

การศึกษาคูณสมบัติทางอณูชีววิทยาของคลาสดี ปีต้า-แลคทาเมส และการถ่ายทอดยีน
ในเชื้อ Acinetobacter baumannii



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มีนาคม 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง “การศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาของคลาสต์ บีต้า-แลคทาเมส
และการถ่ายทอดยีนในเชื้อ Acinetobacter baumannii”
ของ นางสาวอุดมลักษณ์ เหลืองทองคำ
ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....มจร จุฬา.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร.มัจฉรี จุโลทก)

.....สพ.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ ลิทธิศักดิ์)

.....กศพร ทศนภักดิ์.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.กัญญา ทศนภักดิ์)

.....อ.อช.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ดร.อัญชลี ฐานวิสัย)

อนุมัติ

.....อช.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)
รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ปฏิบัติราชการแทน
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จลุล่วงได้ด้วยดีและบรรลุตามวัตถุประสงค์ได้ด้วย ความเมตตาและกรุณาอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ ประธานที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ดร.มัจฉวี จุโลทก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.กัญณิกา ทศนภักดี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร.อัญชลี สุวานวิสัย กรรมการ ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณธวัชชัย กิตติ ที่ได้อนุเคราะห์แบคทีเรียโอเฟจ คุณรวีวรรณ แสงศรี ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อ *Acinetobacter* spp. โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และ โรงพยาบาลพิจิตร ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อ *A. baumannii* ในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ทุนสนับสนุนตลอดการศึกษา ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิต วิทยา และสถานบริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและ อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อน พี่ น้อง ทุกคน ที่คอย สนับสนุนและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

สุดท้ายนี้คุณค่าและคุณประโยชน์ใดๆอันพึงได้รับจากการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัย ขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็น ประโยชน์ต่อผู้อ่านและผู้สนใจด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและการถ่ายทอดยีนดื้อยาไม่มากก็น้อย

อุดมลักษณ์ เหลืองทองคำ

ชื่อเรื่อง	การศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาของคลาสดี บีต้า-แลคทาเมส และการถ่ายทอดยีนในเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i>
ผู้วิจัย	อุดมลักษณ์ เหลืองทองคำ
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิริศักดิ์
กรรมการที่ปรึกษา	ดร.กัญญิภา ทศนภักดิ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2560
คำสำคัญ	<i>Acinetobacter baumannii</i> รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ยีนดื้อยาในกลุ่ม class D- β -lactamase รูปแบบของพลาสมิด การถ่ายทอดยีนในแนวนอน

บทคัดย่อ

A. baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอผู้ป่วยหนัก ช่วง 10 ปีที่ผ่านมา พบอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่มคาร์บาพีเนมของเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในโรงพยาบาลของทวีปเอเชียและโรงพยาบาลของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายของยีนดื้อยาคลาสดี บีต้า-แลคทาเมสเกือบทุกภูมิภาค การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ เพื่อตรวจหายีนดื้อยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลเชิงรายนุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร ศึกษาารูปแบบพลาสมิดของเชื้อ *A. baumannii* ในกลุ่ม XDR-AB จากนั้นนำเชื้อมาศึกษาการถ่ายทอดยีนในแนวนอน โดยวิธีทรานสเฟอร์เมชั่น ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาล และ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ผลการศึกษาพบเชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM) และ piperacillin/tazobactam (PIP) มากกว่าร้อยละ 75 พบรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มคาร์บาพีเนม (CR-AB) ร้อยละ 85.5, กลุ่ม XDR-AB ร้อยละ 6.5 และกลุ่มที่ไวต่อยาต้านจุลชีพ ร้อยละ 8.4 ทุกไอโซเลตไวต่อยาต้านจุลชีพ colistin และ tigecycline เมื่อนำมาทดสอบหายีนดื้อยาคลาสดี คาร์บาพีเนม โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ พบยีนดื้อยา

*bla*_{OXA-23} และยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ร้อยละ 76.1 และ 9.3 ตามลำดับ นำเชื้อกลุ่ม XDR-AB มาศึกษารูปแบบพลาสมิดพบว่ามี 2 รูปแบบ ขนาดประมาณ 9 kb ถึง ≥ 23 kb จากนั้นศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวนอน ผลที่ได้พบว่าเชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB135 สามารถถ่ายทอดการดื้อยา tetracycline และยีนดื้อยา *tet*(B) ผ่านกระบวนการทรานสดักชัน โดยอาศัยแบคทีเรียโอเฟจ ABP19 นำพายีนดื้อยาสู่เชื้อสายพันธุ์ไม่ดื้อยา NU013 และ NU015 มีค่าความถี่ในการเกิดกระบวนการทรานสดักชัน (transduction frequencies) เท่ากับ $4.8 - 9.1 \times 10^{-9}$ นอกจากนี้เชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB140 สามารถถ่ายทอดการดื้อยา kanamycin และยีนดื้อยา *aphA6* โดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชันสู่เชื้อสายพันธุ์ไม่ดื้อยา NU013 และ NU015 มีค่าความถี่ในการเกิดกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation frequencies) เท่ากับ $6.3 - 8.5 \times 10^{-5}$ ผลจากการศึกษานี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของยีนดื้อยา และเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในอนาคตต่อไป



Title MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CLASS D β -
LACTAMASE DETERMINANTS AND GENE TRANSFER
IN ACINETOBACTER BAUMANNII

Author Udomluk Leungtongkam

Advisor Assistant Professor Sutthirat Sitthisak, Ph.D.

Co - Advisor Kannipa Tasanapak, Ph.D.

Academic paper Thesis M.S. in Microbiology, Naresuan University, 2017

Keywords *Acinetobacter baumannii*, Antibiotic susceptibility
patterns, class D- β -lactamase determinants, plasmid
profiles, horizontal gene transfer

ABSTRACT

A. baumannii is a gram-negative bacteria, which is the major cause of nosocomial infection, especially in Intensive Care Units (ICUs). In the past decades, the prevalence of carbapenem *A. baumannii* (CR-AB) has been increasing rapidly in Asia and Thai hospitals. Moreover, the spread of class D β -lactamase resistance genes was detected in almost all regions. The aims of this study were to determine the antimicrobial susceptibility patterns, to detect and study the dissemination of class D β -lactamase resistance genes in *A. baumannii* isolated from inpatients within ChiangRai Prachanukroh and Phichit hospitals, to examine the plasmid profiles of XDR-AB strains and to study the horizontal gene transfer by transformation, transduction and conjugation between *A. baumannii* isolated from clinical specimens and *Acinetobacter* spp. isolated from natural sources. Our results showed that more than 75% of the *A. baumannii* isolates were resistant to cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM) and piperacillin/tazobactam (PIP). The prevalence of CR-AB was found in 85.5%, XDR-AB was found in 6.5%, and susceptibility to all antibiotic tested was found in 8.4%. All isolates were sensitive to colistin and tigecycline. Class D β -lactamase genes were investigated by multiplex PCR amplification. The *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} genes were detected in 76.1% and 9.3%, respectively. XDR-AB strains were

selected to study the plasmid profiles. There are two patterns, ranging approximately from 9 kb to ≥ 23 kb. Moreover, XDR-AB AB135 was transferred tetracycline resistant and *tet(B)* gene via transduction by bacteriophage ABP19 which make the antibiotic susceptible strains, NU013 and NU015, to be antibiotic resistant strains. The transduction frequencies were $4.8 - 9.1 \times 10^{-9}$ per recipient cells. In addition, XDR-AB AB140 was transferred kanamycin resistant gene, *aphA6* via conjugation to antibiotic susceptible strains, NU013 and NU015. The frequency of tranconjugants was $6.3 - 8.5 \times 10^{-5}$ per recipient cells. The results of this study can be used as preliminary data for preventing and controlling the spread of resistance genes and resistant bacteria in the future.



อักษรย่อ

bp	=	Base pair
CaCl ₂	=	Calcium chloride
CF	=	Frequency of conjugation
CFU	=	Colony forming unit
CR-AB	=	Carbapenem-resistant <i>A. baumannii</i>
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EDTA	=	Ethylene diamine tetra-acetic acid
g	=	Gram
Kb	=	Kilo base
MDR-AB	=	Multidrug-resistant <i>A. baumannii</i>
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
MgSO ₄	=	Magnesium sulfate
MIC	=	Minimal inhibitory concentration
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
multiplex PCR	=	Multiplex polymerase chain reaction
NaCl	=	Sodium chloride
NaOH	=	Hydrogen hydroxide
PCR	=	Polymerase chain reaction
PDR-AB	=	Pandrug-resistant <i>A. baumannii</i>
PFU	=	Plaque forming unit
pH	=	Power of hydrogen ion concentration
RNA	=	Ribonucleic acid
TBE	=	Tris-borate-EDTA
TE	=	Transformation efficiency
XDR-AB	=	Extensively drug- resistant <i>A. baumannii</i>
µg	=	Microgram

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4
การถ่ายทอดยีน.....	13
การถ่ายทอดยีนดื้อยาในเนวราบของแบคทีเรีย.....	17
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
สายพันธุ์แบคทีเรียและแบคทีเรียโอเพ่นที่ใช้ในการศึกษา.....	25
การตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ที่แยกจากแหล่ง ธรรมชาติโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ ยีน <i>rpoB</i>	26
การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disc diffusion.....	28
การตรวจหายีนดื้อยา OXA-type carbapenemase ด้วยเทคนิค Multiplex PCR.....	30
การสกัดพลาสมิดของเชื้อ extensively drug resistant <i>A. baumannii</i> (XDR-AB).....	31
การคัดเลือกแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ.....	31
การศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ (Natural transformation).....	32
การศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชัน.....	33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีคอนจูเกชัน.....	35
การตรวจหายีนดื้อยา class D β -lactamase, <i>tet(B)</i> และ <i>aphA6</i> ใน transformants, transductants และ transconjugants ที่แยกได้.....	37
4 ผลการวิจัย.....	38
การตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ที่แยกได้จากแหล่ง ธรรมชาติโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ ยีน <i>rpoB</i>	38
การศึกษาความไวของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ต่อยาต้านจุลชีพ.....	39
การตรวจหายีนดื้อยา OXA-type carbapenemase.....	41
การศึกษารูปแบบของพลาสมิด (plasmid profiles).....	42
การคัดเลือกแบคทีเรียผู้รับและแบคทีเรียผู้ให้.....	42
การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสเฟอร์เมชัน.....	44
การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชัน.....	44
การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีคอนจูเกชัน.....	45
5 บทสรุป.....	50
สรุปผลการวิจัย.....	50
อภิปรายผล.....	51
ข้อเสนอแนะ.....	58
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก.....	78

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

ประวัติผู้วิจัย.....	99
----------------------	----



สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงยีนดื้อยาที่พบใน <i>A. baumannii</i>	12
2	แสดงการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวราบของแบคทีเรีย.....	22
3	แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรียโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา.....	25
4	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน 16S rRNA ยีน <i>rpoB</i> ยีนดื้อยา OXA-type carbapenemase ยีนดื้อยา tetracycline (<i>tet(B)</i>) และยีนดื้อยา kanamycin (<i>aphA6</i>).....	27
5	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ตรวจหายีน 16S rRNA	28
6	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ตรวจหายีน <i>rpoB</i>	28
7	แสดงยาด้านจุลชีพและการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาด้านจุลชีพ.....	29
8	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ multiplex PCR ตรวจหายีนดื้อยา OXA-type carbapenemase.....	30
9	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ตรวจหายีนดื้อยา <i>tet(B)</i> และ <i>aphA6</i>	31
10	แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ <i>rpoB</i> ในเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ.....	38
11	แสดงผลการคัดเลือกแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ.....	43
12	แสดงความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มี sodium azide และรูปแบบการดื้อต่อยาด้านจุลชีพของแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ.....	47
13	สรุปผลการตรวจหายีนดื้อยา class D β -lactamase, <i>tet(B)</i> และ <i>aphA6</i> ใน transformants ที่แยกได้.....	48
14	สรุปผลการตรวจหายีนดื้อยา class D β -lactamase, <i>tet(B)</i> และ <i>aphA6</i> ใน transductants ที่แยกได้.....	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
15 สรุปผลการตรวจหายีนดื้อยา class D β -lactamase, <i>tel</i> (B) และ <i>aphA6</i> ใน transconjugants ที่แยกได้.....	49
16 แสดงข้อมูลเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวน 160 ไอโซเลต และผลการศึกษารูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ และยีนดื้อยา class D β -lactamase ที่ตรวจพบ.....	79
17 แสดงผลการศึกษากายทอดยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสเฟอร์เมชั่นระหว่างแบคทีเรีย <i>A. baumannii</i> และ <i>Acinetobacter</i> spp.	92
18 แสดงผลการศึกษากายทอดยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชั่นระหว่างแบคทีเรีย <i>A. baumannii</i> และ <i>Acinetobacter</i> spp.	93
19 แสดงผลการศึกษากายทอดยีนดื้อยาโดยวิธีคอนจูเกชั่นระหว่างแบคทีเรีย <i>A. baumannii</i> และ <i>Acinetobacter</i> spp.	95

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงโครงสร้างของ acinetobactin.....	9
2 แสดงกระบวนการทรานสพอร์เมชัน.....	14
3 แสดงกระบวนการทรานสดักชัน.....	15
4 แสดงกระบวนการคอนจูเกชัน.....	16
5 แสดงเปอร์เซ็นต์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพ (resistance) ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร	40
6 แสดงเปอร์เซ็นต์รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร.....	40
7 แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase ภายในเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร Lane M: 100 bp ladder; Lane 1: Negative control (น้ำกลั่น); Lane 2: PCR product ของยีนดื้อยา <i>bla</i> _{OXA-51} ; Lane 3: PCR product ของยีนดื้อยา <i>bla</i> _{OXA-51} และ <i>bla</i> _{OXA-23} ; Lane 4: PCR product ของยีนดื้อยา <i>bla</i> _{OXA-51} และ <i>bla</i> _{OXA-58} และ Lane 5: PCR product ของยีนดื้อยา <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} และ <i>bla</i> _{OXA-58}	41
8 แสดงรูปแบบของพลาสมิด (plasmid profiles) ของเชื้อ extensively drug resistant <i>A. baumannii</i> (XDR-AB) Lane M: VC Lambda/HindIII; Lane 1-10: รูปแบบพลาสมิด (plasmid profiles) ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> สายพันธุ์ AB95, AB180, AB183, AB241, AB246, AB269, AB135, AB136, AB140 และ AB229 ตามลำดับ.....	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ

หน้า

- 9 แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนดื้อยา *tet(B)* ภายใน transductants ที่ได้จากกระบวนการทรานสดักชัน Lane M: 100 bp ladder; Lane 1: Negative control (น้ำกลั่น); Lane 2: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* ขนาด 353 bp และยีนดื้อยา *tet(B)* ขนาด 206 bp ของแบคทีเรียผู้ให้สายพันธุ์ AB135; Lane 3-4: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* ของแบคทีเรียผู้รับ สายพันธุ์ NU013 และ NU015 ตามลำดับ และ Lane 5-8: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* และ *tet(B)* ของ transductants ที่ได้จำนวน 4 ไอโซเลต..... 45
- 10 แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนดื้อยา *aphA6* ภายใน transconjugants ที่ได้จากกระบวนการคอนจูเกชัน Lane M: 100 bp ladder; Lane 1: Negative control (น้ำกลั่น); Lane 2: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* ขนาด 353 bp และยีนดื้อยา *aphA6* ขนาด 736 bp ของแบคทีเรียผู้ให้สายพันธุ์ AB140; Lane 3-4: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* ของแบคทีเรียผู้รับ สายพันธุ์ NU013 และ NU015 ตามลำดับ และ Lane 5-6: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* และ *aphA6* ของ transconjugants ที่ได้..... 46

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจัดเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของโลกรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากพบอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อเป็นจำนวนมาก จากรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย พบว่าสิ่งส่งตรวจที่แยกได้ทั้งหมดภายในปี ค.ศ. 2014-2015 ตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter baumannii* มากที่สุดเป็นอันดับที่สาม รองจาก *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* (NARST, 2014-2015) *A. baumannii* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนกลม พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ รวมทั้งสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อภายในโรงพยาบาล ได้แก่ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โรคติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคติดเชื้อบริเวณบาดแผล โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่พักรักษาตัวอยู่ภายในหอผู้ป่วยหนักเป็นเวลานาน (Towner, 2009)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา พบอุบัติการณ์โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่ม carbapenems (carbapenem-resistant *A. baumannii* (CR-AB)) (Poirel, & Nordmann, 2006) กลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน คือ การสร้างเอนไซม์ออกมาทำลายยา ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase ออกมาย่อยสลายยาในกลุ่ม cephalosporins, penicillins และ carbapenems ทำให้ยาด้านจุลชีพออกฤทธิ์ไม่ได้ ส่งผลให้แบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาตามมา กลไกการดื้อยาของแบคทีเรียถูกควบคุมโดยยีนดื้อยา ยีนดื้อยาที่พบใน CR-AB ส่วนใหญ่เป็นยีนดื้อยาในกลุ่ม class D β -lactamase (Zarrilli et al., 2009) ภายในประเทศไทยมีรายงานการแพร่กระจายของยีนดื้อยา class D β -lactamase อยู่เกือบทุกภูมิภาค ทั้งในจังหวัดพิษณุโลก จังหวัดกรุงเทพมหานคร จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (Niumsup et al., 2009; Thapa et al., 2010; Jantama et al., 2013; Jumroon, & Santanirand, 2013; Santimaleeworagun et al., 2014; Teo et al. 2015; Juntanawiwat et al., 2016)

การแพร่กระจายของยีนดื้อยา มักเกิดจากการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวนอน (horizontal gene transfer) โดยเป็นการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปสู่แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่ง โดยอาศัยกระบวนการที่สำคัญ คือ ทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน (Huddleston, 2014) กระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน เป็นการที่เซลล์แบคทีเรียรับดีเอ็นเอที่ล่องลอยอยู่ภายในสิ่งแวดล้อมเข้ามาสู่เซลล์แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่ง มีรายงานการศึกษาพบว่าในเชื้อ *Acinetobacter* spp. กระบวนการทรานสเฟอร์เมชันสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58} และ *bla*_{NDM-1} ไปสู่แบคทีเรียผู้รับได้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยาภายในโรงพยาบาลเพิ่มสูงขึ้น (Bertini et al., 2010; Rumbo et al., 2011; Fu et al., 2012; Fu et al., 2014) ส่วนกระบวนการ ทรานสดักชัน เป็นการถ่ายทอดยีนดื้อยาจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปสู่แบคทีเรียอีกชนิด โดยอาศัย แบคทีริโอเฟจเป็นตัวนำพายีนดื้อยา และกระบวนการคอนจูเกชัน เป็นการถ่ายทอดยีนดื้อยาจาก แบคทีเรียชนิดหนึ่งไปสู่แบคทีเรียอีกชนิดโดยอาศัยอวัยวะพิเศษที่เรียกว่า pili ดึงเซลล์แบคทีเรียสอง ตัวมาใกล้กัน เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยาให้แก่กัน (Black, 2013) มีรายงานการศึกษาก่อนหน้า พบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{GES-11}, *bla*_{IMP-1} และ *bla*_{NDM-1} ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ โดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชัน (Bertini et al., 2010; Fu et al., 2012; Charfi-Kessis et al., 2014; Zhang et al., 2014; Yang et al., 2015)

จากการระบาดของโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *A. baumannii* เพิ่มขึ้นจำนวนมากใน ระยะเวลาอันรวดเร็ว อีกทั้งเชื้อยังดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานพร้อมกัน และยังพบการ แพร่กระจายของยีนดื้อยาในวงกว้าง ทั้งในทวีปยุโรป ทวีปอเมริกาใต้ และทวีปเอเชีย (Patel , & Bonomo, 2013) รวมทั้งในประเทศไทย ส่งผลให้การรักษาโรคติดเชื้อทำได้ยาก ผู้ป่วยเกิดการ เสียชีวิตในอัตราสูง จึงนำไปสู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัย คือ เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยา ยีนดื้อยา และการแพร่กระจายของยีนดื้อยาภายในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลสองแห่งทาง ภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร แล้วนำเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม extensively drug resistant *A. baumannii* (XDR-AB) มาศึกษาการ ถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวนอน โดยวิธีทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *A. baumannii* โดยวิธี disc diffusion
2. เพื่อศึกษายีนดื้อยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยา class D β -lactamase ในเชื้อ *A. baumannii* โดยวิธี multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR)
3. เพื่อศึกษารูปแบบของพลาสมิด (plasmid profiles) ในเชื้อ *A. baumannii* กลุ่ม extensively drug resistant *A. baumannii* (XDR-AB)
4. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวนอน (horizontal gene transfer) โดยวิธี ทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของ *A. baumannii* ที่แยกมาจากผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ จังหวัดเชียงราย และโรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตร และเชื้อที่แยกได้จากธรรมชาติ นำมาตรวจสอบหายีนดื้อยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาใน class D β -lactamase สกัดพลาสมิดและศึกษารูปแบบของพลาสมิดในเชื้อ *A. baumannii* กลุ่ม XDR-AB นำเชื้อมาศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวนอนระหว่างแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจภายในโรงพยาบาล และ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Acinetobacter baumannii

1. จุลชีววิทยา

Acinetobacter ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1911 โดย Beigerinck นักจุลชีววิทยาชาวดัตช์ แยกได้จากตัวอย่างดิน เดิมจัดอยู่ในวงศ์ Neisseriaceae แต่ปัจจุบันถูกจัดอยู่ในวงศ์ Moraxellaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนกลม (coccobacilli) มีขนาดประมาณ 0.7×1.0 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (strictly aerobic) ให้ผลบวกกับการทดสอบ catalase test ให้ผลลบกับการทดสอบ oxidase test และมีสัดส่วนของ Guanine และ Cytosine (G+C content) ในสารพันธุกรรม 39-47% (Fournier, & Richet, 2006; Peleg et al., 2008) โคโลนีมีลักษณะเรียบ บางครั้งมีลักษณะเป็นเมือก สีเหลืองอ่อนหรือสีเทาขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pagel, & Seyfried, 1976) สามารถพบเชื้อได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในดิน น้ำ ผิวน้ำ รวมทั้งสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล ปัจจุบันพบ *Acinetobacter* 26 สปีชีส์ มีเพียง 10 สปีชีส์ที่สามารถแยกจากสิ่งส่งตรวจในมนุษย์ได้ คือ *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri* และ *A. ursingii* (Di Nocera et al., 2011; Dortet et al., 2006) สปีชีส์ที่พบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลมากที่สุด คือ *A. baumannii* (Peleg et al., 2008) ซึ่ง *A. baumannii* มีความสามารถในการยึดเกาะกับอวัยวะของผู้ป่วยได้ดีและยังสามารถอยู่รอดได้บนพื้นผิวต่างๆ เช่น วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ ได้เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้พบโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *A. baumannii* ในโรงพยาบาลเพิ่มมากยิ่งขึ้น (Lee et al., 2008; Pour et al., 2011)

2. โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากพบจำนวนการติดเชื้อชนิดนี้อย่างรวดเร็วในช่วงสามทศวรรษที่ผ่านมา อีกทั้งเชื้อยังดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (multidrug-resistant) โรคที่พบมากที่สุดจากการติดเชื้อ *A. baumannii* คือ โรคปอดอักเสบในโรงพยาบาลหรือที่เรียกว่า Hospital-acquired pneumonia (McConnell et al., 2013) พบมากในผู้ป่วยที่ทำการพักรักษาตัวอยู่ในหอผู้ป่วยหนัก (intensive care unit)

เป็นเวลานาน มีการใช้เครื่องช่วยหายใจ และให้ยาปฏิชีวนะไม่สมเหตุสมผล นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการระบาดของโรคติดเชื้อภายในโรงพยาบาลอาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนเชื้อ *A. baumannii* บนเครื่องมือแพทย์หรือบุคลากรทางการแพทย์ที่มีสุขอนามัยย่ำแย่ ส่วนบุคคลไม่ดีส่งผลให้มีการแพร่กระจายของเชื้อภายในโรงพยาบาลเพิ่มมากขึ้น (Luna, & Aruj, 2007)

โรคปอดอักเสบในชุมชน (Community-acquired pneumonia) เป็นโรคปอดอักเสบที่เกิดภายนอกโรงพยาบาล เกิดขึ้นรุนแรงและเฉียบพลัน มีอัตราการเสียชีวิตสูงกว่าร้อยละ 60 มักเกี่ยวข้องกับตัวของโฮสต์เอง เช่น การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จำนวนมากเกินไปหรือการเป็นโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง นอกจากนี้มีรายงานพบโรคปอดอักเสบในชุมชน ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากในเขตที่มีภูมิอากาศร้อนหรือกึ่งเขตร้อน (Falagus et al., 2007)

โรคติดเชื้อในกระแสเลือด (Bloodstream infection) มีรายงานในระหว่างปี ค.ศ.1995 ถึง ค.ศ. 2002 พบการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลของประเทศสหรัฐอเมริกาที่เกิดจากการติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. คิดเป็นร้อยละ 1.3 ของการติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งหมด พบมากในผู้ป่วยที่พักรักษาตัวอยู่ในหอผู้ป่วยหนัก มีอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อประมาณร้อยละ 34-43.4 พบเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับสาม รองจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* และ *Candida* spp. (Wisplinghoff et al., 2004)

โรคติดเชื้อบริเวณบาดแผลไฟไหม้และบาดแผลอื่นๆ (Burn infection and other wounds) ส่วนใหญ่มักมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (MDR-bacteria) รวมทั้ง *A. baumannii* มีรายงานพบในหนูทดลองโรคติดเชื้อบริเวณบาดแผลมักมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *A. baumannii* คิดเป็นร้อยละ 22 นอกจากนี้ยังพบร้อยละ 53 ของเชื้อที่แยกได้นั้น ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน (MDR-AB) ซึ่งจัดเป็นปัญหาสำคัญที่นำไปสู่ภาวะทุพพลภาพและการเสียชีวิตในที่สุด (Keen et al., 2010)

โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) จัดเป็นโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล มักเกิดขึ้นภายหลังจากผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดสมอง เมื่อมีการติดเชื้อ *A. baumannii* มักมีอาการแสดง ได้แก่ เป็นไข้ ปวดหัว และชักเกร็ง สำหรับปัจจัยที่ส่งเสริมทำให้โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น คือ การใส่สายระบายน้ำในโพรงสมอง ซึ่งกลายเป็นช่องทางสำหรับการติดเชื้อฉวยโอกาสได้ง่ายยิ่งขึ้น ทำให้พบอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 71 (Metan et al., 2007; Rodriguez et al., 2008)

3. ระบาดวิทยา

ในปี ค.ศ. 1995 จากการสำรวจผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการติดเชื้อ *A. baumannii* ในกระแสเลือดสูงถึงร้อยละ 43.3 เป็นสาเหตุการตายอันดับสาม ในผู้ป่วยที่นอนพักรักษาตัวในหอผู้ป่วยหนัก (Wisplinghoff et al., 2004) ส่วนในประเทศไทย แถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบการติดเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มขึ้นจาก 25 ครั้งต่อผู้ป่วย 10,000 คน ในปี ค.ศ. 1999 เป็น 55 ครั้งต่อผู้ป่วย 10,000 คน ในปี ค.ศ. 2003 (Hsueh et al., 2005) ต่อมาจากรายงานในปี ค.ศ. 2014 พบว่าสามารถตรวจพบการติดเชื้อ *A. baumannii* มากเป็นอันดับที่สอง รองจากการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ภายในผู้ป่วยโรคปอดอักเสบของโรงพยาบาลในประเทศจีน (Zhang et al., 2014) จากการรายงานของ Rattanaumpawan et al. พบว่าในประเทศไทยตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* มากเป็นอันดับที่หนึ่ง คิดเป็นร้อยละ 32.7 ของโรคติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เสียชีวิตอันดับต้นๆ ของประเทศไทย (Rattanaumpawan et al., 2013)

การศึกษาลำดับการพัฒนาการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* พบว่า ในช่วง ค.ศ. 1970 พบการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *Acinetobacter* spp. จากสิ่งส่งตรวจเป็นจำนวนมาก แต่ยังสามารถรักษาได้ง่าย โดยใช้ยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β -lactam เช่น ampicillin, minocycline, second-generation cephalosporins, colistin หรือ gentamicin (Livermore, & Woodford, 2006) ต่อมา มีการใช้ยาต้านจุลชีพมากเกินไปจนทำให้เกิดความจำเป็น ส่งผลให้ในระหว่างปี ค.ศ. 1980 ถึง ค.ศ. 1990 พบเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพสามขนานขึ้นไป ที่เรียกว่า multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR-AB) และดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem ได้แก่ imipenem และ meropenem ที่เรียกว่า carbapenem-resistant *A. baumannii* (CR-AB) ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งกว้าง นิยมใช้รักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้ง *A. baumannii* (Poirel, & Nordmann, 2006) ในปี ค.ศ. 1994 Go et al. รายงานการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อภายในโรงพยาบาลนิวยอร์ก ซึ่งเกิดจาก *A. baumannii* พบว่าเชื้อที่แยกได้ดื้อต่อยา cephalosporins และ carbapenem (Go et al., 1994) ต่อมาในแถบสหราชอาณาจักรพบ CR-AB จากสิ่งส่งตรวจเลือด เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 ในปี ค.ศ. 1998 เป็นร้อยละ 55 ในปี ค.ศ. 2006 (Wareham et al., 2008) ส่วนในแถบทวีปเอเชีย ประเทศเกาหลี พบ CR-AB เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 52.9 ในปี ค.ศ. 2006 เป็นร้อยละ 89.8 ในปี ค.ศ. 2014 (Choi et al., 2016) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาพบว่า ในระหว่างปี ค.ศ. 1996 ถึง ค.ศ. 1997 ภายในโรงพยาบาลศิริราช พบความชุกของ MDR-AB ร้อยละ 57.6 (Aswapokee et al., 1998) ส่วนภายในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ในปี ค.ศ. 2003 พบความชุกของ MDR-AB ร้อยละ 23 และเชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem มากที่สุด (Chaiwarith et al., 2005) ในขณะที่โรงพยาบาลศิริราช พบ CR-AB ถึงร้อยละ 56.7 โดยทุกไอโซเลตที่แยกได้ไวต่อยา colistin (Sirichot et al., 2009) ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 มีรายงานพบว่าโรงพยาบาลตติยภูมิของประเทศไทย จำนวน 12 แห่ง พบความชุกของ CR-AB เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 81.8 (Werarak et al., 2012) ซึ่งเห็นได้ว่าพบอัตราการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem เพิ่มขึ้นในระยะเวลาอันรวดเร็ว จัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขสำคัญที่พบทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย การดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem เกิดจากกลไกการดื้อยาหลายกลไกด้วยกัน ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยาในกลุ่ม β -lactam การดัดแปลงโครงสร้างของ outer membrane หรือ penicillin binding proteins ซึ่งเป็นเป้าหมายในการจับของยา และการขับยาออกนอกเซลล์โดย efflux pumps (Limansky et al., 2002; Gehrlein et al., 1991; Marchand et al., 2011)

4. ปัจจัยก่อโรค

ความรุนแรงของโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *A. baumannii* ขึ้นอยู่กับตัวของผู้ติดเชื้อและตัวเชื้อก่อโรค โดยปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค (virulence factors) ในเชื้อ *A. baumannii* ที่สำคัญ ได้แก่

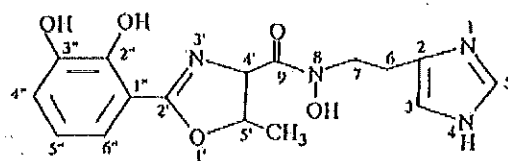
4.1 Outer membrane vesicles หรือ OMVs เป็นถุงที่เชื้อสร้างมาจาก outer membrane ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรายงานพบว่า OMVs เป็นปัจจัยก่อโรคที่มีส่วนร่วมที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความรุนแรงมากขึ้น โดยการส่งปัจจัยก่อโรคไปยังไซโตพลาซึมของเซลล์โฮสต์ และช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์โฮสต์ (Ellis, & Kuehn, 2010) ภายในถุง OMVs บรรจุ OmpA ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น protease และ hemolysin เป็นตัวชักนำให้เซลล์แตก และทำให้เซลล์ตายในที่สุด และยังพบอีกว่า OmpA มีบทบาทในการเกาะติดและบุกรุกทำลายเซลล์เยื่อหุ้ม นำไปสู่การแพร่กระจายของเชื้อ *A. baumannii* ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ (Choi et al., 2008) และสามารถยับยั้ง alternative complement pathways ทำให้ระบบ complement ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Kim et al., 2009) นอกจากนี้ OMVs ยังมีส่วนช่วยในการส่งผ่านยีนดื้อยาไปยังเซลล์แบคทีเรียอื่นได้ (horizontal gene transfer) เช่น OXA-24 carbapenamase gene แสดงให้เห็นว่า OMVs มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของการดื้อยาในเชื้อ *A. baumannii* อีกด้วย (Rumbo et al., 2011)

4.2 Lipopolysaccharide หรือ LPS เชื้อ *A. baumannii* สามารถสร้าง LPS บนผิวเซลล์ของตัวเชื้อได้ โดยพบว่า LPS ประกอบไปด้วย lipid A carbohydrate core และ O-antigen จากการทดลองของ Luke et al. ในปี ค.ศ. 2010 พบว่าเมื่อมีการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ LpsB glycotransferase ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่ได้เกิดการกลายพันธุ์ และส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ต้านทานต่อการทำงานของซีรัม (serum resistant) เชื้อจึงทนและเจริญได้ดีในซีรัมของมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่า LPS มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โฮสต์ได้ดีอีกด้วย (Luke et al., 2010)

4.3 Capsular polysaccharide มีบทบาทสำคัญในการป้องกันแบคทีเรียจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โฮสต์ (Russo et al., 2010)

4.4 Bacterial phospholipase เป็น lipolytic enzyme ประกอบด้วยเอนไซม์ phospholipase D ที่มีความสำคัญในการเกิด serum resistant และเอนไซม์ phospholipase C ช่วยเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อหุ้ม เอนไซม์ Bacterial phospholipase จัดเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญในแบคทีเรียแกรมลบ สามารถกระตุ้นให้มีการตัด phospholipids ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์โฮสต์ เป็นผลให้เชื้อสามารถรุกรานและแพร่กระจายไปยังเซลล์แบคทีเรียข้างเคียงได้ (Jacobs et al., 2010; Camarena et al., 2010)

4.5 Acinetobactin เป็นสารที่ *A. baumannii* สร้างขึ้นสำหรับนำ Fe^{3+} เข้ามาภายในเซลล์ มีบทบาทสำคัญในการช่วยยึดเกาะเซลล์เยื่อหุ้มและยังเหนี่ยวนำให้เซลล์โฮสต์แตกและตายได้ มีการศึกษาใน *A. baumannii* ATCC19606 พบว่าเชื้อสร้าง acinetobactin ซึ่งพบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์แตกและตายในที่สุด ต่อมา มีการศึกษาทดลองในหนู mice พบว่า acinetobactin ที่เชื้อสร้างขึ้น ทำให้หนูที่ติดเชื้อตายได้ แสดงให้เห็นได้ว่าการที่เชื้อสามารถผลิต acinetobactin ได้นั้น ส่งผลให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรคมายิ่งขึ้น (Gaddy et al., 2012; Kim et al., 2015)



ภาพ 1 แสดงโครงสร้างของ acinetobactin

ที่มา: Yamamoto et al., 1994

4.6 Biofilm เชื้อ *A. baumannii* สามารถสร้าง biofilm ขึ้นมาได้ ทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดในสภาวะที่รุนแรงได้นานกว่าเชื้อที่ไม่มีการสร้าง biofilm ดังนั้นการที่เชื้อสามารถผลิตหรือสร้าง biofilm ได้ ช่วยเพิ่มความสามารถในการเกาะติดเซลล์เยื่อและทำให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานยิ่งขึ้น อีกทั้งยังพบว่าเชื้อ *A. baumannii* สามารถยึดเกาะอุปกรณ์ช่วยหายใจ อุปกรณ์ที่เป็นแก้วหรือพลาสติกได้เป็นอย่างดี ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อก่อให้เกิดโรคติดเชื้อภายในโรงพยาบาลเพิ่มสูงขึ้น และยังส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพตามมา (Espinal et al., 2012; Longo et al., 2014)

5. กลไกการดื้อยา

ในปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบปัญหาแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อ *A. baumannii* การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* มีอยู่หลายรูปแบบ เช่น *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenems (Carbapenem resistant *A. baumannii*; CR-AB) เชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพตั้งแต่สามขนานขึ้นไป (Multidrug resistant *A. baumannii*; MDR-AB) เชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกขนานที่ใช้ในการรักษา ยกเว้น colistin และ tigecycline (Extensively drug resistant *A. baumannii*; XDR-AB) และเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกขนานที่ใช้ในการรักษา (Pandrug resistant *A. baumannii*; PDR-AB) ส่งผลให้พบอัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อเป็นจำนวนมาก (Magiorakos et al., 2012) กลไกสำคัญที่ทำให้ *A. baumannii* ดื้อต่อยา ได้แก่

5.1 การสร้างเอนไซม์ทำลายยา ซึ่งพบมากที่สุดในการดื้อยาของ *A. baumannii* เช่น การสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamases มาย่อยสลายยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins และ carbapenems (Bonomo, & Szabo, 2006) การสร้างเอนไซม์ AmpC cephalosporinase ทำให้เชื้อดื้อต่อยา penicillins และ extended-spectrum cephalosporin ยกเว้น cefepime (Drawz et al., 2010) การสร้างเอนไซม์ class D β -lactamase ทำให้เชื้อดื้อต่อยา carbapenem

(Evans, & Amyes, 2014) และการสร้างเอนไซม์ class B metallo- β -lactamase เช่น VIM, IMP ซึ่งสามารถย่อยสลายยาต้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenems ได้ (Thomson, & Bonomo, 2005)

5.2 การลดการนำยาเข้าสู่เซลล์โดยลดการสร้าง porin ยาต้านจุลชีพบางชนิด เช่น ยาในกลุ่ม β -lactam ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ต้องอาศัยช่องทางในการนำยาเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน porin มีการศึกษาพบว่าถ้า *A. baumannii* ติดต่อยาในกลุ่ม carbapenem เชื้อมีการปรับตัวโดยลดการสร้าง porin ซึ่งเป็นช่องทางสำหรับนำยาเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพ (Bou et al., 2000; Limansky et al., 2002)

5.3 การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา เชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม Fluoroquinolones, β -lactams และ Polymyxins มีการเปลี่ยนแปลง penicillin binding protein (PBP) ซึ่งเป็นเป้าหมายในการจับของยา โดยการสร้าง PBP ชนิดใหม่ ทำให้ยาจับไม่ได้ หรือลดการสร้าง PBP ชนิดเดิมที่ยาเคยจับได้ ทำให้ยาต้านจุลชีพจับได้น้อยลงหรือจับไม่ได้เลย ส่งผลให้ยาออกฤทธิ์ไม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบกลไกการดื้อยาลักษณะนี้น้อยมากในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gehrlein et al., 1991)

5.4 การขับยาออกนอกเซลล์ โดย efflux pump ที่อยู่บนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสามารถขับยาในกลุ่ม β -lactams, Tetracycline, Fluoroquinolone, Aminoglycoside และ Glycylcycline โดยใช้ระบบ resistance-nodulation-cell division (RND) ส่งผลให้ระดับยาในเซลล์ลดลง จนไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อได้ ทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (Magnet et al., 2001; McConnell et al., 2013)

6. การดื้อยาในกลุ่ม β -lactams และยีนดื้อยาที่พบใน *A. baumannii*

กลไกสำคัญและพบได้บ่อยสำหรับการดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β -lactams ของเชื้อ *A. baumannii* คือ การสร้างเอนไซม์ β -lactamase ออกมาทำลายยา มีการจัดกลุ่มเอนไซม์ตามคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาหรือโครงสร้างระดับโมเลกุล แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามการจัดจำแนกของ Ambler (Ambler classification) (Bush, & Jacoby, 2010) ได้แก่ Class A β -lactamases ซึ่งมีหมู่ serine อยู่บริเวณ active site ถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid พบมากในแบคทีเรีย Enterobacteriaceae ต่อมาพบ KPC-like enzyme และ GES-like enzyme ใน CR-AB ในประเทศเปอร์โตริโกและเมืองปารีส ตามลำดับ (Robledo et al., 2010; Bonnin et al., 2011) Class B metallo- β -lactamases (MBLs) ใน *A. baumannii* พบยีน *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* และ *bla_{SM}* ซึ่งพบมากในแถบภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ฮองกง เกาหลีใต้ และออสเตรเลีย (Mendes et al., 2009) Class C β -lactamases มีหมู่ serine อยู่บริเวณ active

site ถูกยับยั้งด้วย boronic acid พบยีน *bla*_{AmpC} เพิ่มการแสดงออกของ β -lactamase เป็นผลให้ดื้อต่อยา extended-spectrum cephalosporins ยกเว้น cefepime (Perez et al., 2007) และสุดท้าย Class D serine-carbapenemase หรือ OXA type carbapenemases พบมากที่สุดในการ AB (ตาราง 1) (Zarrilli et al., 2009) โดย OXA type carbapenemases ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 243-260 residues มีน้ำหนักโมเลกุล 23.0 ถึง 35.5 kDa และมีค่า pI values อยู่ระหว่าง 5.1 และ 9.0 (Walther-Rasmussen, & Hoiby, 2006) OXA type carbapenemases ถูกพบครั้งแรกในเชื้อ *A. baumannii* ในปี ค.ศ.1985 แยกได้จากโรงพยาบาลในประเทศสกอตแลนด์ให้ชื่อว่า ARI-1 (*Acinetobacter* Resistant to Imipenem) หรือที่เรียกว่า OXA-23 (Paton et al., 1993) ในปัจจุบันพบ OXA type carbapenemases หลายชนิด ได้แก่ OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like และ OXA-143-like (Evans, & Amyes, 2014) การแพร่กระจายของ OXA type carbapenemases พบได้ทั่วโลก เช่น OXA-23-like พบในประเทศโคลัมเบีย อาร์เจนตินา บราซิล เลบานอน และเวียดนาม เป็นต้น (Villegas et al., 2007; Merkier et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Nhu et al., 2014; Al Atrouni et al., 2016) OXA-58-like ส่วนใหญ่พบในทวีปยุโรป ได้แก่ ประเทศตุรกี กรีซ และอิตาลี (Kulah et al., 2010; Gogou et al., 2011; Migliavacca et al., 2013) OXA-24/40-like พบมากในบางประเทศแถบยุโรปและเอเชีย (Lolans et al., 2006; Mendes et al., 2009) ส่วน OXA-143-like พบในประเทศบราซิล (Neves et al., 2016) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานพบยีนดื้อยาในกลุ่ม OXA type carbapenemases ได้แก่ *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24/40} และ *bla*_{OXA-58} (Mendes et al., 2009) โดยพบความชุกของยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} มากที่สุด ร้อยละ 80-100 ในโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก โรงพยาบาลศิริราช จังหวัดกรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โรงพยาบาลหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี ส่วน *bla*_{OXA-40-like} พบในโรงพยาบาลหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง *bla*_{OXA-40} ถึง 99% (GenBank accession no. KJ748571) พบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลรามาริบัติ และโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า (Niumsup et al., 2009; Thapa et al., 2010; Jantama et al., 2013; Jumroon, & Santanirand, 2013; Santimaleeworagun et al., 2014; Teo et al., 2015; Jantanawiwat et al., 2016)

ตาราง 1 แสดงยีนดื้อยาที่พบใน *A. baumannii*

ยีน	ตำแหน่งที่พบ	ดื้อยา	แหล่งที่มา
Class A β-lactamase			
<i>bla</i> _{GES-11}	พลาสมิด	β -lactams	Poirel et al., 2011
<i>bla</i> _{TEM}	พลาสมิดหรือโครโมโซม	cephalosporins (3 rd)	Manchanda et al., 2010
Class B β-lactamase			
<i>bla</i> _{IMP}	พลาสมิด	carbapenems	Poirel et al., 2011
<i>bla</i> _{VIM}	พลาสมิด	carbapenems	Poirel et al., 2011
<i>bla</i> _{NDM}	พลาสมิดหรือโครโมโซม	carbapenems	Zhang et al., 2013; Krahn et al., 2016
Class C β-lactamase			
<i>bla</i> _{AmpC}	โครโมโซม	extended-spectrum cephalosporins	Poirel, & Nordmann, 2006
Class D β-lactamase (OXA-type carbapenemase)			
<i>bla</i> _{OXA-23}	พลาสมิดหรือโครโมโซม	carbapenems	Peleg et al., 2008
<i>bla</i> _{OXA-24}	พลาสมิดหรือโครโมโซม	carbapenems	Peleg et al., 2008
<i>bla</i> _{OXA-51}	โครโมโซม	carbapenems	Peleg et al., 2008
<i>bla</i> _{OXA-58}	พลาสมิดหรือโครโมโซม	carbapenems	Peleg et al., 2008

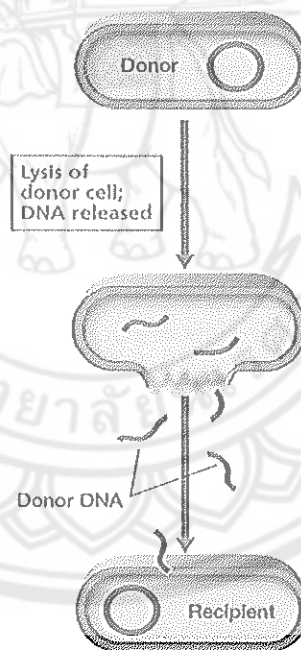
การถ่ายทอดยีน (gene transfer)

การถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียสองชนิดนั้น จำเป็นต้องมีเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ (donor cell) และเซลล์แบคทีเรียผู้รับ (recipient cell) เพื่อส่งผ่านยีน สามารถเกิดได้สองวิธี คือ การถ่ายทอดยีนในแนวตั้ง (vertical gene transfer) และการถ่ายทอดยีนในแนวนอน (horizontal gene transfer or lateral gene transfer)

การถ่ายทอดยีนในแนวตั้ง (vertical gene transfer) เป็นการถ่ายทอดยีนจากเซลล์พ่อแม่ไปยังเซลล์ลูกในขณะที่มีการแบ่งตัว ทำให้ยีนที่ถ่ายทอดมามีลักษณะเหมือนเซลล์พ่อแม่ ส่วนการถ่ายทอดยีนในแนวนอน (horizontal gene transfer or lateral gene transfer) เป็นการถ่ายทอดยีนจากเซลล์แบคทีเรียชนิดหนึ่งไปให้แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ใช่เซลล์พ่อแม่ การถ่ายทอดยีนในแนวนอน จัดว่ามีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากพบว่าการถ่ายทอดในลักษณะนี้ส่งผลให้แบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพมากขึ้น การถ่ายทอดยีนในแนวนอน ประกอบด้วยสามกระบวนการ คือ ทรานสฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน

1. ทรานสฟอร์เมชัน (transformation) เป็นการรับเอา free DNA ที่ลอยลอยอยู่ในสิ่งแวดล้อม เข้ามาในเซลล์ผู้รับ (recipient cell) เนื่องจากเซลล์ผู้ให้มีการย่อยสลายหรือเซลล์แตก พบโดย Fred Griffith, et al. ที่ศึกษาปรากฏการณ์นี้ในปี ค.ศ. 1928 กระบวนการทรานสฟอร์เมชัน มีอยู่สองวิธีด้วยกัน ได้แก่ ทรานสฟอร์เมชันที่สามารถเกิดได้ทั่วไปตามธรรมชาติ (Natural transformation) ซึ่งมีเพียงแบคทีเรียบางสกุลเท่านั้นที่สามารถเกิด Natural transformation ได้ เช่น *Bacillus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Helicobacter* และ *Acinetobacter* (Lorenz, & Wackernagel, 1994; Vries, & Wackernagel, 2002) โดยเซลล์แบคทีเรียที่สามารถรับเอา DNA หรือที่พร้อมรับเอา DNA เข้าไปในเซลล์ได้ เรียกว่า competent cell ขั้นตอนการทรานสฟอร์เมชันตามธรรมชาตินั้น เริ่มจากเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ (donor cell) ตาย และมีการย่อยสลาย DNA ออกมา DNA fragment ของเซลล์แบคทีเรียผู้ให้จับกับ DNA binding protein บนผนังเซลล์ของเซลล์แบคทีเรียผู้รับ (recipient cell) หลังจากนั้นเอนไซม์นิวคลีเอสทำการตัดสาย DNA fragment สายใดสายหนึ่งของเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ สายเดียวของเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียผู้รับ เกิดการถ่ายทอดสารพันธุกรรมกันระหว่างเซลล์แบคทีเรียผู้ให้และเซลล์แบคทีเรียผู้รับ (ภาพ 2) (Lorenz, & Wackernagel, 1994) ส่วนทรานสฟอร์เมชันที่เกิดในห้องปฏิบัติการ หรือที่เรียกว่า Artificial transformation แบคทีเรียหลายชนิด ไม่มีคุณสมบัติเป็น competent cell ในธรรมชาติ จึงต้องมีการชักนำให้เป็น competent cell ก่อน เพื่อทำการทรานสฟอร์เมชันต่อไป กระบวนการ

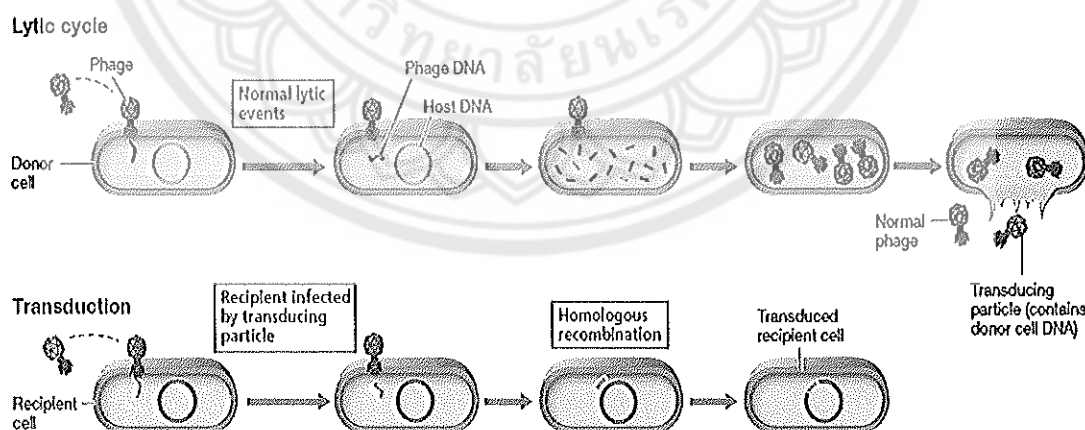
ทรานสเฟอร์เมชันที่เกิดในห้องปฏิบัติการ มีสองวิธีที่นิยม คือ การใช้สารเคมีและการใช้กระแสไฟฟ้า ในการกระตุ้นให้เซลล์ผู้รับมีคุณสมบัติเป็น competent cell การใช้สารเคมีในการกระตุ้น เริ่มจาก ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้อยู่ในระยะ log phase นำไปปั่นเหวี่ยง ละลายลงใน CaCl_2 จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ competent cell ที่ได้ เติมพลาสติกที่ศึกษาลงไป นำไป heat shock โดยให้ความร้อน 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที หลังจากนั้นเติมอาหาร เลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้มีการแสดงออกของยีน และนำไปเพาะเลี้ยง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ส่วนการใช้กระแสไฟฟ้า เป็นการนำเซลล์แบคทีเรียผสมกับพลาสติก แล้วนำไปให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์สูง ทำให้พลาสติกสามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น แล้วจึงนำไปคัดเลือกโดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพ เพื่อคัดเลือกเซลล์ แบคทีเรียที่ต้องการ วิธีนี้นิยมใช้ในแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์หนา (Dale, 1995)



ภาพ 2 แสดงกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน

ที่มา: Madigan et al., 2012

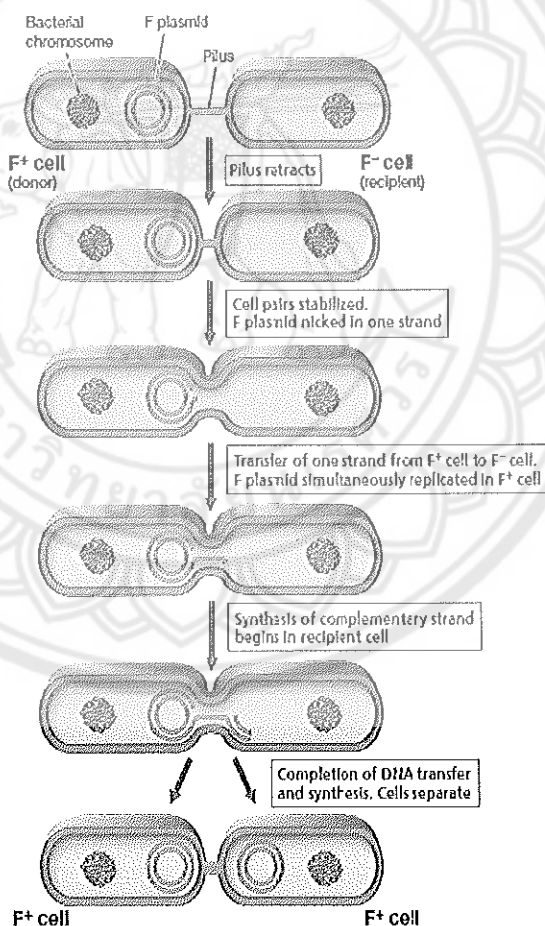
2. ทรานสดักชัน (transduction) เป็นกระบวนการเคลื่อนย้ายยีนของเซลล์แบคทีเรียชนิดหนึ่งไปสู่เซลล์แบคทีเรียอีกชนิด โดยมีแบคทีริโอเฟจหรือเฟจเป็นตัวนำพา ยีนภายในเฟจมียีนของแบคทีเรียอยู่ ยีนถูกฉีดเข้าไปในแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งได้ เกิดการถ่ายทอดยีนระหว่างกัน (Baker et al., 2011) กระบวนการทรานสดักชันมีสองแบบ คือ ทรานสดักชันทั่วไป (generalized transduction) และทรานสดักชันจำเพาะที่ (specialized transduction) ทรานสดักชันทั่วไปเกิดกับ lytic phage เมื่อเฟจเกาะติดกับเซลล์แบคทีเรีย ส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย กรดนิวคลีอิกของเฟจมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และทำให้โครโมโซมหรือกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียแตกออกเป็นพอน (fragment) จากนั้นถูกนำมาบรรจุอยู่ในแคปซิดของเฟจ เมื่อประกอบกันเป็นเฟจที่สมบูรณ์ ออกจากเซลล์แบคทีเรียไปเกาะติดกับแบคทีเรียตัวใหม่ ส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียตัวใหม่ โครโมโซมหรือยีนที่อยู่ในเฟจเข้าไปแทรกอยู่ในแบคทีเรียตัวใหม่ เกิดการถ่ายทอดยีนให้แก่กัน (ภาพ 3) ส่วนทรานสดักชันจำเพาะที่ (specialized transduction) เกิดขึ้นกับ lysogenic phage เช่น แลมด้าเฟจ (lambda phage) โดยกรดนิวคลีอิกถูกแทรกเข้าไปภายในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เมื่อสภาวะเหมาะสม ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ lytic cycle เมื่อเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเฟจ เซลล์แบคทีเรียแตก ปล่อยอนุภาคของเฟจออกมา เมื่อไปเกาะติดกับเซลล์แบคทีเรียตัวใหม่ จะนำกรดนิวคลีอิกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน เกิดการถ่ายทอดยีนให้แก่กัน (Awwal, & Abalaka, 2011)



ภาพ 3 แสดงกระบวนการทรานสดักชัน

ที่มา: Madigan et al., 2012

3. คอนจูเกชัน (conjugation) ถูกค้นพบโดย Lederberg และ Tatum ในปี ค.ศ. 1946 เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีนหรือพลาสมิดระหว่างเซลล์แบคทีเรียโดยตรง มีการสัมผัสกันระหว่างสองเซลล์ คือ เซลล์แบคทีเรียผู้ให้ที่มี F plasmid หรือที่เรียกว่า F^+ และ เซลล์แบคทีเรียผู้รับที่ไม่มี F plasmid หรือที่เรียกว่า F^- โดยเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ที่มี F plasmid (F^+) สร้าง sex pilus ดึงเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มี F plasmid (F^-) มาใกล้กัน เกิดการเชื่อมต่อกัน ตัดสายใดสายหนึ่งของพลาสมิดส่งไปให้แบคทีเรียที่ไม่มี F plasmid สร้างอีกหนึ่งสายที่เข้าคู่กันขึ้นมา ส่วนเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ที่มี F plasmid สร้างอีกหนึ่งสายที่เข้าคู่กัน เกิดการถ่ายทอดพลาสมิดหรือยีนจากแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ ผ่านกระบวนการ homologous recombination (ภาพ 4) (Black, 2013)



ภาพ 4 แสดงกระบวนการคอนจูเกชัน

ที่มา: Madigan et al., 2012

การถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวราบของแบคทีเรีย (horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in bacteria)

การดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและจัดเป็นภัยคุกคามต่อปัญหาสุขภาพของประชากรทั่วโลก กลไกสำคัญที่ส่งเสริมให้มีการแพร่กระจายของยีนดื้อยามากที่สุด คือ การถ่ายทอดยีนในแนวราบ หรือ horizontal gene transfer (Davies, & Davies, 2010) ซึ่งประกอบด้วยสามกลไกหลัก ได้แก่ ทรานสเฟอร์เมชั่น ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน โดยพบว่า คอนจูเกชัน เป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแบคทีเรีย (Dzidic, & Bedekovic, 2003)

1. ทรานสเฟอร์เมชั่น

ในปี ค.ศ. 2010 Bertini et al. ได้ทำการศึกษาการส่งผ่านยีนโดยวิธีทรานสเฟอร์เมชั่น ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในการนำพลาสมิดที่มียีนดื้อยา *bla_{OXA-58}* ของเชื้อ *A. baumannii* Ab120066 ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับ *A. baumannii* BM4547 ซึ่งไวต่อยาต้านจุลชีพ จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียผู้รับมียีนดื้อยา *bla_{OXA-58}* ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenem ตามมา (Bertini et al., 2010) ต่อมา Ramirez et al. ได้ค้นพบ *A. baumannii* A118 ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจเลือดของผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลลูโนสแอร์ ในประเทศอาร์เจนตินา ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถรับเอาดีเอ็นเอหรือเข้ามาภายในเซลล์โดยธรรมชาติ ไม่ต้องใช้สารเคมีหรือกระแสไฟฟ้าเข้ามากระตุ้น (Ramirez et al., 2010)

ส่วนในปี ค.ศ. 2011 Pour et al. ศึกษากระบวนการทรานสเฟอร์เมชั่น โดยใช้พลาสมิดของเชื้อ *A. baumannii* A3 เป็นแบคทีเรียผู้ให้ และ *A. baylyi* 7056 *trpE* เป็นแบคทีเรียผู้รับ เมื่อได้โคโลนีของ transformants นำมาตรวจสอบหาค่า MIC เทียบกับแบคทีเรียผู้รับ พบว่า transformants ที่ได้มีค่า MIC ของยาต้านจุลชีพสูงขึ้นมากกว่า 8 เท่า และมีค่า transformation efficiency เท่ากับ 2.9×10^3 transformants μg^{-1} plasmid DNA (Pour et al., 2011)

จากนั้นในปี ค.ศ. 2012 Ramirez et al. ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา *bla_{CTX-M-2}* โดยใช้พลาสมิดของเชื้อ *Proteus mirabilis* ที่มียีนดื้อยา *bla_{CTX-M-2}* เข้าไปใน *A. baumannii* A118 ซึ่งไวต่อยา CTX, CAZ และ FEP จากการศึกษาพบว่ายีน *bla_{CTX-M-2}* สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาให้ *A. baumannii* A118 ได้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยา *bla_{CTX-M-2}* (Ramirez et al., 2012) ในปีเดียวกัน Rumbo et al. ศึกษาการถ่ายทอดยีนในแนวราบ (horizontal gene transfer) ของยีน OXA-24 carbapenemase ผ่าน outer membrane vesicles (OMVs) ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้าว่าอาจถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันได้ จากกระบวนการทรานสเฟอร์เมชั่น โดยใช้ *A. baumannii* สายพันธุ์ H120-A2 และ H120-CU3

ที่พลาสมิดที่มียีนดื้อยา bla_{OXA-24} เป็นแบคทีเรียผู้ให้ และ *A. baumannii* ATCC17978 เป็นแบคทีเรียผู้รับ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *A. baumannii* ที่สามารถปลดปล่อย OMVs ที่มียีนดื้อยา bla_{OXA-24} ออกมา ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยา โดยเฉพาะยีนที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems ได้ (Rumbo et al., 2011) นอกจากนี้ Fu et al. ยังพบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่มีพลาสมิดที่มียีนดื้อยา bla_{NDM-1} สามารถส่งผ่านยีนดื้อยาไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับ *A. baylyi* ADP1 ได้ โดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชันแบบใช้กระแสไฟฟ้าเข้ามาช่วย (Fu et al., 2012)

ปี ค.ศ. 2013 Higgins et al. พบว่าสามารถเกิดกระบวนการทรานสเฟอร์เมชันได้ใน *A. baumannii* ATCC17978 โดยใช้กระแสไฟฟ้าเข้ามาช่วยกระตุ้นเซลล์แบคทีเรียให้พร้อมรับดีเอ็นเอหรือยีนเข้าไปภายในเซลล์ เมื่อทำการทรานสเฟอร์เมชันเข้าไปใน *A. baumannii* ATCC17978 พบว่าเชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่ได้เกิดกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน แสดงให้เห็นว่ากระบวนการทรานสเฟอร์เมชันสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียได้ (Higgins et al., 2013) และในปีเดียวกัน Krizova et al. ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดยีน bla_{TEM-1} โดยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน ใช้ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pAT801 ซึ่งมียีน bla_{TEM-1} อยู่ เป็นเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ แล้วทำการทรานสเฟอร์เมชันเข้าไปใน *E. coli* Top10 และ *A. baumannii* NHPH56 ซึ่งไม่มียีน bla_{TEM-1} อยู่ พบว่าสามารถเกิดการถ่ายทอดยีน bla_{TEM-1} ได้โดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน มีการใช้กระแสไฟฟ้าเข้ามาช่วย ทำการตรวจสอบหายีน bla_{TEM-1} โดยวิธีพีซีอาร์ และตรวจสอบหาพลาสมิด pAT801 เพื่อทำการยืนยันว่าพบยีนและพลาสมิดที่มียีนดื้อยา bla_{TEM-1} อยู่ในเซลล์แบคทีเรียผู้รับ แล้วส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา (Krizova et al., 2013)

และในปี ค.ศ. 2014 พบว่าประสบความสำเร็จในการส่งผ่านยีนดื้อยา bla_{OXA-58} จาก *Acinetobacter* spp. ไปสู่เชื้อ *A. baumannii* LS0148 ซึ่งเป็นแบคทีเรียผู้รับ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพ ticarcillin เป็นตัวคัดเลือก transformants ที่ได้ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียผู้รับมียีนดื้อยา bla_{OXA-58} และยังดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenem ที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย (Fu et al., 2014)

จากการศึกษาทดลองการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน พบว่า *A. baumannii* สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา ได้แก่ bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-58} และ bla_{NDM-1} ไปสู่แบคทีเรียผู้รับได้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้กระแสไฟฟ้าในการกระตุ้นให้เซลล์แบคทีเรียผู้รับพร้อมที่จะรับยีนดื้อยาเข้าไปภายในเซลล์ เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยาระหว่างกัน

2. ทรานสดักชัน

เป็นการถ่ายถอดยีนหรือดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่ง โดยมีแบคทีเรียโฮเฟจเป็นพาหะ ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใน *A. baumannii* แต่มีการศึกษาในแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่

การศึกษาของ Mazaheri Nezhad Fard, Barton, & Heuzenroeder ในปี ค.ศ. 2011 ได้ทำการศึกษากระบวนการทรานสดักชันในแบคทีเรีย *Enterococci* โดยใช้แบคทีเรียโฮเฟจที่แยกได้จาก *Enterococcus gallinarum* EGRM195, *Enterococcus faecalis* EFRM31 และ EFRM42 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโฮเฟจที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Enterococci* มีบทบาทสำคัญในการถ่ายถอดยีนดื้อยา tetracycline (*tet(M)*) และ gentamicin (*ant2-1*) ระหว่างแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือแบคทีเรียต่างสปีชีส์ในกลุ่ม *Enterococci* (Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Varga et al. ได้ทำการศึกษาการถ่ายถอด พลาสมิดที่มียีนดื้อยา โดยกระบวนการทรานสดักชันใน methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) USA300 ซึ่งพบว่ามีพลาสมิดดื้อยาต้านจุลชีพในวงกว้าง (broad spectrum) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แบคทีเรียโฮเฟจสองชนิด คือ Ø80α และ ØJB ในการชักนำให้มีการนำพลาสมิดที่มียีนดื้อยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย พบว่าประสบความสำเร็จในการเกิดกระบวนการทรานสดักชันนำพลาสมิด penicillinase และพลาสมิดที่ดื้อต่อยา tetracycline ถ่ายทอดพลาสมิดเข้าไปใน USA300 โดย Ø80α และ ØJB เป็นผลให้มีการแพร่กระจายของพลาสมิดที่มียีนดื้อยาในเชื้อ *S. aureus* (Varga et al., 2012)

ในปี ค.ศ. 2015 Giovanetti et al. ทำการศึกษากระบวนการทรานสดักชันของ *Streptococcus pyogenes* bacteriophage Øm46.1 ที่มียีนดื้อยา *mef(A)* และ *tet(O)* ไปสู่ *Streptococcus* สปีชีส์อื่นๆ พบว่าสามารถส่งผ่านยีนดื้อยาไปสู่ *S. agalactiae*, *S. gordonii* และ *S. suis* ได้ด้วยกระบวนการทรานสดักชัน (Giovanetti et al., 2015) ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบมีการศึกษาในเชื้อ *E. coli* โดยใช้แบคทีเรียโฮเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่เป็นตัวนำพายีนดื้อยา จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโฮเฟจที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ สามารถนำพายีนดื้อยา *aphA1*, *tet(A)*, *floR* และ *bla_{TEM-1}* ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับ *E. coli* ATCC13706 ทำให้พบแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มมากขึ้น (Shousha et al., 2015)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าในปัจจุบันแบคทีเรียโฮเฟจเริ่มเข้ามามีบทบาทในการถ่ายถอดยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียด้วยกัน โดยอาศัยกระบวนการทรานสดักชัน ซึ่งยังมี

ผู้ศึกษาในแบคทีเรียแกรมลบจำนวนน้อยมาก เมื่อเทียบกับการศึกษาการถ่ายทอดยีนโดยอาศัยกระบวนการ ทรานส์ฟอร์เมชันและคอนจูเกชัน

3. คอนจูเกชัน

เป็นกระบวนการถ่ายทอดยีนจากเซลล์แบคทีเรียชนิดหนึ่งไปให้เซลล์แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งโดยตรง ผ่านอวัยวะพิเศษที่เรียกว่า pili เมื่อเซลล์สองตัวมาอยู่ใกล้กัน เซลล์หนึ่งยื่น pili ไปเชื่อมกับอีกเซลล์ เกิดการถ่ายทอดยีนดีเอ็นเอให้แก่กัน

ในปี ค.ศ. 2000 Bou, Oliver, & Martinez-beltran ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam โดยกระบวนการคอนจูเกชันจาก *A. baumannii* RYC52763/97 ซึ่งดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam เข้าไปสู่ *E. coli* และ *A. junii* พบว่าไม่สามารถถ่ายทอดการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam ผ่านกระบวนการคอนจูเกชันได้ (Bou et al., 2000)

ในปี ค.ศ. 2007 Valenzuela et al. ศึกษาการถ่ายทอดยีนในแนวนอน (horizontal gene transfer) ของ Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CR-AB) โดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชัน พบว่าไม่ประสบความสำเร็จในการเคลื่อนย้ายพลาสมิดของ *A. baumannii* MW96 เข้าไปใน *E. coli* UB5201Rf (Valenzuela et al., 2007)

จากนั้นในปี ค.ศ. 2010 Bertini et al. ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{OXA-23} โดยกระบวนการคอนจูเกชัน พบว่าสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{OXA-23} เข้าสู่แบคทีเรียผู้รับ *A. baumannii* BM4547 ได้ (Bertini et al., 2010)

ส่วนปี ค.ศ. 2011 Potron et al. ทำการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{NDM-1} ในแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน โดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชัน เซลล์แบคทีเรียผู้ให้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *K. pneumoniae* 601 และ 419, *K. pneumoniae* Kp7, *E. coli* GUE และ *E. coli* 271 ส่วนเซลล์แบคทีเรียผู้รับ คือ *E. coli* J53 นำมาคัดเลือกสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา cefoxitin และ azide พบว่าพลาสมิดในแบคทีเรียผู้ให้ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{NDM-1} ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับ *E. coli* J53 ได้ มีค่า Conjugation frequencies หรือ CF เท่ากับ 10^{-4} ถึง 10^{-8} transconjugants/donor (Potron et al., 2011)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Fu et al. ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{NDM-1} ผ่านกระบวนการคอนจูเกชัน โดยใช้ non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. ที่พลาสมิดมียีนดื้อยา bla_{NDM-1} เป็นเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ เกิดกระบวนการคอนจูเกชันเข้าไปใน *E. coli* J53 ซึ่งใช้เป็นเซลล์แบคทีเรียผู้รับ พบว่าสามารถถ่ายทอดพลาสมิดที่มียีนดื้อยา bla_{NDM-1} ให้แก่ *E. coli* J53 ได้ ทำให้

เซลล์แบคทีเรียผู้รับดื้อต่อยาเซฟาโรสปอรินทุกชนิดและดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam (Fu et al., 2012)

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2014 มีรายงานพบว่าเชื้อ *A. baumannii* Ab453 และ Ab537 สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{OXA-23} และ bla_{GES-11} ไปสู่เชื้อ *A. baumannii* BM4547 โดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชัน ทำให้แบคทีเรียผู้รับดื้อต่อยาด้านจุลชีพตามมา (Charfi-Kessis et al., 2014) และยังมีรายงานของ Talreja et al. พบว่ากระบวนการคอนจูเกชันสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา quinolone ($aac(6')-Ib$) และยีนดื้อยา tetracycline ($tet(E)$, $tet(B)$) ของเชื้อ MDR-AB ไปสู่เชื้อ *E. coli* J53 ได้ มีค่า CF เท่ากับ 10^{-4} transconjugants/donor (Talreja et al., 2014)

ส่วนในปี ค.ศ. 2015 Yang et al. ทำการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาภายในเชื้อ Carbapenem non-susceptible *A. nosocomial* (CNSAN) และ *A. baumannii* สายพันธุ์ 218 และ 102 ซึ่งไวต่อยาด้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenem และไม่มียีนดื้อยา จากการศึกษาพบว่า CNSAN สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{OXA-58} และ bla_{IMP-1} ไปสู่แบคทีเรียผู้รับประสบความสำเร็จ ตรวจพบยีนดื้อยาในแบคทีเรียผู้รับ ค่า MIC ของยา IPM ในแบคทีเรียผู้รับสูงขึ้นจาก 0.75 $\mu\text{g/ml}$ ไปเป็น 32 $\mu\text{g/ml}$ (Yang et al., 2015) และในปี ค.ศ. 2016 มีรายงานการศึกษาพบว่ากระบวนการคอนจูเกชันสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา bla_{NDM-1} จากแบคทีเรียผู้ให้ *A. baumannii* A4183 ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ *E. coli* J53 โดยใช้ยา IPM ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ และ sodium azide ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นตัวคัดเลือก transconjugants (Ramoul et al., 2016)

จากที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. baumannii* สามารถถ่ายทอดการดื้อยาและยีนดื้อยาให้แก่แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันและต่างสายพันธุ์ได้ โดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชันในการการส่งผ่านยีนดื้อยา เป็นผลให้ในปัจจุบันพบอุบัติการณ์การดื้อต่อยาด้านจุลชีพเพิ่มสูงขึ้น และยังทำให้การรักษาโรคติดเชื้อทำได้ยากยิ่งขึ้นอีกด้วย

ตาราง 2 แสดงการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวราบของแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย		ยีนดื้อยา	กระบวนการถ่ายทอดยีนดื้อยา	แหล่งที่มา
เซลล์ผู้ให้	เซลล์ผู้รับ			
<i>A. baumannii</i> Ab12006	<i>A. baumannii</i> BM4547	<i>bla</i> _{OXA-58}	ทรานสเฟอร์เม้น	Bertini et al., 2010
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>A. baumannii</i> A118	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	ทรานสเฟอร์เม้น	Ramirez et al., 2012
<i>A. baumannii</i> ที่ดื้อดื้อยา carbapenem สายพันธุ์ AbH120-A2 และ AbH120-CU3	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>bla</i> _{OXA-24}	ทรานสเฟอร์เม้น	Rumbo et al., 2011
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>A. baylyi</i> ADP1	<i>bla</i> _{NDM-1}	ทรานสเฟอร์เม้น	Fu et al., 2012
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>A. baumannii</i> LS0148	<i>bla</i> _{OXA-58}	ทรานสเฟอร์เม้น	Fu et al., 2014
Enterococci	Enterococci	tetracycline (<i>tetM</i>) และ gentamicin (<i>ant2-1</i>)	ทรานสดักชัน โดยใช้เฟจที่แยกได้จาก <i>E. gallinarum</i> EGRM195, <i>E. faecalis</i> EFRM31 และ EFRM42	Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011

ตาราง 2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย		กระบวนการ		แหล่งที่มา
เชื้อผู้ให้	เซลล์ผู้รับ	ยีนดื้อยา	ถ่ายทอดยีนดื้อยา	
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) USA300	MRSA USA300	พลาสมิด penicillinase และพลาสมิดที่ดื้อด็อกซียา tetracycline	ทรานสดักชันโดยใช้เฟจ Ø80α และ ØJB	Varga et al., 2012
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>mef(A)</i> และ <i>tet(O)</i>	ทรานสดักชันโดยใช้เฟจ Øm46.1	Giovanetti et al., 2015
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> ATCC13706	<i>aphA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>floR</i> และ <i>bla_{TEM-1}</i>	ทรานสดักชันโดยใช้เฟจที่แยกได้จากตัวอย่าง เนื้อไก่	Shousha et al., 2015
<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> BM4547	<i>bla_{OXA-23}</i>	คอนจูเกชัน	Bertini et al., 2010
<i>K. pneumoniae</i> 601 และ 419, <i>K. pneumoniae</i> Kp7, <i>E. coli</i> GUS และ <i>E. coli</i> 271	<i>E. coli</i> J53	<i>bla_{NDM-1}</i>	คอนจูเกชัน	Pottron et al., 2011

ตาราง 2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย		ยีนดื้อยา	กระบวนการถ่ายทอดยีนดื้อยา	แหล่งที่มา
เซลล์ผู้ให้	เซลล์ผู้รับ			
non-baumannii	<i>E. coli</i> J53	<i>bla</i> _{NDM-1}	คอนจูเกชัน	Fu et al., 2012
<i>Acinetobacter</i> spp. ที่พลาลสมิตมีเยินดื้อยา				
<i>bla</i> _{NDM-1}				
<i>A. baumannii</i> Ab453 และ Ab537	<i>A. baumannii</i> BM4547	<i>bla</i> _{OXA-23} และ <i>bla</i> _{GES-11}	คอนจูเกชัน	Charfi-Kessiss et al., 2014
MDR-AB	<i>E. coli</i> J53	<i>aaC</i> (6')-Ib, (<i>tet</i> (E) และ <i>tet</i> (B)	คอนจูเกชัน	Talreja et al., 2014
Carbapenem non susceptible <i>A. nosocomial</i> (CNSAN)	<i>A. baumannii</i> 218 และ 102	<i>bla</i> _{OXA-58} และ <i>bla</i> _{IMP-1}	คอนจูเกชัน	Yang et al., 2015
<i>A. baumannii</i> A4183	<i>E. coli</i> J53	<i>bla</i> _{NDM-1}	คอนจูเกชัน	Ramoul et al., 2016

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

สายพันธุ์แบคทีเรียและแบคทีริโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ *A. baumannii* จำนวน 106 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ จังหวัดเชียงราย ในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคม ในปี พ.ศ. 2557 *A. baumannii* จำนวน 54 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผู้ป่วย โรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตร ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน ในปี พ.ศ. 2557 *Acinetobacter* spp. จำนวน 19 ไอโซเลต ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติภายในมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ และโรงพยาบาลพุทธชินราช (รวิวรรณ แสงศรี, 2556) ส่วนแบคทีริโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ bacteriophage ØABP-02, ØABP-19, ØABP-39, ØABP-44 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากบ่อน้ำบาดน้ำเสีย โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก bacteriophage ØABP-29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากบ่อน้ำบาดน้ำเสีย โรงพยาบาลบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก (Kitti et al., 2015) ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงสายพันธุ์ของแบคทีริโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีริโอเฟจ	สายพันธุ์โฮสต์ <i>A. baumannii</i>	แหล่งที่เก็บ (บ่อน้ำบาดน้ำเสีย)	แหล่งที่มา
ØABP-02	A1389, AB22*	รพ.พุทธชินราช	Kitti et al., 2015
ØABP-19	A1589, AB22*	รพ.พุทธชินราช	Kitti et al., 2015
ØABP-29	A1589, AB22*	รพ. บางระกำ	Kitti et al., 2015
ØABP-39	A1511, AB22*	รพ.พุทธชินราช	Kitti et al., 2015
ØABP-44	ATCC19606, AB20*	รพ.พุทธชินราช	Kitti et al., 2015

* *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์

การตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และยีน *rpoB*

นำเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ในขั้นตอนแรกไพรเมอร์ที่ใช้ คือ 16S rRNA-F และ 16S rRNA-R ดังตาราง 4 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้สภาวะ (PCR condition) ตามตาราง 5 เมื่อได้ PCR product จะทำให้ PCR product ที่ได้มีความบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragment extraction (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ที่สกัดได้โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1% กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที ดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. Service ประเทศเกาหลี เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำมาเก็บไว้ที่โปรแกรม biology workbench (<http://workbench.sdsc.edu>) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เมื่อผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้โปรแกรม BLASTn ให้ผล % identity ต่ำกว่า 98% หรือไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ได้ ทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง โดยใช้ยีน *rpoB* ในการศึกษาไพรเมอร์และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงดังตาราง 4 และ 6 ตามลำดับ

ตาราง 4 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน 16S rRNA ยีน *rpoB* ยีนดื้อยา OXA-type carbapenemase ยีนดื้อยา tetracycline (*tet(B)*) และยีนดื้อยา kanamycin (*aphA6*)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด PCR product (bp)	แหล่งที่มา
16S rRNA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1,500	Misbah et al., 2005
16S rRNA-R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT		
<i>rpoB</i> -F	CCTTCATGACCTGGAAYGGNTA	940	Wang et al., 2014
<i>rpoB</i> -R	TCCAGGATCTGNCCNACRTTCAT		
OXA 23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	Woodford et al., 2006
OXA 23-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
OXA 24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	Woodford et al., 2006
OXA 24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
OXA 51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	Woodford et al., 2006
OXA 51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA 58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	Woodford et al., 2006
OXA 58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
<i>tet(B)</i> -F	TACGTGAATTTATTGCTTCGG	206	Aminov et al., 2002
<i>tet(B)</i> -R	ATACAGCATCCAAAGCGCAC		
<i>aphA6</i> -F	ATGGAATTGCCCAATATTATTC	736	Hujer et al., 2006
<i>aphA6</i> -R	TCAATTCAATTCATCAAGTTTTA		

หมายเหตุ: R = A/G; Y = C/T; N = A/C/G/T

ตาราง 5 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ตรวจหา ยีน 16S rRNA

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	1	95°C	5 นาที
Denature	34	94°C	25 วินาที
Annealing		58°C	40 วินาที
Extension		72°C	50 วินาที
Final extension	1	72°C	6 นาที

ตาราง 6 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ตรวจหา ยีน *rpoB*

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	1	95°C	5 นาที
Denature	34	95°C	30 วินาที
Annealing		55°C	1 นาที
Extension		72°C	1 นาที
Final extension	1	72°C	7 นาที

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disc diffusion

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาปรับความขุ่นในสารละลาย 0.85% Sodium chloride (0.85%NaCl) ให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 Mcfarland โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (McFarland densitometer: SiaBiosan, Latvia) นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว หมุนไม้พันสำลีไปมา 2-3 ครั้ง ให้ขนาดบริเวณข้างหลอดทดลอง จากนั้นนำเชื้อมาป้าย (swab) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ให้ทั่วบริเวณผิวหน้าจานอาหาร รอให้เชื้อที่ป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วจึงนำยาต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ทำการป้ายเชื้อทดสอบแล้ว โดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

โดยการวัด zone of inhibition (mm) และแปลผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยใช้เกณฑ์มาตรฐานจาก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing standards 2014 และ Piewngam, & Kiratisin (2014) ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 แสดงยาต้านจุลชีพและการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพ	Resistance	Intermediated	Susceptibility
1. Amikacin (AK) 30 µg	14	15-16	17
2. Cefotaxime (CTX) 30 µg	14	15-22	23
3. Ceftazidime (CAZ) 30 µg	14	15-17	18
4. Ceftriaxone (CRO) 30 µg	13	14-20	21
5. Cefepime (FEP) 30 µg	14	15-17	18
6. Ciprofloxacin (CIP) 5 µg	15	16-20	21
7. Gentamicin (CN) 10 µg	12	13-14	15
8. Imipenem (IPM) 10 µg	18	19-21	18
9. Meropenem (MEM) 10 µg	14	15-17	18
10. TMX/SXT 1.25/23.75 µg	10	11-15	16
11. Tetracycline (TE) 30 µg	11	12-14	15
12. Piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 µg	17	18-20	21
13. Colistin (CT) 10 µg	9	10-11	12
14. Tigecycline (TGC) 15 µg	12	13-16	17

ที่มา: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing Standards, 2014 และ Piewngam, & Kiratisin, 2014

การตรวจหาชนิดยีน OXA-type carbapenemase ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

เชื้อเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ และโรงพยาบาลพิจิตร จำนวน 160 ไอโซเลต ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาใส่ในหลอด 1.5 ml ที่มี TE buffer 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำให้ตะกอนเซลล์ (pellet) ตกลงมา บริเวณก้นหลอด 1.5 ml นำส่วนใสด้านบนมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เตรียม master mix ซึ่งประกอบไปด้วย 10X buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร magnesium chloride (MgCl₂) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ จำนวน 4 คู่ ได้แก่ OXA23-F, OXA24-F, OXA51-F, OXA58-F และ OXA23-R, OXA24-R, OXA51-R, OXA58-R ความเข้มข้นอย่างละ 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 0.25 ไมโครลิตร ดังตาราง 4 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอแม่แบบ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรโดยเติม dH₂O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycle โดยสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงเป็นไปตามตาราง 8 จากนั้นทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ (PCR product) โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เจลอะกาโรสเข้มข้น 1% ในสารละลาย 0.5% TBE buffer ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

ตาราง 8 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ multiplex PCR ตรวจหาชนิดยีน OXA-type carbapenemase

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	1	95°C	5 นาที
Denature	35	94°C	30 วินาที
Annealing		52°C	40 วินาที
Extension		72°C	50 วินาที
Final extension	1	72°C	7 นาที

การสกัดพลาสมิดของเชื้อ extensively drug resistant *A. baumannii* (XDR-AB)

นำเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งทำการทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ แล้วพบว่า เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ยกเว้น colistin และ tigecycline (XDR-AB) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ มาทำการสกัดพลาสมิดที่ต้องการด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) จากนั้นทำการตรวจสอบรูปแบบของพลาสมิดที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1% กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 75 โวลต์ เวลา 45 นาที ดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC Lambda/HindIII Marker

การคัดเลือกแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ

แบคทีเรียผู้ให้ คัดเลือกจากเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิด ยกเว้น colistin และ tigecycline หรือที่เรียกว่า XDR-AB ส่วนแบคทีเรียผู้รับ คัดเลือกจากเชื้อ *Acinetobacter* spp. จำนวน 19 ไอโซเลต ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ และไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ จากนั้นนำแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับมาทำการตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}) ยีนดื้อยา tetracycline (*tet*(B)) และยีนดื้อยา kanamycin (*aphA6*) ดังแสดงเป็นไปตามตาราง 4 ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นไปตามตาราง 8 และ 9

ตาราง 9 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ตรวจหายีนดื้อยา *tet*(B) และ *aphA6*

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	1	95°C	5 นาที
Denature	34	94°C	30 วินาที
Annealing		54°C	40 วินาที
Extension		72°C	45 วินาที
Final extension	1	72°C	10 นาที

การศึกษาการส่งผ่านยีนดีเอ็นเอโดยวิธีทรานสฟอร์มเมชันแบบธรรมชาติ (Natural transformation)

นำแบคทีเรียผู้รับที่มีคุณสมบัติไวต่อยาด้านจุลชีพทุกชนิด (*Acinetobacter* spp.) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นนำแบคทีเรียผู้รับที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 395 ไมโครลิตร เดิมฟลัสกมิดของแบคทีเรียผู้ให้ (XDR-AB) ที่สกัดให้ได้ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทำการ spread plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาด้านจุลชีพ 3 ชนิด ได้แก่ ticarcillin (50 µg/ml), kanamycin (20 µg/ml) และ tetracycline (20 µg/ml) ตามลำดับ จานอาหารเลี้ยงเชื้อละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปมที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาด้านจุลชีพได้ เรียกว่า transformants จานควบคุมจะทำการ spread แบคทีเรียผู้รับที่มีคุณสมบัติไวต่อยาด้านจุลชีพ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาด้านจุลชีพ 3 ชนิด ได้แก่ ticarcillin (50 µg/ml), kanamycin (20 µg/ml) และ tetracycline (20 µg/ml) คำนวณหาค่า frequency of transformation โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Frequency of transformation} = \frac{\text{ปริมาณของ transformants (CFU/ml)}}{\text{ปริมาณของ recipient (CFU/ml)}}$$

และคำนวณหาค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชัน (transformation efficiency) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้ (Tu, 2005)

$$\text{Transformation efficiency} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี transformant ทั้งหมด (CFU)}}{\text{ปริมาณของฟลัสกมิด (µg)}}$$

การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชัน

1. การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา

เพาะเลี้ยงเซลล์โฮสต์ของแบคทีเรีย *A. baumannii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์โฮสต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส บ่มจนกว่าเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะ log phase หรือมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3-0.4 จากนั้นเติมแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะกับเซลล์โฮสต์ชนิดนั้นๆ ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อโดยการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เซลล์โฮสต์แตก แล้วสามารถปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจออกมาได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์โฮสต์ออกไป ส่วนอนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจจะอยู่ส่วนใสด้านบน นำเอาส่วนใสด้านบนมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเอาส่วนใสหรืออนุภาคของแบคทีเรียโอเฟจที่กรองผ่านแผ่นกรองไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป (Su et al., 1998)

2. การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียโอเฟจโดยวิธี plaque assay

นำแบคทีเรียโอเฟจที่ทำการศึกษามา ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเจือจางใน SM buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) หลังจากนั้นนำแบคทีเรียโอเฟจที่ทำการเจือจางใน SM buffer แล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมให้เข้ากันกับเซลล์โฮสต์ของแบคทีเรีย *A. baumannii* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 200 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดเติมลงในอาหาร soft agar ที่หลอมละลายแล้ว ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทส่วนผสมที่เข้ากันแล้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีวุ้นร้อยละ 1.5 ตั้งทิ้งไว้รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนพลาไคที่เกิดขึ้น (Adums, 1959) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียโอเฟจ โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณของแบคทีเรียโอฟาจ (PFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนพลาต} \times \text{ส่วนกลับของการเจือจาง}}{\text{ปริมาณแบคทีเรียโอฟาจที่ใส่ในวุ้นที่เท (ml)}}$$

3. การศึกษาคุณสมบัติจำเพาะระหว่างแบคทีเรียโอฟาจที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติและเซลล์โฮสต์ XDR-AB โดยวิธี spot test

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย XDR-AB ที่แยกได้จากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ และโรงพยาบาลพิจิตร จำนวน 10 ไชเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ปั่นข้ามคืนแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ soft agar ที่หลอมละลายแล้ว ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นเทส่วนผสมที่เข้ากันแล้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีวุ้นร้อยละ 1.5 อย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วจึงหยด (spot) แบคทีเรียโอฟาจที่ทำการศึกษามีปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อแบคทีเรียโอฟาจหนึ่งตัวลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอจนกระทั่งแบคทีเรียโอฟาจที่ทำการหยดลงไปแห้งสนิท แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น (Yang et al., 2010)

4. กระบวนการทรานสดักชัน

คัดเลือกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความจำเพาะกับเซลล์โฮสต์ XDR-AB แล้วนำแบคทีเรียโอฟาจมาเตรียม phage lysate ของแบคทีเรียผู้ให้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์โฮสต์ XDR-AB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์โฮสต์ XDR-AB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ปั่นจนกว่าเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะ log phase หรือมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3-0.4 เติมน้ำแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะกับเซลล์โฮสต์ชนิดนั้นๆ ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส เติมน้ำ chloroform ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นต่อโดยการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เซลล์โฮสต์แตกแล้วสามารถปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจออกมาได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์โฮสต์ออกไป ส่วนอนุภาคของแบคทีเรียโอฟาจจะอยู่ส่วนใสด้านบน นำเอาส่วนใสด้านบนมารองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเอาส่วนใสหรืออนุภาคของ

แบคทีเรียโอฟีลที่กรองผ่านแผ่นกรองแล้ว ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียผู้รับในอาหารเหลว LB นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับปริมาณเซลล์ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland ในสารละลาย 0.85% NaCl นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาผสมกับแบคทีเรียโอฟีล (10^8 pfu/ml) ที่เตรียมไว้ขึ้นต้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำเลี้ยงเชื้อ double-strength LB broth ปริมาตร 550 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำอาหารเหลว LB จนได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ตกอยู่บริเวณด้านล่างมาละลายกลับในอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาต้านจุลชีพ 3 ชนิด ได้แก่ ticarcillin (50 µg/ml), kanamycin (20 µg/ml) และ tetracycline (20 µg/ml) ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อละ 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อที่สามารถเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้เรียกว่า transductants (ดัดแปลงจาก Shousha et al., 2015) จากนั้นคำนวณหาค่า frequency of transduction ในการทดลองมีจำนวนควบคุม โดยการ spread แบคทีเรียผู้รับที่มีคุณสมบัติไวต่อยาด้านจุลชีพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาต้านจุลชีพ 3 ชนิด ได้แก่ ticarcillin (50 µg/ml), kanamycin (20 µg/ml) และ tetracycline (20 µg/ml)

$$\text{Frequency of transduction} = \frac{\text{ปริมาณของ transductants (CFU/ml)}}{\text{ปริมาณของ recipient (CFU/ml)}}$$

การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีคอนจูเกชัน

1. การคัดเลือกแบคทีเรียผู้รับที่มีคุณสมบัติดื้อต่อ sodium azide เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียผู้รับ

นำแบคทีเรีย *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากธรรมชาติมาศึกษาหาค่า MIC ของ sodium azide จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีส่วนผสมของ sodium azide ในระดับ $0.5 \times \text{MIC}$ ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ overnight culture ไปเลี้ยงในอาหาร LB ที่เพิ่มความเข้มข้นของ sodium azide

(เพิ่มครั้งละ $0.5 \times \text{MIC}$) ในอัตราส่วน 1:10 (overnight culture: fresh LB) เมื่อแบคทีเรียผู้รับสามารถเจริญในระดับความเข้มข้นของ sodium azide ตามที่ต้องการแล้ว นำมาศึกษา susceptibility patterns ของทั้งยาต้านจุลชีพและ sodium azide

2. กระบวนการคอนจูเกชัน

นำแบคทีเรียผู้ให้ที่เป็น XDR-AB มาทดสอบการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีคอนจูเกชันกับแบคทีเรียผู้รับ โดยคัดเลือกแบคทีเรีย XDR-AB ที่มีคุณสมบัติดื้อต่อยาแต่ไวต่อ sodium azide ($\text{MIC} \leq 150 \mu\text{g/ml}$) มาศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธี conjugation โดยใช้ broth culture mating method เริ่มจากนำแบคทีเรียผู้ให้ (XDR-AB) และแบคทีเรียผู้รับที่มีคุณสมบัติดื้อต่อ sodium azide มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ป่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ มาปรับปริมาณเซลล์ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland ในสารละลาย $0.85\% \text{ NaCl}$ นำแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับมาผสมกันในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้แบคทีเรียผู้ให้ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และแบคทีเรียผู้รับปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 760 ไมโครลิตร ชุตควบคุมนำแบคทีเรียผู้รับปริมาตร 180 ไมโครลิตร และ $0.85\% \text{ NaCl}$ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 760 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปป่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง คัดเลือก transconjugants บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มี $50 \mu\text{g/ml}$ ticarcillin + $300 \mu\text{g/ml}$ sodium azide, MHA ที่มี $20 \mu\text{g/ml}$ kanamycin + $300 \mu\text{g/ml}$ sodium azide และ MHA ที่มี $20 \mu\text{g/ml}$ tetracycline + $300 \mu\text{g/ml}$ sodium azide โดยเชื้อที่สามารถเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้เรียกว่า transconjugants จากนั้นจะทำการ spread แบคทีเรียผู้รับบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มี sodium azide $300 \mu\text{g/ml}$ และยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด ได้แก่ ticarcillin ($50 \mu\text{g/ml}$) kanamycin ($20 \mu\text{g/ml}$) และ tetracycline ($20 \mu\text{g/ml}$) นำผลการทดลองที่ได้ มาคำนวณหาค่า frequency of conjugation โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Frequency of conjugation} = \frac{\text{ปริมาณของ transconjugants (CFU/ml)}}{\text{ปริมาณของ recipient (CFU/ml)}}$$

การตรวจหายีนดื้อยา class D β -lactamase, *tet(B)* และ *aphA6* ใน transformants, transductants และ transconjugants ที่แยกได้

ทำการสกัดดีเอ็นเอของ transformants, transductants และ transconjugants ที่แยกได้โดยใช้วิธี boiling method เมื่อได้ดีเอ็นเอออกมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เตรียม master mix ซึ่งประกอบไปด้วย 10X buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในกลุ่ม Class D carbapenemase ยีนดื้อยา tetracycline (*tet(B)*) และยีนดื้อยา kanamycin (*aphA6*) ความเข้มข้นอย่างละ 20 ไมโครโมลาร์ ดังตาราง 4 เอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.5 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอแม่แบบ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรโดยเติม dH_2O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycle โดยสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงดังตาราง 8 และ 9 จากนั้นทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ (PCR product) โดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) เจลอะกาโรสเข้มข้น 1% ในสารละลาย 0.5% TBE buffer ย้อมอะกาโรสเจล ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และยีน *rpoB*

จากการตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ จำนวน 19 ไอโซเลต โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 16S rRNA-F, 16S rRNA-R, *rpoB*-F และ *rpoB*-R พบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTn ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ จำนวน 19 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกเป็น 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* จำนวน 9 ไอโซเลต *Acinetobacter soli* จำนวน 8 ไอโซเลต และ *Acinetobacter nosocomialis* จำนวน 2 ไอโซเลต ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *rpoB* ในเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

Strains	<i>Acinetobacter</i> species	Gene	% Identity
NU001-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	98%
NU002-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	100%
NU003-1	<i>Acinetobacter soli</i>	<i>rpoB</i>	99%
NU003-2	<i>Acinetobacter soli</i>	16S rRNA	100%
NU003-3	<i>Acinetobacter soli</i>	16S rRNA	99%
NU005-1	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	<i>rpoB</i>	99%
NU005-2	<i>Acinetobacter soli</i>	<i>rpoB</i>	99%
NU006-4	<i>Acinetobacter soli</i>	<i>rpoB</i>	100%
NU006-5	<i>Acinetobacter soli</i>	<i>rpoB</i>	100%
NU006-8	<i>Acinetobacter soli</i>	<i>rpoB</i>	100%
NU006-9	<i>Acinetobacter soli</i>	<i>rpoB</i>	99%

ตาราง 10 (ต่อ)

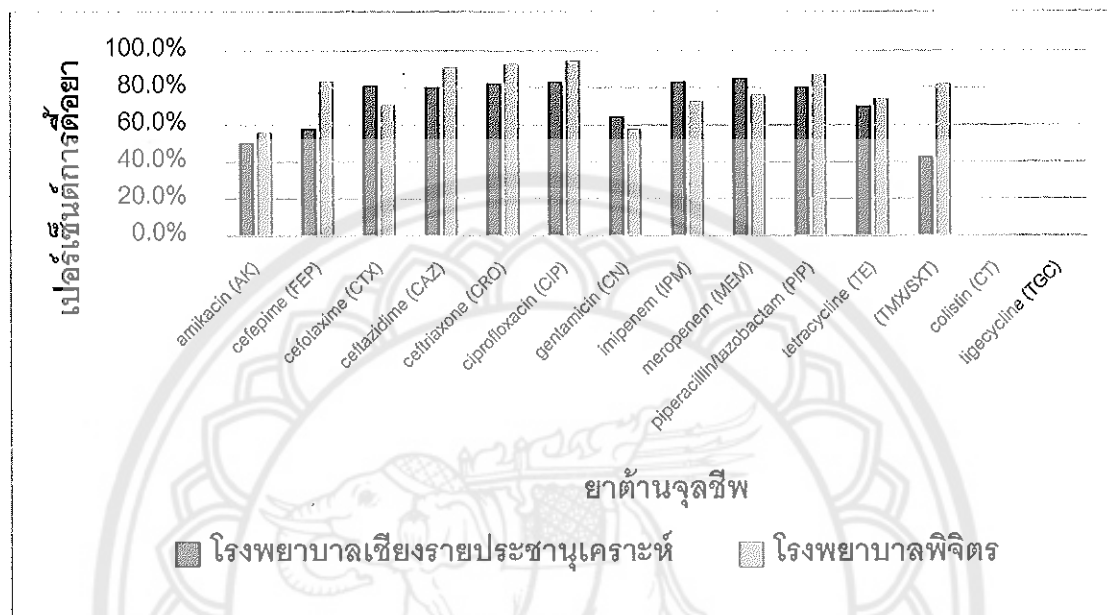
Strains	<i>Acinetobacter</i> species	Gene	% Identity
NU009	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	100%
NU010-1	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	<i>rpoB</i>	99%
NU010-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	99%
NU010-3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	100%
NU010-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	100%
NU013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	100%
NU015	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	100%
NI003	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16S rRNA	100%

การศึกษาความไวของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ต่อยาต้านจุลชีพ

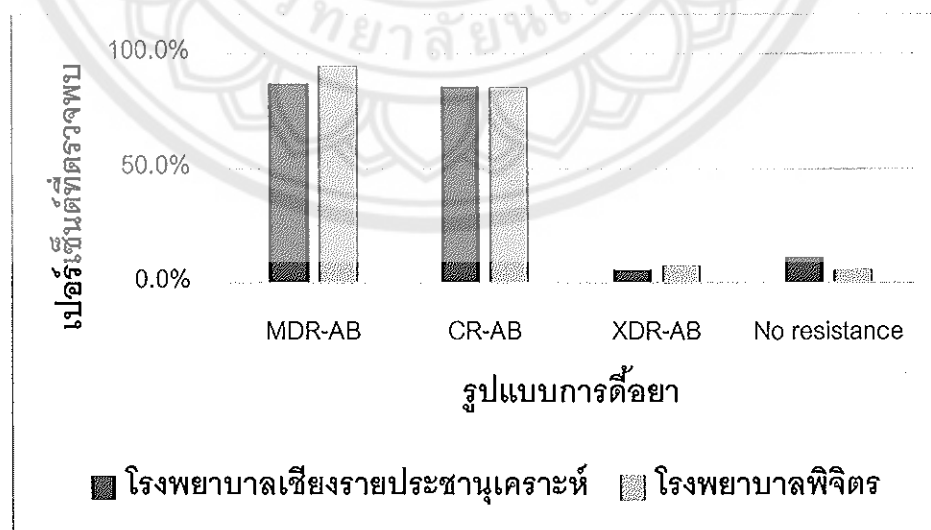
จากการนำเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ จำนวน 106 ไอโซเลต มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยใช้วิธี disc diffusion พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาต้านจุลชีพ amikacin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamycin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole (TMX/SXT) ร้อยละ 50.0, 57.5, 81.1, 80.2, 82.1, 83.0, 64.1, 83.0, 84.9, 80.2, 69.8 และ 42.4 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพิจิตร จำนวน 54 ไอโซเลต ต่อยาต้านจุลชีพ amikacin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamycin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, tetracycline และ TMX/SXT ร้อยละ 55.6, 83.3, 70.4, 90.7, 92.6, 94.4, 57.4, 72.2, 75.9, 87.0, 74.1 และ 81.5 ตามลำดับ ทุกไอโซเลตที่แยกได้ไวต่อยาต้านจุลชีพ colistin และ tigecycline ดังแสดงในภาพ 5

เมื่อนำข้อมูลการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพที่ได้ข้างต้นมาจัดตามรูปแบบการต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ จัดอยู่ในกลุ่ม MDR-AB, CR-AB และ XDR-AB คิดเป็นร้อยละ 86.8, 85.9 และ 5.7 ตามลำดับ ส่วนภายในโรงพยาบาลพิจิตร พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีรูปแบบการต่อยาต้านจุลชีพ ดังนี้คือ MDR-AB ร้อยละ 94.4 CR-AB ร้อยละ 85.2 และ

XDR-AB ร้อยละ 7.4 พบเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิด (no resistance) ภายในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร คิดเป็นร้อยละ 11.3 และ 5.6 ตามลำดับ ดังภาพ 6



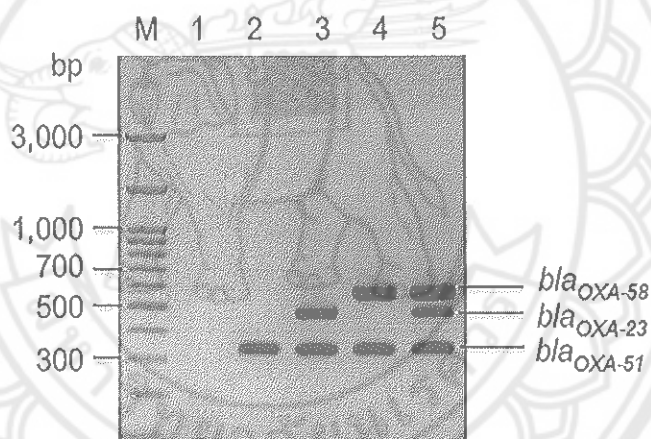
ภาพ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพ (resistance) ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร



ภาพ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร

การตรวจหายีนดื้อยา OXA-type carbapenemase

นำเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 160 ไอโซเลตมาทำการตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase ได้แก่ ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} และ *bla*_{OXA-58} โดยใช้ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-51} เป็น internal control จากการศึกษพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 76.4 รองลงมาพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ร้อยละ 7.5 ส่วนเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลพิจิตร พบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} ร้อยละ 75.9 และยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ร้อยละ 11.1 ในทุกไอโซเลตตรวจไม่พบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-24} นอกจากนี้ยังตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} อยู่ร่วมกับยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} (co-existence) ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ จำนวน 2 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 1.2 ดังแสดงในภาพ 7



ภาพ 7 แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase ภายในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร Lane M; 100 bp ladder, Lane 1: Negative control (น้ำกลั่น); Lane 2: PCR product ของยีนดื้อยา *bla*_{OXA-51}; Lane 3: PCR product ของยีนดื้อยา *bla*_{OXA-51} และ *bla*_{OXA-23}; Lane 4: PCR product ของยีนดื้อยา *bla*_{OXA-51} และ *bla*_{OXA-58} และ Lane 5: PCR product ของยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} และ *bla*_{OXA-58}

การศึกษาารูปแบบของพลาสมิด (plasmid profiles)

เมื่อนำเชื้อในกลุ่ม extensively drug resistant *A. baumannii* (XDR-AB) จำนวน 10 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร มาทำการสกัดพลาสมิด แล้วนำมาศึกษาารูปแบบของพลาสมิด หรือ plasmid profiles จากการศึกษพบว่าพลาสมิดของเชื้อ XDR-AB ที่นำมาศึกษา มีรูปแบบของพลาสมิด 2 รูปแบบ โดยพบพลาสมิดในรูปแบบ A มากที่สุดถึงจำนวน 9 ไอโซเลต (Lane 1-8,10) และรูปแบบ B จำนวน 1 ไอโซเลต (Lane 9) ดังแสดงในภาพ 8



ภาพ 8 แสดงรูปแบบของพลาสมิด (plasmid profiles) ของเชื้อ extensively drug resistant *A. baumannii* (XDR-AB) Lane M: VC Lambda/HindIII; Lane 1-10: รูปแบบพลาสมิด (plasmid profiles) ของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ AB95, AB180, AB183, AB241, AB246, AB269, AB135, AB136, AB140 และ AB229 ตามลำดับ

การคัดเลือกแบคทีเรียผู้รับและแบคทีเรียผู้ให้

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียผู้ให้ โดยการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ จำนวน 14 ชนิด จากเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร จำนวน 160 ไอโซเลต ตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพในรูปแบบ XDR-AB จำนวน 10 ไอโซเลต เมื่อนำมาตรวจหายีนดื้อยา OXA-type carbapenemase ยีนดื้อยา tetracycline (*tet(B)*) และยีนดื้อยา kanamycin (*aphA6*) พบว่าเชื้อ XDR-AB ทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถตรวจพบยีนดื้อยา *bla_{OXA-23}* และยีนดื้อยา *tet(B)* ในทุกไอโซเลต สำหรับยีนดื้อยา *aphA6* ตรวจพบเฉพาะในสายพันธุ์ AB140 ส่วนในแบคทีเรียผู้รับคัดเลือกจากเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ จากนั้นนำมาทดสอบความไวต่อยา

ด้านจุลชีพ คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิด (no resistance) แล้วทำการตรวจหายีนดื้อยาชนิดเดียวกับแบคทีเรียผู้ให้ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ สายพันธุ์ NU005-1, NU013, NU015 และ NI003 ไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ และตรวจไม่พบยีนดื้อยา OXA-type carbapenemase ยีนดื้อยา *tet(B)* และยีนดื้อยา *aphA6* ดังแสดงในตาราง 11 เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับแล้ว ทำการศึกษาการถ่ายยีนดื้อยาในแนวนอน โดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชันต่อไป

ตาราง 11 แสดงผลการคัดเลือกแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ

รหัสสายพันธุ์	รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ
แบคทีเรียผู้ให้		
AB95	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB135	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB136	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB140	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i> , <i>aphA6</i>
AB180	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB183	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB229	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB241	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB246	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
AB269	XDR-AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>tet(B)</i>
แบคทีเรียผู้รับ		
NU005-1	No resistance	ไม่พบยีน
NU013	No resistance	ไม่พบยีน
NU015	No resistance	ไม่พบยีน
NI003	No resistance	ไม่พบยีน

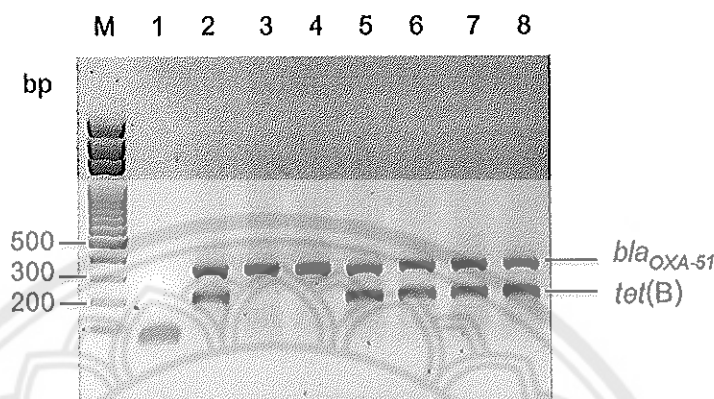
การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ

จากการศึกษาโดยการนำพลาสมิดของเชื้อ XDR-AB ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียผู้ให้ จำนวน 10 ไอคโฮเลต มาทำการทดสอบการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยอาศัยกระบวนการทรานสฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ (Natural transformation) ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับ คือ *Acinetobacter* spp. ที่แยกมาจากแหล่งธรรมชาติ และไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 4 ไอคโฮเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรียผู้ให้ XDR-AB สายพันธุ์ AB135, AB136, AB140, AB180, AB183 และ AB241 สามารถส่งผ่านการดื้อยา kanamycin ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ สายพันธุ์ NU015 ได้ ส่งผลให้ตรวจพบโคโลนีเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่วนประกอบของยา kanamycin 20 µg/ml เมื่อคำนวณหาค่าความถี่ในการเกิดกระบวนการทรานสฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ (Frequency of transformation) พบว่าอยู่ในช่วง 1.1×10^{-10} ถึง 4.4×10^{-11} ส่วนค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์เมชัน (Transformation efficiency) อยู่ในช่วง 2×10^1 ถึง 8×10^2 CFU/µg หลังจากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาตรวจหายีนดื้อยา kanamycin (*aphA6*) จากการศึกษพบว่าตรวจไม่พบยีนดื้อยา *aphA6* ใน transformants ที่ได้ (ตาราง 13)

การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชัน

การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยอาศัยกระบวนการทรานสดักชัน เริ่มจากการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 และ ØABP-44 จากนั้นนำแบคทีเรียโอเฟจที่ทำการเพิ่มจำนวนได้มาทำการนับจำนวน โดยใช้วิธี plaque assay แล้วศึกษาคุณสมบัติความจำเพาะระหว่างแบคทีเรียโอเฟจกับเซลล์โฮสต์ (XDR-AB) โดยวิธี spot test จากการศึกษพบว่าแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-02 และ ØABP-39 มีความจำเพาะกับเชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB183 ส่วนแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-19, ØABP-29 และ ØABP-44 มีความจำเพาะกับเชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB135 และ AB229 นำเชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียโอเฟจนั้นมาใช้เป็นเซลล์โฮสต์ในการเพิ่มจำนวนและนำพายีนดื้อยาไปสู่แบคทีเรียผู้รับ จากการศึกษการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชัน พบว่าเชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB135 ที่ใช้แบคทีเรียโอเฟจ ABP19 (ØABP-19) เป็นตัวนำพาการดื้อยาสามารถนำพาการดื้อยา tetracycline ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับสายพันธุ์ NU013 และ NU015 จึงตรวจพบโคโลนีเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของยา tetracycline 20 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความถี่ในการเกิดกระบวนการทรานสดักชัน (Frequency of transduction) โดยอาศัยแบคทีเรียโอเฟจเป็นตัวนำพายีนดื้อยานั้น พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 4.8×10^{-9} ถึง 9.1×10^{-9} หลังจากนั้นทำการตรวจหายีนดื้อยา tetracycline (*tet(B)*) ใน transductants ที่ได้ (ตาราง 14)

จากการศึกษาพบว่าตรวจพบยีนดื้อยา *tet(B)* ในทุกไอโซเลตของ transductants ดังแสดงในภาพ 9

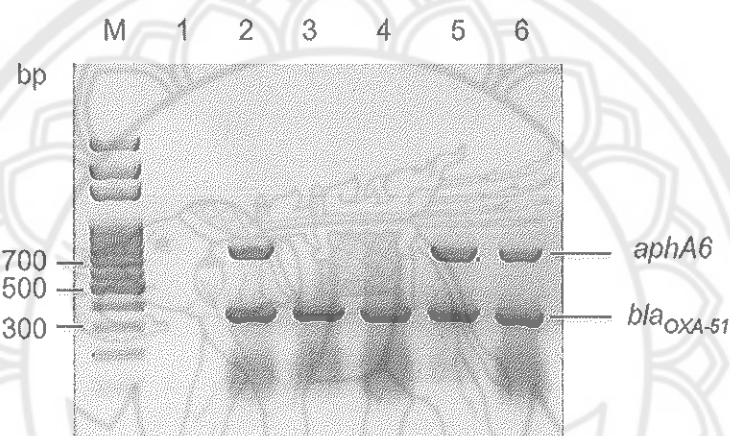


ภาพ 9 แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนดื้อยา *tet(B)* ภายใน transductants ที่ได้จากกระบวนการทรานสดักชัน Lane M: 100 bp ladder; Lane 1: Negative control (น้ำกลั่น); Lane 2: PCR product ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-51} ขนาด 353 bp และยีนดื้อยา *tet(B)* ขนาด 206 bp ของแบคทีเรียผู้ให้สายพันธุ์ AB135; Lane 3-4: PCR product ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-51} ของแบคทีเรียผู้รับ สายพันธุ์ NU013 และ NU015 ตามลำดับ และ Lane 5-8: PCR product ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-51} และ *tet(B)* ของ transductants ที่ได้จำนวน 4 ไอโซเลต

การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีคอนจูเกชัน

คัดเลือกแบคทีเรียผู้รับโดยการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (susceptibility patterns) และความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มี sodium azide เข้มข้นมากกว่า 300 µg/ml จากการศึกษพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียผู้รับได้จำนวน 2 ไอโซเลต คือ NU013 และ NU015 (ตาราง 12) ที่ไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิด และมีค่า MIC ของ sodium azide มากกว่า 300 µg/ml เมื่อได้แบคทีเรียผู้รับแล้ว นำมาทำการทดลองการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีการคอนจูเกชัน จากการศึกษทดลองพบว่าสามารถตรวจพบโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพ ticarcillin 50 µg/ml และ kanamycin 20 µg/ml (transconjugants) ซึ่งใช้เชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB140 เป็นแบคทีเรียผู้ให้ และ *Acinetobacter* spp. สายพันธุ์ NU013 และ NU015 เป็นแบคทีเรียผู้รับ เมื่อนำโคโลนีของ transconjugants ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพ ticarcillin 50 µg/ml มาทำการตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase พบว่า

ตรวจไม่พบยีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase ส่วน transconjugants ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพ kanamycin 20 µg/ml เมื่อนำมาตรวจหายีนดื้อยา *aphA6* พบว่าสามารถตรวจพบยีนดื้อยา *aphA6* ใน transconjugants ดังภาพ 10 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB140 ซึ่งเป็นแบคทีเรียผู้ให้สามารถเกิดการส่งผ่านยีนดื้อยา *aphA6* ไปสู่แบคทีเรียผู้รับสายพันธุ์ NU013 และ NU015 ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียผู้รับดื้อต่อยา kanamycin ตามมา (ตาราง 15) จากนั้นคำนวณหาค่า frequency of conjugation (CF) พบว่าค่า CF มีค่าเท่ากับ $1.0 \times 10^{-4} - 8.6 \times 10^{-5}$



ภาพ 10 แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนดื้อยา *aphA6* ภายใน transconjugants ที่ได้จากกระบวนการคอนจูเกชัน Lane M: 100 bp ladder; Lane 1: Negative control (น้ำกลั่น); Lane 2: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* ขนาด 353 bp และ ยีนดื้อยา *aphA6* ขนาด 736 bp ของแบคทีเรียผู้ให้สายพันธุ์ AB140; Lane 3-4: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* ของแบคทีเรียผู้รับ สายพันธุ์ NU013 และ NU015 ตามลำดับ และ Lane 5-6: PCR product ยีนดื้อยา *bla_{OXA-51}* และ *aphA6* ของ transconjugants ที่ได้

ตาราง 12 แสดงความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มี sodium azide และรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ

Strains	Sodium azide ($\mu\text{g/ml}$)	Ticarcillin (50 $\mu\text{g/ml}$)	Tetracycline (20 $\mu\text{g/ml}$)	Kanamycin (20 $\mu\text{g/ml}$)
แบคทีเรียผู้รับ				
NU005-1 WT	25	S	S	S
NU013 WT	50	S	S	S
NU015 WT	50	S	S	S
NI003 WT	50	S	S	S
NU005-1 R	100	S	S	S
NU013 R	350	S	S	S
NU015 R	350	S	S	S
NI003 R	100	S	S	S
แบคทีเรียผู้ให้				
AB95 (XDR-AB)	150	R	R	R
AB135 (XDR-AB)	100	R	R	R
AB136 (XDR-AB)	400	R	R	R
AB140 (XDR-AB)	100	R	R	R
AB180 (XDR-AB)	100	R	R	R
AB183 (XDR-AB)	100	R	R	R
AB229 (XDR-AB)	100	R	R	R
AB241 (XDR-AB)	100	R	R	R
AB246 (XDR-AB)	150	R	R	R
AB269 (XDR-AB)	100	R	R	R

หมายเหตุ: Resistant (R), Sensitive (S)

ตาราง 13 สรุปผลการตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอ class D β -lactamase, *tet*(B) และ *aphA6* ใน transformants ที่แยกได้

Donor (Resistance genes)	Recipient (Resistance genes)	Transformants (Resistance genes)	Selective antibiotics	Frequency of transformation
AB180 (<i>aphA6</i> -)	NU015 (<i>aphA6</i> -)	TF007 (<i>aphA6</i> -)	20 μ g/ml kanamycin	5.9×10^{-10}
AB183 (<i>aphA6</i> -)	NU015 (<i>aphA6</i> -)	TF009 (<i>aphA6</i> -)	20 μ g/ml kanamycin	1.1×10^{-10}
AB241 (<i>aphA6</i> -)	NU015 (<i>aphA6</i> -)	TF011 (<i>aphA6</i> -)	20 μ g/ml kanamycin	4.4×10^{-11}
AB135 (<i>aphA6</i> -)	NU015 (<i>aphA6</i> -)	TF003 (<i>aphA6</i> -)	20 μ g/ml kanamycin	4.4×10^{-11}
AB136 (<i>aphA6</i> -)	NU015 (<i>aphA6</i> -)	TF005 (<i>aphA6</i> -)	20 μ g/ml kanamycin	1.5×10^{-11}
AB140 (<i>aphA6</i> +)	NU015 (<i>aphA6</i> -)	TF001 (<i>aphA6</i> -)	20 μ g/ml kanamycin	2.9×10^{-11}

ตาราง 14 สรุปผลการตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอ class D β -lactamase, *tet*(B) และ *aphA6* ใน transductants ที่แยกได้

Donor (Resistance genes)	Recipient (Resistance genes)	Transductants (Resistance genes)	Selective antibiotics	Frequency of transduction
AB135 ($\emptyset$ ABP-19) (<i>tet</i> (B) +)	NU013 (<i>tet</i> (B) -)	TD001 (<i>tet</i> (B) +)	20 μ g/ml tetracycline	4.8×10^{-9}
AB135 ($\emptyset$ ABP-19) (<i>tet</i> (B) +)	NU015 (<i>tet</i> (B) -)	TD003 (<i>tet</i> (B) +)	20 μ g/ml tetracycline	9.1×10^{-9}

ตาราง 15 สรุปผลการตรวจหาชนิดของ class D β -lactamase, *tef(B)* และ *aphA6* ใน transconjugants ที่แยกได้

Donor (Resistance genes)	Recipient (Resistance genes)	Transconjugants (Resistance genes)	Selective antibiotics	Frequency of conjugation
AB140 (<i>bla_{OXA-23}</i> +)	NU013 R (<i>bla_{OXA-23}</i> -)	TC011 (<i>bla_{OXA-23}</i> -)	50 μ g/ml ticarcillin	1.0×10^{-4}
AB140 (<i>bla_{OXA-23}</i> +)	NU015 R (<i>bla_{OXA-23}</i> -)	TC016 (<i>bla_{OXA-23}</i> -)	50 μ g/ml ticarcillin	8.6×10^{-5}
AB140 (<i>aphA6</i> +)	NU013 R (<i>aphA6</i> -)	TC021 (<i>aphA6</i> +)	20 μ g/ml kanamycin	8.5×10^{-5}
AB140 (<i>aphA6</i> +)	NU015 R (<i>aphA6</i> -)	TC026 (<i>aphA6</i> +)	20 μ g/ml kanamycin	6.3×10^{-5}

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาของ class D β -lactamase และการถ่ายทอดยีนในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ และโรงพยาบาลพิจิตร พบว่าส่วนใหญ่มีอัตราการดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบมากกว่าร้อยละ 50 ในทุกไอโซเลตไวต่อยาต้านจุลชีพ colistin และ tigecycline เมื่อจัดตามรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าจัดอยู่ในรูปแบบ MDR-AB ร้อยละ 90.6, CR-AB ร้อยละ 85.5 และ XDR-AB ร้อยละ 6.5 จากนั้นทำการตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase พบว่าตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} มากที่สุด รองลงมาได้แก่ ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ส่วนยีนดื้อยา *bla*_{OXA-24} ตรวจไม่พบในทุกไอโซเลต การสกัดพลาสมิดเพื่อศึกษารูปแบบพลาสมิดของเชื้อในกลุ่ม XDR-AB จำนวน 10 ไอโซเลต พบว่ามี 2 รูปแบบด้วยกัน ต่อมาศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวนอน โดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน โดยใช้เชื้อ XDR-AB เป็นแบคทีเรียผู้ให้ *Acinetobacter* spp. ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ และโรงพยาบาลพุทธชินราช ที่มีคุณสมบัติไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ และไม่มียีนดื้อยาเป็นแบคทีเรียผู้รับ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ XDR-AB สามารถนำพาการดื้อยา kanamycin, tetracycline และ ticarcillin ไปสู่แบคทีเรียผู้รับได้ สามารถตรวจพบยีนดื้อยา *tet*(B) ซึ่งทำให้เชื้อดื้อยา tetracycline ในแบคทีเรียผู้รับของกระบวนการทรานสดักชัน และตรวจพบยีนดื้อยา *aphA6* ซึ่งทำให้เชื้อดื้อยา kanamycin ในแบคทีเรียผู้รับของกระบวนการคอนจูเกชัน ทำให้ในปัจจุบันตรวจพบแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากแบคทีเรียสามารถส่งผ่านการดื้อยาระหว่างกันได้ง่าย โดยไม่จำเป็นต้องถ่ายทอดการดื้อยาจากพ่อแม่ไปสู่ลูก (vertical gene transfer) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่อยู่ในโรงพยาบาลไม่ให้ปนเปื้อนออกมาสู่สิ่งแวดล้อม แล้วเกิดการแพร่กระจายของการดื้อยาภายในเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มสูงขึ้นอีก

อภิปรายผล

ในปี ค.ศ. 2014 ถึง ค.ศ. 2015 ประเทศไทย มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมากเป็นอันดับที่ 3 รองจากเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* (NARST, 2014-2015) ยิ่งไปกว่านั้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา พบอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ (susceptibility patterns) ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจภายในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ จำนวน 106 ไอโซเลต และโรงพยาบาลพิจิตร จำนวน 54 ไอโซเลต รวมทั้งสิ้นจำนวน 160 ไอโซเลต พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM) และ piperacillin/tazobactam (PIP) มากกว่าร้อยละ 75 โดยทุกไอโซเลตไวต่อยาต้านจุลชีพ colistin และ tigecycline เมื่อนำมาจัดตามรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าจัดอยู่ในรูปแบบของ MDR-AB มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 90.6 รองลงมาได้แก่ CR-AB ร้อยละ 85.5 และ XDR-AB ร้อยละ 6.5 ตามลำดับ (ตาราง 16) สอดคล้องกับการศึกษาของ Aimsaad et al. ในปี ค.ศ. 2009 พบอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพตั้งแต่สามขนานขึ้นไปของเชื้อ *A. baumannii* (MDR-AB) ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า คิดเป็นร้อยละ 21.1 (Aimsaad et al., 2009) ต่อมาในปี ค.ศ. 2014 ภายในโรงพยาบาลศิริราช พบอุบัติการณ์ของ MDR-AB ร้อยละ 88.7 (Chaisathaphol, & Chayakulkeeree, 2014) ส่วนรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* แบบ XDR-AB มีผู้ศึกษาในปี ค.ศ. 2011 พบอุบัติการณ์ของ XDR-AB คิดเป็นร้อยละ 30.6 (Anunnatsiri, & Tonsawan, 2011) ส่วนในปี ค.ศ. 2015 ภายในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมดดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ยกเว้น colistin และ tigecycline คิดเป็นร้อยละ 65.3 (Inchai et al., 2015) และอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มคาร์บาพีเนมของเชื้อ *A. baumannii* (CR-AB) ภายในประเทศไทยยังเพิ่มสูงขึ้น จากร้อยละ 46.7 ในปี ค.ศ. 2009 เป็นร้อยละ 81.8 ในปี ค.ศ. 2012 (Dejsirilert et al., 2012; Werarak et al., 2012) ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยในปัจจุบันนั้น มีอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้จำเป็นต้องตระหนักในเรื่องของการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อให้เหมาะสมมากยิ่งขึ้น เพื่อช่วยลดอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพในอนาคตต่อไป

เมื่อทำการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพแล้ว ทำการตรวจสอบหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase ซึ่งได้แก่ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} และ *bla*_{OXA-58} ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้ จากการศึกษาพบว่าตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 76.2 (ตาราง 16) สอดคล้องกับการศึกษาทั้งในประเทศไทยและในทวีปเอเชีย ที่พบอุบัติการณ์ของ ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} มากที่สุด อยู่ระหว่างร้อยละ 80-100 ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จาก สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (Niumsup et al., 2009; Thapa et al., 2010; Jantama et al. 2013; Santimaleeworagun et al., 2014) นอกจากนี้ยังตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} จำนวน 14 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 8.7 เพิ่มขึ้นจากการศึกษาของ Jumroon และ Santanirand ในปี ค.ศ. 2013 ที่พบ ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ภายในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลรามาริบัติ จังหวัด กรุงเทพมหานคร คิดเป็นร้อยละ 7.7 ส่วนยีนดื้อยา *bla*_{OXA-24} ตรวจไม่พบในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์และโรงพยาบาลพิจิตร ตรงกันข้ามกับการศึกษา ของ Jumroon และ Santanirand ในปี ค.ศ. 2013 ที่ตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-24} ร้อยละ 7.7 ภายในเชื้อ *A. baumannii* ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบทางพีโนไทป์เพื่อตรวจสอบหาเอนไซม์ ในกลุ่ม metallo- β -lactamases (MBLs) (Jumroon, & Santanirand, 2013) นอกจากนี้ในการ ศึกษาครั้งนี้ยังพบยีนดื้อยา 2 ชนิด ได้แก่ *bla*_{OXA-23} และ *bla*_{OXA-58} อยู่ร่วมกันภายในไอโซเลตเดียวกัน (co-existence) จำนวน 2 ไอโซเลต เป็นรายงานครั้งที่สองในประเทศไทย โดยในครั้งแรกนั้นพบใน เชื้อ CR-AB ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ในช่วงเดือนมกราคม ค.ศ. 2012 ถึง เดือนธันวาคม ค.ศ. 2013 จำนวน 3 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 0.9 (Juntanawiwat et al., 2016)

เมื่อนำเชื้อในกลุ่ม extensively drug resistant *A. baumannii* (XDR-AB) มาสกัด พลาสมิด แล้วนำมาทำการศึกษารูปแบบของพลาสมิด (plasmid profiles) พบว่าพลาสมิดของเชื้อ XDR-AB ทั้ง 10 ไอโซเลตมีความแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ รูปแบบ A และ รูปแบบ B โดยพลาสมิดที่พบในแต่ละไอโซเลต ประกอบด้วยพลาสมิด 2 พลาสมิดที่มีขนาด แตกต่างกัน อยู่ในช่วง 9 kb ถึง ≥ 23 kb สอดคล้องกับการศึกษาของ Saranathan et al. ในปี ค.ศ. 2014 ที่ทำการศึกษารูปแบบของพลาสมิดภายในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ในโรงพยาบาลประเทศอินเดีย จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้มีขนาดของ พลาสมิดในช่วง 500 bp ถึง ≥ 25 kb และภายในพลาสมิดยังตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} และ *bla*_{IMP-1} คิดเป็นร้อยละ 42 และ 36 ตามลำดับ (Saranathan et al., 2014) นอกจากนี้การศึกษาของ Sadeghifard et al. ในปี ค.ศ. 2010 พบว่ารูปแบบของพลาสมิดมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับ รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial susceptibility patterns) และ

รูปแบบของพลาสมิดที่มีลักษณะเหมือนกัน อาจมาจากเชื้อบรรพบุรุษสายพันธุ์เดียวกัน (ancestral strains) อีกด้วย (Sadeghifard et al., 2010)

จากการตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ จำนวน 19 ไอโซเลต โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และยีน *rpoB* พบว่า สามารถจำแนกเป็นสายพันธุ์ *A. baumannii* มากที่สุด จำนวน 9 ไอโซเลต รองลงมา ได้แก่ *A. soli* จำนวน 8 ไอโซเลต และ *A. nosocomialis* จำนวน 2 ไอโซเลต ดังแสดงในตาราง 10 เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี disc diffusion พบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร ส่วนใหญ่ไม่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ และจัดเป็นสายพันธุ์ *A. soli* ซึ่งในปี ค.ศ. 2008 และ ค.ศ. 2015 ได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *A. soli* จากตัวอย่างดินในป่าและผัก ตามลำดับ (Kim et al., 2008; Rafei et al., 2015) ส่วนเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งน้ำบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสียภายในโรงพยาบาลพุทธชินราช ส่วนใหญ่พบว่าเป็นสายพันธุ์ *A. baumannii* และพบว่าเชื้อที่แยกได้มักดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ โดยมีรูปแบบการดื้อยาแบบ MDR-AB และ CR-AB สอดคล้องกับการศึกษาของ Hrenovic et al. ในปี ค.ศ. 2014 ที่ตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* มีรูปแบบการดื้อยาแบบ MDR-AB และ CR-AB จากตัวอย่างน้ำเสียในประเทศโครเอเชีย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียในประเทศโครเอเซียนั้นสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในน้ำเสียมากกว่า 50 วัน ซึ่งอาจส่งผลให้สามารถตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพในสิ่งแวดล้อมต่างๆไป รวมทั้งแหล่งน้ำได้เป็นจำนวนมากในปัจจุบัน (Hrenovic et al., 2014) ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* จากตัวอย่างน้ำในแม่น้ำของประเทศบราซิล เชื้อที่แยกได้นั้นมีรูปแบบการดื้อยาแบบ CR-AB และมียีนดื้อยา *bla_{OXA-23}* เพราะฉะนั้นแหล่งน้ำอาจเป็นแหล่งอาศัย (reservoirs) ที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์อื่น ๆ ตามมาในอนาคต (Turano et al., 2016)

การศึกษาการส่งผ่านยีนในแนวนอน (horizontal gene transfer) ได้แก่ ทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชันนั้น จำเป็นต้องมีแบคทีเรียผู้ให้และแบคทีเรียผู้รับ ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เชื้อ XDR-AB จำนวน 10 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียผู้ให้ ส่วนเชื้อแบคทีเรียผู้รับคัดเลือกจากเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ และไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ไม่มียีนดื้อยาต้านจุลชีพ จากการศึกษาพบว่า *Acinetobacter* spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ NU005-1, NU013, NU015 และ NI003 สามารถนำมาใช้เป็นแบคทีเรียผู้รับได้

การศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสฟอร์เมชัน ใช้พลาสมิดจากเชื้อในกลุ่ม XDR-AB จำนวน 10 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียผู้ให้ และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่ไวต่อยาต้านจุลชีพ จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ NU005-1, NU013, NU015 และ NI003 เป็นแบคทีเรียผู้รับ พบว่าภายหลังจากการทดลองโดยวิธีทรานสฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ (Natural transformation) แล้วนำมาทำการ spread plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพ ได้แก่ ticarcillin (50 µg/ml), kanamycin (20 µg/ml) และ tetracycline (20 µg/ml) พบโคโลนีเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพ kanamycin (20 µg/ml) (ตาราง 17) เมื่อนำโคโลนีที่ได้ไปทำการตรวจหา ยีนดื้อยา *aphA6* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพ kanamycin พบว่าตรวจไม่พบยีนดื้อยา *aphA6* ใน transformants ที่นำมาศึกษา ซึ่งยีนที่ทำให้เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ kanamycin มีอยู่ด้วยกันหลากหลายยีน เช่น ยีนในกลุ่ม phosphotransferases ได้แก่ *aphA1*, *aphA6* ยีนในกลุ่ม acetyltransferases ได้แก่ *aacC1*, *aacC2*, *aacA4* และยีนในกลุ่ม nucleotidyltransferases ได้แก่ *aadB*, *aadA1* (Nemec et al., 2004) เพราะฉะนั้นเป็นไปได้ว่าใน เชื้อแบคทีเรียผู้ให้อาจมียีนดื้อยาชนิดอื่นที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพ kanamycin เช่นกัน จึงทำให้สามารถตรวจพบโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้ ในปี ค.ศ. 2011 มีรายงาน การศึกษาของ Rumbo et al. พบว่าประสบความสำเร็จในการส่งผ่านยีนดื้อยาจากแบคทีเรียผู้ให้ ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ โดยอาศัยวิธีทรานสฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ กล่าวคือใช้ Outer membrane vesicles (OMVs) ของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ AbH120-A2 และ AbH120-CU3 จำนวน 2 ไอโซเลต ซึ่งมีพลาสมิดที่มียีนดื้อยา *bla_{OXA-24}* เป็นแบคทีเรียผู้ให้ และเชื้อ *A. baumannii* ATCC17978 ซึ่งไวต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มคาร์บาเพนิมเป็นแบคทีเรียผู้รับ จากการศึกษาทดลอง พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่มีการปลดปล่อยของ Outer membrane vesicles (OMVs) ซึ่งภายใน บรรจุยีนดื้อยา *bla_{OXA-24}* สามารถส่งผ่านยีนดื้อยานี้ไปสู่ *A. baumannii* ATCC17978 ได้ ส่งผลให้ เชื้อแบคทีเรียผู้รับดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มคาร์บาเพนิม ได้แก่ imipenem, meropenem และ doripenem เพิ่มขึ้นจาก 0.38, 0.75 และ 0.19 µg/ml เป็น ≥ 32 µg/ml ตามลำดับ (Rumbo et al., 2011) ต่อมา Ramirez et al. ได้ทำการศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยา *bla_{CTX-M-2}* โดยวิธีทรานสฟอร์ เมชันแบบธรรมชาติ ใช้พลาสมิด pDCMSR1 ของเชื้อ *Proteus mirabilis* Prm9 ที่มียีน *bla_{CTX-M-2}* เป็นแบคทีเรียผู้ให้ และเชื้อ *A. baumannii* A118 เป็นแบคทีเรียผู้รับ จากการศึกษาพบว่า transformants ที่ได้มีค่า MIC ของยา CTX สูงขึ้นจาก 8 µg/ml เป็น 32 µg/ml และยังตรวจพบ ยีนดื้อยา *bla_{CTX-M-2}* ใน transformants ที่ได้อีกด้วย (Ramirez et al., 2012) แต่มีการศึกษาอื่นๆ รายงานว่าการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสฟอร์เมชัน ส่วนใหญ่มักต้องใช้กระแสไฟฟ้าเข้ามาช่วย

ในการกระตุ้นให้แบคทีเรียผู้รับพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอหรือพลาสมิดที่มียีนดื้อยาเข้ามาภายในเซลล์ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ที่เรียกว่า eletrotransformation เห็นได้จากการศึกษาของ Bertini et al. ที่ประสบความสำเร็จในการส่งผ่านยีนดื้อยาจากพลาสมิดของเชื้อ *A. baumannii* Ab120066 ที่มียีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ไปสู่เชื้อ *A. baumannii* BM4547 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียผู้รับ ทำให้เชื้อแบคทีเรียผู้รับดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มคาร์บาพีเนมตามมา (Bertini et al., 2010) และยังมีการศึกษาในปี ค.ศ. 2012 พบว่าพลาสมิดของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่มียีนดื้อยา *bla*_{NDM-1} สามารถส่งผ่านยีนดื้อยา *bla*_{NDM-1} ไปสู่เชื้อ *A. baylyi* ADP1 ได้โดยอาศัยวิธี eletrotransformation (Fu et al., 2012) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาของ Fu et al. พบว่าวิธีทรานสเฟอร์เมชันแบบ eletrotransformation สามารถส่งผ่านยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} จากพลาสมิดในเชื้อ *Acinetobacter* spp. ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับ *A. baumannii* LS0148 ได้ ส่งผลให้ตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} และการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมเพิ่มสูงขึ้น 2-32 เท่า ใน transformants ที่ได้ (Fu et al., 2014) นำผลการทดลองมาคำนวณหาประสิทธิภาพของการทรานสเฟอร์เมชัน (Transformation efficiency: TE) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง $2.0 \times 10^1 - 8.0 \times 10^2$ transformants/ μ g plasmid DNA ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Patwardhan et al. ที่ทำการศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาระหว่างพลาสมิด pUPI281 ของเชื้อ *A. baumannii* A24 และเชื้อ *E. coli* HB101 โดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชันแบบใช้สารเคมีเหนี่ยวนำ (CaCl_2) ซึ่งให้ค่า TE เท่ากับ 4.3×10^4 transformants/ μ g plasmid DNA (Patwardhan et al., 2008) และการศึกษาของ Pour et al. ที่ทำการศึกษาการส่งผ่าน ยีนดื้อยาของพลาสมิด pUPI801-807 ในเชื้อ *A. baumannii* A3 และ *A. baylyi* 7054 โดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ เมื่อนำมาคำนวณหาค่า TE พบว่าเท่ากับ 2.9×10^3 transformants/ μ g plasmid DNA (Pour et al., 2011) เห็นได้ว่าประสิทธิภาพของการทรานสเฟอร์เมชันในครั้งนี้ต่ำกว่าการศึกษาของ Patwardhan et al. เนื่องจาก การศึกษาของ Patwardhan et al. เป็นการศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชันแบบใช้สารเคมีเหนี่ยวนำ plasmid DNA เข้าสู่แบคทีเรียผู้รับ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันดีกว่าการศึกษานี้ จากนั้นนำผลการทดลองมาคำนวณหา ค่าความถี่ในการเกิดกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน (Frequency of transformation) พบว่ามีค่า อยู่ในช่วง 1.1×10^{-10} ถึง 4.4×10^{-11} ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Doughari et al. ที่ทำการศึกษา การส่งผ่านยีนดื้อยาผ่านกระบวนการทรานสเฟอร์เมชันแบบธรรมชาติ โดยใช้เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพเป็นแบคทีเรียผู้ให้ และใช้เชื้อ *A. lwoffii* และ *A. haemolyticus* เป็นแบคทีเรียผู้รับ

จากการศึกษาพบว่าค่า Frequency of transformation อยู่ในช่วง $1.3 - 5.4 \times 10^{-6}$ (Doughari et al., 2012)

หลังจากนั้นศึกษาการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชัน อาศัยแบคทีเรียโอเฟจเป็นตัวนำพายีนดื้อยาจากแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ พบว่าเชื้อแบคทีเรียผู้ให้ XDR-AB สายพันธุ์ AB135 ที่มีแบคทีเรียโอเฟจ ABP19 (ϕ ABP-19) เป็นตัวนำพายีนดื้อยา สามารถนำพายีนดื้อยา *tet(B)* ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อยา tetracycline ไปสู่แบคทีเรียผู้รับสายพันธุ์ NU013 และ NU015 ได้ (ตาราง 18) ส่งผลให้ตรวจพบยีนดื้อยา *tet(B)* ใน transductants ที่ได้ ดังแสดงในภาพ 9 กระบวนการทรานสดักชันนั้น ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นแบบทรานสดักชันทั่วไป (generalize transduction) เริ่มจากแบคทีเรียโอเฟจที่บรรจุยีนดื้อยาจากแบคทีเรียผู้ให้จะเข้าไปเกาะติดกับเซลล์แบคทีเรียผู้รับ จากนั้นแบคทีเรียโอเฟจจะทำการปลดปล่อยยีนดื้อยาจากแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ ยีนดื้อยาจะแทรกเข้าไปภายในโครโมโซมของแบคทีเรียผู้รับ ส่งผลให้แบคทีเรียผู้รับได้รับยีนดื้อยาและดื้อต่อยาต้านจุลชีพตามมา ซึ่งภายในเชื้อ *A. baumannii* ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาค้นคว้า แต่มีรายงานการศึกษาอื่นๆในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น ในเชื้อ *E. coli* โดย Shousha et al. ซึ่งทำการศึกษาค้นคว้าการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยใช้เชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพเป็นแบคทีเรียผู้ให้เชื้อ *E. coli* ATCC 13706 เป็นแบคทีเรียผู้รับ และมีแบคทีเรียโอเฟจเป็นตัวนำพายีนดื้อยาจากการศึกษาพบว่าประสบความสำเร็จในการส่งผ่านยีนดื้อยา *aphA1*, *tet(A)*, *floR* และ *bla*_{TEM-1} จากแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ (Shousha et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาค้นคว้าการส่งผ่านยีนดื้อยา โดยอาศัยกระบวนการทรานสดักชันในแบคทีเรียแกรมบวก โดยใช้เชื้อ *S. aureus* USA300 เป็นแบคทีเรียผู้ให้ แบคทีเรียโอเฟจ ϕ 80 α , ϕ JB เป็นตัวนำพายีนดื้อยา ส่วนเชื้อแบคทีเรียผู้รับ คือ *S. aureus* 07/235 และ 07/759 จากการศึกษาค้นคว้าแบคทีเรียโอเฟจ ϕ 80 α และ ϕ JB สามารถนำพายีนดื้อยา *bla*_Z, *cadD* และ *tet(K)* ไปสู่แบคทีเรียผู้รับได้ โดยมีค่า transduction frequency เท่ากับ 10^{-5} - 10^{-6} จะเห็นได้ว่ามีค่าสูงกว่าการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ที่ใช้แบคทีเรียโอเฟจของแบคทีเรียแกรมลบ คือเชื้อ *A. baumannii* เป็นตัวนำพายีนดื้อยา ($4.8 - 9.1 \times 10^{-9}$) (Varga et al., 2012) ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 มีรายงานว่าแบคทีเรียโอเฟจ TEM123 สามารถนำพายีนดื้อยา metallo- β -lactamase ซึ่งพบบนโครโมโซมของแบคทีเรียผู้ให้ *S. aureus* S123 มาสู่เชื้อ *S. aureus* S133 ที่ไวต่อยาต้านจุลชีพ ส่งผลให้แบคทีเรียผู้รับดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β -lactam สูงขึ้น (Lee, & Park, 2016) จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอเฟจอาจเป็นตัวกลางสำคัญที่สามารถนำพายีนดื้อยาไปสู่แบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ดื้อต่อยา

ด้านจุลชีพ ส่งผลให้ตรวจพบอัตราการติดต่อยาด้านจุลชีพภายในเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบันอีกด้วย

กระบวนการคอนจูเกชัน เป็นกระบวนการส่งผ่านยีนดื้อยา โดยอาศัยอวัยวะพิเศษที่เรียกว่า sex pilus ในการส่งผ่านยีนดื้อยาจากแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ XDR-AB สายพันธุ์ AB140 ที่มียีนดื้อยา kanamycin (*aphA6*) สามารถส่งผ่านยีนดื้อยา *aphA6* ซึ่งทำให้เชื้อติดต่อยาด้านจุลชีพ kanamycin ไปสู่แบคทีเรียผู้รับ *A. baumannii* สายพันธุ์ NU013 และ NU015 ได้โดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชัน (ตาราง 19) ทำให้สามารถตรวจพบยีนดื้อยา *aphA6* ใน transconjugants เมื่อนำมาคำนวณหาค่า frequency of conjugation (CF) พบว่ามีค่าเท่ากับ $6.3 - 8.5 \times 10^{-5}$ ส่วน transconjugants ที่สามารถเจริญบนจานอาหารที่มียา ด้านจุลชีพ ticarcillin 50 µg/ml เมื่อนำมาตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}) ตรวจไม่พบยีนดื้อยา สัมพันธ์กับการศึกษาของ Fu et al. ที่รายงานว่า การส่งผ่านยีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase (*bla*_{OXA-58}) โดยอาศัยเชื้อ *Acinetobacter* spp. ได้แก่ *A. pittii*, *A. nosocomialis* และ *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียผู้ให้ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับ *A. baumannii* ไม่ประสบความสำเร็จในการส่งผ่านยีนดื้อยา (Fu et al., 2014) มีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเป็นยีนดื้อยาในกลุ่ม β-lactam ชนิดอื่น ได้แก่ ยีนดื้อยาในกลุ่ม class A β-lactamase (*bla*_{GES-11}) หรือ class B metallo-β-lactamase (*bla*_{NDM-1}) ที่เกิดการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยวิธีคอนจูเกชัน ส่งผลให้เชื้อติดต่อยาด้านจุลชีพในคาร์บาพีเนมเช่นกัน จึงทำให้ตรวจพบโคโลนี (transconjugants) เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาด้านจุลชีพ (Fu et al., 2012; Charfi-Kessiss et al., 2014; Zhang et al., 2014; Ramoul et al., 2016) ในปัจจุบันมีการศึกษารายงานว่าการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชันสามารถส่งผ่านยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{GES-11}, *bla*_{IMP-1} และ *bla*_{NDM-1} จากแบคทีเรียผู้ให้ *Acinetobacter* spp. ไปสู่แบคทีเรียผู้รับได้ ส่งผลให้ตรวจพบยีนดื้อยาและอัตราการติดต่อยาด้านจุลชีพของแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (Bertini et al., 2010; Charfi-Kessiss et al., 2014; Zhang et al., 2014; Yang et al. 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า frequency of conjugation (CF) ที่คำนวณได้จากการศึกษาทดลองในครั้งนี้ อยู่ในช่วง $1.0 \times 10^{-4} - 8.6 \times 10^{-5}$ สัมพันธ์กับการศึกษาก่อนหน้าในปี ค.ศ. 2008 ที่ทำการศึกษากการส่งผ่านยีนดื้อยาโดยอาศัยกระบวนการคอนจูเกชันในการส่งผ่านยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ระหว่างเชื้อ *A. baumannii* ที่ติดต่อยาด้านจุลชีพ imipenem ไปสู่เชื้อ *A. baumannii* AbF ที่ไวต่อยาด้านจุลชีพ imipenem พบว่ามีค่า CF อยู่ที่ $2.0 \times 10^{-5} - 1.5 \times 10^{-6}$ (Zarrilli et al., 2008) อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Talreja et al. ในปี ค.ศ. 2014

ที่ทำการศึกษากการส่งผ่านยีนดื้อยาจากเชื้อ MDR-AB ไปสู่เชื้อ *E. coli* J53 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียผู้รับ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ MDR-AB สามารถส่งผ่านยีนดื้อยา quinolone (*aaC* (6')-*Ib*) และ ยีนดื้อยา tetracycline (*tet*(E), *tet*(B)) ไปสู่เชื้อแบคทีเรียผู้รับได้ โดยมีค่า CF เท่ากับ 10^{-4} (Talreja et al., 2014)

ข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากการศึกษาทางอณูชีววิทยาของ class D β -lactamase และการถ่ายทอดยีน ในเชื้อ *A. baumannii* แสดงให้เห็นว่าปัจจุบันประเทศไทยพบอุบัติการณ์การดื้อต่อยา ด้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มสูงขึ้นมาก ส่งผลให้การรักษทำได้ยาก ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูง อีกทั้งยังพบยีนดื้อยา โดยเฉพาะยีนดื้อยา class D β -lactamase แพร่กระจาย ในวงกว้าง และยังสามารถส่งผ่านการดื้อยาหรือยีนดื้อยาเหล่านี้โดยอาศัยกระบวนการถ่ายทอดยีน ในแนวราบ ซึ่งประกอบด้วย 3 กระบวนการ ได้แก่ ทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และคอนจูเกชัน ระหว่างแบคทีเรียด้วยกัน ซึ่งในการศึกษาดังนี้เป็นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นโดยได้จำลอง การส่งผ่านยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียผู้ให้ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาล และแบคทีเรียผู้รับ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม เพราะฉะนั้นเพื่อให้เข้าใจถึง กระบวนการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแบคทีเรียมากขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยใช้ เทคนิค whole genome sequencing เพื่อให้รู้ส่วนประกอบทั้งหมดภายในจีโนมของแบคทีเรียผู้ให้ และแบคทีเรียผู้รับ แล้วนำข้อมูลมาทำนายการส่งผ่านยีนดื้อยาชนิดอื่นๆที่พบในจีโนม ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ควรศึกษาถึงตำแหน่งที่พบยีนดื้อยา โดยใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization หรือ southern blot และศึกษากระบวนการส่งผ่านยีนดื้อยาอื่นๆเพิ่มเติม เช่น การส่งผ่านยีนดื้อยาโดยใช้ outer membrane vesicle เพื่อให้เกิดความเข้าใจในการถ่ายทอด ยีนดื้อยามากยิ่งขึ้น รวมทั้งควรหาวิธีที่เหมาะสมในการกำจัดแบคทีเรียดื้อยาในโรงพยาบาล ไม่ให้มีการปนเปื้อนออกมาสู่สิ่งแวดล้อม และนำผลการศึกษาที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุม ป้องกันการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาทั้งภายในประเทศไทยและต่างประเทศต่อไป



บรรณานุกรม

- รวิวรรณ แสงศรี. (2556). การตรวจหา *copper regulxator genes* ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* และ *Acinetobacter spp.* (การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- Adums, H. W. (1959). *Bacteriophage*. New York: Inter science Publishers.
- Aimsaad, L., Diraphat, P., Utrarachkij, F., Thunyaharn, S., Samakoses, R. & Siripanichgon, K. (2009). Epidemiological characteristics of *Acinetobacter baumannii* infections at Phramongkutklao Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 92(7), 164-172.
- Al Atrouni, A., Hamze, M., Jisr, T., Lemarié, C., Eveillard, M., Joly-Guillou, M. L., & Kempf, M. (2016). Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. *International Journal of Infectious Diseases*, 52, 29–36.
- Aminov, R. I., Chee-Sanford, J. C., Garrigues, N., Teferedegne, B., Krapac, I. J., White, B. A. & Mackie, R. I. (2002). Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1786-1793.
- Anunnatsiri, S. & Tonsawan, P. (2011). Risk factors and clinical outcomes of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia at a university hospital in Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(3), 693-703.
- Aswapokee, N., Tiengrim, S., Charoensook, B. & Sangsiriwut, K. (1998). Antimicrobial resistant pattern of *Acinetobacter spp.* *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*, 15(2), 43-48.
- Awwal, S. M. & Abalaka M. (2011). Effectiveness of transduction and conjugation in genetic transformation. *Journal of Pharmaceutical Research and Opinion*, 1(7), 170 – 173.

- Baker, S., Griffiths, C. & Nicklin, J. (2011). *Microbiology*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P. D., Villa, L., Nordmann, P. & Carrattoli, A. (2010). Characterization and PCR-Based Replicon Typing of Resistance Plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4168–4177.
- Black, L. J. (2013). *Microbiology*. Singapore: John Wiley & Sons Singapore Pte. Ltd.
- Bonnin, R. A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J. R. & Poirel, L. (2011). Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 349-354.
- Bonomo, R. A. & Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(2), 49-56.
- Bou, G., Cerveró, G., Domínguez, M. A., Quereda, C. & Martínez-Beltrán, J. (2000). Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3299-3305.
- Bou, G., Oliver, A. & Martínez-Beltrán, J. (2000). OXA-24, a Novel Class D β -lactamase with Carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1556–1561.
- Bush, K. & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976.
- Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S. & Snyder, M. (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *Plos Pathogens*, 6(4), e1000834.

- Carvalho, K. R., Carvalho-Assef, A. P., Peirano, G., Santos, L. C., Pereira, M. J. & Asensi, M. D. (2009). Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(1), 25-28.
- Chaisathaphol, T. & Chayakulkeeree, M. (2014). Epidemiology of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria in adult hospitalized patients at Siriraj Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 97(Suppl 3), S35-S45.
- Chaiwarith, R., Mahatthanphak, S., Boonchoo, M., Supparatpinyo, K. & Sirisanthana, T. (2005). Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*, 22(1), 1-8.
- Charfi-Kessiss, K., Mansour, W., Ben Haj Khalifa, A., Mastouri, M., Nordmann, P., Aouni, M. & Poirel, L. (2014). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the *bla*_{OXA-23} and the *bla*_{GES-11} genes in a neonatology center in Tunisia. *Microbial Pathogenesis*, 74, 20-24.
- Choi, C. H., Lee, S. K., Lee, Y. C., Park, T. I. & Lee, J. C. (2008). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiology*, 8, doi:10.1186/1471-2180-8-216.
- Choi, J. Y., Kwak, Y. G., Yoo, H., Lee, S. O., Kim, H. B., Han, S. H., ... & Lee, H. (2016). Trends in the distribution and antimicrobial susceptibility of causative pathogens of device-associated infection in Korean intensive care units from 2006 to 2013: results from the Korean Nosocomial Infections Surveillance System (KONIS). *Journal of Hospital Infection*, 92(4), 363-371.
- Dale, J. W. (1994). *Molecular genetics of bacteria*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Davies J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.

- Dejsirilert, S., Tiengrim, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N. & Malathum, K. (2012). Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*: six years of National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) surveillance. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 92(Suppl 4), S34-45.
- Di Nocera, P. P., Rocco, F., Giannouli, M., Triassi, M. & Zarrilli R. (2011). Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiology*, 11, doi: 10.1186/1471-2180-11-224.
- Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C. J. & Cattoir, V. (2006). Bacterial Identification, Clinical Significance, and Antimicrobial Susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, Two Frequently Misidentified Opportunistic Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4471–4478.
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S. & Benade, S. (2012). Virulence, resistance genes, and transformation amongst environmental isolates of *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 25-33.
- Drawz, S. M., Babic, M., Bethel, C. R., Taracila, M., Distler, A. M, Ori, C., ... & Bonomo, R. A. (2010). Inhibition of the class C beta-lactamase from *Acinetobacter* spp.: insights into effective inhibitor design. *Biochemistry*, 49(2), 329-340.
- Dzidic, S. & Bedekovic, V. (2003). Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(6), 519-526.
- Ellis, T. N. & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and Immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 81–94.
- Espinal, P., Marti, S. & Vila, J. (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 80(1), 56-60.
- Evans, B. A. & Amyes, S. G. (2014). OXA β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241-263.

- Falagas, M. E., Karveli, E. A., Kelesidis, I. & Kelesidis, T. (2007). Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(12), 857–868.
- Fournier, P. E. & Richet, H. (2006). The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 692–699.
- Fu, Y., Du, X., Ji, J., Chen, Y., Jiang, Y. & Yu, Y. (2012). Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla*_{NDM-1} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. *Antimicrobial Chemotherapy Advance*, 67(9), 2114-2122.
- Fu, Y., Jiang, J., Zhou, H., Jiang, Y., Fu, Y., Yu, Y. & Zhou, J. (2014). Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. *PLOS ONE*, 9(1), e84680.
- Gaddy, J. A., Arivett, B. A., McConnell, M. J., López-Rojas, R., Pachón, J. & Actis, L. A. (2012). Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infection and Immunity*, 80(3), 1015-1024.
- Gehrlein, M., Leying, H., Cullmann, W., Wendt, S. & Opferkuch, W. (1991). Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy*, 37(6), 405-412.
- Giovanetti, E., Brenciani, A., Morroni, G., Tiberi, E., Pasquaroli, S., Mingoia, M. & Varaldo, P. E. (2015). Transduction of the *Streptococcus pyogenes* bacteriophage Φ m46.1, carrying resistance genes *mef(A)* and *tet(O)*, to other *Streptococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 5, e746.
- Go, E. S., Urban, C., Burns, J., Mariano, N., Mosinka-Snipas, K., Rahal, J. J., ... & Eisner, W. (1994). Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet*, 344(8933), 1329-1332.

- Gogou, V., Pournaras, S., Giannouli, M., Voulgari, E., Piperaki, E. T., Zarrilli, R. & Tsakris, A. (2011). Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(12), 2767–2772.
- Higgins, P. G., Perez-Llarena, F. J., Zander, E., Fernandez, A., Bou, G. & Seiferta, H. (2013). OXA-235, a Novel Class D β -Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2121–2126.
- Hrenovic, J., Durn, G., Goic-Barisic, I. & Kovacic, A. (2014). Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2860-2866.
- Hsueh, P. R., Teng, L. J., Chen, C. Y, Chen, W. H., Yu, C. J., Ho, S. W. & Luh, K.T. (2002). Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, 8(8), 827-832.
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Journal of Infection and Drug Resistance*, 7, 167-176.
- Hujer, K. M., Hujer, A. M., Hulten, E. A., Bajaksouzian, S., Adams, J. M., Donskey, C. J., ... & Thomson, J. M. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), 4114-4123.
- Inchai, J., Pothirat, C., Bumroongkit, C., Limsukon, A., Khositsakulchai, W. & Liwsrisakun, C. (2015). Prognostic factors associated with mortality of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Journal of Intensive Care*, 3(1), 1-9.

- Jacobs, A. C., Hood, I., Boyd, K. L., Olson, P. D., Morrison, J. M., Carson, S., ... & Dunman, P. M. (2010). Inactivation of Phospholipase Diminishes *Acinetobacter baumannii*. *Pathogenesis. Infection and Immunity*, 78(5), 1952–1962.
- Jantama, S. S., Kunawatanakul, T., Semaram, S., Sangsanon, S., Teerawattanasuk, N. & Jantama, K. (2013). Detection of carbapenemase and *bla*_{OXA-23-like} gene in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* at Sunpasitthiprasong Hospital. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 99-109.
- Juntanawiwat, P., Thunyaharn, S., Visawapoka, U., Samosornsuk, W. & Samosornsuk, S. (2016). Prevalence of OXA-type carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in intensive care unit at Phramongkutklao Hospital. *Journal of Medical Technology and Physical Therapy*, 28(2), 120-128.
- Jumroon, N., & P. Santanirand. (2013). Multiple combination patterns of oxa-type carbapenem hydrolyzing and metallo- β -lactamases encoding genes among clinically isolated *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), 908-917.
- Keen, E. F., Robinson, B. J., Hospenthal, D. R., Aldous, W. K., Wolf, S. E., Chung, K. K. & Murray, C. K. (2010). Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. *Burns*, 36(6), 819-825.
- Kim, D., Baik, K. S., Kim, M. S., Park, S. C., Kim, S. S., Rhee, M. S., ... & Seong, C. N. (2008). *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *The Journal of Microbiology*, 46(4), 396-401.
- Kim, J., Lee, J. E., Ree, H. & Kim, H. J. (2015). Total Synthesis of Acinetobactin. *Korean Chemical Society*, 36(1), 439–441.
- Kim, S. W., Choi, C. H., Moon, D. C., Jin, J. S., Lee, J. H. Shin, J. H., ... & Lee, J. C. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 301(2), 224–231.

- Kitti, T., Thummeepak, R., Leungtongkam, U., Kunthalert, D. & Sitthisak, S. (2015). Efficacy of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage cocktail on *Acinetobacter baumannii* growth. *African Journal of Microbiology Research*, 9(42), 2159-2165.
- Krahn, T., Wibberg, D., Maus, I., Winkler, A., Bontron, S., Sczyrba, A., ... & Schlüter, A. (2016). Intraspecies transfer of the chromosomal *Acinetobacter baumannii* *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 3032-3040.
- Krizova, L., Poirol, L., Nordmann, P. & Nemec, A. (2013). TEM-1 β -lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2786-2791.
- Kulah, C., Mooij, M. J., Comert, F., Aktas, E., Celebi, G., Ozlu, N., ... & Savelkoul, P. H. (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(2), 114-118.
- Lee, H. W., Koh, Y. M., Kim, J., Lee, J. C., Lee, Y. C., Seol, S. Y., ... & Cho, D. T. (2008). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 49-54.
- Lee, Y. D. & Park, J. H. (2016). Phage conversion for β -Lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from foods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 263-269.
- Limansky, A. S., Mussi, M. A. & Viale, A. M. (2002). Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4776-4778.
- Livermore, D. M. & Woodford, N. (2006). The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14(9), 413-420.

- Lolans, K., Rice, T. W., Munoz-Price, L. S. & Quinn, J. P. (2006). Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2941-2945.
- Longo, F., Vuotto, C. & Donelli, G. (2014). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiologica*, 37, 119-127.
- Lorenz, M. G. & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58(3), 563-602.
- Luke, N. R., Sauberan, S. L., Russo, T. A., Beanan, J. M., Olson, R., Loehfelm, T. W., ... & Campagnari, A. A. (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infection and Immunity*, 78(5), 2017-2023.
- Luna, C. M. & Aruj, P. K. (2007). Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. *Respirology*, 12(6), 787-791.
- Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D. & Martinko, J. M. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed.). San Francisco, USA: Pearson Education, Inc.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.
- 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.
- Manchanda, V., Sanchaita, S. & Singh, N. (2010). Multidrug resistant acinetobacter. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 291-304.

- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P. & Lambert, T. (2011). 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), 3298–3304.
- Mazaheri Nezhad Fard, R., Barton, M. D. & Heuzenroeder, M. W. (2011). Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letter in Applied Microbiology*, 52(6), 559-564.
- McConnell, M. J., Actis, L. & Pachon, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 130–155.
- Mendes, R. E., Bell, J. M., Turnidge, J. D., Castanheira, M. & Jones, R. N. (2009). Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), 55–59.
- Merkier, A. K., Catalano, M., Ramírez, M. S., Quiroga, C., Orman, B., Ratier, L., ... & Centrón, D. (2008). Polyclonal spread of *bla*(OXA-23) and *bla*(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2(3), 235-240.
- Metan, G., Alp, E., Aygen, B. & Sumerkan, B. (2007). *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 197-199.
- Migliavacca, R., Espinal, P., Principe, L., Drago, M., Fugazza, G., Roca, I., ... & Luzzaro, F. (2013). Characterization of resistance mechanisms and genetic relatedness of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from blood, Italy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(2), 180-186.

- Misbah, S., Hassan, H., Yusof, M. Y., Hanifah, Y. A. & AbuBakar, S. (2005). Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Medical Journal*, 46(9), 461-464.
- National Antimicrobial Resistance Surveillance of Thailand. (2014-2015). Retrieved December 2, 2016, from <http://narst.dmsc.moph.go.th>
- Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., Broek, V. P. & Dijkshoorn, L. (2004). Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *Journal of Medical Microbiology*, 53(12), 1233-1240.
- Neves, F. C., Clemente, W. T., Lincopan, N., Paião, I. D., Neves, P. R., Romanelli, R. M., ... & Nobre-Junior, V. A. (2016). Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143 producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(6), 556-563.
- Nhu, N. T., Lan, N. P., Campbell, J. I., Parry, C. M., Thompson, C., Tuyen, H. T., ... & Nhu, T. D. H. (2014). Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* as the major cause of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients at an infectious disease hospital in southern Vietnam. *Journal of Medical Microbiology*, 63(10), 1386-1394.
- Niumsup, P. R., Boonkerd, N., Tansawai, U. & Tiloklurs, M. (2009). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62(2), 152-154.
- Pagel, J. E. & Seyfried, P. L. (1976). Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* Isolates. *Journal of General Microbiology*, 96(2), 220-232.
- Patel, G. & Bonomo, R. A. (2013). "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, 4(48), 1-17.
- Paton, R., Miles, R. S., Hood, J., Amyes, S. G., Miles, R. S. & Amyes, S. G. (1993). ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2(2), 81-87.

- Patwardhan, R. B., Dhakephalkar, P. K., Niphadkar, K. B. & Chopade, B. A. (2008). A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *Indian Journal of Medical Research*, 128(2), 178-187.
- Peleg, A. Y., Seifert, H. & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 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.
- Piewngam, P., & Klratissin, P. (2014). Comparative assessment of antimicrobial susceptibility testing for tigecycline and colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, including multidrug-resistant isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44(5), 396-401.
- Poirel, L., Bonnin, R. A. & Nordmann, P. (2011). Genetic basis of antibiotic resistance in Pathogenic *Acinetobacter* species. *Biochemistry and Molecular Biology for Life Scientists*, 63(12), 1061-1067.
- Poirel, L. & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and Epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(9), 826-836.
- Potron, A., Poirel, L. & Nordmann, P. (2011). Plasmid-mediated transfer of the *bla*_{NDM-1} gene in Gram-negative rods. *FEMS Microbiology Letters*, 324(3), 111-116.
- Pour, N. K., Dusane, D. H., Dhakephalkar, P. K., Zamin, F. R., Zinjarde, S. S. & Chopade, B. A. (2011). Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62(3), 328-338.
- Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M. L., ... & Kempf, M. (2015). Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2359-2367.

- Ramirez, M. S., Don, M., Merkier, A. K., Bistue, A. J., Zorreguieta, A., Centron, D. & Tolmasky M. E. (2010). Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1488–1490.
- Ramirez, M. S., Merkier, A. K., Quiroga, M. P. & Centron, D. (2012). *Acinetobacter baumannii* is able to gain and maintain a plasmid harbouring *Inc35* found in Enterobacteriaceae isolates from Argentina. *Current Microbiology*, 64(3), 211-213.
- Ramoul, A., Loucif, L., Bakour, S., Amiri, S., Dekhil, M. & Rolain, J. M. (2016). Co-occurrence of *bla_{NDM-1}* with *bla_{OXA-23}* or *bla_{OXA-58}* in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, 136-141.
- Rattanaumpawan, P., Ussavasodhi, P., Kiratisin, P. & Aswapokee, N. (2013). Epidemiology of bacteremia caused by uncommon non-fermentative gram-negative bacteria. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 167.
- Robledo, I. E., Aquino, E. E., Santé, M. I., Santana, J. L., Otero, D. M., León, C. F. & Vázquez, G. J. (2010). Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 1354-1357.
- Rodríguez Guardado, A., Blanco, A., Asensi, V., Pérez, F., Rial, J. C., Pintado, V., ... Maradona, J. A. (2008). Multidrug-resistant *Acinetobacter* meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(4), 908-913.
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A. & Soares, N. C. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3084–3090.

- Russo, T. A., Luke, N. R., Beanan, J. M., Olson, R., Saubaran, S. L., MacDonald, L., ... & Campagnari, A. A. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and Immunity*, 78(9), 3993-4000.
- Sadeghifarda, N., Ranjbar, R., Zaeimic, J., Alikhanid, M. Y., Ghafouryana S., Raftarie, M., ... & Bakar, F. A. (2010). Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles, and RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* bacteria. *Asian Biomedicine*, 4(6), 901-911.
- Santimaleeworagun, W., Thathong, A., Samret, W., Preechachuawong, P., Sae-lim, W. & Jitwasinkul, T. (2014). Identification and characterization of carbapenemase genes in clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from general hospital in Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(4), 874-880.
- Saranathan, R., Sudhakar, P., Karthika, R. U., Singh, S. K., Shashikala, P., Kanungo, R. & Prashanth, K. (2014). Multiple drug resistant carbapenemases producing *Acinetobacter baumannii* isolates harbours multiple R-plasmids. *Indian Journal of Medical Research*, 140(2), 262-270.
- Shousha, A., Awaianont, N., Sofka, D., Smulders, F. J., Paulsen, P., Szostak, M. P., ... & Hilbert, F. (2015). Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4600-4606.
- Sirichot, S., Diraphat, P., Utrarachkij, F., Tribuddharat, C. & Siripanichgon, K. (2009). Dissemination of class I integron in *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia patients and their environment. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(6), 1284-1292.
- Su, M. T., Venkatesh, T. V. & Bodmer, R. (1998). Large-and small-scale preparation of Bacteriophage lambda lysate and DNA. *BioTechniques*, 25(1), 44-46.

- Talreja, D., Muraleedharan, C., Gunathilaka, G., Zhang, Y., Kaye, K. S., Walla, S. K. & Kumar, A. (2014). Virulence properties of multidrug resistant ocular isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Current Eye Research*, 39(7), 695-704.
- Teo, J., Lim, T. P., Hsu, L. Y., Tan, T. Y., Sasikala, S., Hon, P. Y., ... & Apisarnthanarak, A. (2015). Extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a Thai hospital: a molecular epidemiologic analysis and identification of bactericidal Polymyxin B-based combinations. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 4(1), doi: 10.1186/s13756-015-0043-x.
- Thapa, B., Tribuddharat, C., Srifuengfung, S. & Dhiraputra, C. (2010). High prevalence of *bla*_{OXA-23} in oligoclonal carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41(3), 625-635.
- Thomson, J. M. & Bonomo, R. A. (2005). The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5), 518-524.
- Towner, K. J. (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 355-363.
- Tu, Z. (2005). An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 114-120.
- Turano, H., Gomes, F., Medeiros, M., Oliveira, S., Fontes, L.C., Sato, M.I. & Lincopan, N. (2016). Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(1), 80-82.
- Valenzuela, J. K., Thomas, L., Partridge, S. R., Reijden, T. V. D., Dijkshoorn, L. & Iredell, J. (2007). Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 453-460.

- Varga, M., Kuntová, L., Pantucek, R., Mašlanová, I., Ružicková, V. & Doškar, J. (2012). Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction with in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiology Letters*, 332(2), 146-152.
- Villegas, M. V., Kattan, J. N., Correa, A., Lolans, K., Guzman, A. M., Woodford, N., ... & Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. (2007). Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2001-2004.
- Vries, J. D. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2094-2099.
- Walther-Rasmussen, J. & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 373-383.
- Wang, J., Ruan, Z., Feng, Y., Fu, Y., Jiang, Y., Wang, H. & Yu, Y. (2014). Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. *PLoS One*, 9(8), e104882.
- Wareham, D. W., Bean, D. C., Khanna, P., Hennessy, E. M., Krahe, D., Ely, A. & Millar, M. (2008). Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *European Journal Clinical Microbiology*, 27(7), 607-612.
- Werarak, P., Waiwarawut, J., Tharavichitkul, P., Pothirat, C., Rungruanghiranya, S., Geater, S. L., ... & Wiwatworapan, T. (2012). *Acinetobacter baumannii* nosocomial pneumonia in tertiary care hospitals in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 95(Suppl 2), S23-33.

- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P. & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39(3), 309–317.
- Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., ... & Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(4), 351–353.
- Yamamoto, S., Okujo, N. & Sakakibara, Y. (1994). Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Archives of Microbiology*, 162(4), 249–254.
- Yang, H., Liang, L., Lin, S. & Jia, S. (2010). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 10(1), 131.
- Yang, Y. S., Lee, Y. T., Wang, Y. C., Chiu, C. H., Kuo, S. C., Sun, J. R., ... & Chang, F. Y. (2015). Molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter nosocomialis* in a medical center in Taiwan. *Infection, Genetics and Evolution*, 31, 305–311.
- Zarrilli, R., Giannouli, M., Tomasone, F., Triassi, M. & Tsakris, A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(5), 335–341.
- Zarrilli, R., Vitale, D., Di Popolo, A., Bagattini, M., Daoud, Z., Khan, A. U., ... & Triassi, M. (2008). A plasmid-borne *bla*_{OXA-58} gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 4115–4120.
- Zhang, C., Qiu, S., Wang, Y., Qi, L., Hao, R., Liu, X., ... & Li, P. 2013. Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PLoS One*, 8(6), e64857.

- Zhang, R., Hu, Y. Y., Yang, X. F., Gu, D. X., Zhou, H. W., Hu, Q. F., ... & Chen, G. X. (2014). Emergence of NDM-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. isolated from China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(5), 853-860.
- Zhang, Y., Yao, Z., Zhan, S., Yang, Z., Wei, D., Zhang, J., ... & Kyaw, M. H. (2014). Disease burden of intensive care unit-acquired pneumonia in China: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 29, 84-90.





ภาคผนวก ก รายละเอียดของเชื้อ *A. baumannii* ที่ใช้ในการศึกษา

ตาราง 16 แสดงข้อมูลเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวน 160 ไอโซเลต และผลการศึกษารูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ และยีนดื้อยา class D β -lactamase ที่ตรวจพบ

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}
1	AB-94	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
2	AB-95	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
3	AB-96	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
4	AB-97	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
5	AB-98	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB	-	-	+
6	AB-99	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
7	AB-101	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
8	AB-102	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
9	AB-103	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	CR-AB	-	-	-
10	AB-104	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
11	AB-105	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการต่อต้านยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
12	AB-106	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	No resistance	-	-	-
13	AB-109	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
14	AB-110	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	No resistance	-	-	-
15	AB-111	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
16	AB-112	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
17	AB-113	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
18	AB-117	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
19	AB-120	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	+
20	AB-121	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
21	AB-143	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	+
22	AB-144	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
23	AB-147	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
24	AB-148	เตียงรายประชนุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-24}</i>	<i>bla_{OXA-58}</i>
25	AB-149	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
26	AB-150	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
27	AB-151	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
28	AB-152	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
29	AB-156	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
30	AB-159	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
31	AB-160	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
32	AB-162	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
33	AB-163	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
34	AB-166	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
35	AB-167	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
36	AB-168	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
37	AB-169	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อดื้อยา ด้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
38	AB-170	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
39	AB-171	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
40	AB-172	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
41	AB-175	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
42	AB-176	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
43	AB-177	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
44	AB-178	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
45	AB-179	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
46	AB-180	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
47	AB-181	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
48	AB-183	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
49	AB-184	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
50	AB-185	เตียงรายประชาชนนครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}
51	AB-230	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
52	AB-231	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
53	AB-232	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
54	AB-233	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
55	AB-234	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
56	AB-235	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	No resistance	-	-	-
57	AB-236	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
58	AB-237	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
59	AB-239	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
60	AB-240	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
61	AB-241	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
62	AB-242	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
63	AB-243	เสียงรายพระชนมเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อด้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
64	AB-244	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
65	AB-245	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	-
66	AB-246	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
67	AB-247	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
68	AB-248	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
69	AB-249	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
70	AB-250	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
71	AB-251	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB	-	-	-
72	AB-252	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
73	AB-253	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
74	AB-254	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
75	AB-255	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
76	AB-256	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ด้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}
77	AB-257	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
78	AB-258	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
79	AB-259	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
80	AB-261	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
81	AB-262	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
82	AB-263	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB	-	-	+
83	AB-264	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
84	AB-265	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
85	AB-266	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
86	AB-267	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
87	AB-268	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
88	AB-269	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
89	AB-270	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}
90	AB-271	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
91	AB-272	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
92	AB-273	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
93	AB-274	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
94	AB-275	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	CR-AB	+	-	-
95	AB-276	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
96	AB-278	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
97	AB-279	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
98	AB-280	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
99	AB-281	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	-
100	AB-282	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	-
101	AB-284	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	No resistance	-	-	-
102	AB-285	เตียงรายประจักษ์นครราชสีมา	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
103	AB-286	เชียงใหม่ประชานุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
104	AB-287	เชียงใหม่ประชานุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
105	AB-288	เชียงใหม่ประชานุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	-
106	AB-289	เชียงใหม่ประชานุเคราะห์	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	-
107	AB-123	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
108	AB-124	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
109	AB-125	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
110	AB-126	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
111	AB-127	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB	-	-	+
112	AB-128	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
113	AB-129	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
114	AB-130	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
115	AB-131	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ด้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
116	AB-132	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
117	AB-133	พิจิตร	สายสวนปัสสาวะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
118	AB-134	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
119	AB-135	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
120	AB-136	พิจิตร	ปัสสาวะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
121	AB-137	พิจิตร	เลือด	MDR-AB, CR-AB	-	-	-
122	AB-138	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
123	AB-139	พิจิตร	เลือด	MDR-AB	-	-	-
124	AB-140	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-
125	AB-141	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
126	AB-191	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
127	AB-192	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
128	AB-193	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
129	AB-194	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
130	AB-195	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
131	AB-196	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
132	AB-197	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
133	AB-198	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
134	AB-199	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
135	AB-200	พิจิตร	ปัสสาวะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
136	AB-201	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
137	AB-202	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
138	AB-203	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
139	AB-204	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB	-	-	-
140	AB-205	พิจิตร	เสมหะ	No resistance	+	-	-
141	AB-206	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
142	AB-208	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
143	AB-209	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
144	AB-210	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
145	AB-212	พิจิตร	ปัสสาวะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
146	AB-214	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB	-	-	-
147	AB-215	พิจิตร	เสมหะ	No resistance	-	-	-
148	AB-216	พิจิตร	ปัสสาวะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
149	AB-217	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
150	AB-219	พิจิตร	น้ำในเยื่อหุ้มปอด	MDR-AB	-	-	-
151	AB-220	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
152	AB-221	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
153	AB-222	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
154	AB-223	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	+	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

ลำดับ	EI strains	โรงพยาบาลที่แยกเชื้อ	ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	รูปแบบการดื้อยา ต้านจุลชีพ	ยีนดื้อยาที่ตรวจพบ		
					bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-58}
155	AB-224	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
156	AB-225	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
157	AB-226	พิจิตร	หนอง	MDR-AB, CR-AB	-	-	+
158	AB-227	พิจิตร	เสมหะ	MDR-AB, CR-AB	+	-	-
159	AB-228	พิจิตร	เสมหะ	No resistance	-	-	-
160	AB-229	พิจิตร	ปัสสาวะ	MDR-AB, CR-AB, XDR-AB	+	-	-

ตาราง 18 แสดงผลการศึกษากายภาพของยีนดื้อยาโดยวิธีทรานสดักชันระหว่างแบคทีเรีย *A. baumannii* และ *Acinetobacter* spp.

แบคทีเรียผู้ให้ (เฟลจ) /	Transduction frequencies บนอาหาร LBA with ticarcillin (50 µg/ml)				Transduction frequencies บนอาหาร LBA with kanamycin (20 µg/ml)				Transduction frequencies บนอาหาร LBA with tetracycline (20 µg/ml)			
	NU005-1	NU013	NU015	NI003	NU005-1	NU013	NU015	NI003	NU005-1	NU013	NU015	NI003
AB-183 (ØABP-02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-183 (ØABP-39)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-135 (ØABP-19)	-	-	-	-	-	8.5×10^{-5}	6.3×10^{-5}	-	-	-	-	-
AB-135 (ØABP-29)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-135 (ØABP-44)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-229 (ØABP-19)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-229 (ØABP-29)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 18 (ต่อ)

แบคทีเรียผู้ให้ (เฟจ) /	Transduction frequencies บนอาหาร LBA with ticarcillin (50 µg/ml)				Transduction frequencies บนอาหาร LBA with kanamycin (20 µg/ml)				Transduction frequencies บนอาหาร LBA with tetracycline (20 µg/ml)			
	NU005-1	NU013	NU015	NI003	NU005-1	NU013	NU015	NI003	NU005-1	NU013	NU015	NI003
แบคทีเรียผู้รับ												
AB-229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(ØABP-44)												

ตาราง 19 แสดงผลการศึกษากายภาพดัดแปลงพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรีย *A. baumannii* และ *Acinetobacter* spp.

แบคทีเรีย ผู้ให้ / ผู้รับ	Conjugation frequencies บนอาหาร MHA with sodium azide + tetracycline (20 µg/ml)				Conjugation frequencies บนอาหาร MHA with sodium azide + kanamycin (20 µg/ml)				Conjugation frequencies บนอาหาร MHA with sodium azide + tetracycline (20 µg/ml)			
	NU005-1	NU013	NU015	NI003	NU005-1	NU013	NU015	NI003	NU005-1	NU013	NU015	NI003
AB-95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB-140	-	1.0×10^{-4}	8.6×10^{-5}	-	-	8.5×10^{-5}	6.3×10^{-5}	-	-	-	-	-
AB-229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ภาคผนวก ค เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (High-speed centrifuge: Labogene, Denmark)
2. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (multiSUBTMMidi: Cleavers scientific, UK)
3. เครื่องถ่ายภาพ UV transmission (Gel Doc 2000 Gel documentation system: Bio-Rad Laboratories, USA)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (SS-325: TOMY, New Zealand)
5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker: New Brunswick Scientific, USA)
6. เครื่องวัดความขุ่น (McFarland densitometer: SiaBiosan, Latvia)
7. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex-2 Genie: Scientific industries Inc., USA)
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (WiseSpin[®]: Daihan Scientific Co., Ltd., Korea)
9. เครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (UV transilluminator: Herolab, Germany)
10. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (SL SHEL LAB Model 1565 Incubator: Sheldon Manufacturing Inc., USA)
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Beckman Coulter DU[®] 730 UV/Vis Spectrophotometers (Beckman Coulter, Brea, CA)
12. อ่างน้ำร้อน water bath DT (Heto lab Equipment, Denmark)
13. ตู้บ่มเชื้อ UNB300 (MEMMERT, Federal Republic, Germany)
14. ตู้ปลอดเชื้อ HVR 2472 (Holten LaminAir: Denmark)
15. เครื่องวัดกรดต่าง CyberScan pH510 (Eutech Instruments, Malaysia)
16. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)

ภาคผนวก ง การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase Soy Agar (TSA) ปริมาตร 1 ลิตร

ซึ่งอาหาร Trypticase Soy Agar ปริมาณ 40 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Luria-Bertani Broth (LB broth) ปริมาตร 1 ลิตร

ซึ่งอาหาร Luria-Bertani Broth ปริมาณ 25 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Agar (LBA) ให้เติมวุ้น (Agar) ลงไปร้อยละ 1.5 หรือกรณีที่ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth ความเข้มข้น 2 เท่า (double-strength LB broth) ให้เติมอาหารลงไปอีก 25 กรัม

3. Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 1 ลิตร

ซึ่งอาหาร Mueller Hinton Broth ปริมาณ 21 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ให้เติมวุ้น (Agar) ลงไปร้อยละ 1.5

4. Soft Agar ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ซึ่งอาหาร Trypticase Soy Broth ปริมาณ 12.5 กรัม และเติมผงวุ้น (Agar) ลงไปร้อยละ 0.7 กรัม จากนั้นนำไปมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วดูดใส่หลอดทดลอง หลอดละ 4 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

1. 5X TBE buffer (450 mM Tris-Borate, 10 mM EDTA) ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	54	g
Boric acid	27.5	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	ml

ละลายส่วนผสมทั้งสามชนิดลงในน้ำกลั่น คนให้เป็นสารละลายเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จะได้สารละลาย 5X TBE buffer เป็น stock solution จากนั้นนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5X TBE buffer ใช้สำหรับการทำ agarose gel electrophoresis เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง EDTA disodium salt dehydrate ปริมาณ 18.16 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 โดยการเติม NaOH จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 1.0% agarose gel ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง agarose ปริมาณ 1 กรัม นำไปละลายใน 0.5X TBE buffer ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนเพื่อให้ agarose หลอมละลาย ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น ประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม ethidium bromide ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 µg/ml

4. SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-Cl) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

NaCl	2.9	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	g
1 M Tris-Cl (pH 7.5)	25	ml

ละลายส่วนผสมทั้งสามชนิดลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง