

ความชุกและรูปแบบสายพิมพ์อาร์อีพีของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *ISAb<sub>a</sub>125*  
ใน *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย จังหวัดพิษณุโลก



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช  
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE AND REP-FINGERPRINT PATTERNS OF *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6*  
AND *ISAb<sub>a</sub>125* AMONG CLINICAL ISOLATES OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* IN  
PHITSANULOK PROVINCE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and  
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกและรูปแบบลายพิมพ์อาร์อีพีของยีน <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>ADC</sub> , <i>aphA6</i> และ <i>ISAba125</i> ใน <i>Acinetobacter baumannii</i> ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของ ผู้ป่วย จังหวัดพิษณุโลก
โดย	น.ส.จริยา ศรชัย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.รัชนีพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

----- คณะบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

----- ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

----- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.รัชนีพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี)

----- กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

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

จริยา ศรชัย : ความชุกและรูปแบบลายพิมพ์อาร์อีพีของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *ISAb<sub>a</sub>125* ใน *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย จังหวัดพิษณุโลก. ( PREVALENCE AND REP-FINGERPRINT PATTERNS OF *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* AND *ISAb<sub>a</sub>125* AMONG CLINICAL ISOLATES OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* IN PHITSANULOK PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. ดร. รัชนีพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี

*Acinetobacter baumannii* เป็นเชื้อที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในโรงพยาบาลและมีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดเพิ่มมากขึ้น โดยการสร้างเอนไซม์ทำลายยาเป็นกลไกการดื้อยาที่มีความสำคัญและพบได้บ่อย ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2561 ถึง กุมภาพันธ์ 2562 จำนวน 257 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase เอนไซม์ cephalosporinase เอนไซม์ aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) และอินเซอร์ชันซีควอน (*ISAb<sub>a</sub>125*) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี repetitive element polymerase chain reaction (REP-PCR)

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *A. baumannii* 221 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86.0) เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิด (multidrug-resistant *A. baumannii* : MDR-AB) โดยเชื้อ *A. baumannii* 257 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 รองลงมาได้แก่ ยีน *bla*<sub>ADC</sub> ยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> ยีน *ISAb<sub>a</sub>125* และยีน *aphA6* คิดเป็นร้อยละ 38.5, 8.2, 6.2 และ 2.3 ตามลำดับ โดยพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับยีน *bla*<sub>ADC</sub> มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 35.0 ในการศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี rep-pcr ได้ 18 กลุ่ม โดยพบว่ากลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มหลักที่ใหญ่ที่สุด กลุ่มที่ 1 พบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> (ร้อยละ 59.7) และ *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับยีน *bla*<sub>ADC</sub> (ร้อยละ 35.5) มากที่สุด และพบเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานสูงถึงร้อยละ 85.5 กลุ่มที่ 2 พบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> (ร้อยละ 25.0) และ *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับยีน *bla*<sub>ADC</sub> (ร้อยละ 75.0) มากที่สุดเช่นเดียวกัน และพบเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานสูงถึงร้อยละ 100.0 จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของยีนดื้อยาและเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในอนาคตต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล ฝายมือชื่อนิสิต .....  
 ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา  
 ภูมิคุ้มกัน  
 ปีการศึกษา 2563 ฝายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5976654237 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Acinetobacter baumannii, aphA6, ADC gene, NDM-1 gene, ISAb<sub>a</sub>125 gene, Multidrug resistant bacteria

Jariya Sornchai : PREVALENCE AND REP-FINGERPRINT PATTERNS OF *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* AND *ISAb<sub>a</sub>125* AMONG CLINICAL ISOLATES OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* IN PHITSANULOK PROVINCE. Advisor: Rachaneeporn Tiyawisutsri, Ph.D.

*Acinetobacter baumannii* is one of the most important causes of nosocomial infection and it has increasing resistant to many antimicrobial agents. The most importance mechanism for antimicrobial resistance in *A. baumannii* is producing antibiotic degrading enzyme. In this study evaluated the prevalence of beta-lactamase, cephalosporinase, aminoglycoside-modifying enzymes ( AMEs) encoding genes and insertion sequence (*ISAb<sub>a</sub>125*) by polymerase chain reaction (PCR) in *A. baumannii* 257 non-duplicate clinical isolates from July 2018 to February 2019 and Clonal relatedness of all isolates were analyzed using repetitive sequence-based PCR (REP-PCR).

We identified 221 isolates (86.0 %) as multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR-AB). The genes that encode *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *ISAb<sub>a</sub>125* and *aphA6* were detected in 100.0%, 38.5%, 8.2%, 6.2% and 2.3% of these isolates, respectively. Co-existence of *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>ADC</sub> was found 35.0%.

For rep-pcr, 18 different groups were classified. Two predominate groups were found. In group 1 and group 2 *bla*<sub>OXA-51</sub> and co-existence of *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>ADC</sub> was presented 59.7%, 35.5%, 25.0% and 75.0%, respectively. The majority of these two groups are highly MDR-AB resistant. Form this study, it can be used as a preliminary data for monitoring and controlling the spread of these resistant strains.

Field of Study: Molecular Science of Student's Signature .....  
 Medical Microbiology and  
 Immunology

Academic Year: 2020 Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลต่างๆ ดังนี้ อาจารย์ ดร.รัชนิพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้มอบความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกด้านไม่ว่าจะเป็นเรื่องการเรียน สุขภาพ ตลอดจนการใช้ชีวิตในฐานะนิสิตปริญญาโทที่ทำงานไปด้วยควบคู่กับการศึกษาต่อ

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อสำหรับทำการศึกษาในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการเก็บตัวอย่างเชื้อ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานัน รัชวงศ์จิรกุล ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และรองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์ ที่สละเวลามาเป็นกรรมการภายนอกในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สอนและถ่ายทอดวิชาความรู้ต่างๆ

ขอขอบพระคุณ “ทุนคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” และขอขอบคุณหน่วยวิจัยนวัตกรรมวินิจฉัยตรวจเชื้อดื้อยา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุน อุปกรณ์/เครื่องมือ และสถานที่

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาต่อและท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณทุกท่านกำลังใจจากเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงให้คำปรึกษาต่างๆ

จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

จริยา ศรชัย

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ .....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญรูปภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามงานวิจัย .....	5
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
1.4 สมมติฐานงานวิจัย.....	5
1.5 กรอบแนวคิดของการวิจัย.....	6
1.6 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	7
1.7 สถานที่ทำการศึกษารวิจัย .....	7
1.8 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย.....	7
บทที่ 2 .....	8
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง .....	8
2.1 โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) และสถานการณ์โรคติดเชื้อใน โรงพยาบาล .....	8

2.2 เชื้อที่เป็นสาเหตุก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล .....	10
2.3 ปัจจัยเสี่ยงและการติดเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	11
2.4 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	12
2.5 กลไกการก่อโรคของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	13
2.6 การรักษาการติดเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	15
2.6.1 Sulbactam.....	15
2.6.2 Imipenem.....	15
2.6.3 Colistin.....	16
2.6.4 Tigecycline.....	16
2.7 กลไกการดื้อยาของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	16
2.8 อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ <i>A. baumannii</i> ในประเทศไทย.....	18
2.9 ยากลุ่ม beta-lactams และกลไกการออกฤทธิ์ (84) .....	19
2.10 กลไกการดื้อยากลุ่ม beta-lactams.....	21
2.11 เอนไซม์ beta-lactamase .....	21
2.12 เอนไซม์ carbapenemase .....	23
2.12.1 Class B carbapenemase .....	23
2.12.2 Class D carbapenemases หรือ OXA carbapenemases .....	23
2.13 ยากลุ่ม aminoglycosides และการดื้อยา.....	24
2.13.1 กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action) .....	25
2.13.2 กลไกการดื้อยา (Mechanism of resistance) .....	25
2.14 ยากลุ่ม colistin และการดื้อยา.....	28
2.14.1 กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action).....	28
2.14.2 กลไกการดื้อยา (Mechanism of resistance) .....	28
2.15 ความรู้พื้นฐานระดับโมเลกุลเกี่ยวกับเอนไซม์ beta-lactamase (113).....	30



2.16 Insertion sequence (IS).....	31
2.17 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ .....	32
2.17.1 เทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) .....	32
2.17.2 เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	33
2.17.3 เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	33
2.17.4 เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) .....	34
2.17.5 เทคนิค Multilocus sequence typing (MLST) .....	34
2.17.6 เทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (REP-PCR) .....	35
บทที่ 3 .....	37
วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย .....	37
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	37
3.2 เชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย .....	39
3.2.1 การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง .....	39
3.2.2 การพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ .....	40
3.2.3 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	40
3.3 การเก็บตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	40
3.4 การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	41
3.5 การตรวจหาความชุกของยีน <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>ADC</sub> , <i>aphA6</i> และอินเซอร์ชันซีเควน..41 (ISAba125) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่ดื้อยาหลายชนิดโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและ ตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis.....	41
3.5.1 การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	41
3.5.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เพื่อหาความชุกของยีน <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>ADC</sub> , .....	42

<i>aphA6</i> และอินเซอร์ชันซีแควน (IS <i>Aba125</i> ) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	42
3.5.3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์ด้วยวิธี Agarose gel .....	43
3.6 การศึกษาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยวิธี repetitive element polymerase chain reaction (REP-PCR).....	44
บทที่ 4.....	46
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	46
4.1 ผลการเก็บรวบรวมเชื้อ <i>A. baumannii</i> จำแนกตามชนิดสิ่งส่งตรวจ.....	46
4.2 ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ( Antimicrobial Susceptibility Testing ) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	46
4.3 ผลการทดสอบหาความชุกของยีน <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>ADC</sub></i> , <i>aphA6</i> และอินเซอร์ชันซีแควน (IS <i>Aba125</i> ) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์ .....	49
4.4 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยาและผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์กับยีน <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>ADC</sub></i> , <i>aphA6</i> และอินเซอร์ชันซีแควน (IS <i>Aba125</i> ) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	52
4.6 ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) .....	74
4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ผลการทดสอบหาความชุกของยีน <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>ADC</sub></i> , <i>aphA6</i> และอินเซอร์ชันซีแควน (IS <i>Aba125</i> ) ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์และผลการหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR).....	80
บทที่ 5 .....	88
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ .....	88
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	88
5.2 อภิปรายผล .....	90
5.3 ข้อเสนอแนะ .....	95
บรรณานุกรม .....	96

ภาคผนวก ก .....	110
ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี.....	110
ภาคผนวก ข .....	112
ตารางแสดงผลงานวิจัยทั้งหมด.....	112
ประวัติผู้เขียน .....	117



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2544 (39).....	9
ตารางที่ 2 การติดเชื้อในโรงพยาบาลและการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ พ.ศ. 2553 (37).....	10
ตารางที่ 3 แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	37
ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	38
ตารางที่ 5 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา ยีน <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>ADC</sub> , <i>aphA6</i> และอินเซอร์ ชันซีเควน (IS <i>Aba125</i> ) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> (17).....	42
ตารางที่ 6 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ.....	44
ตารางที่ 7 สรุปการจำแนกแยกเชื้อ <i>A. baumannii</i> ตามคุณสมบัติการเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน...49	49
ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในรูปแบบต่างๆกับผลการหาความ ชุกของยีน <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>ADC</sub> , <i>aphA6</i> และอินเซอร์ชันซีเควน (IS <i>Aba125</i> ) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....	69
ตารางที่ 9 แสดงผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i> 257 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความ สัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep- PCR) พิจารณาร่วมกับรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการหาความชุกของยีน <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>ADC</sub> , <i>aphA6</i> และอินเซอร์ชันซีเควน (IS <i>Aba125</i> ) ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส .84	84

## สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แนวโน้มอัตราการตายของเชื้อ <i>Acinetobacter spp.</i> (6) .....	12
รูปที่ 2 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ <i>A. baumannii</i> จากกล้อง scanning electron microscope (54).....	13
รูปที่ 3 รูปร่างและลักษณะ Gram's stain ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> จากกล้องจุลทรรศน์ (55).....	13
รูปที่ 4 ปัจจัยความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ <i>A. baumannii</i> (60).....	14
รูปที่ 5 โครงสร้างของยาในกลุ่ม carbapenems (86).....	20
รูปที่ 6 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย (87) .....	21
รูปที่ 7 กลไกการออกฤทธิ์ของยา aminoglycosides (101).....	25
รูปที่ 8 กลไกการออกฤทธิ์ของยา colistin (106).....	28
รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนเทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (120).....	32
รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (121).....	33
รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงจำนวนเชื้อ <i>A. baumannii</i> จำนวน 257 ตัวอย่าง จำแนกตามชนิดของ.....	46
รูปที่ 12 แผนภูมิแสดงผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะ 11 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> จำนวน 257 ตัวอย่าง .....	47
รูปที่ 13 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สกับไพรเมอร์ของยีน <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 353 คู่เบส แถวที่ 5-18, 20-21, 23-27 และ 29-30 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> แถวที่ 4, 19, 22 และ 28 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ.....	50
รูปที่ 14 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สกับไพรเมอร์ของยีน <i>bla<sub>ADC</sub></i> โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 663 คู่เบส แถวที่ 2-3, 8, 10-18, 21, 23-24, 26-27 และ 29 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน <i>bla<sub>ADC</sub></i> แถวที่ 1, 4-7, 19-20, 22, 25,	

28 และ 30 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla<sub>ADC</sub>* แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ.....50

รูปที่ 15 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์กับไพรเมอร์ของยีน *bla<sub>NDM-1</sub>* โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 621 คู่เบส แถวที่ 51 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla<sub>NDM-1</sub>* แถวที่ 1-50 และ 52-60 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla<sub>NDM-1</sub>* แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ.....51

รูปที่ 16 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์กับไพรเมอร์ของยีน *aphA6* โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 736 คู่เบส แถวที่ 11 และ 22 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *aphA6* แถวที่ 1-10, 12-21 และ 23-29 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *aphA6* แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ.....51

รูปที่ 17 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์กับไพรเมอร์ของยีน *ISAb<sub>a125</sub>* โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 755 คู่เบส แถวที่ 4, 10, 19 และ 22 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *ISAb<sub>a125</sub>* แถวที่ 1-3, 5-9, 11-18, 20-21 และ 23-31 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *ISAb<sub>a125</sub>* แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ.....52

รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยาและผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์กับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6*.....53

รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยาและผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์กับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6*.....54

รูปที่ 20 ภาพถ่ายดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) แถว L คือ Ladder 100 คู่เบส (ซ้าย) และ 1 กิโลเบส (ขวา) แถวที่ 2-19 คือ ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่พบแถบดีเอ็นเอเป็นลายพิมพ์อาร์อีพีรูปแบบต่างๆ.....75

รูปที่ 21 REP-PCR DNA fingerprinting patterns วิเคราะห์โดยโปรแกรม BioNumeric version 8.0 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ optimize 2.5% และ tolerance in the band position 2.5% เกณฑ์ตัดสินว่าเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน  $\geq$  ร้อยละ 80 ขึ้นไป .....76

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันโรคติดเชื้อแบคทีเรียนับเป็นปัญหาที่สำคัญ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่เป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและสามารถพบได้ในโรงพยาบาลทุกระดับทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา โดยในแต่ละปีพบว่ามียาต้านการติดเชื้อของผู้ป่วยติดเชื้อในระหว่างเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจำนวนมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยต้องพักรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น นอกจากนี้แล้วเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้มีการพัฒนาการดื้อยามากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อดังกล่าวลดต่ำลงจนทำให้ไม่สามารถรักษาโรคของผู้ป่วยอย่างได้ผล (1, 2) การดื้อยาปฏิชีวนะกลายเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ซึ่งเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมทั้งในด้านของการรักษาทางการแพทย์และทางการเกษตร (3) นอกจากนี้แล้วยังใช้ในการป้องกันการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ จากสาเหตุนี้จึงทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (Multidrug-Resistance, MDR) และเมื่อเชื้อเกิดการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาส่งผลทำให้ผู้ป่วยต้องพักรักษาตัวเป็นเวลานานขึ้น รวมถึงค่าใช้จ่ายของยาที่สูงและยังทำให้การรักษาล้มเหลวอีกด้วย ในเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเหล่านี้ *Acinetobacter baumannii* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเชื้อหนึ่งที่เป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย อันเนื่องมาจากเชื้อชนิดนี้มีการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด และผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อนี้มีอัตราการตายที่สูง โดยเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบบ่อยมากในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหออภิบาลผู้ป่วยที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อเพิ่มมากขึ้นทุกปี ซึ่งเชื่อดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญทั้งการติดเชื้อที่ปอด การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบจากการติดเชื้อ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (4) ซึ่งพยาธิสภาพของโรคมียากและนับวันยิ่งทวีคูณเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากแบคทีเรียดื้อยาที่ใช้ในการรักษา ทำลาย และกำจัดยาก สำหรับประเทศไทยพบว่าอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 2-4 เป็นร้อยละ 10-30 ภายในเวลา 15 ปีที่ผ่านมา (5) และจากข้อมูลสถานการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* ใน 5 ปีที่ผ่านมา ตั้งแต่ พ.ศ. 2552 – พ.ศ. 2557 ของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (National Antibiotic Resistance Surveillance of Thailand; NARST) พบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.85 มาเป็น 10.94 และพบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นจุลชีพที่พบบ่อยโดยเป็นสาเหตุของการติดเชื้ออันดับที่ 3 ของเชื้อก่อโรคทั้งหมดที่ตรวจพบ ซึ่งจุลชีพที่พบบ่อยในโรงพยาบาลและมัก

ดื้อยาหลายขนานเป็นอันดับที่ 1 และ 2 คือ เชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ตามลำดับ (6)

การดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* พัฒนาการดื้อยาจากหลายกลไกผ่านทาง โครโมโซมและ พลาสมิด (5) ปัจจุบันพบว่าปัญหาที่สำคัญคือเชื้อ *A. baumannii* มีการดื้อยาด้านจุลชีพหลายขนาน (Multidrug-Resistance, MDR) โดยเกณฑ์ในการจัดว่าเป็นเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิด คือ เชื้อต้องมีการดื้อยาด้านจุลชีพมากกว่า 3 กลุ่มจากยาที่ใช้ทดสอบความไว 5 กลุ่ม ได้แก่ Cephalosporins ( ceftazidime หรือ cefepime) , Carbapenems ( imipenem หรือ meropenem), Ampicillin/sulbactam, Fluoroquinolone ( ciprofloxacin หรือ levofloxacin) และ Aminoglycosides ( gentamicin, tobramycin หรือ amikacin) โดยในช่วงเวลาที่ผ่านมารักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* นิยมใช้ยาในกลุ่ม carbapenem เป็นขนานสุดท้ายภายหลังจากการที่ เชื้อมีการดื้อยากลุ่มอื่นๆที่ใช้ในการรักษา ซึ่งการใช้ยาในกลุ่ม carbapenem ที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นเหตุให้ ปัจจุบันมีการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem เพิ่มมากขึ้น (7) จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ตั้งแต่ พ.ศ. 2541 – พ.ศ. 2560 แสดงให้เห็นว่าความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาในกลุ่ม carbapenem (imipenem, meropenem) ลดลงเรื่อยๆ โดยในปี พ.ศ. 2541 ความไวของของยา imipenem คิดเป็นร้อยละ 98.0 แต่ในปี พ.ศ. 2560 ความไวของยา imipenem ลดลงอย่างมาก เหลือเพียงร้อยละ 29.6 ขณะที่ยา meropenem มีความไวลดลงจากร้อยละ 33.0 ในปี พ.ศ. 2550 เหลือเพียงร้อยละ 30.2 (พ.ศ. 2560) ส่วนยาในกลุ่ม broad-spectrum cephalosporins ได้แก่ ยา ceftazidime ความไวลดลงจากร้อยละ 40 (พ.ศ. 2541) เหลือเพียงร้อยละ 29.6 (พ.ศ. 2560) ส่วนยา cefepime มีความไวลดลงจากร้อยละ 38 (พ.ศ. 2551) เหลือเพียง ร้อยละ 27.6 (พ.ศ. 2560) สำหรับยาในกลุ่ม aminoglycoside ได้แก่ gentamicin และ amikacin มีความไวของยาอยู่ในระดับ ไม่สูงมากนักอยู่ในช่วง ร้อยละ 30.0-39.1 และ 36.0-48.4 ตามลำดับ (พ.ศ. 2541-2560) (6) โดยยา carbapenem เป็นยากลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อนี้ หากมีการดื้อยาในกลุ่มนี้จะทำให้เกิด ความยุ่งยากในการรักษาการติดเชื้อ เนื่องจากเป็นยาขนานสุดท้าย (last resort antibiotic) ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิด (8) ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนยาด้านจุลชีพชนิดใหม่ ซึ่งในปัจจุบันจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อชนิดนี้คือดื้อยาเกือบทุกชนิดที่มีใช้ในการรักษาการติดเชื้อในปัจจุบัน ยกเว้น colistin (9) แต่การใช้ยา colistin นั้นมีผลข้างเคียงที่สูง จึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้รักษาอาการติดเชื้อในระยะยาว (10, 11) แต่อย่างไรก็ตามก็เริ่มมีรายงานถึงสายพันธุ์ที่มีการดื้อยามากขึ้นบ้างแล้ว ในประเทศไทยมีการใช้ยา colistin กันอย่างแพร่หลายจึงทำให้สถานการณ์การดื้อยาอยู่ในขั้นที่น่าเป็นห่วง และจากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าความไวของ



เชื้อ *A. baumannii* ต่อยา colistin เริ่มลดลง โดยในปี พ.ศ. 2559 ความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยา colistin คิดเป็นร้อยละ 99.9 แต่ในปัจจุบันความไวของเชื้อต่อยาเริ่มลดลงเหลือเพียง 99.7 ในปี พ.ศ. 2560 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการต่อยา colistin เกิดขึ้น โดยยา colistin จะเป็นตัวเลือกสุดท้ายในการรักษา *A. baumannii* ที่ต่อยาในกลุ่ม carbapenem แต่เมื่อมีการต่อยา colistin และยังไม่มียาตัวใหม่ผลิตรออกมา การรักษาเชื้อต่อยาจึงเป็นปัญหามาก นอกจากนี้การรักษาเชื้อต่อยายังก่อให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรที่ใช้ในการรักษามากขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากผู้ป่วยต้องรักษาในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานานขึ้น จึงนับว่าเชื้อ *A. baumannii* นี้เป็นเชื้อที่สำคัญที่ควรจะควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อและลดอัตราการก่อโรคในผู้ป่วยอย่างยิ่ง

กลไกการต่อยาของ *A. baumannii* มีความหลากหลายและซับซ้อน เชื้อชนิดนี้ต่อยาโดยพันธุกรรมอยู่แล้วและยังสามารถพัฒนาการต่อยาขึ้นได้อีกในระหว่างการรักษา โดยเชื่อดังกล่าวพัฒนาการต่อยาจากหลายกลไกผ่านทางโครโมโซมและพลาสมิด โดยกลไกการต่อยาหลักๆที่พบใน *A. baumannii* มีทั้งหมด 4 กลไก ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา, การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin, การขับยาออกจากเซลล์, การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา ซึ่งกลไกการต่อยาในเชื้อนี้อาจเกิดเพียงกลไกใดกลไกหนึ่งหรืออาจเกิดขึ้นพร้อมกันในหลายกลไกก็ได้ (12) โดยกลไกการต่อยาที่พบบ่อยและสำคัญที่สุดคือการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา โดยการสร้างเอนไซม์นั้น มีรายงานการสร้างเอนไซม์หลากหลายชนิดด้วยกัน ทั้งที่ทำลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้แก่ Amp-C beta-lactamase, OXA-type carbapenemase และ metallo-beta-lactamase และการทำลายยาในกลุ่ม aminoglycosides เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ beta-lactamase ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างของยาในกลุ่ม beta-lactam บริเวณ ring ทำให้อายาเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีไม่สามารถจับกับ target proteins ซึ่งได้แก่ penicillin-binding proteins (PBPs) ที่อยู่บน cell membrane ของเชื้อ ส่งผลให้อายาไม่สามารถทำงานต่อไปได้ และไม่สามารถออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ ทำให้เชื้อที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase เกิดการต่อยาในกลุ่ม beta-lactam (13) ปัจจุบันเอนไซม์ beta-lactamase สามารถจำแนกตามโครงสร้างระดับโมเลกุล (Molecular Classification) ตามระบบของ Amber ออกเป็น 4 กลุ่มคือ A, B, C และ D โดยเอนไซม์ class B ตำแหน่งออกฤทธิ์ต้องอาศัย  $Zn^{2+}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเรียกเอนไซม์ class นี้ว่า metallo beta-lactamase (MBL<sub>S</sub>) (14) เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งได้ด้วย ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) ตัวอย่างของเอนไซม์ MBL<sub>S</sub> ได้แก่ NDM-1, IMP, SPM, VIM, SIM เป็นต้น (14) ส่วนเอนไซม์ class A, C และ D มีตำแหน่งออกฤทธิ์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine (serine beta-lactamase) โดยยาในกลุ่ม broad spectrum cephalosporins เป็นยาขนานแรกๆที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อและเมื่อเชื้อมีการต่อยาโดยการสร้างเอนไซม์ cephalosporinase ทำให้การรักษาไม่ได้ผลและการต่อยาในกลุ่มนี้จัดเป็นการสร้างเอนไซม์ชนิด class C beta-lactamase ซึ่งการต่อยาโดยการสร้างเอนไซม์ cephalosporinase

ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. (*Acinetobacter*-derived cephalosporinase; ADC) จากรายงานการวิจัยในประเทศอิหร่าน พบว่าการดื้อยาแบบ MDR *A. baumannii* นั้นตรวจพบยีน  $bla_{ADC}$  ในทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (15) รวมถึงมีการรายงานการตรวจพบ  $bla_{ADC}$  ในประเทศมาเลเซีย (16) และเนปาล (17) และยากลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษา *A. baumannii* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดคือ ยา carbapenem เอนไซม์ beta-lactamase ที่เกิดจากการดื้อยา carbapenem นี้จะมีชื่อเรียกว่า carbapenemase โดยในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่สำคัญมี 2 ชนิดได้แก่ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamases (CHDLs) และ metallo-beta-lactamases (MBLs) (7) โดยเอนไซม์กลุ่ม CHDLs พบได้บ่อยในเชื้อ *Acinetobacter* spp. สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้มากกว่า 10 กลุ่ม แต่ที่พบบ่อยในเชื้อ *A. baumannii* ได้แก่  $bla_{OXA-23}$  like ,  $bla_{OXA-24/40}$  like ,  $bla_{OXA-51}$  like และ  $bla_{OXA-58}$  like (8) จากการศึกษาหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ CHDLs (OXA) ในแต่ละภูมิภาคในโลกจะให้ผลที่แตกต่างกันออกไป สำหรับการศึกษาในประเทศไทยยังมีการรายงานไม่มากนักและสายพันธุ์ที่ศึกษามีจำนวนน้อย โดยที่มีรายงานได้แก่  $bla_{OXA-23}$ ,  $bla_{OXA-24}$  และ  $bla_{OXA-51}$  (18, 19) มีรายงานการพบ  $bla_{OXA-72}$  และ  $bla_{OXA-58}$ -like แต่พบน้อย (20, 21) และการศึกษาการสร้างเอนไซม์ MBLs ได้แก่  $bla_{NDM-1}$  พบมีการรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 จากชาวยุโรปที่เดินทางมาทำศัลยกรรมความงามที่ประเทศอินเดียและติดเชื้อดื้อยาที่มียีน  $bla_{NDM-1}$  กลับไปและเกิดการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาอย่างรวดเร็ว (22) ต่อมาในปี พ.ศ. 2553 พบว่ามี การรายงานการแพร่กระจายของยีน  $bla_{NDM-1}$  กว่า 40 ประเทศทั่วโลก (23-27) และเริ่มพบการ รายงานการพบยีน  $bla_{NDM-1}$  ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้งในสาธารณรัฐประชาชนจีน, เยอรมัน, อียิปต์, โอมาน และ อิสราเอล (28-30) ซึ่งในประเทศไทยประสบปัญหาเรื่องเชื้อแบคทีเรียที่มี  $bla_{NDM-1}$  เช่นกัน แต่สำหรับในประเทศไทยนั้นยังมีการรายงานการพบยีน  $bla_{NDM-1}$  ในเชื้อ *A. baumannii* ไม่มากนัก จากงานวิจัยของอดุลลักษณ์และคณะที่ศึกษาเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 339 ตัวอย่าง พบยีน  $bla_{NDM-1}$  จำนวน 31 ตัวอย่าง (31)

ในส่วนของการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside-modifying enzymes ที่มีผลต่อการดื้อยา กลุ่ม aminoglycosides นั้นจะมีการเติม acetyl, adenyl หรือ phosphate เข้าไปในโครงสร้างของ ยา ทำให้ยาออกฤทธิ์ไม่ได้ โดยยีนดื้อยาดังกล่าวสามารถส่งผ่านทาง plasmid หรือ transposon และ ส่วนใหญ่พบว่ายีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside-modifying enzymes คือ ยีน *aphA6* ซึ่งยังไม่มีการรายงานพบยีน *aphA6* จากเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศไทย แต่พบ การรายงานการพบยีน *aphA6* ในประเทศอิหร่าน (15) และ เนปาล (17)

นอกจากนี้ยังพบว่า ISAbc อาจจะมีผลทำให้ช่วยส่งเสริมให้มีการแสดงออกของยีนดื้อยาเพิ่ม มากขึ้น โดยเฉพาะ ISAbc1 และ ISAbc125 ที่พบได้บ่อยและมากที่สุดในเชื้อ *A. baumannii* (32)

ด้วยเหตุนี้ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาความชุกของยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ beta-

lactamase 3 ยีน ได้แก่ *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม carbapenem และ cephalosporin ซึ่งเป็นยากลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* และในงานวิจัยครั้งนี้ยังทำการศึกษาความชุกของยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ aminoglycoside-modifying enzymes 1 ยีน ได้แก่ *aphA6* รวมถึงหาความสัมพันธ์ของ insertion sequence (IS) ได้แก่ *ISAb<sub>125</sub>* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อในแต่ละตัวอย่าง ด้วยวิธี repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) จะทำให้ทราบการดื้อยาของแบคทีเรียที่เกิดจากการแพร่กระจายของยีนดื้อยาจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่งหรือเป็นการระบาดจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน (clonal spread) และสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อภายในหออภิบาลผู้ป่วยในโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังช่วยในการจัดการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาลต่อไปในอนาคต

## 1.2 คำถามงานวิจัย

1.2.1 ความชุกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* และ *ISAb<sub>125</sub>* ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคเหนือตอนล่าง มีความแตกต่างกันหรือไม่

1.2.2 เชื้อ *A. baumannii* ที่ตรวจพบยีนดื้อยาต่างๆกัน ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคเหนือตอนล่างมีความสัมพันธ์กันเชิงพันธุกรรมหรือไม่

## 1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาความชุกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* และ *ISAb<sub>125</sub>* ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคเหนือตอนล่างจำนวน 1 แห่ง

1.3.2 เพื่อศึกษารูปแบบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมที่แยกได้จากเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems, cephalosporins และ aminoglycoside ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคเหนือตอนล่างจำนวน 1 แห่ง

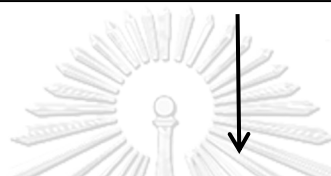
## 1.4 สมมติฐานงานวิจัย

1.4.1 ความชุกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* และ *ISAb<sub>125</sub>* ของเชื้อ *A. baumannii* แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคเหนือตอนล่าง มีความแตกต่างกัน

1.4.2 เชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตเหนือตอนล่าง ที่ตรวจพบยีนดื้อยาเหมือนกัน น่าจะมีความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

### 1.5 กรอบแนวคิดของการวิจัย

เชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจและผ่านการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้ค่าอ้างอิงตามมาตรฐานของสถาบันมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) และค่าอ้างอิงตามมาตรฐานของคณะกรรมการยุโรปสำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) จากห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเขตภาคเหนือตอนล่าง



ยีน (*bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)



วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA Sequencing



ศึกษาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ด้วยเทคนิค Repetitive Sequence-based Polymerase Chain. Reaction (rep-PCR)

## 1.6 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental Research) ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกัน จำนวน 257 ตัวอย่าง สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ได้แก่ เสมหะ ปัสสาวะ หนองเลือด ขึ้นเนื้อ น้ำจากการเจาะหลอดลม และน้ำล้างปอด ที่ส่งเพาะเชื้อที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 1 แห่ง ระหว่างเดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561 ถึง กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 โดยศึกษาความชุกของยีนดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenem, cephalosporin และ aminoglycosides ได้แก่ *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *ISAba125* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR)

## 1.7 สถานที่ทำการศึกษาวิจัย

อาคารจุฬาพัฒน์ 14 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 1.8 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1.8.1 ทราบชนิดของเอนไซม์ carbapenemase ของยีน beta-lactamase และยีนดื้อยา aminoglycoside ใน *A. baumannii* รวมถึงยีนดื้อยา cephalosporin ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems, cephalosporins และ aminoglycosides ในประเทศไทย รวมถึงรูปแบบความไวต่อสารต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียดื้อยาและความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดยีนดื้อยา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการรักษาผู้ป่วยและเฝ้าระวังการระบาดของยีนหรือเชื้อดื้อยานี้ในโรงพยาบาล

1.8.2 ข้อมูลที่ได้นี้จะ เป็นแนวทางในควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ ไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นในโรงพยาบาล เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์สามารถเคลื่อนที่ไปสู่แบคทีเรียตัวอื่นทำให้ได้รับยีนดื้อต่อยาเช่นกันจึงทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อเพิ่มมากขึ้น

1.8.3 จะเป็นข้อมูลให้แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ตระหนักในการเลือกใช้ยาในการรักษา

## บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) และสถานการณ์โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

การติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) หมายถึง การติดเชื้อของผู้ป่วยขณะที่เข้ารับการรักษาอยู่ในโรงพยาบาล โดยที่ผู้ป่วยไม่มีอาการติดเชื่อนั้นมาก่อนหรือไม่ได้อยู่ในระยะฟักตัวของโรคนั้นๆ ขณะเริ่มเข้ารับการรักษา ในโรงพยาบาล ซึ่งอาการของการติดเชื่อนั้นอาจแสดงให้เห็นในขณะที่ผู้ป่วยกำลังรับการรักษาอยู่ในโรงพยาบาล และยักรวมถึงผู้ป่วยที่ออกจากโรงพยาบาลแล้วแต่มีอาการแสดงในช่วงระยะฟักตัวของโรคดังกล่าว กรณีที่ไม่ทราบระยะฟักตัวให้กำหนดระยะเวลาการติดเชื้อที่เกิดขึ้นภายหลังเข้ารับการรักษา ในโรงพยาบาลไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง (33, 34)

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ เนื่องจากผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงหลายประการต่อการติดเชื้อและปัจจัยเหล่านี้ยังมีผลต่อการฟื้นตัวจากโรคด้วย เช่น ผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยเด็กคลอดก่อนกำหนดน้ำหนักตัวน้อย ผู้ป่วยโรคมะเร็ง หรือโรคทางภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนอวัยวะหรือปลูกถ่ายอวัยวะซึ่งต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น และเชื้อก่อโรคมักติดต่อยาปฏิชีวนะชั้นพื้นฐาน เมื่อมีการติดเชื้อในโรงพยาบาล มักจะต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่มีราคาแพงรวมทั้งยาอื่นๆ ที่จำเป็นในการประคับประคองผู้ป่วยในภาวะวิกฤติ การใช้อุปกรณ์ทางการแพทย์ การติดเชื้อในโรงพยาบาลไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อที่อวัยวะใด จึงย่อมมีผลทำให้ผู้ป่วยต้องอยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น อาจมีโอกาเสียชีวิตมากขึ้น และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก

สมหวังและคณะ (35, 36) ได้รายงานสถานการณ์โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในปี พ.ศ.2548 โดยได้ทำการศึกษา จากโรงพยาบาลทั่วประเทศจำนวน 20 โรงพยาบาล พบว่าการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบมากที่สุด คือ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง รองลงมาคือการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อแผลผ่าตัด คิดเป็นร้อยละ 36.1, 25.5 และร้อยละ 11.0 ตามลำดับ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบมาก คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *Enterococci* (ตารางที่ 1) (35, 36)

ภานุมาศและคณะ (37) ได้รายงานข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาลในปี พ.ศ. 2553 จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย โรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป โรงพยาบาลชุมชน และโรงพยาบาลเอกชน จำนวน 1,023 รพ. โดยพบการติดเชื้อในโรงพยาบาล 268,628 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 3.98 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล และพบว่าเป็นการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ

87,751 ครั้ง (ตารางที่ 2) และเป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาลจากแบคทีเรียที่สำคัญ 5 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ซึ่งการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่เกิดจากเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ พบว่ามีจำนวน 87,751 ครั้ง ทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อมีจำนวนต้องอยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้นประมาณ 3.24 ล้านวัน มีผู้ป่วยติดเชื้อมีจำนวนเสียชีวิต 38,481 ราย ดังนั้น โรงพยาบาล หน่วยงาน และบุคลากรทางแพทย์จึงให้ความสำคัญกับโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยมีการกำหนดแผนและนโยบายดำเนินการป้องกันและควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลให้มีประสิทธิภาพเพื่อประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วย ลดทรัพยากร และงบประมาณต่างๆ (37)

ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2543-2553) พบว่า ทั่วโลกมีการใช้ยาปฏิชีวนะในมนุษย์เพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 36 และที่น่ากังวล คือ การใช้ยา carbapenems และ polymyxins เพิ่มขึ้นร้อยละ 45 และ 13 ตามลำดับ โดยยาทั้งสองชนิดนี้คือยากลุ่มสุดท้ายสำหรับการรักษาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาชนิดรุนแรง (highly resistant bacteria) (38)

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศไทย  
ปี พ.ศ. 2544 (39)

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	อุบัติการณ์ (ร้อยละ)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22-31
<i>Escherichia coli</i>	11-18
<i>Proteus spp.</i>	6-13
<i>Enterobacter spp.</i>	6-9
<i>Staphylococcus aureus</i>	5-17
<i>Klebsiella spp.</i>	5-14
<i>Enterococci</i>	2-8

ตารางที่ 2 การติดเชื้อในโรงพยาบาลและการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ พ.ศ. 2553 (37)

ประเภท โรงพยาบาล	การติดเชื้อใน โรงพยาบาล (ครั้ง)	ร้อยละของการ ติดเชื้อใน โรงพยาบาล	การติดเชื้อ กลุ่มเป้าหมาย 5 ชนิด (ครั้ง)	การติดเชื้อดื้อ ยา ต้านจุลชีพ (ครั้ง)
รพ.มหาวิทยาลัย	24,480	7.60	13,743	7,997
รพ.ศูนย์และรพ. ทั่วไป	155,725	5.34	87,423	50,870
รพ.ชุมชน	64,143	2.07	36,009	20,953
รพ.เอกชน	24,280	4.90	13,631	7,932
<b>รวม</b>	<b>268,628</b>	<b>3.93</b>	<b>150,806</b>	<b>87,751</b>

## 2.2 เชื้อที่เป็นสาเหตุก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

เชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่เป็นปัญหาสำคัญลำดับแรกในปัจจุบันคือ *A. baumannii* เนื่องจากเชื้อมักดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดที่มีใช้ในปัจจุบัน ทำให้ต้องใช้ยา colistin ซึ่งเป็นยาเก่าที่เลิกใช้ไปแล้ว โดยยานี้มีผลข้างเคียงต่อร่างกายมนุษย์มาก เชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่มีความสำคัญถัดจากเชื้อ *A. baumannii* คือ เชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งมีความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอดได้ แม้ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหารหรือไม่เหมาะสมกับการดำรงชีพ เชื้อสองชนิดนี้เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยที่สุด สามารถที่จะกลายพันธุ์ให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้อย่างกว้างขวางและรวดเร็ว เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นปัญหาอย่างมากอีกกลุ่มหนึ่งคือ เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ Extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) ซึ่งพบว่ามีความชุกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาการติดเชื้อน้อยมีประสิทธิภาพมีให้เลือกใช้ไม่มากนัก และมักใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างขวางมาก เช่น ยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่ ยา imipenem, meropenem หรือ ertapenem เมื่อมีการใช้ยาในกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง ย่อมส่งผลกระทบต่อทำให้มีความชุกของเชื้อ *A. baumannii* และเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา กลุ่ม carbapenems ตลอดจนยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเชื้อ *A. baumannii* กำลังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยและทั่วโลก เนื่องจากทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูงจากการที่เชื้อสามารถดื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบหลายชนิดได้อย่างรวดเร็วด้วยกลไกที่หลากหลาย เช่น การสร้างเอนไซม์ beta-lactamase การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin การขับยาออกจากเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา

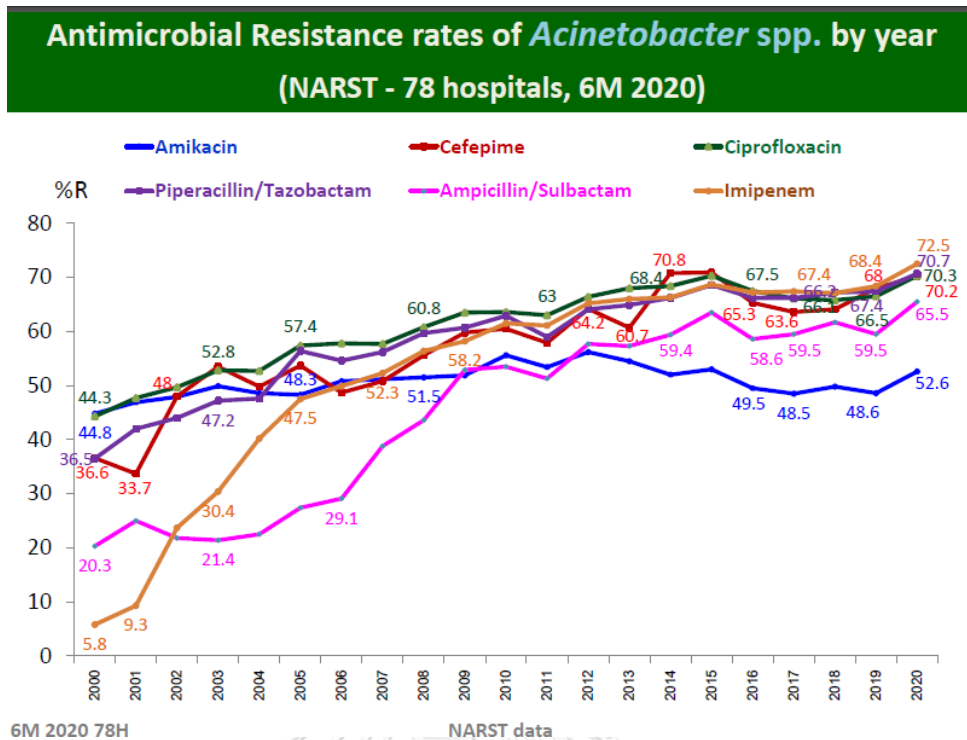


## 2.3 ปัจจัยเสี่ยงและการติดเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในหลายระบบ ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *A. baumannii* ได้แก่ ผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ (ventilator-associated pneumonia) ผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน ผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในหอผู้ป่วยวิกฤติ (intensive care unit; ICU) รวมไปถึงการใส่สายสวนเข้าไปในร่างกาย การก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* ส่วนมากสัมพันธ์กับการได้รับเชื้อภายในโรงพยาบาล (hospital-acquired infection ; HAI) ชินวัฒน์ ศรีใส และคณะ (40) ได้ทำการศึกษาสาเหตุของการติดเชื้อในหอผู้ป่วยหนักทารกแรกเกิด โรงพยาบาลร้อยเอ็ด ปี พ.ศ.2554 จากการติดเชื้อทั้งหมด 9 ราย เป็นการติดเชื้อปอดอักเสบจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ (ventilator-associated pneumonia) พบผู้ป่วยเสียชีวิต 5 ราย และสาเหตุที่ก่อให้เกิดการระบาดคือการปนเปื้อนเชื้อบริเวณอุปกรณ์ที่สัมผัสหลายแห่ง ได้แก่ ตู้อบ ที่จับประตู ตะกร้า ยาฉีด และกะละมังอาบน้ำ (40) ซึ่งโรคปอดบวมจากการติดเชื้อ มักเกี่ยวข้องกับการที่ผู้ป่วยใช้เครื่องช่วยหายใจ และเชื้อมีการ colonize ที่บริเวณทางเดินหายใจ จนเป็นผลให้เกิดปอดบวมในที่สุด (41) และพบว่าโรคปอดบวมจากการติดเชื้อ *A. baumannii* มีอัตราการตายถึงร้อยละ 40-70 (42)

นอกจากนี้การติดเชื้อ ในกระแสเลือด (bloodstream infections) ของเชื้อ *A. baumannii* ส่วนใหญ่มักพบในผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในหอผู้ป่วยหนัก (43) และยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ เช่น ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง การใช้เครื่องช่วยหายใจ การใช้ยาต้านจุลชีพเป็นเวลานาน การมีเชื้อ colonize ที่ผิวหนังจากการเกิดแผล หรือการติดเชื้อในทางเดินหายใจมาก่อน (44, 45) ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยส่งเสริมให้มีการรุกรานของเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด การติดเชื้อบริเวณบาดแผล เช่น บริเวณแผลไฟไหม้ การ colonize ของเชื้อที่บริเวณดังกล่าวและเกิดการรุกรานไปยังชั้นใต้ผิวหนังและสามารถกระจายไปสู่กระแสเลือดได้ (46, 47) ส่วนการติดเชื้อทางเดิน ปัสสาวะ จะสัมพันธ์กับผู้ป่วยเพศหญิงที่มีการคาสายสวนปัสสาวะ และนอนรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน (48, 49) ทำให้มีโอกาสเกิดการวยไตอักเสบและติดเชื้อในกระแสเลือด ตามมา ส่วนปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) ในกระแสเลือด ได้แก่ การที่ผู้ป่วยอยู่หอวิกฤต ผู้ป่วยมีสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การมีประวัติใช้ยาปฏิชีวนะ (50)

จากการรวบรวมข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antibiotic Resistance Surveillance of Thailand; NARST) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในระหว่างปี พ.ศ. 2543-2562 แสดงดังรูปที่ 1 พบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. นับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทยมากที่สุดอย่างหนึ่งในปัจจุบัน จากรายงานดังกล่าว พบว่าเชื้อชนิดนี้มีอัตราการความชุกของเชื้อที่ดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้นอย่างก้าวกระโดด โดยเฉพาะการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems และยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งเชื้อชนิดนี้มักดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มอื่นอีกหลายกลุ่มร่วมด้วย (6)



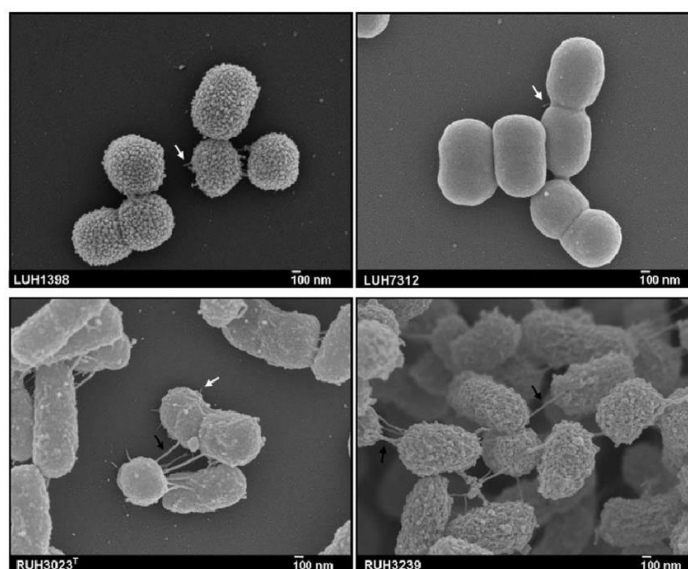
รูปที่ 1 แนวโน้มอัตราการดื้อยาของเชื้อ *Acinetobacter* spp. (6)

## 2.4 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *A. baumannii*

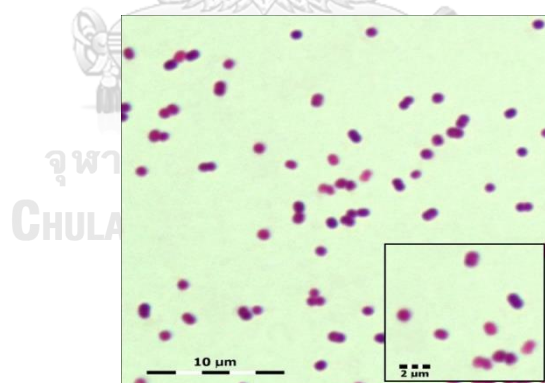
เชื้อ *A. baumannii* จัดอยู่ใน genus *Acinetobacter* เดิมจัดอยู่ในแฟมิลี *Neisseriaceae* แต่ปัจจุบันย้ายออกมาอยู่ในแฟมิลีใหม่ คือ แฟมิลี *Moraxellaceae* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งขนาดเล็กคล้ายรูปกลม (cocci) มีขนาดประมาณ 0.7x1.0 ไมครอน (รูปที่ 2 และรูปที่ 3) เป็นแบคทีเรียชนิด strictly aerobic ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ให้ผลลบในการทดสอบ oxidase test ไม่พบการสร้างเม็ดสี มี encapsulated ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียชนิดที่ไม่สามารถสลายน้ำตาล glucose ได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จึงเรียกว่าแบคทีเรียแกรมลบชนิด non-fermentative Gram negative bacilli (NFB) การจำแนกเชื้อชนิดนี้โดยอาศัยโครงสร้างทางพันธุกรรม แบ่งเชื้อออกได้ 25 สปีชีส์ (genomospecies) แต่มีเพียง 10 สปีชีส์ ที่ได้รับการตั้งชื่อ การจำแนกเชื้อแต่ละสปีชีส์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี รูปร่างและลักษณะโคโลนีของ เชื้อ *A. baumannii* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar (BA) และ MacConkey agar (MC) (51)

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่างๆ ในโรงพยาบาล เช่น ปอดอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องช่วยหายใจ (ventilator-associated pneumonia, VAP) การติดเชื้อในกระแสเลือด ภาวะลิ้นหัวใจติดเชื้อ (endocarditis) การติดเชื้อที่ผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งพยาธิสภาพของโรครุนแรง เนื่องจากแบคทีเรียดื้อยาที่ใช้ในการรักษาทำให้ถูกทำลายและกำจัดได้ยาก มีการ

รายงานอุบัติการณ์การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *A. baumannii* เพิ่มสูงขึ้นในประเทศไทย (52, 53) โดยอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2-4 เป็นร้อยละ 10-30 พบมากในหออภิบาลผู้ป่วย (5)



รูปที่ 2 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *A. baumannii* จากกล้อง scanning electron microscope (54)

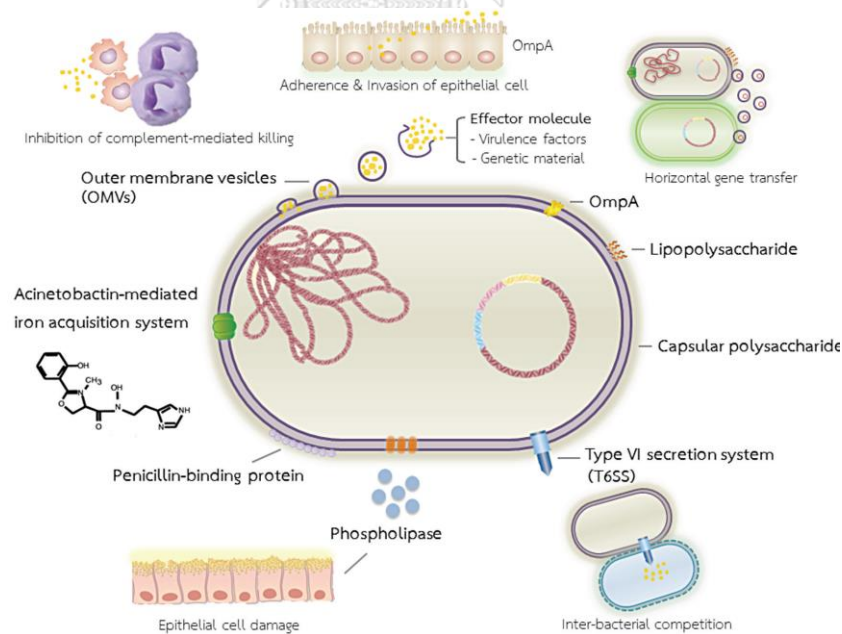


รูปที่ 3 รูปร่างและลักษณะ Gram's stain ของเชื้อ *A. baumannii* จากกล้องจุลทรรศน์ (55)

## 2.5 กลไกการก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii*

การก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* และความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ทั้งตัวมนุษย์และตัวเชื้อโดยเฉพาะ virulence factors จากตัวเชื้อ virulence factors ที่สำคัญของเชื้อชนิดนี้ได้แก่ outer membrane vesicles (OMVs) เป็นถุงที่เชื้อสร้างจากเยื่อหุ้มเซลล์ส่วน outer membrane (รูปที่ 4) โดยข้างในถุงจะมีการบรรจุสารมหโมเลกุลจากส่วนต่างๆของเซลล์ เช่น outer

membrane protein, periplasmic proteins, phospholipids และ lipopolysaccharide ที่เกี่ยวข้องเป็นปัจจัยในการทำให้เกิดโรค เป็นต้น นอกจากนั้นในถู้งดังกล่าวยังมีการบรรจุสารพันธุกรรม ทำให้เกิดการส่งต่อยีนต่างๆไปยังเซลล์แบคทีเรีย (horizontal gene transfer) (56) ปัจจัยความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคที่พบบริเวณผนังเซลล์ที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน OmpA ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็น beta-barrel ที่พบใน *A. baumannii* เกือบทุกสายพันธุ์ และมี biological properties ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) โดย OmpA สามารถทำลายเซลล์บริเวณทางเดินหายใจในระหว่างการติดเชื้อ กลไกนี้เกิดจากการที่ OmpA สามารถเคลื่อนที่ไปยังไมโทคอนเดรียของ host cells และกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (57) และยังมีการศึกษาอื่นซึ่ง รายงานว่า OmpA มีส่วนช่วยให้เกิดการเกาะติด (adherence) การรุกราน (invasion) ของเชื้อใน epithelial cell ส่งเสริมให้เชื้อสามารถกระจายได้ และก่อโรคปอดบวมตามมา (58) และเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่สร้าง OmpA ยังมีกระบวนการหลบหลีกภูมิคุ้มกันโดยทำให้ไม่เกิดการกระบวนการทำลายแบคทีเรีย แบบ complement-mediated killing (59) นอกจากนั้นเชื้อ *A. baumannii* ยังมีการสร้าง virulence factors ชนิดอื่นๆ เช่น Lipopolysaccharide (LPS), Capsular polysaccharides (CPS) และ Penicillin-binding proteins (PBPs) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (รูปที่4)



รูปที่ 4 ปัจจัยความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *A. baumannii* (60)

## 2.6 การรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii*

การรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ยังคงต้องใช้ยาต้านจุลชีพเป็นหลัก ร่วมกับการรักษาประคับประคองอื่นๆ (5) การเลือกใช้ยาที่ครอบคลุมเชื้อแต่แรกยังคงมีความสำคัญ การรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* มีความซับซ้อนมากขึ้นเนื่องจากพบอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานที่ค่อนข้างสูง (Multidrug-Resistance, MDR-AB) ซึ่งยาต้านจุลชีพที่สามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* มีทั้งที่เป็นยาเดี่ยว คือ imipenem, meropenem, ampicillin/sulbactam, amikacin, polymyxin B, colistin, sulbactam, tigecycline และยาผสมที่เสริมฤทธิ์กัน (antibiotic combination therapy) เช่น rifampicin ร่วมกับ colistin หรือ imipenem ; imipenem หรือ meropenem ร่วมกับ aminoglycosides (5) โดยปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาส่วนใหญ่มีดังนี้

### 2.6.1 Sulbactam

มีฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อ *A. baumannii* จึงมีการนำยา ampicillin/sulbactam และ cefoperazone/sulbactam มาใช้ในการรักษา มีการศึกษาผู้ป่วยติดเชื้อ multidrug resistance *A. baumannii* ที่ได้รับยา ampicillin/sulbactam ขนาด 18 กรัม/9 กรัมต่อวัน จำนวน 14 ราย พบว่าผู้ป่วย 9 ราย มีการตอบสนองทางคลินิกดีขึ้น และ 12 ราย มีผลเพาะเชื้อเปลี่ยนเป็นลบ สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับ ampicillin/sulbactam ขนาด 24 กรัม/8 กรัมต่อวัน จำนวน 13 ราย พบว่าผู้ป่วย 8 ราย มีอาการทางคลินิกดีขึ้น และมีผลเพาะเชื้อเปลี่ยนเป็นลบ (61) ในส่วนของ cefoperazone/sulbactam มีการศึกษาในผู้ป่วย 20 ราย ที่ติดเชื้อ multidrug resistant *A. baumannii* ที่เยื่อหุ้มหัวใจโดยให้รับยา cefoperazone/sulbactam ขนาด 2 กรัม/2 กรัม ทุก 8 ชั่วโมง พบว่า ผู้ป่วย 19 ราย มีการตอบสนองทางคลินิกดี โดยมีอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา คือ ผื่นคันเพียง 1 ราย (62) ดังนั้น sulbactam จึงถือเป็นยาที่มีประสิทธิภาพปานกลางในการรักษา multidrug resistance *A. baumannii*

### 2.6.2 Imipenem

จัดเป็นยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาหลักที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ในอดีต อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบว่าเชื้อมีความไวต่อยาลดลงจากการมีกลไกการดื้อยาที่หลากหลาย จากกรณีศึกษาของโรงพยาบาลในประเทศสเปน ในผู้ป่วยติดเชื้อ *A. baumannii* ที่รอดจากการใช้เครื่องช่วยหายใจที่มีความไวต่อ imipenem จำนวน 14 ราย และได้รับการรักษาด้วย imipenem-cilastatin ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำขนาด 2-3 กรัมต่อวัน ผลการรักษาพบว่า ผู้ป่วย 8 ราย มีอาการทางคลินิกดีขึ้น (ร้อยละ 57) (63) มีการศึกษา in vitro เพื่อประเมินค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชพลศาสตร์ซึ่งเกี่ยวข้องกับระยะเวลาของการให้ meropenem โดยใช้เชื้อ *A. baumannii* พบว่า การให้ meropenem ขนาด 1 กรัม ทุก 8 ชั่วโมง หยดเข้าหลอดเลือด

ตัวอย่างต่อเนื่องนาน 3 ชั่วโมง จึงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีที่สุด (64) ในกรณีนี้ที่เชื้อมีความไวต่อ imipenem สามารถเลือกใช้ยานี้ได้ เนื่องจากยามีประสิทธิภาพปานกลางและมีความปลอดภัยสูง แต่ไม่ควรใช้แบบครอบคลุมเชื้ออย่างกว้างๆในพื้นที่ที่เชื่อมีการดื้อยาสูง

### 2.6.3 Colistin

จัดเป็นยาเก่าในกลุ่ม polymyxins ปัจจุบันมีการนำยานี้กลับมาใช้ใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา ผลการศึกษาทางคลินิกของโรงพยาบาลศิริราชในผู้ป่วยจำนวน 78 ราย ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานที่ปอด กระแสเลือด ช่องท้อง ระบบทางเดินปัสสาวะ ผิวหนัง และไซนัสอักเสบ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยา colistimethate ขนาด 2.5-5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำโดยแบ่งให้วันละ 1-2 ครั้ง พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 80.8 และ 94.9 มีอาการแสดงทางคลินิกของการติดเชื้อหายไปและผลการเพาะเชื้อเปลี่ยนเป็นลบ ตามลำดับ โดยอาการไม่พึงประสงค์หลักที่เกิดขึ้นจากการใช้ colistimethate คือ ความเป็นพิษต่อไต (ร้อยละ 30.8) ซึ่งปัจจัยเสี่ยงในการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการใช้ colistimethate ได้แก่ โรคไตเสื่อมเรื้อรังและภาวะพร่องสารน้ำ (65)

### 2.6.4 Tigecycline

เป็นยาต้านจุลชีพที่มีโครงสร้างใหม่ที่เรียกว่า glycylicyclines ซึ่งดัดแปลงมาจากยาในกลุ่ม tetracyclines พบว่ายานี้มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแกรมบวกและแกรมลบรูปแท่งที่ดื้อต่อยาหลายชนิด ข้อมูลการศึกษา *in vitro* จากโรงพยาบาลศิริราช พ.ศ. 2549 (66) พบว่าร้อยละ 97.3 ของ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน (MDR-AB) นั้นไวต่อยา tigecycline มีรายงานการใช้ tigecycline ในผู้ป่วยปอดอักเสบจากการใช้เครื่องช่วยหายใจที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน จำนวน 27 ราย ที่ประเทศเกาหลี พบว่ามีเพียง 17 ราย ที่มีอาการทางคลินิกดีขึ้น (67)

สำหรับการใช้ยาผสมเพื่อเสริมฤทธิ์กัน การศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วย 10 ราย ที่ติดเชื้อ carbapenem-resistant *A. baumannii* และได้รับการรักษาด้วย rifampicin ร่วมกับ imipenem พบว่า ผู้ป่วย 5 ใน 10 ราย หายจากการติดเชื้อ ส่วนผู้ป่วย 3 ราย เสียชีวิต (68) การใช้ยาผสมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในกรณีที่เชื่อมีการดื้อยาสูง

## 2.7 กลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* มีกลไกการดื้อยาต้านจุลชีพหลายกลไก โดยบางสายพันธุ์อาจมีกลไกการดื้อยามากกว่าหนึ่งกลไก ทั้งนี้เชื่อยังสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยกระบวนการ horizontal gene transfer ผ่านทางพลาสมิด integrons transposons หรือ prophage จึงทำให้เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน (multidrug-resistance *A. baumannii*, MDR-AB) กลไกการดื้อยาต้านจุลชีพส่วนมากที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงใน *A. baumannii* คือ 1. การสร้างเอนไซม์ทำลายยา

ด้านจุลชีพ 2. กลไกการลดการนำยาเข้าเซลล์ 3. การขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pumps) และ 4. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายในการจับของยา โดยกลไกแรกเป็นการสร้างเอนไซม์ทำลายยา ด้านจุลชีพ เช่น การสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ซึ่งสามารถทำย่อยหรือทำลายยา penicillins cephalosporins และ carbapenems (69, 70) โดยเอนไซม์ beta-lactamase สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ class A, B, C และ D ซึ่งเอนไซม์ใน class A, C และ D เป็นเอนไซม์จำพวก serine protease มีตำแหน่งออกฤทธิ์เป็นกรดอะมิโน serine และจะใช้หมู่ไฮดรอกซิลของ serine ทำปฏิกิริยากับ beta-lactam ring แล้ววงแหวนจะถูกแตกพันธะเอไมด์ เป็นผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ส่วนเอนไซม์ใน Class B จัดเป็น metallo-beta-lactamase สามารถทำลาย beta-lactam ring โดยอาศัยโลหะ (zinc ion) (71, 72) สำหรับเชื้อ *A. baumannii* พบความชุกของยีนใน class D beta-lactamase หรือ oxacillinases (class D OXA type) มากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยเฉพาะในเชื้อ CRAB (50, 73) ปัจจุบันเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 4 subgroups ได้แก่ subgroup 1 เช่น OXA-23, -27 และ -49, subgroup 2 เช่น OXA-24, -25, -26 และ -40, subgroup 3 เช่น OXA-51 และสุดท้าย subgroup 4 เช่น OXA-58 (74) โดยยีน OXA-51 เป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซมของเชื้อ *A. baumannii* และพบได้โดยทั่วไป ซึ่งเอนไซม์ OXA- 51 สามารถทำลายยาในกลุ่ม penicillins (benzylpenicillin, ampicillin, ticarcillin และ piperacillin) และ carbapenems (imipenem และ meropenem) (75) จากการศึกษาในสาธารณรัฐเกาหลี สาธารณรัฐประชาชนจีน และ ประเทศไทย พบความชุกของยีน OXA-23 มากที่สุด ส่วนในประเทศได้หวั่นพบยีน OXA-58 และ OXA-24 เป็นส่วนใหญ่ (50, 76) กลไกที่สองคือการลดการนำยาเข้าเซลล์ของเชื้อ *A. baumannii* ตัวอย่างเช่น ยากลุ่ม beta-lactams ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงเนื่องจากยามีคุณสมบัติละลายน้ำ (hydrophilic) แต่เซลล์เมมเบรนมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) จึงจำเป็นต้องมีช่องทางให้ยาเข้าสู่เซลล์ โดยผ่านโปรตีนที่เรียกว่า porin ซึ่งเชื้อสามารถลดการสร้างโปรตีน porin ทำให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง จึงเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพตามมา (77) กลไกที่สามคือการขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pumps) อาศัยกลุ่มโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์ เพื่อลดระดับยาภายในเซลล์ โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น efflux pump สามารถขับยาออกนอกเซลล์ได้หลายชนิด เช่น โปรตีน AdeABC สามารถขับยาในกลุ่ม Beta-lactams, Fluoroquinolones, Aminoglycosides, Tetracyclines และ Glycylcyclines เป็นต้น (78) และกลไกสุดท้ายที่พบคือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายในการจับของยา ซึ่งพบว่าเชื้อ *A. baumannii* สามารถใช้กลไกนี้ในยาต้านจุลชีพกลุ่ม Beta-lactams, Fluoroquinolones และ Polymyxins เป็นต้น (78) โดยปกติเชื่อจะมีการสร้าง Penicillin binding protein (PBP) เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์และเป็นเป้าหมายของยาต้านจุลชีพ เชื้อสามารถเปลี่ยนแปลง



โครงสร้างของ PBP เป็นชนิดใหม่ เช่น PBP2 ยาจึงไม่สามารถจับได้ จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อได้ (79)

## 2.8 อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทยพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่พบว่ามี การติดเชื้อในโรงพยาบาลมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยในช่วง 15 ปีที่ผ่านมาพบว่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2 - 4 เป็นร้อยละ 10 - 30 (5) จากรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (National Antimicrobial Resistant Surveillance in Thailand : NARST) ระหว่างปี พ.ศ. 2552 - พ.ศ. 2557 พบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.85 มาเป็น 10.94 และพบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นจุลชีพที่พบบ่อยโดยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในอันดับที่ 3 ของเชื้อก่อโรคทั้งหมดที่ตรวจพบ (6) โดยในปี พ.ศ. 2562 พบว่าเชื้อในกลุ่ม *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex มีความไวต่อยา ampicillin/sulbactam, imipenem, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, amikacin, gentamicin และ cefepime เท่ากับร้อยละ 33.0, 29.8, 29.7, 28.3, 49.4, 39.6 และ 29.3 ตามลำดับ (6) โดยแนวโน้มการดื้อยาของเชื้อตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550-2562 แสดงให้เห็นว่าความไวต่อยา imipenem และ amikacin ลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่ความไวของเชื้อต่อยา piperacillin/tazobactam, ampicillin/sulbactam, ciprofloxacin และ cefepime น้อยกว่าร้อยละ 50 ซึ่งถือว่าเป็นความไวต่อยาที่ค่อนข้างต่ำ

นอกจากนี้ผลการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลศิริราช ปี พ.ศ. 2545 พบว่าร้อยละ 57 ของเชื้อเป็น pan-drug-resistance *Acinetobacter baumannii* (PDR-AB) โดยเชื้อ PDR-AB มีอุบัติการณ์การดื้อยา cotrimoxazole, gentamicin, amikacin, piperacillin, imipenem, meropenem, piperacillin/ tazobactam, ceftazidime, cefpirome, cefoperazone/sulbactam และ ciprofloxacin ยกเว้นยา colistin (80) การศึกษาในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ในปี พ.ศ. 2546 พบว่าเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพทุกขนานในยาทุกกลุ่มที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* (Pandrug-Resistant, PDR-AB) และเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 1 ขนานในยาอย่างน้อย 3 กลุ่มที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* (Multidrug-Resistant, MDR-AB) ร้อยละ 46 และ 23 ตามลำดับ (81) จากข้อมูลการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่โรงพยาบาลชลบุรี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 - 2551 พบว่าเชื้อมีแนวโน้มการดื้อยา โดยความไวต่อยา cefoperazone/sulbactam พบค่อนข้างสูง แต่ความไวต่อยา imipenem ลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่ความไวของเชื้อต่อยา piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin และ amikacin น้อยกว่าร้อยละ 50 ซึ่งถือว่ามี ความไวต่อยาที่ค่อนข้างต่ำ (6) จากการตรวจแยกชนิดเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. 2551 และ พ.ศ.



