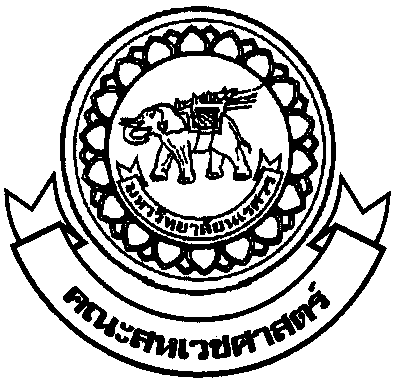


การศึกษาความชุกของยีน Metallo-β-lactamase และ Oxacillinase ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมด้วยวิธี Multiplex PCR

Investigation of the prevalence of Metallo-β-lactamase and Oxacillinase genes among meropenem non-susceptible *Acinetobacter bamannii* by Multiplex PCR

ชนิกานต์ เอี่ยมกร่าง

ณัฐวดี งามยิ่งสกุล

วาลาสิณี แสงไทย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2565

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความชุกของยีน Metallo-β-lactamase และ Oxacillinase ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมด้วยวิธี Multiplex PCR	
ชื่อนิสิต	นางสาวชนิกานต์	เอี่ยมกร่าง
	นางสาวณัฐวดี	งามยิ่งสกุล
	นางสาววาลาสิณี	แสงไทย
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร	

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต คงรส)
หัวหน้าภาควิชาเทคนิคการแพทย์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภวิทู สุขเพ็ง)
คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความชุกของยีน Metallo-β-lactamase และ Oxacillinase ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมด้วยวิธี Multiplex PCR

ชื่อนิสิต นางสาวชนิกานต์ เอี่ยมกร่าง
นางสาวณัฐวดี งามยิ่งสกุล
นางสาววาลาสิณี แสงไทย

สาขาวิชา เทคนิคการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร

คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ขอรับรองว่านิสิตผ่านการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ โดยได้มีการปรับปรุงแก้ไขรายงานตามข้อเสนอแนะจากคณะกรรมการแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร)
ประธานกรรมการ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล)
กรรมการ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยอดหทัย ทองศรี)
กรรมการ

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและบรรลุตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยความเมตตาและกรุณาอย่างยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยอดหทัย ทองศรี ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอขอบคุณกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือ และสถานที่ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา รวมถึงครอบครัวและเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านด้วยดีเสมอมา

สุดท้ายนี้คุณค่าและคุณประโยชน์ใด ๆ อันพึงได้รับจากการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ทางผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่านและผู้ที่สนใจเชื้อแบคทีเรียดื้อยาและยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสไม่มากก็น้อย

ชนิกานต์ เอี่ยมกร่าง
ณัฐวดี งามยิ่งสกุล
วาลาสิณี แสงไทย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความชุกของยีน Metallo-β-lactamase และ Oxacillinase ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมด้วยวิธี Multiplex PCR

ชื่อนิสิต นางสาวชนิกานต์ เอี่ยมกร่าง
นางสาวณัฐวดี งามยิ่งสกุล
นางสาววาลาสิณี แสงไทย

สาขาวิชา เทคนิคการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในโรงพยาบาลที่สำคัญ และมีอุบัติการณ์การดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมที่สูงขึ้น ส่งผลต่อการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมที่แยกผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2553 ถึงเดือนธันวาคม 2554 โดยตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ คาร์บาพีเนมเมสด้วยวิธี disk diffusion และตรวจหายีน Oxacillinase (OXA) และ Metallo-β-lactamases (MBLs) ด้วยวิธี Multiplex PCR พบเป็นเชื้อที่ให้ผลไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมจำนวน 89 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 73.55 และพบยีน OXA จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ และยีน MBLs จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ bla_{VIM}, $bla_{\text{SPM-1}}$, bla_{IMP} และ $bla_{\text{SIM-1}}$ โดยยีน OXA ที่พบมากที่สุดคือ ยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ โดยพบในเชื้อทุกโซเลท คิดเป็นร้อยละ 100 รองลงมาคือ $bla_{\text{OXA-23-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ คิดเป็นร้อยละ 19.10 (17/89) และ 7.87 (7/89) ตามลำดับ ส่วนยีน MBLs ที่พบมากที่สุด คือ bla_{VIM} คิดเป็นร้อยละ 12.36 (11/89) รองลงมาคือ $bla_{\text{SPM-1}}$, bla_{IMP} และ $bla_{\text{SIM-1}}$ คิดเป็นร้อยละ 5.62 (5/89), 1.12 (1/89) และ 1.12 (1/89) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่มียีนมากกว่าหนึ่งชนิดจำนวน 38 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 42.70 จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงความชุกและการแพร่กระจายของยีน OXA และยีน MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* ของโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาต่อไป

คำสำคัญ : ยีน Metallo-β-lactamases, ยีน Oxacillinase, เอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส, *Acinetobacter baumannii*

Project Title	Investigation of the prevalence of Metallo-β-lactamase and Oxacillinase genes among meropenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* by Multiplex PCR	
By	Chanikarn	Aiemkrang
	Natwadee	Gamyingsakun
	Valasinee	Sangthai
Program Title	Medical Technology	
Advisor	Sirilak	Teeraputon

Abstract

Acinetobacter baumannii is an important nosocomial pathogen which highly incidence of carbapenem resistance. It affects the choice of medication in the treatment of infectious diseases. The objective of this study was to determine the prevalence of carbapenemase genes in meropenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* isolated from patients at Srisangworn Sukhothai Hospital during November 2010 to December 2011. All isolates were screened for carbapenemase production by disk diffusion. Then the Oxacillinase (OXA) and Metallo-β-lactamases (MBLs) genes were detected using multiplex PCR. The result showed that 89 isolates were non-susceptible to meropenem (73.55%). Three OXA genes; $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$ and $bla_{\text{OXA-58-like}}$, and four MBLs genes; bla_{VIM}, $bla_{\text{SPM-1}}$, bla_{IMP} and $bla_{\text{SIM-1}}$ were identified. The $bla_{\text{OXA-51-like}}$ gene was the most common OXA genes that found in every isolate (100%), followed by $bla_{\text{OXA-23-like}}$ (19.10%; 17/89) and $bla_{\text{OXA-58-like}}$ (7.87%; 7/89), respectively. In addition, 38 isolates of more than one gene were found (42.70 %). The results inform the prevalence and distribution of OXA and MBLs genes in *A. baumannii* of this hospital as a guideline for further surveillance and prevention of drug-resistant strains.

Keywords : Carbapenemase, Metallo-β-lactamases gene, Oxacillinase gene, *Acinetobacter baumannii*

สารบัญ

บทที่	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
จุลชีววิทยา และการก่อโรคของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*	3
ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค	5
กลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*	5
การตรวจหาการดื้อยาคาร์บาพีเนมทางห้องปฏิบัติการ	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	27
ข้อเสนอแนะ	28
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	34
ประวัติผู้วิจัย	48

สารบัญตาราง

		หน้า
ตาราง 1	การจำแนกชนิดของเชื้อ *A. baumannii* ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี	4
ตาราง 2	การจำแนกชนิดของเชื้อ *A. baumannii* ตามคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม	4
ตาราง 3	เอนไซม์ β-lactamase จำแนกตามโครงสร้างโมเลกุล	9
ตาราง 4	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase ในเชื้อ *A. baumannii*	21
ตาราง 5	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs ในเชื้อ *A. baumannii*	22
ตาราง 6	ผลการทดสอบความไวต่อยาเมอโรพีเนมของเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท	24
ตาราง 7	แสดงผลตรวจยีน Carbapenemase ในเชื้อ *A. baummannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนม จำนวน 89 ไอโซเลท	26
ตาราง 8	แสดงผลการตรวจหายีน Carbapenemase ในเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท	35
ตาราง 9	ส่วนประกอบของ PCR master mix สำหรับตรวจหายีน MBLs	43
ตาราง 10	ส่วนประกอบของ PCR master mix สำหรับตรวจหายีน OXA	44

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพ 1	แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส โดยวิธี Modified-Hodgetest (MHT)	11
ภาพ 2	แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส โดยวิธี Combined disc test	12
ภาพ 3	แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส โดยวิธี Double disc synergy test	13
ภาพ 4	แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส โดยวิธี Carbapenem inactivation method (CIM)	14
ภาพ 5	แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส โดยวิธี Carba NP test	15

สัญลักษณ์และคำย่อ

bp	Base pair
CIM	Carbapenem inactivation method
°C	Degree of Celsius
ddATP	dideoxyadenosine 5′-triphosphate
ddCTP	dideoxycytidine 5′-triphosphate
ddGTP	dideoxyguanosine 5′-triphosphate
ddTTP	dideoxythymidine 5′-triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
eCIM	EDTA-modified carbapenem inactivation method
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic
Fe^{3+}	Ferric iron
ISCR	Insertion sequence common region
LDA	Lysine deaminase
LDC	Lysine decarboxylase
MBLs	Metallo-ß-lactamase
mCIM	Modified carbapenem inactivation method
$MgCl_2$	Magnesium chloride
µg	Microgram
MHA	Mueller Hinton agar
MHT	Modified-Hodge test
MIL	Mile-indole-lysine medium
µl	Microliter
ml	Milliliter
µm	Micrometer
mm	Millimeter
Multiplex PCR	Multiplex polymerase chain reaction

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

nm	Nanometer
No	Non-fermenter
NSS	Normal saline solution
OXA	Oxacillinase
O/F	Oxidative-fermentative
O	Oxidizer
PBP	Penicillin binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Power of hydrogen ion concentration
TSB	Tryptic soy broth
TSI	Triple sugar iron
V	Variable
+	Positive
-	Negative

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

จุลชีววิทยา และการก่อโรคของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* จัดอยู่ในตระกูล *Moraxellaceae* จีนัส *Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสั้น-กลม (coccobacilli) ขนาดประมาณ 0.7 X 1 µm ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ไม่เคลื่อนที่ และที่อุณหภูมิ 37 °C เชื้อ *A. baumannii* จะสร้างโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวอมเทา ผิวเรียบ และมีลักษณะเป็นเมือก (mucoid) บนอาหารแข็ง เช่น sheep blood agar และ tryptic soy agar ทั้งนี้ในปีพ.ศ. 2562 เชื้อในจีนัส *Acinetobacter* สามารถจำแนกได้ 59 สปีชีส์ เช่น *Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter johnsonii* และ *Acinetobacter lwoffii* เป็นต้น โดยเชื้อ *A. baumannii* ถูกพบว่าเป็นสปีชีส์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์มากที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่มักทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อของบาดแผล เยื่อบุช่องท้องอักเสบ ลิ้นหัวใจอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ข้ออักเสบ การติดเชื้อของกระดูกและกล้ามเนื้อ และการติดเชื้อในกระแสโลหิต (6) โดยสามารถจำแนกชนิดของเชื้อ *A. baumannii* ได้ดังตาราง 1 และสามารถแยกเชื้อ *A. baumannii* ออกจากสปีชีส์อื่นในจีนัส *Acinetobacter* ได้จากคุณสมบัติทางชีวเคมีได้ดังตาราง 2

ตาราง 1 การจำแนกชนิดของเชื้อ *A. baumannii* ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี (7), (8), (9)

Biochemical test	*A. baumannii*
Oxidase test	-
TSI	K/K
Motile	-
Lysine deaminase	-
Lysine decarboxylase	+
Indole	-
Citrate	+
Urease	-
Malonate	+
10% glucose	+
10% lactose	+
O/F	Oxidizer
Nitrate reductase	-

หมายเหตุ : + = Positive, - = Negative

ตาราง 2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *A. baumannii* ตามคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม (10)

Acinetobacter spp.	Motility	Oxidase	Growth at 37°C	Growth at 44°C	Hemolysis	Gelatin test	O/F	AD	Malonate
A. baumannii	-	-	+	+	-	-	o	+	+
A. calcoaceticus	-	-	+	-	-	-	o	+	+
A. lwoffii	-	-	+	-	-	-	No	-	-
A. johnsonii	-	-	-	-	-	-	No	v	v

หมายเหตุ : + = Positive, - = Negative และ v = Variable, o = oxidizer, No = Nonfermenter

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค

ความรุนแรงของโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *A. baumannii* ขึ้นอยู่กับตัวของผู้ติดเชื้อและตัวเชื้อก่อโรค โดยปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคในเชื้อ *A. baumannii* ที่สำคัญ ได้แก่

1. Outer membrane vesicles (OMVs) โดยภายในถุง OMVs จะบรรจุ OmpA ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น protease และ hemolysin เป็นตัวชักนำให้เซลล์แตก และทำให้เซลล์ตายในที่สุด และยังพบว่า OmpA มีบทบาทในการเกาะติดและบุกรุกทำลายเซลล์เยื่อบุผิว นำไปสู่การแพร่กระจายของเชื้อ *A. baumannii* ในระหว่างที่มีการติดเชื้อและสามารถยับยั้ง alternative complement pathways ทำให้ระบบ complement ไม่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้

2. Lipopolysaccharide (LPS) เชื้อ *A. baumannii* สามารถสร้าง LPS บนผิวเซลล์ของเชื้อได้ ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โฮสต์ได้

3. Capsular polysaccharide มีบทบาทสำคัญในการป้องกันแบคทีเรียจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โฮสต์

4. Bacterial phospholipase เป็น lipolytic enzyme ซึ่งสามารถกระตุ้นให้มีการตัด phospholipids ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์โฮสต์ เป็นผลให้เชื้อสามารถรุกรานและแพร่กระจายไปยังเซลล์แบคทีเรียข้างเคียงได้ (6)

5. Acinetobactin เป็นสารที่เชื้อในจีนัส *Acinetobacter* สร้างขึ้น มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยน Fe^{3+} ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ โดยเชื้อสามารถดึงเอาเหล็กมาใช้ในเซลล์ผ่านระบบ acinetobatin-mediated system ซึ่ง acinetobactin จัดเป็น siderophore นอกจากนั้นยังทำให้บริเวณที่เชื้อเจริญเกิด cell damage และตายจากกลไก apoptosis ส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญได้ในร่างกาย (11)

กลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*

ในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะยากลุ่มคาร์บาพีเนม โดยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่มนี้เรียกว่า carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) เนื่องจากคาร์บาพีเนมเป็นยากลุ่ม β-lactam ที่ถูกใช้รักษาเชื้อ *A. baumannii* ในอดีต ทำให้พบการดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งนอกจากจะทำลายยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมแล้วยังสามารถทำลายยาในกลุ่ม β-lactam อื่น ๆ ได้ด้วย โดยมีกลไกการดื้อยาอยู่ 4 กลไก ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเพียงกลไกเดียวหรือหลายกลไกพร้อม ๆ กันก็ได้ ดังนี้

1. การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (Drug inactivation or modification)

การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* มีการสร้างเอนไซม์มาทำลายยาในกลุ่ม β-lactam ได้แก่ AmpC β-lactamase, OXA-type carbapenemase และ MBLs ซึ่งไปทำลายส่วนโครงสร้างตรงวงแหวน β-lactam ring ทำให้ยาออกฤทธิ์ไม่ได้ โดยมียีนที่เกี่ยวข้อง คือ ยีน bla_{OXA} ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสชนิด OXA-type เป็นเอนไซม์ β-lactamase ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม D ตามโครงสร้างโมเลกุล หรือ 2d ตามชนิดของ substrate ของเอนไซม์ และยีน bla_{MBL} ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBL ซึ่งเป็นเอนไซม์ β-lactamase ที่จัดอยู่ในกลุ่ม B ตามโครงสร้างโมเลกุล หรือกลุ่ม 3 ตามชนิดของ substrate ของเอนไซม์ โดยเอนไซม์นี้ต้องการสังกะสี (Zn) เป็น co-factor ในการทำปฏิกิริยาทำลายยา

