

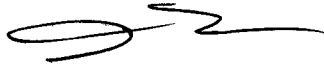
การสำรวจเชื้อ *Acinetobacter baumannii* คือยาหลายขนานด้วยยีน *MexB* และ  
16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)

รดา เตร์ยาชิงห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
กันยายน 2560  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

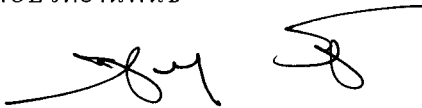
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ รดา เตร์ยาซิงห์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

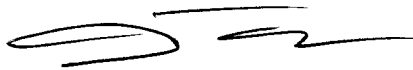


..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



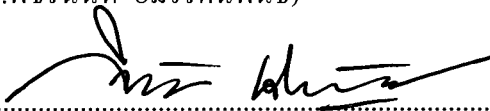
..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร)



..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร)

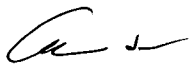


..... กรรมการ  
(ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)



..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา



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

วันที่ 1 เดือน กันยายน พ.ศ. 2560

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความและกรุณาจากคณาจารย์หลาย ๆ ท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ให้ความรู้ ให้อำนาจ ให้อำนาจใจ ตลอดจนแนวทางการทำงาน จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลาและกรุณาให้คำแนะนำและความรู้เพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงให้ถูกต้อง และให้คำแนะนำในการต่อยอดองค์ความรู้ที่มี ให้เกิดประโยชน์อันสูงสุด

ขอขอบคุณ ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลาและกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลาและกรุณาให้คำแนะนำและความรู้เพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี คณะผู้บริหารและเจ้าหน้าที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความกรุณาในการให้เวลาสำหรับโอกาสในการศึกษาต่อ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณ ครอบครัวยาชิงห์ ที่คอยให้กำลังใจและความห่วงใย เป็นแรงผลักดันที่สำคัญยิ่ง ให้มีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้อำนาจและกำลังใจระหว่างเรียนและทำวิทยานิพนธ์ และมอบมิตรภาพอันดียิ่งตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้โอกาสในการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้มีโอกาสพบคนเก่ง คนดี และความมีน้ำใจเอื้อเฟื้อเผื่อแผ่ นอกจากนี้ ยังได้ความรู้ไปช่วยพัฒนาในการทำงานต่อไปอีกด้วย

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแต่บิดามารดา บุรพจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบนานเท่านาน

รดา เตรียาชิงห์

55910133: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: Multidrug-resistance/ *Acinetobacter baumannii*/ *MexA*/ *MexB* / ISR

รดา เตรียาชิงห์: การสำรวจเชื้อ *Acinetobacter baumannii* คือยาหลายขนาน ด้วยยีน *MexB* และ 16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) (SCREENING OF MULTIDRUG RESISTANCE *Acinetobacter baumannii* BY USING *MexB* GENE AND THE 16-23S rRNA INTERGENIC SPACER REGION (ISR)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิชาตรี ศงเจริญสุนทร, Ph.D. 71 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษายีนคล้าย *MexB* ที่แยกได้จาก *Acinetobacter baumannii* และวิเคราะห์เปรียบเทียบยีนนี้กับเชื้อฉวยโอกาสอื่น ด้วยวิธี PCR และยืนยันสายพันธุ์ ด้วยยีนตำแหน่ง 16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* งานวิจัยนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่คล้ายยีน *MexB* จาก *A. baumannii* ซึ่งพบเฉพาะใน เชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่คือยาหลายขนาน และจะไม่พบใน *A. baumannii* ที่ไม่คือยา จาก ตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาลระยองและโรงพยาบาลชลบุรี ในระหว่างเดือนมีนาคม ถึง ธันวาคม ปี พ.ศ. 2557 ดังนั้นงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของยีนนี้ทั้งใน 2 จังหวัด และยีน *MexB* ที่ค้นพบนี้มีขนาด 2,300 คู่เบส และยีนคล้าย *MexB* ที่พบใน *A. baumannii* ที่คือยาหลาย ขนาน มีความคล้ายคลึงและใกล้ชิดกับยีนคือยา กลุ่ม resistance-nodulation division (RND) ของ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่คือยาหลายขนาน ผลการยืนยันสายพันธุ์ด้วย ISR พบว่าเชื้อ *A. baumannii* รวมทั้งสายพันธุ์ที่คือยาและไม่คือยาปฏิชีวนะทั้ง 20 ตัวอย่าง แสดงแถบของ ISR ซึ่งมีขนาด 1,230 คู่เบส ดังนั้นการวิเคราะห์ยีนคือยาชนิดนี้ด้วยวิธี PCR จึงเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยาออกจากเชื้อที่ไม่คือยาในห้องปฏิบัติการทั้ง ในโรงพยาบาล และหน่วยงานทั่วไป รวมถึงใช้ศึกษารูปแบบการวิวัฒนาการของเชื้อคือยารวมถึง การศึกษาปฏิบัติการการระบาคเพื่อหาแนวทางการรักษาและการป้องกันในอนาคต

55910133: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)

KEYWORDS: MULTIDRUG RESISTANCE / *Acinetobacter baumannii*/ *MexA*/ *MexB* / ISR

RADA TEYASINGH: SCREENING OF MULTIDRUG RESISTANCE *Acinetobacter baumannii* BY USING *MexB* GENE AND THE 16-23S rRNA INTERGENIC SPACER REGION (ISR). ADVISORY COMMITTEE: WISATRE KONGCHAREONSUNTORN, Ph.D., 71 P. 2017.

This research was aimed to study *MexB* like gene in *Acinetobacter baumannii* and characterize it among some opportunistic bacteria. The *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). This research could only amplify the *MexB* like DNA from multidrug-resistant *A. baumannii* of which was not found in non drug-resistant *A. baumannii* among all samples, isolated from Rayong Hospitals and Chonburi Hospital during March to December 2014. Thus, the research was revealed that *MexB* like gene disperse in the two provinces, and this gene contained PCR product of 2,300 base pairs. This research also found that *Mex B* like gene isolated from multidrug-resistant *A. baumannii* was similar to resistance-nodulation-cell division (RND) gene found in multidrug-resistant *P. aeruginosa*. 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 1,230 base pairs of ISR. Thus, PCR could be applied to select out multidrug-resistant *A. baumannii* and discrete from non drug-resistant *A. baumannii* in laboratory, hospital and agencies. This method also included to study evolution of resistant bacteria and incidence of outbreaks for treatment and prevention *A. baumannii* infection in the future.

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ก    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                                      | ง    |
| สารบัญ.....  | จ    |
| สารบัญตาราง.....   | ฉ    |
| สารบัญภาพ.....   | ช    |
| บทที่  |      |
| 1 บทนำ.....  | 1    |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....                          | 1    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....                                 | 4    |
| สมมติฐานการวิจัย.....  | 4    |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                               | 5    |
| ขอบเขตของการวิจัย.....                                       | 5    |
| 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....                        | 6    |
| อุบัติการณ์และความสำคัญของเชื้อ.....                         | 6    |
| กลไกการคือยาของแบคทีเรีย.....                                | 9    |
| กลไกการขับสารออกนอกเซลล์.....                                | 11   |
| โครงสร้างของ Efflux pump ของกลุ่มโปรตีน RND .....            | 12   |
| โปรตีนปั๊มยาของกลุ่มโปรตีน RND .....                         | 15   |
| การจำแนกเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอ..... | 19   |
| 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....                                    | 26   |
| เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....      | 26   |
| ไพรเมอร์.....  | 27   |
| เชื้อแบคทีเรีย.....  | 29   |
| การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย.....                         | 29   |
| การสกัด Chromosomal DNA.....                                 | 32   |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่  | หน้า |
|--|------|
| 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....  |      |
| การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>MexB</i> โดยวิธี polymerase chain reaction.....     | 32   |
| การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S-23S rRNA ISR .....                      | 32   |
| การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจาก PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส.....                | 34   |
| การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หายีน <i>MexB</i> ด้วยวิธี Multiplex polymerase chain reaction..  | 34   |
| 4 ผลการวิจัย.....  | 35   |
| การศึกษาเปรียบเทียบและจำแนกเชื้อ <i>A. baumannii</i> คือยาหลายขนาน( <i>MexB</i> )..... | 35   |
| การศึกษาเปรียบเทียบและจำแนกเชื้อ <i>A. baumannii</i> โดย 16S-23S rRNA ISR.....         | 39   |
| การศึกษาเปรียบเทียบและจำแนกเชื้อ <i>A. baumannii</i> คือยาหลายขนาน( <i>MexA</i> )..... | 42   |
| การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR เพื่อใช้คัดกรองเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....            | 44   |
| 5 สรุปและอภิปรายผล.....  | 46   |
| บรรณานุกรม.....  | 52   |
| ภาคผนวก.....   | 62   |
| ภาคผนวก ก.....   | 63   |
| ภาคผนวก ข.....   | 69   |
| ประวัติย่อของผู้วิจัย.....   | 71   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่   | หน้า |
|--|------|
| 2-1 RND family efflux pumps ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคในปัจจุบัน..... | 14   |
| 2-2 เปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีนปั๊มในกลุ่ม RND.....                                 | 14   |
| 3-1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....                    | 30   |
| 3-2 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 20 สายพันธุ์ต่อยาต้าน.....            | 31   |



## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |  | หน้า |
|--------|--|------|
| 2-1    | กลไกการทำงานของยา Colistin .....   | 9    |
| 2-2    | โครงสร้าง Efflux Pump แบบต่าง ๆ ที่ค้นพบในปัจจุบัน.....  | 10   |
| 2-3    | โครงสร้างปั๊ม AcrAB-TolC ของเชื้อ <i>E. coli</i> .....   | 13   |
| 2-4    | โครงสร้างปั๊ม MexAB-OprM ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> .....   | 13   |
| 2-5    | โครงสร้างจำลองของ Multidrug Transporter ชนิด Resistance Nodulation-<br>Division Family .....   | 16   |
| 2-6    | โอเปอรอนของ RND Efflux Pump ใน <i>P. aeruginosa</i> . .....  | 18   |
| 2-7    | โครงสร้าง MtrRCDE Efflux Pump ของเชื้อ <i>N. gonorrhoeae</i> RND family efflux<br>pumps ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคในปัจจุบัน..... | 18   |
| 2-8    | ตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ภายในโอเปอรอนอาร์เอ็นเอ. ....  | 20   |
| 4-1    | แถบ <i>MexB</i> DNA ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ดื้อยาและไม่ดื้อยา.....   | 37   |
| 4-2    | PCR product ของเชื้อแบคทีเรียหลายโอกาสดื้อยาและไม่ดื้อยา.....  | 38   |
| 4-3    | เปรียบเทียบ <i>MexB</i> PCR product ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ไม่ดื้อยา และ <i>MexB</i><br>DNA ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ดื้อยา..... | 39   |
| 4-4    | เปรียบเทียบ ISR PCR product ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....   | 40   |
| 4-5    | เปรียบเทียบ ISR PCR product ของเชื้ออื่นๆที่ดื้อยา.....  | 41   |
| 4-6    | เปรียบเทียบ <i>MexA</i> PCR product ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....   | 43   |
| 4-7    | <i>MexA</i> PCR product ของเชื้ออื่นๆที่ดื้อยา.....  | 43   |
| 4-8    | PCR product จากเทคนิค Multiplex PCR ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> .....   | 45   |

# บทที่ 1

## บทนำ

### ที่มาและความสำคัญ

การระบาดของเชื้อคือยานับเป็นปัญหาสำคัญต่อการเลือกใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาส (Opportunistic Infection) (Panapakdee, 2014) เชื้อกลุ่มนี้มีอุบัติการณ์การก่อโรครุนแรงและเป็นสาเหตุการตายของผู้ป่วยในโรงพยาบาลอันดับต้นของหลายประเทศ เนื่องจากเชื้อคือยาหลายขนาน (Multidrug-resistance: MDR) การแพทย์ในปัจจุบันได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะหลากหลายในการรักษาโรคติดเชื้อ ในบางครั้งก็มีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเกินความจำเป็นจนทำให้เชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิดมีการพัฒนาความสามารถในการคือยาในรูปแบบต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุข หนึ่งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาของสถานพยาบาลหลายแห่งคือเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มฉวยโอกาส และมักส่งผลให้ผู้ป่วยที่มีสุขภาพอ่อนแอหรือผู้ป่วยที่ต้องพักรักษาเป็นเวลานานเกิดโรคแทรกซ้อนได้ง่ายยิ่งขึ้น และเนื่องจากเป็นเชื้อที่มีวิวัฒนาการในการคือยาหลายขนานได้อย่างรวดเร็ว มีความสำคัญในฐานะที่เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อย และมักเป็นเชื้อที่คือต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคปอดบวม (pneumonia) ชนิด ventilator-associated ที่พบบ่อยที่สุดในหอผู้ป่วยหนัก (Intensive Care Unit, ICU; Intermediate Care Unit) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื่อนี้มากขึ้นในหลายๆ ประเทศ (วิชัย สันติมาลากุล, สุทธิพร ภัทรชยากุล และ โปยม วงศ์ภูวรักษ์, 2552) โดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล แม้ว่าจะมีรายงานการติดเชื้อ *Acinetobacter* จากชุมชน แต่ก็ไม่มากนักเมื่อเทียบกับการติดเชื้อในโรงพยาบาล ความสำคัญอีกประการหนึ่งของ *Acinetobacter* spp. คือ เชื้อเหล่านี้มักจะคือต่อยาปฏิชีวนะพร้อมๆ กันหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการคือต่อยาในกลุ่ม Carbapenems โดยเชื้อที่คือต่อ Carbapenems มักจะคือต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในเวลาเดียวกัน (วารสารสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555) ทั้งนี้ยังสามารถแพร่ระบาดได้ง่าย จากบุคลากรทางการแพทย์หรือจากเครื่องมือแพทย์ (วีรพงศ์ วัฒนาพานิช และ พรพรรณทิพย์ ฉายากุล, 2556) จากการศึกษาระบาดของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2539–2540 พบว่ามีการระบาดของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* สูงถึงร้อยละ 57 ทั้งนี้ยังพบอุบัติการณ์คือยาหลายขนานในประเทศไทย ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 54.7 (Keerasuntonpong, Samakeenich, Tribuddharat, & Thamlikitkul, 2002) ในปี พ.ศ.2546 ได้มีการศึกษาการติดเชื้อนี้ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พบว่าอัตราการคือยา Carbapenem

เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 40 จึงทำให้ผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงที่จะเป็นโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ค่อนข้างเพิ่มมากขึ้น (Chaiwarith, Mahatthanaphak, Boonchoo, Supparatpinyo, & Sirisanthana, 2005) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2550 มีรายงานแสดงความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาในกลุ่ม beta-lactam/beta-lactamase inhibitors และยา imipenem ลดลงเรื่อยๆ (Anunnatsiri & Tonsawan, 2011) โดยในปี พ.ศ.2550 แสดงความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยา imipenem และ ampicillin/salbactam (ร้อยละ 57 และ 58) ตามลำดับ ในขณะที่ความไวต่อยาในกลุ่ม broad-spectrum cephalosporins คือ ceftazidime และ cefipime (ร้อยละ 46 และ 45) ตามลำดับ ดังนั้นจากข้อมูลการระบาดของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่สูงขึ้นทุกปี จึงมีความจำเป็นต้องเฝ้าระวังการติดเชื้อเพิ่ม เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไปสู่ชุมชน

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการสามารถวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ได้โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี โดยเชื้อ *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 (ซาอูกิจ พุฒิเลอพงค์, วรางคณา ชวนะสิทธิ์, และวัลภา เลาหะวลีสันต์, 2551) เชื้อชนิดนี้เจริญเติบโตง่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป และอาศัยอยู่ได้บริเวณร่างกายมนุษย์ ทั้งผิวหนัง คอหอย เสมหะ ปัสสาวะ สารคัดหลั่งจากช่องคลอด และอุจจาระ จึงสามารถก่อโรคได้หลากหลายระบบ ทั้งปอดอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด เนื้อเยื่ออ่อน แผลผ่าตัด เยื่อหูช่องท้องอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ติดเชื้อในสายหลอดเลือดและติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น (วีรพงศ์ วัฒนาวนิช และพรณทิพย์ ฉายากุล, 2556) เชื้อชนิดนี้สามารถก่อโรคติดเชื้อในอวัยวะของผู้ที่อ่อนแอ เช่น ผู้ป่วยโรคมุมักันบกพร่อง พิษสุราเรื้อรัง เบาหวาน และผู้ที่เข้ารับการผ่าตัดอวัยวะเนื่องจากเป็นเชื้อที่ทนทานต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้กำจัดได้ยากกว่าเชื้ออื่น ๆ และเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีอัตราการดื้อยาสูงมาก หากตรวจวินิจฉัยไม่ทันท่วงทีก็จะมียาต้านการเสียชีวิตสูง ดังนั้นจึงก่อปัญหาการระบาดในโรงพยาบาลสูงมาก ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ที่เป็นอันตราย เช่น โรคปอดอักเสบที่เกิดในโรงพยาบาล (Hospital-Acquired Pneumonia) โรคปอดอักเสบชุมชน (Community-Acquired Pneumonia) โรคติดเชื้อในกระแสเลือด โรคติดเชื้อในบาดแผล โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคติดเชื้อในเยื่อหูช่องท้อง และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (วีรพงศ์ วัฒนาวนิช และพรณทิพย์ ฉายากุล, 2556) ดังนั้น เชื้อ *A. baumannii* มีอันตรายสูง หากไม่เฝ้าระวังอย่างทันท่วงทีก็จะมียาต้านการเสียชีวิตสูง เพราะเชื้อนี้มีความสามารถในการดื้อยาหลายขนาน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2550 มีรายงานแสดงความไวของเชื้อ *A. baumannii*

ต่อยากลุ่ม beta-lactam/beta-lactamase inhibitors และยา imipenem ลดลงเรื่อยๆ (Anunnatsiri & Tonsawan, 2011) โดยในปี พ.ศ.2550 แสดงความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยา imipenem และ ampicillin/salbutam (ร้อยละ 57 และ 58) ตามลำดับ ในขณะที่ความไวต่อยาในกลุ่ม broad-spectrum cephalosporins คือ ceftazidime และ cefipime (ร้อยละ 46 และ 45) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีความสามารถในการดื้อยาหลายขนาน เมื่อศึกษากลไกการดื้อยาของ *A. baumannii* พบว่ามีหลายกลไก เช่น การสร้างเอนไซม์ topoisomerase การสร้างเอนไซม์ beta-lactamases ย่อยสลายโครงสร้าง Beta-lactem (เช่น ยีน *OXA-51-like* ช่วยในการดื้อยา Carbapenem) การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดจำนวน porin การสร้าง aminoglycoside-modifying enzymes (เช่น ยีน *AAC(3)-la* ช่วยในการดื้อยา Gentamicin) และการสร้าง efflux pump เพื่อขับยาออกจากเซลล์ (เช่น ยีน *Tet(A)* ช่วยในการดื้อยา Tetracyclin) การปรับปรุงโครงสร้างเป้าหมายเข้าจับของยา (เช่น ยีน *GyrA* ช่วยในการดื้อยา Quinolones) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง Outer-Membrane Protein (OMPs) (เช่น ยีน *CarO* ช่วยในการดื้อยา Carbapenems) เป็นต้น (Dijkshoorn et al., 2007 ; Woodford, Turton, & Livermore, 2011) ซึ่งหากเชื้อแบคทีเรียมีการดื้อยาหลายกลไกพร้อมกันจะทำให้พัฒนากลายเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถดื้อยาต้านจุลชีพทุกชนิดได้ (pan-resistant strains) (Falagas & Karageorgopoulos, 2008 ; จารุภรณ์ วิชาลสวัสดิ์, 2551 ; ภัทราภรณ์ รอดเสถียร, 2551) จากการปรับตัวดื้อยาของเชื่อนี้ทำให้มีความยากในการตัดสินใจเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาภาวะติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. ทั้งนี้ยังสามารถแพร่ระบาดได้ง่ายจากบุคลากรทางการแพทย์หรือจากเครื่องมือแพทย์สู่ผู้ป่วย (วิรพงษ์ วัฒนาพานิช และพรรณทิพย์ ฉายากุล, 2556)

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษากลไกการขับยาออกจากเซลล์ชนิดหนึ่งคือ Resistance-nodulation-division (RND) (Llanes et al., 2004; Blair & Piddock, 2009; Ogawa et al., 2012) ซึ่งกลไกนี้เป็นกลไกหลักที่แบคทีเรียใช้ในการดื้อยาของแบคทีเรียบางกลุ่ม ดังเช่น เชื้อ *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ซึ่งเป็นกลไกที่อันตรายร้ายแรง เพราะทำให้เกิดการดื้อยาหลายขนานได้รวดเร็วที่สุด ปัจจุบันมีผู้วิจัยศึกษามากมายเกี่ยวกับยีนดื้อยาที่ใช้กลไกในการขับยาออกจากเซลล์ชนิด RND (Llanes et al., 2004 ; Blair & Piddock, 2009 ; Piddock, 2006 ; Poole, 2007 ; Li & Nikaido, 2009; Nikaido, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Citrobacter freundii* และ *Enterobacter aerogenes* มีความสามารถในการดื้อยาที่ใช้กลไกในการขับยาออกจากเซลล์ ชนิด RND ได้เช่นกัน (Schumacher et al., 2006) จากการค้นคว้าพบว่ารูปแบบการดื้อยาของ *A. baumannii* มีความคล้ายกับรูปแบบการดื้อยาของ *P. aeruginosa* และ *E. coli* (Blair & Piddock, 2009) งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาเบื้องต้นในการหาอุบัติการณ์ของการค้นพบยีน RND ของ *A. baumannii* โดยการ

ออกแบบคู่ไพรเมอร์ยีน *MexB* ให้จำเพาะต่อยีนคือยาของ *A. baumannii* จากฐานข้อมูลยีนของ *P. aeruginosa* และแบคทีเรียอื่น ๆ (Starr, Fruci, & Poole, 2012; Minagawa et al., 2012) ยีน *MexA* คือยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน *MexA* ยีน *MexB* กำหนดการสร้างโปรตีน *MexB* ยีน *OprM* กำหนดการสร้างโปรตีน *OprM* รวมกันสามหน่วยเพื่อสร้าง RND (Lister, Wolter, & Hanson, 2009) เพื่อพิสูจน์ว่าสามารถพบยีน *MexB* ในกลุ่ม *A. baumannii* คือยาด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาวีธีการจำแนก *A. baumannii* ด้วยดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S – 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) (Ko et al., 2008; เกศินี จีรวัดนนกุล และวิสาตรี คงเจริญสุนทร, 2557) ที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* สามารถจำแนกสปีชีส์ของ *A. baumannii* ร่วมกับยีนคือยาคือ *MexB* โดยไม่ต้องทำการเพาะเชื้อ เพื่อแยกดีเอ็นเอจากผู้ป่วยโดยตรง นอกจากนี้ได้ยังศึกษายีน *MexA* อีกด้วย (เนตรชนก สุวรรณะ และวิสาตรี คงเจริญสุนทร, 2555) ดังนั้นการศึกษายีน RND ใน *A. baumannii* อาจใช้ตอบสมมุติฐาน คือ *A. baumannii* ใช้ยีน RND เป็นกลไกหลักในการติดต่อยาปฏิชีวนะทุกขนาน ร่วมกับการใช้ ISR จึงอาจมีประโยชน์ต่อการศึกษาแบคทีเรียสิ่งแวดล้อม ระบาดวิทยา และพยาธิวิทยา เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์และสามารถวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้งานวิจัยนี้มีคุณค่า เพราะอาจจะช่วยลดระยะเวลาเพื่อรอผลตรวจสอบความไวต่อยาของเชื้อ *A. baumannii* สามารถใช้ติดตามความแปรผันและวิวัฒนาการของเชื้อ *A. baumannii* คือยาเพื่อปรับตัวเพื่อกลายพันธุ์เป็นเชื้อคือยาในอนาคต ซึ่งอาจจะช่วยให้แพทย์ได้ตัดสินใจในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ในระยะเริ่มต้นคือยาก่อนลุกลามและเป็นอันตรายถึงชีวิต พร้อมกันนี้ยังพัฒนาวิธีจำแนกยีนคือยาในเชื้อ *A. baumannii* ด้วย วิธี Multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ระบุยีน *MexB* ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ระบุสายพันธุ์ (species) ด้วย ISR