2552 พบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน มีแนวโน้มสูงขึ้นและเป็นอันดับหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบหลายขนาน คือ ร้อยละ 18.9 และ 60.9 ตามลำดับ โดยผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (susceptibility test) ของเชื้อ *A. baumannii* ที่พบจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีความไวต่อยาต้านจุลชีพต่ำเมื่อเทียบกับเชื้อชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะผู้ป่วยชั้นวิกฤติในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก (ICU) และการรักษาพยาบาลผู้ป่วยมะเร็งนั้นทำให้มีโอกาสเกิดการติดเชื้อที่ปกติแล้วไม่ก่อโรค (non- pathogenic หรือ opportunistic) ในผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มมากขึ้น (82, 83)

## 2.9 ยากลุ่ม beta-lactams และกลไกการออกฤทธิ์ (84)

ยากลุ่ม beta-lactams เป็นสารต้านจุลชีพกลุ่มใหญ่ที่นิยมใช้ในทางคลินิก มีโครงสร้างหลัก คือ วงแหวน beta-lactam ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียโดยยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan โดยจับกับ transpeptidase หรือ penicillin-binding protein (PBP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการ cross-linking ระหว่างสาย peptidoglycan ในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง เมื่อ PBP จับกับ beta-lactams แล้วจะไม่สามารถทำหน้าที่สร้างพันธะเชื่อมระหว่างสาย peptidoglycan ได้ จึงมีผลทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง น้ำสามารถซึมผ่านได้อย่างรวดเร็วและทำให้เซลล์แตกในที่สุด (85) ยากลุ่ม beta-lactams แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (85) ได้แก่

2.9.1 กลุ่ม penicillin มีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น penicillin G และยาที่สังเคราะห์ เช่น ยา ampicillin และยา amoxicillin ยากลุ่มนี้ในระยะแรกออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบบางชนิดเท่านั้น ต่อมามีการดื้อยา penicillin โดยเชื้อผลิตเอนไซม์ beta-lactamase ที่เรียกว่า penicillinase จึงได้มีการดัดแปลงยาให้ทนต่อเอนไซม์นี้ เช่น ยา oxacillin, methicillin, cloxacillin เป็นต้น

2.9.2 กลุ่ม cephalosporins เป็นยาที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อรา *Cephalosporium* ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบ โดยออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่ากลุ่ม penicillins ปัจจุบันยาในกลุ่ม cephalosporins มี 5 รุ่น โดยยารุ่นแรกออกฤทธิ์ได้แคบกว่ายารุ่นหลัง ยารุ่นที่ 3 หรือ extended-spectrum cephalosporins มักใช้รักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae*

2.9.3 กลุ่ม monobactams มีโครงสร้างประกอบด้วย beta-lactam ring อย่างเดียว ออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ aztreonam

2.9.4 กลุ่ม carbapenems เป็นยากลุ่ม carbapenems จัดเป็นยาในกลุ่ม beta-lactams โครงสร้างของยามีนิวเคลียสเป็นวงแหวนคู่ (bicyclic nucleus) ที่มี beta-lactam ring เป็น



## 2.10 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม beta-lactams

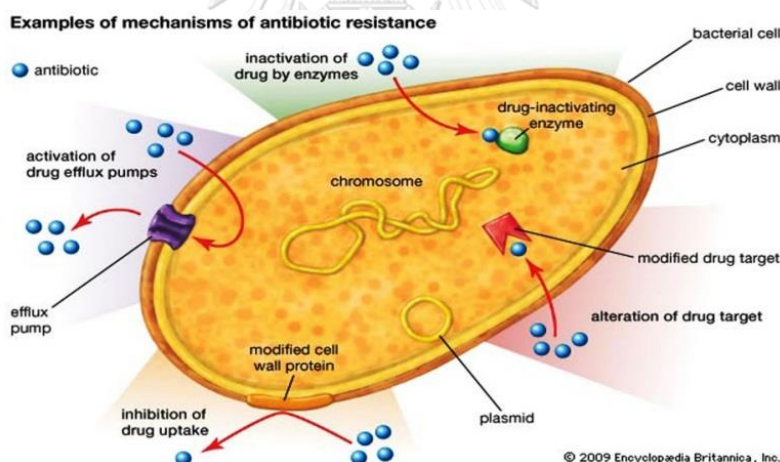
กลไกการดื้อยาของกลุ่ม beta-lactams ของแบคทีเรียแบ่งเป็น 4 กลไกหลัก ได้แก่

2.10.1 การผลิตเอนไซม์ beta-lactamase ที่สามารถสลายยาในกลุ่ม carbapenems เรียกว่า carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase หรือ carbapenemase ได้

2.10.2 การลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ ในโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบมี porin ซึ่งเป็น aqueous channel ที่ฝังตัวอยู่ภายในชั้น lipopolysaccharide ซึ่งเชื่อมโยงกันเป็นทางผ่านเข้าออกของสารอาหารรวมทั้งยาต้านจุลชีพที่มีคุณสมบัติละลายน้ำค่อนข้างดีและน้ำหนักโมเลกุลต่ำ การเปลี่ยนแปลงขนาดและหน้าที่หรือการขาดหายไปของ porin จะมีผลต่อการเข้าออกของยาหรือมี permeability ลดลง ทำให้ยาต้านจุลชีพเข้าไปสู่ภายในเซลล์ได้ลดลง

2.10.3 การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลเป้าหมาย คือ การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา เช่น การดื้อยาในกลุ่ม beta-lactams จะเปลี่ยนเป้าหมายของยา คือ penicillin binding protein (PBP) ซึ่งมีได้ 2 ลักษณะ คือ การสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่ยาจับไม่ได้ให้มากขึ้น หรือ ไปลดการสร้าง PBP ชนิดที่ยาจับได้

2.10.4 การเพิ่มการปั๊มยาออกจากเซลล์ พบได้ในแบคทีเรียบางชนิดที่มี transporter molecule ในเซลล์เมมเบรน ซึ่งสามารถขับยาที่ผ่านเข้ามาในเซลล์ออกไปนอกเซลล์ได้โดยใช้พลังงาน



รูปที่ 6 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย (87)

## 2.11 เอนไซม์ beta-lactamase

เอนไซม์ beta-lactamase ถูกจัดหมวดหมู่หลายแบบเพื่อประโยชน์ทางคลินิก วิธีที่นิยมมี 2 แบบ คือ การจำแนกตาม functional group ของ Bush-Jacoby-Mederios (71) และการจำแนกตามโครงสร้างโมเลกุล (molecular classification) ของ Ambler (84)

2.11.1 การจำแนกตาม functional group ของ Bush-Jacoby-Mederios (71) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามความสามารถของเอนไซม์ในการสลายยาในกลุ่ม beta-lactams ชนิดต่างๆ (substrate preference) และสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ beta-lactamase ได้ ได้แก่

2.11.1.1 group 1 ได้แก่ เอนไซม์ cephalosporinase หรือ AmpC สลายยาในกลุ่ม cephalosporins ได้ ยีนที่กำหนดเอนไซม์นี้พบอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียแกรมลบ เอนไซม์นี้ไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid และ EDTA พบในเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล เช่น *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* และ *Serratia marcescens*

2.11.1.2 group 2 ได้แก่ เอนไซม์ penicillinase, cephalosporinase, broad-spectrum beta-lactamase รวมทั้ง ESBL เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย EDTA ยีนที่กำหนดเอนไซม์นี้มักพบอยู่บนพลาสมิด

2.11.1.3 group 3 ได้แก่ metallo-beta-lactamase (MBL) สามารถสลายยาในกลุ่ม beta-lactams ได้เกือบทุกชนิดรวมทั้งกลุ่ม carbapenems เอนไซม์กลุ่มนี้ไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid แต่ถูกยับยั้งโดย EDTA ยีนที่กำหนดเอนไซม์นี้พบบนโครโมโซมหรือพลาสมิด

2.11.2 การจำแนกตามโครงสร้างโมเลกุลของ Ambler (84) แบ่งได้เป็น 4 class ได้แก่

2.11.2.1 class A เป็น serine beta-lactamase จัดอยู่ใน functional group 2 ของ Bush และคณะ

2.11.2.2 class B หรือ MBL เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ zinc ion ในการทำงาน จัดอยู่ใน functional group 3 ของ Bush และคณะ

2.11.2.3 class C เป็น serine beta-lactamase จัดอยู่ใน functional group 1 ของ Bush และคณะ โดย Class C ของเอนไซม์ beta-lactamase สามารถสลายยาในกลุ่ม Penicillin, Cephalosporin ที่มีฤทธิ์ขยาย (Extended-spectrum cephalosporin) ยกเว้น Cefepime และ beta-lactam ที่ผสมกับสารยับยั้ง beta-lactamase (beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combination) โดย AmpC ของ *Acinetobacter* spp. เรียกว่า *Acinetobacter*-derived cephalosporinase (ADC) มีความหลากหลายไม่ต่ำกว่า 56 แบบจากความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการศึกษาหายีน  $bla_{ADC}$  ในประเทศอิหร่าน พบว่าการดื้อยาแบบ MDR ของเชื้อ *A. baumannii* ตรวจพบยีน  $bla_{ADC}$  ในทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (15) รวมถึงมีการรายงานการตรวจพบ  $bla_{ADC}$  ร่วมกับยีน ISAb<sub>a1</sub> คิดเป็นร้อยละ 85.8 (109 ตัวอย่างในจำนวน 127 ตัวอย่าง) ในประเทศมาเลเซีย (16) ส่วนประเทศเนปาลมีการรายงานการพบยีน  $bla_{ADC}$  คิดเป็นร้อยละ 90.1 (17) และในประเทศแอลจีเรียได้มีการศึกษาในตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาแบบ MDR จำนวน 125 ตัวอย่าง พบว่ามีการตรวจพบยีน  $bla_{ADC}$  ทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (88)

2.11.2.4 class D หรือ oxacillinase (OXA) เป็น serine active site beta-lactamase จัดอยู่ใน functional group 2d ของ Bush และคณะ สามารถสลายฤทธิ์ของ isoxazolympenicillin oxacillin ได้เร็วกว่ายาในกลุ่ม penicillins เช่น benzylpenicillin

## 2.12 เอนไซม์ carbapenemase

เอนไซม์ carbapenemase จำแนกได้เป็น 2 class ได้แก่

### 2.12.1 Class B carbapenemase

Class B carbapenemase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า metallo-beta-lactamases (MBLs) เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ zinc ในการออกฤทธิ์ จัดอยู่ใน functional group 3 มีคุณสมบัติคือไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid แต่ถูกยับยั้งโดย EDTA ในธรรมชาติมีแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ MBLs ได้ จึงติดต่อยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นการดื้อยาที่เกิดจากความจำเพาะของแบคทีเรียที่ไม่มีส่วนประกอบที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพบางขนานตั้งแต่แรก (Natural, Intrinsic หรือ Inherent Resistance) แบคทีเรียเหล่านี้ เช่น *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* (ชื่อเดิม *Flavobacterium*), *Aeromonas hydrophila*, *Legionella gormanii* และ *Janthinobacterium lividum* ยีนของเอนไซม์ MBLs ที่พบในธรรมชาตินี้มักพบอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียและยังไม่มีรายงานว่ามีการถ่ายทอดยีนของเอนไซม์ MBLs ของแบคทีเรียเหล่านี้ไปยังแบคทีเรียอื่นๆ (89) ซึ่งการถ่ายทอดยีนของเอนไซม์ MBLs จัดเป็นการดื้อยาด้านจุลชีพของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นภายหลัง (Acquired Resistance)

ยีนในกลุ่ม metallo-beta-lactamases (MBLs) ที่พบในเชื้อ *A. baumannii* ที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญและมีการแพร่กระจายกว่า 40 ประเทศ คือ ยีน NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase) โดยการศึกษาการสร้างเอนไซม์ MBLs ได้แก่ *bla*<sub>NDM-1</sub> พบมีการรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 จากชาวยุโรปที่เดินทางมาทำศัลยกรรมความงามที่ประเทศอินเดียและติดเชื้อมียีน NDM-1 กลับไปและเกิดการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาอย่างรวดเร็ว (22) ต่อมาในปี พ.ศ. 2553 พบว่ามี การรายงานการแพร่กระจายของยีน NDM-1 กว่า 40 ประเทศทั่วโลก (23-27) และเริ่มพบการ รายงานการพบยีน NDM-1 ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้งในสาธารณรัฐประชาชนจีน สาธารณรัฐ เยอรมัน อียิปต์ โอมาน และ อิสราเอล (28-30) ซึ่งในประเทศไทยประสบปัญหาเรื่องเชื้อแบคทีเรียที่มี NDM-1 เช่นกัน แต่สำหรับในประเทศไทยนั้นยังมีการรายงานการพบยีน NDM-1 ในเชื้อ *A. baumannii* ไม่มากนัก จากงานวิจัยของอุดมลักษณ์และคณะที่ศึกษาเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 339 ตัวอย่าง พบยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> จำนวน 31 ตัวอย่าง (31)

### 2.12.2 Class D carbapenemases หรือ OXA carbapenemases

เป็น serine beta-lactamases จัดอยู่ใน functional group 2d มีคุณสมบัติคือไม่ถูกยับยั้ง ทั้งโดย clavulanic acid และ EDTA โดยเอนไซม์ OXA สามารถจำแนกได้หลายชนิดและมีความสามารถในการสลายยาในกลุ่ม beta-lactams แตกต่างกัน เอนไซม์ OXA ที่สลายยาในกลุ่ม carbapenems ได้ หรือเรียกว่า OXA carbapenemases ส่วนใหญ่พบใน *A. baumannii* ที่ติดต่อ

ยา imipenem เช่น OXA-23 โดยพบที่สก็อตแลนด์(90) OXA-24 และ OXA-25 พบที่สเปน (91) OXA-26 พบที่เบลเยียม (92) และ OXA-27 พบที่สิงคโปร์(92) ปัจจุบันมีรายงานพบเอนไซม์ OXA carbapenemases ใน *A. baumannii* จากประเทศต่างๆ เพิ่มขึ้น สามารถจำแนกเอนไซม์ OXA carbapenemases ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (74) ได้แก่ กลุ่ม OXA-23 เช่น OXA-23 (เดิมเรียกว่าART-1), OXA-27 และ OXA-49 กลุ่ม OXA-24 เช่น OXA-24, OXA-25, OXA-26 และ OXA-40 กลุ่ม OXA-51 (93) เช่น OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70 และ OXA-71 และกลุ่ม OXA-58 (94) เช่น OXA-58 อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานพบ transposon หรือ integron ที่เกี่ยวข้องกับยีนดื้อยาเหล่านี้นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเอนไซม์ OXA-48 carbapenemases ใน *K. pneumoniae* จากประเทศตุรกี (95) เอนไซม์ OXA-48 มีลำดับกรดอะมิโนต่างจาก 4 กลุ่มย่อยที่กล่าวข้างต้น ยีนดื้อยานี้พบบนพลาสมิดแต่ไม่มี integron มาเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ OXA carbapenemases ที่พบใน *A. baumannii* จากประเทศแถบเอเชีย เช่น ที่สิงคโปร์พบเอนไซม์ OXA-27 (92) ที่เกาหลีใต้ (96) และสาธารณรัฐประชาชนจีน (97) พบเอนไซม์ OXA-23 เช่นกัน

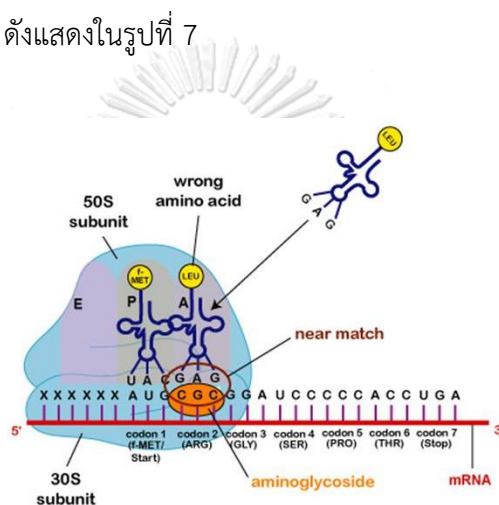
### 2.13 ยากลุ่ม aminoglycosides และการดื้อยา

ยากลุ่ม aminoglycosides ผลิตหรือสังเคราะห์ได้จากเชื้อแบคทีเรียใน family actinomycete 2 genus คือ *Streptomyces* และ *Micromonospora* โดยจะสังเกตได้ว่ายาในกลุ่มนี้ที่ลงท้ายด้วย -mycin จะได้มาจากเชื้อใน genus *Streptomyces* แต่ถ้าลงท้ายด้วย -micin จะได้มาจากเชื้อใน genus *Micromonospora* ปัจจุบัน ยากลุ่ม aminoglycosides ที่นำมาใช้ทางคลินิกมี 13 ชนิด (98) ยา amikacin, netilmicin, dibekacin, isepamicin และ arbekacin เป็น semisynthetic aminoglycosides ยาชนิดอื่นๆ ที่เหลือในกลุ่มนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ fermentation ที่มีสารเคมีอื่นๆเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย 2-3 ชนิด ยากลุ่มนี้ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา มี 9 ชนิด ยกเว้นยา sisomicin, dibekacin, isepamicin และ arbekacin ซึ่งได้รับการรับรองในประเทศญี่ปุ่นและประเทศทางแถบยุโรป ยากลุ่ม aminoglycosides แบ่งออกได้ 5 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมีของยา ได้แก่

1. Streptomycin มียา streptomycin เพียงชนิดเดียวอยู่ในกลุ่มนี้
2. Kanamycin ยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ยา kanamycin A, kanamycin B, amikacin, tobramycin, dibekacin และ arbekacin
3. Gentamicin ยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ยา gentamicin, sisomicin, netilmicin และ isepamicin
4. Neomycin ยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ยา neomycin และ paromomycin
5. Spectinomycin มียา spectinomycin เพียงชนิดเดียวอยู่ในกลุ่มนี้

### 2.13.1 กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action)

ยาในกลุ่ม aminoglycosides มีฤทธิ์เป็น bactericidal drugs โดยยาจะจับกับ 30S ribosomal subunit ใน messenger RNA ที่ตำแหน่ง A (99) ซึ่งอยู่ในส่วนของ 16S reverse transfer RNA ใน 30S ribosomal subunit ส่งผลให้กระบวนการ mRNA translation และ translocation เสียไป ทำให้มีการสร้างโปรตีนลดลงและสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารที่มีประจุออกนอกเซลล์และยับยั้งการแบ่งตัวของ DNA ยาจะจับกับ ribosome ของ prokaryotic cells ได้ดีกว่าของ eukaryotic cells เนื่องจากการแทนที่ของ adenosine ที่ตำแหน่ง 1408 ด้วย guanosine ใน eukaryotic ribosome ทำให้ยาจับกับ ribosome ได้ลดลง (100) ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 กลไกการออกฤทธิ์ของยา aminoglycosides (101)

### 2.13.2 กลไกการดื้อยา (Mechanism of resistance)

การดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides อาจเกิดจากกลไกการดื้อยาตามธรรมชาติ (natural or intrinsic resistance) หรือเกิดขึ้นใหม่ภายหลัง (acquire resistance) หลังจากมีการใช้ยาในกลุ่ม aminoglycosides ทางคลินิกได้ไม่นานก็เริ่มมีปัญหาเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น (102) ในปี ค.ศ. 1946 Finland และคณะได้รายงานผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะซึ่งไม่ตอบสนองต่อยา streptomycin เนื่องจากเชื้อดื้อยา ในปีค.ศ. 1956 มีรายงานการดื้อต่อยา streptomycin ของเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae จากประเทศญี่ปุ่น หลังจากนั้นไม่กี่ปีเชื้อในกลุ่มนี้มีการดื้อต่อยา kanamycin และ neomycin ตามมาอย่างกว้างขวาง ในปีค.ศ. 1967 มีรายงานเชื้อดื้อต่อยา gentamicin ผ่านทาง plasmid กลไกการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides มี 3 วิธี (103)

### 2.13.2.1 การสร้างเอนไซม์ขึ้นมามีผลทำลายยา (aminoglycosides modifying enzymes)

เป็นกลไกการดื้อยาที่สำคัญที่สุดของยาในกลุ่มนี้โดยเอนไซม์จะไปย่อยสลายส่วนที่เป็น amino group หรือ hydroxyl group ของยา ยาที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์เหล่านี้จะจับกับ ribosome ได้ไม่ดีและไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการนำเข้าพลังงาน (energy-dependent uptake) ได้ทำให้เกิดการดื้อต่อยา aminoglycosides ในระดับสูง (high-level resistance) ปัจจุบันพบว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีมากกว่า 50 ชนิด (104)

ส่วนใหญ่พบว่ายีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside-modifying enzymes ในเชื้อ *A. baumannii* คือ ยีน *aphA6* ซึ่งยังไม่มีรายงานพบยีน *aphA6* จากเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศไทย แต่พบรายงานการพบยีน *aphA6* ในประเทศอิหร่านโดยมีอัตราความชุกของยีน *aphA6* คิดเป็นร้อยละ 81.5 (15) และประเทศเนปาลโดยมีอัตราความชุกของยีน *aphA6* คิดเป็นร้อยละ 40.1 (17)

### 2.13.2.2 การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่ยาไปออกฤทธิ์ (modification of the target)

เกิดจาก point mutation ในส่วนของ ribosomal proteins หรือ 16S rRNA และการเกิด enzymatic methylation ของ rRNA ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ ribosomal binding site ยาเข้าไปจับไม่ได้ เกิดการดื้อยาระดับสูง ตัวอย่างสำคัญของการดื้อยาโดยกลไกการเกิด point mutation ที่ ribosomal proteins หรือ 16S rRNA คือ การดื้อต่อยา streptomycin ของเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ เชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococci spp.* และ *Mycobacterium tuberculosis* และการดื้อต่อยา amikacin ของเชื้อ *Mycobacterium abscessus* และ *Mycobacterium chelonae* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยาในกลุ่ม aminoglycosides ชนิดอื่นๆ มีตำแหน่งที่จับกับ ribosome มากกว่า 1 ตำแหน่ง เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ผลิตยาในกลุ่ม aminoglycosides จะมีเอนไซม์ methylase ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการ methylation ที่ตำแหน่ง N7 ของ guanine residues ของ 16S rRNA ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่มนี้

### 2.13.2.3 การลดระดับยาภายในเซลล์ (reduced drug uptake)

การลดการนำยาผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเป็นกลไกการดื้อยาตามธรรมชาติพบได้ในเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่พึ่งออกซิเจน (anaerobic bacteria) เนื่องจากกระบวนการที่ยาจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ต้องใช้พลังงานที่ได้จากกระบวนการหายใจของเซลล์ เชื้ออื่นๆ ที่ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides ตามธรรมชาติได้แก่ streptococci และ enterococci เนื่องจากเชื้อเป็น facultative anaerobic bacteria และมีผนังเซลล์เป็นตัวกั้นไม่ให้ยาซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ การให้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการ



สร้างผนังเซลล์เช่น ยากลุ่ม beta-lactams ร่วมด้วยจะช่วยให้ยากลุ่ม aminoglycosides เข้าสู่เซลล์ของเชื้อเหล่านี้ได้ดีขึ้น (synergistic bactericidal activity)

การดื้อยาโดยกลไกนี้อาจเกิดขึ้นภายหลังในระหว่างที่ผู้ป่วยกำลังได้รับยาอยู่ซึ่งไม่ค่อยพบในกลไกการดื้อยาที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา กลไกนี้มักทำให้เกิดการดื้อต่อยา aminoglycosides ทั้งกลุ่มในระดับต่ำ (low-level resistance) โดยผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ lipopolysaccharide ที่ผนังเซลล์ (porin) ทำให้ยาผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง (decreased cell wall permeability) หรือผ่านทางกลไกการขับยาออกจากเซลล์ (drug efflux mechanism) นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่มอื่นๆได้ กลไกการขับยาออกจากเซลล์แบบที่เรียบพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Burkholderia pseudomallei*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* และ *E. coli* จากการศึกษาเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานรวมทั้งยากลุ่ม aminoglycosides พบ efflux pumps ที่สำคัญคือ Mex XY หรือ AmrAB (105) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการต่อต้านฤทธิ์ของยากลุ่ม aminoglycosides จากสารที่เป็น divalent cations กลไกการลดการนำยาเข้าสู่เซลล์แบบที่เรียบโดยอาศัย Mex XY efflux pump อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิด adaptive resistance ของเชื้อแบคทีเรียด้วยซึ่งพบเกิดขึ้นได้บ่อยที่สุดในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยเชื้อแบคทีเรียที่สัมผัสกับยากลุ่มนี้ครั้งแรก (first-exposure effect) จะมีการปรับตัวทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้เมื่อสัมผัสยารั้งต่อไป (down-regulation of uptake) ส่งผลให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อลดลงและระยะเวลาของ postantibiotic effect สั้นลง ซึ่งการเกิด adaptive resistance จะเกิดภายใน 2 ชม.หลังจากได้รับยารั้งแรกแต่อาจอยู่นานถึง 6-7 ชม. นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียที่เคยสัมผัสยากลุ่ม aminoglycosides อาจเกิดการดื้อยาจากการที่เชื้อไม่สามารถเกิดกระบวนการนำเข้าพลังงานได้ (variants with deficient energy-dependent uptake)

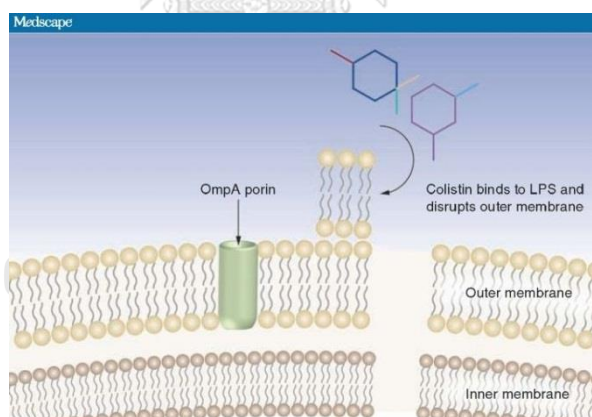
ปัจจุบันพบว่ากลไกการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ของเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบมีความซับซ้อนมากขึ้นเช่น เชื้อ *Providencia* spp. และ *Serratia* spp. มีเอนไซม์ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มาทำลายยาทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด การดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ของเชื้อ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* อาศัยกลไกทั้งการสร้างเอนไซม์มาทำลายยาและลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ หรือการดื้อยาของเชื้อ *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Morganella*, *Proteus* และ *Salmonella* พบว่าเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่มาทำลายยาหลายชนิดที่ถูกควบคุมการสร้างโดยยีนบน plasmid ความซับซ้อนของกลไกการดื้อยาที่เพิ่มมากขึ้นนี้ส่งผลให้เชื้อมีการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides เกือบทุกชนิด

## 2.14 ยากลุ่ม colistin และการดื้อยา

ยา colistin หรือ polymyxin E เป็นยาต้านจุลชีพหนึ่งในสองขนานในกลุ่ม polymyxins ที่นำมาใช้ในคนได้นอกเหนือจาก polymyxin B ยา colistin ถูกนำมาใช้ครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นเมื่อ พ.ศ. 2492 และที่ยุโรปและสหรัฐอเมริกาเมื่อ พ.ศ. 2493 และ พ.ศ. 2503 ตามลำดับ ยานี้ถูกนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อทั่วไปอยู่ยาวนาน 20 ปีจนมียาต้านจุลชีพกลุ่มอื่นที่มีประสิทธิผลมากขึ้นและปลอดภัยมากขึ้น ความนิยมใช้ยา colistin จึงลดลงมากและยานี้ถูกนำมาใช้เฉพาะผู้ป่วยโรค cystic fibrosis เท่านั้น ยา colistin ถูกนำมาใช้รักษาผู้ป่วยทั่วไปอีกครั้งตั้งแต่ พ.ศ. 2530 สำหรับโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ซึ่งดื้อยาต้านจุลชีพทุกขนาน ยกเว้น ยา colistin

### 2.14.1 กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action)

ยา colistin เป็นยาต้านจุลชีพประเภท polypeptide cationic ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ยานี้ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ (bactericidal) โดยจับกับผนังเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรีย แล้วยาจะไปแย่งและขับแคลเซียมและแมกนีเซียมของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์รั่วและแบคทีเรียตายในที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 8 กลไกการออกฤทธิ์ของยา colistin แตกต่างจากยากลุ่มอื่น และมีกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต่างๆจึงทำให้โอกาสที่แบคทีเรียจะเปลี่ยนจากไวต่อยาเป็นดื้อต่อยามีน้อย



รูปที่ 8 กลไกการออกฤทธิ์ของยา colistin (106)

### 2.14.2 กลไกการดื้อยา (Mechanism of resistance)

เมื่อนำยา colistin มารักษาการติดเชื้อในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นก็เริ่มพบเชื้อดื้อยา colistin เพิ่มขึ้นทั้งเชื้อที่ดื้อจริงต่อยา colistin และเชื้อที่ดื้อแฝงต่อยา colistin (heteroresistance) (107-109) ปัจจัยสำคัญที่สัมพันธ์กับการดื้อยา colistin คือการได้รับยา colistin ติดต่อกันเป็นเวลานาน (110) ดังนั้นจึงควรใช้ยา colistin ในกรณีที่จำเป็นใช้ยาในขนาดที่เหมาะสม และใช้ยาในระยะเวลาเท่าที่จำเป็นเท่านั้น

### 2.14.2.1 การดื้อยาที่เกิดจากการดัดแปลง Lipid A ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา

2.14.2.1.1 การเติมหมู่ Phosphoethanolamine ที่หมู่ Phosphate ของ Lipid A โดยเอนไซม์ Phosphoethanolaminetransferase จากยีน *pmrC* โดยยีน *pmrC* ถูกควบคุมการแสดงออกโดย *pmrAB* ซึ่งเป็น Two component sensor-regulator system แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ที่ *pmrAB* ซึ่งมักเกิดที่ *pmrB* (PmrB Sensor) ทำให้เกิด Autoregulation และทำให้ PmrA regulator พร้อมทั้งจะเป็น transcriptional factor โดยปราศจากสิ่งเร้า (Stimuli) สำหรับยีน *pmrC* จึงเป็นสาเหตุทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน *pmrC* ส่งผลให้ดื้อยาในกลุ่ม Polymyxin ใน *A. baumannii* (111)

จากงานวิจัยในปี พ.ศ. 2558 ระบุว่าพบยีนดื้อยาชนิดใหม่ในเชื้อ *E. coli* คือ *mcr-1* (หรือ Plasmid-mediated colistin resistance) ในสาธารณรัฐประชาชนจีน และพบว่ากลไกการดื้อยา colistin ที่พบเป็นการถ่ายทอดยีน *mcr-1* ที่ดื้อยา colistin ผ่านทาง plasmid แบบ horizontal gene transfer (112) โดยยีน *mcr-1* อยู่บน plasmid ชื่อ pHNSHP45 เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าคล้ายกับโปรตีน phosphoethanolamine transferase (EptA) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเติม phosphoethanolamine ให้กับ lipidA ดังนั้นเชื้อจึงสามารถส่งผ่านยีน *mcr-1* ทาง plasmid ไปยังเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นๆ ทำให้เกิดการแพร่กระจายยีน *mcr-1* ซึ่งดื้อต่อยา colistin จะง่าย และรวดเร็วมากขึ้น สามารถแพร่กระจายข้ามสายพันธุ์สู่แบคทีเรียชนิดอื่นๆได้เช่น *A. baumannii* ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาที่สำคัญในโรงพยาบาล

2.14.2.1.2 การเติมหมู่ Galactosamine ที่หมู่ Phosphate ของ Lipid A สามารถเกิดขึ้นได้เช่นกัน ยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ *naxD* ซึ่งอยู่ในกระบวนการสังเคราะห์ Galactosamine และถูกควบคุมผ่านยีน *pmrAB* เช่นเดียวกับยีน *pmrC* (111)

2.14.2.1.3 การเติมหมู่ Acyl ของ Lipid A โดยเอนไซม์ Acyltransferase จากยีน *lpxM* สามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ทนต่อการแทรกตัวของยาในกลุ่ม Polymyxin เป็นเหตุให้เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา (111)

### 2.14.2.2 การดื้อยาที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในกลุ่มยีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ Lipid A

การกลายพันธุ์ในระดับกรดนิวคลีอิก, การขาดหายบางส่วนหรือทั้งหมด หรือการแทรกยีน โดยอินเซอร์ชันซีควอน *ISAbA11* ของยีน *lpxA*, *lpxC*, หรือ *lpxD* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ Lipid A ทำให้ *A. baumannii* ดื้อยาเนื่องจากไม่มี Lipid A ซึ่งเป็นเป้าหมายของยาในกลุ่ม Polymyxin บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (111)

## 2.15 ความรู้พื้นฐานระดับโมเลกุลเกี่ยวกับเอนไซม์ beta-lactamase (113)

ยีนที่ควบคุมหรือกำหนดการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ในแบคทีเรียแกรมลบสามารถจะพบอยู่บนโครงสร้างพันธุกรรมชนิดโครโมโซม (chromosome-mediated beta-lactamase) หรืออยู่บนพลาสมิด (plasmid-mediated beta-lactamase) หรือพบทั้งสองแห่ง รวมถึงพบได้บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic element) หรือบนโครงสร้างพันธุกรรมชนิดอื่นๆของแบคทีเรียที่ทำให้ยีนสามารถถูกถ่ายทอดต่อไปได้ เช่น transposon (Tn) และ integron (In)

ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ในแบคทีเรียแกรมลบสามารถพบบนโครงสร้างพันธุกรรมได้หลายชนิด โครงสร้างพันธุกรรมเหล่านี้ ได้แก่

