

การใช้ดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) ในการจำแนก
สายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

เกศินี จีรวัดมนนุกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ เกศินี จีรวัดนนกุล ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาครี คงเจริญสุนทร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาครี คงเจริญสุนทร)

.....กรรมการ
(ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)

.....กรรมการ
(ดร.สุทิน กิ่งทอง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 30 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณโรงพยาบาลชลบุรี และภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อก่อโรคทั้ง *A. baumannii* และเชื้อก่อโรคอื่น ๆ นำมาใช้ในการทดลองตลอดการวิจัย ซึ่งเป็นส่วนสำคัญอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา และฝ่ายบัณฑิตศึกษาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในงานวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูแก่เวทิตาแด่ บุพการี บุรพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

เกศินี จีรวัฒนนุกูล

54990002: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)

คำสำคัญ: *A. baumannii* คือยาและไม่คือยา/ 16S–23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)/
พีซีอาร์

เกศินี จีระวัฒนกุล: การใช้ดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S–23S RRNA INTERGENIC SPACER REGION (ISR) ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *ACINETOBACTER BAUMANNII* (USING DNA SEQUENCES OF THE 16S-23S RRNA INTERGENIC SPACER REGION (ISR) FOR TYPING SPECIES OF *ACINETOBACTER BAUMANNII*) คณะกรรมการควบคุม
วิทยานิพนธ์: วิทยาศาสตรบัณฑิต จงเจริญสุนทร, Ph.D. 52 หน้า. ปี พ. ศ. 2558.

งานวิจัยนี้ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบของ 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) ที่แยกได้จาก *Acinetobacter baumannii* ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อเปรียบเทียบกับ เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (amplicon) ของ ISR จาก *A. baumannii* สายพันธุ์คือยาและไม่คือยาจำนวนรวม 15 ไอโซเลต มีขนาด 1,230 bp จากการพยากรณ์จาก *A. baumannii* สายพันธุ์ต้นแบบที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ แต่เมื่อนำมา เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดอื่นพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของ ISR มี ขนาดระหว่าง 840-1,050 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. baumannii* สายพันธุ์คือยาและไม่ คือยา มาวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่า *A. baumannii* ทั้ง 15 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. baumannii* ATCC 17978 คือ 98% และจากแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า *A. baumannii* สายพันธุ์คือยาและไม่คือยา มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันประมาณ 98-99% ดังนั้นการศึกษารูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ ได้ของ ISR ด้วยวิธีพีซีอาร์ อาจจะสามารถนำไปจำแนก *A. baumannii* จากสิ่งส่งตรวจในระดับ สปีชีส์ได้

54990002: MAJOR: BIOLOGICAL EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGICAL EDUCATION)

KEYWORDS: DRUG RESISTANT AND NON-DRUG RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*/ 16S-23S RRNA INTERGENIC SPACER REGION (ISR)/ PCR
KASINEE JEERAWATTANANUKUL: USING DNA SEQUENCES OF THE 16S-23S RRNA INTERGENIC SPACER REGION (ISR) FOR TYPING SPECIES OF *ACINETOBACTER BAUMANNII*. ADVISORY COMMITTEE: WISATRE KONGCHREONSUNTORN, Ph.D. 52 P. 2015.

The aim of this study was to identify and compare DNA sequence of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) of *A. baumannii* with opportunistic bacteria by PCR. All ISR amplicons from fifteen isolates of drug resistant and non drug resistant *A. baumannii* were identified and indicated. The predicted nucleotide sequences of ISR, amplified from all fifteen *A. baumannii* were approximately 1,230 base pair (bp). When compared to the ISR amplicon of other opportunistic bacteria, these ISRs were ranged between 840-1,050 bp. Phylogenetic trees of fifteen drug resistant and non drug resistant *A. baumannii* indicated the evolutionary relatedness of *A. baumannii* ATCC 17978 for 98% similarity. Also, all fifteen ISR nucleotide sequences from *A. baumannii* isolates revealed significantly 98% homology to ISR of *A. baumannii* ATCC 17978. Also, the phylogenetic trees indicated the similarity of both drug resistant *A. baumannii* and non drug resistant *A. baumannii* for 98-99% homology. Therefore, the study of ISR amplicon patterns in *A. baumannii* by PCR can distinguish and identify *A. baumannii* from other opportunistic bacteria, isolated from clinical specimens.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อุบัติการณ์ปัจจุบันของการติดเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i>	5
จุลชีววิทยาและการก่อโรคของ <i>A. baumannii</i>	6
กลไกการก่อโรคและการดื้อยาของ <i>A. baumannii</i>	8
หลักการจำแนก <i>A. baumannii</i> ด้วยดีเอ็นเอเทคโนโลยี.....	9
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
ไพรเมอร์.....	14
แบคทีเรียที่นำมาศึกษา.....	15
วิธีการทดลอง.....	16

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	21
ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบ amplicon ของ ISR ที่แยกได้จาก <i>A. baumannii</i> โดยใช้บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) ด้วยวิธีพีซีอาร์.....	21
ศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ISR ของ <i>A. baumannii</i>	26
5 อภิปรายและสรุปผล.....	40
บรรณานุกรม.....	44
ภาคผนวก.....	49
ประวัติของผู้วิจัย.....	52

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>A. baumannii</i> ด้วยชุดทดสอบ API 20 NE System	7
3-1 รูปแบบการคือยาสชนิดต่าง ๆ ของ <i>A. baumannii</i> ที่คือยาหลายขนานที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย.....	19
4-1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ISR ของ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากโรงพยาบาลชลบุรีกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN.....	34
4-2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ISR ของ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากโรงพยาบาลชลบุรีกับแบคทีเรียกลุ่ม <i>Acinetobacter</i> spp. จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN.....	37
4-3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ISR ของ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากโรงพยาบาลชลบุรีกับแบคทีเรียกลุ่ม <i>Enterobacteraceae</i> จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN.....	38

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้าง Efflux Pump แบบต่าง ๆ ที่ค้นพบในปัจจุบัน.....	9
2-2 ตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ภายในโอเปอรอนอาร์เอ็นเอ.....	11
4-1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของISR ของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	22
4-2 ตำแหน่งของดีเอ็นเอของ ISR ที่เพิ่มขยายได้ด้วยคู่ไพรเมอร์ 2F และ 10R บนแผนที่ยืน RNA Operon.....	22
4-3 การออกแบบคู่ไพรเมอร์ 2F และ 10R กับสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์บริเวณ ISR ของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	23
4-4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ที่ได้จากการพยากรณ์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบ.....	24
4-5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของ ISR ที่เพิ่มปริมาณได้จาก <i>A. baumannii</i> ตัวอย่างที่ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย.....	25
4-6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของISR ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ.....	26
4-7 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ระหว่างกลุ่ม <i>A. baumannii</i> คีอียา และไม่คียา.....	33
4-8 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการแสดงระยะห่างของสายวิวัฒนาการเพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>A. baumannii</i> ตัวอย่าง จำนวน 15 ไอโซเลต.....	34
4-9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ <i>A. baumannii</i> คีอียา และไม่คียา กับ <i>A. baumannii</i> สายพันธุ์มาตรฐานจากฐานข้อมูล GenBank.....	36
4-10 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการแสดงระยะห่างของสายวิวัฒนาการเพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง <i>A. baumannii</i> ตัวอย่างกับเชื้อในกลุ่ม <i>Acinetobacter</i> spp. และกลุ่ม <i>Enterobacteraceae</i>	39

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปจะไม่ก่อโรคในคน แต่พบก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ที่มีอัตราการตายสูง (พิชชาพร อธิกวริยะกุล, ญาณภา มณีศรี และรุจิภา ปิงยศ, 2008; Abbo et al., 2005) เป็นเชื้อที่ตรวจพบจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลเป็นอันดับสองรองจาก *Pseudomonas aeruginosa* และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (ภัทรชัย กิรติสิน, 2552) เชื้อมักฉวยโอกาสเกิดโรคในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยหนักที่พักรักษาในหอผู้ป่วยหนัก (Intensive care units) (Puttilerpong et al., 2011) รวมถึงผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคไตวาย และผู้ติดเชื้อเรื้อรัง เชื้อมีความสำคัญทางคลินิก เนื่องจากสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน คือต่อยาด้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (ภัทรชัย กิรติสิน, 2552) ส่วนใหญ่ *A. baumannii* มักทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ (ภัทรชัย กิรติสิน, 2552; Chiang et al., 2011) ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ปอด ทางเดินปัสสาวะ กระแสเลือด เยื่อช่องท้อง เยื่อสมอง แผลผ่าตัด ลิ้นหัวใจ เยื่อหัวใจชั้นใน ข้ออักเสบ และการติดเชื้อที่กระดูกและกล้ามเนื้อ (พิชชาพร อธิกวริยะกุล และคณะ, 2008; ภัทรชัย กิรติสิน, 2552; Mulvey & Simor, 2009) ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อ *A. baumannii* ได้ง่าย เนื่องจาก *A. baumannii* จะฉวยโอกาสแทรกซ้อนระหว่างการทำการรักษาผู้ป่วย ยกตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยที่ต้องใส่ท่อสายสวนหรือเครื่องมือแพทย์เข้าสู่ว่างกายรวมถึงการใช้เครื่องช่วยหายใจเป็นเวลานาน การเกิดบาดแผลจากการผ่าตัดและการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ครบขนาด (Chiang et al., 2011; Puttilerpong et al., 2011) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถอยู่แบบ colonization ที่ผิวหนัง ทางเดินอาหาร และทางเดินปัสสาวะได้ ทำให้ปัจจัยเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้น (ภัทรชัย กิรติสิน, 2552)

ปัจจุบันพบอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 2-4 เป็นร้อยละ 10-30 ในช่วงเวลา 15 ปีที่ผ่านมา (พิชชาพร อธิกวริยะกุล และคณะ, 2008; Puttilerpong et al., 2011) อุตบัติการณ์การติดเชื้อของ *A. baumannii* สูงมากถึงประมาณร้อยละ 57.6 โดยรายงานจากโรงพยาบาลศิริราช (ปี พ. ศ. 2545) พบว่า *A. baumannii* คือยาในโรงพยาบาลถึงร้อยละ 57 และมีการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 54.7 ข้อมูลจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ (ปี พ. ศ. 2546) พบการติดเชื้อของ *A. baumannii* ร้อยละ 23 และจากโรงพยาบาลชลบุรี พบว่ามีแนวโน้มการติดเชื้อจาก

A. baumannii ตั้งแต่ปี พ. ศ. 2549-2551 มีอัตราการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน (พิชชาพร อธิกวิริยะกุล และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ระบาดไปทั่วโลก (Perez et al., 2007; Reguero et al., 2012) เนื่องจากปัญหาการดื้อยาทำให้ต้องพัฒนาวิธีตรวจเชื้อที่แม่นยำและรวดเร็ว เพื่อสะดวกในการวินิจฉัยเชื้อและการให้การรักษาคด้วยยาปฏิชีวนะอย่างถูกต้องและรวดเร็ว การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบ *A. baumannii* ทำได้หลายวิธี อาทิการย้อมสีแกรม (Gram stain) (Vattanavanit & Chayakul, 2013; Dortet, Legrand, Soussy, & Cattoir, 2006) การจำแนกด้วยลักษณะทางพีโนไทป์ ด้วย API 20 NE system และ VITEK 2 system (BioMérieux, 2003) ซึ่งใช้การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. baumannii* ด้วย API 20 NE system จะให้ผลลบกับการทดสอบออกซิเดส (oxidase) ให้ผลบวกกับการทดสอบคาตาเลส (catalase) ไม่สามารถสลายน้ำตาลกลูโคสได้ด้วยกระบวนการหมัก (non-fermentation) และสามารถใช้แหล่งที่มาของคาร์บอนได้ทั้ง caprate, adipate, maltate, citrate และ phenylacetate (Dortet et al., 2006; Hanton, 2005) อย่างไรก็ตามการจำแนกด้วยวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำแต่ล่าช้า และไม่สามารถประเมินและพยากรณ์อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ล่วงหน้าก่อนการรักษาจริง หรือไม่สามารถแยกกลุ่มเชื้อที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการมาก ซึ่งมักต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาช่วยจำแนก นอกจากนี้ยังประเมินความเสี่ยงของการดื้อยาจากแบบแผนของการดื้อยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวและวิธีเหล่านี้ไม่รวดเร็วในการวินิจฉัย และไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อดื้อยา

ดังนั้นเพื่อความรวดเร็วในการวางแผนการรักษาก่อนที่จะจะกลายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยา (Vattanavanit & Chayakul, 2013; Dortet et al., 2006; Chang et al., 2005) ดังนั้นจึงมีการนำดีเอ็นเอเทคโนโลยีมาใช้จำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ อาจจะช่วยวินิจฉัยให้รวดเร็ว แม่นยำขึ้น ซึ่งดีเอ็นเอเทคโนโลยีสามารถใช้ในการสำรวจเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา โดยมีเทคนิคพื้นฐานคือ Probe hybridization, Polymerase chain reaction (PCR), DNA sequencing และ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (ภัทรชัย กิรติสิน, 2552) และได้มีการพัฒนามาเป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อการจำแนกด้วยจีโนไทป์ ได้แก่ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Dolzani, Tonin, Lagatolla, Prandin, & Monti-Lagatolla, 1995; Hernandez et al., 2011) Restriction analysis of amplified ribosomal (ARDRA) (Dijkshoorn, Van Harsselaar, Tjernberg, Bouvet, & Vaneechoutte, 1998; Vaneechoutte et al., 1995) Ribotyping (Gerner-Smidt, Tjernberg, & Ursing, 1991) Sequence analysis (Chang et al., 2005; Zarrilli, Giannouli, Popolo, & Tomasone, 2009) Multiplex PCR (Chen et al., 2007) การจำแนกจะใช้ยีนเป้าหมาย โดยเป็นยีนที่ความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง ได้แก่ 16S rRNA (*rrs* gene) หรือยีนในกลุ่ม rRNA หรือ rRNA operon (*rrn*)

ทั้งหมด หรือเป็นยีนเจ้าบ้าน (housekeeping gene) ในเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ *rpoB* gene, *gyrB* gene (Ko et al., 2008; Dortet et al., 2006), *recA* gene (Chang et al., 2005) และ *recA* gene ร่วมกับ 16S rRNA (Nowak & Kur, 1996)

การจำแนกแบคทีเรียมใช้ยีนในโอเปอรอน rRNA operon (*rrn*) ได้แก่ 16S rRNA gene (*rrs*) ซึ่งมีข้อดีคือ เป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิด มีความผันแปรทางวิวัฒนาการต่ำ มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง และมีขนาดที่เหมาะสม (ประมาณ 1.5 kb) เพียงพอที่จะใช้เป็นข้อมูลเพื่อนำมาจำแนกแบคทีเรีย (Janda & Abbott, 2007) มีความหลากหลายในแต่ละกลุ่มแบคทีเรีย มีความจำเพาะในการจำแนกแบคทีเรียได้ในระดับสกุล (genera) (Barry, Colleran, Glennon, Dunican, & Gannon, 1991) แต่อย่างไรก็ตาม 16S rRNA gene ไม่มีรูปแบบความแตกต่าง (polymorphism) จึงไม่เพียงพอจะนำมาจำแนกเชื้อ *Acinetobacter* (Scola, Gundi, Khamis, & Raoult, 2006) จึงนำมาซึ่งวิวัฒนาการจำแนกเชื้อเพื่อระบุสปีชีส์ (species) ด้วยลักษณะทางจีโนมที่ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงมาก (Whiley, Duke, Hardie, & Hall, 1995) โดยการใส่ดีเอ็นเอบริเวณที่มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง คือบริเวณ 16S–23S rRNA Intergenic Spacer Sequence (ISR) (Barry et al., 1991; Gürtler & Stanisch, 1996) ซึ่งพบว่าสามารถจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Serratia marcescens*, *Mycobacterium tuberculosis* และ *P. aeruginosa* (Barry et al., 1991; Magray, Kumar, Rawat, & Srivastava, 2011) *Escherichia coli* (García-Martínez, Martínez-Murcia, Antón, & Rodríguez-Valera, 1996) *Clostridium difficile*. (Gürtler, 1993) Cyanobacteria (Boyer, Flechtner, & Johansen, 2001) เป็นต้น โดย ISR เป็นบริเวณที่มีความแปรผันต่ำภายในกลุ่มสปีชีส์และมีความแปรผันสูงระหว่างกลุ่มสปีชีส์ และขนาดที่สั้นของ ISR เมื่อเทียบกับ 16S rRNA (Chang et al., 2005) ทำให้การวิเคราะห์ sequencing ทำได้ง่ายและมีความเที่ยงตรงมากกว่า โดย ISR ถูกใช้เป็นเป้าหมายในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงาน PCR เนื่องจากมีข้อดีที่รูปแบบของ amplicon หรือ PCR product ที่จำเพาะกับสปีชีส์ จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายที่เหมาะสมเพื่อใช้จำแนกแบคทีเรีย (Whiley et al., 1995) นอกจากนี้ยังสามารถประเมินความแปรผันภายในกลุ่มสปีชีส์เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อสายพันธุ์คือยาในอนาคต (Chang et al., 2005)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของ ISR ที่ได้จาก *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ ISR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยข้อมูลเหล่านี้จะใช้ติดตามความแปรผันและวิวัฒนาการของเชื้อ *A. baumannii* คือยาและการปรับตัวเพื่อกลายพันธุ์เป็นเชื้อคือยาในอนาคตและเพื่อช่วยให้แพทย์ได้ตัดสินใจในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ

A. baumannii ในระยะเริ่มต้นก่อนลุกลามและเป็นอันตรายถึงชีวิต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบ amplicon ของ ISR ที่แยกได้จาก *A. baumannii*
2. เปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบ amplicon ของ ISR กับแบคทีเรียจิวโอกาส

บางชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

สามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* จากการตรวจหา ISR เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* คี้อยาและไม่คียาโดยใช้บริเวณ ISR เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์อื่นในห้องปฏิบัติการและที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี ช่วงปี พ. ศ. 2555–2556 จำนวน 30 ตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิจัยครั้งนี้ ได้นำเสนอเป็นลำดับดังต่อไปนี้

- อุบัติการณ์ปัจจุบันของการติดเชื้อ *A. baumannii*
- จุลชีววิทยาและการก่อโรคของ *A. baumannii*
- กลไกการก่อโรคและการดื้อยาของ *A. baumannii*
- หลักการจำแนก *A. baumannii* ด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี

อุบัติการณ์ปัจจุบันของการติดเชื้อ *A. baumannii*

ปัจจุบันโรคติดเชื้อแบคทีเรียนับเป็นปัญหาที่สำคัญ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล สาเหตุหลักเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococci* spp. แบคทีเรียแกรมลบที่สำคัญ ได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* การติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาล กำลังเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย อันเนื่องมาจากเชื้อชนิดนี้มีการดื้อยาต้านจุลินทรีย์หลายชนิดและผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อนี้มีอัตราการตายที่สูง จากการสำรวจผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดจำนวน 24,179 ราย ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า *A. baumannii* เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นลำดับที่สอง (43.4 เปอร์เซ็นต์) ในผู้ป่วยที่นอนรักษาตัวในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก (Intensive Care Unit; ICU) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่สอดคล้องกับในประเทศสเปนที่พบว่า *A. baumannii* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อลำดับที่สามในผู้ป่วยที่ใส่เครื่องช่วยหายใจโดยมีอัตราการติดเชื้อเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.3 ในปี ค. ศ. 2003 เป็นร้อยละ 8.8 ในปี ค. ศ. 2005 ส่วนในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่ามีอัตราการติดเชื้อในโรงพยาบาลเนื่องจาก *A. baumannii* เพิ่มขึ้นจาก 25 ครั้งต่อผู้ป่วย 10,000 รายในปี ค. ศ. 1999 เป็น 55 ครั้งต่อผู้ป่วย 10,000 รายในปี ค. ศ. 2003 ซึ่งประเทศไทยเองก็กำลังเผชิญปัญหาอัตราการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน จากการรายงานของศูนย์เฝ้าระวังจุลินทรีย์ดื้อยาแห่งชาติพบว่า *A. baumannii* ที่แยกได้จากเสมหะผู้ป่วยทั่วประเทศเพิ่มจากร้อยละ 14 ในปี ค. ศ. 2005 เป็นร้อยละ 17 ในปี ค. ศ. 2007 และจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียลำดับที่สี่ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมดของผู้ป่วย (วิชัย สันติมาลีวรกุล, สุทธิพร ภัทรชยากุล และโพยม วงศ์สุวรรณ, 2552)

อุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* มักพบในผู้ป่วยหนักที่พักรักษาในโรงพยาบาลนานกว่าห้าเดือน *A. baumannii* ส่วนใหญ่จะแฝงอยู่ตามเครื่องระบายอากาศ ที่นอน หมอน ซอกเตียง ถุงยาหรือน้ำเกลือ สายพลาสติกที่เชื่อมต่อกับร่างกาย ผ้าพันแผล รัดเข็ม อุปกรณ์พื้นฟู รวมถึงเครื่องเรือนต่าง ๆ การที่ *A. baumannii* สามารถอาศัยอยู่บนพื้นผิวของสิ่งไม่มีชีวิตได้ทำให้เกิดการแพร่กระจายของ *A. baumannii* จากการปนเปื้อนมือหรือเสื้อผ้าเจ้าหน้าที่และอุปกรณ์ทางการแพทย์ในแผนกต่าง ๆ เช่น แผนกทารกแรกเกิด แผนกผู้ป่วยไฟไหม้ แผนกประสาท แผนกศัลยกรรม แผนกเนื้องอกวิทยา สาเหตุของการระบาดอาจเกิดจากการพัฒนาความสามารถในการดื้อยาสูงกว่าเชื้อกลุ่มอื่น ๆ โดย *A. baumannii* มักติดเชื้อผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำและผู้ป่วยที่ต้องพักรักษาตัวเป็นเวลานานทำให้ผู้ป่วยเกิดโรคแทรกซ้อนและติดเชื้อในหลายอวัยวะ เช่น ระบบปัสสาวะ กระแสเลือด ปอด ช่องท้อง ระบบทางเดินอาหาร เยื่อหุ้มสมอง แผลผ่าตัด และเยื่อหัวใจ เป็นต้น (Giamarellou, Anastasia, & Kanellakopoulou, 2008) อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *A. baumannii* พบว่าเป็นปัญหาอันดับต้นของการติดเชื้อในโรงพยาบาลทั่วโลก โดยเชื้อ *A. baumannii* คือตัวยาค้านจุลินทรีย์ทั่วโลกคิดเป็นร้อยละ 0-20 ของการติดเชื้อ *A. baumannii* ทั้งหมดในประเทศไทย ข้อมูลจากโรงพยาบาลมหาสารนครเชียงใหม่ในปี พ. ศ. 2546 มีรายงานพบเชื้อ *A. baumannii* คือตัวยาค้านจุลินทรีย์ทุกขนานที่มีจำหน่ายในประเทศไทยร้อยละ 45 (Puttilerpong et al., 2011)

จุลชีววิทยาและการก่อโรคของ *A. baumannii*

A. baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแบบ coccobacilli มีขนาดประมาณ 1.0 ถึง 1.5x1.5 ถึง 2.5 μm (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996) เป็นแบคทีเรียที่ไม่เกิดกระบวนการหมัก (nonfermentation) ไม่มีสี (nonpigment) สามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* โดยวิธีการทางชีวเคมี (biochemical) เพื่อแยกสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ (species) ในสกุล (genus) เดียวกัน (Dolzani et al., 1995) ซึ่งมีวิธีการทดสอบหลายวิธี เช่น การจำแนกด้วย phenotype โดยใช้ API tests (kit) ชุด API 20 NE ดังแสดงในตารางที่ 2-1 ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ใช้จำแนกแบคทีเรียแกรมลบ โดย *A. baumannii* ให้ผลลบกับทดสอบด้วย oxidase test และ motility test ให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย catalase test เป็นต้น (Hanlon, 2005) เจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่อุณหภูมิสูงถึง 44 องศาเซลเซียส (Dortet et al., 2006) สามารถแยกได้จากดินและสภาพสิ่งแวดล้อมทั่วไปรวมไปถึงผิวหนังของคน สามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมีชีวิตอยู่รอดได้ในโรงพยาบาลได้เป็นเวลานาน ผลจากการศึกษาพบว่าสามารถเพาะ *A. baumannii* ได้จากอ่างล้างมือ พื้นห้องและเตียงผู้ป่วยในโรงพยาบาลและพบว่าเชื้อคงทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลาเฉลี่ย 13 วัน เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ

ในโรงพยาบาลที่สำคัญทั้งการติดเชื้อที่ปอด เลือด ระบบทางเดินปัสสาวะ เชื้อหุ้มสมองอักเสบ และ เยื่อช่องท้องอักเสบ เป็นต้น (Hanlon, 2005)

ตารางที่ 2-1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. baumannii* ด้วยชุดทดสอบ API 20 NE System (ดัดแปลงจาก Dortet et al., 2006)

คุณสมบัติ	ผล		ผลการทดสอบ ของ <i>A. baumannii</i>
	ลบ (Negative)	บวก (Positive)	
β -Hemolysis	ไม่พบ	พบ	-
Nitrate reduction	ไม่มีสี	ชมพู-แดง	-
Indole production	ไม่มีสี	ชมพู	-
Fermentation of glucose	ฟ้า-เขียว	เหลือง	-
Arginine dihydrolase	เหลือง	ส้ม/ ชมพู/ แดง	-
Urease activity	เหลือง	ส้ม/ ชมพู/ แดง	-
Esculin hydrolysis	เหลือง	เทา/ น้ำตาล/ ดำ	-
Gelatin hydrolysis	ไม่มีการแพร่เม็คสี	มีการแพร่ของเม็คสีดำ	-
β -Galactosidase	ไม่มีสี	เหลือง	-
Assimilation of:			
Glucose	โปร่งแสง	ขุ่น	±
Arabinose	โปร่งแสง	ขุ่น	±
Mannose	โปร่งแสง	ขุ่น	-
Mannitol	โปร่งแสง	ขุ่น	-
N-Acetylglucosamine	โปร่งแสง	ขุ่น	-
Maltose	โปร่งแสง	ขุ่น	-
Gluconate	โปร่งแสง	ขุ่น	±
Caprate	โปร่งแสง	ขุ่น	+
Adipate	โปร่งแสง	ขุ่น	+
Malate	โปร่งแสง	ขุ่น	+
Citrate	โปร่งแสง	ขุ่น	+
Phenylacetate	โปร่งแสง	ขุ่น	+

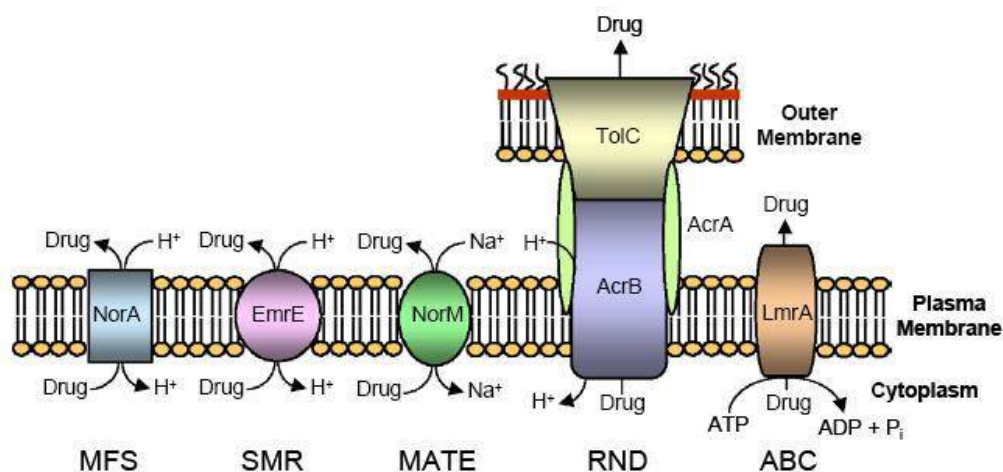
ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผล		ผลการทดสอบ ของ <i>A. baumannii</i>
	ลบ (Negative)	บวก (Positive)	
Oxidase test			-
Catalase test			+

กลไกการก่อโรคและการดื้อยาของ *A. baumannii*

กลไกในการก่อโรคของ *A. baumannii* ในมนุษย์นั้นประกอบด้วยสมมติฐาน 3 ข้อดังนี้คือการที่เชื้อมีสาร polysaccharide บริเวณแคปซูลและมี fimbriae ทำให้สามารถจับเซลล์เยื่อได้ดี สามารถสร้างเอนไซม์บางชนิดที่ทำลายไขมันปกคลุมเนื้อเยื่อทำให้เชื้อจับกับเซลล์ได้ง่ายขึ้นและคุณสมบัติของ lipopolysaccharide และ lipid A ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996) และพบกลไกการดื้อยาของ *A. baumannii* หลายกลไกได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา (Drug Inactivation หรือ Drug Modification) มีรายงานการสร้างเอนไซม์หลากหลายชนิดด้วยกัน ทั้งที่ทำลายยาในกลุ่ม β -lactams ได้แก่ Amp-C, β -lactamase, OXA-type carbapenemase และ metallo- β -lactamase และการทำลายยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น aminoglycoside-modifying enzymes (วิชัย สันติมาลีวรกุล และคณะ, 2552) กลไกการดื้อยาโดยการลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin (OMPs) ซึ่งเป็นก่อนโปรตีนที่ประกอบขึ้นให้มีลักษณะคล้ายช่องที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) โดยพบว่า *A. baumannii* มีจำนวนของ porin น้อย และขนาดของ porin เล็กเป็นผลทำให้ *A. baumannii* มีการซึมผ่านของสารหรือยาผ่านชั้น outer membrane ลดลง (น้อยกว่า 5%) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น (Vila, Martí, & Sánche-Céspedes, 2007) กลไกการดื้อยาโดยการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา (Alteration of Target Site) การศึกษาพบว่า เมื่อยาปฏิชีวนะเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ จะตรงเข้าไปยังบริเวณเป้าหมาย ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะที่ยาปฏิชีวนะจะเข้าไปทำงานได้ ทำให้แบคทีเรียบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมาย เพื่อให้ยาไม่สามารถเข้าจับได้ เช่นใน *Streptococcus pneumoniae* PBP (Penicillin Binding Protein) จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น PBPX ทำให้เกิดการดื้อยาตามมา (วิรวรรณ ลูวีระ, 2548) และความสามารถในการขับยาออกจากเซลล์ (Decreased Drug Uptake) แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาเข้าไปในเซลล์ หรือมีการใช้พลังงานในการขับเคลื่อนด้วยโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์ (Efflux Pump) เพื่อนำยาออกนอกเซลล์ ตัวอย่างเช่น

โปรตีนขับยาออกนอกเซลล์ imipenem จะอาศัยโปรตีน porin ในการควบคุมการผ่านเข้าออกของยาชนิดนี้ เมื่อ *P. aeruginosa* พัฒนาโดยลดปริมาณโปรตีน porin ลง จึงสามารถลดการนำเข้าของยา imipenem น้อยลง กลไกการนำเข้าของยาในเชื้อ *Salmonella typhi* จะมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Multidrug Efflux Pump จึงทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ค้นพบระบบโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์ (Efflux Pump) 5 กลุ่มย่อย ซึ่งแบ่งโดยใช้เกณฑ์การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน เทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี การใช้แหล่งพลังงานในการขับเคลื่อนกลไก และชนิดของสับสเตรทที่จำเพาะของปั๊มชนิดต่าง ๆ คือ Major Facilitator (MFS) Superfamily, Small Multidrug Resistance (SMR) Family, Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Family, Resistance-Nodulation-Division (RND) Family และ ATP-Binding Cassette (ABC) Family (Kumar & Schweizer, 2005) ดังภาพที่ 2-1



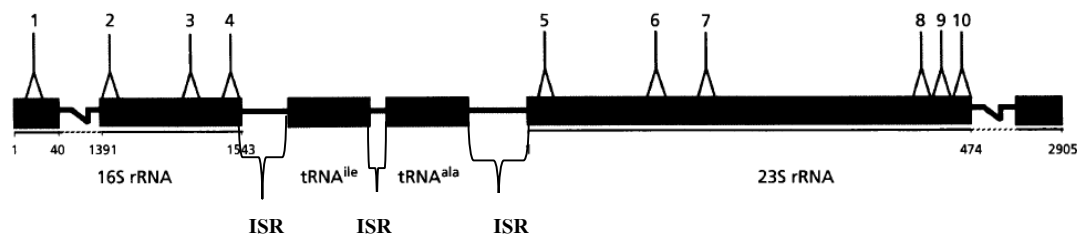
ภาพที่ 2-1 โครงสร้าง Efflux Pump แบบต่าง ๆ ที่ค้นพบในปัจจุบัน (Kumar & Schweizer, 2005)

หลักการจำแนก *A. baumannii* ด้วยดีเอ็นเอเทคโนโลยี

แบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* สามารถแบ่งกลุ่มเป็นสปีชีส์โดยใช้ผลการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกด้วยลักษณะทางจีโนมไทป์ด้วยมีซินเป้าหมายที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด คือ rRNA Operon (*rrn*) ที่มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูงในแบคทีเรีย ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอชนิด 16S, 23S และ 5S (Barry et al., 1991) เรียงลำดับตามการ transcription จาก 5' ไป 3' คือ 16S rRNA, spacer, tRNA, spacer, tRNA, spacer, 23S rRNA (ภาพที่ 2-2) โดยยีน 16S rRNA (*rrs*) เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.5 kb ได้รับ

การยอมรับนำมาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ (species) จีแนส (genera) และแฟมิลี (families) มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง (Gürtler & Stanisich, 1996) แปรผันทางวิวัฒนาการน้อยมาก (Janda & Abbott, 2007) มีฐานข้อมูลที่มีความแม่นยำเพื่อการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) มีรายงานความแตกต่างของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียที่เรียกว่า 2,500 สปีชีส์ (Gürtler & Stanisich, 1996) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA operon (*rrn* operon) ที่สมบูรณ์บนฐานข้อมูล 144 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Barry et al., 1991) ยีน 23S rRNA ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อยกว่ายีน 16S rRNA เนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ ประมาณ 3 kb ฐานข้อมูลการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการของ 23S rRNA ยังไม่สมบูรณ์ ไม่เพียงพอในการเปรียบเทียบ ส่วนยีน 5S rRNA มีขนาดเล็ก ประมาณ 1.2 kb ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อยมาก เนื่องจากมีขนาดเล็กและนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ไม่ได้ (Gürtler & Stanisich, 1996; Barry et al., 1991)

แต่อย่างไรก็ตามแม้ยีน 16S rRNA จะมีข้อดีและถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายแต่มีรูปแบบความแตกต่าง (polymorphism) ที่ยังไม่เพียงพอจะนำมาจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม *Acinetobacter* (Scola et al., 2006) ปัจจุบันมีข้อเสนอแนะให้ใช้บริเวณช่องว่างระหว่างยีน 16S rRNA และ 23S rRNA หรือ Intergenic Spacer Regions (ISR) เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ pre-rRNA และการกำหนดลำดับของ tRNA (Whiley et al., 1995) *A. baumannii* จะมี tRNA เป็น tRNA^{ala} และ tRNA^{ile} (บางชนิดอาจมีเพียง tRNA^{Glu} หรือไม่มีเลยก็ได้) (Osorio, Collins, Romalde, & Toranzo, 2005) มีนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย เนื่องจากมีความเสถียร มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง พบได้ในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ (Gürtler & Stanisich, 1996; Osorio et al., 2005) มีความจำเพาะในระดับสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกันมากทางสายวิวัฒนาการ (Barry et al., 1991; Maslunka, Carr, Gürtler, Kämpfer, & Seviour, 2006) มีความสามารถในการจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ (Barry et al., 1991; Magray et al., 2011) เป็นบริเวณที่มีความแปรผันต่ำภายในกลุ่มสปีชีส์และความแปรผันสูงระหว่างกลุ่มสปีชีส์ และขนาดที่สั้นของ ISR เมื่อเทียบกับ 16S rRNA (Chang et al., 2005) ทำให้การวิเคราะห์ sequencing ทำได้ง่ายและมีความเที่ยงตรง รวดเร็วและราคาไม่สูงมาก (Gürtler & Stanisich, 1996) แต่ข้อเสียของการใช้เทคนิค PCR โดยมี ISR เป็นเป้าหมายคือจำนวนก๊อปปี้ 16S-23S rRNA ของ Intragenic *rrn* Operon ก่อให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์มากขึ้น เนื่องจากไปเพิ่มความหลากหลายของขนาดความยาวของ Intergenic Spacer Region (ISR) และเพิ่มความแตกต่างของจำนวนอัลลีลของ *rrn* operon ทำให้แปลผลได้ยากและทำให้การจำแนกสายพันธุ์เกิดความผิดพลาด (Maslunka et al., 2006)



ภาพที่ 2-2 ตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ภายใน โอเปอรอนอาร์อาร์เอ็นเอ โดยการถอดรหัสจากซ้ายไปขวา เส้นสีดำแสดงถึงบริเวณอันหลากหลายของ rRNA และแถบหนาสีดำแสดงชิ้นส่วนยีน 16S และ 23S หมายเลข 2-4 คือบริเวณที่มักใช้เป็นไพรเมอร์ในลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA หมายเลข 5-10 คือบริเวณที่มักใช้เป็นไพรเมอร์ในลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 23S rRNA ช่องว่างระหว่างไพรเมอร์หมายเลข 4-tRNA gene, ช่องว่างระหว่าง tRNA gene-tRNA gene, ช่องว่างระหว่าง tRNA gene-ไพรเมอร์หมายเลข 5 (ในวงเล็บปีกกา) คือตำแหน่งของบริเวณ ISR (คัดแปลงจาก Gürtler & Stanisich, 1996)

ปัจจุบันมีรายงานวิจัยที่นำบริเวณ ISR มาใช้ในการจำแนกและศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. baumannii* มากมาย ยกตัวอย่าง เช่น Dolzani et al. (1995) ทำการศึกษาเพื่อจำแนก *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex (*A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex) โดยใช้ ISR ของ 16S-23S rRNA ด้วยวิธี restriction analysis จำแนกจากเชื้อ *Acinetobacter* จำนวน 12 genospecies พบว่าการใช้ restriction endonuclease ชนิด *AluI* และ *NdeII* มีความจำเพาะต่อ 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequence ทำให้สามารถจำแนก *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex ออกจากเชื้อ *Acinetobacter* สายพันธุ์อื่น ๆ

Chang et al. (2005) ทำการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อ *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Sequence analysis โดยใช้บริเวณ ITS ของยีน 16S-23S rRNA โดยทำการศึกษาจำแนกจากตัวอย่าง *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex จำนวน 17 ตัวอย่าง และตัวอย่างเชื้ออื่นในสปีชีส์ *Acinetobacter* อีก จำนวน 17 ตัวอย่าง พบว่าการใช้บริเวณยีน ITS จำแนกเชื้อตัวอย่างที่เป็น *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex มีความแม่นยำสูงถึง 0.99 ถึง 1.00 และสามารถจำแนกแยกจาก *Acinetobacter* สปีชีส์อื่นมีความแม่นยำอยู่ในช่วง 0.86-0.92 และเมื่อใช้บริเวณยีน ITS ในการยืนยัน *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex หลังจากการยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมี API 20 NE system พบว่ามีความแม่นยำในการจำแนก 96.2 เปอร์เซ็นต์ (76 ตัวอย่างจาก

79 ตัวอย่าง) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้บริเวณยีน ITS สามารถจำแนกความแตกต่างระดับ genospecies ใน *Acinetobacter* ได้

Keum et al. (2006) ศึกษาการตรวจคัดแยกเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการระบาดก่อโรคมามากที่สุดในโรงพยาบาล จากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคอื่นอีก 24 สายพันธุ์ โดยทำการออกแบบโพรบ (probes) จากยีน 23S rDNA และ 16S-23S rDNA ISR ด้วยวิธี Hybridization และทำการหารูปแบบการแสดงออกของยีนของ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ด้วย DNA microarray พบว่าโพรบมีประสิทธิภาพในการตรวจคัดแยก *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* 84.6% และ 96.2% ตามลำดับ

Chen et al. (2007) ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี one-tube multiplex PCR และวิธี automated ribotyping ทำการจำแนก *A. baumannii* ที่เป็น reference strain จำนวน 22 ตัวอย่าง และ *A. baumannii* ที่ได้จากการแยกทางคลินิก จำนวน 138 ตัวอย่าง โดยใช้บริเวณ ITS ของยีน 16S-23S rRNA และยีน *recA* ผลการศึกษาเปรียบเทียบพบว่าวิธี multiplex PCR มีความจำเพาะในการจำแนก *A. baumannii* 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการใช้คู่โพรเมอร์ของบริเวณ ITS และยีน *recA* โดย *A. baumannii* เท่านั้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 208 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของ ITS ซึ่งจะไม่พบในแบคทีเรียอื่น ได้แก่ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus*

Ko et al. (2008) ทำการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อ *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex ด้วยวิธี Oligonucleotide Array-Based Technique จากเชื้อที่เพาะจาก blood culture ร่วมกับการจำแนกโดยการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial drug) พบว่าการติดฉลาก Oligonucleotide probes บนบริเวณ ITS ของยีน 16S-23S rRNA และบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16S rRNA ควบคู่กัน สามารถจำแนกเชื้อ *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex ซึ่งจากตัวอย่างเชื้อ 291 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยสามารถจำแนกเป็นเชื้อ *A. baumannii* 221 ตัวอย่าง คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Acinetobacter* genomic specie 3 จำนวน 67 ตัวอย่าง คิดเป็น 23.0 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Acinetobacter* genomic specie 13 TU จำนวน 2 ตัวอย่างคิดเป็น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุได้อีก 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.3 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่พบ *A. calcoaceticus*

Hernandez et al. (2011) ทำการศึกษาจำแนกเชื้อ *A. baumannii* โดยวิธี RFLP-PCR เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาล จำนวน 4 โรงพยาบาลในประเทศโคลัมเบียระหว่างปี 2004, 2005, 2007 และ 2009 จำนวน 139 ตัวอย่าง จำแนกทางคลินิก (clinical isolates) โดยใช้บริเวณ ITS ของยีน 16S-23S rRNA โดยมี *A. baumannii* ATCC 19606 ในฐานะข้อมูล GenBank เป็น reference strain จากนั้นนำเชื้อที่แสดงบริเวณ ITS gene จำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี RFLP เลือกใช้ *MboI* enzyme พบว่า

เป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 122 ตัวอย่าง จาก 139 ตัวอย่าง ในที่นี้พบว่า 26 ตัวอย่างมีความเหมือนกันกับเชื้อ *A. baumannii* ในฐานข้อมูล Genbank 100 เปอร์เซ็นต์

Reguero et al. (2012) ทำการศึกษาจำแนกเชื้อ *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex โดยศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อ เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาล จำนวน 4 โรงพยาบาลในประเทศโคลัมเบียระหว่างปี 2004, 2005, 2007 และ 2009 จำนวน 150 ตัวอย่าง และคัดเลือกเชื้อ *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex จำนวน 60 ตัวอย่างจากการจำแนกเบื้องต้นด้วยวิธี automated system จากนั้นใช้วิธีวิเคราะห์โดย PCR ใช้ไพรเมอร์บริเวณ ITS ของยีน 16S-23S rRNA และยีน *rpoB* ร่วมกับการจำแนกเชื้อดื้อยาโดยพิจารณาบริเวณ quinolone resistance-determining region (QRDR) และใช้ไพรเมอร์ IS*Aba*-1, *bla*_{ADC} gene และ *bla*_{OXA} พบว่า 51 ตัวอย่างจาก 60 ตัวอย่าง เป็นเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อ *Acinetobacter nosocomialis* จำนวน 8 ตัวอย่าง และเป็นเชื้อ *Acinetobacter pittii* จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยใช้บริเวณ ITS จำแนก ซึ่งมีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์–100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. Thermal Cycler รุ่น T-Gradient Thermoblock (Labreco, U.S.A.)
2. ชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า (Gibco, U.S.A.)
3. เครื่องส่องภาพเจล Transiluminator (Hoefer Scientific Instrument, U.S.A.)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Beckman, U.S.A.)
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Ohaus Corp., U.S.A.)
6. GF-1 BACTERIAL DNA EXTRACTION Kit (Vivantis, U.S.A.)
7. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 2 20 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson, France)
8. เครื่องผสมสาร Vortex (Scientific Instrument, U.S.A.)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก cube mini centrifuge (GeneSearch Biotechnology, Taiwan)
10. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, U.S.A.)
11. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ThermoE (BIOER TECHNOLOGY, China)

สารเคมี

1. เจลอะกาโรส (Amresco, U.S.A.)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) (Hardy Diagnostics, U.S.A.)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) (Hardy Diagnostics, U.S.A.)
4. 6X Loading Dye (Vivantis, U.S.A.)
5. 100 bp DNA Ladder Plus (Vivantis, U.S.A.)
6. 10 mM dNTP Mix (Vivantis, U.S.A.)
7. 5U/μ Taq DNA Polymerase (Vivantis, U.S.A.)
8. 25 mM MgCl₂ (Vivantis, U.S.A.)
9. 50X TAE Buffer
10. TE buffer pH 8.0
11. เอธิเดียมโบรไมด์ (Promega, U.S.A.)

ไพรมอร์

ออกแบบจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ไพรมอร์ ISR 2F และ ISR 10R และสังเคราะห์จากบริษัท BioDesign (ประเทศไทย) ดังนี้

ไพรมอร์ คือ ISR 2F และ ISR 10R ที่ได้จากโพรบของ Ko et al. (2008)

เพื่อระบุยีนสายพันธุ์เชื้อ *A. baumannii* ออกแบบเพื่อระบุหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนภายในบริเวณช่องว่างระหว่างยีน 16S rRNA และ 23S rRNA เรียกว่าดีเอ็นเอชนิด 16S-23S ribosomal intergenic spacer region (ISR) ที่ได้จากโพรบของ Ko et al. (2008) ซึ่งเป็นไพรมอร์จับหา ISR ของ *A. baumannii* เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง *A. baumannii* กับ *Acinetobacter* spp. อื่น ๆ และแบคทีเรียกลุ่มฉวยโอกาสอื่นที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการและโรงพยาบาล โดยไพรมอร์คู่นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้คือ

ISR 2F 5' TTG TAC ACA CCG CCC GTC 3'

ISR 10R 5' TTC GCC TTT CCC TCA CGG TA 3'

แบคทีเรียที่นำมาศึกษา

1. เชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* จำนวน 15 ไอโซเลต แบ่งเป็น *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา (MDR: multidrug resistance) จำนวน 10 ไอโซเลต และ *A. baumannii* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา (non-MDR: non-multidrug resistance) จำนวน 5 ไอโซเลต เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่พักรักษา ณ โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี ในช่วงปี พ. ศ. 2555–2556 และในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม พ. ศ. 2557 โดยผ่านการตรวจสอบด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี API 20 NE system, VITEK 2 system และทดสอบการดื้อยา (ตารางที่ 3-1)

2. เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นจำนวน 11 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* อย่างละ 1 ไอโซเลตและเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลชลบุรี ในช่วงปี พ. ศ. 2555–2556 และช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม พ. ศ. 2557 จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *K. pneumoniae*, *E. coli*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยาอย่างละ 1 ไอโซเลต

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

1.1 เชื้อ *A. baumannii* ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* คือยา จำนวน 10 ไอโซเลต และเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่คือยาจำนวน 5 ไอโซเลต ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี ในช่วงปี พ. ศ. 2555–2556 และช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม พ. ศ. 2557

1.2 เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นในห้องปฏิบัติการที่ไม่คือยาจำนวน 3 สายพันธุ์ และที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลชลบุรีในช่วงปี พ. ศ. 2555–2556 และช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม พ. ศ. 2557 จำนวน 4 สายพันธุ์ จำนวนสายพันธุ์ละ 2 ไอโซเลตแบ่งเป็นสายพันธุ์คือยาและไม่คือยาซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรีในช่วงปี พ. ศ. 2555–2556

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (nutrient agar) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และทดสอบผลการคือยา (ไม่แสดงผล) ก่อนนำไปทำการทดสอบขั้นต่อไป

2. การสกัด Chromosomal DNA

คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จำนวน 3-5 โคโลนี ลงในอาหารเหลว (NB Broth) จำนวน 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 ml มาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm 2 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย GF-1 BACTERIAL DNA EXTRACTION Kit (Vivantis, U.S.A.) ดั้งชั้นตอนนี้ คือ เติมน้ำ buffer R1 แล้วเติม Lysozyme เพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นเติมน้ำ Protinase K และ RNase เพื่อทำลายโปรตีนและ RNA ตามลำดับ แล้วเติมน้ำ buffer BG เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอ แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol แล้วจึงแยกดีเอ็นเอออกจากสิ่งปนเปื้อนที่เหลือ เช่น RNA โดยนำไปโหลด (load) ใส่อ่าง spin column ล้างดีเอ็นเอให้สะอาดอีกครั้งด้วย wash buffer แล้วจึงชะและละลายเพื่อเก็บดีเอ็นเอลงใน microtube ขนาด 1.5 ml ด้วย TE buffer pH 8.0 ได้ดีเอ็นเอปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร (ประมาณ 2-3 ไมโครกรัม) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การตรวจหาชิ้น ISR ของ *A. baumannii* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ISR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สามารถจับบริเวณ ISR ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน 16S rRNA กับ 23S rRNA (คู่ไพรเมอร์ ISR 2F และ ISR 10R) ที่ได้จากโพรบของ Ko et al. (2008) โดยนำดีเอ็นเอที่ได้ปริมาตร 5 μ l (100 ng) ไปผสมกับ PCR Mastermix ปริมาตรสุดท้าย (total reaction volume) เท่ากับ 50 μ l ที่ประกอบด้วย 0.2 mM dNTPs, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 U *Taq* DNA polymerase, ไพรเมอร์ ข้างละ 0.6 μ M ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที Denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป

4. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจาก PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เจล โดยซึ่งอะกาโรส (Vivantis, U.S.A.) 3 g เติม 1X TAE Buffer 30 ml รันเจลภายใต้ความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus จำนวน 3 μ l ที่มีดีเอ็นเอประมาณ 300 ng ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเครื่อง UV Transilluminator

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ ISR ที่ได้จากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของ ISR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ISR 2F และ ISR 10R ที่ได้จากโพรบสำหรับวิธี hybridization (Ko et al., 2008) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, U.S.A.) แล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Mardmedic, Malaysia) จากนั้นนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความเหมือนและความต่างของยีนที่แยกได้ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ยีนจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN โดยเปรียบเทียบกับยีนที่คล้ายกัน ในฐานข้อมูลที่มีอยู่

6. สร้างแผนผังวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit (BioEdit Sequence Alignment Editor) จากนั้นนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalX และ ClustalW แล้วนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนผังวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) เพื่อบ่งชี้ชนิดของยีนที่ศึกษา ด้วยโปรแกรม MEGA6.0 (BioManager, Australia) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) จากการ Bootstrap ข้อมูล 1,000 ครั้ง และแสดงค่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3-1 รูปแบบการดื้อยาชนิดต่าง ๆ ของ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี ในช่วงปี พ. ศ. 2555-2556 และช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม พ. ศ. 2557

Isolate		β -lactam					Carbapenem			Polymycin	Quinolone	Aminoglycoside	
		CRO	CTX	CAZ	SCF	TZP	IPM	MEM	ETP	CL	CIP	AK	GEN
Ab1	(MDR-C)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab2	(MDR-C)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab3	(MDR-C)	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R
Ab4	(MDR-C)	R	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R
Ab5	(MDR-C)	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Ab6	(MDR-C)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab7	(MDR-C)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab8	(MDR-C)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Ab9	(MDR-C)	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab10	(MDR-C)	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

Isolate		β -lactam					Carbapenem			Polymycin	Quinolone	Aminoglycoside	
		CRO	CTX	CAZ	SCF	TZP	IPM	MEM	ETP	CL	CIP	AK	GEN
Ab11	(non-MDR-C)	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R
Ab12	(non-MDR-C)	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S
Ab13	(non-MDR-C)	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S
Ab14	(non-MDR-C)	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S
Ab15	(non-MDR-C)	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S

หมายเหตุ Ab: *Acinetobacter baumannii*, CRO:Ceftriaxone, CTX:cefotaxime, CAZ:ceftazidime, SCF: Cefoperazone/sulbactam, TZP:

Tazobactam/piperacillin, FOS:Fosfomycin, IPM: Imipenem, MEM:Meropenem, ETP: Ertapenem, CL: Colistin, CIP: Ciprofloxacin,

AK: Amikacin, GEN: Gentamycin, เชื้อไวต่อยา (S; susceptible), เชื้อดื้อปานกลาง (I; intermediate resistance) และเชื้อดื้อต่อยา

(R; resistant), MDR-C: Multidrug resistance Chonburi Hospital, non-MDR-C: non-Multidrug resistance Chonburi Hospital

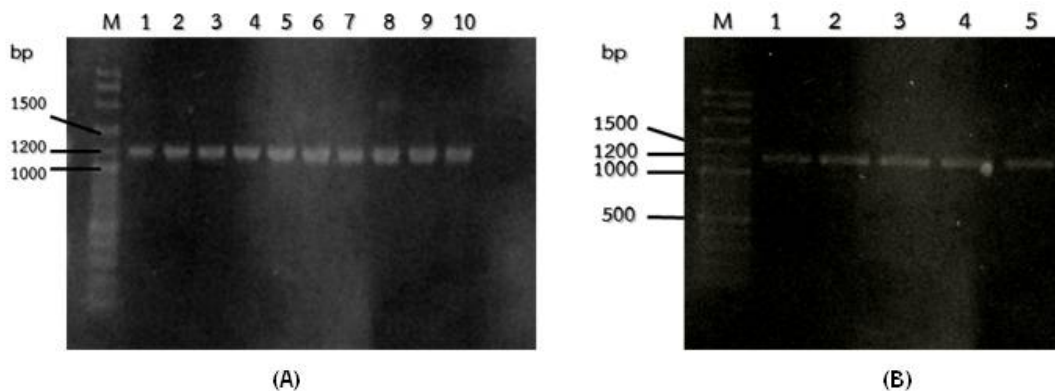
บทที่ 4

ผลการวิจัย

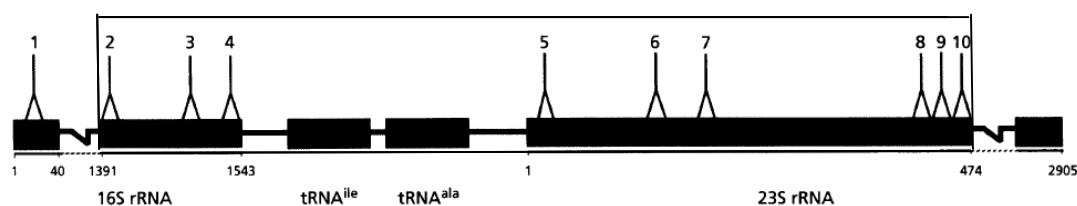
ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอของ ISR ที่แยกได้จาก *A. baumannii* โดยใช้บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) ด้วยวิธีพีซีอาร์

จากการศึกษาความแตกต่างของรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (amplicon) ของ ISR ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้ส่งตรวจ โดย ISR เป็นบริเวณที่มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูงร่วมกับการวินิจฉัยทางชีวเคมี โดยเชื้อ *A. baumannii* ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี แบ่งเป็น *A. baumannii* คี้อยาจำนวน 10 ไอโซเลต (Ab1-Ab10) และไม่คี้อยาจำนวน 5 ไอโซเลต (Ab11-Ab15) โดยพบว่า ในกลุ่มตัวอย่างคี้อยา มีเชื้อ *A. baumannii* ที่คี้อยาปฏิชีวนะทุกกลุ่ม จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลต Ab1, Ab2, Ab6, Ab7 และ Ab9 รวม 5 ไอโซเลต ส่วน Ab10 เป็นไอโซเลตที่พบการคียาน้อยที่สุดคือ 8 ชนิดจาก 12 ชนิด ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่คี้อยาพบว่าทุกไอโซเลตจะไม่คี้อยา Colistin และยา Gentamycin แต่คี้อยา ceftazidime, meropenem, ertapenem, amikacin และ ไอโซเลต Ab15 ให้ผลการคียาน้อยที่สุดคือ 5 ชนิด (แสดงในตาราง 3-1) เมื่อนำ Chromosomal DNA ที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ ISR พบว่าดีเอ็นเอของ ISR ที่แยกได้จาก *A. baumannii* ทั้ง 15 ไอโซเลต มีขนาดเท่ากันทุกไอโซเลต และมีขนาดประมาณ 1,200 bp (ภาพที่ 4-1) ดีเอ็นเอของ ISR เมื่อถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อหาตำแหน่งบนแผนที่ยีน RNA Operon (Gürtler & Stanisich, 1996) พบว่า เส้น forward (2F) มีตำแหน่งอยู่ที่หมายเลข 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1391-1408 บนแผนที่ยีนของบริเวณยีน 16S rRNA (Brosius, Palmer, Kennedy, & Noller, 1978) และเส้น reverse (10R) มีตำแหน่งอยู่ที่หมายเลข 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 459-478 บนแผนที่ยีนของบริเวณยีน 23S rRNA (Brosius, Dull, & Noller, 1979) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ RNA operon ของ *E. coli* (Brosius et al., 1978; Brosius et al., 1979)

ดังนั้นไพรเมอร์คู่นี้จึงถูกออกแบบมาให้ครอบคลุมตั้งแต่บริเวณของยีน 16S rRNA บริเวณ ISR ไปจนถึงบริเวณยีน 23S rRNA บน RNA Operon (ภาพที่ 4-2)

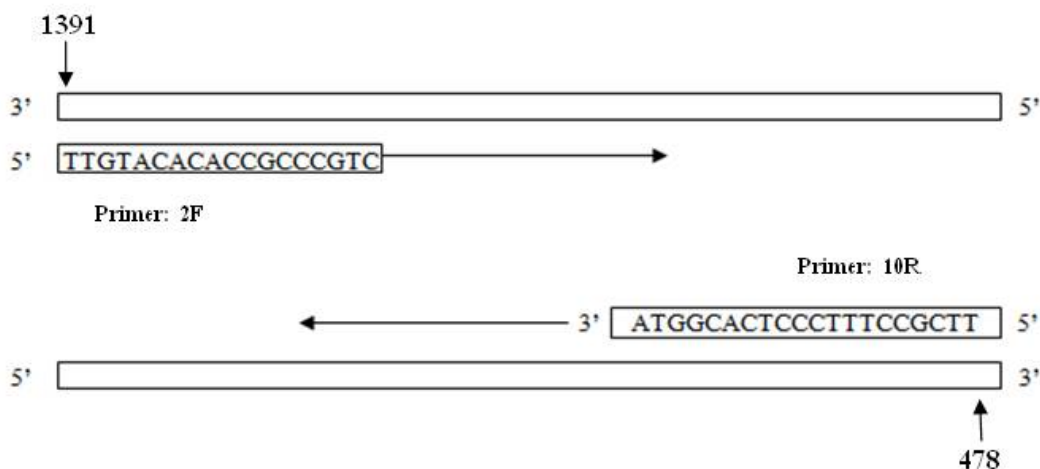


ภาพที่ 4-1 ชิ้นส่วนของISR ของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธีพีซีอาร์และโดยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์, (A) lane M: VC 100 bp plus DNA ladder, 1-10: ISR DNA ของ *A. baumannii* คือยา สายพันธุ์ Ab1-Ab10 ตามลำดับ (B) lane M: VC 100 bp plus DNA ladder, 1-5: ISR DNA ของ *A. baumannii* ไม่คือยา สายพันธุ์ Ab11-Ab15 ตามลำดับ



ภาพที่ 4-2 ตำแหน่งของดีเอ็นเอของ ISR ที่เพิ่มขยายได้ด้วยคู่ไพรเมอร์ 2F และ 10R บนแผนที่ยีน RNA Operon (ครอบคลุมบริเวณยีน 16S rRNA ถึงบริเวณยีน 23S rRNA) (ดัดแปลงจาก Gürtler & Stanisich, 1996)

ทั้งนี้ยืนยันผลได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์นี้ ปรากฏอยู่บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA Operon ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานเป็นต้นแบบคือ *Acinetobacter baumannii* strain XH386 (CP010779.1) (ภาพที่ 4-3) ซึ่งสามารถพยากรณ์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ ISR ของ *A. baumannii* ตัวอย่างที่ได้จากโรงพยาบาลชลบุรีได้ มีขนาดเท่ากับ 1,230 base pair (bp) (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-3 การออกแบบคู่ไพรเมอร์ 2F และ 10R กับสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์บริเวณ ISR ของเชื้อ *A. baumannii*

เมื่อนำขนาดดีเอ็นเอของ ISR ทั้งสายพันธุ์คือยาและไม่คือยาที่แยกได้ไปเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของ ISR ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกที่เป็นเชื้อฉวยโอกาสอื่นเพื่อเปรียบเทียบความจำเพาะของไพรเมอร์ ISR ในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลชลบุรีและจากห้องปฏิบัติการ

ผลการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของ ISR ของ *A. baumannii* กับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก เพื่อจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดต่าง ๆ พบว่าดีเอ็นเอของ ISR สามารถใช้จำแนกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบแถบดีเอ็นเอของ ISR ขนาดคงที่ประมาณ 1,200 bp ในเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างจากเชื้อฉวยโอกาสอื่น (ภาพที่ 4-6) เช่น *P. aeruginosa* พบดีเอ็นเอของ ISR มีขนาดประมาณ 1,050 bp เชื้อ *K. pneumoniae* พบแถบดีเอ็นเอของ ISR ขนาดประมาณ 1,000 bp เชื้อ *E. coli* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 bp ในเชื้อ *B. subtilis* และ *B. cereus* พบแถบดีเอ็นเอของ ISR ขนาดประมาณ 840 bp เท่ากันส่วนเชื้อ MRSA และ *S. aureus* ไม่พบแถบดีเอ็นเอของ ISR แสดงให้เห็นว่า *A. baumannii* มีความแตกต่างกันกับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดต่าง ๆ ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR จะเห็นว่าสามารถใช้ระบุชนิดได้ เนื่องจากขนาดของดีเอ็นเอของ ISR ที่เพิ่มปริมาณได้แตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และดีเอ็นเอของ ISR ของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้ง 15 ไอโซเลต มีขนาดคงที่เท่ากันในทุกไอโซเลต

—————→

5' **TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTCACACCAGAAGTAGCTAGCCTAA**
 CTGCAAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
 GCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTAACGAAAGATTGACGATTGGTAAGAAT
 CCACAACAAGTTGTTCTTCATAGATGTATCTGAGGGTCTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAC
 ACGCTTGATAAGCGTGGGGTCACAAGTTCAAGTCTTGTCAGACCCACCATGACTTTGACTG
 GTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATGATTGATGATGTAAGCTGGGGACTTAGCTTAGTTG
 GTAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAA
 CTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAGTAAATAAAGATTGAGATCTTGGTTTATTAAC
 TTCTGTGATTTCAATTACACGGTAATTAGTGTGATCTGACGAAGACACATTAACCTAATAAC
 AGATTGGCAAATTGAGTCTGAAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAA
 TCTAGATGAATTGAGAACTAGCAAATTAAGTGAATCAAGCGTTTTGGTATGTGAATTTAGA
 TTGAAGCTGTACGGTGCTTAAGTGCACAGTGTCTAAACTGAAATGTTGAAGTTACTAACT
 TGTAGGTAACATCGACTGTTTGGGGTGTATAGTCAAGTAATTAAGTGCATGTGGTGGATG
 CCTTGGCAGTCAGAGGCGATGAAAGACGTGATAGCCTGCGAAAAGCTCCGGGGAGGCGGC
 AAATATCCTTTGATCCGGAGATGTCTGAATGGGGGAACCCACCTACTTTAAGGTAGGTATT
 GCAACATGAATACATAGTGTGCAAGGCGAACGAGGGGAAGTGAACATCTCAGTACCT
 TAGGAAAAGAAATCAATTGAGATTCCTCAGTAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCAT
 TAAGTTATGTGTGTTTTAGTGAACGCTCTGGGAAGTGCGAACGTAGAGGGTGATATCCC
 GTACACGAAAGGGCACACATAATGATGACGAGTAGGGCGAGGCACGTGAAACCTTGTCTG
 AATATGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCCTGACTGACCGATAGTGAACCAG
TTCGCCTTTCCTCACGGTA 3'

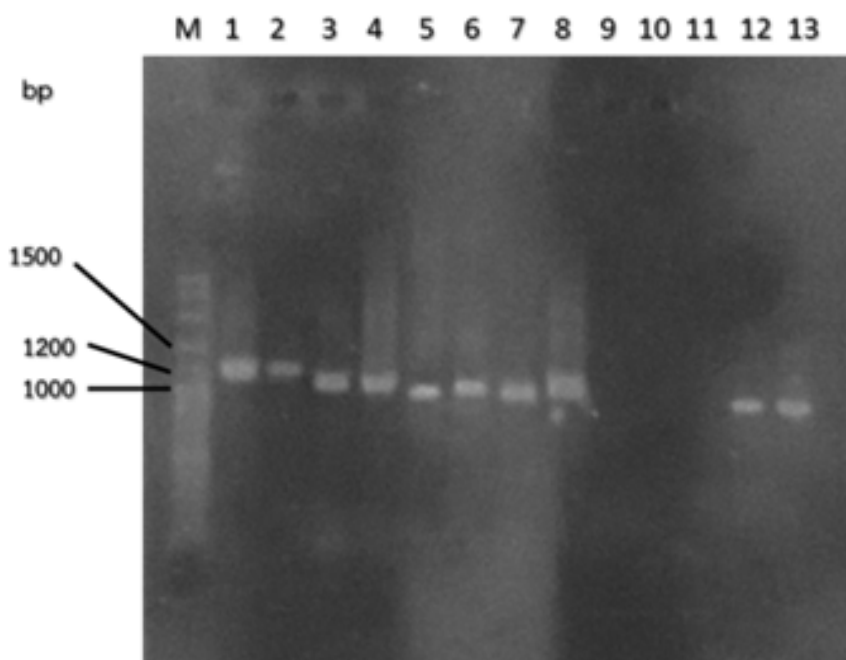
←—————

ภาพที่ 4-4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ขนาด 1,230 bp ที่ได้จากการพยากรณ์จากจีโนมิก
 ดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter baumannii* strain XH386
 (CP010779.1) ที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ 2F และ 10R

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของ ISR ของ *A. baumannii* ทั้ง 15
 ไอโซเลต ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า *A. baumannii* ทั้ง 15 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
 ดีเอ็นเอของ ISR ขนาดใกล้เคียงกับการพยากรณ์ ยกตัวอย่างเช่น *A. baumannii* คือยา สายพันธุ์ Ab1
 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,095 bp ดังภาพที่ 4-5

TAACTGCAAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTA
 ACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTAACGAAAGATTGACG
 ATTGGTAAGAATCCACAACAAGTTGTTCTTCATAGATGTATCTGAGGGTCTGTAGCTC
 AGTTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCACAAGTTCAAGTCTTGTCAGA
 CCCACCATGACTTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAGATACATGATTGATGATGT
 AAGCTGGGGACTTAGCTTAGTTGGTAGAGCGCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCAGGA
 GTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCCGATTACAGAAATTAGT
 AAATAAAGATTGAGATCTTGGTTTTATTAACCTTCTGTGATTTTATTATCACGGTAATTA
 GTGTGATCTGACGAAGACACATTAACCTCATTAAACAGATTGGCAAAATTGAGTCTGAA
 ATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACT
 AGCAAATTAACCTGAATCAAGCGTTTTGGTATGTGAATTTAGATTGAAGCTGTACAGT
 GCTTAAGTGCACAGTGCTCTAAACTGAAATGTTGAAGTTACTAACTTGTAGGTAACA
 TCGACTGTTTGGGGTTGTATAGTCAAGTAATTAAGTGCATGTGGTGGATGCCTTGGCA
 GTCAGAGGCGATGAAAGACGTGATAGCCTGCGAAAAGCTCCGGGGAGGCGGCAAAT
 ATCCTTTGATCCGGAGATGTCTGAATGGGGGAACCCACCTACTTTAAGGTAGGTATT
 GCAACATGAATACATAGTGTGCAAGGCGAACGAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTA
 CCCTTAGGAAAAGAAATCAATTGAGATTCCCTCAGTAGCGGCGAGCGAACGGGGAT
 CAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTGGGAAGTGCGAACGTAGAG
 GGTGATATTCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGACGAGTAGGGCGAGGCA
 CGTGAAACCTTGTC

ภาพที่ 4-5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของ ISR ที่เพิ่มปริมาณได้จาก *A. baumannii* สายพันธุ์
 Ab1 โดยใช้ไพรเมอร์ ISR 2F และ ISR 10R ในการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์
 บริเวณ ISR



ภาพที่ 4-6 คือเอ็นเอของ ISR ของเชื้อ *A. baumannii* และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์ และแยกเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์, lane M: VC 100 bp plus DNA ladder, 1, 2: *A. baumannii* คือยา สายพันธุ์ Ab1 และไม่ใช่ยา สายพันธุ์ Ab15, 3- 4: *P. aeruginosa* คือและไม่ใช่ยา, 5-6: *K. pneumoniae* คือและไม่ใช่ยา, 7-8: *E. coli* คือและไม่ใช่ยา, 9-10: MRSA, 11: *S. aureus* ไม่ใช่ยา, 12: *B. subtilis* และ 13: *B. cereus*

ศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ISR ของ *A. baumannii*

จากข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. baumannii* สายพันธุ์คือยาจำนวน 10 ไอโซเลต และไม่ใช่ยา 5 ไอโซเลต เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบจากผลการ alignment ของทั้ง 15 ไอโซเลต แล้วนำมาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าทั้ง 15 ไอโซเลต สามารถแยกออกจากกันเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4-7 และ ภาพที่ 4-8 ตามลำดับ) และมีความเหมือนกับ *A. baumannii* ในฐานข้อมูล GenBank มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ระหว่างสายพันธุ์ด้วยการ alignment (ภาพที่ 4-9) เปรียบเทียบกับเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐานต่าง ๆ (ตารางที่ 4-1) พบว่า


```

Ab5      AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 202
Ab6      AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 201
Ab12     AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 200
Ab14     AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 198
Ab4      AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 204
Ab7      AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 202
Ab10     AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 200
Ab3      AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 212
Ab2      AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 204
Ab1      AGTTGGTTAGAGCAC--CGCTTGATA--AGCGTGGGG-TCACAAGTTCAAGTCTTGTC- 224
Ab8      AATGGGCTGATCCCCGTTGCTCGCCGCTACTGAGGGAATCTCAA-TTGATTTCTTTTCC 199
Ab9      AATGGGCTGATCCCCGTTGCTCGCCGCTACTGAGGGAATCTCAA-TTGATTTCTTTTCC 197
Ab11     AATGGGCTGATCCCCGTTGCTCGCCGCTACTGAGGGAATCTCAA-TTGATTTCTTTTCC 199
Ab15     AATGGGCTGATCCCCGTTGCTCGCCGCTACTGAGGGAATCTCAA-TTGATTTCTTTTCC 200
Ab13     AATGGGCTGATCCCCGTTGCTCGCCGCTACTGAGGGAATCTCAA-TTGATTTCTTTTCC 202
* * * * *   * *   * * * *   * * * *   * * * *   * * * *   * * * *   * * * *
Ab5      -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 259
Ab6      -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTGTAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 258
Ab12     -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 257
Ab14     -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 255
Ab4      -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 261
Ab7      -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 259
Ab10     -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 257
Ab3      -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 269
Ab2      -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 261
Ab1      -AGACCCACCATGAC-TTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATG-ATTGATGA 281
Ab8      TAAGGGTACTGAGATGTTTCACTTCCCCTCGTTCGCCTTGCAACAC-TATGTATTCATGT 258
Ab9      TAAGGGTACTGAGATGTTTCACTTCCCCTCGTTCGCCTTGCAACAC-TATGTATTCATGT 256
Ab11     TAAGGGTACTGAGATGTTTCACTTCCCCTCGTTCGCCTTGCAACAC-TATGTATTCATGT 258
Ab15     TAAGGGTACTGAGATGTTTCACTTCCCCTCGTTCGCCTTGCAACAC-TATGTATTCATGT 259
Ab13     TAAGGGTACTGAGATGTTTCACTTCCCCTCGTTCGCCTTGCAACAC-TATGTATTCATGT 261
*   **   **   **   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
Ab5      TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 316
Ab6      TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 315
Ab12     TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 314
Ab14     TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 312
Ab4      TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 318
Ab7      TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 316
Ab10     TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 314
Ab3      TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 326
Ab2      TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 318
Ab1      TGTAAGCTGGGGACTTAGCTTA--GTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCACG-CAGGAGGTCA 338
Ab8      TGCAAT-----ACCTACCTTAAAGTAGGTGGGTTCCCCCATTAGACATCTCCGGATCA 312
Ab9      TGCAAT-----ACCTACCTTAAAGTAGGTGGGTTCCCCCATTAGACATCTCCGGATCA 310
Ab11     TGCAAT-----ACCTACCTTAAAGTAGGTGGGTTCCCCCATTAGACATCTCCGGATCA 312
Ab15     TGCAAT-----ACCTACCTTAAAGTAGGTGGGTTCCCCCATTAGACATCTCCGGATCA 313
Ab13     TGCAAT-----ACCTACCTTAAAGTAGGTGGGTTCCCCCATTAGACATCTCCGGATCA 315
* * * * *   * * * *   * * * *   * * * *   * * * *   * * * *

```

Ab5 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 376
 Ab6 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 375
 Ab12 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 374
 Ab14 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 372
 Ab4 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 378
 Ab7 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 376
 Ab10 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 374
 Ab3 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 386
 Ab2 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 378
 Ab1 GGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAACTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAATTAG 398
 Ab8 AAGGAT--ATTTGCC--GCCTCC-CCGGAGCTTTTCGCAGGCT---ATCAC-GTCTTTCA 363
 Ab9 AAGGAT--ATTTGCC--GCCTCC-CCGGAGCTTTTCGCAGGCT---ATCAC-GTCTTTCA 361
 Ab11 AAGGAT--ATTTGCC--GCCTCC-CCGGAGCTTTTCGCAGGCT---ATCAC-GTCTTTCA 363
 Ab15 AAGGAT--ATTTGCC--GCCTCC-CCGGAGCTTTTCGCAGGCT---ATCAC-GTCTTTCA 364
 Ab13 AAGGAT--ATTTGCC--GCCTCC-CCGGAGCTTTTCGCAGGCT---ATCAC-GTCTTTCA 366
 * * * * * ** * **** * * * * * * * * * * * * * **

Ab5 TAAATAAAGATTAAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 435
 Ab6 TAAATAAAGATTAAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 434
 Ab12 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 433
 Ab14 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 431
 Ab4 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 437
 Ab7 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 435
 Ab10 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 433
 Ab3 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 445
 Ab2 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 437
 Ab1 TAAATAAAGATTGAGATCTTGTTTTATTAACCTC-TGTGATTTTCATTATCACGGTAATTA 457
 Ab8 TCGCCTCTGACTG---CCAAGG--CATCCACCACATGC-ACTTAATTACT----TGACTA 413
 Ab9 TCGCCTCTGACTG---CCAAGG--CATCCACCACATGC-ACTTAATTACT----TGACTA 411
 Ab11 TCGCCTCTGACTG---CCAAGG--CATCCACCACATGC-ACTTAATTACT----TGACTA 413
 Ab15 TCGCCTCTGACTG---CCAAGG--CATCCACCACATGC-ACTTAATTACT----TGACTA 414
 Ab13 TCGCCTCTGACTG---CCAAGG--CATCCACCACATGC-ACTTAATTACT----TGACTA 416
 * * * * * ** *

Ab5 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 490
 Ab6 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 489
 Ab12 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 488
 Ab14 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 486
 Ab4 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 492
 Ab7 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 490
 Ab10 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 488
 Ab3 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 500
 Ab2 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAATAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 492
 Ab1 GTGTGATCTGACGAAGAC-ACATTAAC-CA--TTAACAGATTGGCAAAATTG-AGTCTG 512
 Ab8 -TACAACCCCAAACAGTCGATGTTACCTACAAGTTAGTAACTT--CAACATTTTCAGTTTA 470
 Ab9 -TACAACCCCAAACAGTCGATGTTACCTACAAGTTAGTAACTT--CAACATTTTCAGTTTA 468
 Ab11 -TACAACCCCAAACAGTCGATGTTACCTACAAGTTAGTAACTT--CAACATTTTCAGTTTA 471
 Ab15 -TACAACCCCAAACAGTCGATGTTACCTACAAGTTAGTAACTT--CAACATTTTCAGTTTA 471
 Ab13 -TACAACCCCAAACAGTCGATGTTACCTACAAGTTAGTAACTT--CAACATTTTCAGTTTA 473
 * * * * *

```

Ab5      AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCGATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 550
Ab6      AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 549
Ab12     AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 548
Ab14     AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 546
Ab4      AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 552
Ab7      AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 550
Ab10     AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 548
Ab3      AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 560
Ab2      AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 552
Ab1      AAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCTAGATGAATTGAGAACTA 572
Ab8      GAGC--ACTGTGCACTTAAGCACC---GTACAGCT-TCAATCTA----AATTCACA--TA 518
Ab9      GAGC--ACTGTGCACTTAAGCACC---GTACAGCT-TCAATCTA----AATTCACA--TA 516
Ab11     GAGC--ACTGTGCACTTAAGCACC---GTACAGCT-TCAATCTA----AATTCACA--TA 518
Ab15     GAGC--ACTGTGCACTTAAGCACC---GTACAGCT-TCAATCTA----AATTCACA--TA 519
Ab13     GAGC--ACTGTGCACTTAAGCACC---GTACAGCT-TCAATCTA----AATTCATA--TA 521
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
Ab5      GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 603
Ab6      GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 602
Ab12     GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 601
Ab14     GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 599
Ab4      GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 605
Ab7      GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 603
Ab10     GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 601
Ab3      GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 613
Ab2      GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 605
Ab1      GCAAATTAACTGAATCAAGCGTTTTGGTA--TGTGAATT----TAGATTGAA-GCTGTAC 625
Ab8      CCAAAAACGCTTGATTGAGTTAATTTGCTAGTTCTCAATTCATCTAGATTAATTGCTTAAC 578
Ab9      CCAAAAACGCTTGATTGAGTTAATTTGCTAGTTCTCAATTCATCTAGATTAATTGCTTAAC 576
Ab11     CCAAAAACGCTTGATTGAGTTAATTTGCTAGTTCTCAATTCATCTAGATTAATTGCTTAAC 578
Ab15     CCAAAAACGCTTGATTGAGTTAATTTGCTAGTTCTCAATTCATCTAGATTAATTGCTTAAC 579
Ab13     CCAAAAACGCTTGATTGAGTTAATTTGCTAGTTCTCAATTCATCTAGATTAATCGCTTAAC 581
          ****   ***   **   ****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
Ab5      ---GGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 646
Ab6      ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 645
Ab12     ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 644
Ab14     ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 642
Ab4      ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 648
Ab7      ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 646
Ab10     ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 644
Ab3      ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 656
Ab2      ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 648
Ab1      ---AGTGCTTAAGTGACACAGT--GCTCTAAACTGAAAT-----GTTGA--AGTTA 668
Ab8      CTAAACTCTTGAGTGAACAATTTATTTGAGACTCAATTTTGCCAATCTGTTAATGAGTTA 638
Ab9      CTAAACTCTTGAGTGAACAATTTATTTGAGACTCAATTTTGCCAATCTGTTAATGAGTTA 636
Ab11     CTAAACTCTTGAGTGAACAATTTATTTGAGACTCAATTTTGCCAATCTGTTAATGAGTTA 638
Ab15     CTAAACTCTTGAGTGAACAATTTATTTGAGACTCAATTTTGCCAATCTGTTAATGAGTTA 639
Ab13     CTAAACTCTTGAGTGAACAATTTATTTGAGACTCAATTTTGCCAATCTGTTAATGAGTTA 641
          ***   ****   ***   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```


Ab5 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 866
 Ab6 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 865
 Ab12 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 864
 Ab14 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 862
 Ab4 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 868
 Ab7 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 866
 Ab10 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 864
 Ab3 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 876
 Ab2 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 868
 Ab1 ACCTACTTTAAGGTAGGTA-----TTGCAACATGAATACATA-GTGTGCAAGGCGAAC 888
 Ab8 ACCAAC--TAAGCTAAGTCCCCAGCTTACATCATCAAT-CATGTATCTTTTATCTATAAC 866
 Ab9 ACCAAC--TAAGCTAAGTCCCCAGCTTACATCATCAAT-CATGTATCTTTTATCTATAAC 863
 Ab11 ACCAAC--TAAGCTAAGTCCCCAGCTTACATCATCAAT-CATGTATCTTTTATCTATAAC 865
 Ab15 ACCAAC--TAAGCTAAGTCCCCAGCTTACATCATCAAT-CATGTATCTTTTATCTATAAC 866
 Ab13 ACCAAC--TAAGCTAAGTCCCCAGCTTACATCATCAAT-CATGTATCTTTTATCTATAAC 868
 *** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** * ** * ** *

Ab5 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 925
 Ab6 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 924
 Ab12 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 923
 Ab14 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 921
 Ab4 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 927
 Ab7 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 925
 Ab10 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 923
 Ab3 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 935
 Ab2 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 927
 Ab1 GAGGGGAAGTGAAACATCTCAGTACCCTTAGGAAAAGAAATCAA-TTGAGATTCCTCAG 947
 Ab8 TTCAACCAGTCAAA-GTCATGGTGGGTCT--GACAAGACTTGAACCTGTGAC-CCCACGC 922
 Ab9 TTCAACCAGTCAAA-GTCATGGTGGGTCT--GACAAGACTTGAACCTGTGAC-CCCACGC 919
 Ab11 TTCAACCAGTCAAA-GTCATGGTGGGTCT--GACAAGACTTGAACCTGTGAC-CCCACGC 921
 Ab15 TTCAACCAGTCAAA-GTCATGGTGGGTCT--GACAAGACTTGAACCTGTGAC-CCCACGC 922
 Ab13 TTCAACCAGTCAAA-GTCATGGTGGGTCT--GACAAGACTTGAACCTGTGAC-CCCACGC 924
 *** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Ab5 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 985
 Ab6 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 984
 Ab12 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 983
 Ab14 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 981
 Ab4 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 987
 Ab7 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 985
 Ab10 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 983
 Ab3 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 995
 Ab2 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 987
 Ab1 TAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTG 1007
 Ab8 T--TATCAAGCG--TGTGCTCTAACCAACTGAGCTACAGACCCTCAGATACA----TCTA 974
 Ab9 T--TATCAAGCG--TGTGCTCTAACCAACTGAGCTACAGACCCTCAGATACA----TCTA 971
 Ab11 T--TATCAAGCG--TGTGCTCTAACCAACTGAGCTACAGACCCTCAGATACA----TCTA 973
 Ab15 T--TATCAAGCG--TGTGCTCTAACCAACTGAGCTACAGACCCTCAGATACA----TCTA 974
 Ab13 T--TATCAAGCG--TGTGCTCTAACCAACTGAGCTACAGACCCTCAGATACA----TCTA 976
 * * **** * * * ** * ** * ** * * * * *

```

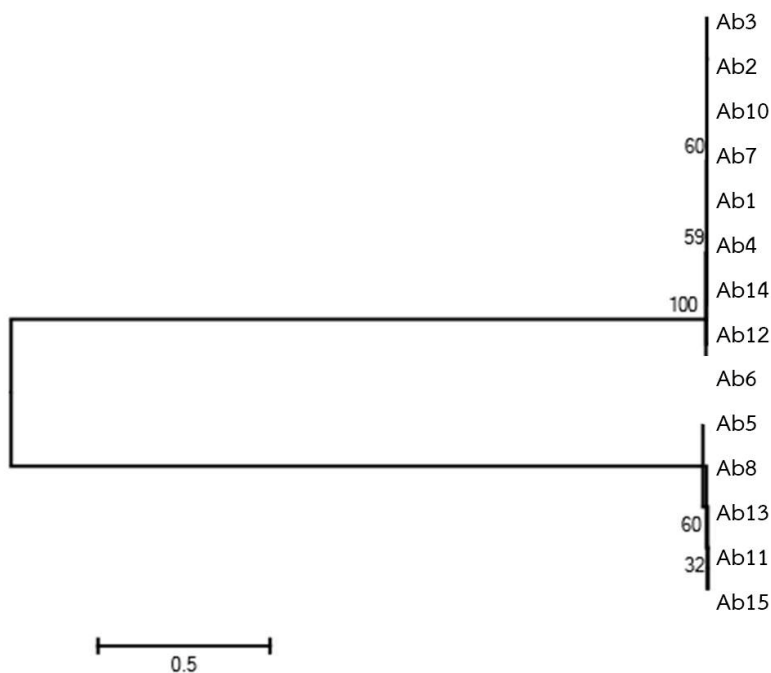
Ab5      GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1044
Ab6      GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1043
Ab12     GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1042
Ab14     GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1040
Ab4      GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1046
Ab7      GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1044
Ab10     GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1042
Ab3      GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1054
Ab2      GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1046
Ab1      GGAAGTGCGAAC -GTAGAGGGTGATATCCCGTACACGAAAGGGCACACATAATGATGAC 1066
Ab8      TGAAGAACAACCTTGTGTGGAT -- TCTTACCAATCGTCAA --- TCTTTCGTTAAGGAGGT 1029
Ab9      TGAAGAACAACCTTGTGTGGAT -- TCTTACCAATCGTCAA --- TCTTTCGTTAAGGAGGT 1026
Ab11     TGAAGAACAACCTTGTGTGGAT -- TCTTACCAATCGTCAA --- TCTTTCGTTAAGGAGGT 1028
Ab15     TGAAGAACAACCTTGTGTGGAT -- TCTTACCAATCGTCAA --- TCTTTCGTTAAGGAGGT 1029
Ab13     TGAAGAACAACCTTGTGTGGAT -- TCTTACCAATCGTCAA --- TCTTTCGTTAAGGAGGT 1031
      **** * * ** * * * * * * * * * * * * * * * *
Ab5      GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGACCATCCTC- 1095
Ab6      GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGACCATCCTCC 1095
Ab12     GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGACCATCCTCC 1094
Ab14     GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGACCATCCTC-- 1090
Ab4      GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGACCATCCTCC 1098
Ab7      GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGACCATCCTCC 1096
Ab10     GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGACCATC---- 1090
Ab3      GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TGAATATGGGGGGGA----- 1097
Ab2      GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC -TG----- 1077
Ab1      GAGTAGGGCG -AGGC -----ACGTGAAACCTTGTC----- 1095
Ab8      GATCCAGCCGAGGTTCCCCTACG -GCTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATCGGCC 1088
Ab9      GATCCAGCCGAGGTTCCCCTACG -GCTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATCGGCC 1085
Ab11     GATCCAGCCGAGGTTCCCCTACG -GCTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATCGGCC 1087
Ab15     GATCCAGCCGAGGTTCCCCTACG -GCTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATCGGCC 1088
Ab13     GATCCAGCCGAGGTTCCCCTACG -GCTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATCGGCC 1090
      ** * * * * * * * * * * * * * * * *
Ab5      -----
Ab6      -----
Ab12     A----- 1095
Ab14     -----
Ab4      A----- 1099
Ab7      -----
Ab10     -----
Ab3      -----
Ab2      -----
Ab1      -----
Ab8      ACACCGTGG----- 1097
Ab9      ACACCGTGG----- 1094
Ab11     ACACCGTGG----- 1096
Ab15     ACAC----- 1092
Ab13     ACACCGTGTAACCGCCC 1108

```

ภาพที่ 4-7 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ระหว่างกลุ่ม

A. baumannii คือยา (Ab1-Ab10) และ กลุ่ม *A. baumannii* ไม่คือยา (Ab11-Ab15)

ด้วยโปรแกรม ClustalW



ภาพที่ 4-8 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการแสดงระยะห่างของสายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. baumannii* ตัวอย่าง จำนวน 15 ไอโซเลต (Ab10-Ab15) ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี ด้วยโปรแกรม ClustalX และ โปรแกรม MEGA6.0

ตารางที่ 4-1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลชลบุรีกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blastn.ncbi.nlm.nih.gov/>)

สายพันธุ์	Accession number	% Similarity
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	CP000521.1	98
<i>A. baumannii</i> 25001 CMCC (B)	DQ108593.1	99
<i>A. baumannii</i> 29108 CMCC (B)	DQ108594.1	99

```

Ab25001   TTGTCAGACCCACCATGACTTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATGATTGAT 334
Ab29108   TTGTCAGACCCACCATGACTTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATGATTGAT 334
AbATCC    TTGTCAGACCCACCATGACTTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATGATTGAT 334
Ab1       TTGTCAGACCCACCATGACTTTGACTGGTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATGATTGAT 279
Ab15      AGGTGGGTTCCCCCAT ---TCAGAC ------ATCTCCGGATCAAAGG ---ATATTTGCC 326
          ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   GATGTAAGCTGGGGACTTAGCTTAGTTGGTAGAGCGCCTGCT -TTGCACGCAGGAGGTCA 393
Ab29108   GATGTAAGCTGGGGACTTAGCTTAGTTGGTAGAGCGCCTGCT -TTGCACGCAGGAGGTCA 393
AbATCC    GATGTAAGCTGGGGACTTAGCTTAGTTGGTAGAGCGCCTGCT -TTGCACGCAGGAGGTCA 393
Ab1       GATGTAAGCTGGGGACTTAGCTTAGTTGGTAGAGCGCCTGCT -TTGCACGCAGGAGGTCA 338
Ab15      GCCTC ---CCCGGAGCTTTTCGCAG --GCTATCACGTCTTTCATCGC -CTCTGACTGCCA 380
          * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   GGAGTTCGACT ----CTCCTAGT --CTCCACCAGA --ACTTAAGATAAGTTCGGATTAC 444
Ab29108   GGAGTTCGACT ----CTCCTAGT --CTCCACCAGA --ACTTAAGATAAGTTCGGATTAC 444
AbATCC    GGAGTTCGACT ----CTCCTAGT --CTCCACCAGA --ACTTAAGATAAGTTCGGATTAC 444
Ab1       GGAGTTCGACT ----CTCCTAGT --CTCCACCAGA --ACTTAAGATAAGTTCGGATTAC 389
Ab15      AGGCATCCACCACATGCACCTTAATTACTTGACTATACAACCCCAAACA -GTCGATGTTAC 439
          * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   --AGAAATTAGTAAATAAAGATTGAGATCTTGGTTTATTAACTTCTGTG -ATTCCTTAT 501
Ab29108   --AGAAATTAGTAAATAAAGATTAAGATCTTGGTTTATTAACTTCTGTG -ATTCATTAT 501
AbATCC    --AGAAATTAGTAAATAAAGATTGAGATCTTGGTTTATTAACTTCTGTG -ATTCATTAT 501
Ab1       --AGAAATTAGTAAATAAAGATTGAGATCTTGGTTTATTAACTTCTGTG -ATTCATTAT 446
Ab15      CTACAAGTTAGTAACT ----TCAACATTTCACTTTA --GAGCACTGTGCACCTTAAGCAC 492
          * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   C --ACGGTAATTAGTGTGATCTGACG ---AAGACACATTAACTCA -TTAACAGATTGG- 553
Ab29108   C --ACGGTAATTAGTGTGATCTGACG ---AAGACACATTAACTCA -TTAACAGATTGG- 553
AbATCC    C --ACGGTAATTAGTGTGATCTGACG ---AAGACACATTAACTCA -TTAACAGATTGG- 553
Ab1       C --ACGGTAATTAGTGTGATCTGACG ---AAGACACATTAACTCA -TTAACAGATTGG- 498
Ab15      CGTACAGCT -TCAATCTAAATTCACATACCAAACGC -TTGATTCAGTTAATTTGCTAGT 550
          * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   -CAAAATTGAGTCTGAAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCT -A 611
Ab29108   -CAAAATTGAGTCTGAAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCT -A 611
AbATCC    -CAAAATTGAGTCTGAAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCT -A 611
Ab1       -CAAAATTGAGTCTGAAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAATCT -A 556
Ab15      TCTCAATTCA -TCT -AGATTAATTGCTTAACTTAACTCTTGAGTGAACAATTTATTTCA 608
          * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   GA -TGAATTGAGAACTAGCAAATTAAGTGAATCAA -GCGTTTTGGTATGTGAATTTAGAT 669
Ab29108   GA -TGAATTGAGAACTAGCAAATTAAGTGAATCAA -GCGTTTTGGTATGTGAATTTAGAT 669
AbATCC    GA -TGAATTGAGAACTAGCAAATTAAGTGAATCAA -GCGTTTTGGTATGTGAATTTAGAT 669
Ab1       GA -TGAATTGAGAACTAGCAAATTAAGTGAATCAA -GCGTTTTGGTATGTGAATTTAGAT 614
Ab15      GACTCAATTTTG --CCAATCTGTTAA -TGAGTTAATGTGTCT ---CGTCAGATCACAC 661
          ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   TGAA -GCTGTACAGTGCTTAAGTGCACAGTGCTC --TAAACTGAAATGTTGA ----AGT 721
Ab29108   TGAA -GCTGTACAGTGCTTAAGTGCACAGTGCTC --TAAACTGAAATGTTGA ----AGT 721
AbATCC    TGAA -GCTGTACAGTGCTTAAGTGCACAGTGCTC --TAAACTGAAATGTTGA ----AGT 721
Ab1       TGAA -GCTGTACAGTGCTTAAGTGCACAGTGCTC --TAAACTGAAATGTTGA ----AGT 666
Ab15      TAATTACCGT --GATAATGAAAT -CACAGAAGTTAATAAACCAAGATCTTAACTTTATT 718
          * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
Ab25001   TACTAACTTGTAAGTAAACATCGACT -GTTTGGGGTTGTATAGTCAAGTAATTAAGTGCAT 780
Ab29108   TACTAACTTGTAAGTAAACATCGACT -GTTTGGGGTTGTATAGTCAAGTAATTAAGTGCAT 780
AbATCC    TGCTAACTTGTAAGTAAACATCGACT -GTTTGGGGTTGTATAGTCAAGTAATTAAGTGCAT 780
Ab1       TACTAACTTGTAAGTAAACATCGACT -GTTTGGGGTTGTATAGTCAAGTAATTAAGTGCAT 725
Ab15      TACTAATTTCT --GTAATCCGAACTTATCTTAACTTCT --GGTGGAG --ACTAGGAG --- 769
          * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

```

```

Ab25001      GTGGTGGATGCCTTGGCAGTCAGAG-GCGATGAAAGACGTGATAGC--CTGCGAAAAGCT 837
Ab29108      GTGGTGGATGCCTTGGCAGTCAGAG-GCGATGAAAGACGTGATAGC--CTGCGAAAAGCT 837
AbATCC       GTGGTGGATGCCTTGGCAGTCAGAG-GCGATGAAAGACGTGATAGC--CTGCGAAAAGCT 837
Ab1          GTGGTGGATGCCTTGGCAGTCAGAG-GCGATGAAAGACGTGATAGC--CTGCGAAAAGCT 782
Ab15         --AGTCGAACTCCTGACCTCCTGCGTGCAAAGCA-GGCGCTCTACCAACTAAGCTAAGTC 826
          *** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ab25001      CCGGG---GAGGCGGCAAAATAT---CCTTTGATCCGGAGAT-----GTCTGA---ATG 881
Ab29108      CCGGG---GAGGCGGCAAAATAT---CCTTTGATCCGGAGAT-----GTCTGA---ATG 881
AbATCC       CCGGG---GAGGCGGCAAAATAT---CCTTTGATCCGGAGAT-----GTCTGA---ATG 881
Ab1          CCGGG---GAGGCGGCAAAATAT---CCTTTGATCCGGAGAT-----GTCTGA---ATG 826
Ab15         CCCAGCTTACATCATCAATCATGTATCTTTTATCTATAACTTCAACCAGTCAAAGTCATG 886
          ** * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ab25001      GGGGAACCCACCTACTTTAAGGTAGGTATTGCAACATGAATACATAGTGT-TGCAAGGCG 940
Ab29108      GGGGAACCCACCTACTTTAAGGTAGGTATTGCAACATGAATACATAGTGT-TGCAAGGCG 940
AbATCC       GGGGAACCCACCTACTTTAAGGTAGGTATTGCAACATGAATACATAGTGT-TGCAAGGCG 940
Ab1          GGGGAACCCACCTACTTTAAGGTAGGTATTGCAACATGAATACATAGTGT-TGCAAGGCG 885
Ab15         GTGGGTCTGACAAGACTTGAACCT---TGTGACCCACGCTTATCAAGCGTGTGCT---CT 940
          ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ab25001      AACGAGGGGAACCTGAAACATCTAAG-TACC----- 969
Ab29108      AACGAGGGGAACCTGAAACATCTAAG-TACC----- 969
AbATCC       AACGAGGGGAAGTGAACATCTCAG-TACC----- 969
Ab1          AACGAGGGGAAGTGAACATCTCAG-TACCCTTAGGAAAAGAAATCAATTGAGATTCCCT 944
Ab15         AACCAACTGAGCTACAGACCCTCAGATACATCTATGAAGAACAACCTGTTGTGGATTCTT 1000
          *** * ** * * ** * ** *
Ab25001      -----
Ab29108      -----
AbATCC       -----
Ab1          CAGTAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCATTAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAAACGCT 1004
Ab15         ACCAATCGTCAATCTTTCGTTAAGGAGGTGATCCAGCCGAGGTTCCCTACGGCTACCT 1060
Ab25001      -----
Ab29108      -----
AbATCC       -----
Ab1          CTGGGAAGTGCGAACGTAGAGGGTGATATTCCTGACACGAAAGGGCACACATAATGATG 1064
Ab15         T-----GTTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACAC----- 1092
Ab25001      -----
Ab29108      -----
AbATCC       -----
Ab1          ACGAGTAGGGCGAGGCACGTGAAACCTTGTC 1095
Ab15         -----

```

ภาพที่ 4-9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ *A. baumannii* คือยา (Ab1) *A. baumannii* ไม่คือยา (Ab15) กับ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐานจากฐานข้อมูล GenBank (ได้แก่ *A. baumannii* ATCC 17978 (AbATCC), *A. baumannii* 25001 CMCC (B) (Ab25001), *A. baumannii* 29108 CMCC (B) (Ab29108)) ด้วยโปรแกรม ClustalW

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของเชื้อ *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาทั้ง 15 ไอโซเลต กับกลุ่ม *Acinetobacter* spp. ได้แก่ *A. lwoffii* BCRC 14855, *A. johnsonii* BCRC 14853, *A. junii* BCRC 14854, *A. haematolyticus* BCRC 14852, *A. calcoaceticus* LMG 992, *Acinetobacter baylyi* 7.2 และ *A. ursingii* LMG 19575 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ทั้งหมดที่นำมาศึกษามีความคล้ายคลึงกันตั้งแต่ 81-92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4-2) ร่วมกับการเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteraceae* ก่อโรคที่สำคัญชนิดอื่น ๆ ที่พบแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชลบุรี และเป็นเชื้อมีแนวโน้มคือยาสูง ได้แก่ *S. marcescens* สายพันธุ์ Zhenjiang, *Proteus vulgaris* KCCM 11539, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Enterobacter cloacae* KCCM 40044, *K. pneumoniae* subsp. *Pneumonia* KP14013, *P. aeruginosa* DPs-20 และ *Salmonella enterica* subsp. *Entericaserovar Typhimurium* 138736 (ตารางที่ 4-3 และ ภาพที่ 4-10) พบว่าสามารถจำแนก *A. baumannii* ออกจากเชื้อในกลุ่ม *Acinetobacter* ชนิดอื่น ๆ ได้ ยกตัวอย่าง เช่น *A. calcoaceticus*, *A. baylyi*, *A. Johnsonii*, *A. lwoffii* เป็นต้นและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ที่มีความแตกต่างกันทางวิวัฒนาการอย่างชัดเจนกับกลุ่ม *Enterobacteraceae* จะเห็นได้ว่าการใช้ข้อมูลจากแผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการรวมไปถึงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ *A. baumannii* ออกจากเชื้อแบคทีเรียคือยาชนิดอื่น ๆ และกลุ่ม *Acinetobacter* ที่มีความใกล้เคียงกันทางสายวิวัฒนาการและยังสามารถใช้เป็นข้อมูลในการติดตามวิวัฒนาการการกลายพันธุ์ของ *A. baumannii* ไปเป็นสายพันธุ์ที่คือยาในอนาคตได้

ตารางที่ 4-2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ISR ของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลชลบุรีกับแบคทีเรียกลุ่ม *Acinetobacter* spp. จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blastn.ncbi.nlm.nih.gov/>)

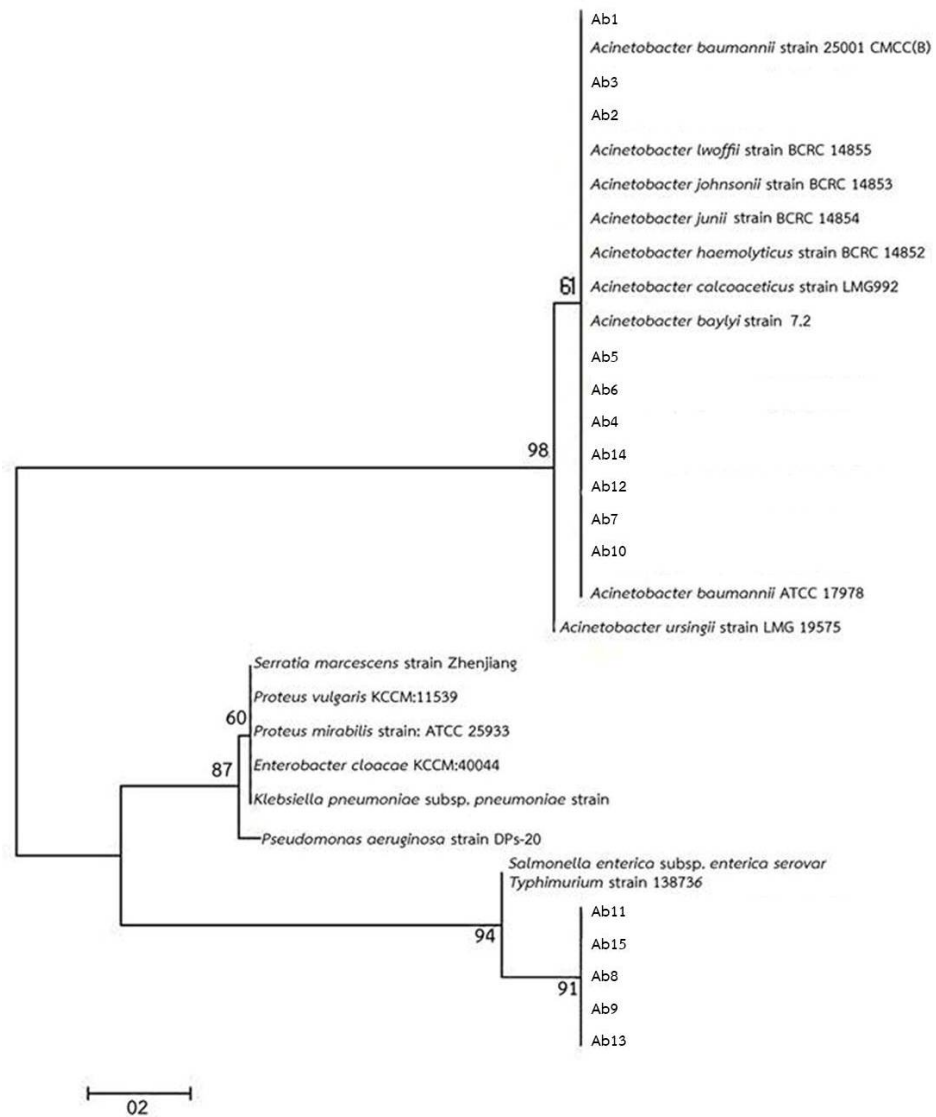
สายพันธุ์	Accession number	% Similarity
<i>A. lwoffii</i> BCRC 14855	AY601835.1	88
<i>A. johnsonii</i> BCRC 14853	AY601834.1	89
<i>A. junii</i> BCRC 14854	AY601832.1	88
<i>A. haematolyticus</i> BCRC 14852	AY601822.2	92
<i>A. calcoaceticus</i> LMG 992	AY601831.2	81

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

สายพันธุ์	Accession number	% Similarity
<i>Acinetobacter baylyi</i> 7.2	EF591586	85
<i>A. ursingii</i> LMG 19575	AY601847.1	83

ตารางที่ 4-3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลชลบุรีกับแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteraceae* จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blastn.ncbi.nlm.nih.gov/>)

สายพันธุ์	Accession number	% Similarity
<i>Serratia marcescens</i> strain		
Zhenjiang	EU008543.1	76
<i>Proteus vulgaris</i> KCCM 11539	FJ410396.1	90
<i>Enterobacter cloacae</i>		
KCCM:40044	FJ410388.1	77
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	AB547910.1	90
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.		
<i>pneumoniae</i> KP14013	KJ845720.1	75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
DPs-20	JN247782.1	91
<i>Salmonella enterica</i> subsp.		
<i>enterica</i> serovar Typhimurium		
strain 138736	CP007581.1	88



ภาพที่ 4-10 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการแสดงระยะห่างของสายวิวัฒนาการเพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ *A. baumannii* จำนวน 15 ตัวอย่าง กับเชื้อในกลุ่ม *Acinetobacter* spp. และกลุ่ม *Enterobacteraceae* ด้วยโปรแกรม ClustalX และโปรแกรม MEGA6.0

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

การวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของ ISR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อจำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ออกจากเชื้อแบคทีเรียคือยาอื่น ๆ และศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม รวมถึงวิวัฒนาการของ *A. baumannii* สายพันธุ์คือยาและไม่คือยา โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (ISR 2F, ISR 10R) ที่ได้จากโพรบของเทคนิค DNA-DNA hybridization (Ko et al., 2008) ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ *A. baumannii* ทุกไอโซเลตจำนวน 15 ไอโซเลต พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,230 bp จากการพยากรณ์จากเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ *Acinetobacter baumannii* strain XH386 (CP010779.1) ซึ่งใกล้เคียงกับผลของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมากคือมีขนาดดีเอ็นเอของ ISR ประมาณ 1200 bp (ภาพที่ 4-1) อย่างไรก็ตามการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR จาก *A. baumannii* คือยา 10 ไอโซเลต แต่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ไม่คือยาเพียง 5 ไอโซเลตมาทำการเปรียบเทียบกันนั้น สามารถใช้เปรียบเทียบความเหมือนหรือต่างของ *A. baumannii* กลุ่มคือยาและไม่คือยาได้โดยพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ที่เพิ่มจำนวนได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บนแผ่นที่ยีนของ RNA operon (Gürtler & Stanisich, 1996) ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA Operon ปรากฏในส่วนที่เป็นดีเอ็นเอช่องว่างระหว่างยีน คือบริเวณ 16S rRNA บริเวณ ISR ไปจนถึง 23S rRNA (ภาพที่ 4-2) ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงของแบคทีเรีย สามารถที่จะใช้ในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ในระดับสปีชีส์ (Keum et al., 2006; Chen et al., 2007) และในระดับจีโนสปีชีส์ (genospecies) ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการกัน (Chang et al., 2005; Reguero et al., 2012) มีขนาดเหมาะสมเพียงพอที่จะเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของ ISR อื่น ๆ ของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่บรรจุในฐานข้อมูล GenBank (Janda & Abbott, 2007; Barry et al., 1991; Magray et al., 2011) โดยไพรเมอร์คู่นี้พิสูจน์ให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ที่เพิ่มจำนวนได้เหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *A. baumannii* ATCC 17978 พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ และมีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR ของ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐานอื่นคือ *A. baumannii* 25001 CMCC (B) และ *A. baumannii* 29108 CMCC (B) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การวิจัยได้ทำการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของ ISR จากเชื้อ *A. baumannii* ด้วยพีซีอาร์ พบว่ามีรูปแบบที่ความแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียคือยาสชนิดอื่น ๆ มีเพียงเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ที่ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอของ ISR เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อทั้งสอง (Gürtler & Barrie, 1995) เมื่อนำมาซึ่งดีเอ็นเอของ ISR ที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมาวิเคราะห์ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA alignment) และสร้างแผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการ ผลการวิเคราะห์ *A. baumannii* ทั้ง 15 ไอโซเลต พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR สามารถแยก *A. baumannii* ออกเป็น 2 กลุ่ม จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่า มี 2 ไอโซเลตของกลุ่มไม่คือยาที่เข้าไปอยู่ในกลุ่มคือยาซึ่งคาดการณ์ได้ว่าสายพันธุ์ไม่คือยาจำนวน 2 ไอโซเลต (Ab12 และ Ab14) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการทำ DNA alignment จะเห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้งสองไอโซเลต มีความเหมือนกับไอโซเลตในกลุ่มคือยา และเมื่อพิจารณาจากแบบแผนการคือยาพบว่ามีการคือยากลุ่ม Carbapenem, Aminoglycoside และกลุ่ม Cephalosporin ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu et al. (2014) ทำให้ใช้เป็นข้อมูลติดตามการเกิดการแปรผันของสายวิวัฒนาการและก่อให้เกิดการคือยาของสองไอโซเลตนี้ในอนาคต

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถตรวจสอบแยกสปีชีส์ของ *A. baumannii* ด้วยวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถพยากรณ์การเกิดการแปรผันของสายวิวัฒนาการ และก่อให้เกิดการคือยาของเชื้อ *A. baumannii* ในอนาคต (Chen et al., 2007) ซึ่งสามารถทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการออกแบบคู่ไพรเมอร์ เช่น ยีน *recA* ที่มีความจำเพาะต่อยีนคือยาเพื่อใช้ในการจำแนกให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

จากการทดลองเปรียบเทียบบริเวณดีเอ็นเอของ ISR ของ *A. baumannii* กับแบคทีเรียกลุ่มคือยาสชนิดอื่น เราพบว่าดีเอ็นเอ ISR ของ *A. baumannii* มีขนาดที่แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มคือยาสชนิดอื่นอย่างชัดเจน ทำให้สามารถจำแนกและตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ได้ดี รวดเร็วและมีความแม่นยำ เทียบเท่าวิธีการทดสอบทางชีวเคมี สอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้ ISR ในการจำแนกเชื้อกลุ่ม *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex ที่ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Sequence analysis ร่วมกับการยืนยันผลด้วยวิธีการทางชีวเคมี คือ API 20 NE (Chang et al., 2005) หรือการจำแนกจากเชื้อกลุ่มอื่นๆ โดยใช้เทคนิค one-tube multiplex PCR และ automated ribotyping ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะกับบริเวณยีน ISR และยีน *recA* พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* และมีรูปแบบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน (Chen et al., 2007) ข้อดีของการตรวจสอบแยกสปีชีส์ของ *A. baumannii* ด้วย ISR เพียงอย่างเดียวร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ในการทดลองนี้มีความรวดเร็วกว่าการใช้วิธี RFLP-PCR ซึ่งใช้จำแนก *A. baumannii* ทางคลินิกที่ต้องมีการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสม เพื่อหารูปแบบที่จำเพาะของ

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Hernandez et al., 2011) และการทดลองของ Ko et al. (2008) ที่ทำการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อ *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex ด้วยวิธี Oligonucleotide Array-Based Technique โดยมีการติดฉลาก Oligonucleotide probes บนบริเวณ ITS ของยีน 16S-23S rRNA และบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16S rRNA ควบคู่กันซึ่งเป็นวิธีที่มีความละเอียดและแม่นยำสูงมากแต่เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือที่ทันสมัย ต้องใช้ผู้ชำนาญการในการทดสอบและอ่านผลตลอดจนเสียค่าใช้จ่ายสูงจึงทำไม่เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ตรวจโรคตามสถานพยาบาล (Bergogne-Bérézin & Towmer, 1996)

จะเห็นได้ว่า ข้อดีของวิธีการใช้ไพรเมอร์ ISR ที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* สามารถจำแนกสปีชีส์ของ *A. baumannii* โดยที่ไม่ต้องทำการเพาะเชื้อและสามารถเตรียมได้จากแบคทีเรียจากผู้ป่วยโดยตรงและสามารถศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม รวมถึงวิวัฒนาการของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (ISR 2F, ISR 10R) เพียงคู่เดียว ร่วมกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยา สามารถที่จะคาดการณ์การแปรผันของเชื้อเพื่อกลายเป็นเชื้อดื้อยาได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการออกแบบคู่ไพรเมอร์กับบริเวณลำดับเบสที่มีความผันแปรสูงและบ่งบอกบริเวณที่ดื้อยาหรือใช้ยีนดื้อยาในการเปรียบเทียบเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนดื้อยา เช่น ยีน *recA* ร่วมกับบริเวณ ITS (Chen et al., 2007) บริเวณ ITS ร่วมกับยีน *rpoB* ร่วมกับการจำแนกเชื้อดื้อยาโดยพิจารณาบริเวณ quinolone resistance-determining region (QRDR) ที่จะดื้อยาในกลุ่ม β -lactams (Reguero et al., 2012) เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น ส่วนการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์คู่นี้ (ISR 2F, ISR 10R) ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย แผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการ สามารถประเมินการแปรผันของเชื้อ *A. baumannii* ในการกลายพันธุ์ดื้อยาก่อนทำให้ทราบผลตรวจสอบความไวต่อยา (Antibiogram) ของเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งอาจจะช่วยลดระยะเวลาในรอผลตรวจสอบความไวต่อยาของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนทำการรักษา หรือช่วยให้แพทย์สามารถตัดสินใจวางแผนการรักษาโรคที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อการดื้อยาล่วงหน้าเพื่อลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยวิกฤตในห้อง ICU นอกจากนี้การใช้ ISR ที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* สามารถดูความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการของเชื้อ *A. baumannii* ที่มีแนวโน้มจะดื้อยากับเชื้อ *A. baumannii* ไม่ดื้อยา เพื่อใช้ศึกษาอิทธิพลของ ISR ต่อการแปรผันทางพันธุกรรมเพื่อปรับตัวในการดื้อยาปฏิชีวนะในอนาคต เพื่อศึกษากลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ต่อไป นอกจากนี้การใช้ ISR สามารถระบุเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ ซึ่งเหมาะสมกว่าเมื่อเทียบกับ 16S rRNA และ 23S rRNA เพราะสามารถแยกเชื้อในระดับจีโนมเท่านั้น (Chang et al., 2005) และการใช้ ISR ที่จำเพาะต่อ

A. baumannii สามารถนำไปวิเคราะห์ผลโดย DNA sequencing ซึ่งทำได้รวดเร็วและราคาไม่สูงมาก (Gürtler & Stanisich, 1996) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การใช้ ISR เพื่อการตรวจสอบจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* มีความจำเพาะกับเชื้อในระดับสปีชีส์ทำให้สามารถจำแนก *A. baumannii* ออกจากกลุ่ม *Acinetobacter* spp. อื่น ๆ และเชื้อกลุ่มคือยาและกลุ่มคือยาได้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Keum et al. (2006) ที่เลือกบริเวณยีน ISR มาออกแบบโพรบ (probes) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* เพื่อทำการจำแนกเชื้อทั้งสองนี้ออกจากเชื้อคือยาอื่นในโรงพยาบาลจำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่าโพรบที่ออกแบบจากบริเวณยีน ISR มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสำคัญที่คือยาและก่อโรคในโรงพยาบาลที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การใช้ ISR เพื่อการตรวจสอบจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* มีความจำเพาะกับเชื้อในระดับสปีชีส์ทำให้สามารถจำแนก *A. baumannii* ออกจากกลุ่ม *Acinetobacter* spp. อื่น ๆ และการออกแบบโพรบเมอร์ที่จำเพาะเชื้อ *A. baumannii* กลุ่มคือยาเพิ่มเติมจะช่วยทำให้การตรวจวินิจฉัยเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว เป็นประโยชน์กับด้านการแพทย์และสาธารณสุข สามารถวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียเพื่อช่วยให้แพทย์ได้ตัดสินใจในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ในระยะเริ่มต้นก่อนลุกลามและเป็นอันตรายถึงชีวิต และยังสามารถใช้ข้อมูลแผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการติดตามวิวัฒนาการการกลายเป็นสายพันธุ์ที่คือยา เพื่อวางแผนป้องกันและควบคุมการระบาดของเชื้อต่อไป

บรรณานุกรม

- วิชัย สันติมาลีวรกุล, สุทธิพร ภัทรชยากุล และ โปยม วงศ์ภูวรักษ์. (2552). สถานการณ์การติดเชื้อและกลไกการดื้อยา โดยเชื้อ *Acinetobacter baumannii*. วารสารไท่ไภย์ชยนิพนธ์, 3, 1-16.
- วีรวรรณ ลูวีระ. (2006). การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. *บทความปริทัศน์*, 24(5), 453-459.
- พิชชาพร อธิกวริยะกุล, ญาณภา มณีศรี และรุจิพา ปิงยศ. (2008). *Treatment of Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in Thailand*. เข้าถึงได้จาก <http://www.ninerx.com/smf/index.php/topic,2117.Msg10492.html#msg10492>.
- ภัทรชัย กิรติสิน. (2552). *ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์ (Textbook of Medical Bacteriology)* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ ฯ: วี.เจ.พรินติ้ง
- Abbo, A., Navon-Venezia, S., Hammer-Muntz, O., Krichali, T., Siegman-Igra, Y., & Carmeli, Y. (2005). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 12-29.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K., & Gannon, F. (1991). The 16S/23S Ribosomal Spacer Region as a Target for DNA Probes to Identify Eubacteria. *Genome Research*, 1, 51-56.
- Bergogne-Bérézin, E., & Towmer, J. K. (1996). *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148-165.
- BioMérieux, Inc. Hazelwood, M. O., U.S.A. (2003). REF 20 050, API 20 NE Identification system for non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods. *BioMérieux, Inc.*, 1-4.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R., & Johansen, J. R. (2001). Is the 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, (18)6, 1057–1069.

- Chaing, M. C., Kuo, S. C., Chen, Y. C., Lee, Y. T., Chen, T. L., & Fung, C. P. (2011). Polymerase chain reaction assay for the detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *44*, 106-110.
- Chang, C. H., Wei, F. Y., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, T. C., & Chang, C. T. (2005). Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*, 1632-1639.
- Chen, T. L., Siu, L. K., Wu, R. C. C., Shaio, M. F., Huang, L. Y., Fung, C. P., Lee, C. M., & Cho, W. L. (2007). Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*, *13*, 801–806.
- Dijkshoorn, L., Van Harsselaar, B., Tjernberg, I., Bouvet, P. J., & Vaneechoutte, M. (1998). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Systematic and Applied Microbiology*, *21*(1), 33-39.
- Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., & Monti-Lagatolla, C. (1995). Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus-A. baumannii* Complex by Restriction Analysis of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(5), 1108-1113.
- Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C. J., & Cattoir, V. (2006). Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*, 4471–4478.
- García-Martínez, J., Martínez-Murcia, A., Antón, A. I., & Rodríguez-Valera, F. (1996). Comparison of the Small 16S to 23S Intergenic Spacer Region (ISR) of the rRNA Operons of Some *Escherichia coli* Strains of the ECOR Collection and *E. coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *178*(21), 6374–6377.
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., & Ursing, J. (1991). Reliability of Phenotypic Tests for Identification of *Acinetobacter* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*(2), 277-282.

- Giamarellou, H., Anastasia, A., & Kanellakopoulou, K. (2008). *Acinetobacter baumannii* : a Universal Threat to Public Health?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 106-119.
- Gürtler, V. (1993). Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 6S-23S rDNA spacer regions. *J Gen Microbio*, 139, 3089 – 3097.
- Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142, 3-16.
- Hanlon, G. W. (2005). The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 375-378.
- Hernández, M. A., Valenzuela, E. M., Pulido, I. Y., Reguero, M. T., Restrepo, S., Trujillo, S. G., Quintero, L. E., & Mantilla, J. R. (2011). The genomic indentification of Colombian *Acinetobacter baumannii* clinical isolates by RFLP-PCR analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 8(1), 110-114.
- Janda, J. M., & Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in The Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
- Keum, K. C., Yoo, S. M., Lee, S. Y., Chang, K. H., Yoo, N. C., Yoo, W. M., Kim, J. M., Choi, J. Y., Kim, J. S., & Lee, G. (2006). DNA microarray-based detection of nosocomial pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Molecular and Cellular Probes*, 20, 42–50.
- Ko, W. C., Lee, N. Y., Su, S. C., Dijkshoorn, L., Vanechoutte, M., Wang, L. R., Yan, J. J., & Chang, T. C. (2008). Oligonucleotide Array-Base Identification of Species in the *Acinetobacter calcoaceticos-A. baumannii* Complex in Isolates from Blood Culture and Antimicrobial Susceptibility Testing of the Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 2052-2059.
- Kumar, A., & Schweizer, P. H. (2005). Bacterial Resistance to Antibiotic : Active Efflux and Reduced Uptake. *Advanced Drug Delivery Review*, 57, 1486-1513.
- Liu, F., Zhu, Y., Yi, Y., Lu, Na., Zhu, B., & Hu, Y. (2014). Comparative genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. *BMC Genomics*, 15(1163), 1471– 2164.

- Magray, M. S. U. D., Kumar, A., Rawat, A. K., & Srivastava, S. (2011). Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA internal transcribed spacer region sequences. *Bioinformatics*, 6(10), 370-371.
- Maslunka, C., Carr, E., Gürtler, V., Kämpfer, P., & Seviour, R. (2006). Estimation of ribosomal RNA Operon (*rrn*) Copy Number in *Acinetobacter* Isolates and Potential of Patterns of *rrn* Operon-Containing Fragments for Typing Strains of this Genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 216-228.
- Mulvey, R. M., & Simor, E. A. (2009). Antimicrobial Resistance in Hospital: How Concerned Should We be?. *Canadian Medical Association or its Licensors*, 180, 408-415.
- Nowak, A., & Kur, J. (1996). Differentiation of seventeen genospecies of *Acinetobacter* by multiplex polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Molecular and Cellular Probes*, 10(6), 405-411.
- Osorio., C. R., Collins, M. D., Romalde, J. L., & Toranzo, A. L. (2005). Variation in 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions in *Photobacterium damsela*: a Mosaic-Like Structure. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 636–645.
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471–3484.
- Puttlerpong, C., Chawanasit, W., Laohawaleesan, W., Rungsang, W., & Ritteverakul, P. (2011). Antimicrobial Use in Hospital-Acquired Pneumonia with Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 6(1), 32-38.
- Reguero, M. T., Medina, O. E., Hernandez, M. A., Florez, D. V., Valenzuela, E. M., & Mantilla, J. R. (2012). Antibiotic resistance patterns of *Acinetobacter calcoaceticos-A. baumannii* complex species from Colombian hospitals. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(3), 142-146.
- Scola, B. L., Gundi, V. A. K. B., Khamis, A., & Raoult, D. (2006). Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (3), 827–832.

- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., Vos, P. D., Claeys, G., & Verschraegen, G. (1995). Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 33(1), 11–15.
- Vattanavanit, V., & Chayakul, P. (2013). *Acinetobacter* Infections in the Intensive Care Unit. *Songkla Med J*, 31(2), 91-100.
- Vila, J., Martí, S., & Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1210–1215.
- Whiley, R.A., Duke, B., Hardie, J. M., & Hall, L. M.C. (1995). Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the *Streptococcus milleri* group. *Microbiology*, 141, 1461-1467.
- Zarrilli, R., Giannouli, M., Popolo, D. A., & Tomasone, F. (2009). Identification of *Acinetobacter* Genomic Species 13TU by Sequence Analysis of the 16S-23S Gene Spacer Region. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 1281-1282.

ภาคผนวก

1. การเตรียม Tris-Acetate (TAE) buffer 50 เท่า (50X)

Tris base	242	กรัม
Glacial Acetic Acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ EDTA	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
ปรับพีเอชให้ได้ 8.5 ด้วย KOH

2. การเตรียม Tris-Acetate (TAE) buffer 1 เท่า (1X) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris-Acetate (TAE) buffer 50 เท่า	20	มิลลิลิตร
-----------------------------------	----	-----------

เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. 1 เปอร์เซ็นต์ อะคราโรสเจล

อะคราโรส	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

4. Tris EDTA buffer (TE) pH 8.0 10 เท่า

1 M Tris-HCl, pH 8.	0.2	มิลลิลิตร
500 mM EDTA, pH 8.0	0.4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	197.6	มิลลิลิตร

5. 0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH8)

di-sodium ethylenediaminetetra-acetate.2H ₂ O	186	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ผสมให้ละลาย แล้วปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ประมาณ 20 กรัม)

6. Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

7. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	3	กรัม
น้ำ	1	ลิตร