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการพบยีนคือยาชนิด RND ที่ใช้ในการขับยาออกจากเซลล์ ในเชื้อ *A. baumannii* จากสิ่งส่งตรวจควบคู่กับการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยี โดยใช้บริเวณ 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region หรือ ISR เพื่อใช้ตรวจหายีนคือยาหลายขนานที่มีกลไกแบบปั๊มของยีน *MexB* ควบคู่กับการระบุสายพันธุ์เชื้อ *A. baumannii* อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้น เพื่อให้สามารถจำแนก *A. baumannii* ได้ในระดับสปีชีส์

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสำรวจยีนคือยาชนิด *MexB* ในเชื้อ *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาที่คัดแยกจากสิ่งส่งตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์
2. เพื่อใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยา โดยไพรเมอร์ 2 คู่ซึ่งจำเพาะต่อยีน *MexB* และ ISR เพื่อจำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยาจากสิ่งส่งตรวจ

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

สามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยาและไม่คือยา ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยการตรวจหายีนคือยา *MexB* ควบคู่กับการตรวจหา ISR เพื่อระบุสายพันธุ์ของ *A. baumannii*

## ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการจำแนกยีนคือยาหลายขนาน ของเชื้อ *A. baumannii* ตัวอย่างที่แยกมาจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลระยอง จังหวัดระยอง โดยเทคนิคพีซีอาร์

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิจัยครั้งนี้ ได้นำเสนอเป็นลำดับดังต่อไปนี้

- อุบัติการณ์และความสำคัญของเชื้อ *A. baumannii*
- กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย
- กลไกการขับสารออกนอกเซลล์ (Efflux pump mechanism)
- โปรตีนปั๊มยากลุ่ม Resistance-Nodulation-Division (RND) Family ที่พบในแบคทีเรีย
- การจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี

#### อุบัติการณ์และความสำคัญของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบท่อนสั้นซึ่งเป็นกลุ่มต้องการออกซิเจน ไม่หมัก น้ำตาล เคลื่อนที่ไม่ได้ มีผลกะตะเลสเป็นบวก ไม่เกิดการออกซิไดซ์ มีค่า G+C content อยู่ที่ 39-47 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในคลาส *Moraxelaceae* ออร์เดอร์ *Gamma*proteobacteria ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกคือ *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* โดย *A. baumannii* สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Sheep Blood Agar หรือ Tryptic Soy Agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเชื้อ *A. baumannii* เป็นเวลาข้ามคืน จะได้โคโลนีรูปร่างกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น เส้นผ่านศูนย์กลาง 15-30 มิลลิเมตร เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเชื้อเรียงตัวเป็นคู่หรือสาย เชื้อ *A. baumannii* พบทั่วไปในธรรมชาติ สามารถแยกได้จากในดิน น้ำ สัตว์ และในร่างกายของมนุษย์ การเก็บตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* จากสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งส่งตรวจ มักเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชต่ำ มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ในเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจน (Peleg, Seifert, & Paterson, 2008)

เชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบฉวยโอกาส อันเป็นผลให้มีอัตราการเจ็บป่วยหรือเสียชีวิตเพิ่มมากขึ้นในปี ค.ศ. 1970 เชื้อนี้ยังไม่ได้รับความสนใจมากนัก เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความสามารถก่อโรคร้าย เป็นผลให้การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *A. baumannii* ในผู้ป่วยถูกละเลยบ่อยครั้ง อย่างไรก็ตามในช่วงยี่สิบปีต่อมาเริ่มมีการให้ความสนใจในเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* เพิ่มมากขึ้น เพราะเชื้อนี้มีอุบัติการณ์การก่อโรคที่รุนแรงและเป็นสาเหตุการตายของผู้ป่วยในโรงพยาบาลอันดับต้นของหลายประเทศ ลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อนี้มักมีการแพร่

กระจายทั่วโลกในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก หรือ ICU (Intensive Care Unit) และเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย จึงพบอุบัติการณ์คือยาหลายขนานของเชื้อนี้เพิ่มขึ้น

ปัจจุบันมีการพบอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* มากขึ้นในผู้ป่วยหนักที่พักรักษาในโรงพยาบาลนานกว่าห้าเดือน เชื้อ *A. baumannii* ส่วนใหญ่จะแฝงอยู่ตามเครื่องระบายอากาศ ที่นอน หมอน ซอกเตียง ถุงยาหรือน้ำเกลือ สายพลาสติกที่เชื่อมต่อกับร่างกาย ผ้าพันแผล รถเข็น อุปกรณ์พื้นฟู รวมถึงเครื่องเรือนต่าง ๆ การที่ *A. baumannii* สามารถอาศัยอยู่บนพื้นผิวของสิ่งไม่มีชีวิต มักทำให้เกิดการแพร่กระจายของ *A. baumannii* จากการปนเปื้อนมือหรือเสื้อผ้าเจ้าหน้าที่ และอุปกรณ์ทางการแพทย์ในแผนกต่าง ๆ เช่น แผนกทารกแรกเกิด แผนกผู้ป่วยไฟไหม้ แผนกประสาท แผนกศัลยกรรม แผนกเนื้องอกวิทยา สาเหตุของการระบาดอาจเกิดจากการพัฒนาความสามารถในการคือยาสูงกว่าเชื้อกลุ่มอื่น ๆ โดยเชื้อ *A. baumannii* มักติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำและผู้ป่วยที่ต้องพักรักษาตัวเป็นเวลานาน ทำให้ผู้ป่วยเกิดโรคแทรกซ้อนและติดเชื้อในหลายอวัยวะ เช่น ระบบปัสสาวะ กระแสเลือด ปอด ช่องท้อง ระบบทางเดินอาหาร เชื้อหุ้มสมอง แผลผ่าตัด และเชื้อบุหัวใจ เป็นต้น (Giamarellou, Antoniadou, & Kanellakopoulou, 2008) จากการเฝ้าระวังมานานกว่า 10 ปีของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อคือยาด้านจุลชีพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า เชื้อ *A. baumannii* มีแนวโน้มคือยาเพิ่มขึ้นทุกปี มีอัตราการคือยาหลายชนิดพร้อมกันสูงถึงร้อยละ 55 ได้แก่ยาในกลุ่ม aminoglycosides, beta-lactams, quinilone, แม้แต่ยาที่เคยใช้รักษาได้ดีในอดีต เช่น carbapenem ในปี พ.ศ.2543 คือยา imipinem เพียงร้อยละ 1-2 แต่ในปี พ.ศ.2554 คือยาเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 64 และคือยาถึงร้อยละ 85 ในผู้ป่วย ICU (National Antimicrobial Resistance Surveillance and Training, 2555) สถานการณ์ปัจจุบัน *A. baumannii* คือยาปฏิชีวนะแทบทุกประเภท ยกเว้น Colistin (วิชญชรรมลิจิตกุล, 2551) เพราะเหตุนี้จึงทำให้เชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* กลายพันธุ์และก่อความรุนแรงมากกว่าการระบาดของ Meticillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Giamarellou, Antoniadou, & Kanellakopoulou, 2008) สำหรับในประเทศไทยช่วง 15 ปีที่ผ่านมาอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2-4 เป็นร้อยละ 10-30 โดยพบมากในหออภิบาลผู้ป่วย การติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นปอดอักเสบ (Saelao & Utiswannakul, 2008) ข้อมูลจากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อคือยาแห่งชาติกระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย (National Anti-microbial Resistant Surveillance Center Thailand; NARST) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2550 แสดงผลความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาในกลุ่ม beta-lactam/beta-lactamase inhibitors และยา imipenem ลดลงเรื่อย ๆ โดยในปี พ.ศ. 2550 ความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยา imipenem และ ampicillin/salbactam (ร้อยละ 57 และ 58) ตามลำดับ ในขณะที่ความไวต่อยาในกลุ่ม broad-spectrum cephalosporins คือ ceftazidime และ cefipime (ร้อยละ 46 และ 45) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าอัตราการ



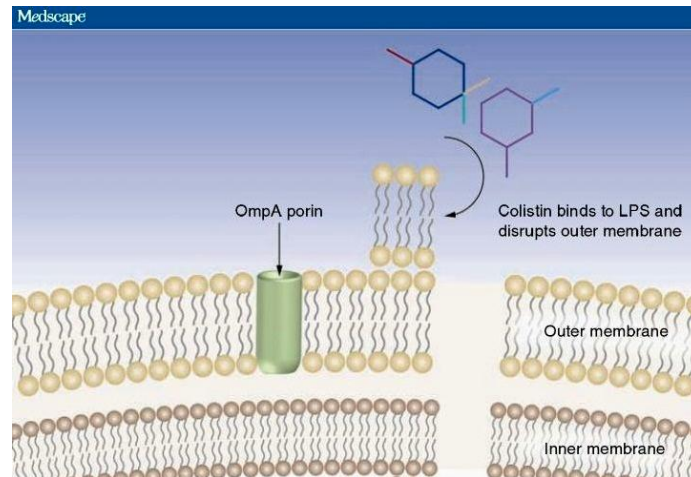
คือยาหลายขนานของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลหัวหินปี ค.ศ.2010-2014 สูงขึ้นทุกปี คือ ร้อยละ 68.16, 87.25, 76.9, 81.04 และ 83.93 ตามลำดับ (อรอนงค์ หงษ์ชุมแพ และวิชัย สันติมาลีวรกุล, 2559)

มีการพบอุบัติการณ์การระบาดในระบบทางเดินหายใจของคนไข้ในโรงพยาบาล ซึ่งเชื้อเจริญเติบโตในลำคอของผู้ป่วยปัสสาวะเรื้อรังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด Berlau et al. (1999) มีการตรวจพบเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 192 คน เชื้อที่พบมากที่สุดคือ *A. lwoffii* และ *A. baumannii* นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *A. baumannii* ในผลไม้สดหลากหลายชนิดที่หาซื้อจากท้องตลาด โดยตรวจพบเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* ถึงร้อยละ 17 ส่วนใหญ่ตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ *A. baumannii* มากถึงร้อยละ 56 และยังตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* ในแอปเปิ้ล เมล่อน ถั่ว กระหล่ำปลี แครอท มันฝรั่ง หัวไชเท้า แดงกวา พริกไทย เห็ด และข้าวโพด การศึกษาช่วงปีหลัง ๆ พบว่าอาหารของโรงพยาบาลมีโอกาสเป็นแหล่งของเชื้อ *A. baumannii* ทำให้เกิดการเจริญของเชื้อในระบบทางเดินอาหารของผู้ป่วยในโรงพยาบาล (Fournier & Richet, 2006)

นอกจากความสามารถในการติดเชื้อ *A. baumannii* ในอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายแล้ว เชื้อนี้ยังสามารถส่งผลให้ผู้ป่วยเป็นอันตรายถึงชีวิตได้เนื่องจาก *A. baumannii* มีความสามารถในการดื้อยาหลายขนาน เมื่อศึกษากลไกการดื้อยาของ *A. baumannii* พบว่ามีหลายกลไก เช่น การย่อยสลายโครงสร้าง Beta-lactem (เช่น ยีน *OXA-51-like* ช่วยในการดื้อยา Carbapenem) การดื้อยา กลุ่ม Aminoglycoside (เช่น ยีน *AAC(3)-la* ช่วยในการดื้อต่อยา Gentamicin) การดื้อยา กลุ่ม Chloramphenicol (เช่น ยีน *CAT1* ช่วยในการดื้อยา Chloramphenicol) การปรับปรุงโครงสร้างเป้าหมายเข้าจับของยา (เช่น ยีน *GyrA* ช่วยในการดื้อยา Quinolones) โครงสร้าง Efflux pump (เช่น ยีน *Tet(A)* ช่วยในการดื้อยา Tetracyclin) และการแปลงแปลงโครงสร้าง Outer-Membrane Protein (OMPs) (เช่น ยีน *CarO* ช่วยในการดื้อยา Carbapenems) เป็นต้น (Dijkshoorn, Nemeč, & Seifert, 2007)

Colistin จัดเป็นยาเก่าในกลุ่ม polymyxins ซึ่งปัจจุบันมีการนำนี้กลับมาใช้ใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา โดย Colistin เป็นยาต้านจุลชีพประเภท Polypeptide Cationic ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยา colistin ยาจะไปจับที่บริเวณ lipid A ของ Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งอยู่บน outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้กระบวนการจัดรูปแบบของ outer membrane ของเชื้อผิดปกติไป จากนั้นจะจับแคลเซียม และแมกนีเซียมของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์รั่ว และแบคทีเรียตายในที่สุด กลไกการออกฤทธิ์ของยานี้แตกต่างจากยาอื่น และมีกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้เอนไซม์ต่าง ๆ จึงทำให้โอกาสที่

แบคทีเรียจะเปลี่ยนจากไวต่อยาเป็นดื้อต่อยาไม่น้อยจึงเป็นยาที่ยังใช้รักษาอยู่ในปัจจุบัน (Li et al., 2007)



ภาพที่ 2-1 กลไกการทำงานของยา Colistin (ที่มา: Yun Cai, Dong Chai, & Wang, 2012)

**กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย** (วิวรรณ ลูวีระ, 2548 : Mcdermott & While, 2011)

1. การดื้อยาโดยธรรมชาติ (Intrinsic Resistance) เชื้อแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการดื้อยาตามธรรมชาติอยู่แล้ว ทำให้ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น Vancomycin ไม่สามารถทำอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนบางชนิดได้ หรือ Aminoglycoside ที่ใช้ในกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช่ออกซิเจน

2. การดื้อยาเกิดขึ้นในระหว่างการรักษาหรือได้รับยีนที่ถ่ายทอดจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Acquired Resistance) เป็นกลไกที่แบคทีเรียพัฒนาขึ้นมาเพื่อจะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ แบ่งย่อยเป็น 4 กลไกใหญ่ ๆ ซึ่งในเชื้อแต่ละชนิดมีกลไกการดื้อยาหลายชนิดดังนี้

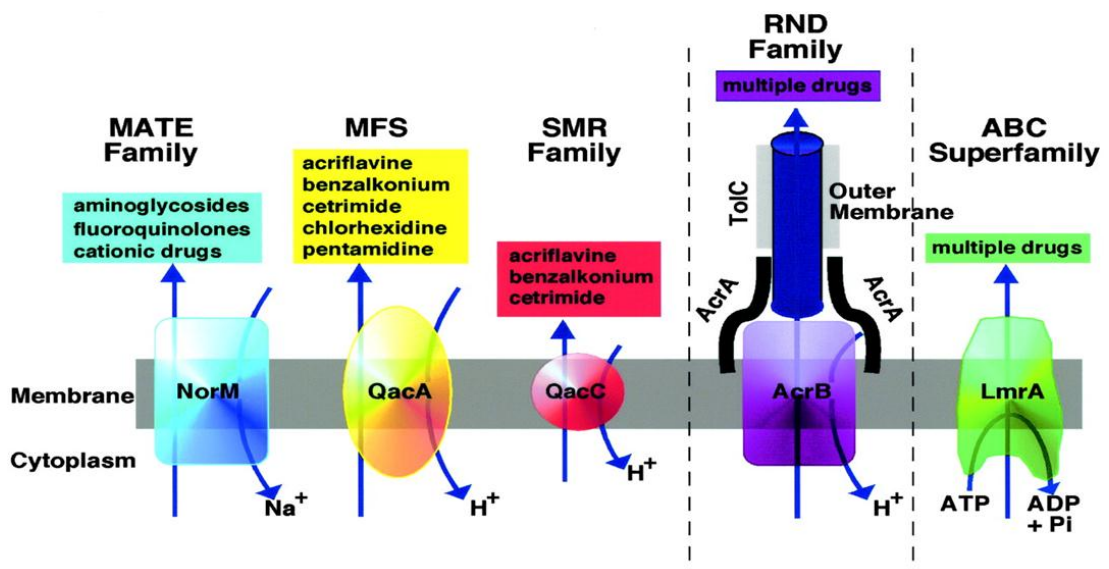
2.1 ลบล้างฤทธิ์ของยา หรือเปลี่ยนแปลงยา (Drug Inactivation หรือ Drug Modification) เป็นกลไกที่พบบากที่สุด เกิดจากการที่แบคทีเรียสร้างเอนไซม์บางชนิดขึ้นมาทำลายเปลี่ยนแปลง หรือหักล้างยาปฏิชีวนะ ตัวอย่างที่เราพบได้บ่อย เช่น Penicillinases Beta-Lactamases หรือ Cephalosporinases

2.2 เปลี่ยนแปลงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาเป้าหมาย (Alteration of Target Site) เนื่องจากยาบางชนิดเมื่อเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ จะตรงเข้าไปยังบริเวณเป้าหมาย ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะที่ยาปฏิชีวนะจะเข้าไปทำงานได้ ทำให้แบคทีเรียบางชนิดนี้มาเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมาย เพื่อให้ยาไม่สามารถเข้าจับได้ เช่น ใน *Streptococcus pneumoniae* PBP (Penicillin Binding Protein) จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น PBPX ทำให้เกิดการดื้อยาตามมา

2.3 เลี่ยงกลไกการดื้อยา (Bypass Pathway) เชื้อที่ดื้อยาสร้างบริเวณเป้าหมายขึ้นมาใหม่ ทำให้ยาปฏิชีวนะมาจับติดกับบริเวณที่สร้างขึ้นใหม่ ทำให้ไม่มีผลกับโครงสร้างเดิมและยาจะออกฤทธิ์ไม่ได้ เช่น PBP2a ในกรณี MRSA

2.4 ลดการนำยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Decreased Drug Uptake) แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาเข้าไปในเซลล์ หรือมีการใช้พลังงานในการขับเคลื่อนด้วยโปรตีนปั๊มยา (Efflux Pump) เพื่อนำยาออกนอกเซลล์ ตัวอย่าง เช่น โปรตีนปั๊มยา Imipenam จะอาศัยโปรตีน Porin ในการควบคุมการผ่านเข้าออกของยาชนิดนี้ เมื่อ *P. aeruginosa* พัฒนาโดยลดปริมาณโปรตีน Porin ลง จึงสามารถลดการนำเข้าของยา Imipenam น้อยลง กลไกการนำเข้าของยาในเชื้อ *Salmonella typhi* จะมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Multidrug Efflux Pump จึงทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ค้นพบระบบโปรตีนปั๊มยา Efflux Pump 5 กลุ่มย่อย ซึ่งแบ่งโดยใช้เกณฑ์การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน เทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี การใช้แหล่งพลังงานในการขับเคลื่อนกลไก และชนิดของสับสเตรทที่จำเพาะของปั๊มชนิดต่าง ๆ คือ 1.) Major Facilitator (MFS) Superfamily 2.) Small Multidrug Resistance (SMR) Family 3.) Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Family 4.) Resistance-Nodulation-Division (RND) Family และ 5.) ATP-Binding Cassette (ABC) Family ดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 โครงสร้าง Efflux Pump แบบต่าง ๆ ที่ค้นพบในปัจจุบัน (Pidcock, 2006)

ปัจจุบันพบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีความสามารถในการดื้อยาหลายขนาน เมื่อศึกษา กลไกการดื้อยาของ *A. baumannii* พบว่ามีหลายกลไก เช่น การสร้างเอนไซม์ topoisomerase การสร้างเอนไซม์ beta-lactamases ย่อยสลายโครงสร้าง Beta-lactam (เช่น ยีน *OXA-51-like* ช่วยในการดื้อยา Carbapenem) การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดจำนวน porin การสร้าง aminoglycoside-modifying enzymes (เช่น ยีน *AAC(3)-Ia* ช่วยในการดื้อยา Gentamicin) และการสร้าง efflux pump เพื่อขับยาออกจากเซลล์ (เช่น ยีน *Tet(A)* ช่วยในการดื้อยา Tetracycline) การปรับปรุงโครงสร้างเป้าหมายเข้าจับของยา (เช่น ยีน *GyrA* ช่วยในการดื้อยา Quinolones) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง Outer-Membrane Protein (OMPs) (เช่น ยีน *CarO* ช่วยในการดื้อยา Carbapenems) เป็นต้น (Dijkshoorn, Nemeč, & Seifert, 2007) ซึ่งหากเชื้อมีการดื้อยาหลายกลไกพร้อมกันจะทำให้พัฒนากลายเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านจุลชีพทุกชนิด (pan-resistant strains) ได้ (Thomson, & Bonomo, 2005) เกณฑ์ในการจัดเป็นการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistance, MDR) คือเชื้อมีการดื้อยาต้านจุลชีพตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปจากกลุ่มยาดังนี้ aminoglycosides, penicillin, carbapenems, cephalosporins, quinolone, polymyxin, cefoperazone/sulbactam หรือ tetracycline, beta lactam/beta lactamase combination, fluoroquinolones, glycopeptide, macrolid, lincosamides, sulfonamide และ chloramphenicol

**กลไกการขับสารออกนอกเซลล์ (Efflux pump mechanism)** (Pidcock, 2006; Venter et al., 2015)

เชื้อแบคทีเรียสามารถต้านทานการทำงานของสารปฏิชีวนะได้ โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ ซึ่งระบบการขนส่งสาร (transporting system) ก็ถือว่าเป็นหนึ่งในกลไกดังกล่าวเช่นเดียวกัน โดยที่ตัวขนส่ง (Transporter) จะมีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (และในเซลล์ยูคาริโอต) และเป็นตัวขับเคลื่อนให้สารประกอบหลายชนิด เช่น substrate ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย, substrate ที่ไม่ใช่สารปฏิชีวนะ และสารปฏิชีวนะ (มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป) ไหลเข้าสู่ (influx) หรือขับออก (efflux) ภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ ยังพบว่ามีตัวขนส่งแบบสองทิศทาง (Bidirectional Transporter) ที่สามารถทำหน้าที่ได้หลากหลายมากขึ้นอีกด้วย Bacterial efflux pump ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานสารปฏิชีวนะนั้น ถือว่าเป็นบทบาทหนึ่งของกลุ่มแบคทีเรียชนิดก่อโรคอีกด้วย (bacterial pathogenicity) ทั้งนี้ มี efflux-pump protein อยู่ 5 กลุ่มด้วยกัน ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายชนิด (MDR) ของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่