**โครโมโซม (chromosome)** แบคทีเรียมีโครโมโซมลักษณะเป็นวงปิด (closed circular) และส่วนใหญ่มีเพียง 1 วง ประกอบด้วยยีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต และ อาจพบยีนดื้อยาได้ ยีนบนโครโมโซมถูกถ่ายทอดไปสู่เซลล์รุ่นลูกได้เมื่อมีการแบ่งเซลล์ (vertical gene transfer)

**พลาสมิด (plasmid)** มีลักษณะเป็นวงปิดเช่นเดียวกันแต่ขนาดเล็กกว่าโครโมโซม มีได้หลายวงในแต่ละเซลล์ และแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ บางชนิดมียีนดื้อยาอยู่ร่วมด้วย พลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดไปได้ระหว่างที่เซลล์แบคทีเรียสัมผัสกัน เรียกว่า conjugative plasmid ทำให้มีการถ่ายทอดยีนระหว่างเซลล์ในรุ่นเดียวกันได้ (horizontal gene transfer)

**หน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic element)** เป็นหน่วยพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนย้ายที่ได้ ซึ่งอาจเป็นการเคลื่อนย้ายภายในเซลล์เดียวกันหรือระหว่างเซลล์ หากหน่วยพันธุกรรมนี้มียีนดื้อยาอยู่ด้วยก็จะช่วยให้ยีนกระจายไปสู่เซลล์อื่นได้ เช่น conjugative plasmid และ bacteriophage (ไวรัสที่สามารถบรรจุยีนแบคทีเรียไว้ในอนุภาค และนำไปให้แบคทีเรียเซลล์อื่นผ่านกระบวนการ transduction) แต่ที่มีบทบาทในการกระจายของยีนดื้อยามากที่สุดคือ transposon (Tn) ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานคือ insertion sequence (IS) ที่ประกอบไปด้วย ยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ transposon ทำหน้าที่ให้โครงสร้าง IS สามารถแทรกเข้าไปใน โครงสร้างพันธุกรรมที่ตำแหน่งใดก็ได้ ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด แต่เป็นแบบไม่จำเพาะตำแหน่ง เรียกกระบวนการ transposition transposon บางชนิด เช่น composite transposon ประกอบด้วย IS ที่ ส่วนปลายทั้งสองด้านและยีนดื้อยาอยู่ตรงกลาง เมื่อมีการเคลื่อนที่ของ transposon จึงนำยีนดื้อยาติดตามไปด้วยเป็นหน่วยเดียวกันและทำให้ยีนดื้อยาแพร่กระจายไปได้

**Integron (In)** เป็นหน่วยพันธุกรรมที่พบได้บนโครโมโซม พลาสมิด หรือแทรกตัวอยู่ใน transposon ประกอบด้วยยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ integrase และส่วนพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ให้กล่องยีน (gene cassette) แทรกตัวเข้ามาใน intergron ได้แบบจำเพาะตำแหน่ง (site-specific recombination) ซึ่ง intergron อาจไม่มีกล่องยีนอยู่เลยก็ได้ สามารถแบ่ง intergron ตามโครงสร้างทางพันธุกรรม ได้เป็น 3 กลุ่ม เรียกว่า class (เรียกว่า class 1 intergron, class 2 intergron และ

class 3 intergron) กล่องยีนที่แทรกเข้ามาใน intergron สามารถถูกตัดออกและส่งต่อไปที่อื่นๆ ได้ โดยที่ intergron ไม่ได้เคลื่อนที่ตามตัวไปด้วย (ต่างจาก transposon) ดังนั้น intergron จึงเป็น โครงสร้างที่มีส่วนในการแพร่กระจายของยีน สร้างเอนไซม์ beta-lactamase

ชนิดของเอนไซม์หรือยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์มีความหลากหลายขึ้นกับสปีชีส์ของเชื้อและ แหล่งที่พบเชื้อ การสร้างเอนไซม์ beta-lactamase นั้นอาจจะเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา ภายในเซลล์ที่ เรียกว่า constitutive expression แต่ก็พบว่าแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดมียีนอีกกลุ่มหนึ่งที่มี บทบาทควบคุมการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase โดยเฉพาะยีนที่อยู่ บนโครโมโซม ซึ่งการควบคุมอาจเป็นการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของยีน เมื่อมีปัจจัยเฉพาะ มากระตุ้น จึงเรียกรูปการแสดงออกของยีนที่สามารถถูกกระตุ้นได้แบบนี้ว่า inducible expression เช่น ยากลุ่ม beta-lactams บางชนิด พบว่าสามารถเป็นปัจจัยในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ได้เชื้อแบคทีเรียจึงสามารถเปลี่ยนตัวเองเป็นเชื้อดื้อยาได้ภายหลังที่สัมผัสกับยา

การสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ถือว่าเป็นกลไกการดื้อยากลุ่ม beta-lactams ที่สำคัญและ แพร่กระจายมากที่สุด ในแบคทีเรียแกรมลบ อีกทั้งยังสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาในระดับสูง และดื้อยาที่มีฤทธิ์กว้างได้ โดยมีกลไกหลัก คือ การทำลายโครงสร้างในส่วนของ beta-lactam ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนแกนของยา จึงมีผลทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ การค้นพบเอนไซม์ beta-lactamase มีรายงานเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ

## 2.16 Insertion sequence (IS)

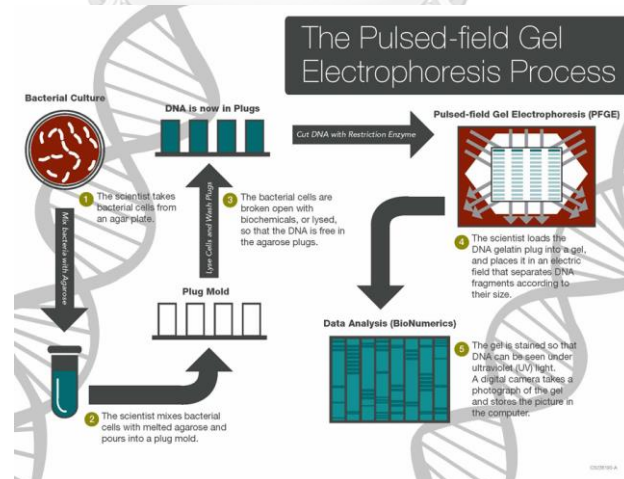
IS เป็นชิ้นส่วนของ DNA จัดเป็น mobile genetic element ชนิดหนึ่งที่มีขนาดเล็กที่สุด ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายตัวเองจากตำแหน่งหนึ่งบนจีโนมไปยังอีกตำแหน่งอื่นที่มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนและมีขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม mobile genetic element ด้วยกัน IS ที่พบในแบคทีเรียมีขนาดตั้งแต่ 700-1,500 bp ประกอบด้วยยีนที่กำหนดเอนไซม์ transposase ซึ่งทำหน้าที่ในการตัดปะชิ้นส่วนของ IS เอง กล่าวคือ เอนไซม์ transposase จะตัดสายนิวคลีโอไทด์และนำเข้าแทรกในตำแหน่งที่ตัดได้ ในโครโมโซมของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์อาจมี IS หลายชนิดและมีจำนวน copies แตกต่างกันไป IS ที่พบร่วมกับยีน OXA carbapenemase ได้แก่ IS<sub>Aba1</sub> พบร่วมกับยีน *bla*<sub>OXA-23</sub> (114, 115) IS<sub>Aba125</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub> (17) ยีนที่กำหนดเอนไซม์ carbapenemase ร่วมกับ IS<sub>Aba</sub> พบได้ทั้งบนพลาสมิดและโครโมโซม นอกจากนี้ Turton และคณะ (116) ยังพบว่า activity ของเอนไซม์ OXA carbapenemase ขึ้นอยู่กับ IS ซึ่งอยู่ทางด้าน upstream ของยีน *bla*<sub>OXA</sub> ซึ่งเปรียบเสมือนเป็น promoter ที่ทำให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น นอกจากนี้แล้วยังพบว่ายีน IS<sub>Aba1</sub> ทำให้มีการแสดงออกของยีน *bla*<sub>ADC</sub> (117) ได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเชื้อในสปีชีส์ที่ต่างกันอาจจะทำให้มีการแสดงออกลดลงได้เช่นกัน (118)

## 2.17 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

การศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลเพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อก่อโรคในคนกับเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม มีหลายวิธีได้แก่ pulse-field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), repetitive sequence-based polymerase chain reaction (REP-PCR), ribotyping และ multilocus sequence typing (MLST)

### 2.17.1 เทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

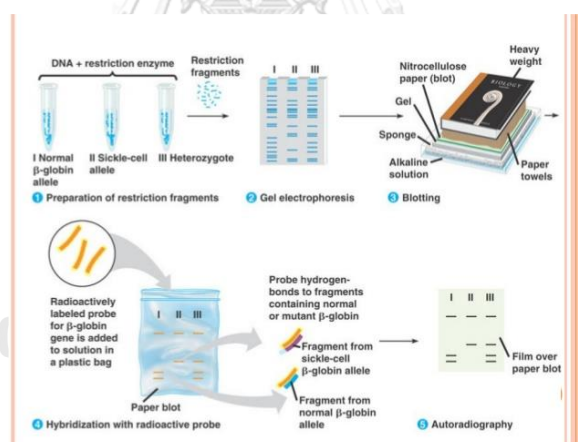
PFGE อาศัยหลักการ คือ สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ตั้งแต่ 10 กิโลเบส ถึง 10 เมกาเบส โดยใช้ pulsed electric field ซึ่งมีการสลับสนามไฟฟ้าสองด้าน โดยใช้ restriction enzyme ในการตัดย่อยดีเอ็นเอของแบคทีเรียในตำแหน่งที่ตัดจำเพาะ ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอหลายขนาดและนำมาสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งข้อดีของวิธี PFGE นี้ คือ สามารถประยุกต์ใช้กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเพื่อใช้ในทางระบาดวิทยาได้ นอกจากนี้ PFGE มีอำนาจในการจำแนกมากกว่าเทคนิค ribotyping หรือ multi-locus sequence typing ในหลายๆ แบคทีเรีย และเป็นวิธีที่สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อได้อย่างคงที่ สามารถทำซ้ำได้ ถือว่าเป็น gold standard ในการจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม PFGE ไม่สามารถนำไปปรับใช้ได้กับทุกห้องปฏิบัติการเนื่องจากในการทำให้เวลานาน ต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ อีกทั้งวัสดุอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้มีราคาสูง ทำให้เกิดปัญหาเมื่อต้องวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก (119)



รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนเทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (120)

### 2.17.2 เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP เป็นเทคนิคซึ่งแสดงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โพลีเมอร์พีมของ RFLP เกิดจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างไปจากเดิม แล้วทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนแปลงไป โดยมีสาเหตุได้หลายประการ ได้แก่ การเกิด point mutation ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเพิ่มขึ้นมา หรือเกิดการหายของดีเอ็นเอส่วนที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทำให้ตำแหน่งจดจำหายไป หรืออาจเกิดจากการเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ (DNA rearrangement) หรือเกิดการเพิ่มหรือหายไปของดีเอ็นเอบางส่วนในบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ 2 ตำแหน่งมีผลให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้มีขนาดต่างไปจากเดิม โดย RFLP มีขั้นตอนดังนี้ คือ ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำไปแยกขนาดบนแผ่นเจลและถ่ายดีเอ็นเอสู่แผ่นกรองพิเศษ แล้วตรวจหาการเข้าคู่กันของตัวตรวจสอบที่มีความจำเพาะกับจีโนมิกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ บนแผ่นกรองพิเศษ แถบที่แตกต่างกันจะเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์หรือมีการเพิ่มหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งตัด 2 ตำแหน่ง คุณสมบัติของเทคนิคนี้คือ จะได้ codominant marker คือสามารถตรวจสอบอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ (119)



รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (121)

### 2.17.3 เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้นๆ ความยาวประมาณ 10 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นแบบสุ่มไม่จำเพาะเจาะจงกับยีน แสดงผลในรูปของการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งหนึ่งๆ RAPD มีข้อดี คือ สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย แต่มีข้อเสียคือ เมื่อทำการทดลองซ้ำบางครั้งได้ผลต่างไปจากเดิม เนื่องจากเทคนิค RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะการทดลอง ในการทำ PCR จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพทดลองให้คงที่ (119)

#### 2.17.4 เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการรวมวิธี RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน ซึ่งรูปแบบ polymorphism ที่เกิดขึ้นกับความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกับเทคนิค RFLP และสามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เหมือนกับ เทคนิค RAPD ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอชิ้นสั้นๆที่เรียกว่า adapter เข้าที่ปลายทั้ง 2 ด้านของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาเกาะ ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อดีเอ็นเอที่ใช้เป็นไพรเมอร์มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ adapter ที่บริเวณด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์ และมีลำดับเบสที่เป็นส่วนของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพิ่มเบสอีก 2-3 นิวคลีโอไทป์ เพื่อให้เกิดการเลือกจับของเบสที่เป็นคู่สมกัน ซึ่งเป็นการลดจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่ติดกับบริเวณจดจำของเอนไซม์ที่สามารถเข้าคู่ได้กับไพรเมอร์ที่เลือกเท่านั้น การเกิด polymorphism เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ทำให้ตำแหน่งตัดจำเพาะเปลี่ยนไป เกิดการหายไปหรือเพิ่มขึ้นของตำแหน่งตัดจำเพาะ หรือเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ ทำให้ขนาดของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ ไม่ต้องทราบข้อมูลของลำดับเบส สามารถทำได้รวดเร็ว เกิด polymorphism จำนวนมาก ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย และใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็ได้ ที่มีส่วนของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ adapter ข้อจำกัดของ AFLP คือ เสียค่าใช้จ่ายสูง ต้องการดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง ทำให้วิเคราะห์ผลยาก (119)

#### 2.17.5 เทคนิค Multilocus sequence typing (MLST)

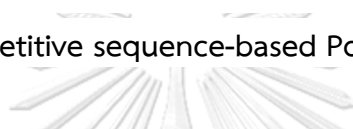
MLST คือวิธีการที่ใช้แยกชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือปรสิต โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย DNA ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ตรงกลาง (internal fragments) ของยีน ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตอยู่ของเชื้อ (house-keeping gene) โดยทั่วไปมักจะใช้ 7 ยีน แต่ละยีนมีขนาดประมาณ 450-500 base pairs (bp) โดย house-keeping gene จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันอย่างชัดเจนในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยวิธีนี้จะพิจารณาตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์โดยไม่คำนึงถึงจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์อาจมีความแตกต่างเพียงตำแหน่งเดียวหรือหลายตำแหน่ง ความแตกต่างของรูปแบบ alleles ของยีนทั้ง 7 ชนิดนี้จะเป็นตัวระบุ allelic profile และถูกกำหนดเป็น sequence type (ST) ขั้นตอนของวิธี MLST ประกอบไปด้วย data collection, data analysis และ multilocus sequence ความแตกต่างของตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (allele numbers) ของแต่ละยีนจะระบุเป็น allelic profile หรือ sequence type (ST) รูปแบบของตำแหน่งการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์ที่ต่างไปจะถูกจัดเป็น allelic profile แบบใหม่ เมื่อทำการพิสูจน์ allelic profile แล้วหากเป็น



แบบใหม่จริงข้อมูลจะถูกนำมาเก็บไว้ในฐานข้อมูล (MLST database) ขั้นตอนสุดท้ายของวิธีนี้คือ multilocus sequence analysis จะวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อโดยเปรียบเทียบ allelic profile ของเชื้อที่ ต้องการทดสอบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เพื่อศึกษาด้านระบาดวิทยาและวิวัฒนาการของเชื้อ เปรียบเทียบรูปแบบของ allelic profile หรือ ST ว่าใกล้เคียงหรือต่างจาก clonal complexes (กลุ่มของเชื้อ) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ความสัมพันธ์ของเชื้อจะแสดงใน ลักษณะแผนภูมิโครงสร้างต้นไม้ (dendrogram) โดยใช้หลักการ matrix of pairwise differences ระหว่าง allelic profile ซึ่งแผนภูมิจะแสดงให้เห็นว่ารูปแบบ allelic profile หรือ ST ของเชื้อแต่ละ ตัวมีความใกล้เคียงหรือแตกต่างกันเพียงใด ซึ่งหากพบว่าเชื้อมี allelic profile ที่ใกล้เคียงกันมาก สันนิษฐานได้ว่าน่าจะมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน (119)

### 2.17.6 เทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction

#### (REP-PCR)



Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction หรือ REP-PCR เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยไพโรเมอร์เป็นส่วนหนึ่งของ Repetitive sequence ซึ่งในจีโนมของเชื้อแบคทีเรียมีชุดลำดับเบสที่ซ้ำๆ (Repetitive DNA sequence) กระจายอยู่ทั่วจีโนม และมีลักษณะอนุรักษสูง เช่น Repetitive extragenic palindromic sequence (REP), Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) และ BOX element sequences โดยมีลำดับเบสขนาด 35-40 คู่เบส, 124-127 คู่เบส และ 154 คู่เบส ตามลำดับ (122) มีโครงสร้างเป็น stem-loop (123) หลักการของ REP-PCR คือ การสังเคราะห์ oligonucleotide primer ที่เข้าคู่กันกับ repetitive element (rep-element) ในแบคทีเรีย เมื่อนำไพโรเมอร์ดังกล่าวร่วมกับการใช้วิธี PCR จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน เฉพาะช่วงลำดับที่อยู่ระหว่าง REP, ERIC และ BOX เท่านั้น (ตำแหน่งต่างๆของ repetitive element ซึ่งกระจายรอบจีโนมของแบคทีเรียจะจำเพาะแน่นอนและเหมือนกันสำหรับสายพันธุ์เดียวกัน แต่แตกต่างกันเมื่อเป็นคนละสายพันธุ์) โดยเรียกรวมกันว่า REP-PCR และผลที่ได้จากปฏิกิริยานี้คือผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product หรือ amplification product) ที่มีขนาดของชิ้นส่วนโมเลกุลดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งบนจีโนมที่ไพโรเมอร์เข้าไปจับ เมื่อนำผลผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาแยกขนาดของโมเลกุลผ่าน agarose โดยใช้ปฏิกิริยา electrophoresis จะได้ REP-PCR genomic fingerprinting patterns คล้ายกับบาร์โค้ด (barcode) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์เฉพาะตัวของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (124) จากคุณสมบัติของไพโรเมอร์ REP (REP1R และ REP2) กับไพโรเมอร์ ERIC (ERIC2 และ ERIC1R) (125) ได้มีการนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับสายพันธุ์ และมีการจำแนกระดับ pathovar ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด

จากงานวิจัยของ Bou และคณะ (126) ได้ทำการเปรียบเทียบอำนาจการจำแนกและความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา imipenem และ meropenem ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า REP-PCR มีอำนาจการจำแนกที่ดีกว่า Arbitrarily Primer PCR (AP-PCR) โดยมีเทคนิค PFGE เป็นเทคนิคอ้างอิงมาตรฐาน ซึ่งเทคนิค REP-PCR เป็นวิธีการที่เป็นประโยชน์และรวดเร็วในการระบุลักษณะทางระบาดวิทยาของการระบาดของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาล โดยผลที่ได้จากวิธี REP-PCR เทียบเท่ากับเทคนิคที่ได้จาก PFGE (126) และงานวิจัยของ Snelling และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบอำนาจการจำแนกรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex โดยใช้วิธี REP-PCR เทียบกับ Ribotyping การศึกษาครั้งนี้พบว่า REP-PCR มีอำนาจการจำแนกที่ดีกว่า Ribotyping (127)



### บทที่ 3

### วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3 แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ลำดับที่	เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1	ตู้ปลอดเชื้อ class II รุ่น Purifier Logic 34408 Series	Labconco	สหรัฐอเมริกา
2	เครื่อง Refrigerated centrifuge รุ่น Universal 320R	Hettich	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
3	ตู้อบ (Incubator) รุ่น INE300	Memmert	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
4	อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5	ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanyo Electric	ญี่ปุ่น
6	ชุดถ่ายภาพเจล (Molecular Imager ChemiDocXRS)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
7	ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ Gel Electrophoresis	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
8	เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น MJ PTC-1148 (Thermo Cycler)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
9	เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมชนิดละเอียด รุ่น ND-1000 (Nanodrop)	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
10	เครื่องอบฆ่าเชื้อ ( Autoclave) รุ่น ES-315	Tommy Tech	สหรัฐอเมริกา
11	เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น G-560E	Scientific Industries	สหรัฐอเมริกา
12	ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
13	เครื่องวัดความชื้น รุ่น Densimat	BioMérieux	ฝรั่งเศส
14	เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น CP2245	Sartorius	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
15	เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น Hiclave HVA-85	Hirayama	ญี่ปุ่น
16	Speed Vacuum รุ่น DNA 110 Speed Vac	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา

ลำดับที่	เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
17	Autopipette (ขนาด 0.1-2, 2-20, 20-200 และ 200-1,000 ไมโครลิตร)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
17	Autopipette (ขนาด 0.1-2, 2-20, 20-200 และ 200-1,000 ไมโครลิตร)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
18	ขวดแลบฟลาเกลียว (0.1, 0.5, 1, 2 ลิตร)	Schott Duran	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
19	Volumetric cylinder ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร	VITLAB	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
20	Parafilm	Parafilm	สหรัฐอเมริกา
21	Pipette tip (ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร)	Axygen	สหรัฐอเมริกา
22	Disposable Cuvette	Plastibrand	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
23	ไม้พันสำลี	United Medical Instrument	ไทย
24	หลอดทดลอง (ขนาด 12x75 และ 13x100)	Pyrex	สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ลำดับที่	สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1	อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hintor Agar	Oxoid	สหราชอาณาจักร
2	อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hintor Broth	Oxoid	สหราชอาณาจักร
3	อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Agar	Oxoid	สหราชอาณาจักร
4	อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth	Oxoid	สหราชอาณาจักร
5	Agar Bacteriological (Agar No.1)	Oxoid	สหราชอาณาจักร
6	อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Triple Sugar Iron (TSI)	Oxoid	สหราชอาณาจักร
7	อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Motile	BD	สหรัฐอเมริกา
8	ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase, 10x Buffer, MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา

ลำดับที่	สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
9	dNTP Set	Promega	สหรัฐอเมริกา
10	GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
11	GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
12	GD 1Kb plus DNA Ladder RTU	BIO-HELIX	ไต้หวัน
13	TE Buffer	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
14	TAE buffer	aMResco	สหรัฐอเมริกา
15	Molecular grade water	Phyto Technology Laboratories	สหรัฐอเมริกา
16	SYBR®Safe DNA gel stain	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
17	DNA Gel Loading dye (6x)	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
18	Agarose Power	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
19	Tris base	aMReSCo	สหรัฐอเมริกา
20	Acetic acid glacial	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
21	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate,99%	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา

### 3.2 เชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

#### 3.2.1 การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้อาศัยการคำนวณจากสูตรของ คอแครน (Cochran) ซึ่งในกรณีนี้ไม่ทราบขนาดของประชากรที่แน่นอน โดยมีสูตรการคำนวณสำเร็จรูป (128) ดังนี้

$$n = \frac{Z^2}{4e^2}$$

เมื่อ  $n$  = ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ  
 $Z$  = ค่า  $Z$  ที่ระดับความเชื่อมั่นหรือระดับนัยสำคัญ ถ้าระดับความเชื่อมั่น 95% หรือระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า  $Z = 1.96$   
 $e$  = ระดับความคาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างที่ยอมให้เกิดขึ้นได้

จากการคำนวณตามสูตรดังกล่าวจะได้ตัวอย่างของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 384 ตัวอย่าง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจากโรงพยาบาลขนาด 1,055 เตียง ในภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 400 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อทั้ง 400 ตัวอย่าง มาเพาะเลี้ยง ทำการทดสอบทางชีวเคมี และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* ผลการทดสอบพบว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง จำนวนที่เหลือเป็น *Acinetobacter* spp. นอกจากนี้ด้วยระยะเวลาในการศึกษาวิจัยมีระยะเวลาที่จำกัด ทางผู้วิจัยจึงดำเนินการศึกษาวิจัยโดยใช้ตัวอย่างเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 257 ตัวอย่าง

### 3.2.2 การพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

การทำวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก เลขที่ IRB 109/63 โดยการเก็บรวบรวมข้อมูลใช้เป็นแบบรหัสที่ตั้งขึ้นมาใหม่ โดยไม่เชื่อมโยงกับฐานข้อมูลของผู้ป่วยในโรงพยาบาล การนำเสนอข้อมูลเป็นการนำเสนอในภาพรวม ไม่ได้นำเสนอเป็นรายบุคคล เพื่อป้องกันข้อมูลหรือความลับต่างๆของผู้ป่วย

### 3.2.3 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อตัวอย่าง *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง ที่มาจากผู้ป่วยไม่ซ้ำกัน เก็บอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อรักษาสภาพ จากโรงพยาบาลขนาด 1,055 เตียงในภาคเหนือตอนล่าง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2561 ถึง กุมภาพันธ์ 2562 โดยเชื้อที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการเพาะเลี้ยง พิสูจน์แยกเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมีและทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ ในเขตภาคเหนือตอนล่างเรียบร้อยแล้ว

## 3.3 การเก็บตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii*

3.3.1 นำเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง ที่ได้จากโรงพยาบาลขนาด 1,055 เตียง ในภาคเหนือตอนล่าง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2561 ถึง กุมภาพันธ์ 2562 นำมาเพาะเลี้ยงบน Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.3.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของ *A. baumannii* ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาว ทึบแสง เรียบ มาทดสอบทางชีวเคมีอีกครั้งโดยเลือกการทดสอบคือ Triple Sugar Iron Agar (TSI), Motile และทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.3.3 นำเชื้อที่ผลการทดสอบทางชีวเคมียืนยันว่าเป็น *A. baumannii* (TSI เป็น K/N, Non-Motile เจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส) มาเก็บในอาหาร Tryptone Soya Broth ที่ผสม glycerol ร้อยละ 15 อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

### 3.4 การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ

#### *A. baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการทดสอบแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ ในเขตภาคเหนือตอนล่างเรียบร้อยแล้ว ด้วยใช้เครื่องอัตโนมัติ Vitek®2 Compact โดยการทดสอบความสามารถของยาด้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยเครื่องอัตโนมัติ Vitek®2 Compact เป็นการทดสอบโดยอาศัยหลักการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงความขุ่นที่เกิดจากการเจริญเติบโตของสารละลายเชื้อในหลุมทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและยาด้านจุลชีพ กล่าวคือ หากเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่ถูกยับยั้งด้วยยาด้านจุลชีพในหลุมทดสอบ ค่าความขุ่นที่วัดได้จะเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นเนื่องจากเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตความขุ่นของสารละลายจะเพิ่มขึ้น เครื่องจะทำการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ส่องผ่านแต่ละหลุมการทดสอบ ทุก ๆ 15 นาที โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 660 นาโนเมตร ซึ่งลักษณะการวัดที่เกิดขึ้นแต่ละหลุม เครื่องจะทำการวัดในแต่ละช่องการทดสอบที่จำนวนจุด 16 จุดที่แตกต่างกันและทำเช่นนี้ซ้ำ 3 รอบ แล้วหาค่าเฉลี่ยผลการวัดออกมา ซึ่งจะเป็นการวัดแบบ Kinetic และนำมาสร้าง Growth Curve ของแต่ละหลุมทดสอบ เมื่อบ่มเพาะจนครบเวลาที่เครื่องกำหนดหรือค่าที่วัดได้มีนัยสำคัญมากพอโปรแกรมจะทำการคำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นออกมาในหน่วยของค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ถ้าภายในเวลา 18 ชั่วโมงเชื้อในหลุมควบคุมการทดสอบเจริญเติบโตได้ไม่ถึงระดับมาตรฐานที่เครื่องกำหนด เครื่องจะไม่ทำการคำนวณค่า MIC ได้เพราะในหลุมทดสอบอื่นๆก็มีเชื้อเจริญเติบโตไม่พอที่จะทดสอบความสามารถของยาด้านจุลชีพได้ การทดสอบด้วยเครื่องนี้จะต้องทราบก่อนว่าเชื้อที่ทดสอบเป็นเชื้อชนิดใด เนื่องจากเชื้อแต่ละกลุ่มจะมีลักษณะพิเศษเฉพาะบางประการที่แตกต่างกัน เช่น การดื้อยาโดยธรรมชาติต่อยาชนิดใดชนิดหนึ่ง เป็นต้น โดยการทดสอบความสามารถของยาด้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยเครื่องอัตโนมัติ Vitek®2 Compact ใช้การควบคุมคุณภาพโดยเชื้อมาตรฐาน 2 สายพันธุ์ สำหรับกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC® 25922™ และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ (129)

### 3.5 การตรวจหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (ISAba125) ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายชนิดโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

#### 3.5.1 การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii*

1. นำตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่ต้องการทดสอบมาทำการเพาะเลี้ยงบน Nutrient

Agar ด้วยการใช้ needle เขี่ยเชื้อลงบน Nutrient Agar กระจายเชื้อด้วยการใช้ loop ขีดเป็น 4 ระบาย

2. จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เขี่ยโคลนนี้ของเชื้อที่ผ่านการปั่น 24 ชั่วโมงปริมาณ 1 loopfull มาละลายในน้ำกลั่น
4. นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) ทิ้งให้มากที่สุดเพื่อให้ได้ตะกอนของเชื้อไว้
5. เติม TE buffer ลงไปในหลอดที่มีตะกอน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
6. ทำการเขย่าด้วยเครื่อง (vortex) ให้เกิดการผสมกัน
7. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
8. นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอน
9. จากนั้นดูดน้ำใสส่วนบนด้วยความระมัดระวัง ปริมาตร 60 ไมโครลิตรและถ่ายไปยังหลอดที่เตรียมไว้สำหรับเก็บดีเอ็นเอ
10. นำหลอดดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง nano drop ที่ความยาวคลื่น 260 nm
11. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดสอบ

### 3.5.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAb125*) ในเชื้อ *A. baumannii*

ในการศึกษาหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAb125*) ครั้งนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยของ Joshi และคณะ (17) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAb125*) ในเชื้อ *A. baumannii* (17)

ไพรเมอร์	ยีน	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'	ขนาดคู่เบส
OXA-51-F	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353
OXA-51-R		TGGATTGCACTTCATCTTGG	
NDM-F	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
NDM-R		CGGAATGGCTCATCACGATC	
ADC-F	<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	TAAACACCACATATGTTCCG	663
ADC-R		ACTTACTTCAACTCGCGACG	
<i>aphA6</i> -F	<i>aphA6</i>	ATGGAATTGCCCAATATTATTC	736
<i>aphA6</i> -R		TCAATTCAATTCATCAAGTTTTA	
<i>ISAb125</i> -F	<i>ISAb125</i>	TGTTGAAGCGATCCGTTGTT	755
<i>ISAb125</i> -R		GTGCGACAGTTTCAAAGCCA	



1. เตรียมน้ำยา master mix ปริมาตร 24 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 16.8 ไมโครลิตร, 1X Taq buffer with KCL (100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCL; pH 8.8 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 500 มิลลิโมลาร์ KCL, 0.8% (v/v)) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, forward และ reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร และ 1.0 U Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

2. เติมน้ำเอ็นเอของ *A. baumannii* ที่สกัดไว้แล้วหลอดละ 1 ไมโครลิตร สำหรับ negative control ใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ส่วนเชื้อ positive control ที่มียีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *ISAbc125* ได้รับความอนุเคราะห์มาจากรองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิพย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

3. จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermo cycler โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาต่างๆตามชนิดของยีนดังนี้

**1. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสใน การตรวจหายีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ *bla*<sub>NDM-1</sub>**  
เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที สำหรับปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที

**2. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสใน การตรวจหายีน *bla*<sub>ADC</sub>**  
เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 28 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สำหรับปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

**3. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสใน การตรวจหายีน *aphA6***  
เริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สำหรับปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

**4. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสใน การตรวจหายีน *ISAbc125***  
เริ่มที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สำหรับปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

### 3.5.3 การวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยวิธี Agarose gel

1. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส มาตรวจสอบผลผลิตโดยเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ผสมด้วยสี SYBR® Safe DNA stain

2. ผสมผลิตภัณฑ์กับ loading dye แล้วใส่ลงในหลุมบนวุ้นโดยใช้ DNA marker ladder

100 base pair plus หรือ 100 base pair เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ

3. ตั้งค่าเครื่อง electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที
4. จากนั้นนำไปถ่ายภาพและดูแถบดีเอ็นเอใต้แสง Ultraviolet ด้วยเครื่อง Chemidoc

XRS

5. ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่มียีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีควน (*ISAbc125*) โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่งวิเคราะห์ผลที่บริษัท BIONEER (ประเทศเกาหลี) จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรม (blast) กับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

### 3.6 การศึกษาหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี repetitive element polymerase chain reaction (REP-PCR)

REP-PCR เป็นการเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งของลำดับเบสที่ซ้ำกัน (repetitive sequence) โดยในแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันจะมีช่วงลำดับเบสที่ซ้ำเหมือนกัน การศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยเทคนิค REP-PCR นี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยของ Reboli และคณะ (130) ดังแสดงในตารางที่ 6

โดยการศึกษาเลือกใช้ primer ที่เป็น ERIC2 ในการตรวจรูปแบบลายพิมพ์ของเชื้อโดยวิธี REP-PCR เนื่องจากสามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้หลากหลายกว่าไพรเมอร์ ERIC1R (131) โดยม้งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้ ERIC2 ในการตรวจรูปแบบลายพิมพ์ของเชื้อโดยวิธี REP-PCR ได้แก่ งานวิจัยของอุดมลักษณ์และคณะที่ทำการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศไทย (31) งานวิจัยของกิตติศักดิ์และคณะที่ทำการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ของเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศไทย (132) และงานวิจัยของ Joshi และคณะ ที่ทำการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศเนปาล (17)

ตารางที่ 6 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ

*A. baumannii* (130)

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

1. ในการทดสอบนี้จะใช้ DNA template ที่ผ่านการสกัดไว้แล้วในหัวข้อ 3.5.1
2. เตรียมน้ำยา master mix ปริมาตร 24 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 16.8 ไมโครลิตร, 1X Taq buffer with KCL (100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCL; pH 8.8 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 500 มิลลิโมลาร์ KCL, 0.8% (v/v)) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร

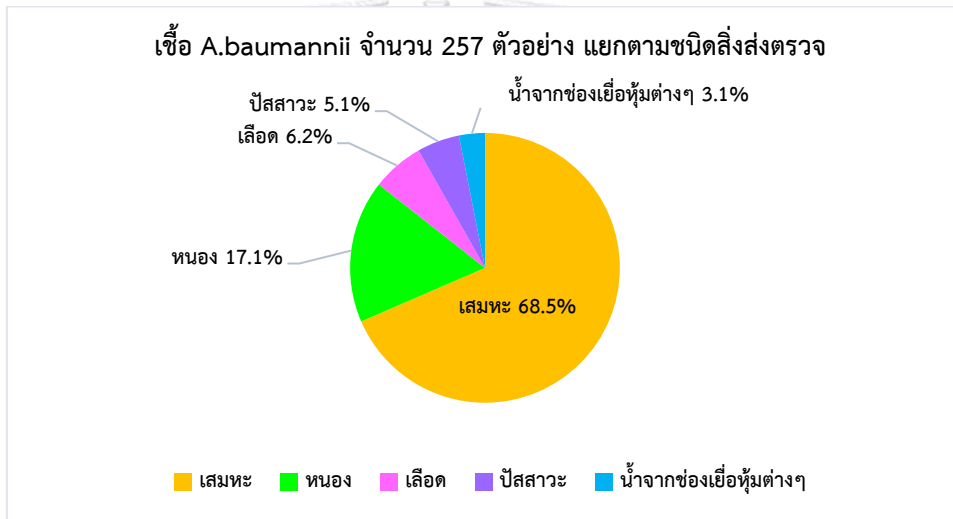
0.5 ไมโครลิตร, ERIC-2 primer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ 1.0 U Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

3. เติมดีเอ็นเอของ *A. baumannii* ที่สกัดไว้แล้วหลอดละ 1 ไมโครลิตร
4. จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermo cycler เพื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้สภาวะต่างๆของปฏิกิริยา ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 45 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที สำหรับปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. เมื่อครบเวลาของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน มาตรวจสอบผลผลิตโดยเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ผสมด้วยสี SYBR® Safe DNA stain
6. ผสมผลิตภัณฑ์กับ loading dye แล้วใส่ลงในหลุมบนวุ้นโดยใช้ DNA marker ladder 100 basepair plus และ 1 kb เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ
7. ตั้งค่าเครื่อง electrophoresis ที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 40 นาที
8. จากนั้นนำไปถ่ายภาพและดูแถบดีเอ็นเอใต้แสง Ultraviolet ด้วยเครื่อง Chemidoc XRS โดยบันทึกภาพเป็นไฟล์แบบ TIFF นำผลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioNumerics Version 8.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) โดยจะตัดสินใจให้เชื่อว่าการทดสอบเป็นกลุ่มเดียวกัน เมื่อมีคะแนนความเหมือนกัน  $\geq 80\%$  หลักเกณฑ์เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Dice coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ด้วยค่าพารามิเตอร์ optimize 2.5 % และ tolerance in the band position 2.5 %

## บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

### 4.1 ผลการเก็บรวบรวมเชื้อ *A. baumannii* จำแนกตามชนิดสิ่งส่งตรวจ

เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลขนาด 1,055 เตียง ในเขตภาคเหนือตอนล่าง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2561 ถึง กุมภาพันธ์ 2562 ส่วนใหญ่มาจากสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะ คิดเป็นร้อยละ 68.5 (176/257 ตัวอย่าง) รองลงมา คือ หนอง คิดเป็นร้อยละ 17.1 (44/257 ตัวอย่าง) เลือด คิดเป็นร้อยละ 6.2 (16/257 ตัวอย่าง) ปัสสาวะ คิดเป็นร้อยละ 5.1 (13/257 ตัวอย่าง) และน้อยที่สุด คือ สิ่งส่งตรวจประเภทน้ำจากช่องเยื่อหุ้มต่างๆในร่างกาย คิดเป็นร้อยละ 3.1 (8/257 ตัวอย่าง) ดังแสดงในรูปที่ 11



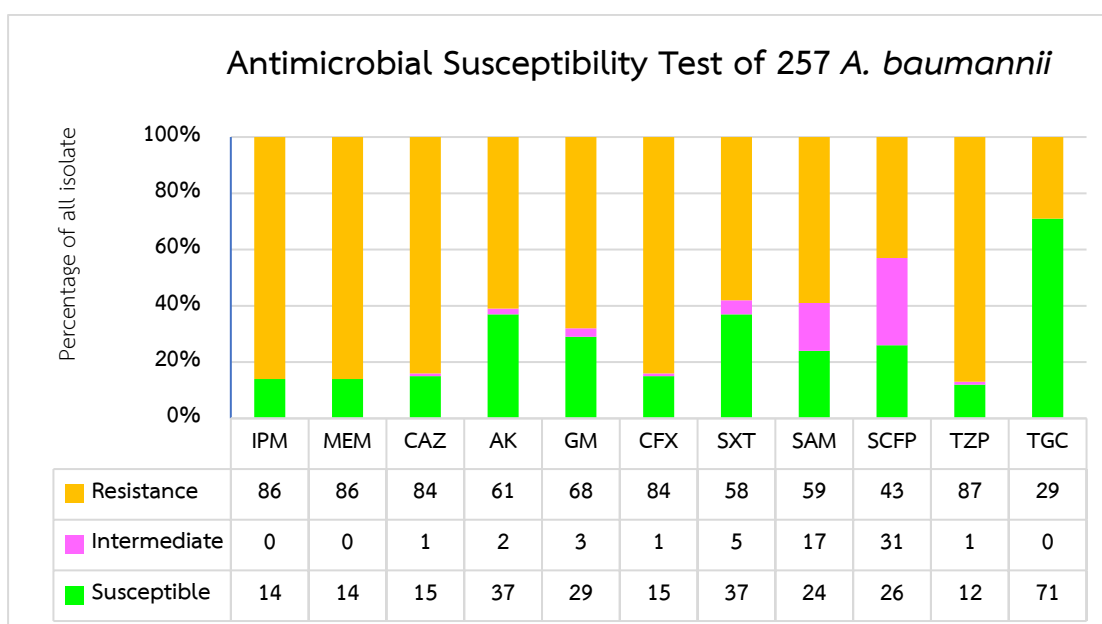
รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงจำนวนเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง จำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ

### 4.2 ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ( Antimicrobial Susceptibility Testing )

#### ในเชื้อ *A. baumannii*

แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 12 โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มยา โดยกลุ่มยาแรก คือ ยากลุ่ม Carbapenems ได้แก่ ยา Imipenem (IPM) และ Meropenem (MEM) พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีอัตราตัวยาร้อยละ 86 กับยาทั้งสองชนิดที่ใช้ทดสอบ กลุ่มที่ 2 ยากลุ่ม Cephalosporin ซึ่งเป็นกลุ่ม Beta-lactam ได้แก่ ยา Ceftazidime (CAZ) โดยพบว่าเชื้อมีอัตราตัวยาร้อยละ 84 กลุ่มที่ 3 ยากลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ ยา Amikacin (AK) และ Gentamicin (GM) พบว่าเชื้อมีอัตราตัวยาร้อยละ 61 และ 68 ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 ยากลุ่ม Quinolone ได้แก่

ยา Ciprofloxacin (CFX) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 84 กลุ่มที่ 5 ยากลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide ได้แก่ ยา Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 58 กลุ่มที่ 6 ยากลุ่ม  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor เป็นยากลุ่ม  $\beta$ -lactam ที่เพิ่มสารยับยั้งเอนไซม์  $\beta$ -lactamase เข้าไปเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีขึ้น ในการศึกษานี้ได้ทดสอบยา Ampicillin/Sulbactam (SAM), Cefoperazone/Sulbactam (SCFP) และ Piperacillin/Tazobactam (TZP) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 59, 43 และ 87 ตามลำดับ และกลุ่มสุดท้ายคือยากลุ่ม Glycylcycline ได้แก่ ยา Tigecycline (TGC) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 29



รูปที่ 12 แผนภูมิแสดงผลของความไวต่อยาปฏิชีวนะ 11 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ของเชื้อ

*A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง

IPM; imipenem, MEM; meropenem, CAZ; ceftazidime, AK ; amikacin, GM ; gentamicin, CFX ; ciprofloxacin, TGC ; tigecycline, SXT ; trimethoprim-sulfamethoxazole, SCFP ; cefoperazone/sulbactam, SAM ; ampicillin/sulbactam, TZP ; piperacillin/tazobactam, S ; susceptible, I ; intermediate, R ; resistance

เมื่อนำแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิด ของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง มาจัดรูปแบบของความไวต่อกุ่มยาสามารถจัดได้ทั้งหมด 74 รูปแบบ ดังแสดงในภาคผนวก ข โดยพบว่ารูปแบบของความไวต่อกุ่มยาของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 74 รูปแบบนั้นสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีการดื้อยามากกว่าหรือเท่ากับ 3 กลุ่มยา เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายขนานที่เรียกว่า Multidrug resistant *A. baumannii* (MDR-AB) ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 221 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 86.0 (221/257) โดยในกลุ่มของการดื้อยาหลาย

ขนานมีรูปแบบของความไวต่อกลุ่มยา มีรายละเอียดดังนี้ รูปแบบที่ 1 เป็นรูปแบบที่มีจำนวนมากที่สุด ซึ่งเป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยาทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 7 กลุ่มยา รูปแบบที่ 2 เป็นรูปแบบที่มีขนาดรองลงมาให้ผลการทดสอบคล้ายกับรูปแบบที่ 1 ยกเว้นยา tigecycline ที่ให้ผลไวต่อยาในการทดสอบ รูปแบบที่ 3 เป็นรูปแบบที่ให้ผลการทดสอบคล้ายกับรูปแบบที่ 2 ยกเว้นยา cefoperazone/sulbactam ที่ให้ผลก้ำกึ่ง (intermediate) รูปแบบที่ 4 เป็นรูปแบบที่ให้ผลการทดสอบคล้ายกับรูปแบบที่ 3 ยกเว้นยา ampicillin/sulbactam และ cefoperazone/sulbactam ที่ให้ผลก้ำกึ่งและรูปแบบที่ 5-65 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยามากกว่าหรือเท่ากับ 3 กลุ่มยา ซึ่งให้รูปแบบต่างๆที่แตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่างของเชื้อ *A. baumannii* ที่ใช้ในการทดสอบ

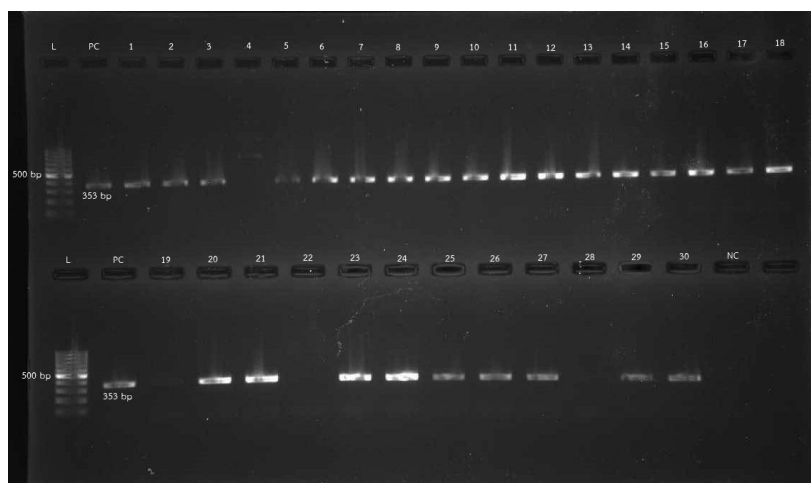
อีกกลุ่มที่มีการดื้อยาน้อยกว่า 3 กลุ่มยาจัดว่าเป็นกลุ่มเชื้อที่ไม่ดื้อยาหลายขนานที่เรียกว่า Non Multidrug resistant *A. baumannii* (Non MDR-AB) ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.0 (36/257) โดยในกลุ่ม Non MDR-AB มีรูปแบบของความไวต่อกลุ่มยาในรูปแบบที่ 66-74 มีรายละเอียดดังนี้ รูปแบบที่ 66-69 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาเพียง 2 กลุ่มเท่านั้น โดยรูปแบบที่ 66 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อต่อยา 2 กลุ่ม คือ ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor (piperacillin/tazobactam) รูปแบบที่ 67 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อต่อยาคคล้ายกับรูปแบบที่ 66 ยกเว้นยา cefoperazone/sulbactam ที่ให้ผลก้ำกึ่ง รูปแบบที่ 68 เป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolone และยากลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide รูปแบบที่ 69 เป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยา กลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และยา กลุ่ม Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ ส่วนรูปแบบที่ 70-73 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อต่อยา 1 กลุ่ม เท่านั้น โดยรูปแบบที่ 70 เป็นรูปแบบที่ให้ผลก้ำกึ่งต่อยา imipenem รูปแบบที่ 71 เป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยากลุ่ม Quinolone รูปแบบที่ 72 เป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยากลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide รูปแบบที่ 73 เป็นรูปแบบที่ให้ผลก้ำกึ่งต่อยา piperacillin/tazobactam และรูปแบบสุดท้าย คือ รูปแบบที่ 74 เป็นรูปแบบที่ไม่ดื้อต่อยากลุ่มใดเลยที่ใช้ในการทดสอบ โดยพบรูปแบบที่ 66-69 จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.3 (6/257) รูปแบบที่ 70-73 จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.7 (7/257) และรูปแบบที่ 74 จำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.9 (23/257) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สรุปการจำแนกแยกเชื้อ *A. baumannii* ตามคุณสมบัติการเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน

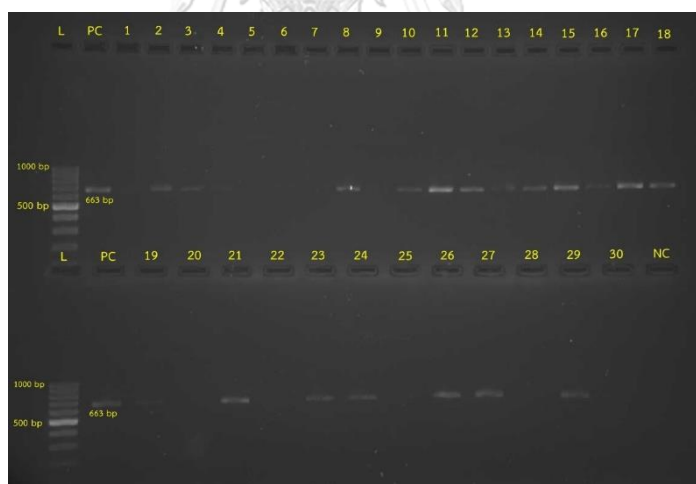
ประเภท	จำนวนกลุ่มยาที่ดื้อ	รูปแบบการดื้อยา	จำนวนเชื้อ(%)
MDR-AB	≥ 3 กลุ่มยา	1-65	221 (86.0)
Non MDR-AB	2 กลุ่มยา	66-69	6 (2.3)
	1 กลุ่มยา	70-73	7 (2.7)
	0	74	23 (9.0)
Non MDR-AB	รวม ≤ 2 กลุ่มยา	66-74	36 (14.0)

#### 4.3 ผลการทดสอบหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีควেন (IS*Aba125*) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การทดสอบหาความชุกของยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ metallo-beta-lactamases (MBLs) ยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> เป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ OXA-type carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamases ยีน *bla*<sub>ADC</sub> เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ cephalosporinase และ ยีน *aphA6* เป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside-modifying enzymes ที่มีผลต่อการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides และ IS*Aba125* ซึ่งเป็น insertion sequence (IS) ที่พบได้บ่อยและมากที่สุดในการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* โดยการศึกษาค้นหาความชุกของยีนทั้งหมดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา และนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบโดยอาศัยการเคลื่อนที่ในวุ้นซึ่งเป็นตัวกลาง (Agarose gel) พบว่าผลผลิตสำหรับยีนทั้งหมด ได้แก่ *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ IS*Aba125* มีขนาดผลผลิตขนาด 353, 663, 621, 736 และ 755 คู่เบส ตามลำดับ ดังที่แสดงให้เห็นในรูปที่ 13-17 ตามลำดับ โดยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบให้ผลบวกกับ *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ IS*Aba125* คิดเป็นร้อยละ 100 (257/257), 38.5 (99/257), 8.2 (21/257), 2.3 (6/257) และ 6.2 (16/257) ตามลำดับ ในการทดสอบกับเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 257 ตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ โดยได้นำยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ IS*Aba125* ที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คัดเลือกแบบสุ่มมาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อยืนยันผลบวกของยีน

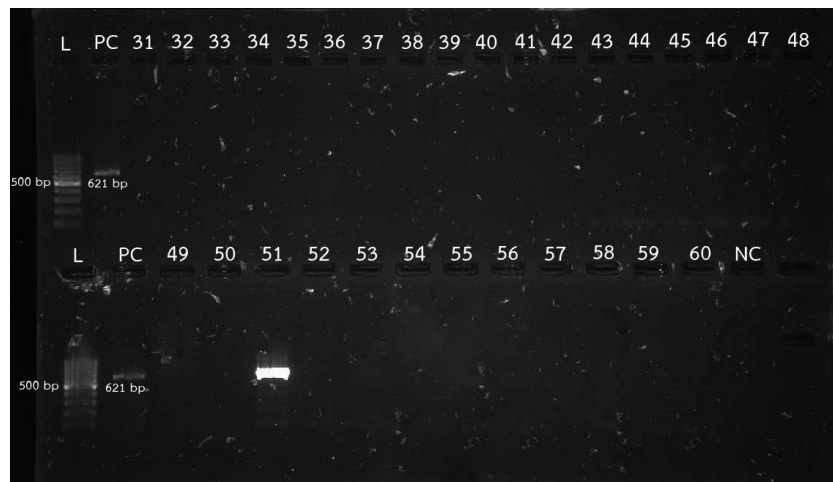


รูปที่ 13 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 353 คู่เบส แถวที่ 5-18, 20-21, 23-27 และ 29-30 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> แถวที่ 4, 19, 22 และ 28 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

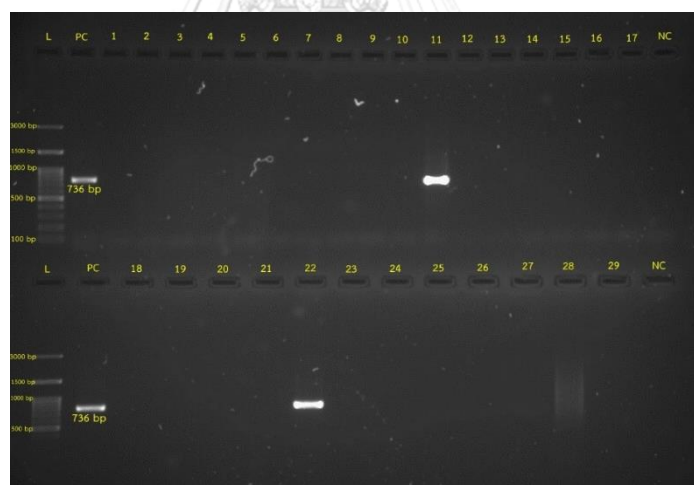


รูปที่ 14 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ของยีน *bla*<sub>ADC</sub> โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 663 คู่เบส แถวที่ 2-3, 8, 10-18, 21, 23-24, 26-27 และ 29 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla*<sub>ADC</sub> แถวที่ 1, 4-7, 19-20, 22, 25, 28 และ 30 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla*<sub>ADC</sub> แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

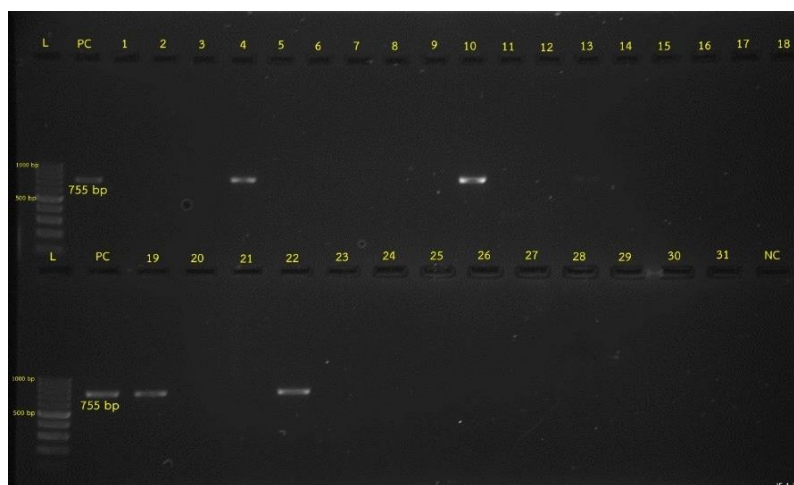




รูปที่ 15 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ของยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 621 คู่เบส แถวที่ 51 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบตีเอ็นเอของยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> แถวที่ 1-50 และ 52-60 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบตีเอ็นเอของยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



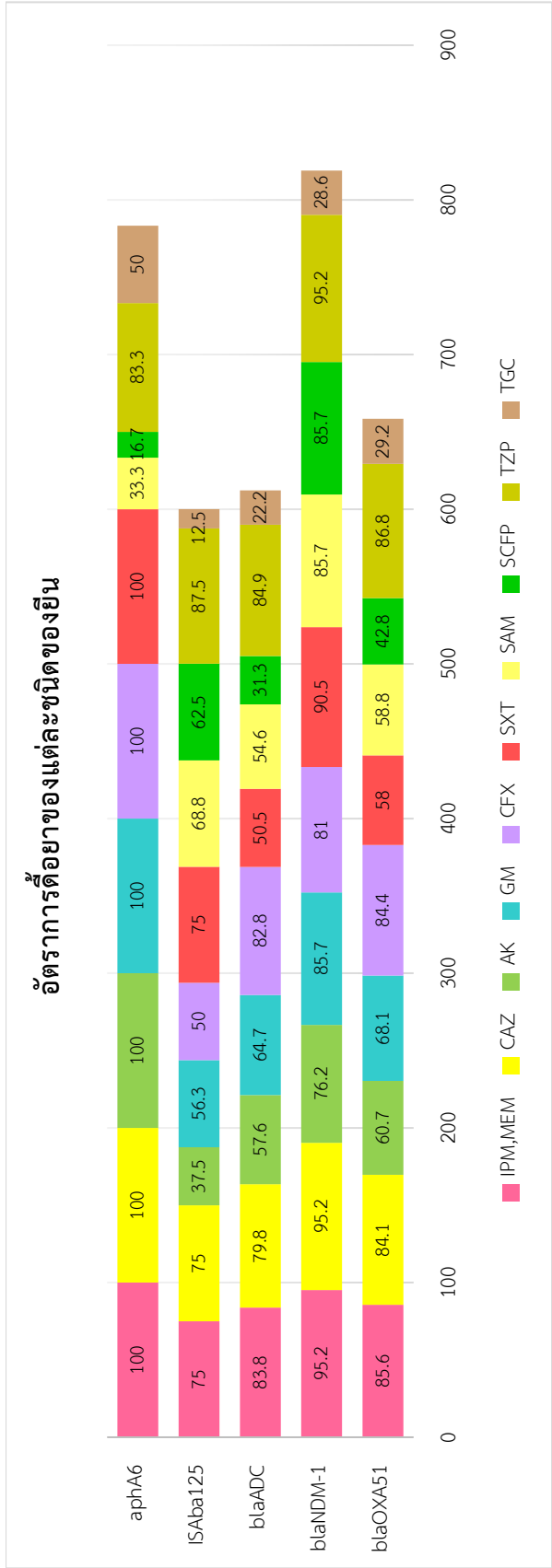
รูปที่ 16 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ของยีน *aphA6* โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบสพลัส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 736 คู่เบส แถวที่ 11 และ 22 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบตีเอ็นเอของยีน *aphA6* แถวที่ 1-10, 12-21 และ 23-29 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบตีเอ็นเอของยีน *aphA6* แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



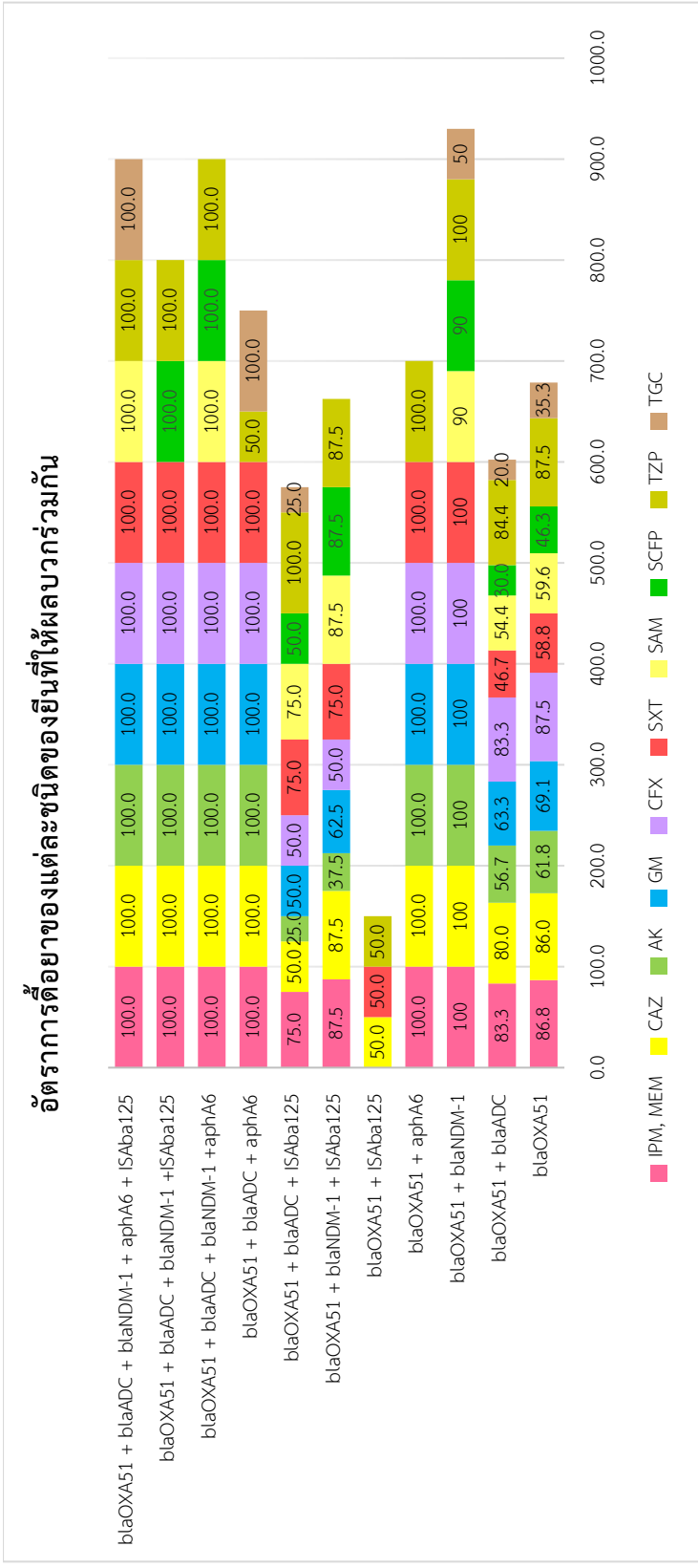
รูปที่ 17 แสดงผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ ของยีน *ISAbc125* โดยแถวที่ L (บน-ล่าง) คือ Ladder 100 คู่เบส แถว PC (บน-ล่าง) คือ positive control (PC) ให้ผลบวกโดยเกิดผลผลิตขนาด 755 คู่เบส แถวที่ 4, 10, 19 และ 22 คือ ตัวอย่างเชื้อที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *ISAbc125* แถวที่ 1-3, 5-9, 11-18, 20-21 และ 23-31 คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *ISAbc125* แถว NC คือ negative control (NC) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

#### 4.4 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยาและผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAbc125*) ในเชื้อ *A. baumannii*

เมื่อนำผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAbc125*) ของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 257 ตัวอย่าง มาเทียบเคียงหาความสัมพันธ์กับผลของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา แสดงดังรูปที่ 18 และ 19 ตามลำดับ



รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยาและผลของปฏิริยาถูกเฝ้าเพื่อเฮอร์สกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเทอร์ซันซีไควน (*ISAbal25*)



รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยาและผลของปฏิกริยาสุกเฝ้าพอลิเมอเรสกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเทอร์ซันซีคอน (ISAbal125) ที่ให้ผลบวกร่วมกันระหว่างยีน

จากกราฟรูปเทียบเคียงแสดงความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธี พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างผลความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยาและผลของปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรส ดังนี้

เชื้อที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรสกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการตี้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 85.6, 84.1, 60.7, 68.1, 84.4, 58.0, 58.8, 42.8, 86.8 และ 29.2 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรสกับยีน *bla<sub>ADC</sub>* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการตี้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 83.8, 79.8, 57.6, 64.7, 82.8, 50.5, 54.6, 31.3, 84.9 และ 22.2 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรสกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการตี้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 95.2, 95.2, 76.2, 85.7, 81.0, 90.5, 85.7, 85.7, 95.2 และ 28.6 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรสกับยีน *ISAb125* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการตี้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 75.0, 75.0, 37.5, 56.3, 50.0, 75.0, 68.8, 62.5, 87.5 และ 12.5 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรสกับยีน *aphA6* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการตี้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่

ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 33.3, 16.7, 83.3 และ 50.0 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 1 ยีนกับปฏิชีวนะลูโกโซพอลิเมอเรส คือ *bla<sub>OXA-51</sub>* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 86.8, 86.0, 61.8, 69.1, 87.5, 58.8, 59.6, 46.3, 87.5 และ 35.3 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 2 ยีนกับปฏิชีวนะลูโกโซพอลิเมอเรส คือ *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 83.3, 80.0, 56.7, 63.3, 83.3, 46.7, 54.4, 30.0, 84.4 และ 20.0 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>NDM-1</sub>* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 90.0, 90.0, 100.0 และ 50.0 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *aphA6* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam คิดเป็นร้อยละ 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0 และ 100.0 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *ISAba125* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Cephalosporin, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam คิดเป็นร้อยละ 50.0, 50.0 และ 50.0 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 3 ยีนกับปฏิภิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส คือ *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub>, *ISAb125* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam คิดเป็นร้อยละ 87.5, 87.5, 37.5, 62.5, 50.0, 75.0, 87.5, 87.5 และ 87.5 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub>, *ISAb125* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 75.0, 50.0, 25.0, 50.0, 50.0 75.0, 75.0, 50.0, 100.0 และ 25.0 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 50.0 และ 100.0 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 4 ยีนกับปฏิภิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส คือ *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam คิดเป็นร้อยละ 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0 และ 100.0 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *ISAb125* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam คิดเป็นร้อยละ 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0 และ 100.0 ตามลำดับ

เชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 5 ยีนกับปฏิชีวนะกลุ่มโพรพิลิมอโรส คือ *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6*, *ISAba125* และผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา amikacin และ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta- lactam/ Beta- lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/ sulbactam และ piperacillin/tazobactam และกลุ่มยา Glycylcycline คิดเป็นร้อยละ 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0 และ 100.0 ตามลำดับ

#### 4.5 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการทดสอบหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีควอน (*ISAba125*) ในเชื้อ *A. baumannii*

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 257 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อจำนวน 221 ตัวอย่าง เป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน เนื่องจากมีการดื้อยามากกว่าหรือเท่ากับ 3 กลุ่มยา ที่ทำการทดสอบ และเมื่อนำรูปแบบการดื้อยามาจัดเรียงทำให้พบความหลากหลายสามารถจำแนกได้เป็น 74 รูปแบบ ตามแสดงในภาคผนวก ข และเมื่อนำเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 257 ตัวอย่าง มาหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *ISAba125* โดยเมื่อนำผลทั้งสองส่วนมาทำการหาความสัมพันธ์ พบว่าเชื้อในรูปแบบดื้อยาเดียวกันอาจให้ผลบวกกับยีนที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 8

รูปแบบที่ 1 เป็นรูปแบบที่มีจำนวนมากที่สุด คือ ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทำการทดสอบทุกชนิด ในรูปแบบนี้ประกอบด้วย *A. baumannii* 46 ตัวอย่าง โดยทั้ง 46 ตัวอย่างให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 71.7 (33/46) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ *bla*<sub>ADC</sub> 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.2 (7/46) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ *bla*<sub>NDM-1</sub> 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10.9 (5/46) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>ADC</sub> และ *ISAba125* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.2 (1/46) ซึ่งในจำนวน 46 ตัวอย่างนี้ไม่พบผลบวกกับยีน *aphA6*

รูปแบบที่ 2 เป็นรูปแบบที่มีจำนวนรองลงมา ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 39 ตัวอย่าง โดยดื้อต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 10 ชนิดที่ทำการทดสอบ ยกเว้นยากลุ่ม Glycylcycline โดย 39 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 51.3 (20/39) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ *bla*<sub>ADC</sub> 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30.8 (12/39) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ *bla*<sub>NDM-1</sub> คิดเป็นร้อยละ 10.3 (4/39) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> และ *ISAba125* 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.1 (2/39) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *bla*<sub>NDM-1</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.5 (1/40)

รูปแบบที่ 3 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ จำนวน 9 ชนิด ยกเว้นยา cefoperazone/sulbactam ที่ให้ผลกำกึ่ง และให้ผลไวต่อยากลุ่ม Glycylcycline โดย 14 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 42.9 (6/14) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ *bla*<sub>ADC</sub> 8



ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 57.1 (8/14) ซึ่งในจำนวน 14 ตัวอย่างนี้ไม่พบผลบวกกับยีน *aphA6*, *bla<sub>NDM-1</sub>* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 4 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มยา Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับยาในกลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/ tazobactam ยกเว้น ampicillin/sulbactam และ cefoperazone/sulbactam ที่ให้ผลกำกึ่ง โดย 3 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *aphA6* 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>NDM-1</sub>* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) ซึ่งในจำนวน 3 ตัวอย่างนี้ไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 5 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มยา Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยาในกลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา ampicillin/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้ พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>* และ *ISAba125* คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) ซึ่งในจำนวน 2 ตัวอย่าง นี้ไม่พบผลบวกกับยีน *aphA6*

รูปแบบที่ 6 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยาในกลุ่ม Sulfonamide, กลุ่มยา Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor และยาในกลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้ พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) และให้ผลบวกกับยีนทั้ง 5 ชนิดที่ทำการทดสอบ คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3)

รูปแบบที่ 7 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยาในกลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ยา piperacillin/tazobactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* เพียงยีนเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 8 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยาในกลุ่ม Sulfonamide, กลุ่มยา Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/ tazobactam และ ยา กลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 9 เป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 10 ชนิดที่ทำการทดสอบ ยกเว้นยาในกลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยาในกลุ่ม Sulfonamide โดยให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 40.0

(2/5) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ *bla*<sub>ADC</sub> 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60.0 (3/5) ซึ่งในจำนวน 3 ตัวอย่าง นี้ไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 10 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคล้ายกับรูปแบบที่ 9 โดยให้ผลไวต่อยากลุ่ม Glycylcycline อีก 1 ชนิด โดยรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (2/4) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (2/4) ซึ่งในจำนวน 3 ตัวอย่างนี้ไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 11 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา cefoperazone/ sulbactam และ piperacillin/ tazobactam โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อยา ampicillin/sulbactam ซึ่งให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) แต่ไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 12 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/tazobactam โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 13 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/tazobactam โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 14 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam และยาในกลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อยากลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 15 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะคล้ายกับรูปแบบที่ 14 โดยให้ผลไวต่อยากลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> เพียงยีนเดียวนั้น คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 16 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/tazobactam โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อยากลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และยา ampicillin/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน

*bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAbA125*

รูปแบบที่ 17 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor โดยให้ผลกำกึ่งต่อยากลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub>, *ISAbA125* คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>ADC</sub> และ *aphA6*

รูปแบบที่ 18 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/tazobactam และยากลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลกำกึ่งต่อยากลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และยา ampicillin/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAbA125*

รูปแบบที่ 19 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบการดื้อยาที่ 18 โดยพบว่าให้ผลกำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAbA125*

รูปแบบที่ 20 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบการดื้อยาที่ 18 โดยพบว่าให้ผลไวต่อยากลุ่ม Glycylcycline ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAbA125*

รูปแบบที่ 21 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/ tazobactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อ ยา ampicillin/ sulbactam และ cefoperazone/sulbactam ซึ่งในรูปแบบนี้ประกอบด้วย *A. baumannii* 9 ตัวอย่าง โดยรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 44.4 (4/9) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55.6 (5/9)

รูปแบบที่ 22 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบที่ 21 โดยพบว่าให้ผลดีต่อยา ampicillin/sulbactam เพิ่มเติม ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 25.0 (1/4) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75.0 (3/4) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAbA125*

รูปแบบที่ 23 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบที่ 22 โดยพบว่าให้ผลดีต่อยากลุ่ม Glycylcycline เพิ่มเติม ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* และ *ISAbA125*

รูปแบบที่ 24 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/ tazobactam และยา กลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อ ยา ampicillin/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 25 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาค้ำกึ่งกับรูปแบบที่ 24 โดยพบว่าให้ผลไวต่อยา กลุ่ม Glycylcycline เพิ่มเติม ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 26 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/ tazobactam และยา กลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อ ยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 27 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาค้ำกึ่งกับรูปแบบที่ 26 โดยพบว่าให้ผลก้ำกึ่งต่อ ยา ampicillin/sulbactam เพิ่มเติม ซึ่งรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 28 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone, ยา กลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยา กลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อ ยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างของรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 29 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/ tazobactam โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อ ยา ampicillin/ sulbactam, cefoperazone/sulbactam ซึ่งทั้ง 4 ตัวอย่างของรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 25.0 (1/4) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 75.0 (3/4) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 30 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาค้ำกึ่งกับรูปแบบที่ 29 โดยให้ผลไวต่อยา กลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยา กลุ่ม Sulfonamide เพิ่มเติม ซึ่งทั้ง 5 ตัวอย่างของรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 80.0 (4/5) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 20.0 (1/5) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 31 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ

โดยรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 32 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับยาในกลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา ampicillin/ sulbactam, piperacillin/ tazobactam โดยให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 20.0 (1/5) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 80.0 (4/5) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 33 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบที่ 32 โดยพบว่าให้ผลไวต่อยากลุ่ม Glycylcycline ซึ่งให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 34 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับยาในกลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 35 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/tazobactam โดยรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 36 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin และ Quinolone โดยรูปแบบการดื้อยาแบบนี้พบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 37 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับยาในกลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ยา piperacillin/ tazobactam โดยให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAba125*

รูปแบบที่ 38 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin, Trimethoprim ร่วมกับยาในกลุ่ม Sulfonamide และ

กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยพบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>NDM-1</sub>*, *ISAb125* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>* และ *aphA6*

รูปแบบที่ 39 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา ampicillin/sulbactam ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2)

รูปแบบที่ 40 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam โดยทั้ง 4 ตัวอย่างของรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 25.0 (1/4) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 75.0 (3/4) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 41 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam , piperacillin/tazobactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* เพียงยีนเดียวทั้ง 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 42 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/ tazobactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 43 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบที่ 42 แต่พบว่าให้ผลไวต่อยา cefoperazone/sulbactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา ampicillin/sulbactam ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างของรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 44 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam และยากลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* เพียงยีนเดียว คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 45 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยพบให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>NDM-1</sub>*, *ISAb125* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>* และ *aphA6*

รูปแบบที่ 46 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และ Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* เพียงยีนเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 47 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และยากลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อยา piperacillin/tazobactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* คิดเป็นร้อยละ 100 (1/1)

รูปแบบที่ 48 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และกลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อยา gentamicin ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* เพียงยีนเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 49 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin, Quinolone, กลุ่มยา Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam และยากลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อยา amikacin ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* เพียงยีนเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>ADC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 50 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคคล้ายกับรูปแบบที่ 49 โดยพบว่าให้ผลไวต่อยา amikacin แต่ให้ผลก้ำกึ่งต่อยา gentamicin ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) และให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) โดยไม่พบผลบวกกับยีน *bla<sub>NDM-1</sub>*, *aphA6* และ *ISAb125*

รูปแบบที่ 51 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides, Quinolone, Beta- lactam/ Beta- lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam และยากลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลก้ำกึ่งต่อ ยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ร่วมกับ *bla<sub>ADC</sub>* คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 52 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam โดย

ให้ผลกำกึ่งต่อยา gentamicin, ampicillin/sulbactam และ cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 53 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาเหมือนกับรูปแบบที่ 52 ยกเว้นยาในกลุ่ม Glycylcycline ให้ผลเป็นดื้อต่อยา ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  เพียงยีนเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน  $bla_{ADC}$ ,  $bla_{NDM-1}$ ,  $aphA6$  และ  $ISAba125$

รูปแบบที่ 54 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาเหมือนกับรูปแบบที่ 52 ยกเว้นให้ผลดื้อต่อยา ampicillin/sulbactam เพิ่ม ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  เพียงยีนเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100 (1/1) โดยไม่พบผลบวกกับยีน  $bla_{ADC}$ ,  $bla_{NDM-1}$ ,  $aphA6$  และ  $ISAba125$

รูปแบบที่ 55 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam และ piperacillin/tazobactam โดยทั้ง 3 ตัวอย่างของรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) และให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$ ,  $ISAba125$  คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3)

รูปแบบที่ 56 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาเกือบทุกกลุ่มที่ทำการทดสอบ ยกเว้น ยาในกลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา amikacin ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน  $bla_{OXA-51}$  คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) และให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{NDM-1}$ ,  $ISAba125$  คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2)

รูปแบบที่ 57 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Quinolone และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อกลุ่มยา Aminoglycosides, ยา ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้พบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 58 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin, Quinolone และ Trimethoprim ร่วมกับ ยาในกลุ่ม Sulfonamide, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam และ ยา กลุ่ม Glycylcycline โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  เพียงชนิดเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100 (1/1)

รูปแบบที่ 59 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamicin, Trimethoprim ร่วมกับ ยา กลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam โดยให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$ ,  $ISAba125$  คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 60 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems, Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam และ



Aminoglycosides ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> เพียงชนิดเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100 (1/1)

รูปแบบที่ 61 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 62 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบที่ 61 ยกเว้นให้ผลกำกึ่งต่อกลุ่มยา Cephalosporin และยา cefoperazone/sulbactam รวมถึงให้ผลไวต่อยา ampicillin/sulbactam โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 63 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Cephalosporin, Aminoglycosides ได้แก่ gentamicin, Quinolone และ Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3)

รูปแบบที่ 64 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycosides และ Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide โดยให้ผลกำกึ่งต่อกลุ่มยา Cephalosporin ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> เพียงชนิดเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100 (1/1)

รูปแบบที่ 65 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Cephalosporin, Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/ tazobactam โดยให้ผลกำกึ่งต่อกลุ่มยา Quinolone และ ยา cefoperazone/sulbactam โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> และ ISAb125 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 (1/1)

รูปแบบที่ 66 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenems และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ได้แก่ piperacillin/tazobactam ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างของรูปแบบนี้พบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3)

รูปแบบที่ 67 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาคลายกับรูปแบบที่ 66 โดยให้ผลกำกึ่งต่อยา cefoperazone/sulbactam เพิ่มเติม ซึ่งรูปแบบนี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 68 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Quinolone และ Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide โดยรูปแบบนี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 69 เป็นรูปแบบที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide และ Beta-lactam/Beta-lactamase inhibitor ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยรูปแบบนี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub>, ISAb125 คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 70 เป็นรูปแบบที่มีความไวต่อยาเกือบทุกชนิดแต่ให้ผลกำกั่งต่อยา Imipenem ซึ่งรูปแบบนี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 71 เป็นรูปแบบที่มีความไวต่อยาเกือบทุกชนิด ยกเว้น ยาในกลุ่ม Quinolone โดยพบเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (2/4) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (2/4)

รูปแบบที่ 72 เป็นรูปแบบที่มีความไวต่อยาเกือบทุกชนิด ยกเว้นยาในกลุ่ม Trimethoprim ร่วมกับ ยากลุ่ม Sulfonamide โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> เพียงยีนเดียวเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 73 เป็นรูปแบบที่มีความไวต่อยาเกือบทุกชนิดแต่ให้ผลกำกั่งต่อยา piperacilin/tazobactam ซึ่งรูปแบบนี้ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> คิดเป็นร้อยละ 100.0 (1/1)

รูปแบบที่ 74 เป็นรูปแบบที่มีความไวต่อยาทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* 23 ตัวอย่าง โดยให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> เท่านั้น 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 52.2 (12/23) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 39.2 (9/23) ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ ISAb<sub>a</sub>125 คิดเป็นร้อยละ 4.3 (1/23) และให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub>, ISAb<sub>a</sub>125 คิดเป็นร้อยละ 4.3 (1/23)

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในรูปแบบต่างๆกับผลการหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAba125*) ในเชื้อ *A. baumannii*

รูปแบบความไวต่อ ยาที่(จำนวนเชื้อ)	ยีนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้					จำนวนเชื้อ
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>aphA6</i>	<i>ISAba125</i>	
1(46)	+	-	-	-	-	33
	+	+	-	-	-	7
	+	-	+	-	-	5
	+	+	-	-	+	1
2(39)	+	-	-	-	-	20
	+	+	-	-	-	12
	+	-	+	-	-	4
	+	-	+	-	+	2
	+	+	+	+	-	1
3(14)	+	-	-	-	-	6
	+	+	-	-	-	8
4(3)	+	-	-	+	-	2
	+	-	+	-	-	1
5(2)	+	-	-	-	-	1
	+	+	+	-	+	1
6(3)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	1
	+	+	+	+	+	1
7(1)	+	-	-	-	-	1
8(1)	+	+	-	+	-	1

รูปแบบความไวต่อ ยาที่(จำนวนเชื้อ)	ยีนที่ทำการศึกษานี้					จำนวนเชื้อ
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>aphA6</i>	<i>ISAba125</i>	
9(5)	+	-	-	-	-	2
	+	+	-	-	-	3
10(4)	+	-	-	-	-	2
	+	+	-	-	-	2
11(1)	+	+	-	-	-	1
12(1)	+	+	-	-	-	1
13(1)	+	+	-	-	-	1
14(3)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	2
15(2)	+	-	-	-	-	2
16(2)	+	-	-	-	-	2
17(2)	+	-	-	-	-	1
	+	-	+	-	+	1
18(1)	+	-	-	-	-	1
19(2)	+	-	-	-	-	1
20(1)	+	-	-	-	-	1
21(9)	+	-	-	-	-	4
	+	+	-	-	-	5
22(4)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	3

รูปแบบความไวต่อ ยาที่(จำนวนเชื้อ)	ยีนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้					จำนวนเชื้อ
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>aphA6</i>	<i>ISAba125</i>	
23(1)	+	-	-	-	-	1
24(1)	+	+	-	-	-	1
25(1)	+	+	-	-	-	1
26(1)	+	-	-	-	-	1
27(1)	+	+	-	-	-	1
28(2)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	1
29(4)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	3
30(5)	+	-	-	-	-	4
	+	+	-	-	-	1
31(2)	+	-	-	-	-	1
32(5)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	4
33(1)	+	+	-	-	-	1
34(1)	+	-	-	-	-	1
35(3)	+	-	-	-	-	2
	+	+	-	-	-	1
36(1)	+	-	-	-	-	1
37(1)	+	-	-	-	-	1
38(1)	+	-	+	-	+	1

รูปแบบความไวต่อ ยาที่(จำนวนเชื้อ)	ยีนที่ทำการศึกษานี้					จำนวนเชื้อ
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>aphA6</i>	<i>ISAba125</i>	
39(2)	+	-	-	-	-	2
40(4)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	3
41(2)	+	-	-	-	-	2
42(2)	+	+	-	-	-	2
43(3)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	2
44(1)	+	-	-	-	-	1
45(2)	+	-	+	-	+	2
46(1)	+	-	-	-	-	1
47(1)	+	+	-	+	-	1
48(1)	+	-	-	-	-	1
49(2)	+	-	-	-	-	2
50(2)	+	-	-	-	-	1
	+	+	-	-	-	1
51(1)	+	+	-	-	-	1
52(1)	+	+	-	-	-	1
53(1)	+	-	-	-	-	1
54(1)	+	-	-	-	-	1
55(3)	+	+	-	-	-	2
	+	+	-	-	+	1
56(2)	+	-	-	-	-	1
	+	-	+	-	-	1

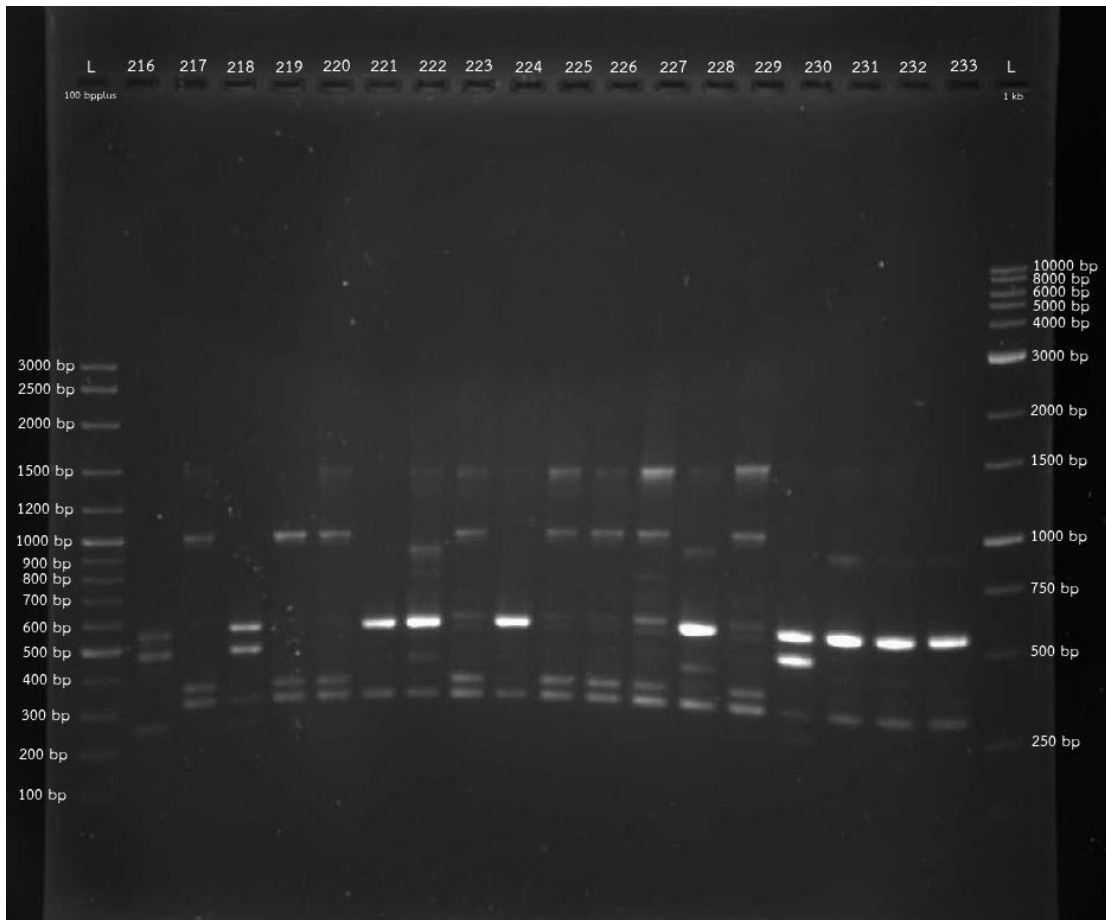
รูปแบบความไวต่อ ยาที่(จำนวนเชื้อ)	ยีนที่ทำการศึกษานี้					จำนวนเชื้อ
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>aphA6</i>	<i>ISAba125</i>	
57(1)	+	+	-	-	-	1
58(1)	+	-	-	-	-	1
59(1)	+	+	-	-	+	1
60(1)	+	-	-	-	-	1
61(1)	+	+	-	-	-	1
62(1)	+	+	-	-	-	1
63(3)	+	-	-	-	-	2
	+	+	-	-	-	1
64(1)	+	-	-	-	-	1
65(1)	+	-	-	-	+	1
66(3)	+	-	-	-	-	2
	+	+	-	-	-	1
67(1)	+	+	-	-	-	1
68(1)	+	+	-	-	-	1
69(1)	+	+	-	-	+	1
70(1)	+	+	-	-	-	1
71(4)	+	-	-	-	-	2
	+	+	-	-	-	2
72(1)	+	-	-	-	-	1
73(1)	+	+	-	-	-	1

รูปแบบความไวต่อ ยาที่(จำนวนเชื้อ)	ยีนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้					จำนวนเชื้อ
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>aphA6</i>	<i>ISAba125</i>	
74(23)	+	-	-	-	-	12
	+	+	-	-	-	9
	+	-	-	-	+	1
	+	-	+	-	+	1

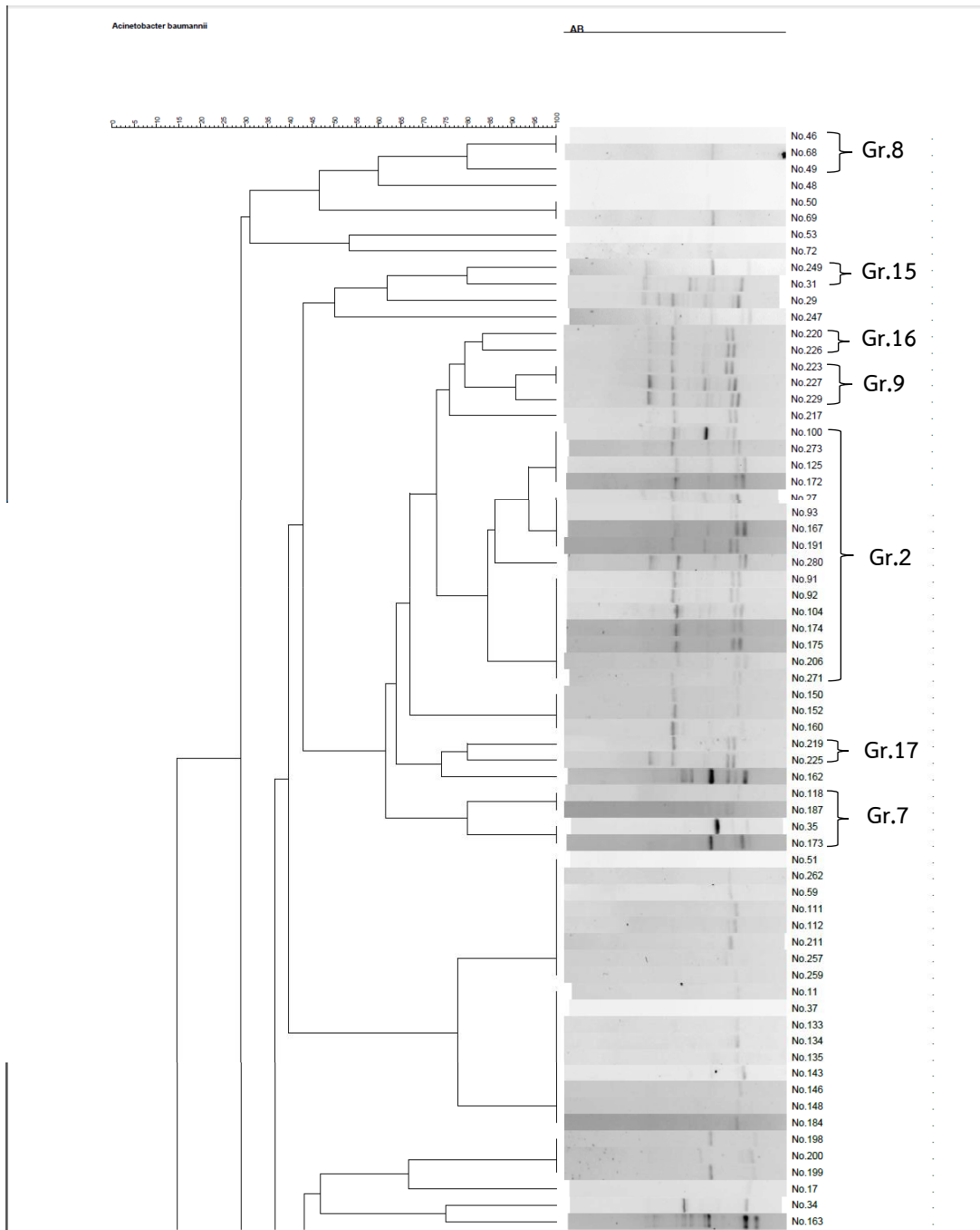
#### 4.6 ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง นำมาศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ด้วยวิธี REP-PCR ดังแสดงในภาพถ่ายของเจล รูปที่ 20 และเมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ BioNumeric version 8.0 (ใบอนุญาตการใช้งานในระยะทดลองใช้ฟรี 30 วัน) โดยใช้หลักเกณฑ์เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอด้วยวิธี Dice Coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ optimize 2.5% และ tolerance in the band position 2.5% เกณฑ์ตัดสินว่าเชื้อที่ทำการทดสอบเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน  $\geq$  ร้อยละ 80 ขึ้นไป ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน จากการทำ REP-PCR แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมดังกล่าว ทำให้ได้รูปแบบลายพิมพ์อาร์อีพี เป็น 18 กลุ่ม (Group ; Gr.) ดังแสดงในรูปที่ 21 โดยพบกลุ่มหลักที่ใหญ่ที่สุดคือกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 24.1 รองลงมา ได้แก่ กลุ่ม 2, กลุ่ม 3 และ กลุ่ม 4 พบร้อยละ 6.2, 5.4 และ 4.7 ตามลำดับ นอกจากนี้พบเชื้อ *A. baumannii* ที่มีรูปแบบลายพิมพ์อาร์อีพี ที่ไม่เหมือนกันเลย ทำให้ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ 107 ตัวอย่าง

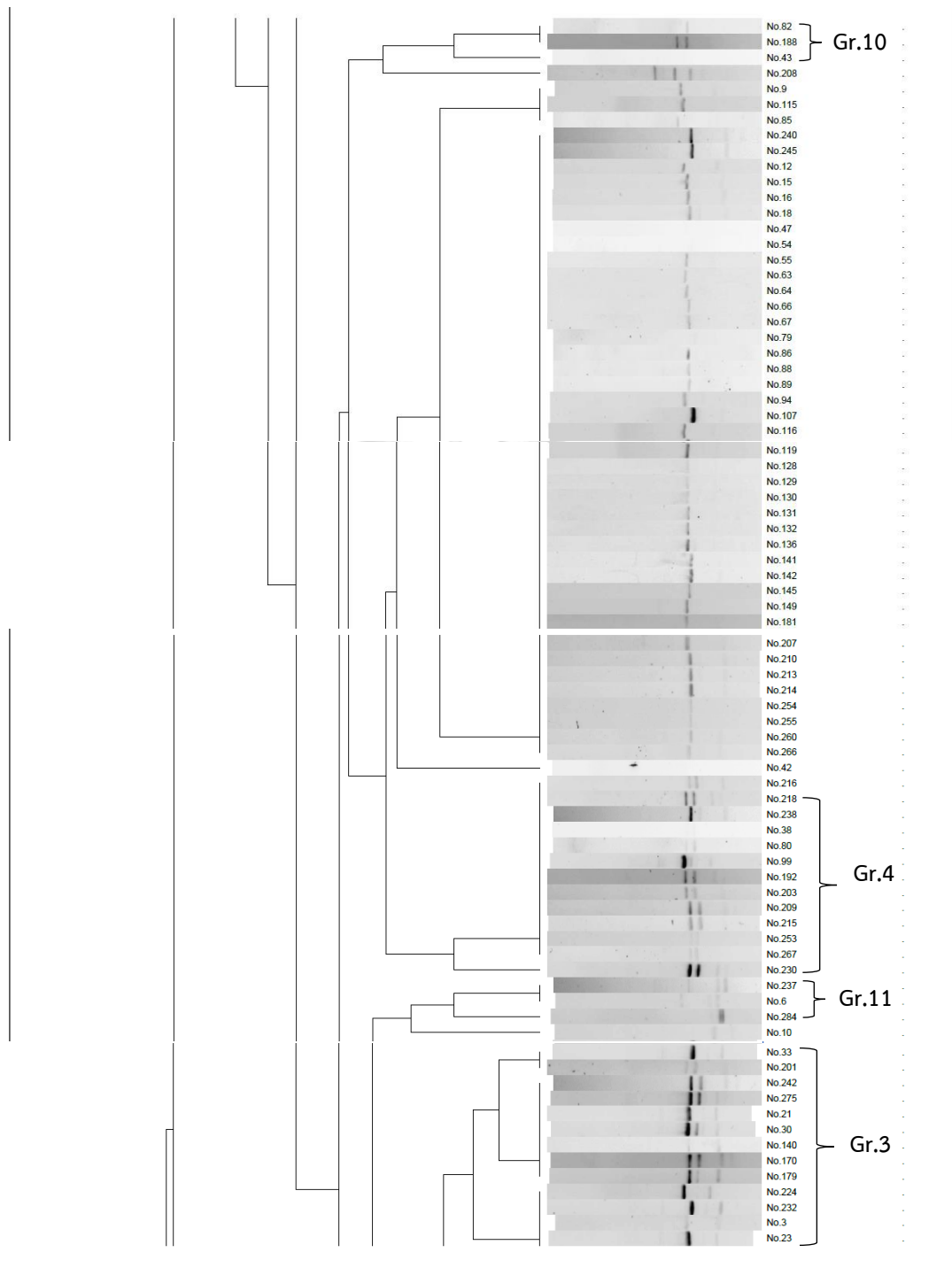




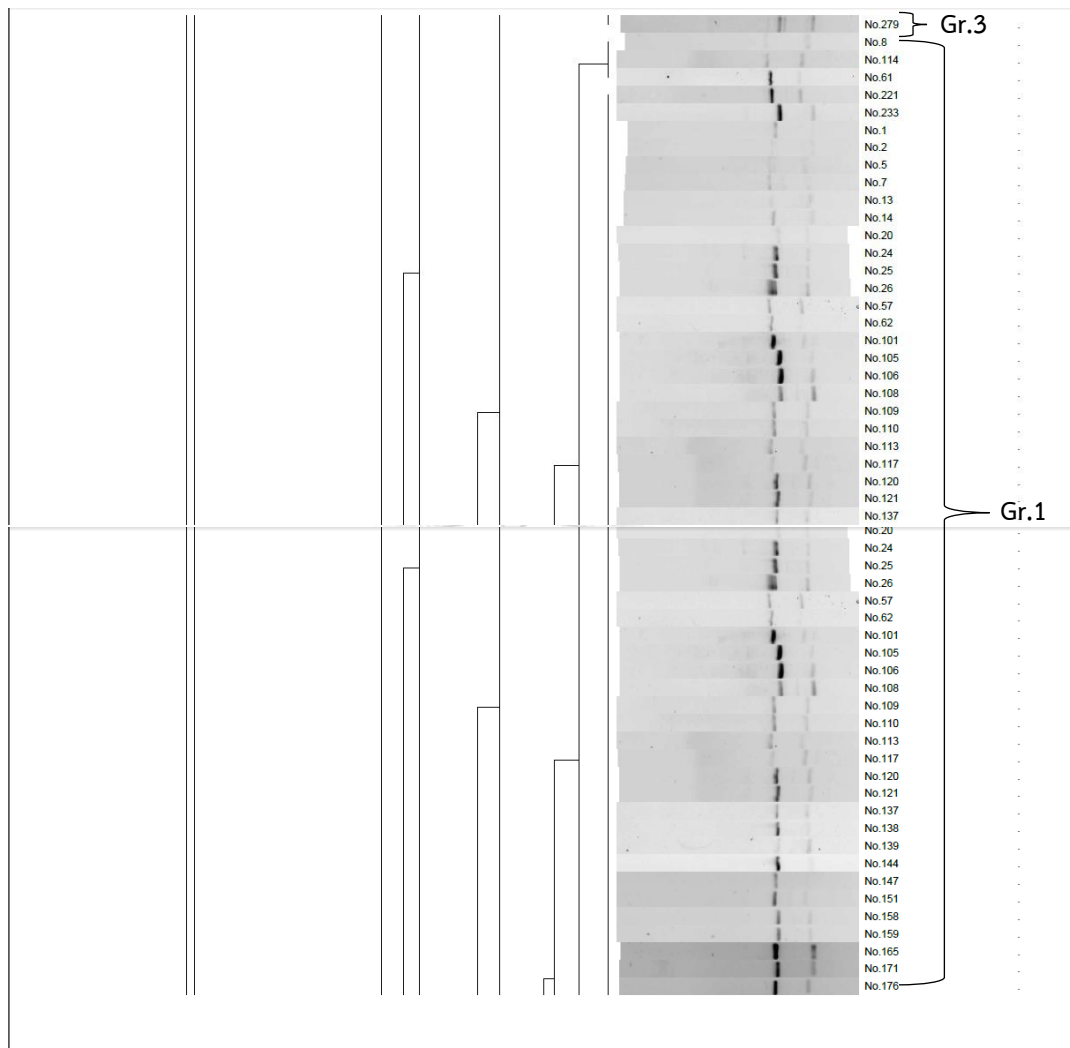
รูปที่ 20 ภาพถ่ายดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) แถว L คือ Ladder 100 คู่เบสพลัส (ซ้าย) และ 1 กิโลเบส (ขวา) แถวที่ 2-19 คือ ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่พบแถบดีเอ็นเอเป็นลายพิมพ์อาร์อีพีรูปแบบต่างๆ



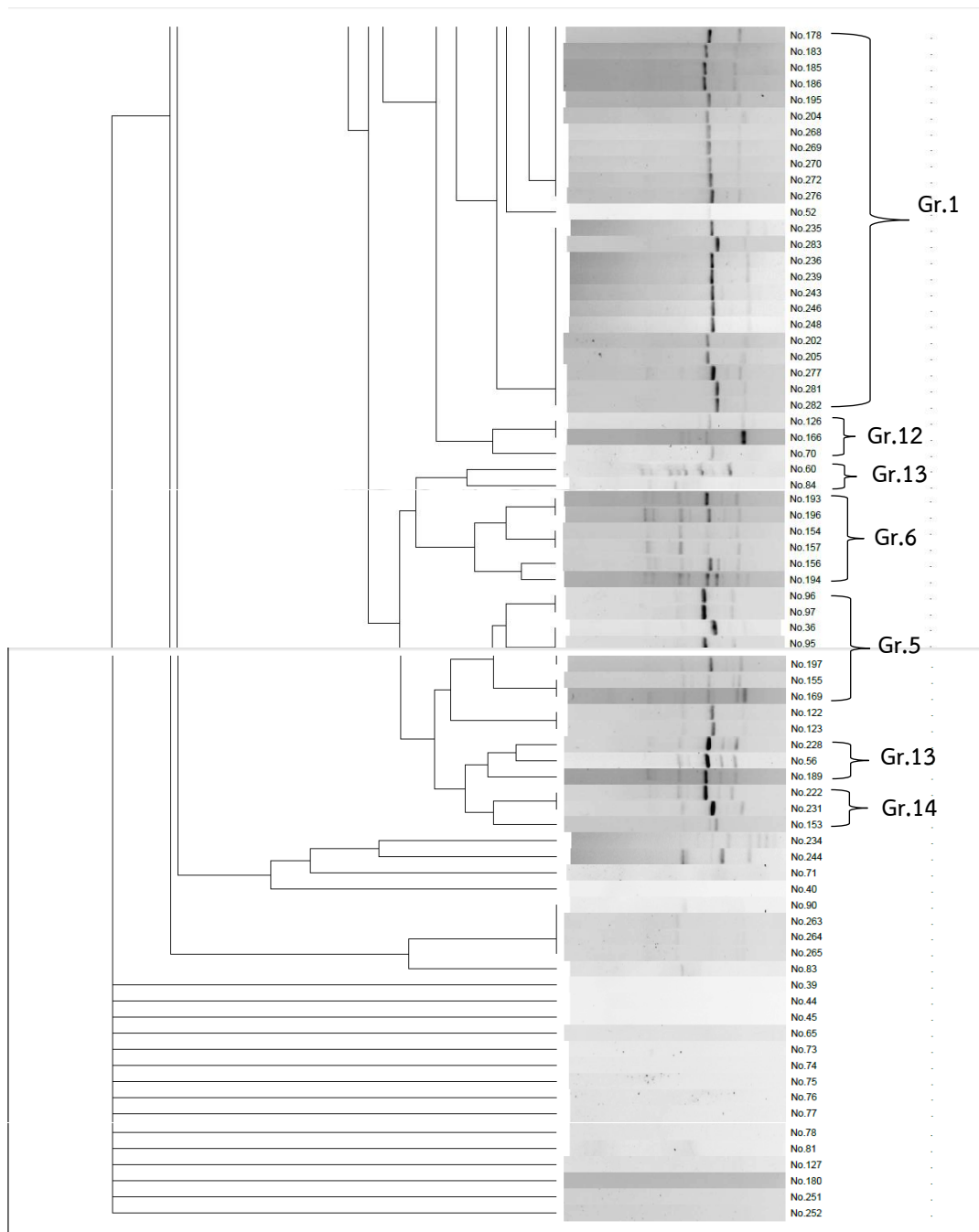
รูปที่ 21 REP-PCR DNA fingerprinting patterns วิเคราะห์โดยโปรแกรม BioNumeric version 8.0 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ optimize 2.5% และ tolerance in the band position 2.5% เกณฑ์ตัดสินว่าเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน  $\geq$  ร้อยละ 80 ขึ้นไป



รูปที่ 21 (ต่อ) REP-PCR DNA fingerprinting patterns วิเคราะห์โดยโปรแกรม BioNumeric version 8.0 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ optimize 2.5% และ tolerance in the band position 2.5% เกณฑ์ตัดสินว่าเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน  $\geq$  ร้อยละ 80 ขึ้นไป



รูปที่ 21 (ต่อ) REP-PCR DNA fingerprinting patterns วิเคราะห์โดยโปรแกรม BioNumeric version 8.0 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ optimize 2.5% และ tolerance in the band position 2.5% เกณฑ์ตัดสินว่าเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน  $\geq$  ร้อยละ 80 ขึ้นไป



รูปที่ 21 (ต่อ) REP-PCR DNA fingerprinting patterns วิเคราะห์โดยโปรแกรม BioNumeric version 8.0 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ optimize 2.5% และ tolerance in the band position 2.5% เกณฑ์ตัดสินว่าเป็นกลุ่มเดียวกันเมื่อคะแนนความเหมือนกัน  $\geq$  ร้อยละ 80 ขึ้นไป

#### 4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ผลการทดสอบหาความชุกของ ยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAbc125*) ด้วยวิธีปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสและผลการหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

การหาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 257 ตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี rep-PCR สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 18 กลุ่ม และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่ม รูปแบบยาและความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ชันซีเควน (*ISAbc125*) สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 9

กลุ่ม 1 (Gr.1) เป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 62 ตัวอย่าง หรือ คิดเป็นร้อยละ 24.1 (62/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 37 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 59.7 (37/62) พบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 22 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 35.5 (22/62) พบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub> 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.2 (2/62) และพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> และ *ISAbc125* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.6 (1/62) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 23 รูปแบบ จากตารางในภาคผนวก ข ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 21.0 (13/62) รูปแบบที่ 2 จำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.2 (15/62) รูปแบบที่ 3 จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.1 (5/62) รูปแบบที่ 6, 9, 14, 21 และ 71 จำนวนรูปแบบละ 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.2 (2/62) รูปแบบที่ 19, 22, 23, 28, 29, 31, 40, 48, 51, 52, 54, 60, 66 และ 72 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.6 (1/62) และรูปแบบที่ 74 จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.1 (5/62) โดยเป็นส่วนใหญ่ MDR-AB ร้อยละ 85.5 ( 53/62 ) non MDR-AB ร้อยละ 14.5 (9/62)

กลุ่ม 2 (Gr.2) เป็นกลุ่มที่มีขนาดรองลงมาโดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 16 ตัวอย่าง หรือ คิดเป็นร้อยละ 6.2 (16/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.0 (4/16) และพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75.0 (12/16) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 12 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 32 จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18.75 (3/16) รูปแบบที่ 1, 2, 10, 17, 21, 30, 31, 40 และ 55 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.25 (1/16) และรูปแบบที่ 42 และ 50 จำนวนรูปแบบละ 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.5 (2/16) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 3 (Gr.3) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 14 ตัวอย่าง หรือ คิดเป็นร้อยละ 5.4 (14/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.9 (6/14) และพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (7/14) และพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>

ร่วมกับ  $bla_{NDM-1}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.1 (1/14) รูปแบบความไวต่อยานั้นมี 9 รูปแบบ. ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 28.6 (4/14) รูปแบบที่ 2 จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 21.4 (3/14) และรูปแบบที่ 3, 21, 22, 24, 61, 68 และ 74 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.1 (1/14) โดยส่วนใหญ่เป็น MDR-AB ร้อยละ 85.7 (12/14) non MDR-AB ร้อยละ 14.3 (2/14)

กลุ่ม 4 (Gr.4) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 12 ตัวอย่าง หรือ คิดเป็นร้อยละ 4.7 (12/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (8/12) และพบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (4/12) ส่วนรูปแบบความไวต่อยามี 7 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (6/12) และรูปแบบที่ 2, 9, 21, 25, 28 และ 74 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.3 (1/12) โดยส่วนใหญ่เป็น MDR-AB ร้อยละ 91.7 (11/12) non MDR-AB ร้อยละ 8.3 (1/12)

กลุ่ม 5 (Gr.5) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.7 (7/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.3 (1/7) พบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 71.4 (5/7) และพบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{NDM-1}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.7 (1/7) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 5 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 2 จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.9 (3/7) และรูปแบบที่ 4, 21, 57 และ 63 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.3 (1/17) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 6 (Gr.6) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 6 ตัวอย่าง หรือ คิดเป็นร้อยละ 2.3 (6/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  ทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (6/6) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 และ 74 จำนวนรูปแบบละ 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (2/6) และรูปแบบที่ 2 และ 10 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.7 (1/6) โดยเป็น MDR-AB ร้อยละ 66.7 (4/6) non MDR-AB ร้อยละ 33.3 (2/6)

กลุ่ม 7 (Gr.7) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 4 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.6 (4/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.0 (1/4) พบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (2/4) และพบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  และ ISAb125 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.0 (1/4) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 21, 35, 55 และ 67 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.0 (1/4) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 8 (Gr.8) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (3/3) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 2, 5 และ 30 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 9 (Gr.9) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (3/3) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 39, 43 และ 46 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 10 (Gr.10) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) และพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 9, 13 และ 20 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 11 (Gr.11) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (3/3) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 26, 30 และ 41 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 12 (Gr.12) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) พบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) และพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub> และ *ISAb<sub>a</sub>125* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 15, 45 และ 74 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) โดยเป็น MDR-AB ร้อยละ 66.7 (2/3) non MDR-AB ร้อยละ 33.3 (1/3)

กลุ่ม 13 (Gr.13) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ *bla*<sub>OXA-51</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) พบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>ADC</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) และพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub> 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) และรูปแบบที่ 9 จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB



กลุ่ม 14 (Gr.14) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) และพบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{NDM-1}$  2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 (2/3) และรูปแบบที่ 74 จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 (1/3) โดยเป็น MDR-AB ร้อยละ 66.7 (2/3) non MDR-AB ร้อยละ 33.3 (1/3)

กลุ่ม 15 (Gr.15) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.8 (2/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) และพบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ *aphA6* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 และ 4 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 16 (Gr.16) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.8 (2/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 และ 29 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 17 (Gr.17) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.8 (2/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  ทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.0 (2/2) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 40 และ 53 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

กลุ่ม 18 (Gr.18) โดยมีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.8 (2/257) เมื่อนำมาศึกษาความชุกของยีนพบ  $bla_{OXA-51}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) และพบยีน  $bla_{OXA-51}$  ร่วมกับ  $bla_{ADC}$  1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) มีรูปแบบความไวต่อยาทั้งหมด 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 33 และ 58 จำนวนรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0 (1/2) ซึ่งทุกตัวอย่างเป็น MDR-AB

ตารางที่ 9 แสดงผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* 257 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) ที่พิจารณาร่วมกับรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะและผลการหาค่าความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และอินเซอร์ซีแควน (*ISba125*) ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

rep-PCR group (จำนวน)	อื่น		Non MDR จำนวน (%)	MDR จำนวน (%)	รูปแบบความไวต่อยา(จำนวนตัวอย่าง)
	อื่น	จำนวน (%)			
1(62)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	37(59.7)	9 (14.5%)	53 (85.5%)	1(7), 2(10), 3(2), 6(1), 9(1), 14(1), 19(1), 21(1), 22(1), 23(1), 31(1), 40(1), 48(1), 54(1), 60(1), 66(1), 71(1), 72(1), 74(3)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	22(35.5)			
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	2(3.2)			
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub> + <i>ISba125</i>	1(1.6)			
2(16)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	4(25.0)	0	16 (100.0%)	1(1), 17(1), 40(1), 50(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	12(75.0)			
3(14)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	6(42.9)	2 (14.3%)	12 (85.7%)	1(3), 2(1), 21(1), 74(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	7(50.0)			
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	1(7.1)			

rep-PCR group (จำนวน)	ขึ้น		Non MDR จำนวน (%)	MDR จำนวน (%)	รูปแบบความไวต่อยา(จำนวนตัวอย่าง)
	ขึ้น	จำนวน (%)			
4(12)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	8(66.7)	1 (8.3%)	11 (91.7%)	1(6), 9(1), 28(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	4(33.3)			2(1), 2(1), 25(1), 74(1)
5(7)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	1(14.3)	0	7 (100.0%)	63(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	5(71.4)			2(3), 21(1), 57(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	1(14.3)			4(1)
6(6)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	6(100.0)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	1(2), 2(1), 10(1), 74(2)
7(4)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	1(25.0)	0	4 (100.0%)	35(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	2(50.0)			21(1), 67(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub> + IS <i>bla</i> <sub>T25</sub>	1(25.0)			55(1)
8(3)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	3(100.0)	0	3 (100.0%)	2(1), 5(1), 30(1)
9(3)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	3(100.0)	0	3 (100.0%)	39(1), 43(1), 46(1)

rep-PCR group (จำนวน)	ขึ้น		Non MDR จำนวน (%)	MDR จำนวน (%)	รูปแบบความไวต่อยา(จำนวนตัวอย่าง)
	ขึ้น	จำนวน (%)			
10(3)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	1(33.3)	0	3 (100.0%)	20(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	2(66.7)			9(1), 13(1)
11(3)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	3(100.0)	0	3 (100.0%)	26(1), 30(1), 41(1)
12(3)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	1(33.3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	15(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	1(33.3)			18(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> + <i>ISAba125</i>	1(33.3)			45(1)
13(3)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	1(33.3)	0	3 (100.0%)	1(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	1(33.3)			9(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	1(33.3)			1(1)
14(3)	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	1(33.3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	74(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	2(66.7)			1(2)

rep-PCR group (จำนวน)	ขึ้น		Non MDR จำนวน (%)	MDR จำนวน (%)	รูปแบบความไวต่อยา(จำนวนตัวอย่าง)
	ขึ้น	จำนวน (%)			
15(2)	<i>bla<sub>OXa-51</sub></i>	1(50.0)	0	2 (100.0%)	1(1)
	<i>bla<sub>OXa-51</sub> + aph46</i>	1(50.0)			
16(2)	<i>bla<sub>OXa-51</sub></i>	2(100.0)	0	2 (100.0%)	1(1), 29(1)
17(2)	<i>bla<sub>OXa-51</sub></i>	2(100.0)	0	2 (100.0%)	40(1), 53(1)
18(2)	<i>bla<sub>OXa-51</sub></i>	1(50.0)	0	2 (100.0%)	58(1)
	<i>bla<sub>OXa-51</sub> + bla<sub>ADC</sub></i>	1(50.0)			

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกัน จากโรงพยาบาลขนาด 1,055 เตียงในภาคเหนือตอนล่าง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2561 ถึง กุมภาพันธ์ 2562 พบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มาจากสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะมากที่สุด ร้อยละ 68.5 (176/257) รองลงมา คือ หนอง ร้อยละ 17.1 (44/257 ตัวอย่าง) เลือด ร้อยละ 6.2 (16/257 ตัวอย่าง) ปัสสาวะ ร้อยละ 5.1 (13/257 ตัวอย่าง) โดยพบสิ่งส่งตรวจประเภทน้ำจากช่องเยื่อหุ้มต่างๆ ในร่างกาย น้อยที่สุด ร้อยละ 3.1 (8/257 ตัวอย่าง)

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 11 ชนิด พบว่าเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่าง มีอัตราการดื้อยา สูงมากกว่าร้อยละ 80 ในยา Piperacillin/Tazobactam (TZP), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Ceftazidime (CAZ) และ Ciprofloxacin (CFX) โดยพบอัตราการดื้อยา รองลงมาในกลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ ยา Gentamycin (GM) และ Amikacin (AK) พบว่าเชื้อมีอัตราดื้อยาร้อยละ 68 และ 61 ตามลำดับ ส่วนยา Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) พบดื้อยาร้อยละ 58 Ampicillin/Sulbactam (SAM) และ Cefoperazone/Sulbactam พบว่ามีอัตราการดื้อยาร้อยละ 59 และ 43 ตามลำดับ ส่วนยาปฏิชีวนะที่มีอัตราการดื้อยาในระดับต่ำที่สุด พบว่ามีการดื้อยาเพียง ร้อยละ 29 คือ ยากลุ่ม Glycylcycline ได้แก่ยา Tigecycline (TGC)

เชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 257 ตัวอย่าง ที่ทำการศึกษาวินิจฉัยรูปแบบของความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (MDR-AB) คิดเป็นร้อยละ 86.0 (221/257) และเป็น Non MDR-AB ร้อยละ 14.0 (36/257) ซึ่งเมื่อนำมาจัดรูปแบบของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ สามารถจัดรูปแบบได้ทั้งหมด 74 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 17.9 (46/257) ซึ่งรูปแบบนี้ดื้อยาทุกชนิดที่ทำการทดสอบ รองลงมา คือ รูปแบบที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 15.1 (39/257) ซึ่งเป็นรูปแบบยาที่คล้ายรูปแบบที่ 1 แต่ไวต่อยา tigecycline เพียงชนิดเดียว

ผลการทดสอบหาความชุกของยีน *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>ADC</sub>, *aphA6* และ *ISAba125* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา และนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบโดยอาศัยการเคลื่อนที่ในวุ้นซึ่งเป็นตัวกลาง พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบพบยีน *bla*<sub>OXA-51</sub> ร้อยละ 100.0 (257/257) รองลงมา คือ ยีน *bla*<sub>ADC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *ISAba125* และ *aphA6* ร้อยละ 38.5 (99/257), 8.2 (21/257), 6.2 (16/257) และ 2.3 (6/257) ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้พบว่าให้ผลบวกพร้อมกันจำนวน 2 ยีน คิดเป็นร้อยละ 40.5 (104/257) จำนวน 3 ยีน คิดเป็นร้อยละ 5.5 (14/257) จำนวน 4 ยีน คิดเป็นร้อยละ 0.8 (2/257) และพบทั้ง 5 ยีน คิดเป็นร้อยละ 0.4 (1/257)

เมื่อพิจารณาผลความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยาและอัตราของการดื้อยาแต่ละชนิดแสดงข้อมูลดังนี้ ผลบวกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>* ที่ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 257 ตัวอย่าง มีจำนวนการดื้อยา Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Ceftazidime (CAZ), Amikacin (AK), Gentamicin (GM), Ciprofloxacin (CFX), Trimethoprim- Sulfamethoxazole (SXT), Ampicillin/ Sulbactam (SAM), Cefoperazone/ Sulbactam (SCFP) และ Piperacillin/Tazobactam (TZP) และ Tigecycline (TGC) คิดเป็นร้อยละของการดื้อต่อยา 85.6, 85.6, 84.1, 60.7, 68.1, 84.4, 58.0, 58.8, 42.8, 86.8 และ 29.2 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla<sub>ADC</sub>* ที่ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 99 ตัวอย่าง มีจำนวนการดื้อยา Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Ceftazidime (CAZ), Amikacin (AK), Gentamicin (GM), Ciprofloxacin (CFX), Trimethoprim- Sulfamethoxazole (SXT), Ampicillin/ Sulbactam (SAM), Cefoperazone/ Sulbactam (SCFP) และ Piperacillin/Tazobactam (TZP) และ Tigecycline (TGC) คิดเป็นร้อยละของการดื้อต่อยา 83.8, 83.8, 79.8, 57.6, 64.7, 82.8, 50.5, 54.6, 31.3, 84.9 และ 22.2 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *bla<sub>NDM-1</sub>* ที่ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 21 ตัวอย่าง มีจำนวนการดื้อยา Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Ceftazidime (CAZ), Amikacin (AK), Gentamicin (GM), Ciprofloxacin (CFX), Trimethoprim- Sulfamethoxazole (SXT), Ampicillin/ Sulbactam (SAM), Cefoperazone/ Sulbactam (SCFP) และ Piperacillin/Tazobactam (TZP) และ Tigecycline (TGC) คิดเป็นร้อยละของการดื้อต่อยา 95.2, 95.2, 95.2, 76.2, 85.7, 81.0, 90.5, 85.7, 85.7, 95.2 และ 28.6 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *aphA6* ที่ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 6 ตัวอย่าง มีจำนวนการดื้อยา Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Ceftazidime (CAZ), Amikacin (AK), Gentamicin (GM), Ciprofloxacin (CFX), Trimethoprim- Sulfamethoxazole (SXT), Ampicillin/ Sulbactam (SAM), Cefoperazone/ Sulbactam (SCFP) และ Piperacillin/Tazobactam (TZP) และ Tigecycline (TGC) คิดเป็นร้อยละของการดื้อต่อยา 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 100.0, 33.3, 16.7, 83.3 และ 50.0 ตามลำดับ

ผลบวกของยีน *ISAbc125* ที่ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 16 ตัวอย่าง มีจำนวนการดื้อยา Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Ceftazidime (CAZ), Amikacin (AK), Gentamicin (GM), Ciprofloxacin (CFX), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT), Ampicillin/Sulbactam (SAM), Cefoperazone/ Sulbactam (SCFP) และ Piperacillin/Tazobactam (TZP) และ Tigecycline (TGC) คิดเป็นร้อยละของการดื้อต่อยา 75.0, 75.0, 75.0, 37.5, 56.3, 50.0, 75.0, 68.8, 62.5, 87.5 และ 12.5 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของความไวต่อยาทั้ง 7 กลุ่มยา และผลการหาความชุกของยีน *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *aphA6* และ *ISAbc125* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ในรูปแบบที่ 1 ที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 7 กลุ่มยาประกอบไปด้วยเชื้อจำนวน 46 ตัวอย่าง โดย 33 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  สูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 71.7 (33/46) รองลงมาคือผลบวกร่วมกันระหว่าง  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{ADC}$  คิดเป็นร้อยละ 15.2 (7/46) ผลบวกระหว่าง  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{NDM-1}$  คิดเป็นร้อยละ 10.9 (5/46) ผลบวกระหว่าง  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{ADC}$ , ISAb125 คิดเป็นร้อยละ 2.1 (1/46) ส่วนรูปแบบที่ 2 ที่มีจำนวนรองลงมา ที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะเกือบทุกกลุ่ม ยกเว้น ยา tigecycline ซึ่งรูปแบบการดื้อยานี้ให้ผลบวกกับยีน  $bla_{OXA-51}$  สูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 51.3 (20/39) รองลงมาคือผลบวกร่วมกันระหว่าง  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{ADC}$  คิดเป็นร้อยละ 30.8 (12/39) ผลบวกร่วมกันระหว่าง  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{NDM-1}$  คิดเป็นร้อยละ 10.3 (4/39) ผลบวกร่วมกันระหว่าง  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{NDM-1}$ , ISAb125 คิดเป็นร้อยละ 5.1 (2/39) และผลบวกร่วมกันระหว่าง  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{ADC}$ ,  $bla_{NDM-1}$  และ  $aphA6$  คิดเป็นร้อยละ 2.5 (1/39) โดยรูปแบบการดื้อยาในรูปแบบอื่นๆดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* 257 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) สามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างได้ 18 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ที่สุดโดยประกอบด้วยเชื้อ 62 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.1 (62/257) กลุ่มที่มีขนาดรองลงมา คือ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.2 (16/257) กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.4 (14/257) กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.7 (12/257) กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.7 (7/257) กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.3 (6/257) กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.6 (4/257) กลุ่มที่ 8-14 ประกอบด้วยเชื้อจำนวนกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.2 (3/257) และกลุ่มที่ 15-18 ประกอบด้วยเชื้อจำนวนกลุ่มละ 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.8 (2/257) โดยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่างนี้มีรูปแบบลายพิมพ์อาร์อีพีไม่สามารถจัดกลุ่มได้จำนวน 107 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 41.6 (107/257) จากผลข้างต้นจะเห็นได้ว่าอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่มีการดื้อยาหลายชนิดและมีการสร้างยีนดื้อยานั้นเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อในหลายๆกลุ่ม ไม่ได้มาจากกลุ่มเดียว โดยมีกลุ่มที่พบมากที่สุด 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบยีนดื้อยามากที่สุด

## 5.2 อภิปรายผล

ปัญหาการดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* นั้นเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญ และมีแนวโน้มของการทวีความรุนแรงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในหลายๆประเทศทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทยด้วยเช่นกัน ซึ่งปัญหาการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* นี้นำไปสู่อัตราการเจ็บป่วยและอัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้หากยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมกับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* อาจจะทำให้เกิดการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆได้ สำหรับประเทศไทย ข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีแนวโน้มของความไวต่อยากลุ่ม Carbapenems, Cephalosporins,



Aminoglycosides และ Beta-lactam/ Beta-lactamase inhibitors ลดลงเรื่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา Imipenem และ Meropenem ซึ่งเป็นยาขนานสุดท้าย (last resort antibiotic) ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (8) ทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ ซึ่งในปัจจุบันจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาเกือบทุกชนิดที่มีใช้ในการรักษาการติดเชื้อในปัจจุบัน ยกเว้น colistin (9) แต่การใช้ยา colistin นั้นมีผลข้างเคียงที่สูง จึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้รักษาอาการติดเชื้อในระยะยาว (10, 11)

การศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อที่ผ่านการเพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ ในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยไม่สามารถเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลของผู้ป่วยในโรงพยาบาลได้ การนำเสนอข้อมูลเป็นการนำเสนอในภาพรวม ไม่ได้นำเสนอเป็นรายบุคคล โดยตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 257 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนใหญ่มาจากสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะร้อยละ 68.5 รองลงมา คือ หนองจากแผล ร้อยละ 17.1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานในประเทศไทย ได้แก่ งานวิจัยของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์และโรงพยาบาลลพบุรี ที่พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนานก็พบได้จากเสมหะถึงร้อยละ 64 และ 68.2 ตามลำดับ (133, 134) และสอดคล้องกับงานวิจัยในต่างประเทศของ Joshi และคณะที่ทำการศึกษาในประเทศเนปาล พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน ส่วนมากเก็บได้จากสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะถึงร้อยละ 59.1 (26/44) (17) รวมถึงงานวิจัยของ Merkier และคณะที่ทำการศึกษาในประเทศชูดาน พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน ส่วนมากเก็บได้จากสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะถึงร้อยละ 61 (135) ซึ่งการตรวจพบเชื้อในสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะมากที่สุดเนื่องมาจากเชื้อ *A. baumannii* มักก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่ปอดหรือโรคปอดอักเสบเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งวิธีระมัดระวังและคณะได้ทำการศึกษาปอดอักเสบจากการติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลตติยภูมิ ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศไทย จากผู้ป่วยปอดอักเสบในโรงพยาบาล พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อที่ก่อโรคประมาณร้อยละ 30 ของปอดอักเสบในโรงพยาบาลทั้งหมด (136)

เชื้อ *A. baumannii* ที่ศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่าจำนวน 221 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่มีการดื้อยาหลายขนานเป็นส่วนใหญ่ มีการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenem และ Cephalosporins ในระดับที่สูง โดยพบอัตราการดื้อยาในกลุ่ม Carbapenem ทั้งยา Imipenem (IPM) และ Meropenem (MEM) สูงถึงร้อยละ 86 ส่วนใหญ่อาจเนื่องมาจากกลไกการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา ได้แก่ OXA-type carbapenemase (Class D) และ metallo-beta-lactamases (MBLs, Class B) ในการศึกษาพบความชุกของยีน  $bla_{OXA-51}$  ในทุกตัวอย่างของเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทำการทดสอบ ร้อยละ 100.0 อาจเนื่องมาจากยีน  $bla_{OXA-51}$  เป็นยีนดื้อยาโดยกำเนิด (intrinsic gene) ของเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งสามารถนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ (identification) ได้ (135) สามารถส่งผ่านยีนบนโครโมโซม (chromosomal encoded) (137) ยีนนี้สามารถสร้างเอนไซม์ OXA-51 like ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยที่ใหญ่ที่สุดของ OXA-type carbapenemase สามารถพบกลุ่มย่อยของ  $bla_{OXA-51}$  like ได้มากกว่า 95 กลุ่มย่อย (variants) (8) อาทิเช่น  $bla_{OXA-69}$ ,  $bla_{OXA-66}$ ,  $bla_{OXA-83}$ ,  $bla_{OXA-84}$  เป็นต้น โดยยีน  $bla_{OXA-69}$  เป็นยีนที่มีการเร่งปฏิกิริยาการดื้อยาที่ค่อนข้างน้อย แต่หากยีนตัวนี้มีกรพบ ISAbal ในบริเวณตำแหน่งของโปรโมเตอร์ จะส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกของยีนที่มากขึ้น (116,

138) นอกจากนี้ยีนดื้อยาในกลุ่มของ OXA-type carbapenemase ยังมียีนดื้อยาชนิดอื่นๆ อีกหลายยีน อาทิเช่น *bla*<sub>OXA 23</sub> , *bla*<sub>OXA 24</sub> และ *bla*<sub>OXA 58</sub> โดยมีรายงานความชุกของยีน *bla*<sub>OXA 23</sub> สูงในประเทศไทย และทวีปเอเชีย (8, 17, 31, 139, 140) ส่วนยีน *bla*<sub>OXA24</sub> และ *bla*<sub>OXA58</sub> พบได้น้อยหรืออาจไม่พบเลย (17, 20, 31) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษายีน *bla*<sub>OXA 23</sub> , *bla*<sub>OXA 24</sub> และ *bla*<sub>OXA 58</sub> เหล่านี้ร่วมด้วย นอกจากนี้การดื้อยาในกลุ่ม Carbapenem อาจมีสาเหตุมาจากการสร้างเอนไซม์ metallo-beta-lactamases (MBLs, Class B) ได้เช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการตรวจพบยีน MBLs เพียงหนึ่งชนิดคือ *bla*<sub>NDM-1</sub> ให้ผลบวกร้อยละ 7.9 โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศไทยของอุดมลักษณ์และคณะที่พบ *bla*<sub>NDM-1</sub> ร้อยละ 9.1 (31) และการศึกษาในประเทศแอลจีเรียที่พบ *bla*<sub>NDM-1</sub> ร้อยละ 10.2 (88) แต่การศึกษาครั้งนี้ให้ผลบวกสูงกว่าการศึกษาในประเทศปากีสถาน อินเดีย และเวียดนาม (141-143) ซึ่งให้ผลบวกในช่วงร้อยละ 1.1- 4.1 แต่ให้ผลบวกต่ำกว่าการศึกษาในประเทศเนปาลซึ่งพบร้อยละ 13.6 (17) แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการดื้อยาที่สูงของยา Carbapenem ถึงร้อยละ 86 อาจเนื่องมาจาก ยีน MBLs ตัวอื่นๆ อาทิเช่น *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub> เป็นต้น ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจหา หากต้องการทดสอบอาจตรวจด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การตรวจหายีนด้วยวิธี PCR หรือสามารถตรวจลักษณะทางฟีโนไทป์ในการหาเอนไซม์ metallo-beta lactamase ได้โดยใช้การทดสอบด้วยวิธี EDTA carbapenem combined disc

ส่วนการดื้อยาในกลุ่ม Cephalosporins ได้แก่ ยา Ceftazidime (CAZ) ในระดับสูงมากกว่าร้อยละ 80 จากการศึกษาครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกลไกการสร้างเอนไซม์ *Acinetobacter*-derived cephalosporinase (ADC) โดยยีน *bla*<sub>ADC</sub> อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้มีอัตราความชุกเพียงร้อยละ 38.5 (99/257) ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาในประเทศเนปาลของ Joshi และคณะ ที่พบยีน *bla*<sub>ADC</sub> สูงถึงร้อยละ 90.1 (17) และการศึกษาในประเทศอิหร่านของ Sarhaddi และคณะ พบยีน *bla*<sub>ADC</sub> ทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบร้อยละ 100 (54/54) ซึ่งการตรวจพบยีน *bla*<sub>ADC</sub> ทุกตัวอย่าง มีความเป็นไปได้ว่าเนื่องจากมีการดื้อยา ceftazidime และ cefotaxime สูงถึงร้อยละ 98.1 (53/54) และร้อยละ 96.3 (52/54) ตามลำดับ (15) และการศึกษาในประเทศอิหร่านอีกหนึ่งงานวิจัย พบยีน *bla*<sub>ADC</sub> ร้อยละ 82 (31/39) (144) การดื้อยาในกลุ่ม Cephalosporins ของเชื้อ *A. baumannii* นอกจากจะมีสาเหตุมาจากกลไกการสร้างเอนไซม์ ADC โดยยีน *bla*<sub>ADC</sub> แล้วนั้น อาจเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) ได้แก่ *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>GES</sub> และ *bla*<sub>CTX</sub> เป็นต้น หรืออาจมีกลไกอื่นๆ อาทิเช่น การลดความสามารถของยาในการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอก หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding proteins ร่วมด้วย (69, 70) ซึ่งสามารถตรวจหาโดยวิธีทางฟีโนไทป์เบื้องต้น สำหรับเอนไซม์ ESBLs ได้แก่ การทดสอบด้วยวิธี disk diffusion จากนั้นทำการทดสอบยืนยันด้วยวิธี Combination disk หรือสามารถใช้วิธีทางจีโนไทป์โดยการหายีนดื้อยาด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ในการศึกษาครั้งนี้พบอัตราการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ได้แก่ ยา gentamycin (GM) และ amikacin (AK) ร้อยละ 68 และ 61 ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเกิดจากกลไกการสร้าง aminoglycoside-modifying enzymes (AME) มาทำลายยา ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้อง คือ ยีน *aphA6* โดยในการศึกษาครั้งนี้พบผลบวกต่อยีน *aphA6* เพียงร้อยละ 2.3 ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาใน

ต่างประเทศของ Joshi, Mosavat และ Sarhaddi และคณะ (15, 17, 144) ที่พบผลบวกสูงถึงร้อยละ 40.1, 72.0 และ 81.5 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีผลการรายงานการพบยีน *aphA6* ความชุกของยีน *aphA6* ในการศึกษาครั้งนี้ มีระดับที่ต่ำกว่างานวิจัยอื่น ๆ นั้น อาจเนื่องมาจากอัตราการดื้อยา amikacin ของการศึกษานี้พบต่ำกว่าการศึกษาในประเทศอิหร่านของ Sarhaddi และคณะ ที่ตรวจพบยีน *aphA6* ถึงร้อยละ 81.5 โดยมีการดื้อยา amikacin ในอัตราที่สูงมาก ร้อยละ 90.7 (15) หรือการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides อาจมีเอนไซม์ AME ชนิดอื่น อาทิเช่น phosphotransferases ชนิดอื่น (*aphA1*), nucleotidyltransferases (*aadA1*, *aadB*) และ/หรือ acetyltransferase (*aacC1*) (145) หรือกลไกอื่นที่มาจากเกี่ยวข้อง อาทิเช่น การเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งที่ยาไปออกฤทธิ์ โดยเกิดการ point mutation ในส่วนของ ribosomal protein หรือ 16S rRNA หรือ กลไกการขับยาออกจากเซลล์ (drug efflux mechanism) ซึ่งการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ของเชื้อ *A. baumannii* อาจเกิดขึ้นเพียงกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือหลายกลไกพร้อมๆกัน (103) ซึ่งในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆร่วมด้วย

ในการศึกษานี้ตรวจพบอินเซอร์ชันซีควอน (ISAb<sub>a</sub>125) เพียงร้อยละ 6.2 (16/257) โดยส่วนมากพบ ISAb<sub>a</sub>125 ร่วมกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> และ *bla*<sub>OXA-51</sub> ถึงร้อยละ 50 (8/16) ของการพบ ISAb<sub>a</sub>125 แต่พบต่ำกว่างานวิจัยของ Khorsi และคณะ ในประเทศแอลจีเรียที่พบยีนทั้ง 2 ชนิด ISAb<sub>a</sub>125 ร่วมกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> จาก 9 ใน 10 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> คิดเป็นร้อยละ 90 (88) นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยของประเทศเนปาลโดย Joshi และคณะพบ ISAb<sub>a</sub>125 ร่วมกับยีน *bla*<sub>NDM-1</sub> ทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา เนื่องมาจากเชื้อ *A. baumannii* อาจมี อินเซอร์ชันซีควอน หลายชนิด ได้แก่ ISAb<sub>a</sub>1 ที่พบร่วมกับยีน *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24/40</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> และ/หรือ ยีน *bla*<sub>ADC</sub> (114, 115), ISAb<sub>a</sub>125 ร่วมกับ *bla*<sub>NDM-1</sub> (17), ISAb<sub>a</sub>4 (146) โดยการศึกษาวิจัยของ Turton และคณะ พบว่าการแสดงออกของยีนหรือการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ OXA-type carbapenemase นั้นเมื่อมีอินเซอร์ชันซีควอน ทางด้าน upstream ของยีน *bla*<sub>OXA</sub> จะทำหน้าที่เป็น promoter ให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น (116, 117) และจากการศึกษาของ Lopes และคณะที่ศึกษาบทบาทหน้าที่ของ ISAb<sub>a</sub>125 ร่วมกับยีน *bla*<sub>ADC</sub> ผลการศึกษาพบว่า ISAb<sub>a</sub>125 ส่งเสริมให้มีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเมื่อพบร่วมกับยีน *bla*<sub>ADC</sub> จะส่งเสริมให้มีการแสดงออกและดื้อต่อยาในกลุ่ม cephalosporin (147)

