วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.1) January – April 2021 บทความวิจัย

การสำรวจเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานโดยพีซีอาร์ด้วยยีนคล้าย *MexA*, *MexB* และ 16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)

PCR for Screening of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* by *MexA, MexB* Like Gene and 16-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)

วิสาตรี คงเจริญสุนทร[1*] และ รดา เตร์ยาซิงห์[2]

Wisatre Kongcharoensuntorn[1*] and Rada Teyasingh[2]

[1] *ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2] *ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 6*

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University*

[2]Reginol Medical science Center 6

Received : 14 May 2020

Revised : 30 June 2020

Accepted : 15 July 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการจำแนกเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน ด้วยยีนคล้าย *MexA* และ *MexB* ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยเปรียบเทียบยีนนี้กับเชื้อฉวยโอกาสอื่น ด้วยวิธี PCR และยืนยันสายพันธุ์ด้วยยีนตำแหน่ง16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่คล้ายยีน *MexA และ MexB* จาก *A. baumannii* ซึ่งพบเฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน และจะไม่พบใน *A. baumannii* ที่ไม่ดื้อยา จากตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาลระยองและโรงพยาบาลชลบุรี ในระหว่างเดือนมีนาคม ถึง ธันวาคม ปี พ.ศ.2559 ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของยีนเหล่านี้ทั้งใน 2 จังหวัด และยีนคล้าย *Mex A* และ *MexB* ที่ค้นพบนี้มีขนาด 1,175 และ 2,300 คู่เบสตามลำดับ ผลการยืนยันสายพันธุ์ด้วย ISR พบว่าเชื้อ *A. baumannii* รวมทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 20 ตัวอย่าง แสดงแถบของ ISR ซึ่งมีขนาด 1,258 คู่เบส ดังนั้นการวิเคราะห์ยีนดื้อยาของ *A. baumannii* ออกจากเชื้อฉวยโอกาสอื่นๆ ด้วยวิธีพีซีอาร์นี้สามารถนำไปใช้ศึกษารูปแบบการวิวัฒนาการของเชื้อดื้อยา รวมถึงการศึกษาอุบัติการณ์การระบาดเพื่อหาแนวทางการรักษาและการป้องกันในอนาคต

คำสำคัญ : *Acinetobacter baumannii* ; ยีนคล้าย *MexA* และ *MexB* ;
16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)

Abstract

This research was aimed to identify *MexA* and *MexB* like gene in *Acinetobacter baumannii* from clinical isolates and compare it among some opportunistic bacteria. The *MexA* and *MexB* gene was analyzed and compared by PCR and confirmed the difference of *A. baumannii* among other species by 16S - 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR). The results of research could amplify both the *MexA* and *MexB* like DNAs from multidrug-resistant *A. baumannii* of which was not found in nondrug-resistant *A. baumannii* among all clinical isolates from Rayong Hospitals and Chonburi Hospital, collected during March to December 2016. Thus, the research was revealed that these *Mex A* and *MexB* like genes dispread in the two provinces, and these genes contained PCR products of 1,175 and 2,300 base pairs, respectively. Also, identification of *A. baumannii* by using ISR primer could indicate that twenty isolates of both multidrug-resistant *A. baumannii* and non multidrug-resistant *A. baumannii* contained 1,258 base pairs of ISR. Thus, PCR could be applied to select out multidrug-resistant *A. baumannii* and discrete from other opportunistic bacteria. This method also included to study evolution of resistant bacteria and incidence of outbreaks for treatment and prevention of *A. baumannii* infection in the future.

Keywords : multidrug resistant ; *Acinetobacter baumannii ; MexA and MexB* like gene ;
16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)

*Corresponding author. E-mail : wisatre@go.buu.ac.th

บทนำ

การระบาดของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* นับเป็นปัญหาสำคัญต่อการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาส (Opportunistic Infection) (Panapakdee, 2014) เชื้อกลุ่มนี้มีอุบัติการณ์การก่อโรคที่รุนแรง เพราะมีความสามารถในการดื้อยาหลายขนานและกลไกก่อโรคหลายแบบ จึงเป็นสาเหตุการตายของผู้ป่วยในโรงพยาบาลอันดับต้นของหลายประเทศ เนื่องจากเชื้อนี้เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน (Lee *et al.,* 2017) *A. baumannii* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแบบ coccobacilli ไม่เคลื่อนที่ (non-motility) มีแคปซูล ไม่หมักน้ำตาล (non-fermenter) เชื้ออยู่ใน family *Moraxellaceae* เมื่อย้อมสีแกรมอาจสับสนกับเชื้อ *Neisseria* spp. หรือ *Moraxella* spp. เชื้อให้ผลบวกกับปฏิกิริยาเอนไซม์คาตาเลส (catalase) และให้ผลลบกับปฏิกิริยาเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) การเจริญเป็นแบบอาศัยออกซิเจนเท่านั้น เชื้อนี้มักพบบ่อยที่สุดในหอผู้ป่วยหนัก (Intensive Care Unit, ICU; Intermediate Care Unit) ก่อโรคปอดอักเสบที่เกิดในโรงพยาบาล (Hospital-Acquired Pneumonia) การติดเชื้อในกระแสเลือด แผลผ่าตัด เยื่อบุช่องท้องอักเสบ เป็นต้น (Hurley, 2016; Lee *et al*., 2017) ดังนั้น *A. baumannii* จึงมีอันตรายสูง หากไม่เฝ้าระวังอย่างทันท่วงที ก็จะมีอัตราการเสียชีวิตสูง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2558 พบรายงานแสดงความไวของเชื้อ *A.baumannii* ต่อยากลุ่ม beta-lactam/beta-lactamase inhibitors และยา imipenem ลดลงเรื่อยๆ (Anunnatsiri & Tonsawan, 2011; Pagdepanichkit, 2016) สำหรับในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2550 ในประเทศไทย แสดงความไวของเชื้อ *A. baumanni* ต่อยา imipenem และ ampicillin/salbactam (ร้อยละ 57 และ 58) ลดลง ตามลำดับ ในขณะที่ความไวต่อยาในกลุ่ม broad-spectrum cephalosporins คือ ceftazidime และ cefipime (ร้อยละ 46 และ 45) ลดลงเช่นกัน (Anunnatsiri & Tonsawan, 2011) ทำให้มีความยากในการตัดสินใจเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาภาวะติดเชื้อ *A. baumannii* ดังนั้นจากข้อมูลการระบาดของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานสูงขึ้นทุกปี (Lee *et al*., 2014; Liu *et al*., 2018) จึงมีความจำเป็นต้องเฝ้าระวังการติดเชื้อเพิ่ม เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจากบุคลากรทางการแพทย์หรือจากเครื่องมือแพทย์สู่ผู้ป่วยไปสู่ชุมชน และหาแนวทางการรักษาต่อไป งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษากลไกการขับยาออกจากเซลล์ชนิดหนึ่งคือ Resistance-nodulation-division (RND) (Ogawa *et al.,* 2012; Li *et al.,* 2015) คือโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์ ที่พบในเชื้อ *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ซึ่งเป็นกลไกที่อันตรายร้ายแรง เพราะทำให้เชื้อฉวยโอกาสเกิดการดื้อยาหลายขนานได้รวดเร็วที่สุด ปัจจุบันมีผู้วิจัยศึกษามากมายเกี่ยวกับยีนดื้อยาที่ใช้กลไกในการขับยาออกจากเซลล์ชนิด RND (Resistance-Nodulation-Division (RND) Family) ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่สามารถขับยาปฏิชีวนะและสารพิษออกนอกเซลล์แบคทีเรีย โดยอาศัยการขับเคลื่อนโปรตอนเข้าเซลล์ และการขับยาและสารพิษออกนอกเซลล์แบคทีเรียโดยผ่านโปรตีน RND transporter ร่วมกับ Periplasmic Membrane Fusion Protein (MFP) และ Outer Membrane Factor (OMF) โดยสามารถขับยาและสารพิษออกนอกเซลล์โดยไม่ต้องใช้ ATP (Wieczorek *et al*., 2008; Yoon *et al*., 2013; Pagdepanichkit *et al*., 2016) โอเปอรอนที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ *MexA* คือกลุ่มยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน RND ใน *P. aeruginosa* ประกอบด้วยยีน MexA ยีน *MexB* ยีน *OprM* กำหนดการสร้างโปรตีนรวมกันสามซับยูนิตเพื่อสร้าง RND (Lister, Wolter & Hanson, 2009) และจากการค้นคว้าจากรูปแบบการดื้อยาและการศึกษายีนชุด RND พบว่ารูปแบบการดื้อยาของ *A. baumannii* ที่ศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายกับรูปแบบการดื้อยาของ

P. aeruginosa และ *A. baumannii* เพราะดื้อยากลุ่ม Carbapenem Quinolone Beta-lactams, Beta-lactamase Inhibitor Macrolide แต่ไม่ดื้อยา tigecycline (Blair & Piddock, 2009; Li *et al.,* 2015) ซึ่งแตกต่างจากยีนกลุ่ม RND คือ *Ade*ABC ที่ค้นพบใน *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา Tigecycline , reserpine และ carbonyl cyanide (Yoon *et al.,* 2013; Pagdepanichkit *et al.,* 2016) งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาเบื้องต้นในการหาอุบัติการณ์ของการค้นหายีน RND ของ *A. baumannii* นอกเหนือจากยีน *Ade*ABC (Wieczorek et al., 2008) โดยการออกแบบคู่ไพรเมอร์ยีน *MexA และ MexB* ให้จำเพาะต่อยีนดื้อยาของ *A. baumannii* จากฐานข้อมูลยีนของ *P. aeruginosa* และแบคทีเรียอื่นๆ (Minagawa *et al.,* 2012) ร่วมกับปัจจุบันนักวิจัยได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อใช้ระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* อย่างรวดเร็วโดยใช้ เอ็นเอบริเวณยีน 16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) (Ko *et al.,* 2008; Soo *et al*., 2013) เพราะปัญหาการดื้อยาหลายขนานนี้ ทำให้ต้องพัฒนาวิธีตรวจเชื้อที่แม่นยำและรวดเร็ว เพราะในปัจจุบันยังไม่การตรวจสายพันธุ์ควบคู่ไปกับการตรวจหายีนดื้อยาหลายขนาน เพื่อสะดวกในการวินิจฉัยเชื้อ และการให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอย่างถูกต้อง และรวดเร็วในการวางแผนการรักษาก่อนที่เชื้อจะกลายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยา

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการพบยีนดื้อยาชนิด RND ที่ใช้ในการขับยาออกจากเซลล์ ในเชื้อ *A. baumannii* จากสิ่งส่งตรวจควบคู่กับการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ยีนคล้าย *MexA* และ *MexB* ร่วมกับการจำแนกสายพันธุ์ของ *A. baumannii* ด้วยดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) โดยไม่ต้องทำการเพาะเชื้อ เพียงเก็บตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจและตรวจดีเอ็นเอจากผู้ป่วยโดยตรง

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย

A. baumannii จำนวน 19 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่รักษาในโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลระยอง จังหวัดระยอง ในช่วงเวลาตั้งแต่ เดือนมีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 แบ่งเป็น *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา (multidrug resistance (MDR) 10 ไอโซเลต และ *A. baumannii* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา non- multidrug resistance (non-MDR) จำนวน 9 ไอโซเลต และสายพันธุ์มาตรฐาน คือ *A. baumannii* ATCC 17978 ระบุสายพันธุ์ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีจากห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล และนำไปศึกษารูปแบบการดื้อยาด้วยวิธี agar disk diffusion method (CLSL, 2017)

เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *K. pneumoniae* ดื้อยา 2 ไอโซเลต, *E. coli* ดื้อยา 2 ไอโซเลต, *P. aeruginosa* ดื้อยา 2 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยที่รักษา ณ โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา 2 ไอโซเลต โดยทั้งหมดอยู่ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 นำมายืนยันสายพันธุ์เบื้องต้นด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี จากนั้นเลี้ยงเชื้อทั้งหมดใน NA (nutrient agar) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการทดสอบขั้นต่อไป

การสกัด Chromosomal DNA

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มาปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำเซลล์แบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 BACTERIAL DNA EXTRACTION Kit (Vivantis, U.S.A) มีขั้นตอน คือ เติม buffer R1 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Lysozyme 10mg/ml 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 20 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตกโดยการทำลายผนังเซลล์ (cell wall lysis) จากนั้นเติม Proteinase K 20 mg/ml 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C 20 นาที และเติม RNase 20 mg/ml 10 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C 5 นาที เพื่อทำลายโปรตีนและ RNA ตามลำดับ จากนั้นเติม BG buffer 2 volume บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C 10 นาที เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอ แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol 200 ไมโครลิตร จากนั้นจึงแยกดีเอ็นเอออกจากสิ่งปนเปื้อนที่เหลือ เช่น RNA โดยนำไปโหลด (load) ใส่ลง spin column ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และล้างดีเอ็นเอให้สะอาด โดยปั่นเหวี่ยง 10000xg 1 นาที 2 ครั้ง ด้วย wash buffer จากนั้นจึงชะดีเอ็นเอออกมา ด้วย DNase/RNase-Free Distilled Water 100 ไมโครลิตร เก็บใน microtube ขนาด 1.5 ml ได้ดีเอ็นเอปริมาตรสุทธิประมาณ 2-3 ไมโครกรัม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ไพรเมอร์

ออกแบบจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ไพรเมอร์ คู่ที่ 1 คือ *MexAF* และ *MexAR* : คู่ที่ 2 คือ *MexBF* และ *MexBR* ซึ่งเป็นไพรเมอร์ ทั้งสองคู่ ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน (conserve sequence) *MexA* และ *MexB* ของ *P. aeruginosa* และกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนต่างๆ ที่คล้ายกับของ *A. baumannii* จากฐานข้อมูล GenBank ออกแบบด้วยโปรแกรม Primer 3 และ Primer-BLAST เมื่อได้ primer ทั้ง 2 คู่ (แสดงดังตารางที่ 1) จึงนำไปเปรียบเทียบความเหมือน (% homology) กับ Reference strain คือ *P. aeruginosa* PAO1 (mexB MDR protein, NC002516.2) และ *A. baumannii* ATCC 17978 และส่วนไพรเมอร์ ISR (แสดงดังตารางที่ 1) ทำการปรับปรุงจากโพรบของ Ko *et al*. (20008) เพื่อใช้ระบุสายพันธุ์และแยกความแตกต่างของ *A. baumannii* กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ 3 คู่ที่ใช้ในการวิเคราะห์หา *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน (สังเคราะห์จากบริษัท Biodesign, Thailand)

ชื่อไพรเมอร์	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ** Sequence (5'-3')	**ค่าTm**	**%GC**	**ขนาดของผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)**
คู่ที่ 1 *MexAF*	CAG CAG CTC TAC CAG ATC GAC	58.73	55	1,175
คู่ที่ 1 *MexAR*	TTC GGT AAC CAG CCA CTT GT	58.72	50	
คู่ที่ 2 *MexBF*	AGG TCC AGG TGC AGA ACA AG	58.73	55	2,300
คู่ที่ 2 *MexBR*	GGA ATC GAC CAG CTT TCG TA	58.72	50	
คู่ที่ 3 ISR 2F	TTG TAC ACA CCG CCC GTC	59.95	61	1,258
คู่ที่ 3 ISR 10R	TTC GCC TTT CCC TCA CGG TA	63.57	55	

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน MexA MexB และ 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ยีน MexA และ MexB : ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของยีน *MexA* และ *MexB* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ 2 คู่ ได้แก่ ยีน *MexA* ใช้ forward primer *MexAF* และ reverse primer *MexAR* และ ยีน *MexB* ใช้ forward primer *MexBF* และ reverse primer *MexBR* (สังเคราะห์จากบริษัท Biodesign, Thailand แสดงดังตารางที่ 1) ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 23 µl ประกอบด้วย 10X buffer, 10 mM dNTPs, 25 mM $MgCl_2$, 30 µM MexB primer, 5 unit *Taq* DNA polymerase (Immolase DNA polymerase 5U/ul, Bioline), nuclease water และ 5 µl template ดีเอ็นเอ และใช้, Negative control คือ Mastermix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA, Positive control (PC) คือ Mastermix ที่เติม DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยาเป็นชุดเปรียบเทียบ แล้วเพิ่มปริมาณ *MexA* ดีเอ็นเอ และ *MexB* ดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง PCR (My cycler, BIORAD,USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้ (1) Initial Denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที (2) PCR cycle ประกอบด้วย Denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 45 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ จำนวน 35 รอบ และ(3) Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอ ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ด้วยเครื่อง Gel documentation machine, ECX-20-M (Viber lourmat, France) และตัดเจลออกมาทำให้บริสุทธิ์ และนำไปทำ sequencing โดยบริษัท Bio Basic Inc. (Markham, Canada) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน (%homology) ด้วยโปรแกรม BLASTN (https://blastn.ncbi.nim.nih.gov/ และ bioedit)

ISR : ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ISR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สามารถจับบริเวณ ISR ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน 16S *rRNA* กับ 23S *rRNA* (คู่ไพรเมอร์ ISR 2F และ ISR 10R) (Ko *et al.,* 2008) แสดงในตารางที่ 1 ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 23 µl ประกอบด้วย 10X buffer, 10 mM dNTPs, 25 mM $MgCl_2$, 30 µM ISR primer, 5 unit *Taq* DNA polymerase (Immolase DNA polymerase 5U/ul, Bioline), nuclease water และ 5 µl template ดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ ISR ดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง PCR machine (My cycler, BIORAD,USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้ (1) Initial Denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที (2) PCR cycle ประกอบด้วย Denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 45 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ จำนวน 35 รอบ และ(3) Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอ ด้วย 2% agarose gel electrophoresis และวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ *MexA* และ *MexB*

ผลการวิจัย

การศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา และไม่ดื้อยาจากสิ่งตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยในแผนก ICU unit ของโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง จังหวัดระยอง จะใช้หลักการจำแนกเชื้อ MDR โดยพบคุณสมบัติการดื้อยาอย่างน้อย 3 กลุ่มจากกลุ่มยา 5 กลุ่ม ได้แก่ ดื้อยายาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่ม Aminoglycisides, ยาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มยา β-lactam, ยาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มยา Quinolone, ยาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มยา Polymyxin, หรือยาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มยา Carbapenem ผลการวิจัยจากตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii*

ที่สุ่มเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2559 จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่า *A. baumannii* เป็นเชื้อไม่ดื้อยา 10 สายพันธุ์ (รวมเชื้อ *A. baumannii* ATCC 17978) และเป็นเชื้อดื้อยาทั้ง 10 สายพันธุ์นี้ มักจะดื้อยาในกลุ่มยา aminoglycosides มากที่สุด และดื้อยาบางกลุ่ม ได้แก่ β-lactams, carbapenem, quinolone ส่วน *A. baumannii* ที่ไม่ดื้อยา ยังคงไวต่อยา colistin และ gentamycin แสดงดังตารางที่ 2

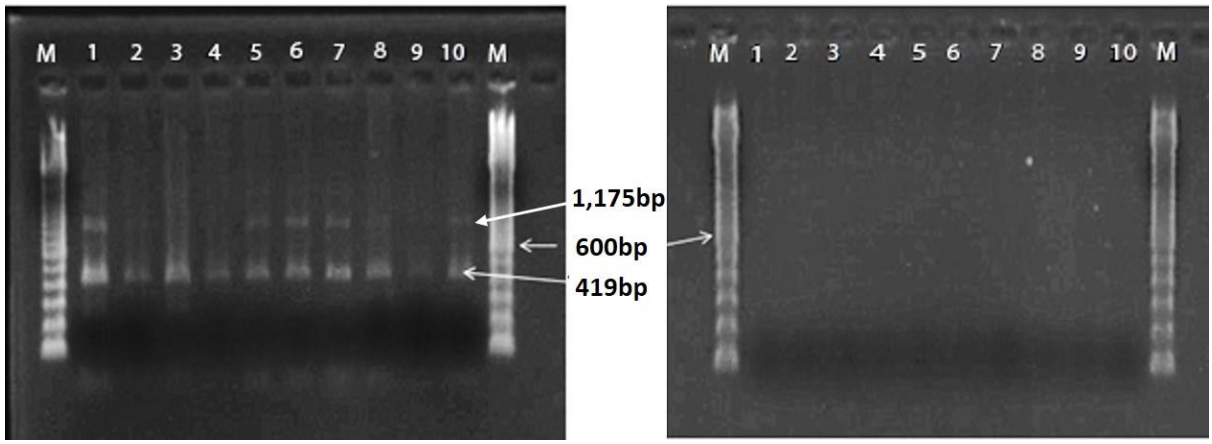
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* 20 สายพันธุ์ต่อยาต้านจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

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-R)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab7	(MDR-R)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab8	(MDR-R)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Ab9	(MDR-R)	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
Ab10	(MDR-R)	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
Ab11*	(non-MDR-C)	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
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
Ab16	(non-MDR-R)	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S
Ab17	(non-MDR-R)	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S
Ab18	(non-MDR-R)	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S
Ab19	(non-MDR-R)	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S
Ab20	(non-MDR-R)	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S

Ab: *Acinetobacter baumannii*, Ab11* *A. baumannii* ATCC 17978, CRO: ceftriaxone, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, SCF: Cefoperazone/sulbactam, TZP: tazobactam/piperacillin, IPM: imipenem, MEM: meropenem, ETP: ertapenem , CL: colistin, CIP: ciprofloxacin, AK: amikacin, GEN: gentamycin, เชื้อไวต่อยา (S; susceptible), เชื้อดื้อปานกลาง (I; intermediate resistance) และ เชื้อดื้อต่อยา (R; resistant), MDR-C:Multidrug resistance Chonburi Hospital, non-MDR-C: non-Multidrug resistance Chonburi Hospital, MDR-R:Multidrug resistance Rayong Hospital, non-MDR-R:non-Multidrug resistance Rayong Hospital

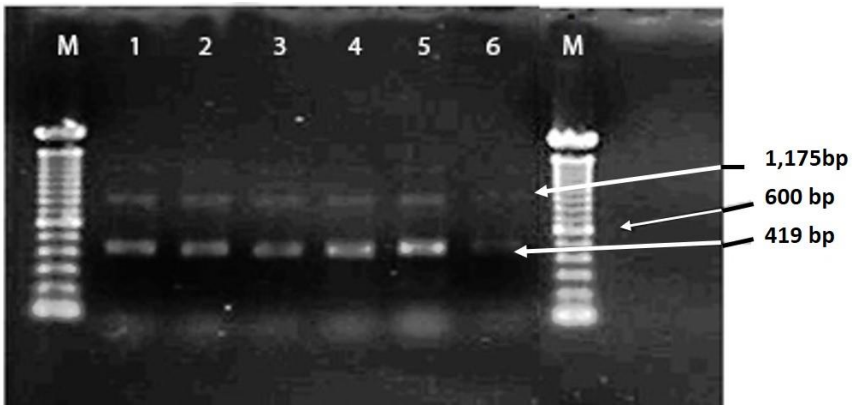
ผลการตรวจหาอุบัติการณ์ และคัดกรองเชื้อ A. baumannii ด้วยยีนคล้าย MexA

สามารถยืนยันผลการใช้ยีนคล้าย *MexA* เพื่อตรวจหาอุบัติการณ์ และคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา ออกจากกลุ่มเชื้อที่ไม่มียีนดื้อยาจำนวน 10 ตัวอย่าง (*A. baumannii* จากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง จำนวนอย่างละ 5 ตัวอย่าง) โดยแสดงผลการวิเคราะห์ ในภาพที่ 1A lane 1-10 พบแถบดีเอ็นเอของยีนคล้าย *MexA* จากเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา ซึ่งมีขนาด 1,175 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะขนาด 419 คู่เบส (ตรวจพบยีน *MexA* ทั้ง 10 ไอโซเลท จากเชื้อ *A. baumannii* 10 ไอโซเลท คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) และไม่พบยีนคล้าย *MexA* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ดื้อยา (ภาพที่ 1 B lane 1-10) และงานวิจัยนี้ยังพบการกระจายตัวของยีน *MexA* ในสิ่งส่งตรวจ ในเขตจังหวัดชลบุรีและระยอง และเมื่อนำ PCR



(A) (B)

ภาพที่ 1 เปรียบเทียบ *MexA* PCR product ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาจากโรงพยาบาลสองแห่ง จำนวน 10 ไอโซเลท (ภาพที่ 1A) เชื้อจากโรงพยาบาลชลบุรี (เลนส์ที่ 1-5) และเชื้อจากโรงพยาบาลระยอง (เลนส์ที่ 6-10) พบแถบ 1,175 และ 419 คู่เบส และเปรียบเทียบกับแถบ *MexA* DNA ของเชื้อที่ไม่ดื้อยา จำนวน 10 ไอโซเลท (ภาพที่ 1B) *A. baumannii* ATCC 17978 (เลนส์ที่ 1) และ *A. baumannii* ที่ไม่ดื้อยา จำนวน 9 ไอโซเลท จากโรงพยาบาลชลบุรี (เลนส์ที่ 2-5) และโรงพยาบาลระยอง (6B-10B) ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีPCR และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์, lane M: 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (ไม่ได้แสดง control PC และ NC)

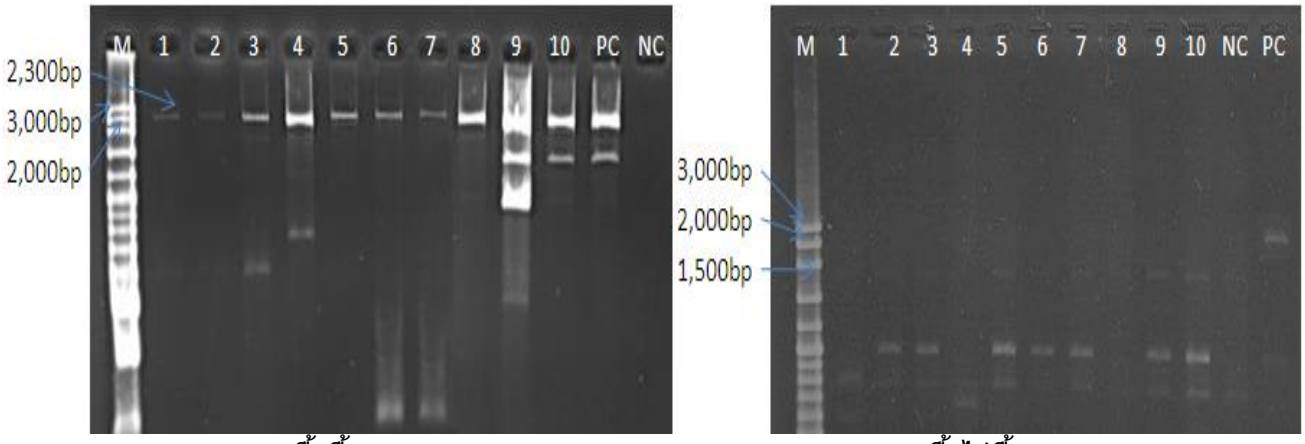


ภาพที่ 2 *MexA* PCR product ของเชื้ออื่นๆที่ดื้อยา วิเคราะห์ด้วยวิธี PCR lane M: 100 bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-2 เชื้อ *K. pneumoniae*, หมายเลข 3-4 เชื้อ *P. aeruginosa*, หมายเลข 5-6 เชื้อ *E. coli* พบแถบ 1,175 และ 419 คู่เบส ของยีน *MexA* ของเชื้อดื้อยาทั้ง 6 ไอโซเลต

product ไปยืนยันผลด้วยการ sequencing พบว่า PCR product ขนาด 1,175 คู่เบส มีความคล้ายคลึงและใกล้ชิดมากที่สุดกับยีนดื้อยา กลุ่ม resistance-nodulation division (RND) ของ *A. baumannii* MDR-ZJ06 CP001937.1 และของ *A. baumannii* 1656-2 strain 29108 (CP001921.1) มี% homology เท่ากันคือ 99% และเมื่อศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ของยีนคล้าย *MexA* เพื่อใช้แยกเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน ออกจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งแสดงดังภาพที่ 2 lane 1-10 พบว่าเชื้อกลุ่มอื่นที่ดื้อยาหลายขนานก็ตรวจพบยีนคล้าย *MexA* ได้แก่ *E. coli, K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* เช่นเดียวกัน (พบดีเอ็นเอขนาด 1,175 คู่เบส และขนาด 419 คู่เบส)

ผลการตรวจหาอุบัติการณ์ และคัดกรองเชื้อ A. baumannii ด้วยยีนคล้าย MexB

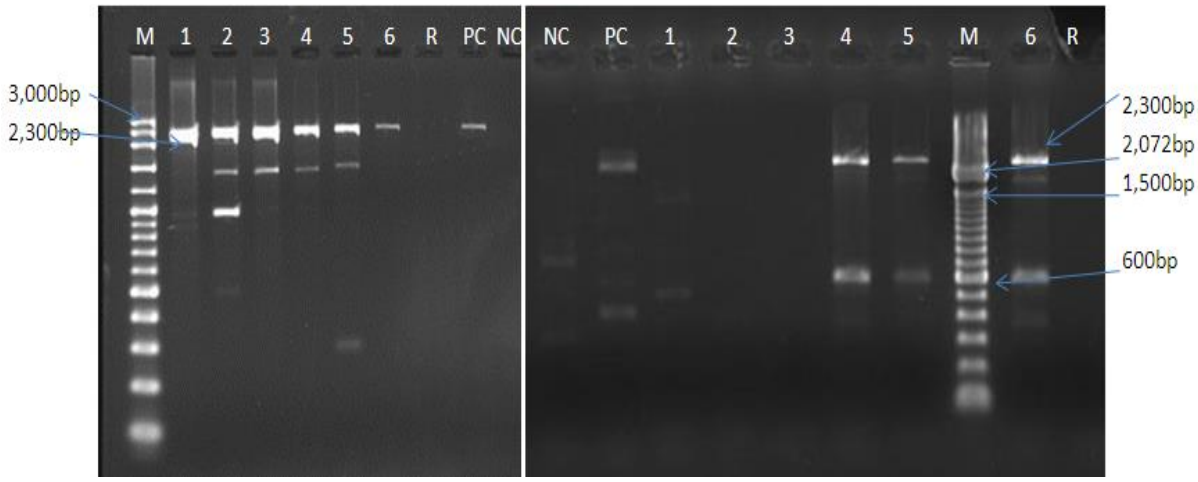
สามารถตรวจพบยีนคล้าย *MexB* ขนาด 2,300 คู่เบส เฉพาะในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน (ภาพที่ 3A lane 1-10) และไม่พบยีนคล้าย *MexB* ในกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ดื้อยา (ภาพที่ 3B lane 1-10) และเมื่อนำ PCR product ไปไปหาลำดับเบส เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนคล้าย *MexB* พบว่าเหมือนกับยีนของเชื้อ *A. baumannii* strain A85 plasmid pA85-3 clone GC1 AbaR4 resistance island (NC_002516.2) 100% และมีลำดับเบสที่คล้ายกับลำดับเบสของ *A. baumannii* strain ABO30 (NZ_CP009257.1) 95% และคล้ายกับ *A. baumannii* strain A85 ที่ดื้อยา (KC118540.6) 85% ตามลำดับ



(A เชื้อดื้อยา) **(B เชื้อไม่ดื้อยา)**

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบผล PCR product ของยีน *MexB* DNA ของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาและไม่ดื้อยา จำนวนอย่างละ 10 ไอโซเลท ภาพที่ 3A เชื้อจากโรงพยาบาลชลบุรี lane 1-5 และ lane 6-10 จากโรงพยาบาลระยอง แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ (A) lane M: VC 100bp plus DNA ladder (Vivantis), หมายเลข 1-10A พบแถบ 2,300 bp ของยีน *MexB* ของ *A. baumannii* ดื้อยาทั้ง 10 ไอโซเลท, ภาพที่ 3B lane M: VC 100bp plus DNA ladder (Vivantis), lane 1 *A. baumannii* ATCC 17978 และ lane 2-10 คือ *A. baumannii* ที่ไม่ดื้อยาทั้ง 9 ไอโซเลท (ไม่พบแถบ 2,300 bp ของยีน *MexB*), Negative control (NC) คือ Mastermix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA, Positive control (PC) คือ Mastermix ที่เติม DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยา)

เมื่อศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ของยีนคล้าย *MexB* โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาสายพันธุ์ต่างๆ ผลการตรวจแสดงให้เห็นว่ามีการพบยีนคล้าย *MexB* ชนิดนี้เช่นดียวกันในเชื้อ *P. aeruginosa*, *K. pneunoniae*, *E. coli* แต่ไม่พบยีนคล้าย *MexB* ในเชื้อกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ MRSA และ *P. aeruginosa* ที่ไม่ดื้อยา แสดงดัง ภาพที่ 4

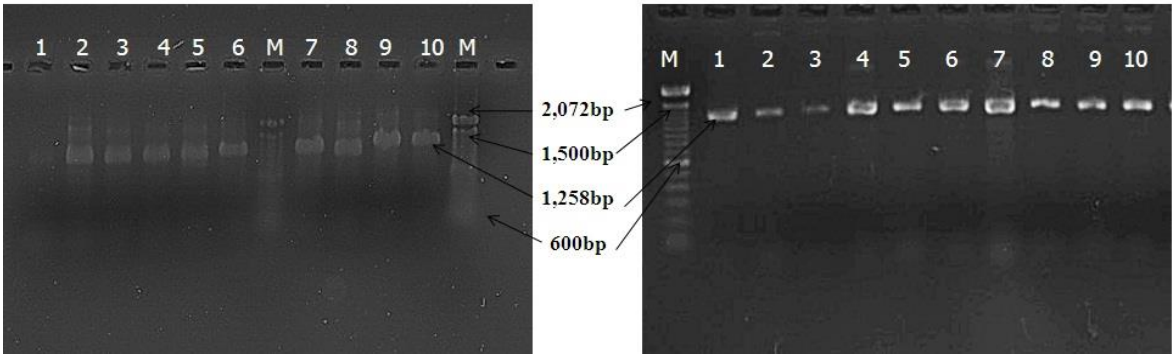


(A) (B)

ภาพที่ 4 ผลการสำรวจหายีน *MexB* DNA จากเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสดื้อยาและไม่ดื้อยาจากโรงพยาบาลสองแห่ง คือ โรงพยาบาลชลบุรี (A) และโรงพยาบาลระยอง (B) แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4A) lane M: VC 100 bp plus DNA ladder (Vivantis), หมายเลข 1-2 คือเชื้อ *K. pneumoniae*, หมายเลข 3-4 เชื้อ *P. aeruginosa*, หมายเลข 5-6 เชื้อ *E. coli* ทั้งหมดพบแถบ 2,300 bp ของยีน *MexB* DNA ของเชื้อดื้อยาทั้ง 6 ไอโซเลต, lane R: Master mix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA template, (ภาพที่ 4B) lane M:100bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-3 เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ไม่พบแถบ 2,300 bp ของยีน *MexB* DNA, หมายเลข 4-6 เชื้อ *P. aeruginosa* พบแถบ 2,300 คู่เบส ของยีน *MexB* DNA ของเชื้อดื้อยาทั้ง 3 ไอโซเลต, lane R : Master mix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA template , Negative control (NC) คือ Mastermix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA, Positive control (PC) คือ Mastermix ที่เติม DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยา)

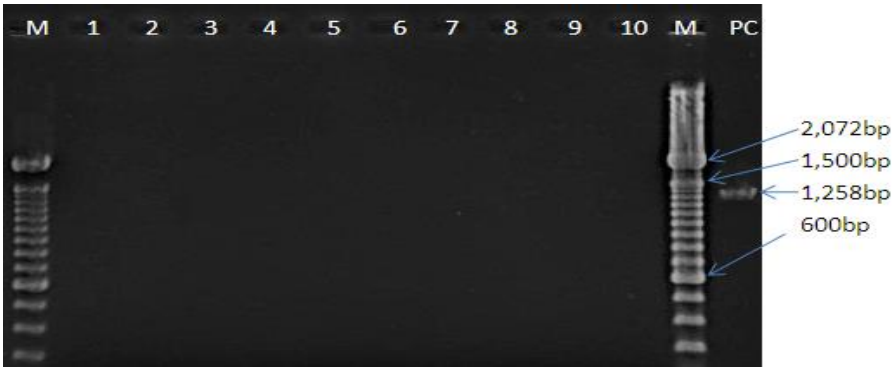
ผลการตรวจวิเคราะห์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ด้วยลำดับเบสระหว่าง 16-23s rRNA (ISR)

A. baumannii รวมทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 20 ตัวอย่าง แสดงแถบของ ISR ซึ่งมีขนาด 1,258 คู่เบส โดยตรวจพบทั้งในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยองตามลำดับ (ดังภาพที่ 5A และ 5B) และ ISR สามารถใช้ระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* เพื่อคัดแยกออกจากเชื้อกลุ่ม Enterobacteraceae เช่น *K. pneumoniae* , *P. aeruginosa* และ MRSA (ภาพที่ 6) ซึ่งจะไม่พบแถบขนาด 1,258 คู่เบส และเมื่อนำแถบ PCR product ของ ISR ไป ยืนยันผลโดยการหาลำดับเบส และเปรียบเทียบกับ *A. baumannii* ATCC 17978 (CP000521.1) มีความคล้ายกันเท่ากับ 96% และเทียบกับ *A. baumannii* strain 29108 DQ108594.1 มีความคล้ายกันเท่ากับ 99%



(A) (B)

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบ ISR PCR product ของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา (หมายเลข 1-5 A และ1-5 B ที่ได้จากโรงพยาบาลชลบุรี และไม่ดื้อยา (หมายเลข 6-10 A และ6-10 B ที่ได้จากโรงพยาบาลระยอง ซึ่งทั้งหมดเก็บตัวอย่างระหว่างมีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 วิเคราะห์ด้วยวิธี PCR แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ (A) lane M:100bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-10 พบแถบ 1,258 คู่เบส ของยีน ISR DNA ของ *A. baumannii* ดื้อยาและไม่ดื้อยาทั้ง 10 ไอโซเลต, (B) lane M:100 bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 11-20 พบแถบ 1,258 bp ของยีน ISR DNA ของ *A. baumannii* ดื้อยาและไม่ดื้อยาทั้ง 10 ไอโซเลต



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบ ISR PCR product ของเชื้ออื่นๆที่ดื้อยา (หมายเลข 1-6) จากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง (หมายเลข 7-10) แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ lane M:100 bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-2 เชื้อ *K. pneumoniae*, หมายเลข 3-4 เชื้อ *P. aeruginosa*, หมายเลข 5-6 เชื้อ *E. coli*, หมายเลข 7-8 เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), หมายเลข 9-10 เชื้อ *P. aeruginosa* ไม่พบแถบ 1,258 คู่เบสของยีน ISR ของเชื้อดื้อยาทั้ง 10 ไอโซเลต (Positive control:MDR *A. baumannii*)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัยจากการวิเคราะห์รูปแบบของการดื้อยาด้วย antibiogram แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่สุ่มตรวจและแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลชลบุรี และโรงพยาบาลระยอง เป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานที่ดื้อยาในเกือบทุกชนิดที่ใช้รักษา ได้แก่กลุ่มยา betaLlactams, carbapenem, aminoglycosides, quinolone และดื้อต่อยา meropenem (100% จาก 20 สายพันธุ์) และเชื้อ *A. baumannii* มีแนวโน้มจะดื้อต่อยา colistin อย่างไรก็ตามควรทดสอบ หาค่า MIC ของ colistin ด้วยวิธี Broth dilution susceptibility test เพื่อยืนยันผลการวิจัยต่อไป และถ้า *A. baumannii* บางสายพันธุ์ดื้อต่อยา colistin ก็จะสนับสนุนรายงานวิจัยที่พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เริ่มดื้อต่อยากลุ่ม polymycin (colistin) ที่เป็นยากลุ่มที่เหลืออยู่ที่ยังสามารถใช้รักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานในปัจจุบัน (Puttilerpong *et al*., 2011; Lee *et al*., 2014; Liu *et al*., 2018) ดังนั้นควรตระหนักถึง เพื่อหาแนวทางในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ต่อไป เช่น การใช้ยา polymycin ร่วมกับ netropsin เพราะเป็นยากลุ่มสุดท้ายที่ยังคงใช้รักษาได้ผลดีในปัจจุบัน (Lee *et al*., 2017)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ 2 คู่คือ คู่ *MexAF-MexAR* และ คู่ *MexBF- MexBR* นี้สามารถนำมาใช้คัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานได้ เพราะสามารถตรวจพบยีนคล้าย *MexA* ขนาด 1,175 คู่เบส และยีนคล้าย *MexB* ขนาด เอ 2,300 คู่เบส ใน *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน (ซึ่งจะตรวจไม่พบยีน *MexA* และ *MexB* จากเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ดื้อยา 9 ไอโซเลท และเชื้อมาตรฐาน *A. baumannii* ATCC 17978 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) และสามารถตรวจพบการแพร่กระจายของยีนคล้าย *MexA* และ *MexB* นี้ ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาในสองเขตจังหวัดคือชลบุรีและระยอง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (สำรวจจำนวน *A. baumannii* ดื้อยา 10 ไอโซเลท พบยีนคล้าย *MexA* และ *MexB* 10 ไอโซเลท) อย่างไรก็ตามการสำรวจนี้ยังคงเป็นเพียงการศึกษาเริ่มต้น เพราะใช้ตัวอย่างน้อยเพียง 19 ไอโซเลทเท่านั้น การศึกษาอุบัติการณ์ควรเพิ่มจำนวนสิ่งตัวอย่างขนาดใหญ่ เพื่อให้การวิจัยน่าเชื่อถือ และในการทำ PCR นี้ ได้สำรวจพบยีนคล้าย *MexA* และ *MexB* ในกลุ่มเชื้อดื้อยาสายพันธุ์อื่นๆ (เพราะพบแถบดีเอ็นเอของ *MexA* ขนาด1,175 คู่เบส และขนาด 419, 500, 1000, 1500 คู่เบส และใน *MexB* พบขนาด 600 คู่เบส) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อดื้อยาจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ต่างก็มียีนกลุ่ม RND ที่มีความคล้ายคลึงกันกับ *A. baumannii* ที่นำมาศึกษา จึงต้องทำการพิสูจน์โดยการนำลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเหล่านี้ (419, 500, 600 1000, 1500 คู่เบส) ไปหาลำดับเบส และนำลำดับเสไปเปรียบเทียบกับยีนดื้อยากลุ่ม RND ชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล GEnBank ต่อไป หรืออาจจะต้องปรับ condition ของ PCR ให้เหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตามการพบแถบดีเอ็นเอของยีนคล้าย *MexA และ MexB* ที่ไม่จำเพาะอาจจะแสดงถึงความผันแปรของยีนดื้อยาในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ หรืออาจแสดงถึงประสิทธิภาพของไพรเมอร์คู่ *MexAF- MexAR* และ *MexBF-MexBR* ซึ่งยังออกแบบไม่จำเพาะ (แม้จะออกแบบมาจากบริเวณ conserve sequence ของยีน กลุ่ม RND และของ *P. aeruginosa* เป็นต้นแบบ) ทำให้พบแถบดีเอ็นเอที่เป็น non- specific PCR product ในแบคทีเรียดื้อยาชนิดอื่นๆ ที่นำมาศึกษา และจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนคล้าย *MexA* จากเชื้อ *A. baumannii* ที่ศึกษาในครั้งนี้ มีความคล้ายคลึงกับยีนดื้อยา *AdeABC* ของ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Tigecycline (Lee *et al.,* 2014; Pagdepanichkit *et al*., 2016) เป็นต้น และยีนคล้าย *MexA* ที่แยกได้นี้เป็นยีนที่สัมพันธ์กับ *AdeABC* ในสายวิวัฒนาการ (% homology คือ 77%) (ไม่ได้แสดงผล phylogenic tree)

ผลการจำแนกสายพันธุ์ *A. baumannii* ด้วยไพรเมอร์ ISR ด้วยไพรเมอร์คู่ ISR 2F-ISR 10R แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์ทั้งสองนี้มีความแม่นยำ เพราะสามารถใช้แยกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อแกรมบวกและแกรมลบสายพันธุ์อื่นๆ อาทิเช่น *P. aeruginosa*, *K. pneunoniae*, *E. coli* ดื้อยา และแยกออกจาก MRSA และ *P. aeruginosa* ที่ไม่ดื้อยาและเมื่อนำ PCR product ของ ISR ไปเปรียบเทียบกับ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐานได้แก่ *A. baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* 25001 CMCC (B) และ *A. baumannii* 29108 CMCC (B) พบ % homology อยู่ในช่วง 98-99 % และ ลำดับเบสของ PCR product อยู่บนแผนที่ยีน *rRNA* Operon ของ *A. baumannii* ระหว่างลำดับเบสที่ 478-1391 คู่เบส (Gürtler & Stanisich, 1996) (ไม่ได้นำเสนอในงานวิจัยนี้) จึงสามารถยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจอย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วกว่าการเพาะเชื้อและใช้เทคนิคทางชีวเคมี และคู่ไพรเมอร์ ISR นี้ทำให้ทราบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนอกยีน *rRNA* มีขนาด 1,258 คู่เบส

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสามารถพัฒนาเทคนิคตรวจจำแนกสายพันธุ์ของ *A. baumannii* ที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียดื้อยา แยกออกจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆที่ไม่ดื้อยา ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ไพรเมอร์หายีนดื้อยาที่คล้าย *MexA* และ ยีน *MexB* และไพรเมอร์ ISR แต่ยังคงเป็นงานวิจัยในขั้นต้น (pilot study) เพื่อให้การจำแนกสายพันธุ์ของ *A. baumannii* มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น ควรเพิ่มตัวอย่างให้ขนาดใหญ่ขึ้น เช่น จำนวน 100-200 ตัวอย่าง การพัฒนาการตรวจด้วยวิธีนี้อาจจะมีประโยชน์ เพื่อนำไปใช้จำแนกและคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน ออกจากเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสกลุ่มอื่นๆ ได้ เช่น กลุ่ม *Enterobacteriaceae* ซึ่งก็จะช่วยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ได้อย่างรวดเร็ว และเพื่อทำการรักษาได้อย่างทันท่วงที เพื่อลดอุบัติการณ์การดื้อยา โดยไม่ต้องรอผลการใช้วิธีเพาะเชื้อและวิธีทางชีวเคมี หรือการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ หรือสามารถนำไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่นี้มาใช้ตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา ควบคู่กับการตรวจทางชีวเคมี

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายขนาน เพื่อแยกออกจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆที่ไม่ดื้อยาด้วยการใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ คู่ *MexAF-MexAR* และ คู่ *MexBF- MexBR* เพื่อหายีนคล้าย *MexA* และ ยีน *MexB* ควบคู่กับการจำแนกสายพันธุ์ *A. baumannii* ด้วยไพรเมอร์ ISR และพบอุบัติการณ์การแพร่กระจายของเชื้อนี้ในจังหวัดชลบุรีและระยอง ในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังคงเป็นเพียงการศึกษาเริ่มต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลระยอง จังหวัดระยอง และภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 6 จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Anunnatsiri, S., & Tonsawan, P. (2011). Risk factors and clinical outcomes of multidrug-resistance *Acinetobacter baumannii* bacterimia at a University Hospital in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, *42* (3), 693-703.

Blair, J. M., & Piddock, L.J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram- negative bacteria: an update, *Current Opinion in Microbiology*, *12* (5), 512–519.

CLSL. (2017). Performance standards for antibacterial susceptibility testing. 27th ed. CLSL supplements M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Hurley, J.C. (2016). World-wide variation in incidence of *Acinetobacter* associated ventilator associated pneumonia: a meta-regression. BMC Infectious Diseases, 16, 577, (DOI 10.1186/s12879-016-1921-4).

Ko, W.C., Lee, N.Y., Su, S.C., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, 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.

Lee, S.Y., Shin, J.H., Park, K.H., Kim, J.H., Shin, M.G., Suh, S.P., & Ryang, D.W. (2014). Identification, genotypic relation, and clinical features of colistin-resistant isolatates of *Acinetobacter* genomic species 13BJ/14TU from bloodstreams of patients in a university hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(3), 931-939.

Lee, C.R. Lee, J.H., Park, M., Park, K.S. , Bae, K., Kim, Y.B., Cha, C.K., Jeong, B.C., & Lee , S.H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 1-35.

Li, X. Z., Plesiat, P. & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(2), 337-418.

Lister, D. P., Wolter J. D., & Hanson D. N. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology reviews*, *22* (4), 528-610.

Liu, C., Chang, Y., Xu, Y., Luo, Y., W, L., Mei, Z., Li, S., Wang, R. & Jia, X. (2018). Distribution of virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Oncotarget*, *9*(31), 21663-21673.

Minagawa, S., Inami, S., Kato, T., Sawada, S., Yasuki, T., Miyairi, S., Horikawa, M., Okuda, J., & Gotoh, N. (2012). RND type efflux pump system *MexAB-OprM* of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiology*, *12* (70), 1471-2180.

Ogawa, W., Onishi, M., Ni, R., Tsuchiya, T., & Kuroda, T. (2012). Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. *Gene*, *498*(2), 177–182.

Pagdepanichkit , S., Tribuddharat C., & Chuanchuen R. (2016) Distribution and expression of the Ade multidrug efflux systems in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, *62*(9) 794-801.

Puttilerpong, C., Chawanasit, W.,Laohawaleesan, W, Rungsang, W., Ritteeverkul, P. & (2011). Antimicroial 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. (in Thai)

Wieczorek, P., Sacha, P.,.Hauschild, T.,Zórawski, M., Krawczyk, M., & Tryniszewska, E. (2008). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Foloa Histichemica et Cytochemica, *46*(3), 257-267.