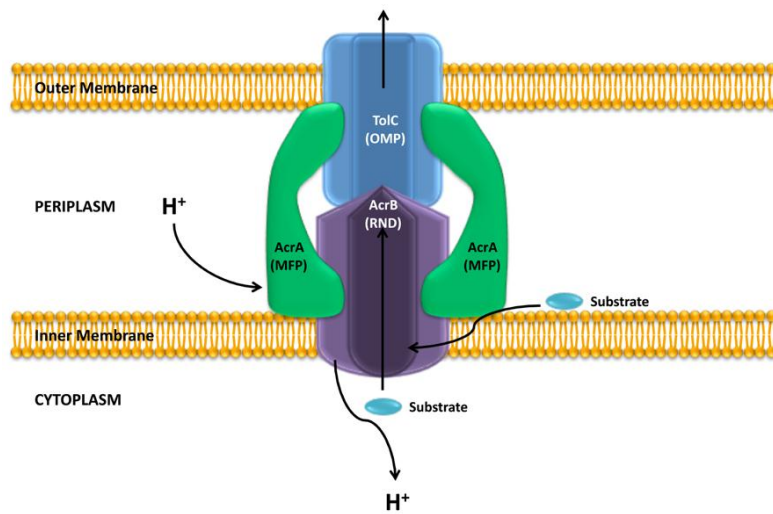
- 1) กลุ่มที่จับตัวยาหลายชนิด และสารที่เป็นพิษ (multidrug and toxic compound extrusion; MATE)
- 2) superfamily ของ adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC)
- 3) กลุ่มของโปรตีนชนิด small multidrug resistance (SMR)
- 4) major facilitator superfamily (MFS)
- 5) กลุ่ม resistance-nodulation-cell division (RND)

เกณฑ์การจำแนกกลุ่มโปรตีนดังกล่าวข้างต้น จะอ้างอิงจากลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน แหล่งพลังงานที่ pump ใช้ จำนวนของสารประกอบที่อยู่ใน pump (เชิงเดี่ยว หรือ เชิงซ้อน) จำนวนของtransmembrane-spanning region และชนิดของ substrate ที่ pump ขับออกมา นอกจากนี้ ยังพบ pump ที่จับตัวยาออกจากเซลล์ (Drug efflux pump) ในแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวกอีกด้วย แต่ประสิทธิภาพในการต้านทานของ pump ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบนั้น จะมีความซับซ้อนมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างทางโมเลกุลของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell envelope)

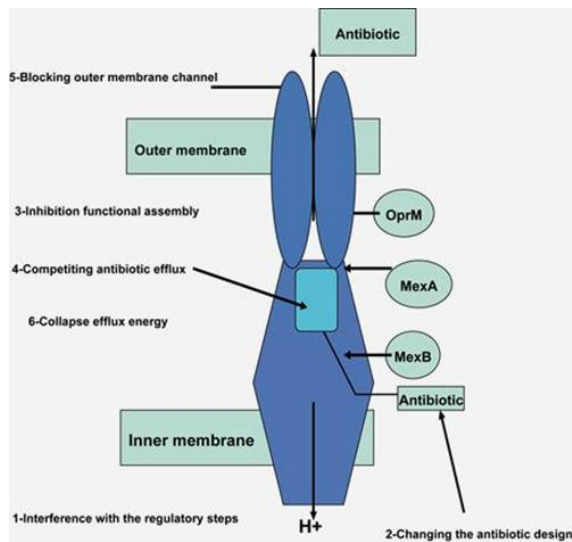
#### โครงสร้างของ Efflux pump ของกลุ่มโปรตีน RND (Wieczorek et al., 2008)

แบคทีเรียแกรมลบ จะได้รับการปกป้องจากเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ด้วยเหตุนี้ ตัวขนส่ง (transporter) efflux ของ RND family จึงถูกแบ่งออกเป็นระบบโครงสร้าง 3 ระบบด้วยกัน ซึ่งจะมีเหมือนกันในเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการพบระบบโครงสร้าง *AcrAB-TolC* จากเชื้อ *E. coli* และระบบโครงสร้าง *MexAB-OprM* จากเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่ง efflux pump ทั้งสองกลุ่มนี้ จะประกอบไปด้วย โปรตีนขนส่ง (transporter protein) (efflux) (เช่น *AcrB*) (ภาพที่ 2-3) ซึ่งจะอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) (cytoplasmic), periplasmic accessory protein (หรือ membrane fusion protein (MFP)) (เช่น *AcrA*) และ โปรตีนที่อยู่บนผิวด้านนอก (outer membrane protein; OMP) (เช่น *TolC*) ซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบ การเกิดตัวขนส่งที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ (transporter) ของ RND ในเชื้อฉวยโอกาส (nosocomial pathogen) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *P. aeruginosa* จะมีระบบอยู่เพียง 2-3 ระบบเท่านั้นที่สามารถทำงานในเวลาเดียวกัน ในทางคลินิกแล้ว เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถขนส่ง efflux pump สองระบบได้พร้อมกัน นั่นคือ *MexAB-OprM* กับ *MexXY* หรือ *MexAB-OprM* กับ *MexEF-OprN* (ภาพที่ 2-4) สำหรับเชื้อ *A. baumannii* นั้น AdeB จะเป็นโปรตีนขนส่งตัวยาหลายชนิด (multidrug transporter protein), AdeA จะเป็น membrane fusion protein (MFP) และ AdeC จะเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวด้านนอก (outer membrane protein; OMP) ทั้งนี้ ตัวขนส่ง (transporter) efflux

(AdeB) จะดักจับ substrate ที่มาจากภายใน phospholipid bilayer ของเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) และจาก cytoplasm จากนั้น จึงขนส่ง substrate ดังกล่าวเข้าไปยังตัวกลางภายนอกเซลล์ (extracellular medium) โดยอาศัยโปรตีนที่อยู่บนผิวด้านนอก (outer membrane protein; OMP) (AdeC) สรุปดังตารางที่ 2-1 และตารางที่ 2-2



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างปั๊ม AcrAB-TolC ของเชื้อ *E. coli* (Carolina, Jorge, & Jose, 2013)



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างปั๊ม MexAB-OprM ของเชื้อ *P. aeruginosa* (Poole et. al., 1993)

ตารางที่ 2-1 RND family efflux pumps ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคในปัจจุบัน  
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Wieczorek et al., 2008)

| Organism             | Efflux components |                  |      | Antibiotic as substrates   |
|----------------------|-------------------|------------------|------|----------------------------|
|                      | MFP               | Main transporter | OMP  |                            |
| <i>A. baumannii</i>  | AdeA              | AdeB             | AdeC | AG, CM, FQ, NO, TC, TM     |
|                      | AdeI              | AdeJ             | AdeK | ?                          |
| <i>E. coli</i>       | AcrA              | AcrB             | TolC | BL, CM, FQ, ML, NO, RF     |
|                      | AcrA              | AcrD             | TolC | AG, FU                     |
|                      | AcrB              | AcrF             | TolC | FQ                         |
|                      | MdlA              | MdlBC            | TolC | NO                         |
|                      | YhiU              | YhiV             | TolC | NO                         |
| <i>K. pneumoniae</i> | AcrA              | AcrB             | ?    | FQ                         |
| <i>P. mirabilis</i>  | AcrA              | AcrB             | ?    | NO                         |
| <i>P. aeruginosa</i> | MexA              | MexB             | OprM | AG, BL, CM, ML, NO, TC, TM |
|                      | MexC              | MexD             | OprJ | CM, CP, FQ, TC             |
|                      | MexE              | MexF             | OprN | CM, FQ                     |
|                      | MexH              | MexI             | OprD | NO                         |

ตารางที่ 2-2 เปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีนปั๊มในกลุ่ม RND ของเชื้อดื้อยา (ที่มา: ดัดแปลง  
จาก Magnet, Courvalin, Lambert, 2001)

| Sequence | % Identity |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|          | compared   | AcrA | AcrB | MtrC | MtrD | MexA | MexB | MexC | MexD | MexX | MexY | AmrA | AmrB | AcrD |
| AdeA     |            | 38   |      | 39   |      | 37   |      | 37   |      | 34   |      | 37   |      |      |
| AdeB     |            |      | 49   |      | 47   |      | 47   |      | 53   |      | 46   |      | 46   | 45   |

สำหรับ Periplasmatic protein *AdeA* จะเป็นสื่อกลางในการทำงานร่วมกันระหว่าง *AdeB* กับ *AdeC* การขนส่งด้วยยาโดย pump แต่ละกลุ่มนั้น จะถูกขับเคลื่อนโดยความแตกต่างทางศักย์ไฟฟ้าเคมีระหว่างเยื่อเซลล์ (transmembrane electrochemical gradient) ของโปรตอน โดยสมาชิกของ RND family ก็คือ proton antiporter ที่ใช้ความแตกต่างของโปรตอนเป็นพลังในการขับตัวยาออกจากเซลล์ โดยมีการแลกเปลี่ยนกันระหว่าง H<sup>+</sup> ion หนึ่งตัว กับโมเลกุลของยา 1 โมเลกุล โครงสร้างต่อมาของ RND-type efflux protein จะประกอบด้วย transmembrane segment (TMS) 12 ชนิดด้วยกัน โดยมีหางยาว 2 หาง อยู่ระหว่าง TMS 1 และ 2 กับ TMS 7 และ 8 รูปแบบของโปรตีนที่อยู่บนผิวด้านนอก (outer membrane protein; OMP) แบบสามสาย จะทำให้เกิดโครงสร้างที่มีช่องทางเข้าออกของสารละลายขึ้นมา โดยจะทอดผ่านระหว่าง เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) และ periplasmic space สำหรับโปรตีน membrane fusion protein (MFP) จะเกี่ยวข้องกับการทำให้เยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) และเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) เข้าไปใกล้ หรือตั้งอยู่บนโครงสร้างของโปรตีนที่อยู่บนผิวด้านนอก (outer membrane protein; OMP) (Magnet, Courvalin, & Lambert, 2001)

### โปรตีนปั๊มยากลุ่ม Resistance-Nodulation-Division (RND) Family ที่พบในแบคทีเรีย

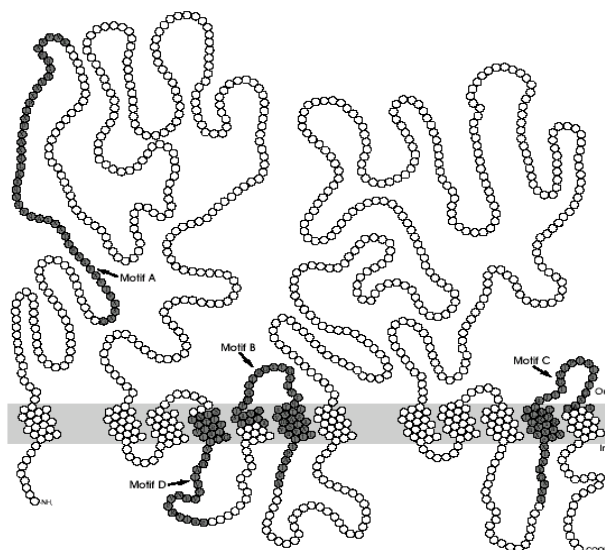
*A. baumannii* มีคุณสมบัติในการดื้อยาหลายขนาน อาจเกิดจากการปรับตัวหรือมียีน *Mdr* ซึ่งมีหน้าที่กำหนดการสร้างโปรตีนปั๊มยาออกนอกเซลล์เมมเบรน (Transmembrane Transporters) ยีนนี้เกิดการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำของโลหะหนักหรือสารพิษภายในร่างกายของผู้ป่วยทำให้เกิดการปรับปรุงโครงสร้างในการปั๊มสารพิษออกนอกเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยาหลายขนานได้พร้อมกัน (Kumar & Schweizer, 2005; Alekshun & Levy, 2007) โดยพบตัวอย่างใน *Neisseria gonorrhoeae* พบโปรตีนกลุ่ม Mtr หรือใน *Klebsiella pneumoniae* พบโปรตีนกลุ่ม RamA และใน *P. aeruginosa* พบยีนและโปรตีนปั๊มยามากกว่าหนึ่งชนิด โดยมีกลุ่มที่สำคัญคือโอเปอรอน *MexAB-OprM* (Gotoh et al., 1995)

โปรตีนในกลุ่มโอเปอรอน *MexAB-OprM* คือยีนที่สร้างโปรตีนในกลุ่ม Resistance-Nodulation-Division (RND) Family คือกลุ่มโปรตีนปั๊มยาที่ฝังทอดยาวระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับเยื่อหุ้มชั้นใน สามารถพบ RND Transporters ได้ในแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่ม RND Transporters จะทำงานร่วมกับ Periplasmic Membrane Fusion Protein (MFP) และ Outer Membrane Factor (OMF) โดย MFP Proteins ประกอบด้วย Single N-terminal TMS และ Large C-terminal Periplasmic Domain ซึ่งจะชักนำให้เกิดการหลอมรวมกันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน ผลจากการทำงาน



ร่วมกันของโปรตีนดังกล่าวเป็นสาเหตุให้เกิดการขับยาและสารพิษผ่านออกจากเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Gotoh et al., 1995)

โปรตีนปั๊มยา กลุ่ม RND Family มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2-2 และ 2-5 เป็นโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ที่ประกอบด้วย 12 TMSb Transporters เหล่านี้ มักจะเป็นโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีนในโครโมโซม และพบว่าโปรตีนดังกล่าวนี้มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านยาแบบหลายขนาน การขนส่งโลหะหนักออกจากเซลล์ การขนส่งโพลิแซคคาไรด์ รวมทั้งขับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic Solvents) ออกจากเซลล์ โดยพบว่าส่วนที่เป็นองค์ประกอบของ RND ในระบบ Transporters นี้เป็นส่วนที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรท (Substrate Specificity) ที่หลากหลาย และมีความสามารถในการขับยาออกจากเซลล์ โดยสามารถขับยาและสารพิษที่อยู่บริเวณที่เป็น Cytoplasm และ Periplasm จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า Transporter ชนิดนี้จะจับกับยาซึ่งเป็นสับสเตรทตรงบริเวณที่เป็น Hydrophobic Region และสามารถที่จะสอดแทรกเข้ามาสู่บริเวณของ Phospholipid Bilayer ได้ ตัวอย่าง เช่น BmrR Transporter ของ *Bacillus subtilis* พบว่ามีลักษณะที่เป็น Hydrophobicity นอกจากนี้พบว่ารูปร่างและขนาดโมเลกุลของยายังมีบทบาทสำคัญมากต่อการจับกับ Transporter Protein ปัจจุบันค้นพบโปรตีนปั๊มยาชนิดนี้ในแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่าง ๆ เช่น *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *A. baumannii* (ตารางที่ 2-1 และ ภาพที่ 2-5) (Putman et al., 2000)



ภาพที่ 2-5 โครงสร้างจำลองของ Multidrug Transporter ชนิด Resistance-Nodulation-Division

Family บริเวณที่แรเงาคือ Residues ของ Conserved Sequences Motifs (Putman et al., 2000)

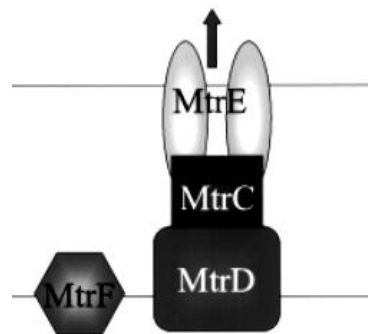
ปัจจุบันมีการค้นพบขึ้นและสามารถแยกขึ้นคือยาปฏิชีวนะและโอเปอรอนของแบคทีเรียมากมายบางสายพันธุ์ที่ใช้ระบบ (RND Family) เช่น *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Burkholderia pseudomallei* และ *A. baumannii* เป็นต้น สามารถแจกแจงลักษณะเด่นของขึ้นและโอเปอรอนสำคัญ ดังตัวอย่างต่อไปนี้คือ (Veen & Konings, 1997; Putman et al., 2000; Magnet et al., 2000; Marchand et al., 2004; Touati et al., 2008)

*P. aeruginosa* มีปั๊มยาหลักที่สำคัญที่สุดคือ RND Pump ซึ่งปั๊มนี้ใช้การทำงานร่วมกันหลายระบบแตกต่างจาก ABC Superfamily ซึ่งใช้การไฮโดรไลต์ ATP เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนแบบปฐมภูมิ ส่วนกลุ่มของ RND Family เป็นแบบทุติยภูมิ มีการใช้พลังงานอนุภาคโปรตอนในการขับเคลื่อน การแตกตัวของอนุภาคโปรตอนที่จะทำให้เกิดโปรตอนคู่โดดเดี่ยวและ Carbonyl Cyanide *m*-chlorophenylhydrazone จะเพิ่มและสะสมในสับสเตรทของแบคทีเรียเพื่อส่งออกตามปกติ RND Pump ของ *P. aeruginosa* มีองค์ประกอบ 3 ส่วนคือ Periplasmic Membrane Fusion Protein (MFP), Outer Membrane Factor (OMF) และ Cytoplasmic Transporter ซึ่งมีรูปแบบโครงสร้างของช่องทางที่ข้ามผ่านระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (ดังภาพ 2-4) ทำให้มีการผ่านของยาประเภท Lipophilic กับ Amphiphilic ออกจากบริเวณ Periplasmic Space และไซโตพลาสซึมไปสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งการถอดรหัสนี้มีการทำงานภายในโอเปอรอนของโครโมโซม (ดังภาพที่ 2-3 และ 2-4) (Kumar & Schweizer, 2005) โปรตีนปั๊มยาของเชื้อ *P. aeruginosa* คือโปรตีน RND Pump ประกอบด้วยโปรตีนย่อยทั้งหมด 10 ชนิด คือ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW, MexPQ-OpmE, MexMN และ Tri ABC ที่สามารถจับกับสับสเตรทต่างชนิดกัน เช่น ยาปฏิชีวนะ ยามาแมลง ลีซอิม ฟังก์ชันฟอก สารละลายอินทรีย์ สารอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และไฮโมเชอรินแกล็คโตน โปรตีนปั๊มของ *P. aeruginosa* ชนิดนี้คือ MexAB-OprM Efflux Pump ซึ่ง MexAB-OprM Efflux Pump เป็นส่วนที่สามารถขนส่งยาหลายประเภทออกนอกเซลล์ เช่น Fluoroquinolone, Tetracycline, Chloramphenicol, Beta-lactams และ Beta-lactamase Inhibitor, Macrolide, Novobiocin, Trimethoprim และ Sulfonamides และขนส่งยาปฏิชีวนะกลุ่มเบตาแลคแตมหลายชนิด เช่น Carboxypenicillins, Aztreonam, Extended-Spectrum Cephalosporin (ตัวอย่าง Cefotaxime และ Cefotaxime), Penems (ตัวอย่างเช่น Meropenem), Carbapenems, Meropenem และ Panipenem จึงเป็นสาเหตุให้เชื้อ *P. aeruginosa* มีความสามารถในการดื้อยาหลายขนาน และมียีน *mexR* (ภาพที่ 2-6) เป็นยีนควบคุมการทำงานของปั๊มชนิดนี้อีกทอดหนึ่งคล้ายกับโปรตีนปั๊มยาของ *E. coli* คือ AcrAB-TolC efflux pump (Lister, Wolter, & Hanson, 2009)



ภาพที่ 2-6 โอเปอรอนของ RND Efflux Pump ใน *P. aeruginosa* แสดงองค์ประกอบและคุณลักษณะของปั๊ม โดยลูกศรสีแดงเข้มเป็น Transcriptional Regulator-encoding Gene ลูกศรสีน้ำเงินเข้ม คือ Membrane Fusion Protein-encoding Gene ลูกศรสีฟ้า RND Transporter-encoding Gene ลูกศรสีแดง Outer Membrane Protein-encoding Gene (Lister, Wolter, & Hanson, 2009)

โปรตีนปั๊มยาของ *N. gonorrhoeae* สามารถปั๊ม Trion X-100 ออกนอกเซลล์ คือชนิด MtrRCDE Efflux Pump ควบคุมด้วยยีนในโครโมโซม คือโอเปอรอน *MtrRCDE* ประกอบด้วยส่วนของ Transcriptional Regulator Gene คือยีน *MtrR*, *MtrC*, *MtrD* และ *MtrE* ซึ่งจะถอดรหัสสำหรับโปรตีน MFP, RND, และ OMP family ตามลำดับ ศึกษาขึ้นโดยการสอดแทรกยีน *MtrC* หรือ *MtrE* (ภาพที่ 2-7) พบว่าจะทำให้ความสามารถต้านทานต่อ Erythromycin, Penicillin, Fatty Acids ลดลง แสดงว่าโปรตีนทั้งสองมีความจำเป็นต่อกระบวนการปั๊มยาออกนอกเซลล์ (Putman et al., 2000)



ภาพที่ 2-7 โครงสร้าง MtrRCDE Efflux Pump ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* RND family efflux pumps ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคในปัจจุบัน (ที่มา: ตัดแปลงจาก Shafer et al., 2008)

โปรตีนปั๊มยาของ *B. pseudomallei* ทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่นำมารักษา เช่น Beta-lactams, Aminoglycosides และ Macrolides เป็นต้น ควบคุมด้วยโอเปอรอน *AmrAB-OprA* ซึ่งถอดรหัสเป็น Multidrug Efflux Pump โปรตีนซับยูนิตที่ทำให้เกิดความต้านทาน

ต่อยาปฏิชีวนะ Aminoglycoside และ Macrolide คือ AmrA และ AmrB มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ โปรตีน MexC และ MexB ใน *P. aeruginosa* ตามลำดับ (Moore et al., 1999; Magnet et al., 2001)

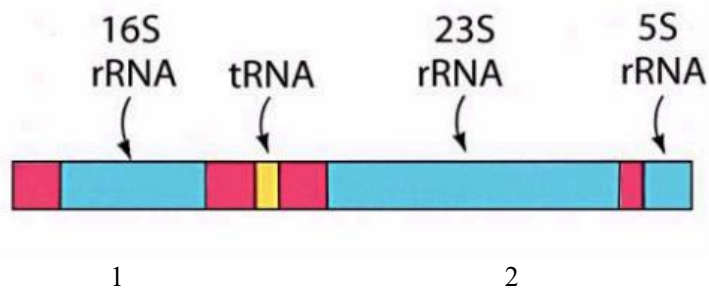
โปรตีนปั๊มยาของ *E. coli* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อสารตีเทอร์เจน ลีซอมีที่มีสถานะเป็นค่า และยาปฏิชีวนะควบคุมด้วยยีน คือ *ArcA* และ *ArcB* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนโอเปอรอนเดียวกัน โดยที่ *ArcA* เป็นโปรตีนปั๊มยาในกลุ่ม MFP Family ในขณะที่ *ArcB* เป็นโปรตีนปั๊มยาในกลุ่ม RND family และผลของการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคสอดแทรกยีนแสดงให้เห็นว่าโปรตีนหน่วย *ArcA* และ *ArcB* มีความจำเป็นต่อการเกิดการดื้อยาหลายขนาน เพราะทำงานร่วมกับ Outer Membrane Protein ที่ชื่อ TolC รวมกลุ่มเป็นโปรตีนปั๊มยาที่สมบูรณ์คือ *ArcAB* efflux system พบว่า TolC (ภาพที่ 2-3) จะประกอบตัวเป็นช่องให้สารละลายผ่านได้ซึ่งช่องดังกล่าวจะแพร่กระจายออกสู่ Outermembrane และ Periplasmic Space ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้สามารถขนส่งสารผ่านเข้าออกระหว่างบริเวณภายในไซโตพลาสซึมและสิ่งแวดล้อมภายนอก (Putman et al., 2000; Jiang et al., 2015)

นอกจากนี้ ยังสามารถพบโปรตีนปั๊มยาได้ในเชื้ออีกหลายชนิดด้วยกัน เช่น ใน *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* และ *Mycobacterium avium* complex พบโปรตีนปั๊มยาในกลุ่ม PMF (Pule et al., 2016) และมีงานวิจัยที่ศึกษาโปรตีนปั๊มยาชนิด RND ได้แก่ *AdeABC* ที่สำรวจยีนนี้จำนวน 14 ตัวอย่างใน *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา Tigecycline แต่ไม่ได้เปรียบเทียบความเหมือนและต่างกับยีน *MexAB* (Yoon et al., 2013) และ *AdeABC* ที่พบใน *A. baumannii* ที่ดื้อต่อ reserpine และ carbonyl cyanide (Pagdepanichkit et al., 2016)

### การจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี

แบคทีเรียในجنัส *Acinetobacter* สามารถแบ่งกลุ่มเป็นสปีชีส์โดยใช้เกณฑ์ จำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน จากการเปรียบเทียบด้วยต้นไม้วิวัฒนาการและเทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี ปัจจุบันมี *Acinetobacter* อยู่ทั้งหมด 32 สายพันธุ์ จำแนกด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แต่เป็นวิธีที่เกิดการผิดพลาดได้ง่าย นอกจากนี้ยังนิยมใช้เปรียบเทียบยีนของโครโมโซม คือ rRNA Operon (*rrn*) ในโปรคาริโอตประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอชนิด 16S, 23S และ 5S การใช้ Intergenic Spacer Regions (16S-23S rRNA Gene ISR และ 23S-5S rRNA Gene ISR) คือดีเอ็นเอที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างยีนสังเคราะห์ rRNA (ดังภาพที่ 2-8) ถึงแม้ว่าการเปรียบเทียบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA จะเป็นที่แพร่หลายในการใช้เป็นตัวชี้วัดเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของโปรคาริโอต แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือถ้าใช้ยีน 16S rRNA เพื่อคัดแยกเชื้อจะไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงทางสายพันธุ์กันมาก ปัจจุบันจึงมีผู้เสนอการใช้ 16S-23S ISR เพื่อการ

เพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับยีน 16S-23S rRNA ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนโดยวิธีการพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เห็นความแตกต่างของเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นทำให้แปลผลได้ยาก ข้อเสียของวิธีนี้คือ จำนวนก๊อปปี้ 16S-23S rRNA ของ Intragenic *rrn* Operon สามารถให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ของแบคทีเรียมากขึ้น ทำให้เกิดความแปรผันทุกครั้งในลำดับนิวคลีโอไทด์และความยาวของ Intergenic Spacer Region (ISR) ของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์จึงมักเกิดจากความแตกต่างระหว่างอัลลีลของ *rrn* operon ภายในลำดับนิวคลีโอไทด์สายเดียวกันได้ จึงเป็นผลให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S RNA ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มากยิ่งขึ้น ทำให้มีความผันแปรของยีนนี้สูงมาก ทำให้การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียผิดพลาดได้ โดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรียอาศัย (Maslunka, Carr, Gürtler, Kämpfer, & Seviour, 2006)



ภาพที่ 2-8 ตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ภายในโอเปอรอนอาร์เอ็นเอ โดยการถอดรหัสจากซ้ายไปขวา แสดงถึงบริเวณอันหลากหลายของ rRNA และแถบสีฟ้าแสดงชิ้นส่วน ยีน 16S, 23S และ 5S หมายเลข 1 คือ บริเวณที่มักใช้เป็นไพรเมอร์ในหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA และหมายเลข 2 คือบริเวณที่มักใช้เป็นไพรเมอร์ในหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 23S rRNA (ที่มา : <http://www.irm.pdx.edu/~newmanl/SynRRNA.GIF>, 2547)

จากงานวิจัยของ Dolzani et al. (1995) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่มีการระบาดมากขึ้นเรื่อย ๆ ได้ทำการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ออกเป็น 5 กลุ่ม คือ Genospecies 2, 3 และ 13 และอีกสองกลุ่มที่เพิ่งค้นพบใหม่ด้วยวิธี DNA-DNA Hybridization หรือวิธี Ribotyping ซึ่งทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่ซับซ้อนและใช้เวลานาน อีกทั้งยังไม่เหมาะในการใช้จำแนกสปีชีส์ในสถานพยาบาล และส่งผลให้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียจันส์เดียวกัน จึงใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอส่วน 16S-23S rRNA Intergenic Spacer (ISR) ควบคุมวิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *NdeII* ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่

เพิ่มขยายได้อีกขึ้นหนึ่ง ซึ่งจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อ *A. baumannii* 36 ตัวอย่าง โดยวิธี DNA-DNA Hybridization พบว่าข้อมูลที่ได้สามารถจำแนกจีโนมและสปีชีส์ของ *A. baumannii* ก่อนข้างได้ผลดีและจำแนกคุณลักษณะเชื้อได้ ถูกต้องมีความแม่นยำยิ่งขึ้น จากนั้นมีผู้วิจัยอีกหลายกลุ่มศึกษาการจำแนกของ *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex จำนวน 68 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ทางฟิโนไทป์เพื่อยืนยันรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการทดสอบการจำแนกสายพันธุ์ในการทดลอง โดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นส่วนที่ถูกตัดจากลำดับดีเอ็นเอของ ISR เทคนิควิเคราะห์ฟิโนไทป์จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถจำแนก *A. calcoaceticus-A. baumannii* Complex ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Dolzani, Tonin, Lagatolla, Prandin, & Monti-Lagatolla, 1995)

ศึกษาการจำแนกจีโนมและสปีชีส์ *A. calcoaceticus, A. baumannii*, Genomic Species 3, Genomic Species 13 TU และ *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex เป็นกลุ่ม *Acinetobacter* ที่มีถิ่นใกล้เคียงกันเป็นอย่างมากและยากในการจำแนกทางฟิโนไทป์ เพื่อแยกออกจากกลุ่มเชื้อ *A. calcoaceticus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคแยกออกจาก *A. baumannii* ที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาส การศึกษาครั้งนี้ด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) โดยใช้ ISR เพื่อจำแนกสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมากเหล่านี้ออกจากกัน จากการทดลองใช้ลำดับ ISR ในเชื้อ 11 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *Acinetobacter* สายพันธุ์อื่น ๆ จำนวน 17 ตัวอย่าง พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR จะมีความยาว 607 ถึง 638 คู่เบส และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันมากในระดับ 0.99-1.0 ทดลองโดยใช้วิธีการในการจำแนกเชื้อ 79 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* (18 ตัวอย่าง) และ *A. baumannii* (61 ตัวอย่าง) ร่วมกับการวิเคราะห์ทางชีวเคมีคือ API 20 NE System มาจำแนก *A. baumannii* (46 ตัวอย่าง), Genomic Species3 (19 ตัวอย่าง) และ Genomic Species 13 TU (11 ตัวอย่าง) ทำให้ทราบว่า ISR นั้นสามารถจำแนกเป็น *Acinetobacter* ได้ละเอียดในระดับสปีชีส์ ได้ถึง 96.2 เปอร์เซ็นต์ (จากทั้งหมด 79 ตัวอย่าง แยกได้ 76 ตัวอย่าง) และสามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มคือ *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค AFLP เพื่อยืนยันผลการจำแนกความถูกต้องของยีนกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นจากฐานข้อมูล GenBank เพื่อปรับปรุงไปใช้ในสถานพยาบาลเพื่อการแยกเชื้อสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (Chang, Wei, Dijkshoorn, Vanechoutte, Tang, & Chang, 2005; Ko et al., 2008)

วิเคราะห์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Ribotyping (Gerner-smidt, 1992) และใช้เอนไซม์ตัดวิเคราะห์ยีน ISR หรือยีนของ rRNA , ยีน *rpoB* และยีน *gyrB* ซึ่งแสดงถึงผลที่ดี แต่มีข้อจำกัดคือมีความผันแปรสูงจากวิวัฒนาการของสายพันธุ์ของแต่ละสปีชีส์ (Vanechoutte et al., 1995) ดังนั้น การใช้บริเวณ ISR ซึ่งเป็นบริเวณยีนระหว่าง 16S และ 23S rRNA เป็นอาจเป็นทางเลือก

อีกวิธีหนึ่งในการคัดแยกสปีชีส์ของแบคทีเรียต่างสายพันธุ์และแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมาก

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้นำเสนอการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียด้วย ISR ซึ่งมีประโยชน์ต่อการศึกษแบคทีเรียสิ่งแวดล้อม ระบาดวิทยา และพยาธิวิทยา สามารถจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ และสามารถวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียตลอดจนยืนยันผลการทดลองด้วยวิธีอื่น ๆ ดังกล่าวข้างต้น ปัจจุบันยังคงต้องอาศัยวิธีการแยกโดยวิธี DNA-DNA Hybridization ซึ่งเป็นวิธีที่เรียกว่าเป็น “Gold Standard” เพื่อการคัดแยกเชื้อให้มีความน่าเชื่อถือ ได้แก่การศึกษาและจำแนกกลุ่มเชื้อ *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* Complex ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเสนอการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายดีเอ็นเอ เพื่อที่จะใช้จำแนกเชื้อ *A. baumannii* (Ko et al., 2008)

การศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์มาก เกี่ยวกับแหล่งที่มาและการแพร่กระจายของการติดเชื้อ คือยาและบ่งบอกความสัมพันธ์ทางระบาดวิทยาได้ ทั้งยังเป็นเครื่องมือที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการช่วย ประเมินผลและการพัฒนามาตรการป้องกันการติดเชื้อ คือยาได้เป็นอย่างดี จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มีนักวิจัยหลายท่านที่ศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเลือกใช้วิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) amplified fragment length polymorphism (AFLP) random amplified polymorphic DNA (RAPD) repetitive element polymerase chain reaction (REP-PCR) amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) ribotyping และ enterobacteria repetitive intergenec consensus (ERIC-PCR) ซึ่งทุกวิธีให้ผลการทดลองที่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือสามารถแยกลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อได้เป็นกลุ่ม และยังสามารถบอกถึงการแพร่ระบาดของเชื้อคือยาได้เช่นเดียวกัน จะแตกต่างก็เพียงในหลักการและวิธีการ แปลผลของแต่ละวิธี (วารสาร แดงอาจ, ธานี วงษ์ชัย, และศิริลักษณ์ ธีระภูธร, 2557) วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (arbitrary primer) และมีขนาดสั้นประมาณ 10-20 นิวคลีโอไทด์ นำผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แล้วเชื่อมด้วยสี่เอธิเดียม โบรไมด์ที่ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ได้มีผู้นำวิธีอาร์เอพีดีมาใช้ศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเชื้อแบคทีเรียทั่วไปรวมถึงใน *A. baumannii* เนื่องจาก เป็นวิธีที่มีความไว ความละเอียด และความจำเพาะสูงใกล้เคียงกับวิธี PFGE รวมทั้งขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สะดวกรวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับคู่เบส ต้นทุนไม่สูงนัก ใช้หลักการเดียวกับการทำพีซีอาร์ จึงสามารถใช้เครื่องมือ

เดียวกันกับการทำพีซีอาร์และให้ผลการแยกกลุ่มใกล้เคียงกับ วิธี PFGE ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard method) ที่สามารถแยกแยะลักษณะความแตกต่าง ทางพันธุกรรมได้เป็นอย่างดี แต่ต้องใช้ เครื่องมือและอุปกรณ์ราคาแพง ขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อน ต้องใช้ความ เชี่ยวชาญ

*Acinetobacter* สามารถจัดกลุ่มสปีชีส์โดยใช้เกณฑ์ จำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ คล้ายคลึงกัน จากการเปรียบเทียบด้วยต้นไม้วิวัฒนาการและการใช้เทคนิคทาง ดีเอ็นเอเทคโนโลยี ปัจจุบันมี *Acinetobacter* อยู่ทั้งหมด 32 สายพันธุ์ จำแนกด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังนิยมใช้เปรียบเทียบยีนของโครโมโซม คือ rRNA Operon (rrn) ในโปรคาริโอต ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอชนิด 16S, 23S และ 5S การใช้ Intergenic Spacer Regions (16S-23S rRNA Gene ISR และ 23S-5S rRNA Gene ISR) คือดีเอ็นเอที่อยู่ตรงรอยต่อ ระหว่างยีนสังเคราะห์ rRNA แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือถ้าใช้ยีน 16S rRNA เพื่อคัดแยกเชื้อจะไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์กันมาก ในปัจจุบันจึงมีผู้เสนอการใช้ 16S-23S ISR เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันมากขึ้น และยังมีการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) กับยีน 16S-23S rRNA ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนโดยวิธีการพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการจำแนกเชื้อ แบคทีเรีย ทำให้เห็นความแตกต่างของเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้ชิดให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นทำให้แปลผลได้ ยาก ข้อเสียของวิธีนี้คือ จำนวนก๊อปปี 16S-23S rRNA ของ Intragenic rrn Operon สามารถให้เกิด ความหลากหลายของสายพันธุ์ของแบคทีเรียมากขึ้น ทำให้เกิดความแปรผันทุกครั้งในลำดับ นิวคลีโอไทด์และความยาวของ Intergenic Spacer Region (ISR) ของแบคทีเรียหลากหลายสาย พันธุ์จึงมักเกิดจากความแตกต่างระหว่างอัลลีลของ rrn operon ภายในลำดับนิวคลีโอไทด์สาย เดียวกันได้ จึงเป็นผลให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S RNA ของแบคทีเรีย แต่ละสายพันธุ์มากยิ่งขึ้น ทำให้มีความผันแปรของยีนนี้สูงมาก ทำให้การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย ผิดพลาดได้ โดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรียอาเคีย (Maslunka, Carr, Gürtler, Kämpfer, & Seviour, 2006)

วิธี DNA-DNA Hybridization พบว่าข้อมูลที่ได้สามารถจำแนกจิ้นสและสปีชีส์ของ *A. baumannii* ค่อนข้างได้ผลดีและจำแนกคุณลักษณะเชื้อได้ ถูกต้องมีความแม่นยำยิ่งขึ้น จากนั้นมี ผู้วิจัยอีกหลายกลุ่มศึกษาการจำแนกของ *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex จำนวน 68 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ทางพีโนไทป์เพื่อยืนยันรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการทดสอบการจำแนกสายพันธุ์ในการทดลอง โดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอแต่ละ ชิ้นส่วนที่ถูกตัดจากลำดับดีเอ็นเอของ ISR เทคนิควิเคราะห์พีโนไทป์จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่ง



สามารถจำแนก *A. calcoaceticus-A. baumannii* Complex ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Dolzani et al., 1995)

ศึกษาการจำแนกจีโนมและสปีชีส์ *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, Genomic Species 3, Genomic Species 13 TU และ *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex เป็นกลุ่ม *Acinetobacter* ที่มียีนใกล้เคียงกันเป็นอย่างมากและยากในการจำแนกทางพีโนไทป์ เพื่อแยกออกจากกลุ่มเชื้อ *A. calcoaceticus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคแยกออกจาก *A. baumannii* ที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาส การศึกษาครั้งนี้ด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) โดยใช้ ISR เพื่อจำแนกสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมากเหล่านี้่ออกจากกัน จากการทดลองใช้ลำดับ ISR ในเชื้อ 11 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *Acinetobacter* สายพันธุ์อื่น ๆ จำนวน 17 ตัวอย่าง พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR จะมีความยาว 607 ถึง 638 คู่เบส และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันมากในระดับ 0.99-1.0 ทดลองโดยใช้วิธีการในการจำแนกเชื้อ 79 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* (18 ตัวอย่าง) และ *A. baumannii* (61 ตัวอย่าง) ร่วมกับการวิเคราะห์ทางชีวเคมีคือ API 20 NE System มาจำแนก *A. baumannii* (46 ตัวอย่าง), Genomic Species3 (19 ตัวอย่าง) และ Genomic Species 13 TU (11 ตัวอย่าง) ทำให้ทราบว่า ISR นั้นสามารถจำแนกเป็น *Acinetobacter* ได้ละเอียดในระดับสปีชีส์ ได้ถึง 96.2 เปอร์เซ็นต์ (จากทั้งหมด 79 ตัวอย่าง แยกได้ 76 ตัวอย่าง) และสามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มคือ *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค AFLP เพื่อยืนยันผลการจำแนกความถูกต้องของยีนกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นจากฐานข้อมูล GenBank เพื่อปรับปรุงไปใช้ในสถานพยาบาลเพื่อการแยกเชื้อสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (Chang et al., 2005; Ko et al., 2008)

วิเคราะห์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Ribotyping (Gerner-smidt, 1992) และใช้เอ็นไซม์ตัดวิเคราะห์ยีน ISR หรือยีนของ rRNA , ยีน *rpoB* และยีน *gyrB* ซึ่งแสดงถึงผลที่ดีแต่มีข้อจำกัดคือมีความผันแปรสูงจากวิวัฒนาการของสายพันธุ์ของแต่ละสปีชีส์ (Vanechoutte et al., 1995) ดังนั้น การใช้บริเวณ ISR ซึ่งเป็นบริเวณยีนระหว่าง 16S และ 23S rRNA เป็นอาจเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งในการคัดแยกสปีชีส์ของแบคทีเรียต่างสายพันธุ์และแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน

การใช้ ISR จึงอาจมีประโยชน์ต่อการศึกษาแบคทีเรียสิ่งแวดล้อม ระบาดวิทยา และพยาธิวิทยา เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์และสามารถวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ได้อย่างชัดเจนจนยืนยันผลการทดลองด้วยวิธีอื่น ๆ ดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเสนอการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ได้อย่างดีด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายดีเอ็นเอ เพื่อที่จะใช้จำแนกเชื้อ *A. baumannii* การศึกษายีน *MexB* นั้น สามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธีการทางอณูชีววิทยา (DNA techniques Chromosomal) ขั้นตอนคือการสกัดดีเอ็นเอ และนำ

ผลผลิตที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gelelectrophoresis (Nobuhisa Masuda et al., 2000) หรือการใช้วิธี real time PCR แทนวิธีการดั้งเดิม (Catherine Llanes et al., 2000) และวิธี Quantitative real time PCR (qRT-PCR) (Mohammad Reza Arabestani et al., 2015) เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผู้ศึกษาต้องการ ทั้งยังประหยัดงบประมาณและเวลา จึงเป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ข้อเสียสำหรับวิธีนี้คือ ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ชัดเจน จึงจะสามารถตรวจสอบผลผลิตที่ถูกต้องได้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุอุปกรณ์

1. Thermal Cycler PCR Machine, MyCycler (Bio-Rad, U.S.A.)
2. Gel electrophoresis machine, Power pac300 (Biorad, U.S.A.)
3. Gel documentation machine, ECX-20-M (Viber lourmat, France)
4. Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, U.S.A)
5. GF-1 Bacterial DNA extraction kit (Vivantis, U.S.A)
6. Centrifuge, Spectrafuge (Labnet, U.S.A)
7. Refrigerator (Toshiba<sup>®</sup>, Thailand)
8. Freezer (Panasonic, Thailand)
9. Block heater (Labnet, U.S.A)
10. Microwave (Sharp, Thailand)
11. Automatic pipette (Gilson, France) with Filter tip (Rainin, U.S.A.)
12. 1.5 and 2.0 ml Microcentrifuge (QSP, U.S.A)
13. Ellectronic balance, BT4202S (Sartorius, Germany)
14. Biological safety cabinet class II type B2 (Nuair, U.S.A.)
15. DNA/RNA UV-cleaner box (Biosan, Latvia)

#### สารเคมี

1. Agarose gel, Analytical grade (Amresco, U.S.A)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (Bio Basic Inc., U.S.A)
3. 10X Loading Dye (Vivantis, U.S.A)
4. 100bp DNA ladder (Invitrogen)
5. Nuclease Free Water (Appllichem, Germany)
6. 100 bp DNA Ladder Plus (Vivantis, U.S.A)
7. 10 mM dNTP Mix (Vivantis, U.S.A)
8. 5 unit *Taq* DNA polymerase (Immolase DNA pol.5U/ul (Bioline, U.S.A.)
9. TBE Buffer
10. เอธิเดียมโบรไมด์ (Promega, U.S.A)

## ไพรเมอร์

ออกแบบจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ไพรเมอร์ คู่ที่ 1 คือ *MexBF-MexBR* และไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ ISR 2F และ ISR 10R (Ko et al., 2008) โดยสังเคราะห์จากบริษัท BioDesign ดังนี้

ไพรเมอร์ คู่ที่ 1 เพื่อจำแนกยีนดีเอซา คือยีน *MexB* ไพรเมอร์คู่นี้ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน (conserve sequence) *MexB* ของ *P. aeruginosa*\* เปรียบเทียบกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนคล้ายกับของ *A. baumannii* จากฐานข้อมูล GenBank ออกแบบด้วยโปรแกรม Primer 3 โดยไพรเมอร์คู่นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้คือ

| ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ Sequence (5'-3') | ขนาดของผลิตภัณฑ์ (คู่เบส) |
|--------------|---|---------------------------|
| <i>MexBF</i> | AGG TCC AGG TGC AGA ACA AG                    | 2,300                     |
| <i>MexBR</i> | GGA ATC GAC CAG CTT TCG TA                    |                           |

\*Reference strain คือแบคทีเรีย *P. aeruginosa* PAO1 (mexB MDR protein, NC002516.2)

(ค่าTm *MexBF* =58.73 และ %GC=55, ค่าTm *MexBR*=58.72 และ %GC=50)

ไพรเมอร์ คู่ที่ 2 ระบุยีนสายพันธุ์เชื้อ *A. baumannii* เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนภายในบริเวณช่องว่างระหว่างยีน 16S rRNA และ 23S rRNA เรียกว่าดีเอ็นเอชนิด 16S-23S ribosomal intergenic spacer region (ISR) อ้างอิงจากโพรบของ Ko et al. (2008) ซึ่งเป็นไพรเมอร์จับหา ISR ของ *A. baumannii* เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง *A. baumannii* กับ *Acinetobacter* spp. อื่น ๆ โดยไพรเมอร์คู่นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้คือ

| ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ Sequence (5'-3') | ขนาดของผลิตภัณฑ์ (คู่เบส) |
|--------------|---|---------------------------|
| ISR 2F       | TTG TAC ACA CCG CCC GTC                       | 1,258                     |
| ISR 10R      | TTC GCC TTT CCC TCA CGG TA                    |                           |

\*Reference strain คือแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* strain XH386 (CP010779.1)

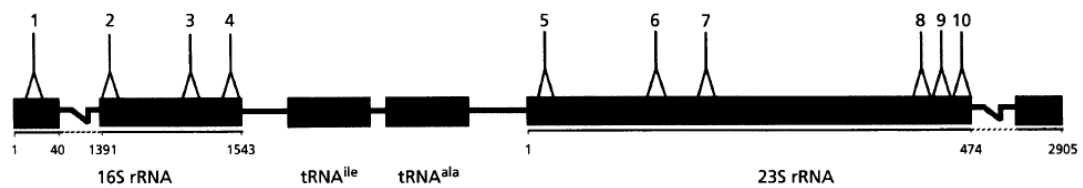
(ค่าTm ISR 2F =59.95 และ %GC=61, ค่าTm ISR 10R =63.57 และ %GC=55)