การศึกษานี้ได้ตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี REP-PCR เป็นวิธีที่เป็นประโยชน์และรวดเร็วในการระบุลักษณะทางระบาดวิทยาของการระบาดของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาล โดยวิธีนี้ใช้ระยะเวลาและขั้นตอนน้อยกว่าวิธี PFGE ที่เป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุล (molecular genotyping) ของเชื้อ *A. baumannii* (126) และจากงานวิจัยของ Grundmann และคณะ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในแต่ละห้องปฏิบัติการที่ไม่ซ้ำกัน จำนวน 7 ห้องปฏิบัติการใน 6 ประเทศแถบยุโรป ผลที่ได้พบว่าการศึกษาทางระบาดวิทยานี้ให้ผลการศึกษาที่มีความถูกต้องร่วมกันของแต่ละห้องปฏิบัติการมากกว่าร้อยละ 96.8 (148) และงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งเป็นงานวิจัยของ VILA และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธี PCR-based techniques

ที่แตกต่างกัน ได้แก่ REP-PCR, arbitrarily primed (AP) PCR, amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) พบว่าเทคนิค REP-PCR มีอำนาจในการจำแนกรูปแบบทางสายพันธุ์ และความสามารถในการทำซ้ำแต่ละครั้งดีกว่าวิธี PCR-based techniques อื่นๆ (149) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Bou และคณะที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการจำแนกสายพันธุ์เอ็นเอด้วย 2 วิธี คือ REP-PCR และ AP-PCR ผลการศึกษาพบว่าวิธี REP-PCR มีอำนาจในการจำแนกสายพันธุ์ สูงกว่าวิธี AP-PCR โดยใช้เทคนิค PFGE เป็นวิธีมาตรฐาน สามารถระบุได้ว่าเทคนิค REP-PCR เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์และรวดเร็วในการนำมาใช้ศึกษาลักษณะทางระบาดวิทยาของการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* (126) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ทางผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธี REP-PCR ในการศึกษาในรูปแบบทางด้านระบาดวิทยา เนื่องจาก เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วและราคาถูก เมื่อเทียบกับวิธีอื่นในการศึกษา ระบาดวิทยา

ในการศึกษานี้สามารถจำแนกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลขนาด 1,055 เตียง ทางภาคเหนือตอนล่าง ด้วยวิธี REP-PCR ได้ถึง 18 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทำการทดสอบนั้น มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก (genetic diversity) โดยอาจมาจากบรรพบุรุษคนละบรรพบุรุษกัน หรือ มีแหล่งต้นกำเนิดเริ่มต้นจากคนละโคลนกัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้ทราบถึงข้อมูลของผู้ป่วย หอผู้ป่วยที่รับเข้าเป็นผู้ป่วยใน ฯลฯ อาจทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างแม่นยำ การศึกษานี้พบความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* หลักๆอยู่ 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ซึ่งมีจำนวนสมาชิกมากที่สุดถึง 62 ตัวอย่าง และรองลงมาคือ กลุ่ม 2, กลุ่ม 3 และกลุ่ม 4 มีจำนวน 16, 14 และ 13 ตัวอย่าง ตามลำดับ นอกจากนี้จะพบเป็นกลุ่มเล็กๆที่มีสมาชิก 2-7 ตัวอย่าง และมีเชื้อที่ไม่สามารถนำมาจัดรูปแบบเข้ากับกลุ่มอื่นๆได้จำนวน 107 ตัวอย่าง โดยในกลุ่มที่ 1 พบว่าเชื้อมีรูปแบบความไวต่อยา ในรูปแบบยาที่ 2 สูงที่สุด คือ เชื้อมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ยกเว้น ยา tigecycline รองลงมา คือ รูปแบบยาที่ 1 ซึ่งมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ในกลุ่มหลักกลุ่มที่ 1 นี้ เป็นเชื้อที่เป็น MDR-AB จำนวน 53 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 85.5 ส่วนที่เหลือในกลุ่มหลักกลุ่มที่ 1 เป็น Non MDR-AB จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.5 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของอุดมลักษณ์และคณะจากประเทศไทย (31) ที่ได้ทำการศึกษาด้วยวิธี REP-PCR ในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 339 ตัวอย่างจากโรงพยาบาล 4 แห่ง พบว่าสามารถแยกความหลากหลายทางสายพันธุ์ได้ถึง 33 กลุ่ม โดยมีกลุ่มหลักอยู่จำนวน 4 กลุ่มเช่นกัน ได้แก่ R16, R24, R4 และ R1 ซึ่งมีจำนวนสมาชิก 157, 29, 27 และ 23 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Joshi และคณะจากประเทศเนปาล (17) และ Zeighami และคณะจากประเทศอิหร่าน ที่ได้ทำการศึกษาด้วยวิธี REP-PCR ของเชื้อ *A. baumannii* พบว่าสามารถแยกความหลากหลายทางสายพันธุ์ได้ 7 กลุ่ม และ 8 กลุ่ม ตามลำดับ (150)

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยากับรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii* จากการทำ REP-PCR พบว่ากลุ่มที่ 1-2 ซึ่งเป็นกลุ่มหลักพบยีน  $bla_{OXA-51}$  ในจำนวนที่สูงที่สุด ซึ่งเป็นเพราะว่าเป็นยีนที่เป็น intrinsic carbapenemase gene และพบ  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{ADC}$  ในจำนวนที่สูงรองลงมา โดยการพบ  $bla_{OXA-51}$  กับ  $bla_{ADC}$  ในจำนวนที่สูง มีความสัมพันธ์กับ

จำนวนการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems และ cephalosporin โดยพบว่ามีจำนวนการดื้อยาคิดเป็นร้อยละ 86.0 และ 84.0 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าทั้งสี่กลุ่มที่พบรูปแบบการดื้อยาแบบ MDR-AB สูงมากกว่าร้อยละ 85.0 ซึ่งการศึกษาที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของอุดมลักษณ์และคณะจากประเทศไทย (31) ที่พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ในโรงพยาบาลที่นำมาทำการทดสอบเป็นเชื้อที่มีการดื้อยาหลายขนานและจัดให้เป็น extensively drug-resistant *A. baumannii* (XDR-AB)

ดังนั้นจะเห็นได้จำนวนการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* มีจำนวนที่สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งถือเป็นยาขนานสุดท้ายในการนำมาใช้รักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งแนวโน้มของการดื้อยาที่สูงขึ้นในเชื้อ *A. baumannii* นี้ จะเป็นข้อมูลให้แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ตระหนักในการเลือกใช้ยาในการรักษาและข้อมูลที่ได้นี้จะเป็แนวทางในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นในโรงพยาบาลเนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์สามารถเคลื่อนที่ไปสู่แบคทีเรียตัวอื่นทำให้ได้รับยีนดื้อยาเช่นกัน จึงทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อเพิ่มมากขึ้น

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลหลายๆแห่งทั่วประเทศไทย เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลในภาพรวมที่มากขึ้นและครอบคลุมขึ้น
2. เพื่อให้ทราบกลไกการดื้อยาทั้งหมดของเชื้อ *A. baumannii* ควรศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆเพิ่มเติม ได้แก่ การขับยาออกจากเซลล์โดย efflux pump หรือ การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์
3. ควรศึกษายีนชนิดอื่นๆหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ที่มีส่วนในการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*
4. เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ในด้านการระบอดมากขึ้นควรเก็บตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่อยู่ภายในสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล เช่น อุปกรณ์การแพทย์ หรือ เครื่องมือต่างๆหรือนำข้อมูลจากเวชระเบียนมาใช้ (ต้องได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการจริยธรรมก่อน)

## บรรณานุกรม

1. Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, et al. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2007;28(6):713-9.
2. Kuo LC, Lai CC, Liao CH, Hsu CK, Chang YL, Chang CY, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia : clinical features, antimicrobial therapy and outcome. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007;13(2):196-8.
3. Danishta I, Ismet M, Sonatun D, Jaufeerally-Fakim Y. Antibiotic Resistance of *Escherichia Coli* Isolates from Environmental and Waste Water Samples in Mauritius. 2010.
4. Agustí C, Pujol M, Argerich MJ, Ayats J, Badía M, Domínguez MA, et al. Short-term effect of the application of selective decontamination of the digestive tract on different body site reservoir ICU patients colonized by multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;49(1):205-8.
5. Rungruanghiranya S, Somboonwit C, Kanchanapoom T. *Acinetobacter* infection in the intensive care unit. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*. 2005(22):77-92.
6. Center NARS. National antimicrobial resistance surveillance Thailand antibiogram 2017 Thailand: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; [cited 2020 01 October]. Available from: <http://narst.dmasc.moph.go.th/>.
7. วิชัย สันติมาลีวรกุล, สุทธิพร ภัทรชยากุล และ โปยม วงษ์ภูวรักษ์. สถานการณ์การติดเชื้อ และ กลไกการดื้อยา โดยเชื้อ *Acinetobacter baumannii*. *ไทยเฝ้าระวังนิพนธ์*. 2552;2552(3( Jan-Dec)):161-76.
8. Evans BA, Amyes SG. OXA beta- lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):241-63.
9. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barrero-Almodovar AE, Garcia-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM, et al. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin : a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(9):1111-8.
10. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin : the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(9):1333-41.
11. Koomanachai P, Tiengrim S, Kiratisin P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infections caused by multidrug-resistant

*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. International Journal of Infectious Diseases. 2007;11(5):402-6.

12. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens : microbiological, clinical, and epidemiological features. Clinical microbiology reviews. 1996;9(2):148-65.

13. Ehlers M, Hughes JM, Kock M. Prevalence of Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* 2012.

14. Smith MG, Gianoulis TA, 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 & development. 2007;21(5):601-14.

15. Sarhaddi N, Soleimanpour S, Farsiani H, Mosavat A, Dolatabadi S, Salimizand H, et al. Elevated prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with extensive genetic diversity in the largest burn centre of northeast Iran. Journal of global antimicrobial resistance. 2017;8:60-6.

16. Biglari S, Alfizah H, Ramliza R, Rahman MM. Molecular characterization of carbapenemase and cephalosporinase genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary medical centre in Malaysia. Journal of medical microbiology. 2015;64(Pt 1):53-8.

17. Joshi PR, Acharya M, Kakshapati T, Leungtongkam U, Thummeepak R, Sitthisak S. Co-existence of *bla*<sub>(OXA-23)</sub> and *bla*<sub>(NDM-1)</sub> genes of *Acinetobacter baumannii* isolated from Nepal : antimicrobial resistance and clinical significance. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2017;6:21.

18. Niumsup PR, Boonkerd N, Tansawai U, Tiloklurs M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. Japanese journal of infectious diseases. 2009;62(2):152-4.

19. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์. การศึกษากลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenem ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล 2018.

20. อรุณวดี ชนะวงศ์. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการการตรวจหาเอนไซม์เบตาแลกตาเมสที่สลายยาในกลุ่ม carbapenems ในแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งที่แยกได้จากผู้ป่วย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ Alternative : Detection of carbapenem-hydrolysing Beta-lactamases in gram-negative bacilli isolated from patients in Srinagarind Hospital. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.

21. เบศจมาศ ไสยะธา และ อลิสา บุญพาวรรณ. การตรวจหายีน *bla*<sub>OXA-58</sub> และยีน ISAba ใน *Acinetobacter baumannii* ที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2552.

22. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase



gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(12):5046-54.

23. Mochon AB, Garner OB, Hindler JA, Krogstad P, Ward KW, Lewinski MA, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* : case report and laboratory detection strategies. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(4):1667-70.

24. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(3):1274-8.

25. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1791-8.

26. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM- type carbapenemases in Gram- negative bacteria. *BioMed research international*. 2014;2014:249856.

27. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 4):499-513.

28. Espinal P, Fugazza G, López Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, et al. Dissemination of an NDM- 2- Producing *Acinetobacter baumannii* Clone in an Israeli Rehabilitation Center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(11):5396-8.

29. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(6):1260-2.

30. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of *bla*<sub>OXA-23</sub> with *bla*<sub>NDM-1</sub> and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(10):2253-4.

31. Leungtongkam U, Thummeepak R, Wongprachan S, Thongsuk P, Kittit T, Ketwong K, et al. Dissemination of *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, and *bla*<sub>NDM-1</sub> Genes of *Acinetobacter baumannii* Isolates from Four Tertiary Hospitals in Thailand. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, New York)*. 2018;24(1):55-62.

32. Pagano M, Martins AF, Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016;47(4):785-92.

33. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American journal of infection control*. 2008;36(5):309-32.



34. Kouchak F, Askarian M. Nosocomial infections: the definition criteria. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2012;37(2):72-3.
35. สมหวัง ด่านชัยวิจิตร. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล. งานตำราวารสารและสิ่งพิมพ์สถานเทคโนโลยี การศึกษาแพทยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล. 2544;3:384.
36. Danchaivijitr S, Judaeng T, Sripalakij S, Naksawas K, Plipat T. Prevalence of nosocomial infection in Thailand 2006. *Journal of Medical Association Thailand*. 2007;90(8):1524-9.
37. ภาณุมาศ ภูมาศ, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล ภูษิต ประคองสาย ตวงรัตน์ โประ อาหาร ธีวไพบูลย์ และ สุกพล ลิ้มวัฒนานนท์. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย วารสาร วิจัยระบบสาธารณสุข. 2556;6;3(ก.ค.-ก.ย.):352-60.
38. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010 : an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(8):742-50.
39. สมหวัง ด่านชัยวิจิตร. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล. 3, editor. กรุงเทพมหานคร: แอล ที เพรส; 2544.
40. ชินวัตร ศรีใส, ภัศราภรณ์ ศิริษา เบ็ญจวรรณ คำแหงพล ทิพย์วิมล อยู่ทรัพย์ และ สุวิตา บุญชะโด. การสอบสวนการ ระบาดของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในหอผู้ป่วยหนักทารกแรกเกิด โรงพยาบาลร้อยเอ็ด. วารสาร โรงพยาบาลร้อยเอ็ด, ภาพสีนรุ้, มหาสารคาม. 2555:76-82.
41. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals : multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(12):939-51.
42. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Critical care medicine*. 2003;31(10):2478-82.
43. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(3):309-17.
44. Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez-Jimenez FJ, Monterrubio-Villar J, Gili-Miner M. Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Critical Care Medicine* 1999;27(9):1794-9.
45. Jung JY, Park MS, Kim SE, Park BH, Son JY, Kim EY, et al. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC infectious diseases*. 2010;10:228.

46. Lyytikäinen O, Kõljalg S, Härmä M, Vuopio-Varkila J. Outbreak caused by two multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit : emergence of resistance to imipenem. *Journal of Hospital Infection*. 1995;31(1):41-54.
47. Trottier V, Segura PG, Namias N, King D, Pizano LR, Schulman CI. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *Journal of Burn Care & Research*. 2007;28(2):248-54.
48. Basic B, Beus I, Marton E, Himbele J, Klinar I. Nosocomial infections in critically ill infectious disease patients: results of a 7-year focal surveillance. 27, editor1999.
49. Stapleton A. Urinary tract infections in patients with diabetes. *The American journal of medicine*. 2002;113 Suppl 1A:80s-4s.
50. Apisarnthanarak A, Hsu LY, Khawcharoenporn T, Mundy LM. Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria : how to prioritize infection prevention and control interventions in resource-limited settings. *Expert review of anti-infective therapy*. 2013;11(2):147-57.
51. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii* : An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012;3(3):243-50.
52. Dejsirilert S, Suankratay C, Trakulsomboon S, Thongmali O, Sawanpanyalert P, Aswapokee N, et al. National Antimicrobial Resistance Surveillance, Thailand (NARST) data among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand from 2000 to 2005. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2009;92 Suppl 4:S68-75.
53. Dejsirilert S, Tiengrim S, Sawanpanyalert P, Aswapokee N, Malathum K. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* : six years of National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) surveillance. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2009;92 Suppl 4:S34-45.
54. de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, et al. Do Biofilm Formation and Interactions with Human Cells Explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*. 2010. e10732 p.
55. Aryal S. Habitat and Morphology of *Acinetobacter baumannii* 2018 [cited 2018 01 July]. Available from: <https://bacteriologynotes.com/habitat-and-morphology-of-acinetobacter-baumannii/>.
56. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010;74(1):81-94.
57. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular microbiology*. 2005;7(8):1127-38.

58. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended- spectrum beta- lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;58(1):178-82.
59. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, et al. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS microbiology letters*. 2009;301(2):224-31.
60. ระพี ธรรมมีภักดิ์, สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ และ ธวัชชัย กิตติ. ระบาดวิทยาและปัจจัยความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *ธรรมศาสตร์เวชสาร* 2558;15(2):322-32.
61. Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A, Georgiadis G. High- dose ampicillin-sulbactam as an alternative treatment of late- onset VAP from multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2007;39(1):38-43.
62. Isik P, Yarali N, Bay A, Sac R, Kara A, Tunc B. The Clinical Efficacy of Cephoperazone- Sulbactam and Amikacin Sulfate Combination in Pediatric Febrile Neutropenic Patients. *Pediatric Febril Nötropeni Hastalarında Sefoperazon-sulbaktam ve Amikasin Sülfat Birlikteliğinin Klinik Etkinliği*. 2011;21(1):34-9.
63. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barrero-Almodovar AE, Garcia- Garmendia JL, Bernabeu- Wittel IM, et al. Treatment of multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator- associated pneumonia ( VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem- susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(9):1111-8.
64. Frei CR, Burgess DS. Continuous infusion beta-lactams for intensive care unit pulmonary infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(5):418-21.
65. Spapen H, Jacobs R, Van Gorp V, Troubleyn J, Honoré PM. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Annals of Intensive Care*. 2011;1:14-.
66. Tiengrim S, Tribuddharat C, Thamlikitkul V. In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2006;89 Suppl 5:S102-5.
67. Shin JA, Chang YS, Kim HJ, Kim SK, Chang J, Ahn CM, et al. Clinical outcomes of tigecycline in the treatment of multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Yonsei Medical Journal* 2012;53(5):974-84.
68. Thamlikitkul V, Santiprasitkul S, Suntanonra L, Pakaworawuth S, Tiangrim S, Udompunthurak S, et al. Skin flora of patients in Thailand. *American journal of infection control*. 2003;31(2):80-4.

69. Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Current opinion in microbiology*. 2005;8(5):518-24.
70. Falagas ME, Koletsis PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology*. 2006;55(Pt 12):1619-29.
71. Bush K. Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future. *Reviews of infectious diseases*. 1988;10(4):681-90.
72. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* : mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(3):219-26.
73. Brown S, Amyes SGB. The sequences of seven class D  $\beta$ -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(4):326-9.
74. Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter* : the story so far. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(1):1-3.
75. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(10):4174-9.
76. Jean SS, Hsueh PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;37(4):291-5.
77. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;43 Suppl 2:S49-56.
78. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii* : human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*. 2013;37(2):130-55.
79. Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari MR. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Indian Journal of Medical Research*. 2011;133(3):332-8.
80. Anuwat Keerasuntonpong, Chartchai Samakeenich,,Chanwit Tribuddharat and Visanu Thamlikitkul. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* Infections in Siriraj Hospital 2002. 2006;58(8).
81. Romanee Chaiwarith, Somphop Mahatthanaphak,,Manasnan Boonchoo,,Khuanchai Supparatpinyo and Thira Sirisanthana. Pandrug- Resistant

- Acinetobacter baumannii* at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents. 2005;22(1).
82. Sudjaroen WTaY. Characterization and Antibiotic Susceptibility Profile of Nosocomial Pathogens Isolated from Cancer Patients. Thai Cancer Journal. October-December 2009;29(4).
83. วรยุพา ถมปัต, นภารัตน์ คุ่มวงษ์,กรรณิกา มาฆะเซ็นต์ และ ยุทธนา สุดเจริญ. จุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและการดื้อยาต้านจุลชีพในผู้ป่วยมะเร็ง. วารสารโรคมะเร็ง. 2553;30(2):68-76.
84. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005;55(6):1050-1.
85. Murray PR, Baron EJ, American Society for M. Manual of clinical microbiology. 8th ed. ed. Washington, D.C. :: ASM Press; 2003.
86. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C.  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Reviews in Medical Microbiology. 2013;24(1):7-17.
87. Bbosa G, Mwebaza N, Odda J, B Kyegombe D, Ntale M. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance2014. 410-25 p.
88. Khorsi K, Messai Y, Hamidi M, Ammari H, Bakour R. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub> in Algiers hospitals. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2015;8(6):438-46.
89. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clinical Microbiology and Infection. 2002;8(6):321-31.
90. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44(1):196-9.
91. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44(6):1556-61.
92. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(2):583-8.
93. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clinical Microbiology and Infection. 2005;11(1):15-23.

94. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(1):202-8.
95. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(1):15-22.
96. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(5):2241-5.
97. Yu YS, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. *Journal of medical microbiology*. 2004;53(Pt 7):653-6.
98. Blaser JEBRDMJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8, editor: Saunders; 2015 28 Aug 2014.
99. Walter F, Vicens Q, Westhof E. Aminoglycoside-RNA interactions. *Current opinion in chemical biology*. 1999;3(6):694-704.
100. Lynch SR, Puglisi JD. Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *Journal of molecular biology*. 2001;306(5):1037-58.
101. Kaiser GE. Aminoglycosides Interfering with Translation by causing a Misreading of the Codons along the mRNA [cited 2018 01 July]. Available from: [http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/aglycomiscode\\_illus.html](http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/aglycomiscode_illus.html).
102. Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(4):727-37.
103. Azucena E, Mobashery S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resistance Updates*. 2001;4(2):106-17.
104. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(4):727-37.
105. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(2):479-87.
106. Biswas Silpak BJ-M, Dubus Jean-Christophe, Reynaud-Gaubert Martine, Rolain Jean-Marc Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century 2012 [cited 2018 01 July]. Available from: [https://www.medscape.com/viewarticle/772588\\_6](https://www.medscape.com/viewarticle/772588_6).
107. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(9):2946-50.

108. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(4):786-90.
109. Beno P, Krcmery V, Demitrovicova A. Bacteraemia in cancer patients caused by colistin-resistant Gram-negative bacilli after previous exposure to ciprofloxacin and/or colistin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;12(5):497-8.
110. Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE, Papaioannou V, Ntani G, et al. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Critical care medicine*. 2008;36(3):807-11.
111. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii* : clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(7):1607-15.
112. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China : a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(2):161-8.
113. ภัทรชัย กীরติสิน และ อนุชา อภิสารธนรักษ์. Beta-lactamase ในแบคทีเรียแกรมลบ: จากความรู้พื้นฐานสู่เวชปฏิบัติ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด วี.เจ. พรีเมียม; 1469.
114. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem- hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(8):3198-202.
115. Poirel L, Nordmann P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene *bla*<sub>(OXA-58)</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1442-8.
116. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*. 2006;258(1):72-7.
117. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006;12(2):123-30.
118. Segal H, Garry S, Elisha BG. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*. *FEMS microbiology letters*. 2005;243(2):425-9.

119. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS microbiology reviews*. 2009;33(5):892-916.
120. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) 2016 [cited 2018 July 13]. Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>.
121. Difference between RAPD and RFLP [cited 2018 July 13]. Available from: <https://www.majordifferences.com/2013/02/difference-between-rapd-and-rflp.html>.
122. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS microbiology reviews*. 2009;33(5):892-916.
123. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*. 1994;60(7):2286-95.
124. Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(6):1661-9.
125. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*. 1991;19(24):6823-31.
126. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2000;6(12):635-43.
127. Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C, et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(5):1193-202.
128. Cochran WG. *Sampling Techniques*. 3rd, editor. New York: John Wiley & Sons; July 1977.
129. Pincus D. MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK ® 2 SYSTEM. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. 2014;2.
130. Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, Wood CA, Hamill RJ. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(11):2635-40.
131. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*. 1991;19(24):6823-31.



132. กิตติศักดิ์ จิตรภักดี และ วณัฐยา บุญมาลา. การสำรวจเอนไซม์ metallo-beta-lactamase ใน *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ในปี พ.ศ. 2555: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2555.
133. Wanutsanun T, Pornpimol P, Kamolwish L, Sureerat C. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital patients. *ScienceAsia*. 2014;40:28-34.
134. Rodsathien P. Multidrug Resistance *Acinetobacter baumannii* at Lopburi Hospital. *Khon Kaen Hospital Medical Journal*. November 2008;32(6):74-81.
135. Merkier AK, Centrón D. *bla*<sub>(OXA-51)</sub>-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;28(2):110-3.
136. Werarak P, Waiwarawut J, Tharavichitkul P, Pothirat C, Rungruanghiranya S, Geater SL, et al. *Acinetobacter baumannii* nosocomial pneumonia in tertiary care hospitals in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2012;95 Suppl 2:S23-33.
137. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG, González-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6(4):311-6.
138. Figueiredo S, Poirel L, Croize J, Recule C, Nordmann P. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to IS*Aba1*-mediated overexpression of the natural *bla*<sub>(OXA-66)</sub> oxacillinase gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2657-9.
139. Porntip Paungmoung WR, Patcharee Kammarnjassadaku, Panjaporn Nimmanee, Sutas Boonyong and Isaya Janwithayanuchit. Prevalence of metallo-β-lactamases and carbapenem- hydrolysing class D β-lactamases among imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Nakhonpathom Hospital. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand*. 2011;39.
140. Niumsup PR, Boonkerd N, Tansawai U, Tiloklurs M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. *Japanese journal of infectious diseases*. 2009;62(2):152-4.
141. Hasan B, Perveen K, Olsen B, Zahra R. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Pakistan. *Journal of medical microbiology*. 2014;63(Pt 1):50-5.
142. Mishra S, Sen MR, Upadhyay S, Bhattacharjee A. Genetic linkage of *bla*<sub>NDM</sub> among nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary referral hospital in northern India. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;41(5):452-6.

143. Tran DN, Tran HH, Matsui M, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K, et al. Emergence of New Delhi metallo- beta- lactamase 1 and other carbapenemase- producing *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex among patients in hospitals in Ha Noi, Viet Nam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(2):219-25.
144. Mosavat A, Soleimanpour S, Farsiani H, Salimizand H, Kebriaei A, Amel Jamehdar S, et al. Moderate Genetic Diversity with Extensive Antimicrobial Resistance Among Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Referral Hospital in Northeast Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2018;11(7):e14412.
145. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):538-82.
146. Bogaerts P, Cuzon G, Naas T, Bauraing C, Deplano A, Lissou B, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene associated with IS*Aba4* in Belgium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(11):4205-6.
147. Lopes BS, Amyes SGB. Role of IS*Aba1* and IS*Aba125* in governing the expression of *bla*<sub>ADC</sub> in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* strains resistant to cephalosporins. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(Pt 8):1103-8.
148. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(12):3071-7.
149. Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus- A. baumannii* complex. *Journal of medical microbiology*. 1996;44(6):482-9.
150. Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samadi E, Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC infectious diseases*. 2019;19(1):629.

ภาคผนวก ก  
ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

1. 1M Tris, pH 8.0 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้
  - ชั่งผง Tris base (aMReSCo) 121.1 กรัม
  - เติมน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer
  - ปรับ pH ด้วย 6M HCL จนได้ pH ประมาณ 8.0
  - ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร
  - นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
  - นำ 1 M Tris ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
2. 0.5 M EDTA (Na<sub>2</sub>), pH 8.0 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้
  - ชั่งผง EDTA (Na<sub>2</sub>) (Bio Rad) 186.1 กรัม
  - เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer และอาจใช้ความร้อนช่วย
  - ปรับ pH ด้วยเกล็ด NaOH จนได้ pH ประมาณ 8.0
  - ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร
  - นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
  - นำ 0.5 M EDTA (Na<sub>2</sub>), ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
3. 5M NaCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้
  - ชั่งผง NaCl 292.2 กรัม
  - เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer
  - นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
4. 1M NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้
  - ชั่งผง NaCl 5.84 กรัม
  - เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer

- นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
5. 50X TAE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้
- ชั่งผง Tris base (aMReSCo) 242 กรัม
  - เติม glacial acetic acid ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร
  - เติม EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
  - ผสมโดยเขย่าให้เข้ากันมากที่สุด แล้วอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
  - เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง
6. 1X TE buffer 500 มิลลิลิตร (10 มิลลิโมลาร์ Tris, 1 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8.0) มีวิธีเตรียมดังนี้
- ตวง 100X TE buffer (Sigma-aldrich) 5 มิลลิลิตร
  - เติมน้ำกลั่น 495 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน
  - นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
  - นำ 1X TE buffer ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว (sterile) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
7. 1X TAE buffer 1000 มิลลิลิตร
- ตวง 50X TAE buffer 20 มิลลิลิตร
  - เติมน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
  - นำ 1X TAE buffer เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
8. 1% และ 1.5% agarose gel
- ชั่งผง agarose 1 กรัม หรือ 1.5 กรัม (ตามเปอร์เซ็นต์ของเจลที่ต้องการ)
  - ตวง 1X TAE buffer จำนวน 100 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในขวดที่มีผง agarose
  - นำไปต้มและคนให้ละลายจนหมด
  - ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิห้องลดลงเหลือประมาณ 50 องศา
  - นำมาเทลงใน gel chamber

ภาคผนวก ข  
 ตารางแสดงผลงานวิจัยทั้งหมด

ตารางรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 257 ตัวอย่าง

รูปแบบ	IPM	MEM	CAZ	AK	GM	CFX	SXT	SAM	SCFP	TZP	TGC	จำนวน
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	46
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	39
3	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	14
4	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	S	3
5	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	2
6	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	3
7	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	1
8	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	1
9	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	5
10	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	4
11	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	1
12	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	S	1
13	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	1
14	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	3
15	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	S	2
16	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	S	2
17	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	2

รูปแบบ	IPM	MEM	CAZ	AK	GM	CFX	SXT	SAM	SCFP	TZP	TGC	จำนวน
18	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	R	1
19	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	2
20	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	S	1
21	R	R	R	R	R	R	S	I	I	R	S	9
22	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	S	4
23	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	1
24	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	1
25	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	S	1
26	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	1
27	R	R	R	R	R	R	S	I	I	R	R	1
28	R	R	R	S	S	R	R	R	I	R	S	2
29	R	R	R	S	S	R	S	I	I	R	S	4
30	R	R	R	S	S	R	R	I	I	R	S	5
31	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	2
32	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	S	5
33	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	1
34	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	1
35	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	3
36	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	1
37	R	R	R	S	R	R	R	I	I	R	S	1

รูปแบบ	IPM	MEM	CAZ	AK	GM	CFX	SXT	SAM	SCFP	TZP	TGC	จำนวน
38	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	1
39	R	R	R	S	S	R	S	I	S	R	S	2
40	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	4
41	R	R	R	S	S	R	S	R	I	R	S	2
42	R	R	R	S	S	R	R	S	I	R	S	2
43	R	R	R	S	S	R	R	I	S	R	S	3
44	R	R	R	S	S	R	R	I	I	R	R	1
45	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	2
46	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	1
47	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	1
48	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	S	1
49	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	2
50	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R	R	2
51	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	1
52	R	R	R	S	I	R	S	I	I	R	S	1
53	R	R	R	S	I	R	S	I	I	R	R	1
54	R	R	R	S	I	R	S	R	I	R	S	1
55	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	3
56	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	2
57	R	R	R	I	I	R	S	I	I	R	S	1





ตารางแสดงผลการทดสอบหาความชุกของยีน  $bla_{OXA-51}$ ,  $bla_{ADC}$ ,  $bla_{NDM-1}$ ,  $aphA6$   
และอินเซอร์ชันซีเควน ( $ISAba125$ ) ในเชื้อ *A. baumannii*

ยีน	ยีนที่ให้ผลบวก	จำนวนที่ให้ผลบวก (ร้อยละ)
ยีนเดี่ยวที่ให้ผลบวก	$bla_{OXA-51}$	257 (100)
	$bla_{ADC}$	99 (38.5)
	$bla_{NDM-1}$	21 (8.2)
	$aphA6$	6 (2.3)
	$ISAba125$	16 (6.2)
ผลบวกจำนวน 1 ยีน	$bla_{OXA-51}$	136 (52.9)
ผลบวกจำนวน 2 ยีน	$bla_{OXA-51} + bla_{ADC}$	90 (35.0)
	$bla_{OXA-51} + bla_{NDM-1}$	10 (3.9)
	$bla_{OXA-51} + aphA6$	2 (0.8)
	$bla_{OXA-51} + ISAba125$	2 (0.8)
ผลบวกจำนวน 3 ยีน	$bla_{OXA-51} + bla_{NDM-1} + ISAba125$	8 (3.1)
	$bla_{OXA-51} + bla_{ADC} + ISAba125$	4 (1.6)
	$bla_{OXA-51} + bla_{ADC} + aphA6$	2 (0.8)
ผลบวกจำนวน 4 ยีน	$bla_{OXA-51} + bla_{ADC} + bla_{NDM-1} + aphA6$	1 (0.4)
	$bla_{OXA-51} + bla_{ADC} + bla_{NDM-1} + ISAba125$	1 (0.4)
ผลบวกจำนวน 5 ยีน	$bla_{OXA-51} + bla_{ADC} + bla_{NDM-1} + aphA6 + ISAba125$	1 (0.4)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว จริยา ศรชัย
วัน เดือน ปี เกิด	21 ธันวาคม 2534
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคนิคการแพทย์
ที่อยู่ปัจจุบัน	หมู่บ้านเดอะเวโรน่า วิลเลจ บ้านเลขที่ 18/184 ถนน พัฒนาชนบท 3 แขวง คลองสองต้นนุ่น เขต ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
รางวัลที่ได้รับ	1.รางวัลนักศึกษาดีเด่น ด้านกิจกรรมยอดเยี่ยม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2553 2.รางวัลนักศึกษาดีเด่น ด้านกิจกรรมยอดเยี่ยม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2554 3.รางวัลด้านกิจกรรมดีเด่น ตำแหน่ง คณะกรรมการและเลขานุการสโมสร นักศึกษา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2556 4.รางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 ในการนำเสนอโครงการวิจัยปริญญานิพนธ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2556 ประเภท Poster Presentation จากหัวข้อวิจัยเรื่อง การโคลนนิ่งบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีน CD137 ของมนุษย์โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม 5.รางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 ในการนำเสนอโครงการวิจัยปริญญานิพนธ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2556 ประเภท Oral Presentation จากหัวข้อวิจัยเรื่อง การโคลนนิ่งบริเวณโปรโม เตอร์ของยีน CD137 ของมนุษย์โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม