *Moraxella* spp หรือ เชื้อ *Neisseria* spp. โดยอาจแยกออกจากกันได้ยาก แต่เชื้อนี้จะสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase) แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ช่วยในการจำแนกเชื้อนี้จากแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งตัวอื่น เจริญเติบโตแบบอาศัยออกซิเจน สามารถเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (1) ปัจจุบันพบถึง 26 สายพันธุ์ (species) และ 9 genomic species โดยพบว่า 4 สายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* ซึ่งได้แก่ *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomic species3 และ *Acinetobacter* genomic species 13TU มีลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ที่เหมือนกันและยากที่จะจำแนกออกจากกันได้ จึงได้จัดเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ไว้ใน *A. calcoaceticus* -complex (15) สำหรับสายพันธุ์ที่พบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในคนมากที่สุดคือ *A. baumannii* (3)



รูปที่ 2.1 แสดงเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

(ที่มา: http://simple.wikipedia.org/wiki/File:Acinetobacter_baumannii.JPG)



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะการติดสีแกรมของ *Acinetobacter baumannii*
(<http://www.buddycom.com/bacteria/gnr/gnrfastid.html>)

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* เป็นเชื้อที่พบได้ในดินและน้ำ (15) สามารถเจริญเติบโตได้ในร่างกายมนุษย์และก่อให้เกิดโรคได้หลายระบบ เช่น ปอดอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อช่องท้องอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด เนื้อเยื่ออ่อน สายสวนหลอดเลือด ทางเดินปัสสาวะ และแผลผ่าตัด เป็นต้น (1) โดยเชื่อนี้มักก่อโรคอยู่ในบริเวณที่มีความชื้น เช่น mucous membranes หรือบริเวณผิวหนังที่เป็นบาดแผล (15) เชื้อ *A. baumannii* สามารถทนต่อสิ่งแวดล้อม เช่น อ่างล้างมือ พื้นห้อง เติงผู้ป่วย ได้นานถึงประมาณ 13 วัน ทำให้เชื่อนี้สะสมอยู่ในสภาพแวดล้อมและก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (3)

ปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ของเชื้อ *A. baumannii* ประกอบด้วย

1. ส่วนประกอบของแบคทีเรีย (structural component) ได้แก่

1.1 Outer membrane protein A หรือ OmpA เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ของตัวเชื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรค เมื่อ OmpA จะไปจับกับไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) จะทำให้เกิดการบวม และไมโทคอนเดรียไม่สามารถทำหน้าที่ได้ นอกจากนี้จะเกิดการหลั่งของสารต่างๆ ได้แก่ cytochrome c protein ซึ่งทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของโฮสต์ (15)

1.2 แคปซูล (capsule) ประกอบด้วย polysaccharide ซึ่งช่วยให้เชื้อสามารถเกาะจับกับเซลล์เยื่อต่างๆ ของคนได้

1.3 Fimbriae ช่วยในการเกาะติดกับ Epithelial cells ของคน

1.4 ไบโอฟิล์ม (Biofilm) ช่วยให้ตัวเชื้อทนต่อสภาวะต่างๆที่ไม่เหมาะสม โดยเชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของต่างๆ เช่น แก้ว อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในหอผู้ป่วย หรือเซลล์เยื่อต่างๆของร่างกาย (15)

2. เอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้น ได้แก่ Phospholipase D และ Phospholipase C (15)
3. สารพิษ ได้แก่ lipid A ซึ่งเป็น lipopolysaccharide เป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ (16)

อุบัติการณ์การติดเชื้อ

เชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อที่สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมและ colonize อยู่ในเครื่องมือและอุปกรณ์ รวมทั้งสถานที่ภายในสถานพยาบาลได้เป็นเวลานาน ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่เป็นปัญหาทั่วโลกในปัจจุบัน (17) พบว่าเชื้อนี้สามารถอยู่ในบริเวณผิวหนังของคนปกติ ร้อยละ 3 แต่พบเชื้อในบริเวณผิวหนังของคนเร่ร่อนได้ถึงร้อยละ 22 (15) โดยบริเวณที่พบมากที่สุดได้แก่ มือ ขาหนีบ บริเวณที่มีความชื้น เช่น รักแร้ ซอกนิ้วมือ ซอกนิ้วเท้า หู จมูก เป็นต้น เชื้อนี้ทนและดื้อต่อยาหลายชนิด (18) ซึ่งพบว่ามีกรรายงานการพบเชื้อดื้อยาหลายชนิด (Multiresistant) จากหลายประเทศทั่วโลก ได้แก่ ทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ เอเชีย และ บริเวณแปซิฟิกใต้ (17) โดยในประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2531 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อ 1 ใน 10 ที่พบบ่อยในการติดเชื้อในโรงพยาบาล (1) เชื้อ *A. baumannii* ในประเทศไทยนั้นมียุบัติการณ์ที่ค่อยๆมากขึ้นในทุกๆปี จึงนับว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ก่อปัญหาในด้านสาธารณสุขของประเทศไทย โดยพบเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.85 มาเป็น 10.94 และพบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นจุลชีพพบบ่อยโดยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในอันดับที่ 3 ของเชื้อก่อโรคทั้งหมดที่ตรวจพบ (3)

การรักษาการติดเชื้อ

การรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* มีทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาแบบเดี่ยว และ การใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกัน (antibiotic combination therapy) สำหรับยาเดี่ยวที่ใช้ในการรักษาได้แก่ Imipenem, Meropenem, Ampicillin/sulbactam, Amikacin, Polymyxin B, Colistin, Sulbactam, Tigecycline ส่วนยาร่วมที่เสริมฤทธิ์กัน เช่น การใช้ Rifampicin ร่วมกับ Colistin/Imipenem หรือ Meropenem/Imipenem ร่วมกับ Aminoglycosides เป็นต้น (1)

จากข้อมูลการศึกษาพบว่าในช่วงปี พ.ศ. 2513 - 2522 ยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ได้แก่ ยาในกลุ่ม Aminoglycosides กลุ่ม β -lactams และยา tetracycline สำหรับเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยานั้น ยาที่แนะนำเป็นยาตัวแรกในการรักษา (Drug of choice) คือยาในกลุ่ม Carbapenems ต่อมาเมื่อมีการพบการดื้อยาของเชื้อเพิ่มมากขึ้นทำให้การรักษาได้มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (non MDR *A. baumannii*) จะใช้ยาร่วมกันระหว่างยาในกลุ่ม Aminoglycosides กับยาในกลุ่ม β -lactams เช่น piperacillin หรือ imipenem ส่วนการรักษา *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (MDR *A. baumannii*) รวมถึงดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems ส่วนยาในกลุ่ม

Polymyxin โดยเฉพาะยา Colistin ที่ยังสามารถใช้ได้ในปัจจุบัน แต่ยาชนิดนี้จะมีผลข้างเคียงคือทำให้เกิดการเป็นพิษที่ไตได้ (Nephrotoxicity) (19)

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อ *A. baumannii*

สามารถจำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ คือ ยาที่ยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ได้แก่ยาในกลุ่ม β -Lactam และยาอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ยาในกลุ่ม Penicillin ทั้งหมด Cephalosporin และ Carbapenem ยาในกลุ่ม Glycopeptide (vancomycin teicoplanin) และยา Fosfomycin ยาที่มีกลไกยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ Aminoglycoside, Macrolides (Erythromycin, Roxithromycin, Azithromycin และ lincosamide), Tetracycline (tetracycline, minocycline, doxycycline) และ Glycylcyclines (tigecycline) ยาที่มีกลไกยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ trimethoprim และ sulfa ยาที่ขัดขวางกระบวนการแบ่งตัวและการถอดรหัสพันธุกรรม คือยาในกลุ่ม Fluoroquinolone และยาอื่น เช่น Mitronidazole

2. ยาในกลุ่ม β -Lactam

Penicillin ได้แก่ยา Ampicillin, Amoxycillin, Cloxacillin, Piperacillin เป็นยาออกฤทธิ์ต้านแกรมบวกได้ดี สำหรับ piperacillin จัดเป็น pseudomonal penicillin เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดีกว่า penicillin ตัวอื่นๆ ยาในกลุ่มนี้ได้มีการเติม β -Lactamase inhibitor คือ sulbactam, clavulanate และ tazobactam เพื่อยับยั้งเอนไซม์ β -Lactamase แต่สารดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

Cephalosporin แบ่งยาในกลุ่มนี้ออกเป็นรุ่นตามขอบเขตในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อคือ รุ่น 1 -4 สำหรับยารุ่น 1 ได้แก่ Cefazolin และ Cephalexin รุ่น 2 สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่ารุ่น 1 ได้แก่ Cefuroxime และ Cefoxitin รุ่น 3 แบ่งออกเป็นกลุ่มที่ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั่วไปได้ดีแต่ไม่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* ได้แก่ยา Ceftriaxone และ Cefotaxime เป็นต้น กลุ่มที่ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* และสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบตัวอื่นได้แต่ไม่ดีเท่ากลุ่มแรกและต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ไม่ดี ได้แก่ Ceftazidime และ Cefoperazone ซึ่งปัจจุบันมีแต่ในรูปของยาผสมกับ sulbactam ทำให้ยายับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ได้ดีขึ้น สำหรับยา Cephalosporin รุ่น 4 ซึ่งเป็น Antipseudomonal cephalosporin ที่สามารถต้านเชื้อและแกรมบวกได้ด้วย เช่นยา Cefepime และ Cefpirome

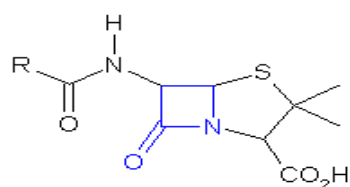
Carbapenem สำหรับประเทศไทย มียาในกลุ่มนี้ขึ้นทะเบียนไว้ 4 ชนิด คือ Imipenem, Meropenem, Doripenem และ Ertapenem ยาในกลุ่มนี้ครอบคลุมเชื้อค่อนข้างกว้าง คือสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตด้วย ซึ่งปกติแล้ว เชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะไวต่อยาในกลุ่มนี้ ยกเว้น *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* (20)

3. การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*

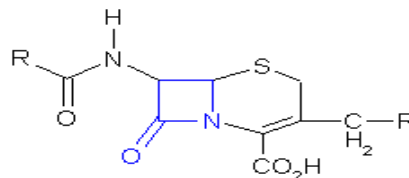
องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้ตระหนักและเล็งเห็นว่า ปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเป็น 1 ใน 3 ของปัญหาสุขภาพที่มีความสำคัญที่สุดในขณะนี้ (15) โดยพบว่าการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. baumannii* เป็นปัญหาที่ทั่วโลกกำลังประสบอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน โดยกลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* นั้น มีหลายกลไก ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา การลดการนำยาเข้าสู่บริเวณที่เป็นเป้าหมาย การเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมายซึ่งยาจะเข้าไปจับ และการขับยาออกจากเซลล์ ซึ่งเชื้อสามารถเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะโดยอาศัยกลไกใดกลไกหนึ่ง หรืออาจเกิดพร้อมๆกันในหลายๆกลไกได้ (3)

การสร้างเอนไซม์ทำลายยา

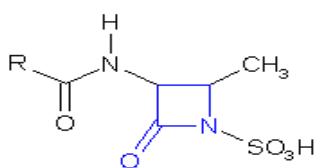
ได้แก่ เอนไซม์ β -lactamases ซึ่งสามารถทำลายยาในกลุ่ม β -lactam หลายกลุ่ม คือ Penicillins, Cephalosporins และ Carbapenems (21) โดยเอนไซม์จะไปทำลายโครงสร้างของยาที่เป็น β -lactam ring (22) ส่งผลให้ยาไม่สามารถเข้าไปจับกับ target site ซึ่งได้แก่ penicillin binding proteins (PBPs) บน cytoplasmic membrane ของเชื้อได้ (23)



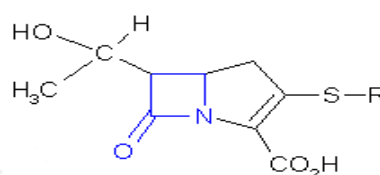
Penicillin nucleus



Cephalosporin nucleus



Monobactam nucleus



Carbapenem nucleus

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของยา β -lactams (Penicillin, Cephalosporin, Monobactam, Carbapenem)
(ที่มา: http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/03_Blactams/Blactam_Antibiotics.htm)

เอนไซม์ β -lactamases นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มโดยใช้โครงสร้างระดับโมเลกุล (Molecular classification) ตามระบบของ Ambler คือ A, B, C และ D (23)

class A β -lactamase หรือ Extended Spectrum β -lactamase (ESBLs) เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ serine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายยา เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำลายยา Penicillins ยากลุ่ม Cephalosporins รุ่นที่ 1, 2 และ 3 และยาในกลุ่ม monobactam (aztreonam) เอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารยับยั้ง (β -lactamase inhibitors) ได้แก่ sulbactam, clavulanic acid และ tazobactam โดยเอนไซม์ ESBLs นี้แบ่งเป็น 3 กลุ่มหลักๆ คือ TEM, SHV และ CTX-M นอกจากนี้ยังมีการรายงาน ESBLs ชนิดอื่นๆนอกเหนือจากเอนไซม์ใน 3 กลุ่มดังกล่าว ได้แก่ VEB, PER, GES, TLA, IBC, SFO-1, BES-1 และ BES-2 เป็นต้น โดยเอนไซม์ที่พบมากที่สุดคือเอนไซม์ TEM (24)

class B β -lactamase หรือ Metallo- β -lactamase (MBL) เป็นเอนไซม์ที่ต้องการสังกะสี (Zn^{2+}) เป็น co-factor ในการเกิดปฏิกิริยาทำลายยา โดยสามารถทำลายยาในกลุ่ม β -lactams ได้ทั้งหมด ยกเว้นยาในกลุ่ม monolactams (25) เอนไซม์ในกลุ่มนี้จัดเป็น Carbapenemase ชนิดหนึ่ง เอนไซม์ MBLs จะถูกยับยั้งการทำงานด้วย

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และสาร Thiol compound ซึ่งจะไปจับสังกะสีทำให้เอนไซม์ MBLs ทำงานไม่ได้ (26) ในปัจจุบันพบเอนไซม์ MBLs หลายชนิดได้แก่ Imipenemase (IMP), Sno Paolo Metallo (SPM), Verona integron-encoded Metallo- β -lactamase (VIM), Seoul Imipenemase (SIM), Japan, Kyorin University Hospital Imipenemase (KHM), German Imipenemase (GIM), New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) และ Australian Imipenemase (AIM) (25)

class C β -lactamase หรือ AmpC β -lactamase เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ serine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายยา โดยในสภาวะปกติเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ AmpC ได้ในปริมาณต่ำๆ แต่ถ้ามีการกระตุ้นด้วยยา β -lactam (β -lactam induction) หรือเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน AmpD ทำให้ไม่มีการแสดงออกของ AmpD protein หรือมีการแสดงออกที่ลดลง (AmpD- associated derepression) จะทำให้เกิดสภาวะที่มีการแสดงออกของยีน AmpC ที่มากกว่าปกติ เป็นสาเหตุให้ยีน AmpC ผลิตเอนไซม์ AmpC β -lactamase ออกมามาก (27) จึงเกิดการดื้อยาโดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำลายยาในกลุ่ม Cephalosporins รุ่นที่ 1, 2 และ 3 (ไม่ทำลายยา Cephalosporins รุ่นที่ 4) และสามารถทำลายยา Cephamycins ได้ แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วย β -lactamase inhibitor (28)

class D β -lactamase หรือ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D (29)(CHDLs) หรือเอนไซม์ Oxacillinase (OXA) เป็นเอนไซม์ β -lactamase class D อาศัย serine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายยา isoxazolympenicillin, oxacillin และ ยาในกลุ่ม carbapenem ได้ (23) ไม่ถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid, sulbactam, tazobactam รวมทั้ง EDTA (30),(31) ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ในงานตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่ปฏิบัติงานประจำทั่วไป เนื่องจากไม่ได้ตรวจวิเคราะห์ถึงระดับจีโนมโทปของเชื้อ (32) เอนไซม์นี้แบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มย่อย (subgroup) ได้แก่ OXA-23 like, OXA-24like (OXA-40 like), OXA-51 like, OXA-58 like และ OXA-143 like (33) โดยเอนไซม์ OXA-23 like จัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่มีการตรวจพบมากที่สุดในเชื้อ *A. baumannii* (30) สามารถส่งผ่านยีนบนพลาสมิด (plasmid encoded) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ OXA-23, OXA-27, OXA-49 (31) เอนไซม์ OXA-24 like สามารถส่งผ่านยีนบนพลาสมิด (plasmid encoded) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 และ OXA-72 (31),(34) เอนไซม์ OXA-51 like เป็นกลุ่มย่อยที่ใหญ่ที่สุดของ OXA-type β -lactamases สามารถส่งผ่านยีนบนโครโมโซม (chromosomal encoded) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-82 เอนไซม์ OXA-58 like สามารถส่งผ่านยีนบนพลาสมิด (plasmid encoded) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ OXA-58,

OXA-96, OXA-97 (30) และ OXA-143 like เป็นเอนไซม์ที่สามารถส่งผ่านยีนบน พลาสมิด (plasmid encoded) ซึ่งมีรายงานการพบเอนไซม์ชนิดนี้มากในแถบประเทศบราซิล (29)

การลดการนำยาเข้าสู่บริเวณเป้าหมาย

โดยปกติช่องทางที่นำยาเข้าสู่เซลล์ (porin) และโปรตีนตัวอื่นๆที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) จะช่วยขนส่งยาเข้าสู่เซลล์ แต่ในเชื้อ *A. baumannii* จะมีช่องที่นำยาเข้าสู่เซลล์ที่มีขนาดเล็กลง และลดการสร้างด้วยจึงสามารถป้องกันยาไม่ให้ผ่านเข้าไปยังภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้ ซึ่งพบมากในการดื้อยา carbapenems (3),(21)

การเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมายที่ยาจะไปจับ

โดยยาในกลุ่ม β -lactam มีเป้าหมายของยาอยู่ที่ Penicillin binding protein (PBP) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะเป็นไปได้ใน 2 ลักษณะดังนี้คือ ลักษณะที่ 1 ได้แก่การสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่ยาไม่สามารถจับได้ให้มีปริมาณมากขึ้น ลักษณะที่ 2 ได้แก่การลดการสร้าง PBP ชนิดที่ยาจับได้ให้มีปริมาณลดลง (3)

การขับยาออกจากเซลล์ Efflux pump

เป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีหน้าที่ขับยาออกจากเซลล์แบคทีเรียทำให้ระดับยาภายในเซลล์ลดลงจนไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ โดยระบบ Efflux pump ของเชื้อ *Acinetobacter* ส่วนใหญ่จะเป็น resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily transporters ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ cytoplasmic pump, membrane fusion protein และ outer membrane channel protein หากเชื้อดื้อยาด้วยการสร้าง Efflux pump นั้นจะทำให้เชื้อสามารถขับยาปฏิชีวนะได้หลายกลุ่ม เช่น Tetracyclines, Chloramphenicol, Aminoglycosides, Quinolones และ β -lactams (3)

Multidrug resistant หรือ MDR คือการที่เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 2 กลุ่มจากที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 5 กลุ่ม ได้แก่ Antipseudomonal cephalosporins, Antipseudomonal carbapenem, Ampicillin/sulbactam, Fluoroquinolones และ Aminoglycosides (21), (35) การดื้อยาของเชื้อสามารถเกิดจากกลไกเพียงกลไกเดียวหรืออาจเกิดจากหลายๆกลไก จึงเป็นสาเหตุของการเกิดเชื้อดื้อยาหลายชนิดหรือ Multidrug resistant ขึ้น

4. *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like}, และ *bla*_{OXA-58 like}

*bla*_{OXA-23 like} เป็นยีนที่ encode บนพลาสมิดมีความยาว 45 kb. ซึ่งยีน *bla*_{OXA-23 like} เป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์ OXA-23 like ซึ่งจัดอยู่ใน class D β -lactamase โดยในกลุ่มของเอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วย OXA-23, OXA-27, OXA-49 (31) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความแตกต่างของกรดอะมิโนตั้งแต่ 2-5 ตัว โดยยีน *bla*_{OXA-23 like} มีความเกี่ยวข้องกับ Insertion Sequence คือ ISAb₁ ซึ่งเป็นส่วน upstream ของยีนที่ช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มากขึ้น (36) เอนไซม์ OXA-23 like พบในเชื้อ *A. baumannii* ได้จากทั่วโลก ได้แก่ ประเทศสเปน สหราชอาณาจักร บราซิล สิงคโปร์ และจีน เป็นต้น

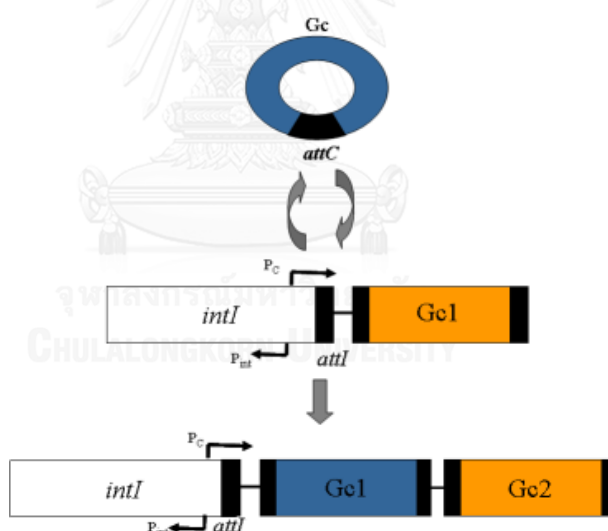
*bla*_{OXA-24 like} หรือ *bla*_{OXA-40 like} เป็นยีนที่ encode บนพลาสมิด ผลิตเป็นเอนไซม์ OXA-24 like โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย OXA-24, OXA-25, OXA-26 และ OXA-72 จัดอยู่ใน class D β -lactamase (31) เอนไซม์แต่ละเอนไซม์ในกลุ่มนี้ มีความแตกต่างของ amino acid ตั้งแต่ 1-5 ตัว และ *bla*_{OXA-24 like} ยังไม่มีรายงานความเกี่ยวข้องกับ Insertion element ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน (30) เอนไซม์ OXA-24 like พบในเชื้อ *A. baumannii* ได้จากทั่วโลก ได้แก่ ทวีปยุโรป (โดยเฉพาะประเทศสเปน เบลเยียม สาธารณรัฐเช็ก ไต้หวันและอิหร่าน เป็นต้น (31)

*bla*_{OXA-51 like} เป็นยีนที่ encode บนโครโมโซม ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ OXA-51 like โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA70, OXA-71, OXA-78, OXA-79, OXA-80 จัดอยู่ใน class D β -lactamase เอนไซม์ในกลุ่มนี้ มีความแตกต่างของ amino acid ตั้งแต่ 1-15 ตัว (31) มีความเกี่ยวข้องกับ Insertion Sequence คือ ISAb₁₆ ซึ่งเป็นส่วน upstream ของยีน ที่ช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มากขึ้น (37)

*bla*_{OXA-58 like} เป็นยีนที่ encode บนพลาสมิด ผลิตเป็นเอนไซม์ OXA-58 like โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย OXA-58, OXA-96 และ OXA-97 จัดอยู่ใน class D β -lactamase (30) มีความเกี่ยวข้องกับ Insertion Sequence ได้แก่ ISAb₃, ISAb₁₂₅ ซึ่งเป็นส่วน upstream ของยีนที่ช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มากขึ้น (38)

5. Integron

Integron คือ โครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบอยู่บนโครโมโซม พลาสมิด หรือ transposon ได้ โดยสามารถบรรจุดีเอ็นเอที่อยู่ในรูป gene cassettes ในตำแหน่งที่จำเพาะ ซึ่งดีเอ็นเอนั้นอาจเป็นยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย Integron ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ Integrase gene (*intI*) และตำแหน่ง *attI* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ integrase นำเข้าหรือตัด gene cassette ออก การเข้ามารวมตัวของ gene cassette ใน integron นั้นจะเกิดขึ้นที่บริเวณติดกับ *attI* โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Integrase (39) gene cassette ปกติบรรจุยีนเพียงยีนเดียวที่เชื่อมต่อกับตำแหน่ง *attC* (เบสสั้นๆ อาจเรียกว่า 59 base element site) ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะกับยีนดื้อยาแต่ละชนิดแตกต่างกันไป โดยปกติแล้ว gene cassette ไม่มี promotor แต่เมื่อมีการรวมตัวกับ integron จะอาศัย promotor จาก integron เพื่อช่วยในแสดงออกของยีน (39) นอกจากนี้ยังสามารถบรรจุยีนดื้อยาได้หลาย gene cassette จึงทำให้เกิดการดื้อยาได้หลายชนิด (multiresistance integrons) (40)



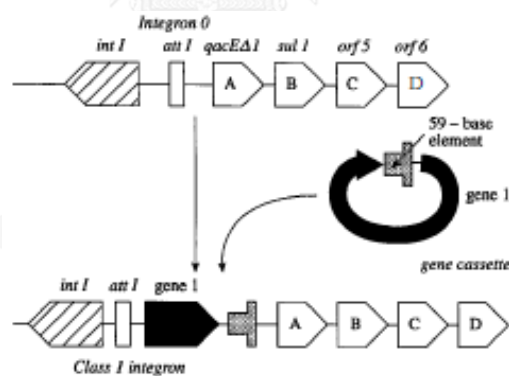
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ Integron และการเข้ารวมตัว (integration) ของ gene cassette (Gc) ใน Integron

(ที่มา: <http://integrall.bio.ua.pt/?intro>)

Integron แบ่งออกเป็น 3 class หลักๆ คือ class1, class2 และ class3 (39) ซึ่ง Integron ในแต่ละ class มียีน *intI* ที่มีหน้าที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ integrase ที่ต่างกันคือ *intI1*, *intI2* และ *intI3* ตามลำดับ (40) การศึกษาเกี่ยวกับ integron ในเชื้อ *A. baumannii* พบว่าสามารถตรวจพบ integron ใน class1 และ class2 ได้ แต่ยังไม่มีการตรวจพบ class 3 (41) โดยพบ class 1

integron มากกว่า class 2 integron ดังในการศึกษาของ Peymani A. และคณะ (42) ในปี พ.ศ. 2555 ที่ศึกษาเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดในประเทศอิหร่านพบ class1 integron สูงถึงร้อยละ 92.5 แต่ไม่พบ class2 integron แต่ในการศึกษานี้ขัดแย้งกับการศึกษาของ Kamabeik S. และคณะ (43) ซึ่งศึกษาในประเทศเดียวกันในปี พ.ศ. 2556 ที่ตรวจพบ class1 integron เพียงร้อยละ 7.5 แต่พบ class2 integron สูงถึงร้อยละ 67.5 ในขณะที่ประเทศในทวีปยุโรปตรวจพบ class1 integron ร้อยละ 43 (44) สหราชอาณาจักรตรวจพบ class1 integron ร้อยละ 77 (45) และสาธารณรัฐประชาชนจีนตรวจพบ class1 integron ร้อยละ 51.9 (46)

Class1 Integron เป็น integron ที่พบมากที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบ (43) โดยมีโครงสร้างดังนี้ ทาง 5' conserved segment จะเชื่อมติดกับ 3' conserved segment โดยส่วนประกอบที่สำคัญที่อยู่บริเวณ 5' conserved segment คือ Integrase gene: *intI* และตำแหน่งที่มีการรวมตัวของ gene cassettes ได้แก่ ตำแหน่ง *attI* รวมทั้งมี promotor ประกอบอยู่ สำหรับ 3' conserved segment ประกอบด้วยยีน *sulI* เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา sulphonamides นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งที่ประกอบด้วย *qacE* และ *qacEΔ1* ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการดื้อสารประกอบของยาอื่นๆ (39)



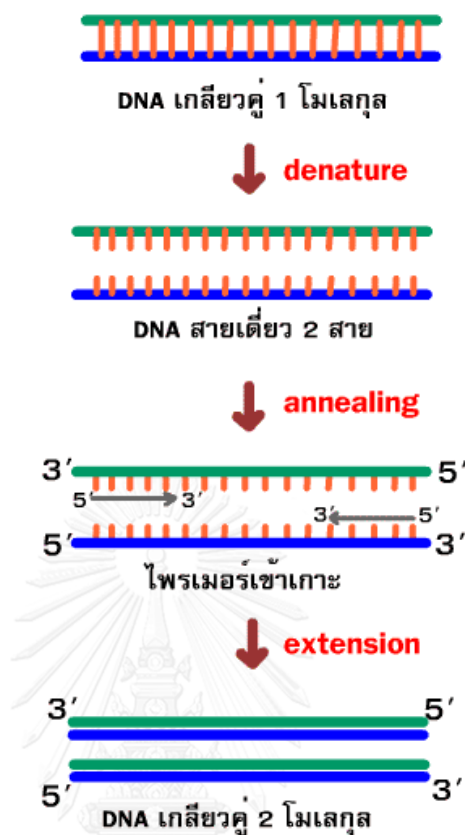
รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของ class1 integron (1)

6. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

คือขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการในเวลาอย่างรวดเร็ว วิธีนี้พัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis ในปี พ.ศ.2526 โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อาศัยองค์ประกอบ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) เอนไซม์ DNA polymerase Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด oligonucleotide primers และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเป็นลูกโซ่ โดยในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับ ดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม
3. Extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากไพรเมอร์ ในทิศทางจาก 5' ไป 3' อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ผลผลิตของ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (34)



รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1.

Denaturation : เพิ่มอุณหภูมิ เพื่อให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกออกจากกัน ขั้นตอนที่ 2 Annealing :

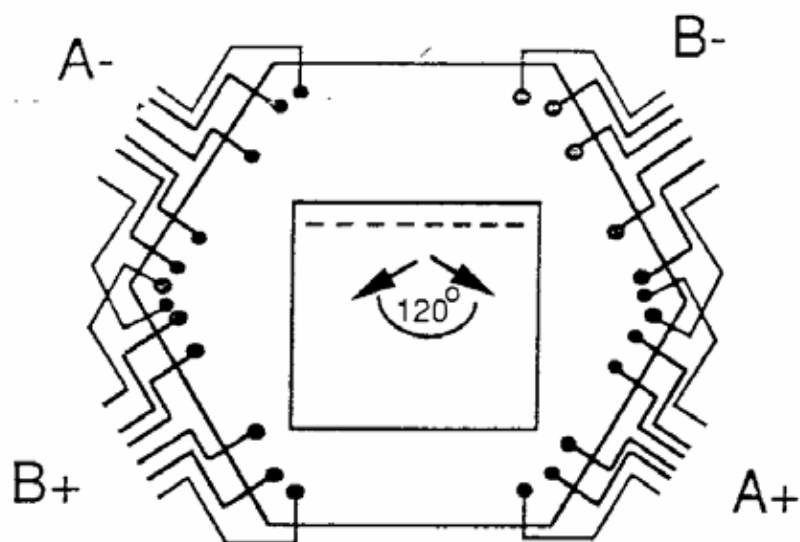
อุณหภูมิลดลง เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ในขั้นตอนที่ 3 Extension : เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ได้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double strain DNA)

(ที่มา: <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/dna/chapter/chapter4application.htm>)

การศึกษา β -lactamase ยีนได้มีการศึกษาด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อใช้ในการค้นหาชนิดต่างๆที่มีความจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ใช้ โดยในปี ค.ศ. 2008 Adams-Haduch JM. และคณะ (47) ได้ใช้วิธีนี้ศึกษาชนิดยารวมทั้งยีนในกลุ่มที่ทำให้ดื้อยา Carbapenem ในปีค.ศ. 2010 Thapa B. และคณะ (8) ได้ทำการศึกษาโดยการทดสอบหาชนิดยีนใน class B และ class D β -lactamase ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ตัวอย่างทดสอบที่เก็บจาก ร.พ.ศิริราช เป็นต้น นับว่าวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วในการค้นหาชนิดยีนที่สนใจในการทดสอบ ผู้วิจัยจึงได้เลือกวิธีดังกล่าวมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้

7. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

ในปัจจุบันการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรมมีหลายวิธีหลายเทคนิค ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการตรวจหาและบ่งชี้ชนิด (subtyping) ของเชื้อแบคทีเรีย และนิยมใช้ศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อก่อโรคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร หรือเชื้อดื้อยา ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *A. baumannii* และ Vancomycin-resistant enterococci (33) โดย PFGE เป็นวิธีการแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งแตกต่างจาก Electrophoresis ธรรมดา คือ การใช้การสลับสนามไฟฟ้า 2 ทิศทาง ถ้าสนามไฟฟ้าด้านหนึ่งทำงาน อีกด้านจะหยุด โดยดีเอ็นเอจะวิ่งขนานไปกับทิศทางของกระแสไฟฟ้า จากนั้นจะมีการสลับทิศทางการให้กระแสไฟฟ้าอีกทิศทาง ทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนทิศทางการวิ่ง การวิ่งของดีเอ็นเอที่ผ่านรูพรุนของเจล ซึ่งเป็นตัวกลาง เป็นรูปกลับไปกลับมาในลักษณะซิกแซก โดยดีเอ็นเอขนาดเล็กจะสามารถเปลี่ยนมุมการวิ่งได้ดี และเร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ทำให้วิธีนี้สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) โดยสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 100 - 12,000 kb วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อแต่ละตัวอย่างได้ (48), (49)



รูปที่ 2.7 ทิศทางสนามไฟฟ้า Pulsed Field Gel Electrophoresis

(ที่มา: Lecture Notes for Methods in Cell Biology, Mark F. Wiser)

ในการทดสอบด้วยวิธี PFGE นั้นมีการตัดดีเอ็นเอของเชื้อออกเป็นชิ้นสั้นๆ โดยการใช้เอนไซม์เป็นตัวช่วยตัด ในการทดสอบนี้ได้เลือกใช้เอนไซม์ Apal สกัดแยกได้จากเชื้อ *Escherichia coli* ที่มียีน Apal โดยได้รับมาจากเชื้อ *Acinetobacter pasteurainus* โดยเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปฏิกิริยาการตัดจะถูกบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้การตัดที่สมบูรณ์ และหยุดปฏิกิริยาโดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 20 นาที (50)

การเลือกใช้เอนไซม์ Apal เนื่องจากการศึกษาของ Kai-Ming Chang และคณะ ที่ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Apal, Ascl, AsiSI, Mrel, Pasi, SanDI, SbfI, Sfil และ SgrAI กับเชื้อ *A. baumannii* ผลที่สรุปได้คือเอนไซม์ Mrel, Pasi, SanDI, SbfI เป็นเอนไซม์ที่มีราคาสูงมาก ในขณะที่เอนไซม์ Apal, Ascl, AsiSI, Sfil และ SgrAI เป็นเอนไซม์ที่มีการตัดย่อย DNA ในวุ้น plug ได้อย่างสมบูรณ์ แต่เอนไซม์ Apal นั้นใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ในการตัดที่สมบูรณ์ที่น้อยมาก คือ 2.5 U ในขณะที่เอนไซม์อื่นๆที่ทดสอบใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า และให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังการตัดมากกว่า 40 ชิ้น ทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่าง และจัดแบ่งกลุ่มได้ จึงทำให้เอนไซม์ Apal เหมาะแก่การนำมาใช้ในการทดสอบกับเชื้อ *A. baumannii* มากที่สุด (51) เอนไซม์ Apal เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อโดยมีความจำเพาะกับบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์เป็น 5' GGGCC^C 3' และทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (52)

การทดสอบความสัมพันธ์ของเชื้อที่มียีนดื้อยา เพื่อเป็นข้อมูลด้านระบาดวิทยานั้น ได้มีการนำเทคนิค PFGE มาทำการทดสอบ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีมาตรฐานในการศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ได้แก่ งานวิจัยของ Adams JM และคณะ (47) ในปี ค.ศ. 2008 ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* และการศึกษาของ Villalon P. และคณะ (53) ซึ่งทำการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศสเปนเมื่อปี ค.ศ. 2011 ด้วยวิธี PFGE เช่นกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกวิธีดังกล่าวมาใช้ทดสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ที่มียีนดื้อยาในกลุ่ม carbapenem สำหรับการได้มาซึ่งข้อมูลในทางระบาดวิทยาต่อไป



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดจำนวน 100 สายพันธุ์ เก็บอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อรักษาสภาพ ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 100 คน โดยได้รับการอนุเคราะห์จากงานจุลชีววิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันบำราศนราดูร จ.นนทบุรี ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2555 – เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 โดยแยกตาม ปี พ.ศ. ดังนี้ พ.ศ. 2555 จำนวน 38 สายพันธุ์ พ.ศ. 2556 จำนวน 24 สายพันธุ์ พ.ศ. 2557 จำนวน 35 สายพันธุ์และ พ.ศ. 2558 จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยเชื้อ *A. baumannii* ที่ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงตามมาตรฐานงานจุลชีววิทยา จำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้ค่าอ้างอิงตามมาตรฐานของสถาบันมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) เชื้อทั้งหมดเพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจต่างๆ ได้แก่ เสมหะ ปัสสาวะ หนอง เลือด ชิ้นเนื้อ น้ำจากการเจาะหลอดลม และน้ำล้างปอด

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้อบ (Incubator) บริษัท Edelstahl Rostfrei ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
 เครื่องปรับความชุ่ม DEN-1 McFarland Densitometer บริษัท Biosan ประเทศสหราชอาณาจักร
 เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) บริษัท Gemmy ประเทศไต้หวัน
 เครื่องสำหรับวางแผ่นยา (Dispenser) บริษัท Oxoid ประเทศสหราชอาณาจักร
 เครื่องปั่นตกตะกอน AccuSpin Micro บริษัท Fisher Scientific ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
 เครื่อง Thermo Shaker บริษัท Biosan ประเทศสหราชอาณาจักร
 ตู้ Biosafety Carbinet class II บริษัท Biosan ประเทศสหราชอาณาจักร
 Autopipette ขนาด 2, 10, 20, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร บริษัท Rainnin ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส บริษัท SEVERIN ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR system 9700 บริษัท Applied Biosystems ประเทศสหรัฐอเมริกา

ชุดเครื่องมือ pulsed field gel electrophoresis (CHEF Mapper[®] XA System) บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่อง Gel Electrophoresis (Mupid) บริษัท Advance ประเทศญี่ปุ่น

ชุดถ่ายภาพเจล ChemiDoc XRS บริษัท Bio Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งสาร Sartorius บริษัท Sartorius ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) บริษัท Biomedica ประเทศสหรัฐอเมริกา

ไม้พันสำลี บริษัท ไทยก๊อสม ประเทศไทย

หลอด PCR 0.2 มิลลิลิตร บริษัท ExtraGene ประเทศสหรัฐอเมริกา

หลอด Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร บริษัท ExtraGene ประเทศสหรัฐอเมริกา

หลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท ExtraGene ประเทศสหรัฐอเมริกา

หลอดทดลอง (ขนาด 12x75 และ 13x100 มิลลิเมตร) บริษัท Pyrex ประเทศสหรัฐอเมริกา

Disposable Cuvette บริษัท Plastibrand ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

2.2 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion broth บริษัท Oxoid ประเทศสหราชอาณาจักร

อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี

Triple Sugar Iron (TSI) บริษัท Oxoid ประเทศสหราชอาณาจักร

Sulfur-Indole-Motility (SIM) บริษัท Oxoid ประเทศสหราชอาณาจักร

Nitrate บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

Malonate บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

Simmons Citrate บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

Urease บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

OF Dextrose บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

OF Lactose บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

OF Sucrose บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
 OF Mannitol บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
 OF Arabinose บริษัท Merck ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
 OF Sorbitol บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
 OF Xylose บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
 OF Maltose บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
 Esculin บริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
 0.85% NaCl บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์
 แผ่นยาปฏิชีวนะ (Disk) บริษัท Oxoid ประเทศสหราชอาณาจักร ได้แก่

Imipenem	10 µg.
Meropenem	10 µg.
Ceftazidime	30 µg.
Cefotaxime	30 µg.
Cefepime	30 µg.
Ciprofloxacin	5 µg.
Piperacillin	100 µg.
Gentamycin	10 µg.
Amikacin	30 µg.
Ampicillin/Sulbactam	10/10 µg.

TE Buffer บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
 Molecular grade water บริษัท Phyto Technology Laboratories ประเทศ
 สหรัฐอเมริกา
 ชุดน้ำยา Taq DNA Polymerase ,10x Buffer, MgCl₂ บริษัท Thermo Scientific
 ประเทศสหรัฐอเมริกา
 dNTP set บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
 TBE buffer บริษัท aMResco ประเทศสหรัฐอเมริกา
 SYBR[®] Safe DNA gel stain บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา

GeneRuler 100 bp DNA ladder บริษัท ThermoFisher Scientific ประเทศ
สหรัฐอเมริกา

DNA Gel Loading dye (6x) บริษัท ThermoFisher Scientific ประเทศ
สหรัฐอเมริกา

Agarose powder บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

Ethidium bromide บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

Tris base บริษัท aMReSCo ประเทศสหรัฐอเมริกา

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate, 99% บริษัท
Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

N-lauroylsarcosine sodium salt, for molecular biology, ≥94% บริษัท Sigma
Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

Certified Low Melt Agarose บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

Certified Megabase Agarose บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

Certified Molecular biology Agarose บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

Proteinase K (Fungal) บริษัท Invitrogen ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
เอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal บริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

CHEF DNA Size Standard Lamda Ladder บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บรวบรวมเชื้อ *A. baumannii* ด้อยหลายชนิด

เก็บเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 100 สายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกเชื้อ *A. baumannii* มาเพาะใน Brain heart infusion broth ที่เติม glycerol ร้อยละ 15 และมีเม็ดลูกปัดเป็นตัวเกาะของเชื้อในหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดของเหลวออกให้หมด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดลองต่อไป

3.2 การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี disk diffusion

เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ยาปฏิชีวนะวางลงบนอาหารเลี้ยงชนิดแข็ง Mueller-Hinton agar (MHA) ตามมาตรฐานของสถาบันมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) เพื่อให้ยาแพร่กระจายออกไปยังบริเวณโดยรอบที่เป็นเนื้อวุ้นอาหาร ทำให้บริเวณใกล้เคียงเป็นจุดที่มีความเข้มข้นสูงสุดและค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะห่างจากแผ่นกระดาษออกไปด้านนอก เมื่อทำการทดสอบด้วยการละลายเชื้อใน 0.85% NaCl ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard และป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ระบาย หากเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบถูกยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะ เชื้อก็ไม่สามารถเจริญได้บริเวณนั้น จะเกิดเป็นบริเวณที่เรียกว่า Inhibition zone ให้มองเห็น

วิธีการวิจัย

เพาะเชื้อ *A. baumannii* ที่ต้องการทำการทดสอบบน MHA ที่อุณหภูมิ 35- 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลูกโคโลนีของเชื้อ ที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ 3-5 โคโลนี ละลายใน 0.85% NaCl ให้ได้เท่ากับความขุ่นที่ 0.5 Mc Farland Standard ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงในสารละลายเชื้อที่ปรับความขุ่นไว้แล้ว บิดกับขอบหลอดให้หมาดๆ จากนั้นนำมาป้ายลงบนอาหารแข็งชนิด MHA ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร โดยป้ายเป็น 3 ระบาย ให้เชื้อมีการกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งจานอาหาร วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ป้ายเชื้อแล้วเอาไว้ เพื่อให้หน้าผิวของอาหารแห้ง แต่ไม่ควรทิ้งไว้เกิน 15 นาที จากนั้นคืบแผ่นยาปฏิชีวนะ วางลงบนจานอาหารที่ป้ายเชื้อไว้ เพื่อให้แผ่นยาแนบสนิทกับอาหาร ใช้ปากคีบค่อยๆ กดอย่างเบามืออีกครั้ง โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบมี 10 ชนิด ได้แก่ Meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม Imipenem (IPM) 10 ไมโครกรัม Cefotaxime (CTX) 30

ไมโครกรัม ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม, Amikacin (AK) 30 ไมโครกรัม Gentamicin (GM) 10 ไมโครกรัม Ciprofloxacin (CFX) 5 ไมโครกรัม Piperacillin 100 ไมโครกรัม และ Ampicillin/sulbactam 10/10 ไมโครกรัม แล้วนำไปปมเพาะที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการวัด inhibition zone แล้วนำไปแปลผลโดยการอ้างอิงกับค่ามาตรฐานของสถาบันมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) (54)

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าการแปลผลการทดสอบความไวทางด้านจุลชีพลด้วยวิธี disk diffusion ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยใช้ค่าอ้างอิงจากมาตรฐานของสถาบันมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) ปี 2015 (54)

Antimicrobial Agent	Disk Content (µg.)	Zone Diameter (mm.) Interpretive Criteria		
		Susceptible	Intermediate	Resistance
Ceftazidime	30	≥18	15-17	≤14
Cefotaxime	30	≥23	15-22	≤14
Cefepime	30	≥18	15-17	≤14
Imipenem	10	≥22	19-21	≤18
Meropenem	10	≥18	15-17	≤14
Gentamycin	10	≥15	13-14	≤12
Amikacin	30	≥17	15-16	≤14
Ciprofloxacin	5	≥21	16-20	≤15
Piperacillin	100	≥21	18-20	≤17
Ampicillin/Sulbactam	10/10	≥ 15	12-14	≤11

3.3 การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ เชื้อ *A. baumannii*

นำเชื้อ *A. baumannii* ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสมาทำการเพาะเลี้ยงด้วยการใช้ needle เขี่ยเม็ดลูกปัดขึ้นมา 1 เม็ด กลิ้งลงบน Tryptic soy agar กระจายเชื้อด้วยการใช้ loop ขีด เป็น 4 ระบาย จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีของเชื้อ ที่ผ่านการ บ่ม 24 ชั่วโมง ปริมาณ 1 loopful มาละลายในน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) ทิ้งให้มากที่สุดเพื่อให้ได้ตะกอนของเชื้อไว้

เติม TE buffer ลงไปในหลอดที่มีตะกอน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเขย่าด้วยเครื่อง (vortex) ให้เกิดการผสมกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอน จากนั้นดูดน้ำใสส่วนบนด้วยความระมัดระวัง ปริมาณ 60 ไมโครลิตร และถ่ายไปยังหลอดที่เตรียมไว้สำหรับเก็บดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบต่อไป

3.4 การตรวจหาความชุกของยีนดีออกสลุ่ม OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase (CHDLs) ในเชื้อ *A. baumannii* ดีออกหลายชนิด โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase ของเชื้อ *A. baumannii* โดยการตรวจหายีน *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like} และ *bla*_{OXA-58 like} การทดสอบนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยของ Woodford และคณะ (67) ดังแสดงในตาราง 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase ของเชื้อ *A. baumannii*

ไพรเมอร์	ยีน	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'	ขนาด (คู่เบส)
OXA-23F OXA-23R	<i>bla</i> _{OXA-23}	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	501
OXA-24F OXA-24R	<i>bla</i> _{OXA-24like}	GGAATGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246
OXA-51F OXA-51R	<i>bla</i> _{OXA-51like}	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353
OXA-58F OXA-58R	<i>bla</i> _{OXA-58}	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599

วิธีการวิจัย

การเตรียมส่วนผสมของน้ำยาในแต่ละตัวอย่างทดสอบนั้น ประกอบไปด้วย 1x *Taq* buffer (Tris-HCl pH 8.8 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, KCl ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์, 0.8% (v/v) Nonidet P40.) dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ forward และ reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และ 1.0 U *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้อุณหภูมิก่อนเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้อุณหภูมิในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที ทำการลดอุณหภูมิลงมาที่ 57 องศาเซลเซียส 45 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์มาจับกับดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้เกิดการสร้างสายดีเอ็นเอที่ต้องการ ซึ่งปฏิกิริยาลูกโซ่จะเกิดขึ้นเป็นจำนวน 35 รอบ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์มากพอที่จะสามารถนำมาตรวจหาในขั้นตอนต่อไป แล้วทำการตรวจผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.5% agarose gel electrophoresis และทำการอ่านผลด้วยการส่องด้วยแสง Ultraviolet ด้วยเครื่องชุดถ่ายภาพเจล Chemi Doc XRS

3.5 การตรวจหาความชุกของยีนกลุ่ม Class 1 integrons ในเชื้อ *A. baumannii* ตือยาหลายชนิด โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

ในการศึกษา ยีนในกลุ่ม class 1 integron ของเชื้อ *A. baumannii* โดยการตรวจหา ยีน *Int1* ยีน *qacEΔ1* และ ยีน *Sul1* ซึ่งมีการทดสอบนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยของ Piyakul C. และคณะ (55) ดังแสดงในตาราง 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน class 1 integron ยีน *Int1* ยีน *qacEΔ1* และ ยีน *Sul1* ของเชื้อ *A. baumannii*

ไพรเมอร์	ยีน	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'	ขนาด (คู่เบส)
Int-F	<i>Int1</i>	GGCGCGCTGAAAGGTCTGGT	753
Int-R		CCGCTGCGTTCGGTCAAGGT	
qacE-F	<i>qacEΔ1</i>	TTGCCCCCTCCGCCGTTGTC	245
qacE-R		CCTCCGCAGCGACTTCCACG	
Sul-F	<i>Sul1</i>	GACGCGAGGCCTGTATCGCC	334
Sul-R		TCCGTCGCAAGGCGGAAACC	

วิธีการวิจัย

การเตรียมส่วนผสมของน้ำยาในแต่ละตัวอย่างทดสอบนั้น ประกอบไปด้วย 1x *Taq* buffer (Tris-HCl pH 8.8 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, KCl ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์, 0.8% (v/v) Nonidet P40.) dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ forward และ reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และ 1.25 U *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดแต่ละหลอด (Multiplex Polymerase Chain Reaction) ใช้อุณหภูมิก่อนเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้อุณหภูมิในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ทำการลดอุณหภูมิลงมาที่ 60 องศาเซลเซียส 40 วินาทีเพื่อให้ไพรเมอร์มาจับกับดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที เพื่อให้เกิดการสร้างสายดีเอ็นเอที่ต้องการ ซึ่งปฏิกิริยาลูกโซ่จะเกิดขึ้นเป็นจำนวน 36 รอบ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์มากพอที่จะสามารถนำมาตรวจหาในขั้นตอนต่อไป แล้วจึงทำการตรวจผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยการแยกดีเอ็นเอด้วย กระแสไฟฟ้าบน 1.5% agarose gel electrophoresis และทำการอ่านผลด้วยการส่องด้วยแสง Ultraviolet ด้วยเครื่องชุดถ่ายรูปรูปเจล Chemi Doc XRS

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อ *A. baumannii* ที่มียีน *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-51 like} และ *bla*_{OXA-58 like} โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่งวิเคราะห์ผลที่บริษัท BIONEER (ประเทศเกาหลี) จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรม (blast) กับฐานข้อมูลของ

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.6 การศึกษาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

การเตรียมชิ้นวุ้น (Plug) ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii*

นำเชื้อ *A. baumannii* ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสมาทำการเพาะเลี้ยงด้วยการใช้ needle เขี่ยเม็ดลูกปัดขึ้นมา 1 เม็ด กลิ้งลงบน Tryptic soy agar กระจายเชื้อด้วยการใช้ loop ขีดเป็น 4 ระบาย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเลี้ยงใน Tryptic soy broth ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวขึ้นลงประมาณ 3 ครั้ง จากนั้นใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านบนออก ให้คงเหลือแต่ตะกอนก้นหลอด เติม SE buffer 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ทำซ้ำในขั้นตอนนี้ 3 รอบ) ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านบนออก จากนั้นเติม SE buffer 150 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลาย 100 ไมโครลิตร ใส่ใน cuvette และเติม SE buffer 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าที่ต้องการจากการวัดคือ ต้องไม่น้อยกว่า 0.1 บันทึกค่าและนำมาคำนวณกลับเพื่อให้ทราบปริมาณ SE buffer ที่ต้องเติมลงไป เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 เติม SE buffer ตามปริมาตรที่คำนวณข้างต้นในหลอดปั่นเดิม ที่มีสารละลายเชื้อที่เหลืออยู่ 50 ไมโครลิตร ละลาย Low melting agarose gel ความเข้มข้น 2% โดยระหว่างทำนั้นให้หล่อด้วยน้ำอุ่นตลอดเวลา นำสารละลายที่มีเชื้อข้างต้นมาผสมกับวุ้นที่ละลายเอาไว้ ในอัตราส่วนเจลดต่อสารละลายเชื้อเป็น 1:1 ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว แล้วหยอดเชื้อที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับวุ้นลงในช่องสำหรับเตรียมชิ้นวุ้นตัวอย่าง (plug mold) โดย 1 ช่องใช้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ให้ด้านบนนูนล้นขึ้นไปเล็กน้อย วางไว้ 15 นาทีเพื่อให้วุ้นแข็ง จากนั้นปาดชิ้นวุ้นตัวอย่างให้ขอบเรียบตรง จากนั้นใช้ตัวต้นวุ้น ค่อยๆดัน plug ออกจากช่องสำหรับเตรียมชิ้นวุ้นตัวอย่าง ลงไปในหลอดทดลองขนาดที่มี Lysis buffer 5 มิลลิลิตร แล้วใช้พาราฟิล์มพันฝาหลอดให้สนิท แล้วจึงนำหลอดทดลองที่มีชิ้น plug ไปบ่มใน Shaking incubator โดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบเวลาค่อยๆเท Lysis buffer ออก โดยระวังอย่าให้ชิ้น plug หลุดลอดออกไป จากนั้นค่อยๆ ล้าง plug ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และสารละลาย TE buffer

5 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม TE buffer (อุณหภูมิห้อง) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอด ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานหลายสัปดาห์

การย่อยโครโมโซมดีเอ็นเอใน plug ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เตรียม 1X restriction enzyme buffer ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดละ 200 ไมโครลิตร ตัดชิ้น plug ด้วยใบมีดให้มีขนาด 4x5.5 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่ใส่ 1X restriction enzyme buffer ไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาดูด 1X restriction enzyme buffer ออก เติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal ความเข้มข้น 30 U ที่เตรียมใน 1X restriction enzyme buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใน Shaking incubator โดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

การนำชิ้นวุ้นตัวอย่าง (plug) ลงใน agarose เพื่อทำ PFGE

เตรียม 1% Megabase agarose gel ใน 0.5X TBE buffer โดยใช้หัว 15 ช่อง เพื่อให้เกิดช่องสำหรับโหลด plug เมื่อครบเวลาดูด 1X restriction enzyme buffer ออก และเติม 0.5X TBE buffer 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำ plug ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal แล้วใส่ลงในช่องตัวอย่างของ 1% Megabase agarose gel ที่เตรียมไว้ โดยใส่ Lamda Ladder PFGE ไว้ในช่องแรกและช่องสุดท้าย เพื่อใช้เป็น marker และในช่อง 2-14 ใส่ plug เชื้อตัวอย่าง ละลาย 1% Megabase agarose gel ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้พออุ่น แล้วค่อยๆ เททับช่องที่ใส่ plug เอาไว้ให้ครบทุกช่อง เพื่อปิดช่องตัวอย่าง แล้วจึงเติม 0.5X TBE buffer ปริมาตร 2.2 ลิตร ลงใน chamber ของเครื่อง Pulsed-field gel Electrophoresis (CHEF Mapper® XA System) จากนั้นนำเจลวางลงในช่องสำหรับวางเจลในตัวเครื่อง ค่อยๆ กดให้ฐานเจลให้สนิทกับลือคของเครื่อง ตั้งค่าเครื่องให้ทำการผลัดขึ้นของดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 19 ชั่วโมง เวลาในการ switch อยู่ที่ 5-20 วินาที มุมรวมในการผลัด 120 องศา กระแสไฟ 6V/cm และเลือกการผลัดเป็นแบบ linear ramping เมื่อครบเวลาการทำ PFGE ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ที่ละลายใน 0.5X TBE buffer 300 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ ล้างสีย้อมด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร 45 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ อ่านผลโดยใช้ UV illumination ปรับความชัดของภาพและบันทึก โดยบันทึกไฟล์แบบ TIFF นำผลไปทำการวิเคราะห์ โดยโปรแกรม Bionumeric Version 7.5 โดยจะตัดสินให้เชื้อที่ทำการทดสอบเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อมี

คะแนนความเหมือนกัน $\geq 80\%$ หลักเกณฑ์เปรียบเทียบแถบตีเอ็นเอด้วยวิธี Dice coefficient และวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ด้วยค่าพารามิเตอร์ optimize 1.5 % และ tolerance in the band position 1.5 %

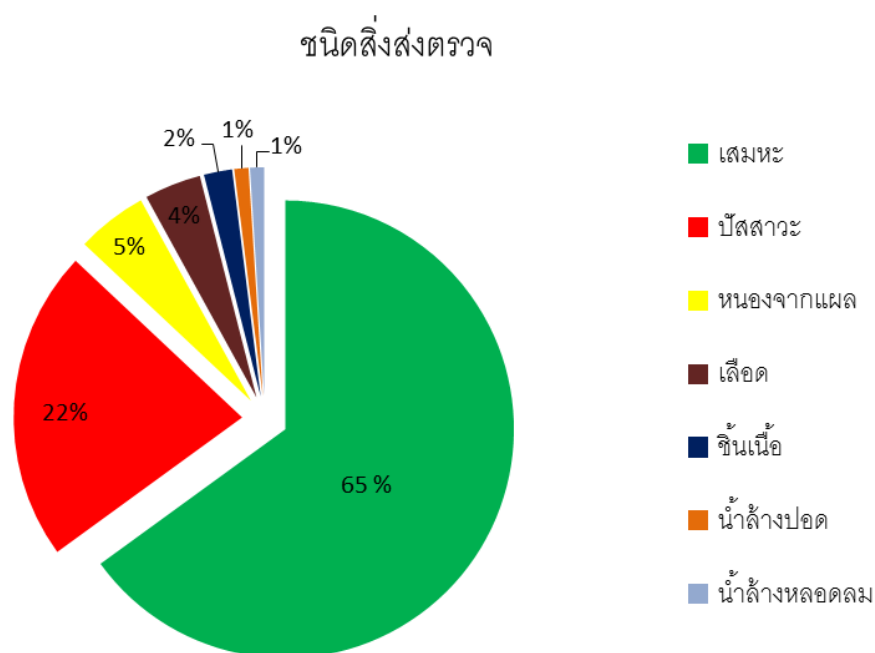


บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดจำนวน 100 สายพันธุ์ เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2558 โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บในปี พ.ศ. 2555 จำนวน 38 สายพันธุ์ พ.ศ. 2556 จำนวน 24 สายพันธุ์ พ.ศ. 2557 จำนวน 35 สายพันธุ์และ พ.ศ. 2558 จำนวน 3 สายพันธุ์ เก็บได้จากเสมหะร้อยละ 65 (65/100) ปัสสาวะร้อยละ 22 (22/100) หนองจากแผล ร้อยละ 5 (5/100) เลือดร้อยละ 4 (4/100) ชี้นเนื้อร้อยละ 2 (2/100) น้ำล้างปอดร้อยละ 1 (1/100) และ น้ำจากการเจาะหลอดลมร้อยละ 1 (1/100) ดังแสดงในรูป 4.1

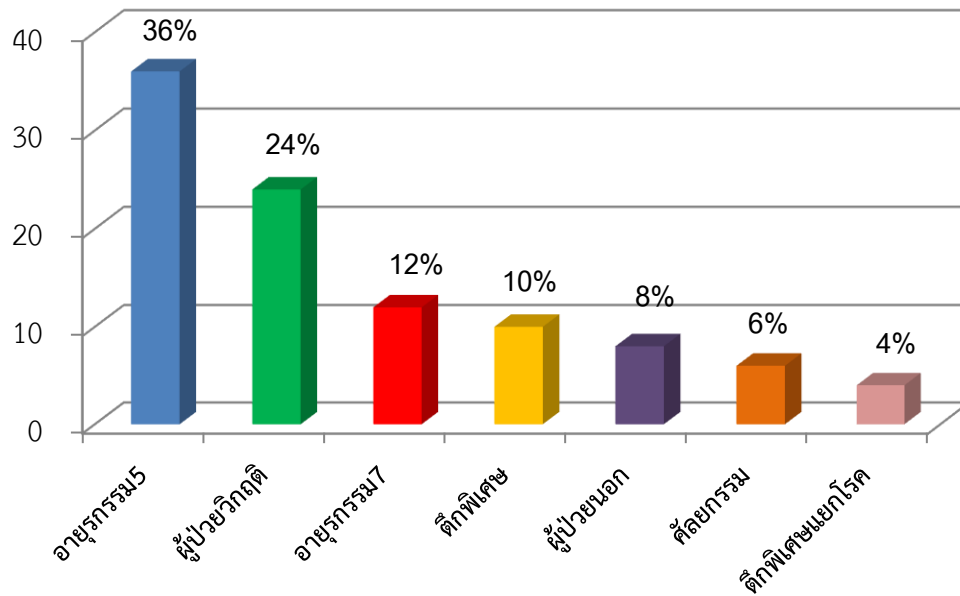


รูปที่ 4.1 แสดงจำนวนเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดจำนวน 100 สายพันธุ์ จำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ

เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดจำนวน 100 สายพันธุ์นี้ เก็บได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการ
รักษาและพักฟื้นในหอผู้ป่วยภายในสถาบันฯ คิดเป็นร้อยละ 92 (92/100) นอกนั้นเก็บได้จากผู้ป่วย
ที่เข้ารับการรักษาแต่ไม่ได้พักฟื้นที่หอผู้ป่วยคิดเป็นร้อยละ 8 (8/100) โดยส่วนใหญ่แล้วเป็นตัวอย่าง
ที่เก็บได้จากหอผู้ป่วยอายุกรรม 5 (ตึก5/5) ร้อยละ 36 (36/100) รองลงมาคือหอพักผู้ป่วยวิกฤติ (ICU)
ร้อยละ 24 (24/100) หอผู้ป่วยอายุกรรม7 (ตึก7/3 และ 7/6) ร้อยละ 12 (12/100) หอผู้ป่วยห้อง
พิเศษ (3/3 และ 3/4) ร้อยละ 10 (10/100) ผู้ป่วยนอก (ผู้ป่วยฉุกเฉินและผู้ป่วยนอกศัลยกรรม และ
OPS) ร้อยละ 8 (8/100) หอผู้ป่วยศัลยกรรม (5/4) ร้อยละ 6 (6/100) และหอผู้ป่วยห้องแยกโรค
(3/2) ร้อยละ 4 (4/100) ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 4.2



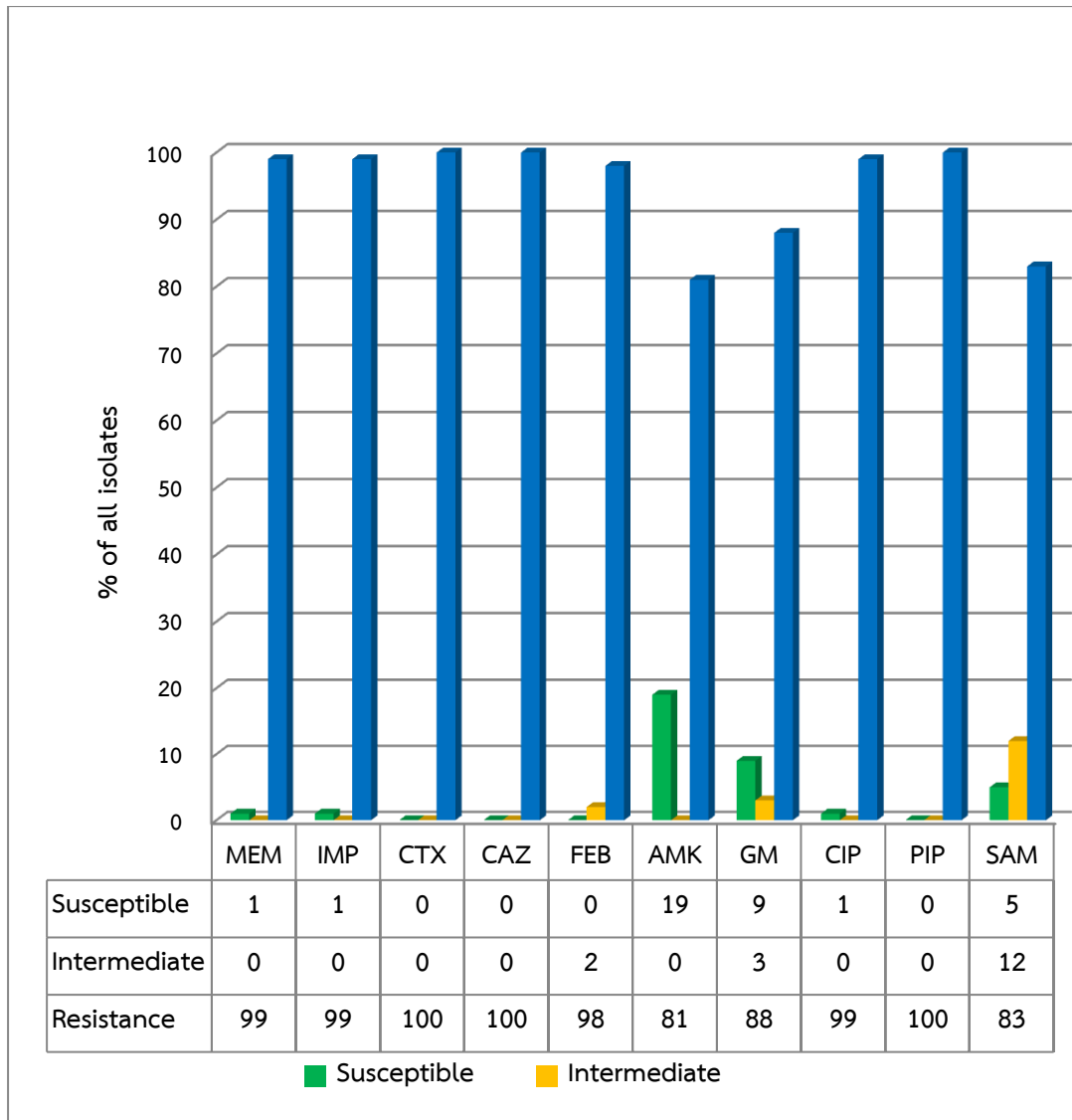
เชื้อ *A. baumannii* จำแนกตามหอผู้ป่วย



รูปที่ 4.2 แสดงเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในหลายชนิด จำนวน 100 สายพันธุ์ จำแนกตามหอผู้ป่วย

2. ผลการศึกษารูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial Susceptibility Testing) ในเชื้อ *A. baumannii*

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion ทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะจำนวน 10 ชนิด โดยสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มยา โดยกลุ่มยาแรกคือกลุ่ม Carbapenems ได้แก่ ยา Meropenem (MEM) และ Imipenem (IMP) พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีอัตราดื้อยาร้อยละ 99 กับยาทั้งสองชนิดที่ใช้ทดสอบ ยากลุ่ม Cephalosporin ซึ่งเป็นกลุ่ม β -lactam ได้แก่ ยา Cefotaxime (CTX) Ceftazidime (CAZ) Cefepime (FEP) โดยพบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 100, 100 และ 98 ตามลำดับ ส่วนยาในกลุ่ม Penicillin ซึ่งเป็นกลุ่ม β -lactam เช่นกัน ได้แก่ Piperacillin (PIP) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 100 ยากลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ ยา Amikacin (AMK) และ Gentamycin (GM) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 81 และ 88 ตามลำดับ ยากลุ่ม Quinolone ได้แก่ ยา Ciprofloxacin (CIP) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 99 และ Ampicillin/Sulbactam (SAM) ซึ่งเป็นยากลุ่ม β -lactam ที่เพิ่มสารยับยั้งเอนไซม์ β -Lactamase พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 83 ดังแสดงในรูป 4.3



รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดงผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 10 ชนิดโดยวิธี disk diffusion ของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์

อักษรย่อชื่อยา คือ MEM=Meropenem IMP=Imipenem CTX=Cefotaxime
 CAZ=Ceftazidime FEB=Cefepime AMK=Amikacin GM=Gentamycin
 CIP=Ciprofloxacin PIP=Piperacillin SAM=Ampicillin/Sulbactam

ตารางที่ 4.1 แสดงรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์

รูปแบบ	MEM	IMP	CTX	CAZ	FEP	PIP	SAM	AMK	GM	CIP	จำนวน
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	72
2	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	7
3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	4
4	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	2
5	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	1
6	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	4
7	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	2
8	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R	1
9	R	R	R	R	I	R	I	S	R	R	1
10	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	3
11	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	2
12	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1

โดยตัวอักษรย่อในตารางคือ R = Resistance S = Susceptible I = Intermediate และอักษรย่อ
 ชื่อยา คือ MEM = Meropenem IMP = Imipenem CTX = Cefotaxime, CAZ = Ceftazidime
 FEP = Cefepime AMK = Amikacin GM = Gentamycin CIP = Ciprofloxacin PIP =
 Piperacillin SAM = Ampicillin/Sulbactam

เมื่อนำผลจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะมาจัดเป็นหมวดหมู่สามารถจัดได้ทั้งหมด 12 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

รูปแบบที่ 1 เป็นรูปแบบที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ชื่อ *A. baumannii* คือต่อยาทุกชนิดที่ทำการทดสอบ คิดเป็นร้อยละ 72 (72/100)

รูปแบบที่ 2 เป็นรูปแบบที่มีขนาดรองลงมา ให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกับรูปแบบที่ 1 ยกเว้นยา Ampicillin/Sulbactam ที่ให้ผลก้ำกึ่ง (Intermediate) คิดเป็นร้อยละ 7 (7/100)

รูปแบบที่ 3 ไวต่อยา Amikacin เพียงชนิดเดียว ส่วนรูปแบบที่ 4 มีความไวต่อยา Amikacin และให้ผลก้ำกึ่งต่อยา Gentamycin รูปแบบ 3 และ 4 คิดเป็นร้อยละ 4 (4/100) และ 2 (2/100) ตามลำดับ

รูปแบบ 5 เป็นรูปแบบที่ให้ผลก้ำกึ่งต่อยาใน Generation ที่ 4 ของยาในกลุ่ม Cephalosporin ได้แก่ Cefepime และไวต่อยา Ampicillin/Sulbactam คิดเป็นร้อยละ 1 (1/100)

รูปแบบ 6 เป็นรูปแบบที่ไวต่อยาทั้ง 2 ชนิดในกลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ ยา Amikacin และ Gentamycin คิดเป็นร้อยละ 4 (4/100)

รูปแบบ 7 เป็นรูปแบบที่ไวต่อยา Ampicillin/Sulbactam และยา Amikacin คิดเป็นร้อยละ 2 (2/100)

รูปแบบ 8 เป็นรูปแบบที่ไวต่อยา Amikacin และให้ผลก้ำกึ่งต่อยา Gentamycin และ Ampicillin/Sulbactam คิดเป็นร้อยละ 1 (1/100)

รูปแบบ 9 เป็นรูปแบบที่ไวต่อยา Amikacin และให้ผลก้ำกึ่งต่อยาต่อยา Cefepime และยา Ampicillin/Sulbactam คิดเป็นร้อยละ 1 (1/100)

รูปแบบ 10 เป็นรูปแบบที่ไวต่อยาทั้ง 2 ตัวในกลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ยา Amikacin และ Gentamycin และให้ผลก้ำกึ่งต่อยา Ampicillin/Sulbactam คิดเป็นร้อยละ 3 (3/100)

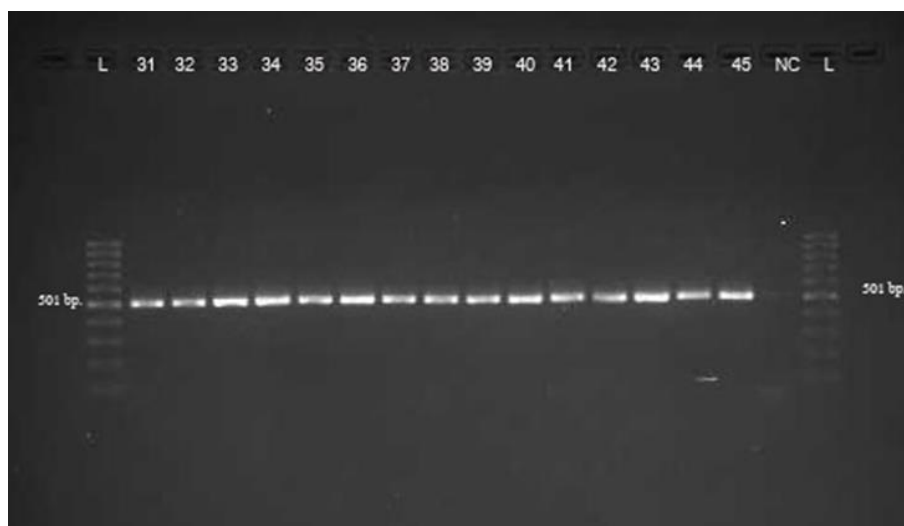
รูปแบบ 11 เป็นรูปแบบที่ไวต่อยาทั้ง 2 ตัวในกลุ่ม Aminoglycoside คือยา Amikacin และ Gentamycin รวมทั้งให้ผลไวต่อยา Ampicillin/Sulbactam ด้วยเช่นกัน คิดเป็นร้อยละ 2 (2/100)

รูปแบบ 12 เป็นรูปแบบเพียงรูปแบบเดียวที่ไวต่อยาในกลุ่ม Carbapenems ได้แก่ยา Meropenem และ Imipenem และไวต่อยาในกลุ่ม Quinolone ซึ่งได้แก่ยา Ciprofloxacin อีกด้วย คิดเป็นร้อยละ 1 (1/100)

3. ผลการทดสอบหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} ด้วยวิธี ปฏิกริยาถูกลูโซพอลิเมอเรส

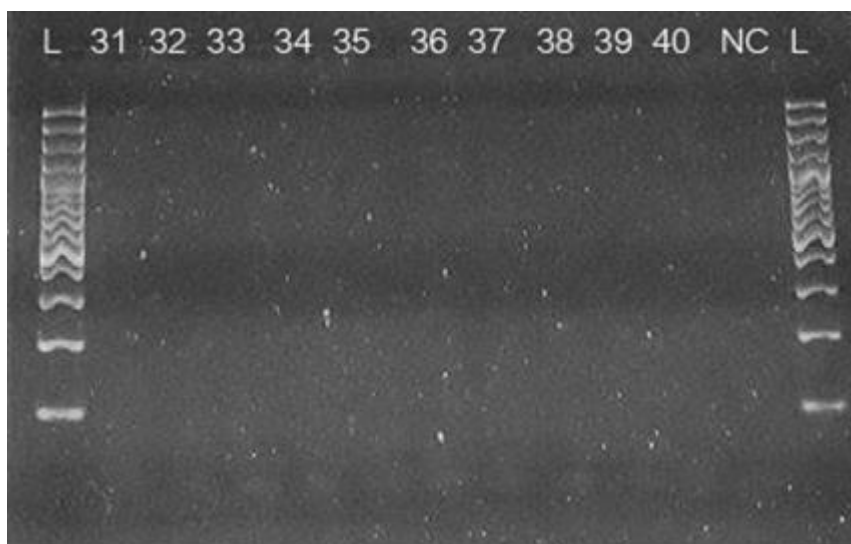
การทดสอบหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, และ *bla*_{OXA-58} ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase ซึ่งเป็นยีนที่มีการรายงานการตรวจพบบ่อยในเชื้อ *A. baumannii* โดยการศึกษาหาความชุกของยีนทั้ง 4 ด้วยปฏิกริยาถูกลูโซพอลิเมอเรส โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษาและนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบโดยการอาศัยการเคลื่อนที่ในวุ้นซึ่งเป็นตัวกลาง (Agarose gel) และใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวเร่งให้เกิดการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก (Electrophoresis) หากผลผลิตที่ได้มีขนาดเล็ก จะสามารถเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าผลผลิตขนาดใหญ่ จากนั้นจึงนำวุ้นซึ่งเป็นตัวกลางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต มาทำการตรวจสอบได้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง Chemidoc XRS ทำให้ได้ภาพของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต สำหรับยีนทั้ง 4 ได้แก่ *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, และ *bla*_{OXA-58} จะมีขนาดผลผลิตขนาด 501, 246, 353 และ 599 คู่เบส ตามลำดับ โดยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 100 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบให้ผลบวกกับยีน *bla*_{OXA-23} และ *bla*_{OXA-51} คิดเป็นร้อยละ 97 (97/100) และ 100 (100/100) ตามลำดับ แต่ไม่พบยีน *bla*_{OXA-24} และ *bla*_{OXA-58} ในการทดสอบกับเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ โดยยีน *bla*_{OXA-23} และ *bla*_{OXA-51} ที่ให้ผลบวกกับปฏิกริยาถูกลูโซพอลิเมอเรส จะคัดเลือกแบบสุ่มมาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อยืนยันผลบวกของยีนทั้งสอง พบว่าเป็นยีน *bla*_{OXA-23} และ *bla*_{OXA-51} จริง

การทดสอบหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23} โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในการทดสอบ และใช้ไพรเมอร์ OXA-23F; GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA OXA-23R; ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT ในการทำปฏิกิริยา ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยานั้นจะมีขนาดเท่ากับ 501 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.4



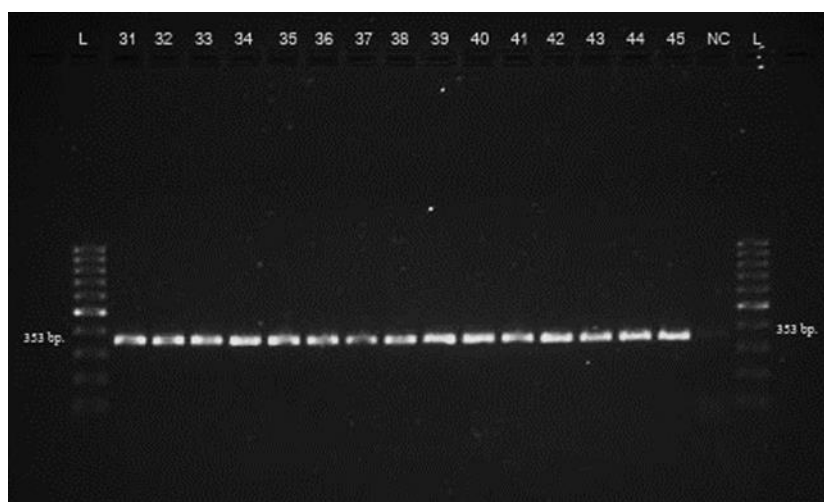
รูปที่ 4.4 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23} ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ จากรูปแถวที่ 1 และ 18 L คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2-16 โดยที่ 31-45 คือหมายเลขตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบ แถวที่ 17 NC คือ ตัวควบคุมลบ (Negative Control) โดยตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบให้ผลบวกทั้งหมดเกิดผลผลิตขนาดเท่ากับ 501 คู่เบส

การทดสอบหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-24} โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการทดสอบ และใช้ไพรเมอร์ OXA-24F; GGA ATG TTG GCC CCC TTA AA และ OXA-24R; AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 4.5



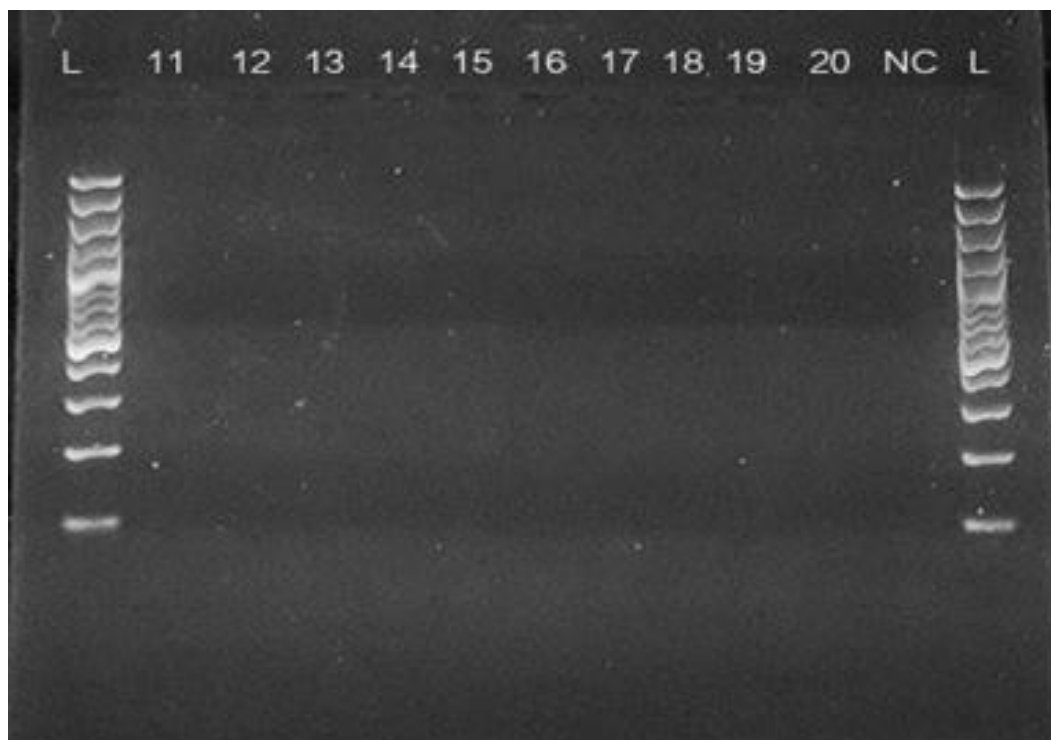
รูปที่ 4.5 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-24} ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากรูปแถวที่ 1 และ 13 L คือ Ladder 100 คู่เบส โดยแถวที่ 2-11 นั้น 31-40 คือหมายเลขตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบ แถวที่ 12 NC คือ ตัวควบคุมลบ (Negative Control) โดยตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบให้ผลลบทั้งหมด

การทดสอบหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-51} โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในการทดสอบ และใช้ไพรเมอร์ OXA-51F; TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG OXA-51R; TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG ในการทำปฏิกิริยา ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยานั้นจะมีขนาดเท่ากับ 353 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-51} ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ จากรูปแถวที่ 1 และ 18 L คือ Ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2-16 โดยที่ 31-45 คือหมายเลขตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบ แถวที่ 17 NC คือ ตัวควบคุมลบ (Negative Control) โดยตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบให้ผลบวกทั้งหมดเกิดผลผลิตขนาดเท่ากับ 353 คู่เบส

การทดสอบหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-58} โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการทดสอบ และใช้ไพรเมอร์ OXA-58F; AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG และ OXA-58R; CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 4.7



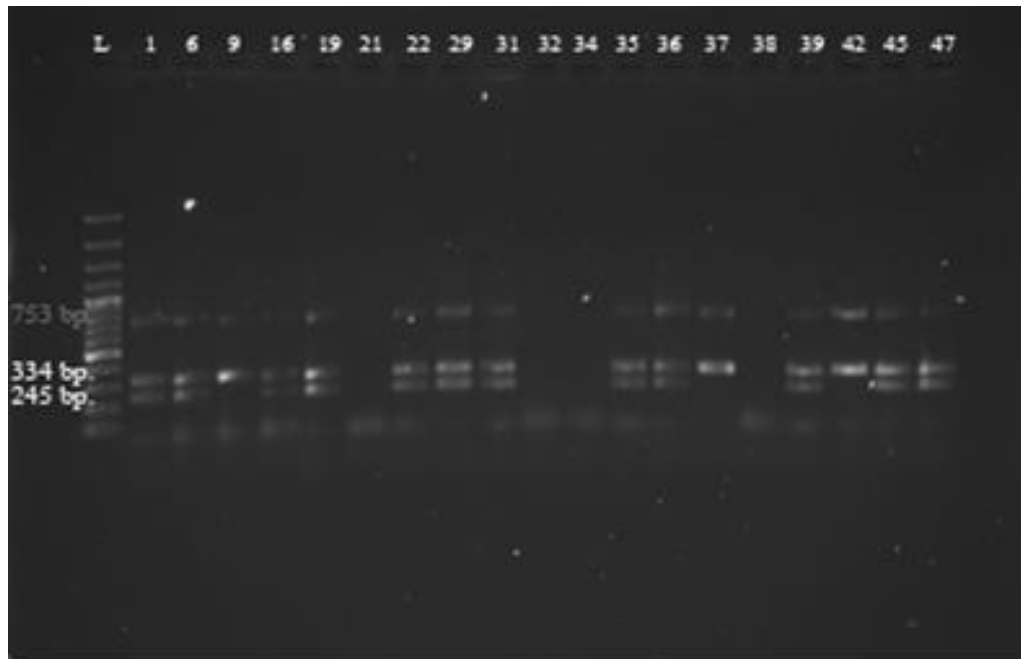
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.7 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-58} ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากรูปแถวที่ 1 และ 13 L คือ Ladder 100 คู่เบส โดยแถวที่ 2-11 นั้น 11-20 คือหมายเลขตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบ แถวที่ 12 NC คือ ตัวควบคุมลบ (Negative Control) โดยตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบให้ผลลบทั้งหมด

4. ผลการทดสอบหาความชุกของ class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Class1 Integron เป็น integron ที่พบมากที่สุด ในแบคทีเรียแกรมลบรวมทั้งเชื้อ *A. baumannii* โดยได้ทำการศึกษายีน *Int1*, *Sul1* และ *qacEΔ1* โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 3 คู่ลงไปในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน เพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex Polymerase Chain Reaction) จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบโดยอาศัยการเคลื่อนที่ในวุ้นซึ่งเป็นตัวกลาง (Agarose gel) และใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวเร่งให้เกิดการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก (Electrophoresis) หากผลผลิตที่ได้มีขนาดเล็ก จะสามารถเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าผลผลิตขนาดใหญ่ จากนั้นจึงนำวุ้นซึ่งเป็นตัวกลางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตมาทำการตรวจสอบได้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง Chemidoc XRS จะเห็นภาพของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต โดยยีนทั้งสามนั้น ได้แก่ ยีน *Int1*, *Sul1* และ *qacEΔ1* จะมีผลผลิตขนาด 753, 334 และ 245 คู่เบส ตามลำดับ

การทดสอบหาความชุกของ class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ของยีน ทั้งสามกับเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ พบว่า ยีน *Int1* ให้ผลบวกร้อยละ 23 (23/100) ยีน *Sul1* ให้ผลบวกร้อยละ 24 (24/100) และยีน *qacEΔ1* ให้ผลบวกร้อยละ 21 (21/100) โดยพบว่าความชุกของ class I Integron ที่พบผลบวกของทั้งสามยีนคิดเป็นร้อยละ 20 (20/100) พบผลบวกกับยีน *Int1* และ *sul1* แต่ให้ผลลบกับยีน *qacEΔ1* ร้อยละ 3 (3/100) พบผลบวกกับยีน *sul1* และ *qacEΔ1* ให้ผลลบกับยีน *Int1* ร้อยละ 1 (1/100) โดยยีน class I Integron ที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะคัดเลือกแบบสุ่มมาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อยืนยันผลบวกของยีนทั้งสอง พบว่าเป็นยีน class I Integron จริง ทั้งยีน *Int1*, *sul1* และ *qacEΔ1*



รูปที่ 4.8 แสดงภาพของ 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลการหาความชุกของยีน class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสได้แก่ ยีน *Int1*, *Sul1* และยีน *qacEΔ1* ซึ่งมีผลผลิตขนาด 753, 334 และ 245 คู่เบส ตามลำดับ โดยแถวที่ 1 L คือ Ladder 100 คู่เบส โดยแถวที่ 2-20 คือหมายเลขตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบ

พบผลบวกทั้งสามยีนในแถวที่ 2, 3, 5, 6, 8-10, 13, 14, 17, 19 และ 20 ได้แก่ เชื้อ *A. baumannii* หมายเลข 1, 6, 16, 19, 22, 29, 31, 35, 36, 39, 45 และ 47 ตามลำดับ ผลบวกกับยีน *Int1* และ *Sul1* ในแถวที่ 4, 15 และ 18 ได้แก่ เชื้อ *A. baumannii* หมายเลข 9, 37 และ 42 ตามลำดับ

ผลลบทั้งสามยีน class I Integron ในแถวที่ 7, 11, 12, และ 16 ได้แก่ เชื้อ *A. baumannii* หมายเลข 21, 32, 34 และ 38 ตามลำดับ

5. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการทดสอบหาความชุกของยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} และ Class I Integron

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อทั้งหมดเป็นเชื้อดื้อยาหลายชนิด เนื่องจากมีการดื้อยามากกว่า 2 กลุ่มที่ทำการทดสอบ และเมื่อนำรูปแบบการดื้อยามาจัดเรียงทำให้พบความหลากหลายสามารถจำแนกได้เป็น 12 รูปแบบ ตามตารางที่ 4.1 และนำเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์มาหาความชุกของยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} และ Class I Integron เมื่อนำผลทั้งสองส่วนมาทำการหาความสัมพันธ์ พบว่าเชื้อในรูปแบบดื้อยาเดียวกันอาจให้ผลยีนที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 4.2

รูปแบบยาที่ 1 เป็นรูปแบบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทำการทดสอบทุกชนิด ในรูปแบบนี้ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 72 สายพันธุ์ โดย 55 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} แต่ให้ผลลบกับ Class I Integron คิดเป็นร้อยละ 76.39 (55/72) ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} bla_{OXA-51} และ Class I Integron 16 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 22.22 (16/72) มีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่ให้ผลบวกกับ bla_{OXA-51} เพียงยีนเดียว คิดเป็นร้อยละ 1.39 (1/72)

รูปแบบยาที่ 2 มีขนาดรองลงมา ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 7 สายพันธุ์ โดยดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทำการทดสอบทุกชนิด ยกเว้น Ampicillin/Sulbactam ที่ให้ผลกำกึ่ง โดย 4 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} ให้ผลลบกับ Class I Integron คิดเป็นร้อยละ 57.14 (4/7) ส่วน 3 สายพันธุ์ที่เหลือให้ผลบวกยีน bla_{OXA-23} bla_{OXA-51} และ Class I Integron คิดเป็นร้อยละ 42.86 (3/7)

รูปแบบยาที่ 3, 4, 8, 10 และ 11 เป็นรูปแบบที่ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 4, 2, 1, 3 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ ทั้ง 5 รูปแบบยานี้ให้ผลการทดสอบที่เหมือนกันคือให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} แต่ให้ผลลบกับ Class I Integron

รูปแบบยาที่ 5 และ 9 เป็นรูปแบบที่ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* รูปแบบละ 1 สายพันธุ์ ให้ผลเหมือนกันคือให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-51} และ Class I Integron

รูปแบบยาที่ 6 เป็นรูปแบบที่ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 4 สายพันธุ์ โดย 3 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} ให้ผลลบกับ Class I Integron ส่วนอีกหนึ่งสายพันธุ์ให้ผลบวกกับ bla_{OXA-51} เพียงยีนเดียว

รูปแบบยาที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 2 สายพันธุ์ โดย 1 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับ ยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} ไม่พบ Class I Integron ส่วนอีกหนึ่งสายพันธุ์ให้ผลบวกกับให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-51} และ Class I Integron

รูปแบบยาที่ 12 เป็นรูปแบบเพียงรูปแบบเดียวที่ไวต่อยาในกลุ่ม Carbapenems ได้แก่ยา Meropenem และ Imipenem ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-51} และ class I Integron



ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในรูปแบบต่างๆ กับผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23} , *bla*_{OXA-24} , *bla*_{OXA-51} , *bla*_{OXA-58} และยีนใน Class I Integron

รูปแบบยาที่ (จำนวนเชื้อ)	OXA-type Carbapenemase gene				Class I Integron gene	จำนวนเชื้อ
	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-58}		
1 (72)	+	-	+	-	-	55
	+	-	+	-	+	16
	-	-	+	-	-	1
2 (7)	+	-	+	-	-	4
	+	-	+	-	+	3
3 (4)	+	-	+	-	-	4
4 (2)	+	-	+	-	-	2
5 (1)	+	-	+	-	+	1
6 (4)	+	-	+	-	-	3
	-	-	+	-	-	1
7 (2)	+	-	+	-	-	1
	+	-	+	-	+	1
8 (1)	+	-	+	-	-	1
9 (1)	+	-	+	-	+	1
10 (3)	+	-	+	-	-	3
11 (2)	+	-	+	-	-	2
12 (1)	-	-	+	-	+	1

6. ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

การทดสอบหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ เนื่องจากเชื้อตัวอย่างทั้งหมดให้ผลบวกกับยีน *bla_{OXA-51}* โดยวิธี PFGE นี้อาศัยการแยกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เมื่อให้กระแสไฟฟ้า 2 ทิศทางที่ทำงานสลับกันในตัวกลางวุ้น จากนั้นจึงนำแผ่นวุ้นไปตรวจผลได้แสง Ultraviolet ทำให้ได้ภาพเจลที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดหลากหลาย จากนั้นจึงนำผลที่ได้มาทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยความเหมือนหรือความต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏในภาพ นำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม BioNumerics Version 7.5 (ได้รับอนุญาตทดลองใช้โปรแกรมฟรีเป็นเวลา 30 วัน) เปรียบเทียบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal ด้วยวิธี Dice coefficient และ Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ตั้งค่า optimize 1.5% และค่า Tolerance in the band position 1.5% โดยมีความเหมือนกัน (similarity) ตั้งแต่ร้อยละ 80 ขึ้นไป ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม Pulsotype เดียวกัน จากการทำ PFGE แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมดังกล่าว ทำให้สามารถแบ่งตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ ได้เป็น 18 กลุ่ม (pulsotype; PT) ดังนี้ (รูปที่ 4.9 และ รูปที่ 4.10)

กลุ่ม Pulsotype 1 (PT1) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 54 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 54 (54/100) ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 23, 24, 25, 32, 33, 34, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 65, 69, 70, 71, 73, 76, 80, 82, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 93, 94 และ 98

กลุ่ม Pulsotype 2 (PT2) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่มีขนาดรองลงมา ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 11 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 11 (11/100) ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 9, 35, 37, 39, 42, 45, 54, 61, 83, 96 และ 97

กลุ่ม Pulsotype 3 (PT3) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 6 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 6 (6/100) ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 5, 20, 26, 28, 30 และ 53

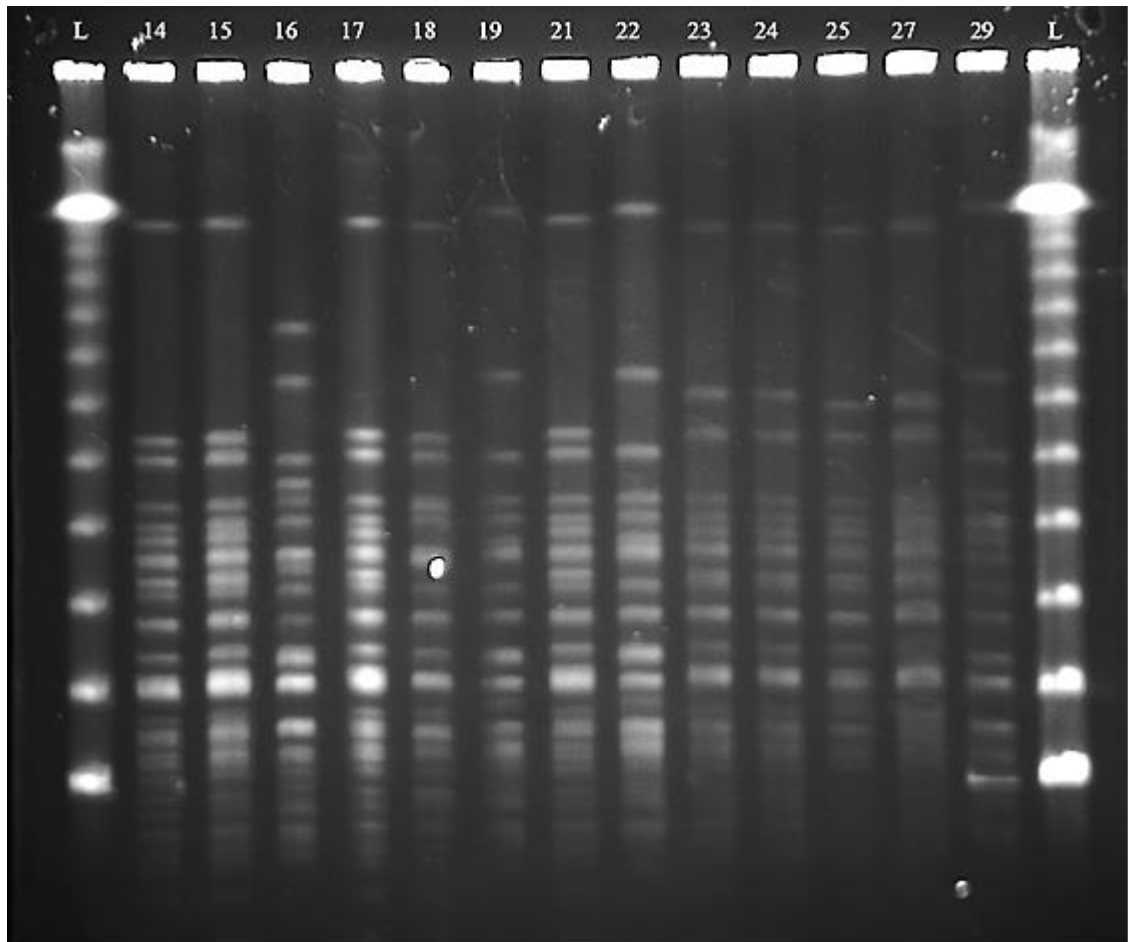
กลุ่ม Pulsotype 4 (PT4) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 5 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 5 (5/100) ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 16, 19, 22, 29 และ 47

กลุ่ม Pulsotype 5 (PT5) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 5 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 5 (5/100) ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 72, 75, 81, 99 และ 100

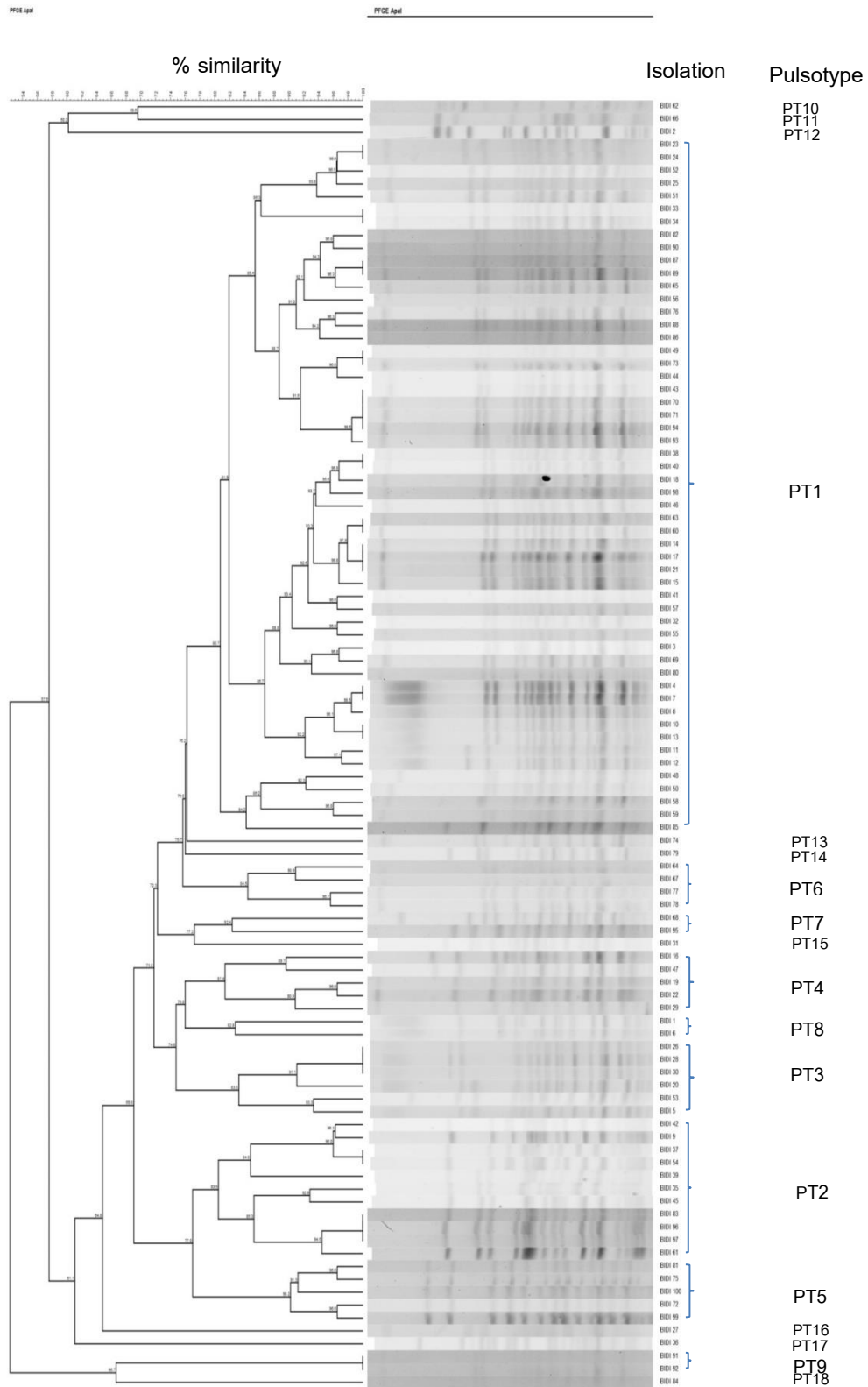
กลุ่ม Pulsotype 6 (PT6) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 4 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 4 (4/100) ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 64, 67, 77 และ 78

กลุ่ม Pulsotype 7, 8 และ 9 (PT7, PT8 และ PT9) นั้นประกอบประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* กลุ่ม PT ละ 2 สายพันธุ์ โดย PT7 ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 68 และ 95 PT8 ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 1 และ 6 PT9 ประกอบด้วยเชื้อตัวอย่างหมายเลข BIDI 91 และ 92

กลุ่ม Pulsotype 10-18 เป็นเชื้อตัวอย่างที่ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มกับเชื้อตัวอย่างอื่นๆได้เลย เมื่อใช้ความเหมือนของผลการทดสอบที่ร้อยละ 80 ขึ้นไป ได้แก่ PT10 (ตัวอย่าง BIDI 62), PT11 (ตัวอย่าง BIDI 66), PT12 (ตัวอย่าง BIDI 2), PT13 (ตัวอย่าง BIDI 74), PT14 (ตัวอย่าง BIDI 79), PT15 (ตัวอย่าง BIDI 31), PT16 (ตัวอย่าง BIDI 27), PT17 (ตัวอย่าง BIDI 36) และ PT18 (ตัวอย่าง BIDI 84)



รูปที่ 4.9 แสดงภาพถ่ายดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apal* ด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) แถวที่ 1 และ 15 โดย L คือ Lamda Ladder แถวที่ 2-14 คือตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii*



รูปที่ 4.10 แสดงการวิเคราะห์ผลการจัด Pulsotype ด้วยโปรแกรม BioNumerics Version 7.5 ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสายพันธุ์ 100 สาย

7. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ผลการทดสอบหาความชุกของยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} และยีนใน Class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และผลการหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม ด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

การหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-51} เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี PFGE สามารถแยกได้เป็น 18 Pulsotypes และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่าง Pulsotype รูปแบบยาความชุกของยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} และยีนใน Class I Integron และหอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.11 ดังนี้

Pulsotype 1 (PT1) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 54 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 54.00 (54/100) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน bla_{OXA-23} ร่วมกับยีน bla_{OXA-51} 53 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 98.14 (53/54) มีเพียง 1 สายพันธุ์ ร้อยละ 1.85 (1/54) พบยีน bla_{OXA-51} เพียงยีนเดียว ไม่พบ Class I Integron ใน PT1

ส่วนของการศึกษารูปแบบยานั้น ผลที่ได้คือเชื้อใน PT1 นี้ มีรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 7 รูปแบบ (จากตารางที่ 4.1) ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 44 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 81.48 (44/54) รูปแบบยาที่ 2 จำนวน 3 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 5.55 (3/54) รูปแบบยาที่ 3, 6 และ 8 จำนวนรูปแบบละ 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.85 (1/54) ส่วนรูปแบบยาที่ 4 และ 10 จำนวนรูปแบบละ 2 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 3.70 (2/54) ในแต่ละรูปแบบ

สำหรับหอผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT1 นี้ มาจากหอผู้ป่วย 6 แห่ง โดยพบจากตึกอายุรกรรม 5 มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ หอผู้ป่วยวิกฤติ ตึกพิเศษ ตึกอายุรกรรม 7 ผู้ป่วยนอก และหอผู้ป่วยศัลยกรรม คิดเป็น ร้อยละ 42.59 (23/54), 22.22 (12/54), 14.81 (8/54), 9.26 (5/54), 9.26 (5/54) และ 7.41 (4/54) ตามลำดับ

Pulsotype 2 (PT2) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่พบรองลงมาจาก PT1 ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 11 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 11.00 (11/100) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน bla_{OXA-23} ร่วมกับยีน bla_{OXA-51} ทุกสายพันธุ์ หรือร้อยละ 100.00 (11/11) นอกจากนี้ยังพบ Class I Integron ใน PT2 ทุกสายพันธุ์โดยพบร่วมกับยีน bla_{OXA-23} และยีน bla_{OXA-51}

ใน PT2 พบรูปแบบการดื้อยา 2 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 90.90 (10/11) พบรูปแบบที่ 2 เพียงหนึ่งสายพันธุ์คิดเป็น ร้อยละ 9.09 (1/11) สำหรับหอยผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT2 นี้ มาจากหอยผู้ป่วย 5 แห่ง โดยพบจากตึกอายุรกรรม 7 มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ตึกพิเศษแยกโรค หอยผู้ป่วยศัลยกรรม และผู้ป่วยนอกคิดเป็น ร้อยละ 45.45 (5/11), 27.27 (3/11), 9.09 (1/11) และ 9.09 (1/11) ตามลำดับ

Pulsotype 3 (PT3) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 6 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 6.00 (6/100) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla*_{OXA-23} ร่วมกับยีน *bla*_{OXA-51} 5 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 83.33 (5/6) ที่เหลือหนึ่งสายพันธุ์พบ Class I Integron ร่วมกับยีน *bla*_{OXA-23} และยีน *bla*_{OXA-51} คิดเป็น ร้อยละ 16.67 (1/6)

ใน PT3 พบรูปแบบการดื้อยา 2 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 83.33 (5/6) พบรูปแบบที่ 2 เพียงหนึ่งสายพันธุ์คิดเป็น ร้อยละ 16.67 (1/6) สำหรับหอยผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT3 นี้ มาจากหอยผู้ป่วย 3 แห่ง โดยพบจากหอยผู้ป่วยวิกฤติ มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ตึกอายุรกรรม 5 และตึกพิเศษแยกโรค คิดเป็น ร้อยละ 50.00 (3/6), 33.33 (2/6) และ 16.67 (1/6) ตามลำดับ

Pulsotype 4 (PT4) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 5 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 5.00 (5/100) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla*_{OXA-23} ร่วมกับยีน *bla*_{OXA-51} ทุกสายพันธุ์ หรือร้อยละ 100.00 (5/5) นอกจากนี้ยังพบ Class I Integron ใน PT4 ทุกสายพันธุ์โดยพบร่วมกับยีน *bla*_{OXA-23} และยีน *bla*_{OXA-51}

ใน PT4 พบรูปแบบการดื้อยา 3 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 60.00 (3/5) พบรูปแบบที่ 2 และ 9 เท่ากันคิดเป็นร้อยละ 20.00 (1/5) ในแต่ละรูปแบบ สำหรับหอยผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT4 นี้ มาจากหอยผู้ป่วย 3 แห่ง โดยพบจากตึกอายุรกรรม 5 และหอยผู้ป่วยวิกฤติ มากที่สุดโดยพบเท่ากันคิดเป็นร้อยละ 40.00 (2/5) ในแต่ละรูปแบบ รองลงมา ได้แก่ ตึกอายุรกรรม 7 คิดเป็นร้อยละ 20.00 (1/5)

Pulsotype 5 (PT5) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 5 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 5.00 (5/100) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla*_{OXA-23} ร่วมกับยีน *bla*_{OXA-51} ทุกสายพันธุ์ หรือร้อยละ 100.00 (5/5) ไม่พบ Class I Integron ใน PT5

ใน PT5 พบรูปแบบการดื้อยา 3 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 3 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 60.00 (3/5) พบรูปแบบที่ 10 และ 11 เท่ากันคิดเป็นร้อยละ 20.00 (1/5) ในแต่ละรูปแบบ สำหรับหอยผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT5 นี้ มาจากหอยผู้ป่วย 4 แห่ง โดยพบจากตึกอายุรกรรม 5 มากที่สุด

คิดเป็นร้อยละ 40.00 (2/5) รองลงมาพบเท่ากันทั้งสามหอผู้ป่วย ได้แก่ หอผู้ป่วยวิกฤติ ตึกศัลยกรรม และผู้ป่วยนอกคิดเป็นร้อยละ 20.00 (1/5) ในแต่ละหอผู้ป่วย

Pulsotype 6 (PT6) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 4 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 4.00 (4/100) เมื่อนำมาศึกษาความซุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla_{OXA-23}* ร่วมกับยีน *bla_{OXA-51}* 3 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 75.00 (3/4) มีเพียง 1 สายพันธุ์ ร้อยละ 25.00 (1/4) พบยีน *bla_{OXA-51}* เพียงยีนเดียว ไม่พบ Class I Integron ใน PT6

ใน PT6 พบรูปแบบการดื้อยา 2 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 6 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 75.00 (3/4) 83.33 (5/6) พบรูปแบบที่ 2 เพียงหนึ่งสายพันธุ์คิดเป็น ร้อยละ 25.00 (1/4) สำหรับหอผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT6 นี้ มาจากหอผู้ป่วย 2 แห่ง โดยพบจากหอผู้ป่วยวิกฤติและตึกพิเศษ เท่ากันคิดเป็น ร้อยละ 50 (2/4) ในแต่ละหอผู้ป่วย

Pulsotype 7 (PT7) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 2.00 (2/100) เมื่อนำมาศึกษาความซุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla_{OXA-23}* ร่วมกับยีน *bla_{OXA-51}* 1 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 50.00 (1/2) และพบ Class I Integron ใน PT7 โดยพบร่วมกับยีน *bla_{OXA-23}* และยีน *bla_{OXA-51}* จำนวน 1 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 50.00 (1/2)

ใน PT7 พบรูปแบบการดื้อยา 2 รูปแบบเท่ากันๆ คือ รูปแบบที่ 1 และรูปแบบที่ 7 คิดเป็นรูปแบบละ ร้อยละ 50 (1/2) สำหรับหอผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT7 นี้ มาจากหอผู้ป่วย 2 แห่ง โดยพบจากตึกอายุรกรรม 5 และหอผู้ป่วยวิกฤติ เท่ากันคิดเป็น ร้อยละ 50 (1/2) ในแต่ละหอผู้ป่วย

Pulsotype 8 (PT8) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 2.00 (2/100) เมื่อนำมาศึกษาความซุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla_{OXA-23}* ร่วมกับยีน *bla_{OXA-51}* ทุกสายพันธุ์ หรือร้อยละ 100.00 (2/2) นอกจากนี้ยังพบ Class I Integron ใน PT8 ทุกสายพันธุ์โดยพบร่วมกับยีน *bla_{OXA-23}* และยีน *bla_{OXA-51}*

ใน PT8 พบรูปแบบการดื้อยาเพียงรูปแบบเดียวคือรูปแบบที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 100.00 (2/2) และมาจากตึกอายุรกรรม 5 ทุกสายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 100.00 (2/2)

Pulsotype 9 (PT9) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 2.00 (2/100) เมื่อนำมาศึกษาความซุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla_{OXA-23}* ร่วมกับยีน *bla_{OXA-51}* ทุกสายพันธุ์ หรือร้อยละ 100.00 (2/2) ไม่พบ Class I Integron ใน PT9 พบรูปแบบการดื้อยาเพียงรูปแบบเดียวคือรูปแบบที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 100.00 (2/2) โดยมาจากหอผู้ป่วย 2 แห่ง ได้แก่ ตึกอายุรกรรม 5 และหอผู้ป่วยวิกฤติ เท่ากันคิดเป็น ร้อยละ 50 (1/2) ในแต่ละหอผู้ป่วย

Pulsotype10-18 (PT10-18) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 9 สายพันธุ์ หรือ ร้อยละ 9.00 (9/100) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีน OXA-type Carbapenemase พบยีน *bla*_{OXA-23} ร่วมกับยีน *bla*_{OXA-51} จำนวน 6 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 66.67 (6/9) พบ *bla*_{OXA-51} ร่วมกับ Class I Integron จำนวน 1 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 11.11 (1/9) และพบยีน *bla*_{OXA-23} ยีน *bla*_{OXA-51} ร่วมกับ Class I Integron จำนวน 2 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 22.22 (2/9)

PT10-18 พบรูปแบบการดื้อยา 5 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 55.56 (5/9) พบรูปแบบที่ 2, 7, 11 และ 12 เท่ากันคิดเป็นร้อยละ 11.11 (1/9) ในแต่ละรูปแบบ ใน PT10-18 มาจากหอผู้ป่วย 4 แห่ง โดยพบจากตึกอายุรกรรม 5 และหอผู้ป่วยวิกฤติเท่ากัน คิดเป็น ร้อยละ 33.33 (3/9) ในแต่ละหอผู้ป่วย รองลงมาคือผู้ป่วยนอก และตึกอายุรกรรม 7 คิดเป็นร้อยละ 22.22 (2/9) และ 11.11 (1/9) ตามลำดับ



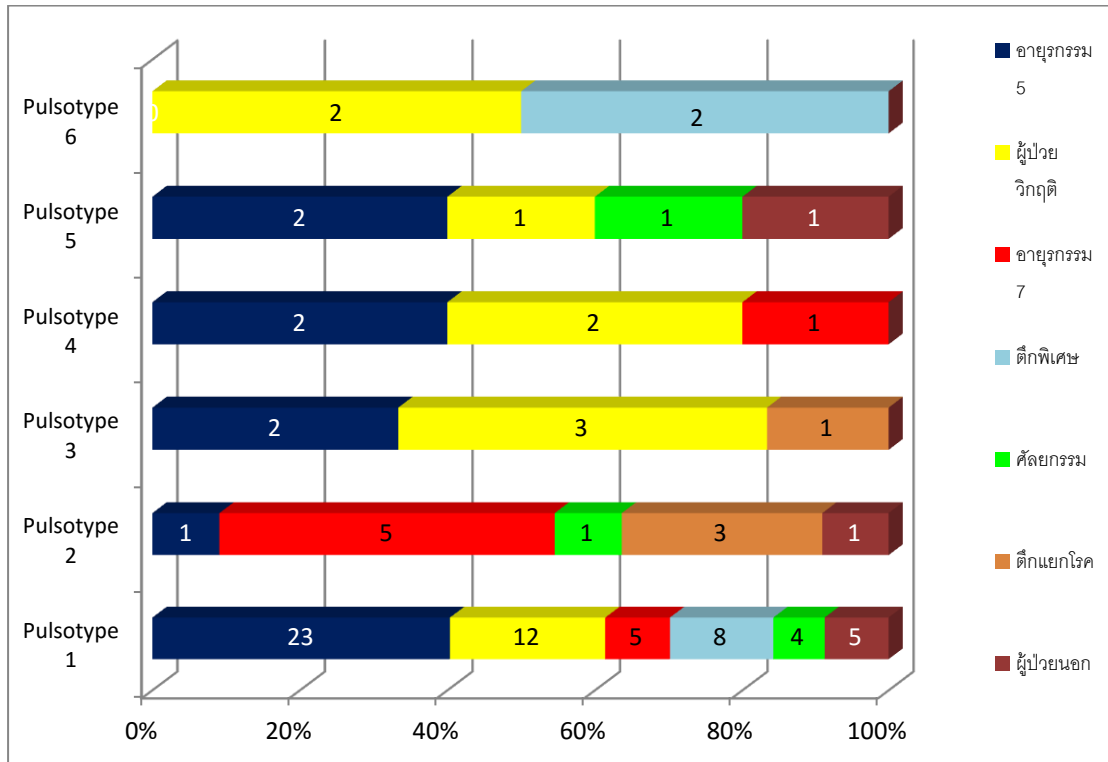
ตารางที่ 4.3 แสดงผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* 100 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) พิจารณาร่วมกับรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการหาความชุกของยีน *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} และ Class I Integron และหอผู้ป่วยที่ส่งตรวจตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการ



Pulsotype (จำนวน)	ยีน		รูปแบบยา (จำนวนตัวอย่าง)	หอผู้ป่วย (จำนวนตัวอย่าง)
	ยีน	จำนวน (%)		
1 (54)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	53 (98.14%)	1(43), 2(3), 3(1), 4(2), 6(1), 8(1), 10(2)	A(23), B(12), C(4), D(8), E(4), G(5)
	<i>bla</i> _{OXA-51}	1 (1.85%)	1(1)	C(1)
	รวม	54/100 (54.00%)	1(44) , 2(3), 3(1), 4(2), 6(1), 8(1), 10(2)	A(23), B(12), C(5), D(8), E(4), G(5)
2 (11)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51} Class I Integron	11 (100.00%)	1(10), 2(1)	A(1), C(5), E(1), F(3), G(1)
3 (6)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	5 (83.33%)	1(5)	A(2), B(3)
	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51} Class I Integron	1 (16.67%)	5(1)	F(1)
	รวม	6 (6.00%)	1(5), 5(1)	A(2), B(3), F(1)
4 (5)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51} Class I Integron	5 (100%)	1(3), 2(1), 9(1)	A(2), B(2), C(1)
5 (5)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	5 (100%)	3(3), 10(1), 11(1)	A(2), B(1), E(1), G(1)
6 (4)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	3 (75%)	2(1), 6(2)	B(1), D(2)
	<i>bla</i> _{OXA-51}	1 (25%)	6(1)	B(1)
	รวม	4/100 (4.00%)	2(1), 6(3)	B(2), D(2)
7 (2)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51} Class I Integron	1 (50%)	7(1)	B(1)
	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	1 (50%)	1(1),	A(1)
	รวม	2/100 (2.00%)	1(1), 7(1)	A(1), B(1)
8 (2)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51} Class I Integron	2 (100%)	1(2)	A(2)
9 (2)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	2 (100%)	1(2)	A(1), B(1)
10-18(9)	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	6(%)	1(4), 7(1), 11(1)	A(3), B(2), G(1)
	<i>bla</i> _{OXA-51} + Class I Integron	1 (%)	12(1)	C(1)
	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51} Class I Integron	2 (%)	1(1), 2(1)	B(1), G(1)
	รวม	9/100 (9.00%)	1(5),2(1),7(1),11(1),12(1)	A(3), B(3), C(1), G(2)

ใช้ตัวย่อของหอผู้ป่วยดังนี้ A คือ ตึกอายุรกรรม5 B คือ หอผู้ป่วยวิกฤติ C คือตึกอายุรกรรม 7 D คือ ตึกพิเศษ E คือหอผู้ป่วยศัลยกรรม F คือตึกพิเศษแยกโรค และ G คือผู้ป่วยนอกโดยเมื่อนำหอผู้ป่วย ณ วันส่งที่ส่งตัวอย่าง

Pulsotype ที่พบมากที่สุดได้แก่ PT 1-6 ของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด มาหาความสัมพันธ์พบแสดงดังรูป



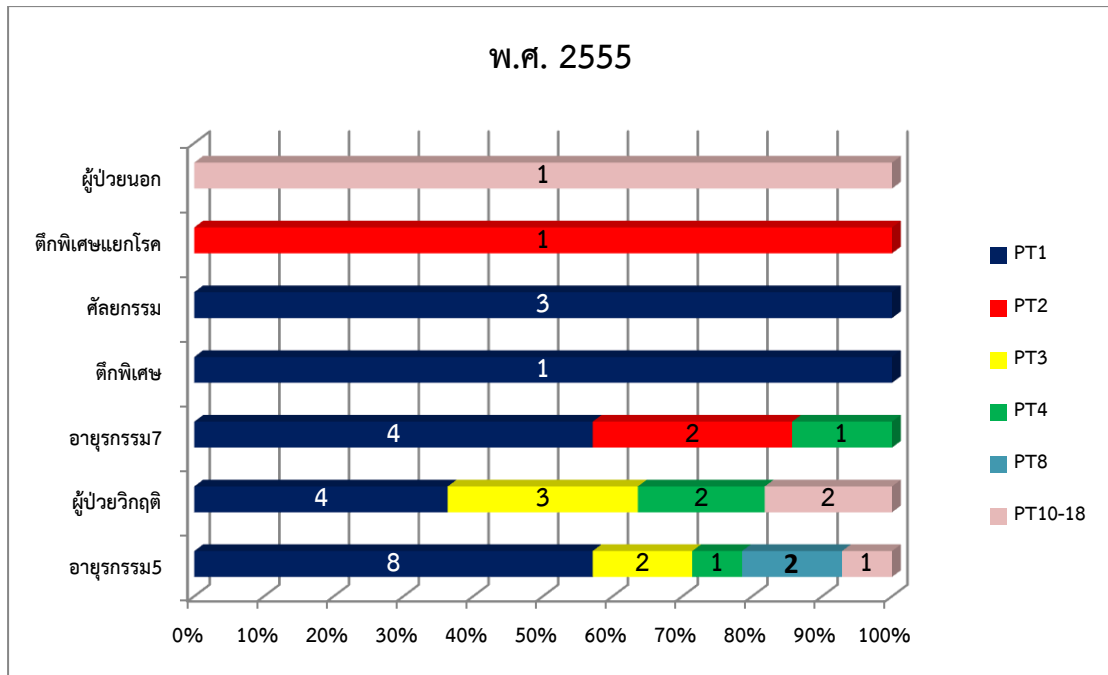
รูปที่ 4.11 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดใน Pulsotype 1-6 และหอผู้ป่วย ณ วันส่งที่ส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการ

8. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและหอผู้ป่วย ทำการศึกษาแยกในแต่ละปี

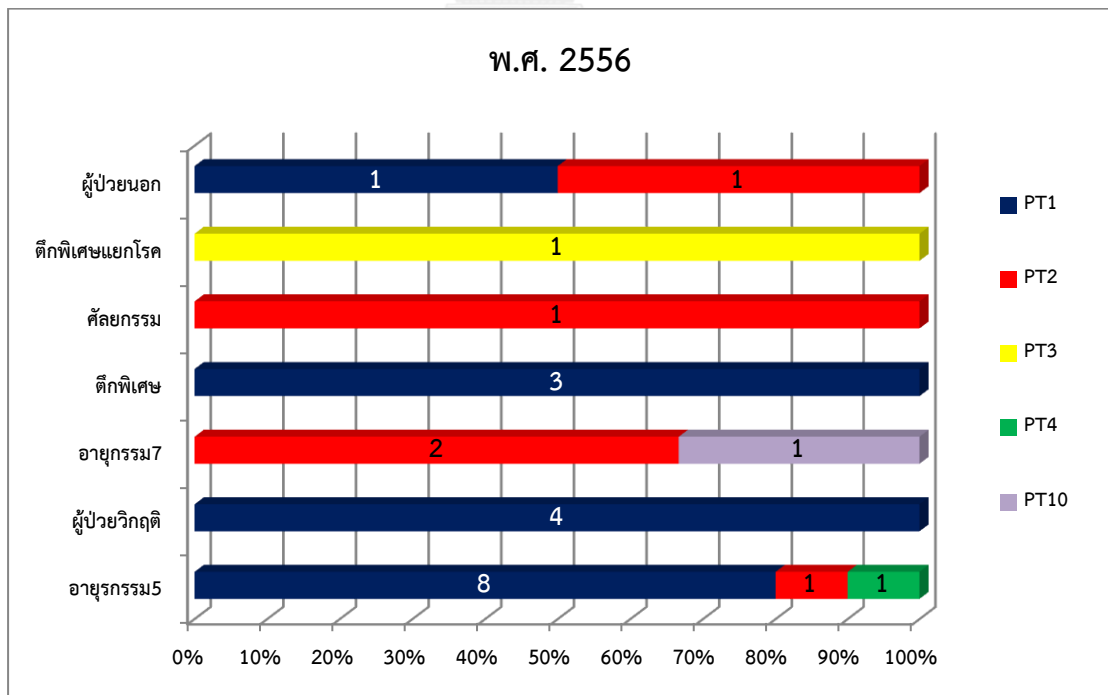
เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม และหอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ โดยแยกในแต่ละปี พ.ศ. ดังนี้ พ.ศ. 2555 แสดงในรูปที่ 4.12 พ.ศ. 2556 แสดงในรูปที่ 4.13 และพ.ศ. 2557-2558 แสดงในรูปที่ 4.14 สามารถสรุปได้ดังนี้

ในปี พ.ศ. 2555 เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ที่เก็บได้มีทั้งหมด 38 สายพันธุ์ พบ PT1 เป็น PT หลักที่พบมากที่สุด ร้อยละ 52.63 (20/38) รองลงมาคือ PT3 และ PT4 ร้อยละ 13.16 (5/38) และ 10.53 (4/38) ตามลำดับ ปี พ.ศ. 2556 เชื้อที่เก็บได้มีทั้งหมด 24 สายพันธุ์ พบ PT1 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 66.67 (16/24) รองลงมาคือ PT2 ร้อยละ 20.83 (5/24) ส่วน พ.ศ. 2557-2558 เชื้อที่เก็บได้มีทั้งหมด 38 สายพันธุ์ พบ PT1 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 47.37 (18/38) รองลงมาคือ PT5, PT6 และ PT2 คิดเป็นร้อยละ 13.16 (5/38), 10.53 (4/38) และ 7.89 (4/38) ตามลำดับ

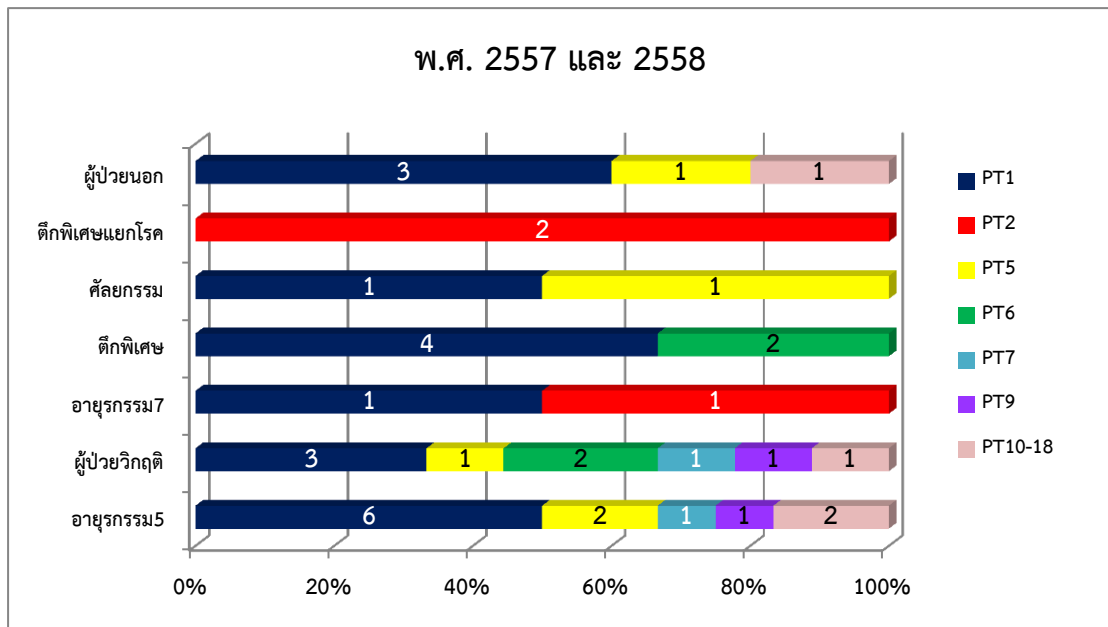
เมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม และหอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2558 พบว่าตึกอายุรกรรม 5 พบ PT1 มากที่สุดในทุกปีโดยแต่ละปีพบมากกว่าร้อยละ 50 ในตึกผู้ป่วยวิกฤติพบว่าในปี พ.ศ. 2556 พบ PT1 เพียง PT เดียว ส่วนในปี พ.ศ. 2555 และ 2557-2558 พบ PT1 มากที่สุด และพบ PT อื่นๆด้วย ได้แก่ PT 3, PT 4, PT 6 เป็นต้น สำหรับตึกอายุรกรรม 7 พบว่าในปี พ.ศ. 2555 พบ PT1 มากที่สุด รองลงมาคือ PT 2 และ PT 4 ปี พ.ศ. 2556 ไม่พบ PT1 พบแต่ PT 2 และ PT 10 และ ปี พ.ศ. 2557-2558 พบ PT 1 และ PT 2 สำหรับตึกพิเศษพบ PT1 มากที่สุดในทุกปีเหมือนกับตึกอายุรกรรม 5 โดยพบว่าในปี พ.ศ. 2555-2556 พบแต่ PT1 เท่านั้น สำหรับตึกศัลยกรรมพบว่าในปี พ.ศ. 2555 พบแต่ PT1 เท่านั้น ส่วน พ.ศ. 2556 พบแต่ PT2 เท่านั้น พ.ศ. 2557-2558 พบ PT 1 และ PT 5 สำหรับตึกพิเศษแยกโรคไม่พบ PT1 ที่เป็น PT หลักที่พบในทุกหอผู้ป่วย โดยพบ PT2 ในปี พ.ศ. 2555 และ พ.ศ. 2557-2558 ส่วนปี พ.ศ. 2556 พบ PT3 โดยผู้ป่วยนอกจะพบ PT 1, PT2, PT5 และ PT10-18



รูปที่ 4.12 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จำนวน 38 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2555 และหอผู้ป่วย



รูปที่ 4.13 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จำนวน 24 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2556 และหอผู้ป่วย



รูปที่ 4.14 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จำนวน 38 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2557-2558 และหอผู้ป่วย

9. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและชนิดสิ่งส่งตรวจ

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของ เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดจำนวน 100 ตัวอย่าง กับชนิดสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ เสมหะ ปัสสาวะ น้ำล้างปอด น้ำล้างหลอดลม หนองจากแผล ซึ้นเนื้อ และเลือด สามารถสรุปได้ดังแสดงในรูปที่ 4.15

PT 1 เป็นรูปแบบที่มีจำนวนตัวอย่างมากที่สุดคือ 54 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 54 (54/100) โดยพบว่ามาจากเสมหะมากที่สุดร้อยละ 66.60 (36/54) รองลงมาคือ ปัสสาวะ และเลือดพบ ร้อยละ 24.07 (13/54) และ 3.70 (2/54) ตามลำดับ ส่วนน้ำล้างปอด หนองจากแผล ซึ้นเนื้อ พบอย่างละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.85 (1/54)

PT 2 และ PT 6 มาจากสิ่งส่งตรวจ 3 ชนิด ได้แก่ เสมหะ ปัสสาวะ และหนองจากแผล โดย PT 2 พบว่ามาจากเสมหะมากที่สุดร้อยละ 72.72 (8/11) รองลงมาคือปัสสาวะ และหนองจากแผล พบ ร้อยละ 18.18 (2/11) และ 9.09 (1/11) ตามลำดับ ส่วน PT 6 มาจากเสมหะมากที่สุดเช่นกันพบ ร้อยละ 50.00 (2/4) รองลงมาคือปัสสาวะ และหนองจากแผลพบอย่างละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.00 (1/4)

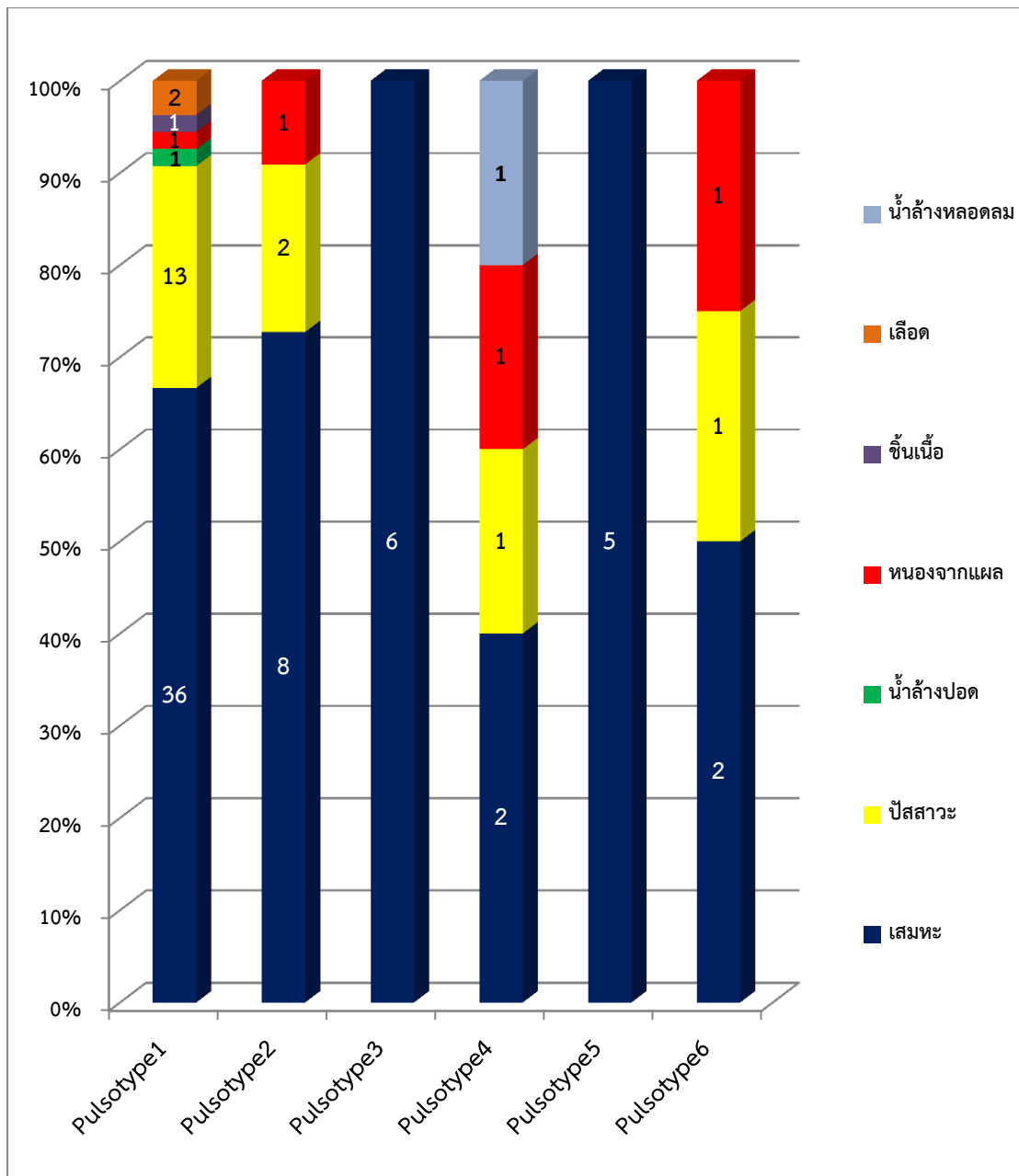
PT 3, PT 5 และ PT 9 พบว่ามาจากสิ่งส่งตรวจชนิดเดียว คือเสมหะ

PT 4 พบว่ามาจากเสมหะมากที่สุดร้อยละ 40.00 (2/5) รองลงมาคือปัสสาวะ น้ำล้างหลอดลมและหนองจากแผล โดยพบอย่างละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.00 (1/5)

PT 7 มาจากเสมหะและปัสสาวะอย่างละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.00 (1/2)

PT 8 มาจากปัสสาวะและหนองจากแผลอย่างละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.00 (1/2)

PT 10-18 เป็น PT ที่ไม่สามารถจัดรูปแบบเข้ากับรูปแบบอื่นๆได้ ประกอบด้วยเสมหะ ร้อยละ 66.67 (6/9) และปัสสาวะร้อยละ 33.33 (3/9)



รูปที่ 4.15 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดใน Pulsotype1-6 และชนิดสิ่งส่งตรวจ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดจำนวน 100 สายพันธุ์ เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2558 โดยส่วนใหญ่มาจากเสมหะร้อยละ 65 (65/100) ปัสสาวะร้อยละ 22 (22/100) หนองจากแผลร้อยละ 5 (5/100) เลือดร้อยละ 4 (4/100) ชิ้นเนื้อร้อยละ 2 (2/100) น้ำล้างปอดร้อยละ 1 (1/100) และ น้ำจากการเจาะหลอดลมร้อยละ 1 (1/100) โดยตัวอย่างเก็บได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาและพักฟื้นในหอผู้ป่วยภายในสถาบันฯ ร้อยละ 92 (92/100) และเก็บได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาแต่ไม่ได้พักฟื้นที่หอผู้ป่วยร้อยละ 8 (8/100)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion ทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะจำนวน 10 ชนิด พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีอัตราดื้อยาร้อยละ 99 กับยา Meropenem และ Imipenem ที่อยู่ในกลุ่ม Carbapenems และพบว่ามียัตราดื้อยา กลุ่ม β -lactam ได้แก่ Piperacillin, Cefotaxime, Ceftazidime และ Cefepime ร้อยละ 100, 100, 100 และ 98 ตามลำดับ และ Ampicillin/Sulbactam (SAM) ซึ่งเป็นยากกลุ่ม β -lactam ที่เพิ่มสารยับยั้งเอนไซม์ β -Lactamase พบว่าเชื้อมียัตราดื้อยาร้อยละ 83 ส่วนยากกลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ยา Amikacin และ Gentamycin พบว่าเชื้อมียัตราดื้อยาร้อยละ 81 และ 88 ตามลำดับ ยากกลุ่ม Quinolone ได้แก่ยา Ciprofloxacin พบว่ามียัตราดื้อยาร้อยละ 99 เมื่อนำผลจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะมาจัดเป็นหมวดหมู่สามารถแบ่งออกได้ทั้งหมด 12 รูปแบบ โดยรูปแบบที่ว่ามีมากที่สุดคือรูปแบบที่ 1 ร้อยละ 72 (72/100) ซึ่งดื้อต่อยาทุกชนิดที่ทำการทดสอบ และพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ทั้งหมดเป็นเชื้อดื้อยาหลายชนิด เนื่องจากมีการดื้อยามากกว่า 2 กลุ่มที่ทำการทดสอบ

การทดสอบหาความชุกของยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , และ bla_{OXA-58} ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase ซึ่งเป็นยีนที่มีการรายงานการตรวจพบบ่อยในเชื้อ *A. baumannii* โดยการศึกษาความชุกของยีนทั้ง 4 ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 100 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} คิดเป็นร้อยละ 97 (97/100) และ 100 (100/100) ตามลำดับ แต่ไม่พบยีน bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-58}

การทดสอบหาความชุกของ Class1 Integron เป็น integron ที่พบมากที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้งเชื้อ *A. baumannii* โดยได้ทำการศึกษายีน *Int1*, *Sul1* และ *qacEΔ1* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex Polymerase Chain Reaction) พบว่า ยีน *Int1* ให้ผลบวกร้อยละ 23 (23/100) ยีน *Sul1* ให้ผลบวกร้อยละ 24 (24/100) และยีน *qacEΔ1* ให้ผลบวกร้อยละ 21 (21/100) โดยพบว่าความชุกของ class I Integron ที่พบผลบวกของทั้งสามยีนคิดเป็นร้อยละ 20 (20/100) พบผลบวกกับยีน *Int1* และ *sul1* แต่ให้ผลลบกับยีน *qacEΔ1* ร้อยละ 3 (3/100) พบผลบวกกับยีน *sul1* และ *qacEΔ1* ให้ผลลบกับยีน *Int1* ร้อยละ 1 (1/100)

ผลการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการทดสอบหาความชุกของยีน *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* และ Class I Integron พบว่า เชื้อส่วนมากให้ผลรูปแบบยาแบบที่ 1 คือ ตื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิดที่ทำการทดสอบ ในรูปแบบนี้ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 72 สายพันธุ์ โดย 55 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับยีน *bla_{OXA-23}* และ *bla_{OXA-51}* แต่ไม่พบ Class I Integron คิดเป็นร้อยละ 76.39 (55/72) ให้ผลบวกกับยีน *bla_{OXA-23}* *bla_{OXA-51}* และ Class I Integron 16 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 22.22 (16/72) มีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่ให้ผลบวกกับ *bla_{OXA-51}* เพียงยีนเดียว คิดเป็นร้อยละ 1.39 (1/72) ส่วน รูปแบบยาที่ 12 เป็นรูปแบบเพียงรูปแบบเดียวที่ไวต่อยาในกลุ่ม Carbapenems ได้แก่ยา Meropenem และ Imipenem ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับยีน *bla_{OXA-51}* และ class I Integron

การทดสอบหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ใน *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioNumerics Version 7.5 สามารถแบ่งตัวอย่างได้เป็น 18 pulsotypes โดย Pulsotype 1 เป็นกลุ่ม pulsotype ที่ใหญ่ที่สุด คือประกอบด้วย 54 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 54 (54/100) กลุ่มที่มีขนาดใหญ่รองลงมาคือ Pulsotype 2 ซึ่งประกอบด้วย 11 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 11 (11/100) กลุ่ม Pulsotype 3, 4, 5 และ 6 ประกอบด้วยกลุ่มละ 6, 5, 5 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ ส่วน Pulsotype 7- 9 เป็นกลุ่มเล็กๆ ประกอบด้วยกลุ่มละ 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมี Pulsotype 10-18 ประกอบด้วยตัวอย่างเชื้อกลุ่มละ 1 สายพันธุ์ ซึ่งตัวอย่างทั้ง 9 สายพันธุ์ ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มกับตัวอย่างอื่นๆได้เลย เมื่อใช้ความเหมือนที่ร้อยละ 80 เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม Pulsotype

การศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ผลการทดสอบหาความชุกของยีน *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* และยีนใน Class I Integron ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส และผลการหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) พบว่า Pulsotype 1 (PT1) เป็นกลุ่ม Pulsotype ที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 54 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 54.00 (54/100) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีน

OXA-type Carbapenemase พบยีน bla_{OXA-23} ร่วมกับยีน bla_{OXA-51} 53 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 98.14 (53/54) มีเพียง 1 สายพันธุ์ ร้อยละ 1.85 (1/54) พบยีน bla_{OXA-51} เพียงยีนเดียว ไม่พบ Class I Integron ใน PT1 โดยพบรูปแบบการดื้อยาเป็นรูปแบบที่ 1 จำนวน 44 สายพันธุ์ คิดเป็น ร้อยละ 81.48 (44/54) สำหรับหอผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT1 นี้ มาจากตึกอายุรกรรม 5 มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ หอผู้ป่วยวิกฤติ คิดเป็น ร้อยละ 42.59 (23/54) และ 22.22 (12/54) ตามลำดับ ส่วน Pulsotype 2 (PT2) ที่พบรองลงมาคือ ร้อยละ 11.00 (11/100) พบยีน bla_{OXA-23} ร่วมกับยีน bla_{OXA-51} ทุกสายพันธุ์ หรือร้อยละ 100.00 (11/11) นอกจากนี้ยังพบ Class I Integron ใน PT2 ทุกสายพันธุ์โดยพบร่วมกับยีน bla_{OXA-23} และยีน bla_{OXA-51} สำหรับหอผู้ป่วยที่พบเชื้อ *A. baumannii* ใน PT2 นี้ มาจากตึกอายุรกรรม 7 มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ตึกพิเศษแยกโรค คิดเป็น ร้อยละ 45.45 (5/11) และ 27.27 (3/11) ตามลำดับ

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและหอผู้ป่วย ทำการศึกษาแยกในแต่ละปี พบว่าอายุรกรรม 5 เป็นหอผู้ป่วยที่ส่งตัวอย่างมากที่สุดในทั้ง 3 ช่วงปี รองลงมาเป็นหอผู้ป่วยวิกฤติ รูปแบบความสัมพันธ์หลักที่พบในหอผู้ป่วยทั้ง 2 หอ คือ Pulsotype 1 ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบได้ในหอผู้ป่วยทั้งหมด ยกเว้นตึกผู้ป่วยพิเศษแยกโรค ที่ไม่พบเชื้อที่มีรูปแบบความสัมพันธ์ Pulsotype 1 พบเพียงรูปแบบ Pulsotype 2 และ 3

2. อภิปรายผล

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลทั่วโลก โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยในช่วง 15 ปีที่ผ่านมาพบว่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2 - 4 เป็นร้อยละ 10 - 30 (1) นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอัตราเสียชีวิตสูง เนื่องจากเชื้อ *A. baumannii* มักดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (3) โดยการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* มักใช้ยาในกลุ่ม carbapenem กันมาก จนเป็นเหตุให้ปัจจุบันมีการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem เพิ่มมากขึ้น (21) ดังนั้นการดื้อยาในกลุ่มดังกล่าวทำให้ส่งผลต่อการรักษาที่ยากขึ้นเนื่องจากยากกลุ่มดังกล่าวนับเป็นยากกลุ่มสุดท้ายที่ใช้รักษาการติดเชื้อชนิดนี้ โดยกลไกการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem มีหลายกลไกที่สำคัญคือการสร้างเอนไซม์มาทำลายยานอกจากนี้อาจเกิดจากการขับยาออกจากเซลล์ การลดการนำยาเข้าสู่บริเวณเป้าหมาย (3), (21)

ในงานวิจัยนี้ศึกษาในเชื้อ *A. baumannii* 100 สายพันธุ์ที่ได้ผ่านการจำแนกชนิดของเชื้อและทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โดยตัวอย่างทั้งหมดเก็บได้จากผู้ป่วยที่มารักษาที่สถาบันบำราศนราดูรในช่วงปี พ.ศ. 2555-2558 จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ ได้แก่ เสมหะ ปัสสาวะ หนองจากแผล เลือด ขึ้นเนื้อ น้ำล้างปอด และน้ำจากการเจาะหลอดลม ซึ่งในการศึกษานี้ตัวอย่างเชื้อส่วนมากเก็บได้จากเสมหะถึงร้อยละ 65 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายๆ งาน ที่ตัวอย่างเชื้อส่วนใหญ่เก็บได้จากเสมหะ ได้แก่ งานวิจัยของ Omer Ml. และคณะ (56) จากประเทศชูดาน พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิด ส่วนมากเก็บได้จากเสมหะถึงร้อยละ 61 และเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยสองงานวิจัยจากประเทศไทย ได้แก่ จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (57) และโรงพยาบาลลพบุรี (58) โดยพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิด ส่วนใหญ่เก็บได้จากเสมหะถึงร้อยละ 64 และ 68.2 ตามลำดับ

การศึกษาหาความชุกของยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} ซึ่งเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ Carbapenemase มาทำลายยาในกลุ่ม carbapenem ที่มีรายงานพบได้บ่อยในเชื้อชนิดนี้ (38) จากผลการทดสอบพบว่า bla_{OXA-51} เป็นยีนที่ตรวจพบในทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบหรือร้อยละ 100 (100/100) ซึ่งยีนนี้สามารถสร้างเอนไซม์ OXA-51 like ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยที่ใหญ่ที่สุดของ OXA-type β -lactamases และสามารถส่งผ่านยีนบนโครโมโซมได้ (chromosomal encoded) (30) และยีน bla_{OXA-51} นี้เป็นยีน intrinsic ของเชื้อ *A. baumannii* สามารถใช้พิสูจน์แยกเชื้อ (identification) ได้ (56), (59) ในการวิจัยนี้ยีนที่ตรวจพบมีความชุกมากเป็นลำดับรองลงมาคือ bla_{OXA-23} พบสูงถึงร้อยละ 97 (97/100) ซึ่งยีนนี้สร้างเอนไซม์ OXA-23 like พบในเชื้อ *A. baumannii* โดยสามารถส่งผ่านยีนบนโครโมโซมและพลาสมิด (59) แต่

ไม่พบยีน *bla*_{OXA-24} และ *bla*_{OXA-58} เลย โดยผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Chagas TP. และคณะ จากประเทศบราซิล (60) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *A. baumannii* ที่เก็บในช่วงปี ค.ศ. 2008-2011 จำนวน 155 สายพันธุ์ โดยทุกสายพันธุ์ให้ผลบวกกับยีน *bla*_{OXA-51 like} คิดเป็นร้อยละ 100.00 ส่วนยีน *bla*_{OXA-23 like} พบ 146 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 94.20 ไม่พบยีน *bla*_{OXA-24 like} และยีน *bla*_{OXA-58 like}

นอกจากนี้ยังให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lowings M. และคณะ ที่ประเทศแอฟริกาใต้ (61) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา Carbapenem และ Cephalosporin ร้อยละ 67 พบยีน *bla*_{OXA-51} และ *bla*_{OXA-23} ร้อยละ 99 และ 77 ตามลำดับ ไม่พบยีน *bla*_{OXA-24} และ *bla*_{OXA-58} เช่นเดียวกัน และให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยจากสาธารณรัฐประชาชนจีน โดย Wang H. และคณะ (62) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 221 สายพันธุ์ ในปี ค.ศ. 1999-2005 โรงพยาบาลที่เป็นโรงเรียนแพทย์ (Teaching Hospitals) จำนวน 11 โรงพยาบาล ตรวจพบยีน *bla*_{OXA-23} ร้อยละ 97.7

การวิจัยนี้พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีอัตราดื้อยา Meropenem และ Imipenem ที่อยู่ในกลุ่ม Carbapenems สูงมากถึงร้อยละ 99 กลไกหลักที่ทำให้ให้เชื้อดื้อยาคือการสร้างเอนไซม์ Carbapenemase มาทำลายยา ได้แก่ เอนไซม์ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs) และ metallo- β -lactamases (MBLs) (63) โดยงานวิจัยนี้ พบยีน *bla*_{OXA-23} สูงถึงร้อยละ 97 อาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ OXA-23 เป็นกลไกหลักที่ทำให้เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา Carbapenem (64) แต่อย่างไรก็ตามอาจมีกลไกอื่น ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ CHDLs ชนิดอื่น หรือเอนไซม์ class B β -lactamase หรือ Metallo- β -lactamase (MBL) หรือกลไกอื่นๆ ได้แก่ การขับยาออกจากเซลล์ การลดการนำยาเข้าสู่บริเวณเป้าหมาย หรือการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาจะเข้าไปจับ เป็นต้น (21)

สำหรับการศึกษาความชุกของยีน *bla*_{OXA-24} และ *bla*_{OXA-58} ซึ่งให้ลบต่อการทดสอบทั้งหมดนั้น เพื่อให้ทราบว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สที่ทำการทดสอบให้ผลลบจริง ไม่ได้เกิดจากการผิดพลาดในขั้นตอนปฏิกิริยาการทดลอง ควรมีตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) มาทำการทดสอบร่วมด้วยเพื่อยืนยันความถูกต้องของกระบวนการทำปฏิกิริยา แต่ในการวิจัยนี้ไม่สามารถหาตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างควบคุมบวกได้ หรือควรมีตัวควบคุมภายใน (internal control) ซึ่งอาจเป็นยีน 16s ribosomal RNA (16s rRNA) ที่พบในเชื้อ *Acinetobacter* เพื่อทำการทดสอบควบคู่ไปด้วย เนื่องจากยีน 16s rRNA เป็นส่วน Conserved region สามารถตรวจพบได้ในเชื้อ *A. baumannii* มาทำการศึกษาร่วมด้วย ซึ่งในงานวิจัยของ Zhao SY (65) ที่ได้ทำการทดสอบยีน 16s rRNA เพื่อทดสอบว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* จริง

การศึกษาอื่น Class I Integron พบว่าความชุกของ class I Integron ที่พบผลบวกของทั้งสามยีน ได้แก่ ยีน *Int1*, *Sul1* และ *qacEA1* คิดเป็นร้อยละ 20 (20/100) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Ben Othman A. และคณะ ที่ประเทศตูนิเซีย (66) ศึกษาเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 204 สายพันธุ์ ซึ่งที่ดื้อยาในกลุ่ม β -Lactam ร้อยละ 92 พบว่าเชื้อให้ผลบวกกับ Class I Integron ร้อยละ 25 โดยซึ่งอาจพบความชุกของ Class I Integron สูงหรือต่ำกว่านี้ได้ ได้แก่ ประเทศในทวีปยุโรปพบ class I integron ร้อยละ 43 (44) ในทวีปเอเชีย ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน พบ class I integron ร้อยละ 51.9 (46) ส่วนในประเทศทางตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศอิหร่าน พบ class I integron เพียงร้อยละ 7.5 เท่านั้น (43) จะเห็นได้ว่าในแต่ละที่จะตรวจพบยีนกลุ่มนี้แตกต่างกันออกไป โดยงานวิจัยนี้ให้ผลบวกกับ class I Integron เพียงร้อยละ 20 ซึ่งค่อนข้างต่ำกว่าที่คณะผู้วิจัยคาดการณ์ไว้ อาจเป็นไปได้ในหลายๆกรณี คือ ตัวอย่างกลุ่มที่เป็นสายพันธุ์กลุ่มใหญ่ที่มีการระบาดอาจเป็นเชื้อที่ไม่มี Class I Integron จริง หรือเป็นไปได้ว่าในตัวอย่างกลุ่มนี้อาจมีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งของยีน *Int1* หรือยีน *Sul1* หรือยีน *qacEA1* ยีนใดยีนหนึ่งที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ ทำให้ไพรเมอร์ซึ่งมีความจำเพาะสูงเข้าจับไม่ได้ หรือตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* อาจมีการสร้าง Integron ในกลุ่มอื่น ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาไว้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ class II และ/หรือ class III เป็นต้น ในการศึกษา Integron นั้นส่วนมากมักทำการทดสอบยีน *Integrase (int1)* เพียงยีนเดียวเท่านั้น เนื่องจากยีน *Integrase* นี้จะอยู่ในช่วง 5' conserved segment ซึ่งใน Integron ทั้ง 3 คลาส นี้จะมีส่วนที่เป็น 5' conserved segment ที่เหมือนกัน ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *int1* ที่มีเอนไซม์ *integrase* และ *attI* เป็น recombination site ของ integrons แต่จะแตกต่างกันในส่วนที่เป็น 3'-conserved segment งานวิจัยของ Chen J. และคณะ (67) ทำการศึกษา Integron ทั้ง 3 คลาส โดยการหา ยีน *Integrase* เพียงยีนเดียวได้แก่ *Int1*, *Int2* และ *Int3* ตามลำดับ การศึกษาของ Ayşegül Çopur Çiçek และคณะ (68) ซึ่งทำการศึกษา Class I Integron ในประเทศตุรกี ได้ศึกษายีน *Int1* เท่านั้น สำหรับการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบหา ยีนใน class I Integron ทั้งส่วน 5'-conserved segment ซึ่งได้แก่ยีน *Int1* และ 3'-conserved segment ได้แก่ *qacEA1* และ *Sul1* เพื่อเป็นการศึกษา class I Integron ทั้งขึ้นอย่างครอบคลุม เมื่อพบผลบวกของยีน *Int1* สามารถสรุปผลได้ว่าเชื้อมี class I Integron แต่หากผลการทดสอบบวกกับทั้งสามยีน *Int1* *qacEA1* และ *Sul1* ครบ สามารถสรุปได้ว่าเชื้อมี class I Integron และอาจมี gene cassettes ของยีนดื้อยา โดยงานวิจัยของ Betteridge T และคณะ (69) ที่ได้ทำการศึกษา class I Integron ครบทั้ง 3 ยีน เช่นเดียวกัน

การศึกษาความสัมพันธ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมมีหลายวิธี วิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการศึกษาาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อแบคทีเรีย สำหรับงานวิจัยนี้ ตัวอย่าง *A. baumannii* 100 สายพันธุ์นั้น ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal ในการตัดจีโนมของเชื้อ ผลการศึกษาสามารถนำผลมาจัดกลุ่มโดยใช้เกณฑ์ความเหมือนกันตั้งแต่ ร้อยละ 80 ขึ้นไปให้อยู่ในกลุ่ม (Pulsotype) เดียวกัน กล่าวคือเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดสูงมากนั่นเอง โดยใช้การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม BioNumerics Version 7.5 จากการทดสอบแล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมดังกล่าว ทำให้สามารถแบ่งตัวอย่างได้ 18 pulsotype โดย Pulsotype 1 เป็นกลุ่ม Pulsotype กลุ่มที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วย 54 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 54 กลุ่มที่มีขนาดใหญ่รองลงมาคือ Pulsotype 2 ซึ่งประกอบด้วย 11 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 11 ซึ่งใกล้เคียงกันกับงานวิจัยของ Chaulagain BP. และคณะ (26) จากประเทศเกาหลีใต้ เชื้อ *A. baumannii* 52 สายพันธุ์ ทำการศึกษาโดยวิธี PFGE ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal สามารถแยกเชื้อออกเป็น 16 กลุ่ม (type) และ 2 กลุ่มย่อย (Subtype) ในขณะทำงานวิจัยของ Zhao S. และคณะ ซึ่งทำการศึกษาในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (65) โดยใช้ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* 120 สายพันธุ์ มาศึกษาด้วย PFGE ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal ในการตัดเช่นกัน โดยผลคือสามารถจัดกลุ่มเชื้อตัวอย่างออกได้เป็น 14 กลุ่ม

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา 100 สายพันธุ์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลโดยจัดกลุ่มโดยใช้เกณฑ์ความเหมือนกันตั้งแต่ ร้อยละ 80 ขึ้นไปให้อยู่ในกลุ่ม (Pulsotype) เดียวกัน ด้วยโปรแกรม BioNumerics Version 7.5 พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มออกเป็น 18 pulsotype เมื่อวิเคราะห์ภาพโดยไม่ใช้โปรแกรม โดยดูด้วยตาพบว่า PT 9 และ PT 18 มี band ของดีเอ็นเอที่ถูกตัดย่อยในบางส่วนคล้ายคลึงกัน และ band ของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่คมชัด ทำให้ไม่มั่นใจว่า PT 9 และ PT 18 นั้นมีความแตกต่างกันจนสามารถแบ่งเป็น Pulsotype ใหม่ได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุที่ทำให้วิธี PFGE ได้ผลไม่ชัดเจนอาจเกิดได้หลายสาเหตุ ได้แก่ ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ก่อนทำ plug ขั้นตอนการเตรียม plug ขั้นตอนการย่อยเซลล์ในการเตรียม plug ขั้นตอนการล้าง plug ขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ขั้นตอนการทำ Gel electrophoresis และขั้นตอนการบันทึกภาพเก็บข้อมูล สำหรับการศึกษาที่ผลการทดสอบในบางตัวอย่างให้ผล band ของดีเอ็นเอไม่คมชัด อาจมีสาเหตุมาจากดีเอ็นเอเสื่อมสภาพไป (Degrading DNA) หรือการย่อยดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ (Incomplete lysis cells) หรือการล้างดีเอ็นเอไม่เพียงพอ หรือบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างอุณหภูมิไม่เหมาะสม รวมทั้งการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่สมบูรณ์ (70) ต้องทำการแก้ไขในแต่ละขั้นตอนให้ถูกต้องและระมัดระวัง เช่น ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์ ความบริสุทธิ์ของเชื้อที่ต้องการศึกษาเป็นเรื่องสำคัญ ต้องทำการเพาะแยกให้ได้เชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อน

การปรับปริมาณเชื้อให้เหมาะสมพอดี ไม่เยอะหรือน้อยเกินไป ขั้นตอนการเตรียม plug ระวังเรื่องอุณหภูมิของเจลที่ใช้เตรียม รวมทั้งต้องทำทุกอย่างด้วยความระมัดระวัง เพราะอาจทำให้ดีเอ็นเอที่เตรียมมีการเสียสภาพหรือได้ plug ที่ไม่มีคุณภาพ ขั้นตอนการย่อยเซลล์ (cell lysis) เป็นขั้นตอนที่ส่งผลต่อไปยังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพราะหากทำการย่อยไม่ดี การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ตามมา ขั้นตอนนี้ต้องควบคุมความเข้มข้นของสารต่างๆให้เหมาะสม โดยเฉพาะ Proteinase K รวมทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาในกระบวนการนี้ด้วย ส่วนขั้นตอนการล้าง plug เป็นอีกขั้นตอนที่สำคัญ หากทำการล้างน้อยเกินไปจะส่งผลต่อขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และทำให้เกิดความไม่คมชัดของ band ดีเอ็นเอตามมา สำหรับขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนคือการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หากกระบวนการนี้เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ เมื่อทำการนำ Plug ไปทำการทดสอบในขั้นตอน PFGE จะให้ผลเป็นเส้นดีเอ็นเอที่ไม่มีความคม ดังนั้นในขั้นตอนนี้ควรควบคุมเรื่องความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตลอดจนอุณหภูมิ และเวลาที่ให้เอนไซม์ตัดจำเพาะทำปฏิกิริยา เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องควบคุมให้ถูกต้องด้วย (71), (72)

การหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-51} เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี PFGE สามารถแยกได้เป็น 18 Pulsotypes และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่าง Pulsotype รูปแบบยาความชุกของยีน bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} และยีนใน Class I Integron และหอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ พบว่า Pulsotype 1 ที่ให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} และให้ผลลบกับ class I Integron ซึ่งกลุ่มนี้มีจำนวนตัวอย่างมากกว่าครึ่งที่นำมาทดสอบ รูปแบบการดีเอ็นเอส่วนใหญ่เป็นรูปแบบที่ 1 ที่ดีเอ็นเอทุกชนิดที่ทดสอบ คิดเป็นร้อยละ 81.48 (44/54) พบมาจากตึกอายุรกรรม 5 มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ หอผู้ป่วยวิกฤติ รองลงมาคือ Pulsotype 2 ที่เกือบทั้งหมดให้ผลบวกกับยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-51} เช่นกัน แต่ต่างจาก PT1 คือทุกสายพันธุ์ให้ผลบวกกับ class I Integron และ PT2 พบรูปแบบการดีเอ็นเอส่วนใหญ่เป็นรูปแบบที่ 1 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 90.90 (10/11) นอกจากนี้ยังพบมากในตึกอายุรกรรม 7 รองลงมา ได้แก่ ตึกพิเศษแยกโรค ซึ่งต่างจาก PT1 แสดงว่าเชื้อที่ระบาดเป็นส่วนใหญ่ น่าจะมาจาก PT1 ซึ่งเป็น PT หลักและพบมากในตึกอายุรกรรม 5 มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ หอผู้ป่วยวิกฤติ ซึ่งพบใน PT อื่นๆที่มีขนาดเล็กๆ ได้แก่ PT3, PT4 และ PT5 เช่นกัน

การที่พบ PT1 ซึ่งเป็น PT หลักและพบ PT อื่นๆที่มีขนาดเล็กๆ (PT3, PT4 และ PT5) ในตึกอายุรกรรม 5 และหอผู้ป่วยวิกฤติมาก อาจเนื่องมาจากการเคลื่อนย้ายผู้ป่วยจากหอผู้ป่วยหนึ่ง ไปยังอีกหอผู้ป่วยตามอาการของผู้ป่วย จึงทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อจนยากแก่การควบคุม ตลอดจนการสลับเปลี่ยนหน้าที่กันของเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์เองที่มีการหมุนเวียนกันปฏิบัติงานไปยังหอผู้ป่วยต่างๆ หรืออาจเกิดจากการใช้เครื่องมือทางการแพทย์ร่วมกันของแต่ละหอผู้ป่วย จึงทำให้

มีการแลกเปลี่ยนสายพันธุ์ของเชื้อกันไปมา ทำให้ในแต่ละหอผู้ป่วยมีเชื้อที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ นอกจากนี้ใน PT 2 ซึ่งเป็น PT รongนั้น พบยีน class I Integron ซึ่งเป็นหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) จะช่วยให้เกิดการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถบรรจุยีนดื้อยาได้หลายชนิด (13) อีกทั้งพบแพร่กระจายในหอผู้ป่วยที่ต่างไปจาก PT อื่น จึงควรเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการแพร่กระจาย เชื้อ *A. baumannii* ที่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดซึ่งก่อให้เกิดความยุ่งยากในการรักษา และเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงขึ้น ดังนั้นการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเพื่อป้องกันไม่ให้อุบัติการณ์ของการรักษาตัวและพักฟื้นในหอผู้ป่วยน่าจะเป็นหนทางที่ดีที่สุดในการแก้ปัญหาและลดโอกาสความสูญเสียทั้งในแง่ทรัพยากรที่จะใช้สำหรับการรักษาและชีวิตของผู้ป่วยด้วย และนอกจากนี้การเลือกใช้อาหารในการรักษาที่ถูกต้องก็ยังเป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพ ลดอัตราการเสียชีวิต ตลอดจนลดอัตราการเกิดเชื้อดื้อยาที่เพิ่มจำนวนขึ้นในสถานพยาบาลได้อีกด้วย

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและหอผู้ป่วย ทำการศึกษาแยกในแต่ละปี พบว่าตึกอายุรกรรม 5 เป็นหอผู้ป่วยที่ส่งตัวอย่างมากที่สุดในทั้ง 3 ช่วงปี รองลงมา เป็นหอผู้ป่วยวิกฤติ โดยพบ PT 1 เป็น PT หลักในทุกหอผู้ป่วย ยกเว้นตึกผู้ป่วยพิเศษแยกโรคที่ไม่พบ PT1 เลย พบเพียงรูปแบบ PT 2 และ PT 3 จากการศึกษาพบว่าตึกผู้ป่วยพิเศษแยกโรคที่ไม่พบ PT1 ที่เป็น PT หลักเลย เนื่องจากเมื่อมีการจำกัดพื้นที่ของสถานพยาบาล ทำให้การกระจายเชื้อถูกจำกัด โดยเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลของสถานพยาบาลนี้ในทุกหอผู้ป่วยคือ เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่พบใน PT1 เนื่องจากมีการกระจายในหอผู้ป่วยทุกหอในสถาบันบาราศนราดรุร ยกเว้นหอผู้ป่วยพิเศษแยกโรค ส่วนหอผู้ป่วยพิเศษแยกโรค เชื้อที่พบว่าระบาดคือ เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่พบใน PT 2 และ PT 3 เนื่องจากหอผู้ป่วยพิเศษแยกโรคนี้เป็นหอที่มีการหมุนเวียนเข้าออกของผู้ป่วย บุคลากรการแพทย์ รวมทั้งการใช้อุปกรณ์การแพทย์น้อยมาก เนื่องจากเป็นหอผู้ป่วยที่มีเพียงผู้ป่วยที่มีความเสี่ยง หรือมีอาการของโรคที่มีโอกาสเสี่ยงแพร่กระจายไปยังผู้อื่นได้ง่าย เป็นห้องที่ถูกจัดไว้พิเศษ และมีการออกแบบพิเศษ คือเป็นห้องควบคุมความดันอากาศ (Negative pressure) เพื่อป้องกันการแพร่เชื้อ ดังนั้นบุคลากรทางการแพทย์ในหอผู้ป่วยนี้ต้องเป็นบุคลากรที่จำเพาะ และได้รับการอบรมเฉพาะทาง ตลอดจนอุปกรณ์ทางการแพทย์มีความจำเพาะใช้เฉพาะหอผู้ป่วยนี้เพียงหอเดียว จึงเป็นสาเหตุให้หอผู้ป่วยนี้ไม่มีการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ระบาดในหอผู้ป่วยอื่น คือสายพันธุ์ในรูปแบบ PT1 ผลการศึกษานี้สนับสนุนเกี่ยวกับข้อสันนิษฐานด้านการแพร่กระจายเชื้อที่ว่า บุคลากรทางการแพทย์ การเคลื่อนย้ายผู้ป่วยระหว่างหอ และการใช้เครื่องมือทางการแพทย์ร่วมกัน เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อระบาดในสถานพยาบาล

3. ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่ได้จากการเก็บในหลายๆ สถานพยาบาล เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลในภาพรวมที่มากขึ้น
2. ควรทำการศึกษาทั้งเชื้อที่เป็นเชื้อดื้อยาหลายชนิด และเชื้อที่ไม่ดื้อยา เพื่อสามารถเปรียบเทียบผล และสรุปผลได้ชัดเจนมากขึ้น
3. ควรศึกษาเอนไซม์ในคลาสอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น β -lactamase คลาส A และ B ที่มีส่วนในการดื้อยา Carbapenem เช่นกัน
4. เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์มากขึ้นควรต้องนำผลการวิจัยไปวิเคราะห์ร่วมกับประวัติการรักษาของผู้ป่วย แต่เนื่องด้วยเรื่องเกี่ยวกับสิทธิความเป็นส่วนตัวและการรักษาความลับของผู้ป่วย จึงไม่สามารถนำประวัติของผู้ป่วยที่ติดเชื่อมาทำการวิเคราะห์อย่างละเอียดได้

รายการอ้างอิง

1. Vattanavanit V, Chayakul P. *Acinetobacter* infections in the intensive care unit. Songkhla Med. 2013;31:91-100.
2. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. National antimicrobial resistance surveillance Thailand antibiogram 2013. Available from: <http://narst.dmsc.moph.go.th/>.
3. วิชัย สันติมาลีวรกุล, สุทธิพร ภัทรยากุล, โปยม วงศ์ภูวรักษ์. สถานการณ์การติดเชื้อและกลไกการดื้อยาโดยเชื้อ *Acinetobacter baumannii*. ไทยเิกซ์ชยนิพนธ์. 2552;4:1-16.
4. Evans BA, Amyes. SGB. OXA β -lactamase-Lactamases. clin microbiol Re. 2014;27:241-63.
5. Ehlers MM, Hughes JM, MM. K. Prevalence of carbapenemase in *Acinetobacter baumannii*: antibiotic resistant bacteria-A continuous challenge in the new millennium. InTech. 2012:214-39.
6. Micheal G, Smith TAG, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M *et al*. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. Genes Dev. 2007;21:601-14.
7. Lean S.S. SZ, Ismail S., Rahman N.I.A., Othman N., Abdullah F.H., *et.al*. Prevalence and genetic characterization of carbapenem-and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a tertiary hospital in Teregganu, Malaysia. ISRM Microb. 2014:1-10.
8. Thapa B TC, Srifuengfung S, Dhiraputra C. High prevalence of blaOXA-23 in oligoclonal carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010;41:625-35.
9. Nuimsup PR BN, Tansawai U, Tiloklurs M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. Jpn J Infect Dis. 2009;62:152-4.

10. Jumroon N, P. S. Multiple combination Patterns of OXA-type carbapenemase hydrolyzing and metallo- β -lactamase encoding genes among clinically isolated *Acinetobacter baumannii*. Int J Pharm Bio Sci. 2013;4:908-17.
11. Bonomo RA. New Delhi metallo β -lactamase and multidrug resistance: A global SOS?. Clin Infect Dis. 2011;52:485-7.
12. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, P. K. Coexistence of blaOXA-23 with bla_{NDM-1} and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from india. J antimicrob Chemother. 2010;65:2253-4.
13. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology and genetics of class D β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:24-38.
14. Koeleman JGM, Stoof J, Van der bijl MW, Vandenbroucke-Graus CMJE, Savelkoul PHM. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. J Clin Microbiol. 2001;39:8-13.
15. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, RD. S. *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012;3:243-50.
16. Bergogne BE TK. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogen: microbiological, clinical and epidemiological features. clin microbiol Re. 1996;9:148-65.
17. Perez F HA, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:371-84.
18. ชินวัฒน์ ศรีใส , เบ็ญจวรรณ คำแหงพล, ทิพย์วิมล อยู่ทรัพย์, สุวิตา บุญชะโด. การสอบสวนการระบาดของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในหอผู้ป่วยหนักทารกแรกเกิด โรงพยาบาลร้อยเอ็ด. ว.โรงพยาบาลร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์, มหาสารคาม. 2555;19:76-82.
19. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance of resistance to carbapenem to *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic option. Int j Antimicrob Agents. 2012;39:105-44.
20. กำธร มาลาธรรม. หลักการจ่ายยาปฏิชีวนะในเวชปฏิบัติทั่วไป. หน่วยโรคติดเชื้อ.1-17.
21. Singh H, Thangaraj P, Chakrabarti A. *Acinetobacter baumannii*: A brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. j Clin Diagn Res. 2013;7:2602-5.

22. Singh R, Saxena A, Singh H. Identification of group specific motifs in beta-lactamase family of proteins. J Biomed Sci. 2009;16:1-7.
23. Zeba B. Overview of Beta-lactamase incidence on bacterial drug resistance. afr J Biotechnol. 2005;4:1559-62.
24. Thirapanmethee K. Extended spectrum β -lactamase : critical tools of bacteria resistance. Mahidol University J of pharmaceutical Science. 2012;39(1):1-8.
25. Noori M, Karimi A, Fallah F, Hashemi A, Alimehr S, Goudarzi H, *et al.* High prevalence of Metallo-beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospital of Tahrán, Iran. Arch Pediatr Infect dis. 2014;2:1-5.
26. Chaudhari MS, Javadekar TB, Ninama G, Pandya N, Damor J. A study of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples of S.S.G. hospital. National J of Med Res. 2011;1:60-3.
27. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanism. clin microbiol Rev. 2009;22:582-610.
28. ภัทรชัย กิรติสิน. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเอนไซม์ ESBL, AmpC และ KPC. clinical Microbiology Society of Thailand. 2010;3:1-6.
29. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases in *Acinetobacter baumannii*. antimicrob Agents Chemother. 2009;53:5035-8.
30. Opazo A, Dominguez M, Bello H, Amyes SGB, Gonzales RG. OXA-type carbapenemasees in *Acinetobacter baumannii* in South America. J infect Dev Ctries. 2012;6:311-6.
31. Brown S, Amyes S. OXA β -lactamase in *Acinetobacter* : the story so far. J antimicrob Chemother. 2006;57:1-3.
32. Yan JJ, Tsai SH, Chuang CL, Wu JJ. OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. J antimicrob Immunol Infect. 2006;39:130-4.

33. Dermaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R EY, *et al.* The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* Jpn J Infect Dis. 2009;62:372-7.
34. วีรพงศ์ ลูจิตานนท์. พื้นฐานเทคนิค Polymerase chain reaction. 2008:1-15.
35. Pop-Vicas A, Strom J, Stanley K, D'Aganta EMC. Multidrug-resistant gram-negative bacteria among patients who require chronic hemodialysis. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3:752-8.
36. Carvalho KR, D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Galvao dos Santos L, Jose Felix Pereira M, MD. A. Occurrence of blaOXA-23 gene in impenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011;106:505-6.
37. Zandera E, Higgins PG, Fernandez-Gonzalez A, Seifert H. Detection of intrinsic bla_{OXA-51-like} by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. Int J Med Microbiol. 2013;303:88-9.
38. Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, SGB. A. Novel genetic context of multiple bla_{OXA-58} gene in *Acinetobacter* genospecies 3. J antimicrob Chemother. 2010;65:1586-8.
39. Bennett PM.. Integron and gene cassettes: a genetic construction kits for bacteria. J Antimicrob Chemother. 1999;43.
40. Cambray G, Nuas SA, Campoy S, Guerin E, Da RS, Gonzalez ZB, et al. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. Cambray et al Mobile DNA. 2011;2.
41. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integron in *Acinetobacter baumannii*: Description of a hybrid class 2 integron. antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2684-8.
42. Peymani A, Farajnia S, Reza NM, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, Azhari F. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, Northwest of Iran. Polish J Microbiol. 2012;61:57-60.

43. Kamalbeik S, Kouchek M, Baseri MS, Fallah F, Malekan MA, H. T. Prevalence of class 2 integron in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in toxicological ICU patients in Tehran. *Iranian J Toxicol.* 2013;7.
44. Matinez-FP, Fluit A.C, Schmitz F.J, Grekt V.S.C, Verhoef J, M.E. J. Class I integrons in gram-negative isolates from different European hospital and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:689-96.
45. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, *et al.* Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3074-82.
46. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S *et al.* Prevalence and characterization of class I integron among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patient in Nanjing, China. *J Clin Microbiol.* 2007;45:241-3.
47. Adams Haduch JMPD, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, *et al.* Genetic basis of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a Tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3837-43.
48. Fay PD. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The molecular epidemic tools. *NPHL.* 2003:1-2.
49. Wretler JC, Lipes BD, Birren BW, E. L. Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Method in *Enzymology.* 1996:255-72.
50. nzytech. Apal Available from: <https://www.nzytech.com/products-services/conventional/mb062/>.
51. Chang K-M, Huang W-C, Chiou C-S, Shen G-H, Huang C-C, Wen F-S. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2013;46(3):195-201.
52. Thermofisher Scientific. Related applications: Restriction Enzyme Cloning. Available from: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1411>.

53. Villalon P, Valdezate S, Medina Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidermic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol. 2008;49:875-82.
54. Clinical and Laboratory standards Institute(CLSI) . Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25, editor. Wayne, Pennsylvania, USA2015.
55. Piyakul C, TiyaWisutsri R, K. B. Emergence of metallo- β -lactamase IMP-14 and VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary-level hospital in Thailand. Epidemiol Infect. 2012;140(3):539-41.
56. Merkier AK, Centrón D. *bla*_{OXA-51}-type β -lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicro Ag. 2006;28(2):110-3.
57. Tunyapanita W, Pruekpraserta P, Laoprasopwattana K, Chelaeb. S. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital patients Science Asia. 2014;40:28-34.
58. Rodsathien P. Multidrug resistance *Acinetobacter baumannii* at Lopburi hospital. ขอนแก่นวารสาร. 2008;32:74-81.
59. Kock MM, Bellomo AN, Storm N, MM. E. Prevalence of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens obtained from an academic hospital in South Africa. South Afr J Epidemiol Infect. 2013;28:28-32.
60. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23–producing clones (CC15 and CC79). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2014;79(4):468-72.
61. Michelle L, Marthine M, Andries WD, MK. M. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa-an update. BMC Infect Dis. 2015;79:521-30.

62. Wang H GP, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(11).
63. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology *Clinical Microbiology and Infection.* 2006;12(9):826-36.
64. Aljindan R, Bukharie H, Alomar A, Abdalhamid B. Prevalence of digestive tract colonization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Saudi Arabia. *J Med Microbiol.* 2015;64(4):400-6.
65. Zhao SY, Jiang DY, PC X, Zhang YK, Shi HF, Cao HL, et al. An investigation of drug resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;17(4):1-8.
66. Ben Othman A, Zibri M, Masmoudi A, Abdellatif S, Ben Lakhel S, C. F. Multiresistance and endemic status of *Acinetobacter baumannii* associated with nosocomial infections in a tunisian hospital: a critical situation in the intensive care units. *Braz J Microbiol.* 2011;42:415-22.
67. Chen J, Li H, Yang J, Yang J, Zhan R, Chen A *ea.* Prevalence and characterization of Integrons in Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* in Eastern China: A Multiple-Hospital Study *Int J Environ Res Public Health* 2015;12:10093-105.
68. Ayşegül Çopur Çiçek *et al.* Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(9):743-7.
69. Betteridge T, Partridge SR, Iredell JR, Stokes HW. Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *antimicrob Agents Chemother.*55(8):3939-43.
70. Higgins PG. Available from: https://www.researchgate.net/post/PFGE-Why_is_there_a_smear_instead_of_separate_bands.
71. Cooper K. PFGE: General overview and troubleshooting tips. Available from: <file:///C:/Users/HP/Downloads/PFGE%20Toubleshooting.pdf>.

72. BIO-RAD. Pulsed field gel electrophoresis. Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6224.pdf.



ภาคผนวก

1. 1M Tris, pH 8.0 ปริมาตร 1000 ml.

Tris base	121.1 g
น้ำกลั่น	700 ml.

นำมาละลายให้เข้ากันจนหมด นำไปวัดค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl เมื่อปรับได้ค่าแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตร 1000 ml. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 1000 ml.

EDTA	186.1 g.
น้ำกลั่น	800 ml.

นำมาละลายโดยใช้ NaOH ในการปรับ pH โดยสาร EDTA จะค่อยละลายเมื่อ pH เป็น 8.0 เมื่อได้ค่า pH เป็น 8.0 แล้ว เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. 5M NaCl ปริมาตร 1000 ml.

NaCl	292.2 g.
น้ำกลั่น	1000 ml.

นำมาละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. 1M NaCl ปริมาตร 100 ml.

NaCl	5.84 g.
น้ำกลั่น	100 ml.

นำมาละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 ml.

Tris base	108	g.
Boric acid	55	g.
EDTA (0.5M)	40 ml. หรือ	EDTA 9.3 g.

นำมาละลายให้เข้ากันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 5X TBE buffer ปริมาตร 1000 ml.

Tris base	54	g.
Boric acid	27.5	g.
EDTA(0.5M)	20 ml. หรือ	EDTA 4.65 g.

นำมาละลายให้เข้ากันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. 1X TE buffer ปริมาตร 500 ml.

100x TE buffer	5	ml.
น้ำกลั่น	495	ml.

นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. SE buffer (75mM NaCl., 25 mM EDTA) ปริมาตร 500 ml.

1M NaCl	37.5	ml.
0.5M EDTA	25	ml.
น้ำกลั่น	437.5	ml.

นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. LMP buffer (10mM Tris, 0.1mM EDTA) ปริมาตร 50 ml.

0.5 M EDTA 10 μ l.

1 M Tris 500 μ l.

น้ำกลั่น 49.49 ml.

นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิพวรรณ หมิ่นหนู เกิดเมื่อวันที่ 19 พฤศจิกายน พ.ศ. 2529 ที่ จ.พัทลุง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2552 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2555 ปัจจุบันปฏิบัติงานในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ กลุ่มงานวินิจฉัยชั้นสูง กลุ่มปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์และอ้างอิงด้านโรคติดเชื้อ สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