ไพรเมอร์ คู่ที่ 3 เพื่อจำแนกยีนคือ คือยีน *MexA* ไพรเมอร์คู่นี้ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน (conserve sequence) *MexA* ของ *P. aeruginosa*\* เปรียบเทียบกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนคล้ายกับของ *A. baumannii* จากฐานข้อมูล GenBank ออกแบบด้วยโปรแกรม Primer 3 อ้างอิงจากเนตรชนก สุวรรณะ และ วิสาตรี คงเจริญสุนทร. (2555) โดยไพรเมอร์คู่นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้คือ

| ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ Sequence (5'-3') | ขนาดของผลิตภัณฑ์ (คู่เบส) |
|--------------|---|---------------------------|
| <i>MexAF</i> | CAG CAG CTC TAC CAG ATC GAC                   | 612                       |
| <i>MexAR</i> | TTC GGT AAC CAG CCA CTT GT                    |                           |

\* Reference strain คือแบคทีเรีย *P. aeruginosa* (Accession number L11616)

(ค่าTm *MexAF* =58.73 และ %GC=55, ค่าTm *MexAR*=58.72 และ %GC=50)



ภาพที่ 3-1 ตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ภายในโอเปอรอนอาร์อาร์เอ็นเอ โดยการถอดรหัสจากซ้ายไปขวา เส้นสีดำแสดงถึงบริเวณอันหลากหลายของ rRNA และแถบหนาสีดำแสดงชิ้นส่วนยีน 16S และ 23S หมายเลข 2-4 คือบริเวณที่มักใช้เป็นไพรเมอร์ในหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA หมายเลข 5-10 คือบริเวณที่มักใช้เป็นไพรเมอร์ในหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 23S rRNA ช่องว่างระหว่างไพรเมอร์หมายเลข 4-tRNA gene, ช่องว่างระหว่าง tRNA gene-tRNA gene, ช่องว่างระหว่าง tRNA gene-ไพรเมอร์หมายเลข 5 คือตำแหน่งของบริเวณ ISR (คัดแปลงจาก Gürtler & Stanisich, 1996)

## เชื้อแบคทีเรีย

*A. baumannii* จำนวน 20 ไอโซเลต แบ่งเป็น *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา (multidrug resistance (MDR) 10 ไอโซเลต และ *A. baumannii* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา non- multidrug resistance (non-MDR) จำนวน 10 ไอโซเลต ซึ่งตรวจสอบด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี (ตาราง3-1) ตรวจสอบการดื้อยาด้วยวิธี agar disk diffusion method (ตาราง3-2) และเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยที่รักษา ณ โรงพยาบาลชลบุรี และโรงพยาบาลระยอง ในช่วงเวลาดังแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 โดยการจำแนกเชื้อ MDR นั้นจะต้องดื้ออย่างน้อย 3 กลุ่มจากกลุ่มดังต่อไปนี้ sulfonamide aminoglycosides, penicillin, carbapenems, cephalosporins, quinolone, polymyxin, glycopeptide, macrolid, cefoperazone/sulbactam หรือ tetracycline, beta lactam/beta lactamase combination, fluoroquinolones, lincosamides และ chloramphenical

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* สายพันธุ์ดื้อยาอย่างละ 3 ไอโซเลต, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยที่รักษา ณ โรงพยาบาลระยอง จังหวัดระยอง โดยทั้งหมดอยู่ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 เลี้ยงเชื้อใน NA (nutrient agar) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการทดสอบขั้นต่อไป

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

ตารางที่ 3-1 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. baumannii*

| คุณสมบัติ               | ผล            |                 | ผลการทดสอบของ<br><i>A. baumannii</i> |
|-------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|
|                         | ลบ (Negative) | บวก (Positive)  |                                      |
| Oxidase test            | ไม่มีสี       | สีม่วง          | -                                    |
| Catalase test           | ไม่เกิดฟอง    | เกิดฟอง         | +                                    |
| Sulfide                 | สีเหลือง      | สีดำ            | -                                    |
| Indole production       | ไม่มีสี       | ชมพู            | -                                    |
| Motility                | ไม่ขุ่น       | ขุ่น            | -                                    |
| Nitrate reduction       | ไม่มีสี       | ชมพู-แดง        | -                                    |
| Malonate                | สีเขียว       | สีน้ำเงิน       | -                                    |
| Simmon citrate          | โปร่งแสง      | ขุ่น            | +                                    |
| OF Lactose              | โปร่งแสง      | ขุ่น            | +                                    |
| OF Sucrose              | โปร่งแสง      | ขุ่น            | -                                    |
| OF Manital              | โปร่งแสง      | ขุ่น            | -                                    |
| OF Arabinose            | โปร่งแสง      | ขุ่น            | ±                                    |
| OF Xylose               | โปร่งแสง      | ขุ่น            | +                                    |
| OF Maltose              | โปร่งแสง      | ขุ่น            | -                                    |
| Esculin hydrolysis      | เหลือง        | เทา/ น้ำตาล/ ดำ | -                                    |
| Fermentation of glucose | ฟ้า-เขียว     | เหลือง          | -                                    |
| Arginine dihydrolase    | เหลือง        | ส้ม/ ชมพู/ แดง  | -                                    |
| Urease activity         | เหลือง        | ส้ม/ ชมพู/ แดง  | -                                    |
| β-Galactosidase         | ไม่มีสี       | เหลือง          | -                                    |

ตารางที่ 3-2 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* 20 สายพันธุ์ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ

| 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        | 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   |
| 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   |
| Isolate |             | β-lactam |     |     |     |     | Carbapenem |     |     | Polymycin | Quinolone | Aminoglycoside |     |
|         |             | CRO      | CTX | CAZ | SCF | TZP | IPM        | MEM | ETP | CL        | CIP       | AK             | GEN |
| 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*, 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), เชื้อคือปานกลาง (I; intermediate resistance) และ เชื้อคือต่อยา (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



## วิธีการทดลอง

### การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อทั้งหมด 34 ไอโซเลต ได้แก่ *A. baumannii* คือยา 10 ไอโซเลต, *A. baumannii* ไม่คือยา 10 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *K. pneumoniae* คือยา 2 ไอโซเลต, *E. coli* คือยา 2 ไอโซเลต, *P. aeruginosa* คือยา 2 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยที่รักษา ณ โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa* สายพันธุ์คือยาอย่างละ 3 ไอโซเลต, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่คือยา 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยที่รักษา ณ โรงพยาบาลระยอง จังหวัดระยอง เพาะเลี้ยงเชื้อใน NA (nutrient agar) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อเตรียมสกัด DNA

### การสกัด Chromosomal DNA

เลือกโคลนของเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 BACTERIAL DNA EXTRACTION Kit (Vivantis, U.S.A) มีขั้นตอน คือ เติม buffer R1 จากนั้นเติม Lysozyme เพื่อทำให้เซลล์แตกโดยการทำลายผนังเซลล์ (cell wall lysis) จากนั้นเติม Proteinase K และ RNase เพื่อทำลายโปรตีนและ RNA ตามลำดับ จากนั้นเติม BG buffer เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอ แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol จากนั้นจึงแยกดีเอ็นเอออกจากสิ่งปนเปื้อนที่เหลือ เช่น RNA โดยนำไปโหลด (load) ใส่ลง spin column ชะล้างดีเอ็นเอให้สะอาดอีกครั้งด้วย wash buffer จากนั้นจึงชะดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH 8.0 เก็บใน microtube ขนาด 1.5 ml ได้ดีเอ็นเอปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร (ประมาณ 2-3 ไมโครกรัม) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *MexB* โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของยีน *MexB* ในเชื้อ *A. baumannii* และ เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะคือ forward primer *MexBF* 5' AGG-TCC-AGG-TGC-AGA-ACA-AG 3' และ reverse primer *MexBR* 5' GGA-ATC-GAC-CAG-CTT-TCG-TA 3' (ออกแบบด้วยโปรแกรม Bioedit และ Primer 3 และสังเคราะห์จากบริษัท Biodesign, Thailand) ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 23 µl ประกอบด้วย 10X buffer, 10 mM dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 µM *MexB* primer, 5 unit *Taq* ดีเอ็นเอ polymerase (Immolase DNA pol.5U/ul, Biorline), nuclease water และ 5 µl template ดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ *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

### **การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) โดยวิธี PCR เพื่อยืนยันสายพันธุ์ *Acinetobacter***

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ISR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สามารถจับบริเวณ ISR ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน 16S rRNA กับ 23S rRNA (คู่ไพรเมอร์ ISR 2F และ ISR 10R) ที่ได้ จากวิธี Hybridization (Ko et al., 2008) คือ forward primer ISR 2F; 5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC-3' และ reverse primer ISR 10R; 5'- TTC GCC TTT CCC TCA CGG TA-3' ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 23 µl ประกอบด้วย 10X buffer, 10 mM dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 µM ISR primer, 5 unit *Taq* DNA polymerase (Immolase DNA pol.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

### **การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *MexA* โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)**

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของยีน *MexA* ในเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะคือ forward primer *MexAF* 5' CAG CAG CTC TAC CAG ATC GAC 3' และ reverse primer *MexAR* 5' TTC GGT AAC CAG CCA CTT GT 3' (ออกแบบด้วยโปรแกรม Bioedit และ Primer 3 และสังเคราะห์จากบริษัท Biodesign, Thailand) ในปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับ *MexB* จากนั้นวิเคราะห์ชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอ ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

### การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจาก PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ โดยซังอะกาโรส (Vivantis, U.S.A) 2 g เติม 1X TBE Buffer 100 ml รันเจลภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ตรวจสอบเจลด้วยการย้อมสี Ethidium bromide และตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Gel documentation machine, ECX-20-M (Viber lourmat, France)

### การวิเคราะห์หายีน *MexB* ด้วยวิธี Multiplex polymerase chain reaction

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของยีน *MexB* และ ISR ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ 2 คู่ คือ forward primer ISR 2F; 5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC-3' และ reverse primer ISR 10R; 5'- TTC GCC TTT CCC TCA CGG TA-3' และ forward primer *MexBF* 5' AGG-TCC-AGG-TGC-AGA-ACA-AG 3' และ reverse primer *MexBR* 5' GGA-ATC-GAC-CAG-CTT-TCG-TA 3' (Biodesign) ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 23  $\mu$ l ประกอบด้วย 10X buffer, 10 mM dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 30  $\mu$ M *MexB* และ ISR primer, 5 unit *Taq* ดีเอ็นเอ polymerase (Immolase DNA pol.5U/ul, Bionline), nuclease water และ 5  $\mu$ l template ดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ 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

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### การศึกษาเปรียบเทียบและจำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยาหลายขนาน โดยใช้ยีน *MexB*

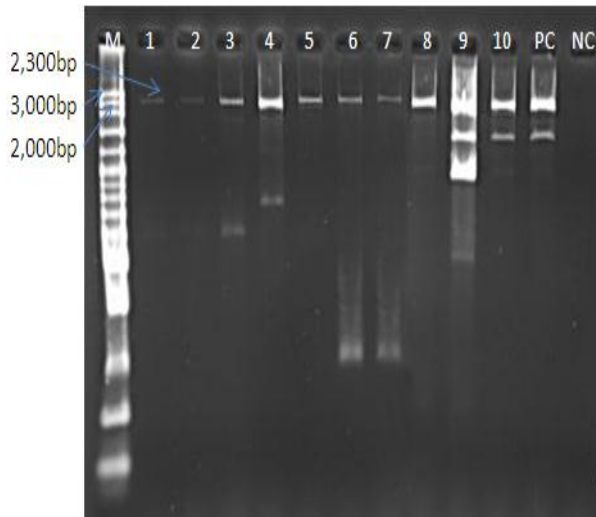
งานวิจัยนี้ได้ทำการจำแนกยีน *MexB* จากเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยา ด้วยการทำให้เชื้ออาร์เพื่อคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* จากสิ่งส่งตรวจ ที่มียีนชนิด *MexB* ยืนยันผลควบคู่กับวิธีวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีการทางชีวเคมี โดยทำการศึกษาจากการนำแบคทีเรีย *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาซึ่งได้รับความอนุเคราะห์สิ่งส่งตรวจ จากโรงพยาบาล ชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง จำนวนอย่างละ 5 ตัวอย่าง มาทำการตรวจวิเคราะห์ นำมาเพิ่มขยายจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตัดแปลงจากโพรบ สำหรับวิธี Hybridization (Ko et al., 2008) และไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ที่ออกแบบวิเคราะห์เทียบเคียงกับบริเวณอนุรักษ์ของยีน *MexB* ของ *P. aeruginosa* และวิเคราะห์เปรียบเทียบกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนคล้ายกับของ *A. baumannii* และยีนคือยาอื่น ๆ จากฐานข้อมูล GenBank ออกแบบด้วยโปรแกรม Primer 3 และไพรเมอร์จำเพาะเพื่อหา *MexB* หลังจากการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่คือยาทั้ง 10 ตัวอย่าง แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *MexB* ซึ่งมีขนาด 2,300 คู่เบส (มีขนาดใกล้เคียงกับความคาดการจากการออกแบบ Primer จาก โปรแกรม Primer 3) (ดังภาพที่ 4-1) และได้นำไปทำการหาลำดับคู่เบสของยีน *MexB* ปรากฏว่าดีเอ็นเอเพิ่มขยายได้ไม่เสถียร ทำให้ไม่สามารถหาลำดับคู่เบสของ *MexB* ได้ นอกจากนี้ยังพบดีเอ็นเอ non specific DNA ขนาด ประมาณ 600 คู่เบสในเลนที่ 3, non specific DNA ขนาด ประมาณ 700 คู่เบสในเลนที่ 4, non specific DNA ขนาด ประมาณ 300 คู่เบสในเลนที่ 6-7 และ non specific DNA ขนาด ประมาณ 1,200 คู่เบส ในเลนที่ 9 (ดังภาพที่ 4-1 A) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ *MexB* สามารถใช้เป็นดัชนียืนยันการตรวจคัดแยกเชื้อ *A. baumannii* คือยาออกจากเชื้อที่ไม่คือยาได้อย่างมีประสิทธิภาพควบคู่กับวิธีทดสอบทางชีวเคมีที่ได้รับการวินิจฉัยจากโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังได้นำไพรเมอร์ *MexB* มาวิเคราะห์เพื่อหา *MexB* โดยนำเชื้อแบคทีเรียคือยาหลายขนานชนิดอื่นๆ มาเพิ่มขยายจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อเปรียบเทียบยีน *MexB* ที่พบเพื่อเปรียบเทียบความจำเพาะของไพรเมอร์ *MexB* ในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยาออกจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดต่างๆ

ผลการเปรียบเทียบยีน *MexB* ของ *A. baumannii* คือยาหลายขนานกับ *A. baumannii* ไม่คือยา เพื่อหาอุบัติการณ์การคือยาของยีน *MexB* พบว่าไพรเมอร์ *MexB* ที่ออกแบบนี้เป็นไพรเมอร์

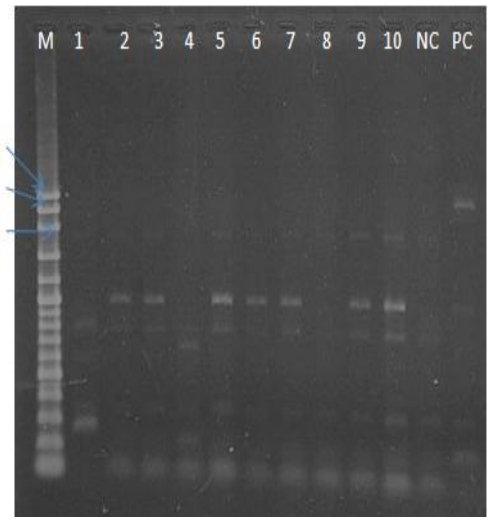
จำเพาะที่สามารถใช้จำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยาหลายขนาน แยกออกจากกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* ไม่คือยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ กล่าวคือไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *MexB* มีขนาดเท่ากับ 2,300 คู่เบส ในกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* ไม่คือยา (ภาพที่ 4-1 B lane 1-10) แต่จะพบยีน *MexB* ขนาด 2,300 คู่เบส เฉพาะในกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* คือยาหลายขนานเท่านั้น อย่างไรก็ตามผลในรูปที่ ภาพที่ 4-1 A และ B ยังแสดงความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบ เพราะพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non specific band) อยู่ด้วย (ขนาดประมาณ 500 คู่เบส) และเมื่อศึกษาคุณสมบัติการค้นพบยีน *MexB* พบว่าเชื้อ *A. baumannii* คือยาที่เก็บจากต่างแหล่งกันคือ โรงพยาบาลชลบุรี และ โรงพยาบาลระยอง จังหวัดชลบุรี ยังคงตรวจพบ ยีน *MexB* ในเชื้อ *A. baumannii* คือยาเช่นเดียวกันคือแถบดีเอ็นเอขนาด 2,300 คู่เบส แต่แตกต่างกัน คือพบแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะเพิ่มเติมที่มีขนาดไม่เท่ากันในโรงพยาบาลสองแห่ง (500-1000 คู่เบส)

นอกจากนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบความจำเพาะของยีน *MexB* ของ *A. baumannii* คือยาหลายขนานกับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกคือยาหลายขนานสายพันธุ์อื่น ๆ (ภาพที่ 4-2 A และ B lane 1-6) พบว่า สามารถพบยีน *MexB* ขนาดเท่ากับ 2,300 คู่เบส ได้เช่นกันในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือยาหลายขนานสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* แต่ไม่พบยีน *MexB* ในแบคทีเรียแกรมบวก คือ MRSA และ *P. aeruginosa* ที่ไม่คือยา แสดงดังภาพที่ 4-2 B ดังนั้นผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ *MexB* ที่ออกแบบมานี้ยังไม่มี ความจำเพาะต่อเฉพาะกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยาหลายขนาน เพราะพบแถบดีเอ็นเอ 2,300 คู่เบส ในแบคทีเรียสายพันธุ์คือยาคืออื่น ๆ ด้วย โดยเฉพาะพบใน *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อต้นแบบในการออกแบบ นอกจากนี้พบข้อสังเกตจากผลของพีซีอาร์จากภาพ 4-2 A และ B ซึ่งพบว่าเชื้อคือยา *P. aeruginosa* ที่ไอโซเลทได้จากต่างแหล่งกันจาก โรงพยาบาลชลบุรี และ โรงพยาบาลระยอง จังหวัดชลบุรี ยังคงตรวจพบ ยีน *MexB* เช่นเดียวกันคือแถบดีเอ็นเอขนาด 2,300 คู่เบส (ภาพ 4-2, เลนส์ที่ 3-4 ในภาพ A และเลนส์ที่ 4-6 ในภาพ B) การพบดีเอ็นเอคล้ายยีน *MexB* ในเชื้อ *P. aeruginosa* แต่ ยีนที่คล้าย *MexB* ที่เพิ่มขยายได้เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดคล้ายกันกับแถบที่พบใน *A. baumannii* คือประมาณ 2,300 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non specific band) เพิ่มเติมจำนวน 1 แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ในเลน 3-5 ภาพ 4-2 A และแถบดีเอ็นเอเพิ่มจำนวน 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 900 และ 1,200 คู่เบสในเลน 2 ภาพ 4-2 A นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะจำนวน 1 แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ในเลน 4-6 ภาพ 4-2 B จากข้อมูลเหล่านี้ ทำให้เราทราบว่า การใช้ยีน *MexB* เพียงชิ้นเดียว ไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อ *A. baumannii* คือยาหลายขนาน ออกจากเชื้อคือยาสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น เชื้อในกลุ่ม *P. aeruginosa* และเชื้อกลุ่ม Enterobacteraceae (แต่ยังคงมีศักยภาพสามารถระบุว่าเป็นเชื้อคือยา แยกจากเชื้อที่ไม่คือยาได้จาก

แถบดีเอ็นเอขนาด 2,300 คู่เบส) จึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจยืนยันสายพันธุ์คือยา *A. baumannii* เพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์อื่น ๆ ควบคู่ด้วย ได้แก่ *Mex A* และ *MexB* ควบคู่กับการตรวจสอบด้วยรูปแบบการคือยา

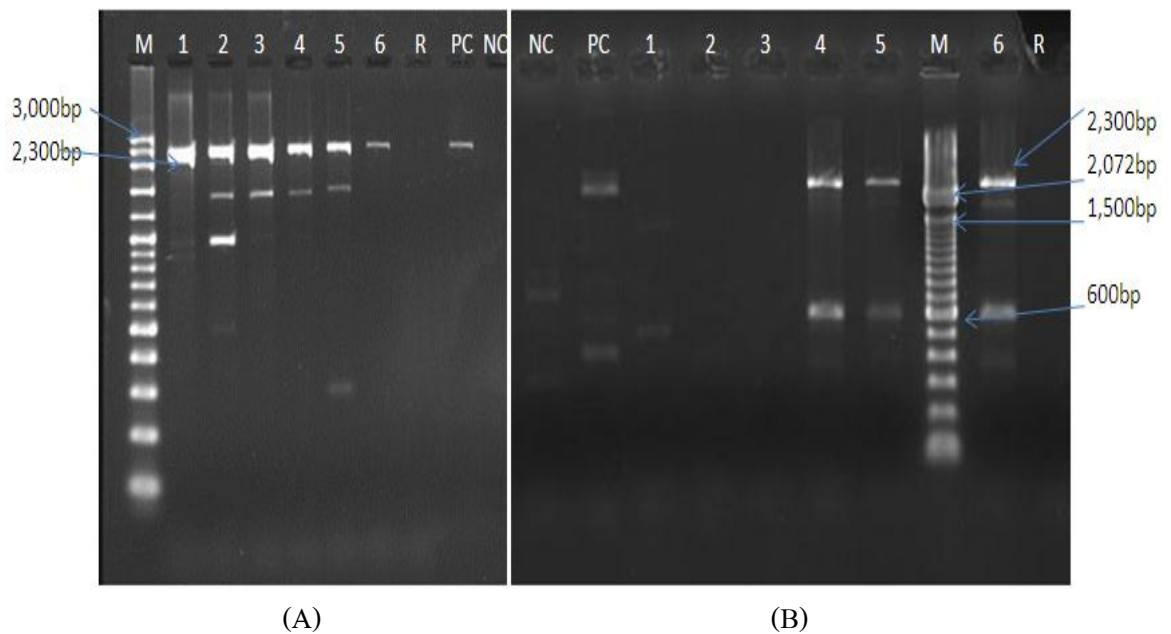


(A: เชื้อคือยา)

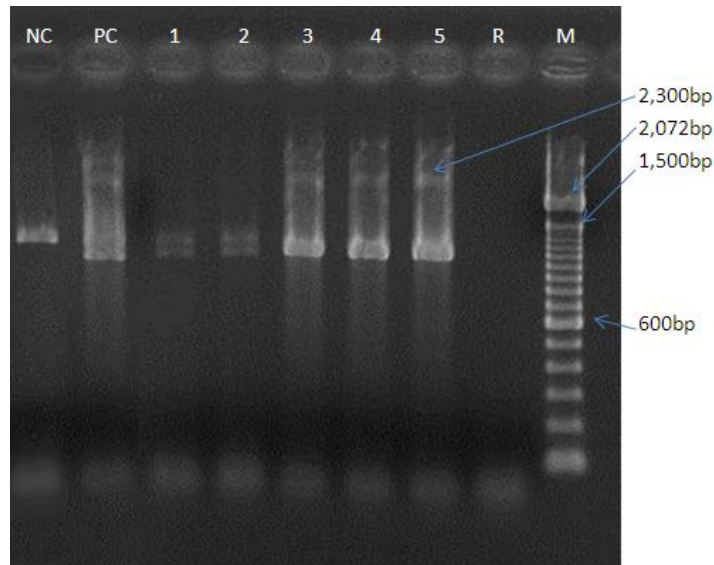


(B: เชื้อไม่คือยา)

ภาพที่ 4-1 แถบ *MexB* DNA ของเชื้อ *A. baumannii* คือยาและไม่คือยา จำนวนอย่างละ 10 ไอโซเลท (1-5A และ 1-5B จากโรงพยาบาลชลบุรี, 6-10A และ 6-10B จากโรงพยาบาลระยอง) แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ (A) lane M: VC 100bp plus DNA ladder (Vivantis), หมายเลข 1-10A พบแถบ 2,300 bp ของยีน *MexB* DNA ของ *A. baumannii* คือยาทั้ง 10 ไอโซเลท, (B) lane M: VC 100bp plus DNA ladder (Vivantis), หมายเลข 1-10B ไม่พบแถบ 2,300 bp ของยีน *MexB* DNA ของ *A. baumannii* ไม่คือยาทั้ง 10 ไอโซเลท, Negative control (NC) คือ Mastermix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA, Positive control (PC) คือ Mastermix ที่เติม DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* คือยา)



ภาพที่ 4-2 PCR product ของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสคือยาและไม่คือยาจากโรงพยาบาลสองแห่ง คือโรงพยาบาลชลบุรี (A) และโรงพยาบาลระยอง (B) แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ (A) 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* พบแถบ 2,300bp ของยีน *MexB* DNA ของเชื้อคือยาทั้ง 6 ไอโซเลต, lane R: Master mix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA template, (B) lane M: 100bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-3 เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ไม่พบแถบ 2,300bp ของยีน *MexB* DNA, หมายเลข 4-6 เชื้อ *P. aeruginosa* พบแถบ 2,300 คู่เบส ของยีน *MexB* DNA ของเชื้อคือยาทั้ง 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* คือยา



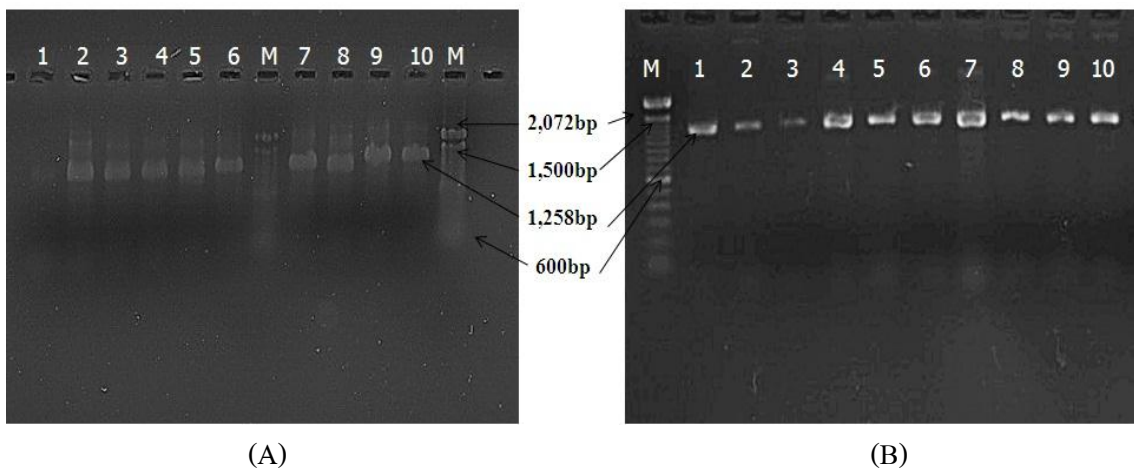
ภาพที่ 4-3 เปรียบเทียบ *MexB* PCR product ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ไม่คือยาจำนวน 2 ไอโซเลท (1-2) และ *MexB* DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่คือยาจำนวน 3 ไอโซเลท (3-5) และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ lane M: 100 bp plus DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-2 เชื้อ *P. aeruginosa* ไม่คือยา ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,300bp หมายเลข 3-5 เชื้อ *P. aeruginosa* คือยา พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,300 คู่เบส, lane R: Master mix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA template , Negative control (NC) คือ Mastermix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA, Positive control (PC) คือ Mastermix ที่เติม DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* คือยา)

### การศึกษาเปรียบเทียบและจำแนกเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)

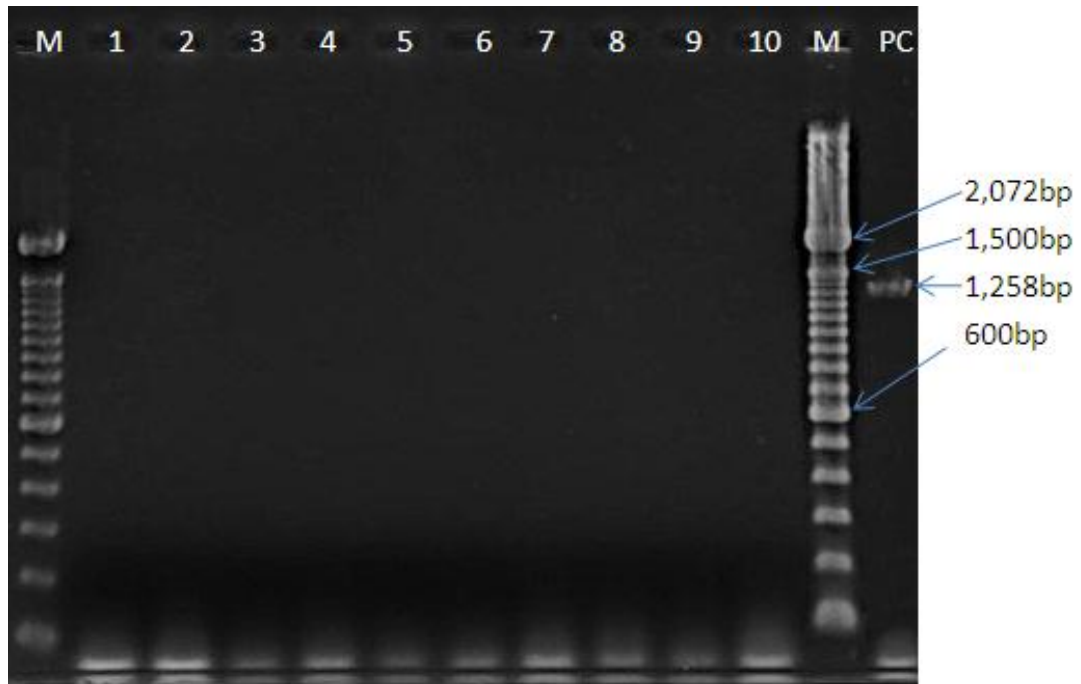
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ โดยใช้ดัชนีที่สามารถแยกจีโนมและสปีชีส์ของเชื้อนี้ได้อย่างแม่นยำคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ISR ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ใช้ไพรเมอร์ที่ดัดแปลงจากโพรบ สำหรับวิธี Hybridization (Ko et al., 2008) เพื่อจะนำไปตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* จากสิ่งส่งตรวจยืนยันผลควบคู่กับวิธีระบุสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธีการทางชีวเคมี โดยทำการศึกษาจากการนำแบคทีเรีย *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยองที่เก็บได้จากสิ่งส่งตรวจจำนวนอย่างละ 5 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์ ด้วยการเพิ่มขยายจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ วิธีพีซีอาร์ พบว่าเชื้อ *A. baumannii* รวมทั้งสายพันธุ์ที่คือยาและไม่คือยาปฏิกิริยาทั้ง 20 ตัวอย่าง



แสดงแถบของ ISR ซึ่งมีขนาด 1,258 คู่เบส (ดังภาพที่ 4-4) แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ISR มีความจำเพาะสูงมาก เพราะสามารถใช้ยืนยันการคัดแยกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อชนิดกลุ่ม Enterobacteraceae อื่นๆ ได้แก่ *K. pneumoniae* เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อแกรมบวกคือยา MRSA และเชื้อ *A. baumannii* ที่มาจากแหล่งเก็บที่แตกต่างกันคือจากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง จังหวัดชลบุรี และเชื้อที่เก็บได้มาจากต่างเวลากัน ต่างยังคงพบแถบดีเอ็นเอ ISR ขนาด 1,258 คู่เบสเช่นเดิมคงที่เสมอ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ไพรเมอร์ ISR สามารถระบุสายพันธุ์ของ *A. baumannii* ได้อย่างถูกต้องและมีความจำเพาะสูง แสดงดังภาพที่ 4-4 และ ภาพที่ 4-5 นอกจากนี้ ยังได้เพิ่มขยายจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ ISR ด้วยวิธีพีซีอาร์ ในแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก (ภาพที่ 4-5) ทำให้ทราบว่าสามารถแยกเชื้อต่างสายพันธุ์กันได้ ด้วยการใช้ไพรเมอร์ ISR ในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดอื่น ๆ



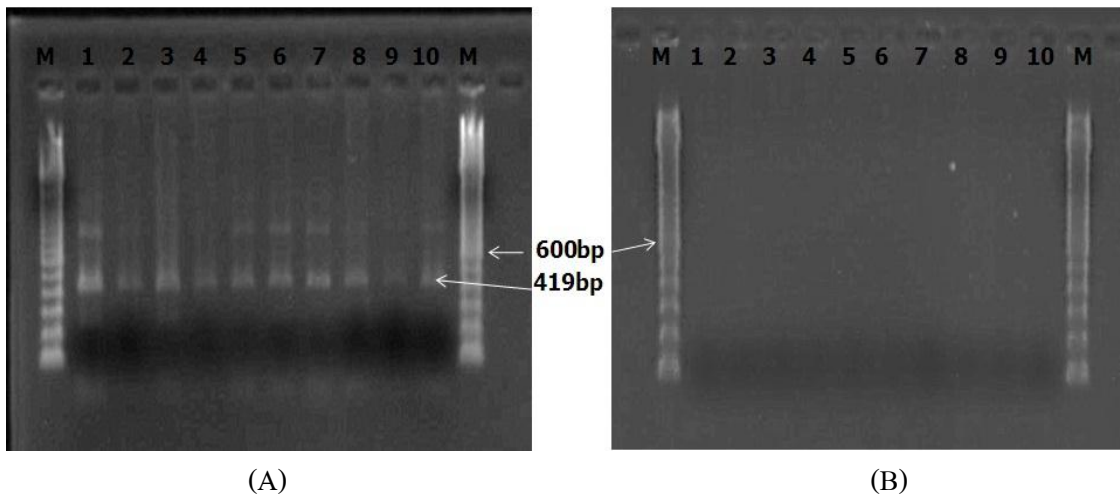
ภาพที่ 4-4 เปรียบเทียบ ISR PCR product ของเชื้อ *A. baumannii* คือยา (หมายเลข 1-5 A และ 1-5 B) ที่ได้จากโรงพยาบาลชลบุรี และไม่คือยา (หมายเลข 6-10 A และ 6-10 B) ที่ได้จากโรงพยาบาลระยอง ซึ่งทั้งหมดเก็บตัวอย่างระหว่าง มีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 วิเคราะห์ด้วยวิธี PCR แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ (A) lane M:100bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-10 พบแถบ 1,258 คู่เบส ของยีน ISR DNA ของ *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาทั้ง 10 ไอโซเลต, (B) lane M:100 bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 11-20 พบแถบ 1,258 bp ของยีน ISR DNA ของ *A. baumannii* คือยาและไม่คือยาทั้ง 10 ไอโซเลต



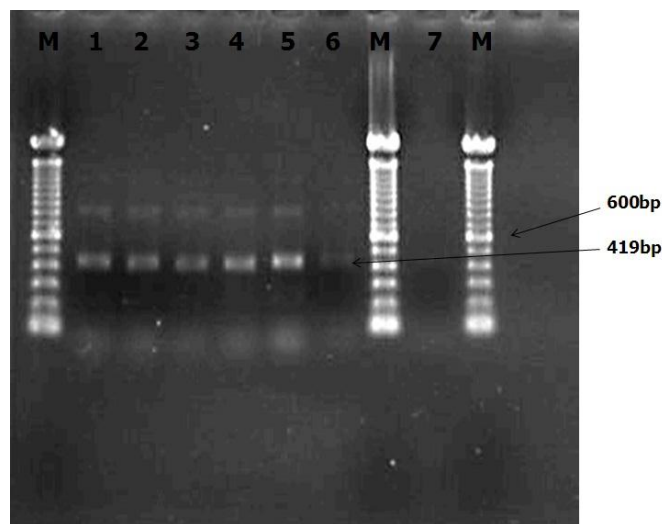
ภาพที่ 4-5 เปรียบเทียบ ISR PCR product ของเชื้ออื่นๆที่ดื้อยา (หมายเลข 1-6) จากโรงพยาบาล ชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง (หมายเลข 7-10) แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ lane M:100 bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-2 เชื้อ *K. pneumoniae*, หมายเลข 3-4 เชื้อ *P. aeruginosa*, หมายเลข 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*)

## การศึกษาเปรียบเทียบและจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ด้อยาหลายขนาน โดยใช้ยีน *MexA*

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาและยืนยันผลการใช้ ยีน *MexA* ในการจำแนกยีน *MexA* จากเชื้อ *A. baumannii* ด้อยา ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลสองแห่ง และเพื่อศึกษาเรื่องการคงอยู่ (stability) ของยีนกลุ่ม RND pump ในเชื้อ *A. baumannii* ด้อยา และเพื่อใช้ในการสุ่มตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ที่ด้อยา เปรียบเทียบกับกลุ่มเชื้อที่ไม่มียีนด้อยาจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่เชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง จำนวนอย่างละ 5 ตัวอย่าง ผลการวิจัยหลังจากการได้ยืนยันผลจากการระบุสายพันธุ์ด้วย ISR แล้ว พบว่าเชื้อทั้ง 10 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ด้อยา แสดงแถบของยีน *MexA* ซึ่งมีขนาด 419 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะขนาด 1,175 (มีขนาดใกล้เคียงกับ ISR) ดังภาพที่ 4-6 แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ *MexA* สามารถใช้เป็นดัชนียืนยันการตรวจคัดแยกเชื้อ *A. baumannii* ด้อยาออกจากเชื้อที่ไม่ด้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกันกับ *MexB* นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ความจำเพาะของไพรเมอร์ของยีน *MexA* ในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ด้อยาออกจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 4-7 ซึ่งผลการวิเคราะห์จากรูปนี้แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ด้อยา ออกจากเชื้อกลุ่มๆ อื่นๆ ด้วยไพรเมอร์ของยีน *MexA* เพราะเชื้อด้อยาสายพันธุ์อื่นๆ ยังคงตรวจพบยีนคล้าย *MexA* เช่นเดียวกัน (พบดีเอ็นเอขนาด 1,175 คู่เบส และขนาด 419 คู่เบส) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อด้อยาเหล่านี้ต่างก็พบยีนกลุ่ม RND เช่นเดียวกับเชื้อ *A. baumannii* ด้อยา และเชื้อเหล่านี้ อาจเป็นเชื้อด้อยาหลายขนานเช่นเดียวกับเชื้อ *A. baumannii* ด้อยา



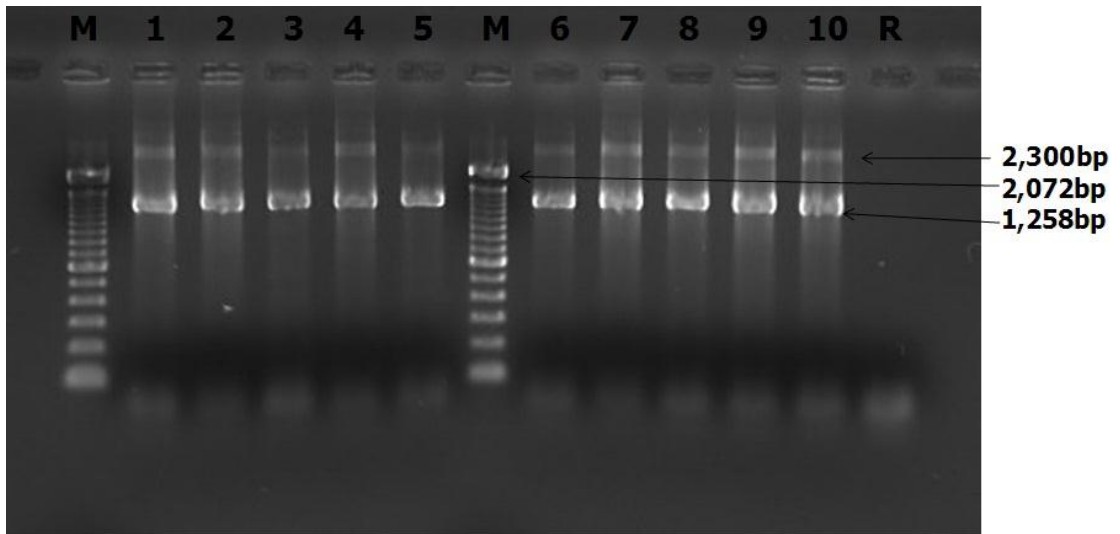
ภาพที่ 4-6 เปรียบเทียบ *MexA* PCR product ของเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยาจำนวน 10 ไอโซเลท (A) จากโรงพยาบาลชลบุรี (1-5) และโรงพยาบาลระยอง (6-10) เปรียบเทียบกับแถบ *MexA* DNA ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่คือยา จำนวน 10 ไอโซเลท (B) จากโรงพยาบาลชลบุรี (1-5) และโรงพยาบาลระยอง (6-10) วิเคราะห์ด้วยวิธี PCR และแยกดีเอ็นเอด้วย กระแสไฟฟ้าโดยใช้ด้วยอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์, lane M: 100 bp DNA ladder (Invitrogen)



ภาพที่ 4-7 *MexA* PCR product ของเชื้ออื่น ๆ ที่คือยา จำนวน 6 ไอโซเลท วิเคราะห์ด้วยวิธี PCR, lane M:100bp DNA ladder (Invitrogen), หมายเลข 1-2 เชื้อ *K. pneumoniae*, หมายเลข 3-4 เชื้อ *P. aeruginosa*, หมายเลข 5-6 เชื้อ *E. coli* พบแถบ 419 คู่เบส ของยีน *MexA* ของเชื้อคือยาทั้ง 6 ไอโซเลท, lane 7: Master mix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA template

## การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR เพื่อใช้คัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาออกจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาออกแบบเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์สองคู่คือยีน *MexB* (*MexBR* กับ *MexBF*) และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ ISR (*ISR 2F* กับ *ISR 10R*) เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนคล้าย *MexB* และลำดับนิวคลีโอไทด์ ISR ในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อคัดกรอง *A. baumannii* ออกจากเชื้อชนิดอื่นและค้นหา *MexB* ในคราวเดียวกันโดยทดสอบกับตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ทั้งดื้อยาและไม่ดื้อยาจำนวน 10 ตัวอย่าง จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค Multiplex PCR ที่ออกแบบเพื่อค้นหา *MexB* และ ISR ไปพร้อมกันนั้นสามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* และสามารถคัดกรองหายีนต้านยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาแยกออกจากเชื้อ *A. baumannii* ไม่ดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ภาพที่ 4-8 แถบที่ 1-10) เพราะพบแถบดีเอ็นเอของยีน *MexB* ขนาด 2,300 คู่เบส และแถบของ ISR ขนาด 1,258 คู่เบส ในตัวอย่างเฉพาะกลุ่ม *A. baumannii* ดังนั้นเทคนิค Multiplex PCR นี้ มีประโยชน์ เพราะทำให้สามารถตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาออกจากเชื้อที่ไม่ดื้อยาชนิดอื่น ๆ โดยไม่ต้องใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยีที่ยุ่งยากเพื่อระบุหายีนดื้อยา เช่น DNA Hybridization หรือ ribotyping นอกจากนี้ในอนาคตจะทำการตรวจสอบด้วยวิธี Multiplex PCR เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของความจำเพาะของไพรเมอร์สองคู่ได้แก่ ได้แก่ ยีน *MexB* และ ISR หรือสามคู่ ได้แก่ ยีน *MexA* ยีน *MexB* และ ISR ด้วยเทคนิค Multiplex PCR นอกจากนั้นจะต้องเพื่อพิสูจน์ความไวจำเพาะ และความแม่นยำของไพรเมอร์ทั้งสามชนิดนี้ในการคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา ออกจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เช่น แบคทีเรียดื้อยาในกลุ่มฉวยโอกาสที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นปัญหาก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 4-8 PCR product จากเทคนิค Multiplex PCR ของเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้ไพรเมอร์สองคู่ คือ ISR 2F กับ ISR 10R และ MexBF กับ MexBR โดยใช้อุณหภูมิ Denaturation คือ 95 องศาเซลเซียส Annealing คือ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า บนอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์, หมายเลข 1-5 คือตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ด้อยจากโรงพยาบาลชลบุรี (พบดีเอ็นเอขนาด 1,258 คู่เบสและ 2,300 คู่เบส หมายเลข 6-10 คือตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ด้อยจากโรงพยาบาลชลบุรี (พบดีเอ็นเอขนาด 1,258 คู่เบส และ 2,300 คู่เบส, lane M: 100 bp DNA ladder (Invitrogen), lane R: Master mix ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA template

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนยีน *MexB* ที่ออกแบบให้จำเพาะกับ *A. baumannii* เพื่อใช้แยกดีเอ็นเอที่คล้ายยีน *MexB* จาก *A. baumannii* คือยา และจากผลการใช้ไพรเมอร์คู่ *MexB* จำแนกนั้น สรุปได้ว่าสามารถตรวจพบยีน *MexB* ได้เฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่คือยาหลายขนาน แต่ไม่พบยีน *MexB* ใน *A. baumannii* ที่ไม่คือยา ดังนั้นไพรเมอร์คู่นี้จึงสามารถนำมาใช้คัดกรองเชื้อ *A. baumannii* คือยาออกจากกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่คือยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตรวจไม่พบยีน *MexB* 10 ไอโซเลท จากเชื้อ *A. baumannii* 10 ไอโซเลท คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) และสามารถตรวจพบการแพร่กระจายของยีน *MexB* นี้ในเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยาในสองเขตจังหวัดชลบุรีและระยอง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (สำรวจจากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยองจำนวนตัวอย่าง *A. baumannii* คือยา 10 ไอโซเลท พบยีน *MexB* 10 ไอโซเลท) งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของยีนนี้ในสองจังหวัดในเขตภาคตะวันออก และมีโอกาสที่จะพบการแพร่กระจายของยีนไปทั่วประเทศ จากรายงานการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* คือยาพบว่ามีอัตราการระบาดเพิ่มสูงขึ้นในทุกๆปี (Chaiwarith et al., 2005) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้พบว่ายีน *MexB* ที่แยกได้จากวิธีพีซีอาร์นี้มีความจำเพาะต่ำ เพราะเมื่อตรวจหายีน *MexB* นี้ในเชื้อกลุ่มอื่น ๆ เช่น *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ที่คือยาพบแถบดีเอ็นเอคล้ายยีน *MexB* เช่นเดียวกับที่ตรวจพบในเชื้อ *A. baumannii* คือยา และพบแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะ ขนาดสั้นกว่า ยีน *MexB* (ที่คาดไว้จากการออกแบบ) คือขนาด 300-1,200 คู่เบส เพิ่มเติมจำนวน 1-2 แถบแล้วแต่ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา ซึ่งอธิบายได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นนี้ยังไม่จำเพาะ และดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายได้ก็ไม่เสถียรพอที่จะนำไปหาลำดับคู่เบสได้ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST ได้ จึงไม่ทราบขนาดที่แท้จริงของยีน *MexB* ที่เพิ่มขยายได้จากเชื้อต้นแบบ *A. baumannii* คือยาหลายขนาน และแถบ non specific DNA นี้ น่าจะเกิดจาก เชื้ออื่นๆ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจต่างก็มีแนวโน้มจะคือยา เพราะตรวจพบยีนดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับขนาด 2,300 คู่เบส เช่นกัน อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอที่คล้าย ยีน *MexB* และมีขนาดหลากหลายคือ เท่ากับ 2,300 คู่เบส และ 300-1,200 คู่เบส เหล่านี้ ก็น่าจะเป็นยีนกลุ่ม RND Family เช่นเดียวกับที่พบใน *A. baumannii* ที่คือยาหลายขนาน ยีนดีเอ็นเอที่พบเหล่านี้ อาจเกิดจากดีเอ็นเอที่กำหนดการสร้างโปรตีนหลาย subunit ของยีนกลุ่ม RND จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะขนาด 300-1,200 คู่เบส เพิ่มเติม ผลการวิจัยนี้ได้ทำการยืนยันตามข้อสมมุติฐานได้จากการพบดีเอ็นเอไม่จำเพาะใน *P. aeruginosa* ซึ่งอาจจะเป็นยีนกลุ่ม RND Family ที่คล้ายคลึงกันคือ โอเปอรอน

*MexAB-OprM* แต่ลำดับเบสอาจแตกต่างกัน (เป็นสาเหตุทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* มีรูปแบบการดื้อยาที่คล้าย *A. baumannii* จากการวิจัยนี้ เช่น Fluoroquinolone, Tetracycline, Chloramphenicol, Beta-lactams และ Beta-lactamase Inhibitor, Macrolide, Novobiocin, Trimethoprim และ Sulfonamides และการขนส่งยาปฏิชีวนะกลุ่มเบตาแลคแตมหลายชนิด เช่น Carboxypenicillins, Aztreonam, Extended-Spectrum Cephalosporin (ตัวอย่าง Ceftazidime และ Cefotaxime), Penems (ตัวอย่างเช่น Faropenem), Carbapenems, Meropenem และ Panipenem) (Lister, Wolter, & Hanson, 2009) นอกจากนี้ผลการวิจัยนี้ได้สนับสนุนการค้นพบยีนกลุ่ม RND คือ *AdeABC* ที่สำรวจการแสดงออกของยีนนี้จากเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* 14 ตัวอย่างที่ดื้อยา Tigecycline แต่ไม่ได้เปรียบเทียบความเหมือนและต่างกับยีน *MexAB* (Yoon et al., 2013) และศึกษาการแสดงออกของยีน *AdeABC* ที่พบใน *A. baumannii* ที่ดื้อต่อ reserpine และ carbonyl cyanide (Pagdepanichkit et al., 2016) ส่วนผลการวิจัยครั้งนี้พบแถบ non specific DNA ขนาด 1,500 คู่เบส เพิ่มเติมจากแถบดีเอ็นเอ 2,300 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าใน *E. coli* ก็อาจจะพบยีนกลุ่ม RND Family ที่คล้ายคลึงกันกับใน *A. baumannii* ที่ดื้อยาได้เช่นเดียวกัน แต่พบขนาดชิ้นดีเอ็นเอย่อยเพิ่มเติมและขนาดใหญ่กว่าของ *A. baumannii* แสดงให้เห็นว่ายีน *A. baumannii* ที่สำรวจพบอาจมีขนาดและลำดับเบสที่แตกต่างจากยีน RND ที่พบใน *E. coli* เพราะพบหลักฐานงานวิจัยที่สนับสนุนจากการค้นพบโปรตีนปั๊มยาในเชื้อ *E. coli* คือ AcrAB-TolC efflux pump (Putman et al., 2000; Lister, Wolter & Hanson, 2009) นอกจากนี้งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *K. pneumoniae* ก็พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,300 คู่เบส ร่วมกับชิ้น non specific DNA ขนาด 1,500 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก 500 คู่เบส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ *MexB* นี้ยังสามารถเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอที่คล้ายยีน *MexB* ได้ใน *K. pneumoniae* เช่นเดียวกัน แสดงว่าเชื่อนี้ก็มีแนวโน้มจะดื้อยาเช่นเดียวกันกับยีน RND ที่พบใน *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* แต่ขนาดของยีนและลำดับเบสของยีน RND ที่สำรวจพบอาจจะมีขนาดและลำดับเบสแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามต้องพิสูจน์โดยการทำ sequencing ในขั้นต่อไปเพื่อหาขนาดของแถบดีเอ็นเอของ *MexB* ที่พบทั้งหมดนี้มาพิสูจน์และเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BLAST แต่เนื่องจากดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายได้จากไพรเมอร์คู่นี้ไม่เสถียร และไม่คงทนเพียงพอในการนำไปหาลำดับคู่เบส หรือมีขนาดชิ้นใหญ่มากเกินไปประสิทธิภาพของ Tag ที่จะปรับสภาพให้คงอยู่นานพอเพื่อนำไป cloning หรือนำไปหาลำดับคู่เบส นอกจากนี้ไพรเมอร์คู่นี้สามารถตรวจคัดกรองแยกเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาออกจากกลุ่มไม่ดื้อยาได้ เพราะจะไม่พบยีน *MexB* ใน *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ที่ไม่ดื้อยา ข้อสังเกตคือ ในเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกคืออาจจะไม่พบยีน *MexB* ตรงตามความคาดหมาย เพราะ MRSA ไม่มียีนชุด RND (Laura & Piddock, 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า คู่ไพรเมอร์ของยีน *MexB* นี้สามารถที่จะตรวจคัดกรองแยกเชื้อที่ดื้อยาออกจากกลุ่มเชื้อ



ที่ไม่ดีอย่างไร แต่ไม่จำเป็นต่อการตรวจหาเชื้อที่เป็นกลุ่มเชื้อคือยากกลุ่มแกรมลบด้วยตัวเอง ซึ่งจะต้องนำไพรเมอร์นี้ไปปรับปรุงโดยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ จากบริเวณ homologous DNA หรือเป็นบริเวณ conserve อื่นๆของ RND ในเชื้อ *A. baumannii* ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายได้ หรือออกแบบไพรเมอร์ ชนิด inner primer จากดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายได้ชิ้นแรก ด้วยการทำ Nested PCR หรือใช้ไพรเมอร์คู่ *MexA* และ *MexB* ร่วมกันในการทำ Multiplex PCR ควบคู่กับการนำคู่ไพรเมอร์ ISR มาใช้ร่วมในการตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ในลำดับต่อไป

นอกจากนี้จากฐานข้อมูลยังพบการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนคือยาอื่น ๆ ในฐานข้อมูลจาก GenBank พบว่ายีนคือยาที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากการวิจัยในครั้งนี้อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันกับกลุ่มยีนบีมายาหลายขนาน 3 กลุ่ม ซึ่งโปรตีน RND ของ *MexB* จากงานวิจัยครั้งนี้คล้ายกับยีน *AdeB* ของ *A. baumannii* (Magnet et al., 2001)

จากการทดลองนั้นพบแถบ DNA มีขนาดที่แตกต่างจากตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มฉวยโอกาสชนิดอื่นอย่างชัดเจน จึงทำให้สามารถระบุและคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ในระดับสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำเทียบเท่ากับวิธีทดสอบทางชีวเคมีซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ใช้ ISR ในการแยกเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* แต่การแยก *S. aureus* ต้องเพิ่มเติมวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ หรือ ribotyping ควบคู่เพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง (Villard et al., 2006) สำหรับการใช้นิวคลีโอไทด์ Pulsed – Field Gel Electrophoresis (PFGE) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Gräser et al, 1993; Allardet-Servent et al., 1989; Gouby et al, 1992; Putman et al., 2000) สำหรับหารูปแบบจำเพาะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เป็นเทคนิคที่มีความละเอียดสูงมาก ผู้ใช้จำเป็นต้องมีความชำนาญการ ตลอดจนการเสียค่าใช้จ่ายสูง ทำให้เทคนิคนี้ไม่เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ตรวจโรคตามสถานพยาบาล (Bergogne-Bérézin & Towmer, 1996)

งานวิจัยข้างต้นนี้ได้ทำการยืนยันประสิทธิภาพของไพรเมอร์ ISR เพื่อยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างดีเอ็นเอ 16S-23S rRNA แทน 16sDNA gene เพื่อทดแทนวิธีการดั้งเดิมด้วยการใช้โพรบและเทคนิค DNA-DNA Hybridization (Ko et al., 2008) ซึ่งงานวิจัยนี้ช่วยยืนยันผลว่าไพรเมอร์ ISR 2F และ ISR 10R มีความแม่นยำสูงมาก เพราะให้ผลการตรวจสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานได้แก่ *A. baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* 25001 CMCC (B) และ *A. baumannii* 29108 CMCC (B) พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 98-99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้อยู่บนแผนที่ยีน RNA Operon ระหว่างลำดับเบสที่ 478-1391 คู่เบส (Gürtler & Stanisich, 1996) (แสดงในตารางภาคผนวกที่ ก 2) จึงสามารถยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจอย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็วกว่าการเพาะเชื้อและใช้เทคนิคทางชีวเคมี และคู่ไพรเมอร์ ISR นี้ทำให้ทราบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์

บริเวณนอกยีน rRNA มีขนาดดีเอ็นเอที่จำเพาะมากขนาด 1,230 คู่เบส แต่ลำดับเบสจากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้ามีขนาด 1,258 คู่เบสซึ่งคลาดเคลื่อนเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับคู่ ISR ต้นแบบ พยากรณ์จากแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานเป็นต้นแบบคือ *A. baumannii* strain XH386 (CP010779.1) และ *A. baumannii* strain 29108 (ตารางภาคผนวกที่ ก-2) ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์ ISR คู่นี้ เพื่อแยกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อแกรมบวกและแกรมลบสายพันธุ์อื่นๆ อาทิ เช่น *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* คือยา และแยกออกจาก MRSA และ *P. aeruginosa* ที่ไม่ใช่ยา (ไม่พบแถบดีเอ็นเอของ ISR ขนาด 1,258 คู่เบส จึงทำให้สามารถระบุและคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ในระดับสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำเทียบเท่ากับวิธีทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งเทคนิคทาง PCR นี้เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ ใช้ระยะเวลาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม การเปรียบเทียบดีเอ็นเอของ ISR จากเชื้อ *A. baumannii* ด้วยพีซีอาร์ พบว่ามีรูปแบบที่ความแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียคือยาชนิดอื่น ๆ มีเพียงเชื้อกลุ่มที่ไม่ใช่ยาและ MRSA ที่ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอของ ISR เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อทั้งสอง (Gürtler & Barrie, 1995)

จากการทดลองเปรียบเทียบบริเวณดีเอ็นเอของ ISR ของ *A. baumannii* กับแบคทีเรียกลุ่มคือยาชนิดอื่น ทำให้สามารถจำแนกและตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้ ISR ในการจำแนกเชื้อกลุ่ม *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex ที่ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Sequence analysis ร่วมกับการยืนยันผลด้วยวิธีการทางชีวเคมี คือ API 20 NE (Chang et al., 2005) การทดลองนี้มีความรวดเร็วกว่าการใช้วิธี RFLP-PCR ซึ่งใช้จำแนก *A. baumannii* ทางคลินิกที่ต้องมีการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมเพื่อหารูปแบบที่จำเพาะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (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 ควบคู่กันซึ่งเป็นวิธีที่มีความละเอียดและแม่นยำสูงมาก ต้องใช้เครื่องมือที่ทันสมัย ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบและตลอดจนเสียค่าใช้จ่ายสูงจึงทำไม่เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ตรวจ (Bergogne-Bérézin & Towmer, 1996)

งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์และสำรวจหายีน *MexA* จากเชื้อ *A. baumannii* คือยาจากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยอง ผลวิจัยพบลำดับเบสขนาด 419 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะขนาด 1,175 คู่เบสของ ยีน *MexA* เพิ่มเติมในเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นผลจากเชื้อสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมียีน *MexA* ที่คล้ายคลึงและใกล้เคียงกับยีนคือยากกลุ่ม RND Family ของเชื้อ *P. aeruginosa* และแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะขนาด 1,175 คู่เบส นี้ อาจเป็นยีนอีกยีนหนึ่งที่ควบคุมการทำงานของ RND pump ดังนั้นเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้กับไพรเมอร์

*MexA* จึงสามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ใช่ยาได้เป็นผลสำเร็จ (ไม่พบยีนขนาด 419 คู่เบส ในเชื้อ *A. baumannii* ไม่ใช่ยา) และงานวิจัยนี้ยังพิสูจน์การกระจายตัวของยีน *MexA* ในสิ่งส่งตรวจที่เก็บได้จากโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลระยองนั้น และแสดงให้เห็นเช่นกันกับ *MexB* ว่ามีการแพร่กระจายของยีน *MexA* นี้ในสองจังหวัดในเขตภาคตะวันออกเฉียง

นอกเหนือจากการค้นพบยีน *MexA* และยีน *MexB* ดังกล่าวข้างต้นแล้ว งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาเทคนิคตรวจจำแนกสายพันธุ์ของ *A. baumannii* ที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียคือยา แยกออกจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆที่ไม่ใช่ยาด้วยการใช้เทคนิค Multiplex PCR เพื่อค้นหายีนที่คล้าย *MexB* และควบคู่กับการจำแนกสายพันธุ์ *A. baumannii* ด้วยไพรเมอร์ ISR ในปฏิกิริยาเดียวกัน จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถตรวจสอบได้ว่าวิธี Multiplex PCR ที่ออกแบบนี้ สามารถจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ได้ดี และมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำ Multiplex PCR ไปใช้จำแนกและคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* เพื่อให้แยกออกจากเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสกลุ่มอื่น ๆ ได้ เช่น กลุ่ม *Enterobacteriaceae* เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ได้อย่างรวดเร็ว และทำการรักษาได้อย่างทันท่วงที โดยไม่ต้องรอผลการใช้วิธีเพาะเชื้อและวิธีทางชีวเคมี หรือการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามต้องเพิ่มผลการพิสูจน์โดยใช้ Multiplex PCR ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์สองคู่คือ ยีน *MexB* และ ISR หรือใช้คู่ไพรเมอร์ของ ยีน *MexA* และ ISR หรือ ไพรเมอร์สามคู่ได้แก่ ยีน *MexA* ยีน *MexB* และ ISR ให้สามารถนำไปตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* คือยาออกจากเชื้อไม่ใช่ยา และคัดแยกเชื้อแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ ออกจาก *A. baumannii* ในลำดับต่อไป เพื่อที่จะมั่นใจว่าเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับการออกแบบไพรเมอร์คู่ ยีน *MexA* ยีน *MexB* และ ISR มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้ตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* คือยา เพื่อทดแทนการใช้การตรวจทางชีวเคมีและแบบแผนการคือยา (antibiotic susceptibility test)

งานวิจัยนี้ได้ค้นพบยีน *MexB* ที่สามารถตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์คือยาออกจาก *A. baumannii* สายพันธุ์ไม่ใช่ยา และสามารถพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งจำเพาะต่อยีน *MexB* และคู่ไพรเมอร์ ISR เพื่อใช้ตรวจหา ยีนคือยา *MexB* จากเชื้อ *A. baumannii* เพื่อช่วยตรวจคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยาออกจากเชื้อที่ไม่คือยาออกจากเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจโดยไม่ต้องใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอเทคโนโลยีที่ยุ่งยาก งานวิจัยนี้ยังสามารถใช้ตรวจหาอุบัติการณ์การคือยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาล และสามารถทดสอบได้ครั้งละหลายตัวอย่าง และข้อดีของวิธี Multiplex PCR คือช่วยลดระยะเวลาตรวจพิสูจน์เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์คือยาอย่างรวดเร็ว

และแม่นยำ เพื่อให้แพทย์ได้วินิจฉัยโรคติดเชื้อจาก *A. baumannii* ได้อย่างรวดเร็วและตลอดจนช่วยติดตามผลในการรักษาทางคลินิกต่อไป

มีนักวิจัยหลายกลุ่มใช้เทคนิค Multiplex PCR มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำแนกเชื้อหลายชนิด เช่น Pérez-roth et al., (2001) ใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* สามารถจำแนกเชื้อและตรวจสอบความดื้อยาของเชื้อ โดยใช้ยีน *femB* เป็นตัวจำแนกสายพันธุ์ดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ยีน *MecA* ในการตรวจสอบหาเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin และยีน *IleS-2* เพื่อตรวจสอบการดื้อยา นอกจากนี้ยังมีงานวิจัย ในการจำแนก *E. coli* ที่ก่อโรคอุจจาระร่วงโดยใช้ยีน *Eae* เพื่อแยกเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* ยีน *Stx* สำหรับแยกเชื้อ Shiga Toxin-producing *E. coli* ยีน *Elt* และยีน *Est* สำหรับแยกเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* และยีน *IpaH* สำหรับแยก Enteroinvasive *E. coli* (Toma et al., 2003)

นอกจากนี้การวิจัยชิ้นนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษากลไกการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนาน และเพื่อสร้างแผนที่โอเปอรอนยีนดื้อยา *MexB* จากเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศไทย เพื่อศึกษากลไกการดื้อยาและการทำงานของยีนดื้อยา กลุ่ม RND Family (ซึ่งเป็นชนิดที่คล้ายคลึงกับโอเปอรอนดื้อยาของ *P. aeruginosa* คือโอเปอรอน *mexA-mexB-omprM*) นอกจากนี้ วิธี Multiplex PCR ยังสามารถช่วยติดตามผลการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาที่ก่อปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลและในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันอ่อนแอ งานวิจัยชิ้นต่อไปคือการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถจำแนกโอเปอรอน (*mexA-mexB-omprM*) ได้ด้วยวิธี Multiplex PCR และการศึกษาการระบาดของยีนกลุ่มนี้ในเขตพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาวิธีป้องกันและเลือกใช้วิธีการรักษาอย่างเหมาะสม

ข้อมูลต่างๆจากงานวิจัยฉบับนี้จะช่วยให้การดูแลสุขภาพของประชาชนให้ปลอดจากการติดเชื้อ *A. baumannii* และลดสาเหตุการตายจากการติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาล หรือสามารถใช้ข้อมูลจากผลพีซีอาร์ มาประกอบการวางแผนการเลือกใช้ยาในการรักษาได้อย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการใช้ยาเกินความจำเป็น การควบคุมการแพร่กระจายของโรค ช่วยเสริมสร้างระบบสาธารณสุขทั้งในระยะสั้นและระยะยาวอย่างมีประสิทธิภาพ หรือช่วยปรับปรุงกลวิธีที่มีอยู่เดิมให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งนี้ การศึกษากลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* และการทำงานของยีนดื้อยา กลุ่ม RND Family ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ และจะช่วยให้งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพมีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

## บรรณานุกรม

- เกตุณี จีรวัดนนกุล และวิสาตรี คงเจริญสุนทร. (2557). การใช้ดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S - 23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จารุภรณ์ วิศาลสวัสดิ์. (2551). การดื้อยาของกลุ่ม carbapenem ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา. *เวชสาร โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา*, 32 (1), 19-28.
- ชุตติมาภรณ์ ไชยสงค์ และสุรศักดิ์ ไชยสงค์. (2556). ผลลัพธ์และต้นทุนของการใช้ยา Colistin และ Tigecycline ในการรักษาโรคติดเชื้อแกรมลบ. *ว.เภสัชศาสตร์อีสาน*, 9 (3), 65-73.
- ชาญกิจ พุฒิเลอพงศ์, วรางคณา ชวนะสิทธิ์ และวัลภา เลาหะวลีสันต์. (2551). การใช้ยาด้านจุลชีพรักษาโรคปอดอักเสบในโรงพยาบาลจากการติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ดื้อยาหลายขนาน ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. *ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*, 6 (1), 32-38.
- เนตรชนก สุวรรณะ และวิสาตรี คงเจริญสุนทร. (2555). Identification of multidrug resistant *MexA* gene and typing species of *Acinetobacter baumannii* using the 16-23s rRNA intergenic spacer region (ISR). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พิชชาพร อธิกวิริยะกุล, ญาณภา มณีศรี และรุจิภา ปิงยศ. (2556, 10 เมษายน). Treatment of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Thailand. เข้าถึงได้จาก <http://www.ninrx.com/smf/index.php/topic,2117.Msg10492.html#msg10492>.
- ภัทรชัย กิรติสิน. (2552). ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์ (Textbook of Medical Bacteriology) (พิมพ์ครั้งที่ 2) กรุงเทพฯ ๑: วิ.เจ.พรินต์ติ้ง.
- ภัทรภรณ์ รอดเสถียร. (2551). การดื้อยาด้านจุลชีพหลายขนานของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในโรงพยาบาลลพบุรี. *The clinical acamia*, 32 (6), 74-81.
- ภาณุมาศ ภูมาศ, ดวงรัตน์ โพธิ์, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, อาทร์ รวีไพบูลย์, ภูษิต ประคองสาย และสุพล สิมวัฒนานนท์. (2555). ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพในประเทศไทย: การศึกษาเบื้องต้น. *วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข*, 6 (3), 352-360.

- วิชัย สันติมาลีวรกุล, สุทธิพร ภัทรชยากุล และโพยม วงศ์ภูวรักษ์. (2552). สถานการณ์การติดเชื้อและกลไกการดื้อยา โดยเชื้อ *Acinetobacter baumannii*. *วารสารไท่ไภย์ชนนินพนธ์*, 3, 1-16.
- วิญญู ธรรมลิขิตกุล. (2551). โคลิสติน: ยาต้านจุลชีพสำหรับรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา. *เวชบันทึกศิริราช*, 1 (3), 152-158.
- วีรพงศ์ วัฒนาวนิช และพรรณทิพย์ ฉายากุล. (2556). การติดเชื้ออะซิไนโตแบคเตอร์ในผู้ป่วยที่รับไว้รักษาที่หออภิบาล. *สงขลานครินทร์เวชสาร*, 31 (2), 91-95.
- วีรวรรณ ลูวีระ. (2006). การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. *บทความปริทัศน์*, 24 (5), 453-459.
- ศิริลักษณ์ ชีระภูธร, วราภรณ์ แดงอาจ และธานี วงษ์ชัย. (2557). รูปแบบลายพิมพ์อาร์เอฟดีของยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ เมทัลโล-เบต้า-แลคตาเมส ใน *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วย. *วารสารเทคนิคการแพทย์*, 42 (2), 4940-4951.
- อภิษฎา ราษฎร์วิจิตร. (2555). โคลิสติน (Colistin) หรือ โพลีมิกซิน อี (Polymyxin E) เข้าถึงได้จาก <http://www.hamor.com/th%E0%B9%82%E0%B8%8484%E0%B8%A5%E0%B8%AA%E0%B8%99/กลไกcolistin>
- อรอนงค์ หงษ์ชุมแพ และวิชัย สันติมาลีวรกุล, (2559). ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยาโดยเฉลี่ยสำหรับการรักษาต่อวันต่อ 1000 รายคนใช้-วัน ของยาต้านจุลชีพ และอัตราดื้อยาของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii*: กรณีศึกษาโรงพยาบาลหัวหิน. *ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*, 11 (1), 27-32.
- 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.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128 (6), 1037-1050.
- Allardet-Servent, A., Bouziges, N., Carles-Nurit, M.J., Bourg, G., Gouby, A., & Ramuz, M. (1989). Use of Low-Frequency-Cleavage Restriction Endonuclease for DNA Analysis in Epidemiological Investigations of Nosocomial Bacterial Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2057-2061.

- Anja, S., Rainer, T., Jurgen, A. B., Klaus, K., Jean-Marie, P., & Winfried, V. Kern. (2006). Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacterfreundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*, 1261-1264.
- 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.
- Arabestani, M. R., Rajabpour, M., Mashouf, R. Y., Alikhani, M. Y., & Mousavi, S. M. (2015). Expression of Efflux pump *MexAB-OprM* and *OprD* of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Sample using qRT-PCR. *Iranian Medicine*, *18* (2).
- Barry, T., Collieran, 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.
- Berlau, J., Aucken, H. M., Houang, E., & Pitt, T. L. (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp. including *Acinetobacter baumannii* from vegetable: implication for hospital-acquired infection. *Journal Hospital Infection*, *42*, 201-204.
- 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.
- 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.
- Caroline M. Pule, Samantha L. Sampson, Robin M. Warren, Philippa A. Black, Paul D. van Helden, Tommie C. Victor, & Gail E. Louw. (2016) Efflux pump inhibitors targeting mycobacterial efflux systems to enhance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71* (1), 17-26.

- 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.
- Chaiwarith, R., Mahatthanaphak, S., Boonchoo, M., Supparatpinyo, K., & Sirisanthana, T. (2005). Pandrug-resistance *Acinetobacter baumannii* at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. *Journal Infection Disease Antimicrobial Agents*, *22*, 1-8.
- 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 coalcoaceticus*-*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*. *Clinical Microbiology Infection*, *13*, 801–806.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *NatureReview microbial*, *5* (12), 939-951.
- Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., & Monti-Lagatolla, C. (1995). Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticos*-*A. baumannii* Complex by Restriction Analysis of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*, 1108-1113.
- Enrietta Venter, Rumana Mowla, Thelma Ohene-Agyei, & Shutao Ma. (2015). RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Frontiers Microbiology*, *6*, 1-11.
- Etsuko, S., & Hiroshi, N. (2014) Properties of AdeABC and AdeIJK Efflux Systems of *Acinetobacter baumannii* Compared with Those of the AcrAB-TolC System of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, *58* (12), 7250–7257.



- Falagas, M. E., & Karageorgopoulos, D. E. (2008). Pandrug resistance (PDR), extensive drugresistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: needfor international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis*, 46 (7), 1121-1122.
- Fengwei Jiang, Chunxia An, Yinli Bao, Xuefeng Zhao, Robert L. Jernigan,Andrew Lithio, Dan Nettleton, Ling Li,Eve Syrkin Wurtele, Lisa K. Nolan,Chengping Lu, & Ganwu Li (2015). ArcA Controls Metabolism, Chemotaxis, and Motility Contributing to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *American society for Microbiology*, 83 (9), 3545-3554
- Fernando, D., & Kumar, A. (2011). Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 569 – 572.
- Fournier, P. E., & Richt, H. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (5), 692-699.
- George M. Eliopoulos, Lisa L. Maragakis & Trish M. Perl. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options, Oxford Journals. *Medicine & Health: Clinical Infectious Deseases*, 46 (8), 1254-1263.
- Gerner-Smidt, P. (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (10), 2680-2685.
- Giamarellou, H., Anastasia, A., & Kanellakopoulou, K. (2008). *Acinetobacter baumannii* : Universal Threat to Public Health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 106-119.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J., & Nishino. (1995). The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 39 (11), 2567-2569.
- Gouby, A., Carles-Nurit, M. J., Bouziges, N., Bourg, G., Mesnard, R., & Bouvet, P. J. M., (1992). Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Investigation of Hospital Outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1588–1591.

- Gräser, Y. I., Klare, E. Halle, Gantenberg, R., Buchholz, P., Jacobi, H. B., Presber, W., & Schönian, G. (1993) Epidemiological Study of an *Acinetobacter baumannii* Outbreak by Using Polymerase Chain Reaction Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2417–2420.
- 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.
- 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 identification 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.
- Keerasuntonpong, A., Samakeenich, C., Tribuddharat, C., & Thamlikitkul, V. (2002). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections in Siriraj hospital. *Siriraj Medical Journal*, 58 (8), 951-954.
- 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.
- Kumar, A., & Schweizer, P. H. (2005). Bacterial Resistance to Antibiotic: Active Efflux and Reduced Uptake. *Advanced Drug Delivery Review*, 57, 1486-1513.
- Laura J. V. Piddock. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps ? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 629-636.
- 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.

- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., & Plésiat, P. (2004). Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing *MexAB-OprM* and *MexXY* Efflux Pumps Simultaneously. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 48 (5), 1797-1802.
- Li, J., Nation, R. L., Owen, R. J., Wong, S., Spelman, D., & Franklin, C. (2007). Antibigrams of multidrug- resistance clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistance strains. *Clinical Infectious Diseases*, 45 (5), 396-398.
- Li, X. Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 69, 1555–1623.
- Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001) Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (12), 3375-3380.
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., & Lambert, T. (2004) Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (9), 3298-304.
- 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.
- Moore, R.A., DeShazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A., & Woods, D.E. (1999). Efflux-Mediated Aminoglycoside and Macrolide Resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (3), 465–470.
- Morris, R. D., & Geballe P. A. (2000) Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Molecular and Cellular Biology*, 28 (23), 8635-8642.
- Marchand, I., Damier-Damier, L., Courvalin, P., & Lambert, T. (2004). Expression of the RND-type Efflux Pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is Regulated by the AdeRS Two-Component System. *Antimicrobial Agents Chemother*, 48 (9), 3298-3304.

- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000). Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing *MexAB-OprM* and *MexXY* Efflux Pumps Simultaneously. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 48 (5), 1797-1802.
- Mcdermott, P. F., & While, D. G. (2011). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Marryland Heights, Missouri; Elsevier.
- 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.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, 78, 119–146.
- 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.
- 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.
- Panapakdee, S. (2014). *In vitro antibacterial activity of imipenem in combination with colistin Against multidrug resistance Acinetobacter baumannii*. Master's thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- 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.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21 (3), 538-582.
- 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.
- Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Pubmed*, 4 (8), 629-636.

- Pongpech, P., Amornnoppattanakul, S., Panpakdee, S., Fangwithaya, S., Namha, P., Dhiraputra, C., & Leelarasamee, A. (2010). Antibacterial activity of carbapenem-based combinations against multidrug-resistance *Acinetobacter baumannii*. *Journal Medical Association Thailand*, *93* (2), 161-171.
- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, *39* (3), 162-176.
- Pule, C. M., Sampson, S. L., Warren, R. M., Black, P. A., Helden, P. D., Victor, T. C., & Louw, G. E. (2016). Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71* (1), 17-26.
- Putman, M., Veen, H.W., & Konings, W.N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Review*, *64* (4), 672-693.
- Saelao, S., & Utiswannakul, A. (2008). Therapy for patient with multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Health Res*, *22* (3), 131-136.
- 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.
- Starr, L. M., Fruci, M., & Poole, K. (2012). Pentachlorophenol Induction of the *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* Efflux Operon: Involvement of Repressors *NalC* and *MexR* and the Antirepressor *ArmR*. *PLoS ONE*, *7* (2), 32684.
- Tikhonova, E. B., Yamada, Y., & Zgurskaya, H. I. (2011). Sequential Mechanism of Assembly of Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC. *Chem Biol*, *18* (4), 454-463.
- Thomson, J. M., & Bonomo, R. A. (2005). The threat of antibiotic resistance in Gram-negative Pathogenic bacteria: beta-lactam in peril. *Curr Opin Microbiol*, *8* (5), 518-524.
- Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J., & De Champs, C. (2008). First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *60* (3), 287-290.

- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., Vos, D. P., Claeys, G., & Verschraegen, G. (1995). Identification of *Acinetobacter* gen. sp. by Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (1), 11-15.
- Veen, H. W., & Konings, W. N. (1997). Multidrug Transporter from Bacteria to Man: Similarities in Structure and Function. *Seminars in Cancer Biology*, 8, 183-191.
- Venter, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T., & Ma, S. (2015). RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 6, 377.
- Werarak, P., Kiratisin, P., & Thamlikitkul, V. (2010). Hospital-Acquired Pneumonia and Ventilator-Associated Pneumonia in Adults at Siriraj Hospital: Etiology, Clinical Outcomes, and Impact of Antimicrobial Resistance. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 93 (1), 126-138.
- Wieczorek, P., Sahha, P., Hauschild, T., Zorawski, M., Krawczyk, M., & Tryniszewska, E. (2008). Multidrug resistance *Acinetobacter baumannii*- the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotic. *Folia histochemica et cytobiologica*, 46 (3), 257-267.
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *Microbiology review*, 35 (5), 736-755.
- Yun Cai, Dong Chai, & Rui Wang Beibei Liang Nan Bai (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (7), 1607-1615.
- Yoon, E.J., Courvalin, P., & Grillot-Courvalin, C. (2013) RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 57 (7), 2989-2995.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

- หลักการออกแบบไพรมอร์
- เปรียบเทียบความเหมือนต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย
- ภาพลักษณะของเชื้อ *A. baumannii*



## หลักการการออกแบบไพรเมอร์

ได้ทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียหรือยีนต้นแบบแบคทีเรียที่สนใจ กับแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blastn.ncbi.nlm.nih.gov/>) และ Bio edit จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 และพยากรณ์ลำดับที่ไพรเมอร์เข้าจับดังแสดงในภาพภาคผนวกที่ ก1 และ ก2

```
5' MexBF-----> 311
3' GACATCGCCC AGGTCCAGGTGCAGAACAAAG CTGCAACTGG CCACCCCGCT ACTGCCGAG GAAGTGCAGC GCCAGGGGAT
CCGGGTGACC AAGGCGGTGA AGAACTTCTT CATGGTGGTC GGTGTGGTTT CCACCGACGG CAGCATGACC AAGGAAGACC
TGTCGAACTA CATCGTTTCC AACATCCAGG ACCCACTCTC GCGGACCAAG GCGTTCGGTG ACTTCCAGGT GTTCGGCTCG
CAGTACTCGA TGCATCTG GCTCGACCCG GCCAAGCTGA ACAGTACCA GCTGACCCCG GCGACGTGA GCAGCGCGAT
CCAGGCGCAG AACGTGCAGA TTTCTCCGG CCAGCTCGG GGCTGCGCG CGGTCAAGGG CCAGCAGCTC AACGCCACCA
TCATCGGCAA GACCCGCTG CAGACCGCGG AGCAATTCGA GAACATCTG CTCGAGGTCA ATCCCGACGG TTCCAGGTG
CGCTGAAGG ACGTGCGCGA TGATGGCTG GCGGCGCAGG ACTACAGCAT CAACGCGCAG TTCAACGGCA GCCCGGCGT
CGGTATCGCG ATCAAGCTGG CCACCGGCGC CAACGCGTG GATACCGCA AGGCGATCCG CCAGACCATC GCCAACCTGG
AACCGTTCAT GCCGAGGGC ATGAAGTGG TCTACCGTA CGACACCACC CCGGTGGTCT CGGCCTCGAT CCATGAGGTA
GTGAAGACCC TCGGCGAGGC GATCCTCTC GTGTTCTGG TGATGTACTT GTTCTGCGA AACTTCCGCG CCACGCTGAT
CCCGACCATC GCCGTACCG TGGTGTGCT GGGGACCTT GCGGTGCTCG CCGCGTTCGG CTCTCGATC AACACCCTGA
CCATGTTCCG CATGGTGTG GCCATCGGCT TGCTGGTGA CGACGCCATC GTGGTGGTGG AGAACGTGCA GCGGGTGTG
GCCGAGGAAG GCCTGTCGCC AAGGGAGGCG GCGCGCAAGT CCATGGGCCA GATCCAGGGC GCGCTGGTTCG GTATCGCCAT
GGTGTCTCG GCGGTATTC TGCCGATGGC GTTCTTCGCG GGCTCCACCG GGGTATCTA CCGGCAGTTC TCCATACCA
TCGTGTCGGC CATGGCCCTC TCGGTGATCG TGGCGTGTAT CCTACCCCG GCGCTCTGCG CGACCATGCT CAAGCCGATC
GAGAAAGGCG ACCATGGCGA GCACAAGGGC GGCTTCTCG GCTGGTCAA CCGGATGTTT CTTCCACCA CCCACGGCTA
CGAGCGGGG GTGGCGTGA TCCTCAAGCA TCGCGCGCG TACCTGCTGA TCTACGTGGT GATCGTGGCC GGGATGATCT
GGATGTTAC CCGCATTCCC ACCCGTTC TCCCGACGA GGACCAGGGC GTACTGTTTC CCCAGGTACA GACCCCGCG
GGTCCAGTG CCGAGCGTAC CCAGGTGGT GTGGACTCGA TGCGGAATA CCTGCTGGAG AAGGAAAGCT CTTGCGTACG
CTCGGTGTT ACCGTGACCG GCTTCAACTT CGCCGGCCG GCCCAGAGTT CCGGCATGGC GTTCATCATG CTCAAGCCCT
GGGAAGAGCG TCCCGGTGGC GAGAACAGCG TGTTGAACT GGCCAAGCGC GCGCAGATGC ACTTCTTAC CTTCAAGGAC
GCGATGTTGT TCGCCTTCG GCCCGCTG GACTGGAAC TGGGTAACCG CACCGGCTTC GACCTGTTC TCCAGGACCA
GGCGGGTGT GGCACGAAG TCCTGCTCA GCGCGCAAC AAGTTCCTA TGCTCGCCG GCAGAACCCG GCGTGAAC
GCGTGCGCC CAACGGCATG AGCGACGAAC CGCAGTACAA GCTGGAGATC GACGACGAGA AGGCCAGCGC CCTCGGCGT
TCCCTGCGG ACATCAACAG CACCGTGTCC ATCGCTGGG GTTCCAGCTA CGTCAACGAT TTCATCGACC GTGGCCGGGT
CAAGCGGGTC TACCTGCAGG GCAGGCCGGA CGCGCGGATG AACCCGGACG ACCTGAGCAA GTGGTACGTG CGCAACGACA
AGGGCGAGAT GGTGCCGTT AACGCCTTC CCACCGCAA GTGGGAATAC GGTTCCCGA AGCTGGAGCG CTACAATGGC
GTGCCGCGA TGGAGATCT CGCGAGCCG GCGCCCGCC TGAGTTCCGG TGACGCCATG GCGGCGGTG AGGAGATCGT
CAAGCAATTG CCGAAAGGCG TTGGTACTC CTGGACCGC CTGTCTACG AGGAGCGCTT GTCCGGCTCG CAGGCGCCG
CGTGTATGC GCTGTCGCTG CTGGTGGTGT TCCTCTGCTT GCGCGCCCTG TACGAAAGCTGGTTCGATTCC 3'
```

2690 <---5' MexBR

ภาพผนวกที่ ก-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ *MexB* ขนาด 2,300 bp ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *P.aeruginosa* PAOI (NC\_002516.2) ที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ *MexBF* และ *MexBR*

5' TTGTACACACCGCCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGCTAGCCTAA  
 CTGCAAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA  
 GCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTAACGAAAGATTGACGATTGGTAAGAAT  
 CCACAACAAGTTGTTCTTCATAGATGTATCTGAGGGTCTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAC  
 ACGCTTGATAAGCGTGGGGTCACAAGTTCAAGTCTTGTGACACCCACCATGACTTTGACTG  
 GTTGAAGTTATAGATAAAAAGATACATGATTGATGATGTAAGCTGGGGACTTAGCTTAGTTG  
 GTAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCGACTCTCCTAGTCTCCACCAGAA  
 CTTAAGATAAGTTCGGATTACAGAAAATTAGTAAATAAAGATTGAGATCTTGGTTTATTAAC  
 TTCTGTGATTTCAATTATCACGGTAATTAGTGTGATCTGACGAAGACACATTAATCATTAAAC  
 AGATTGGCAAAATTGAGTCTGAAATAAATTGTTCACTCAAGAGTTTAGGTTAAGCAATTAA  
 TCTAGATGAATTGAGAACTAGCAAATTAAGTGAATCAAGCGTTTTGGTATGTGAATTAGA  
 TTGAAGCTGTACGGTCTTAAGTGCACAGTGTCTAAACTGAAATGTTGAAGTTACTAACT  
 TGTAGGTAACATCGACTGTTTGGGGTTGTATAGTCAAGTAATTAAGTGCATGTGGTGGATG  
 CCTTGGCAGTCAGAGGCGATGAAAAGACGTGATAGCCTGCGAAAAGCTCCGGGGAGGCGGC  
 AAATATCCTTTGATCCGGAGATGTCTGAATGGGGGAACCCACCTACTTTAAGGTAGGTATT  
 GCAACATGAATACATAGTGTGCAAGGCGAACGAGGGGAAGTAAAACATCTCAGTACCCT  
 TAGGAAAAGAAATCAATTGAGATTCCTCAGTAGCGGCGAGCGAACGGGGATCAGCCCAT  
 TAAGTTATGTGTGTTTTAGTGGAACGCTCTGGGAAGTGCGAACGTAGAGGGTGATATCCC  
 GTACACGAAAAGGGCACACATAATGATGACGAGTAGGGCGAGGCACGTGAAACCTTGTCTG  
 AATATGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCCTGACTGACCGATAGTGAACCAG  
 TTCGCCTTTCCCTCACGGTA 3'

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

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MexB

multidrug resistance protein MexB (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Gene ID: 877852) แบบที่เรียงต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ กับแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. baumannii* คืยมาจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blastn.ncbi.nlm.nih.gov/>)

| สายพันธุ์   | Accession number                 | % Similarity |
|---|----------------------------------|--------------|
| <i>A. baumannii</i> strain A85 plasmid pA85-3 clone GC1 AbaR4 resistance island | NC_002516.2                      | 100          |
| <i>A. baumannii</i> strain ABO30  | NZ_CP009257.1<br>1752635-1754656 | 95           |
| <i>A. baumannii</i> strain A85 (MDR)  | KC118540.6                       | 85           |

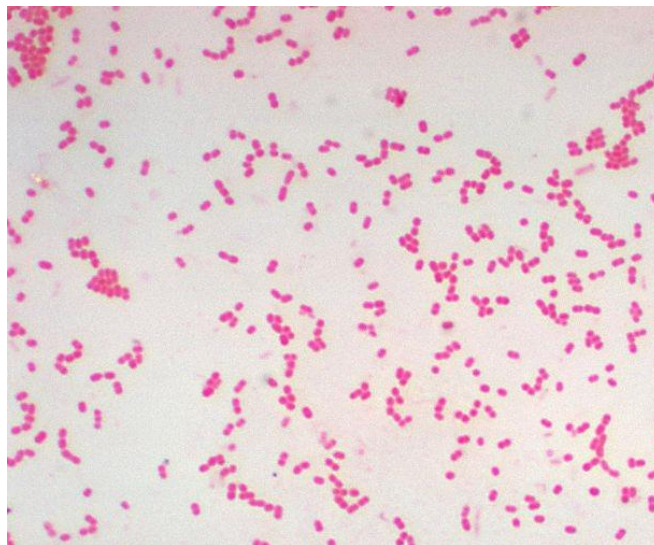
ตารางภาคผนวกที่ ก-2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ISR จาก

เชื้อ *A. baumannii* ต้นแบบ กับแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. baumannii* จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blastn.ncbi.nlm.nih.gov/>)

| สายพันธุ์   | Accession number | % Similarity |
|---|------------------|--------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> strain 29108                   | DQ108594.1       | 99           |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> strain DM19305/01 16S-23S rRNA | EU030660.1       | 99           |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978                     | CP000521.1       | 96           |



ภาพผนวกที่ ก-3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ ก-4 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ผ่านการย้อมแกรม (Gram's stain, Gram's negative coccobacilli)

ตารางภาคผนวกที่ ก-3 Mastermix ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *MexB*, *MexA* และ ISR  
 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

| Components of the Master Mix     | Data        | Volumn ( $\mu$ l) |
|----------------------------------|-------------|-------------------|
| Sterile deionized water          | -           | 12.7              |
| 10X Enzyme Buffer                | 2X buffer   | 2                 |
| 25 mM $MgCl_2$                   | -           | 0.8               |
| 10 mM dNTP mix                   | 0.4 mM      | 0.4               |
| 10 $\mu$ M Forward primer        | 0.5 $\mu$ M | 1                 |
| 10 $\mu$ M Reverse primer        | 0.5 $\mu$ M | 1                 |
| Tag DNA polymerase (5U/ $\mu$ l) | 5 U         | 0.1               |
| DNA template                     | -           | 5 ul              |
| Total volumn                     |             | 23                |

โดยมีปฏิกิริยา PCR ดังนี้

|           |                 |           |          |
|-----------|-----------------|-----------|----------|
| ขั้นที่ 1 | 95 องศาเซลเซียส | 3 นาที    | } 35 รอบ |
| ขั้นที่ 2 | 95 องศาเซลเซียส | 45 วินาที |          |
|           | 55 องศาเซลเซียส | 45 วินาที |          |
|           | 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที    |          |
| ขั้นที่ 3 | 72 องศาเซลเซียส | 7 นาที    |          |

## ภาคผนวก ข

- การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)

|                      |      |           |
|----------------------|------|-----------|
| TBE 10x              | 100  | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ | 1000 | มิลลิลิตร |
| ผสมให้เข้ากัน        |      |           |

2. 2 เฟอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล

|          |     |           |
|----------|-----|-----------|
| อะกาโรส  | 2   | กรัม      |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

3. Luria Broth (LB) มีองค์ประกอบดังนี้

|                |    |      |
|----------------|----|------|
| ทริปโตเนน      | 10 | กรัม |
| Yeast Extract  | 5  | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 10 | กรัม |
| น้ำ            | 1  | ลิตร |

4. 0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH8)

|  |     |           |
|--|-----|-----------|
| di-sodium ethylenediaminetetra-acetate.2H <sub>2</sub> O       | 186 | กรัม      |
| น้ำกลั่น   | 800 | มิลลิลิตร |
| ผสมให้ละลาย แล้วปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ประมาณ 20 กรัม) |     |           |

5. Nutrient agar

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

6. Nutrient broth (NB)

|              |   |      |
|--------------|---|------|
| Beef extract | 3 | กรัม |
| Peptone      | 3 | กรัม |
| น้ำ          | 1 |      |