เอนไซม์ในกลุ่ม β-lactamase

เอนไซม์ β-lactamase สามารถแบ่งได้หลายกลุ่ม โดยจัดกลุ่มตามโครงสร้างโมเลกุล (Molecular classification) ได้ 4 กลุ่ม (class) ได้แก่ class A, B, C และ D ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 2 กลุ่ม คือ Serine β-lactamase และ Metallo-β-lactamase (MBLs) โดย Serine β-lactamase เป็นเอนไซม์ β-lactamase ที่มีตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยา (active site) อยู่บริเวณกรดอะมิโน serine ส่วน MBLs จะเกิดปฏิกิริยาเมื่อมีโมเลกุลของโลหะไอออน คือ Zn^+ เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา จึงจะสามารถออกฤทธิ์ทำลายยาได้ โดยเอนไซม์ Serine β-lactamase ประกอบด้วย 3 class ได้แก่ class A, class C และ class D ส่วน MBLs ได้แก่ class B

Class A β-lactamase เป็นเอนไซม์ที่ทำลายยาในกลุ่ม penicillin และ cephalosporin ได้มากกว่าการทำลายยากลุ่มคาร์บาพีเนม นอกจากนี้ยังสามารถทำลายยาในกลุ่ม monobactam ได้ ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกยับยั้งด้วยกรด clavulanic acid ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ TEM, SHV, GES, CTX-M, SCO, PER, VEB, KPC, และ CRAB เป็นต้น โดยเอนไซม์กลุ่มนี้ที่สามารถพบได้ใน *A. baumannii* ได้แก่ PER-1, CTX-M, SHV และ GES

Class B β-lactamase หรือ MBLs เป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยโมเลกุลของโลหะไอออน คือ Zn^+ มาร่วมในปฏิกิริยา จึงจะสามารถทำงานได้ และสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA เชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่งผลให้ดื้อยาในกลุ่ม penicillin, cephalosporin และคาร์บาพีเนม เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ IMP, NDM, VIM และ GIM เป็นต้น ในปัจจุบันเอนไซม์ในวงศ์ MBLs ที่พบใน *Acinetobacter* spp. สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มย่อย (subgroup) ดังนี้

1. เอนไซม์ในวงศ์ IMP มี 18 ชนิด ตั้งแต่ IMP-1 ถึง IMP-18 โดยเอนไซม์ IMP-1 ถูกค้นพบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นในปีพ.ศ. 2540 ในเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งต่อมามีการแพร่กระจายไปอย่างกว้างขวางในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นและกลุ่มเอเชียแปซิฟิค

2. เอนไซม์ในวงศ์ VIM มี 12 ชนิด ตั้งแต่ VIM-1 ถึง VIM11a และ VIM11b โดยเอนไซม์ VIM-1 ถูกพบครั้งแรกที่เมืองวีโรนา ประเทศอิตาลีในปีพ.ศ. 2540 ในเชื้อ *P. aeruginosa* และต่อมาก็พบในเชื้อ *A. xylosoxidans* ในโรงพยาบาลเดียวกัน และพบใน *P. putida* ในประเทศอิตาลี และยังพบในเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pnueumoniae*) ในประเทศกรีซ ในปัจจุบันพบเอนไซม์ในวงศ์ VIM หลากหลายชนิดมากขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก

3. เอนไซม์ในวงศ์ SPM ขณะนี้มีเพียง 1 ชนิด คือ SPM-1 ถูกพบครั้งแรกในเมืองเซาเปาโล ประเทศบราซิลในปีพ.ศ. 2540 ในเชื้อ *P. aeruginosa*

4. เอนไซม์ในวงศ์ GIM ขณะนี้มีเพียง 1 ชนิด คือ GIM-1 พบครั้งแรกที่ประเทศเยอรมนี ในปีพ.ศ. 2545 ในเชื้อ *P. aeruginosa*

5. เอนไซม์วงศ์อื่น ๆ ที่มีรายงานแต่พบได้ไม่บ่อย ได้แก่ เอนไซม์ SIM ที่ประเทศเกาหลีใต้ ในเชื้อ *A. baumannii* เอนไซม์ AIM ที่ประเทศออสเตรเลียในเชื้อ *P. aeruginosa* และพบที่ประเทศญี่ปุ่นในเชื้อ *C. freundii* และเอนไซม์ NDM (New Dehil metallo-β-lactamase) ที่ประเทศอินเดียในเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งในปัจจุบันมี 6 ชนิด คือ NDM-1 ถึง NDM-6 (12)

Class C β-lactamase ได้แก่ AmpC หรือ cephalosporinase เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม cephalosporin ได้ดี เนื่องจากมีความจำเพาะต่อยากลุ่มนี้ พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้อยู่บนโครโมโซม แต่ในปัจจุบันพบว่ามียีนที่สร้างเอนไซม์นี้อยู่บนพลาสมิดด้วย โดยในสภาวะปกติยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC มีการแสดงออกในระดับต่ำ (repression) แต่เชื้อจะสร้างเอนไซม์นี้ก็ต่อเมื่อเจริญในสภาวะที่มียา ampicillin, imipenem รวมถึง clavulanic acid ยีนจึงมีการแสดงออกในภาวะกระตุ้น (inducible expression) ทำให้มีสร้างเอนไซม์ออกมาในปริมาณมากกว่าปกติและดื้อต่อยาในกลุ่ม cephalosporin เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ MOX, CIT, ACC, ADC, EBC, FOX และ DHA โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่สามารถพบได้ใน *A. baumannii* ได้แก่ ADC

Class D β-lactamase หรือ Oxacillinase ได้แก่ เอนไซม์ในวงศ์ OXA ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถทำลายยา oxacillin ได้ และทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วย NaCl โดยพบยีนที่สร้างเอนไซม์มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมและหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ ได้แก่ class 1 integron บนพลาสมิด เอนไซม์ในวงศ์ OXA มีโครงสร้างของโมเลกุลค่อนข้างหลากหลาย ซึ่งเอนไซม์ OXA-51 สามารถพบได้ใน *A. baumannii* ทุกตัวที่ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนม เนื่องจากเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมของเชื้อนี้ (intrinsic resistance gene) ในปัจจุบันเอนไซม์ในวงศ์ OXA ที่พบใน *Acinetobacter* spp. สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มย่อย (subgroup) ดังนี้

1. OXA-23 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด ได้แก่ OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, 0XA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165-OXA-171, OXA-225, OXA-239 พบได้ใน *A. baumannii*, *A. junii*, *A. radioresistens* และ *A. pittii*

2. OXA-24/40 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด ได้แก่ OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207 พบได้ใน *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. pittii*, *A. baylyi* และ *A. calcoaceticus*

3. OXA-48 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด ได้แก่ OXA-48, OXA-48b, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247 พบได้ใน *A. baumannii* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ

4. OXA-51 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม และเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายมากที่สุด ได้แก่ OXA-51, OXA-64-71, OXA-75-80, OXA-82-84, OXA-86-95, OXA-98-100, OXA-104, OXA-106-113, OXA-115-117, OXA-120-128, OXA-130-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148-150, OXA-172-180, OXA-194-197, OXA-200-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248-250, OXA-25 พบได้ใน *A. baumannii*

5. OXA-58 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด ได้แก่ OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164, พบได้ใน *A. baumannii*, *A. pittii*. *A. nosocomialis*, *A. phenon* 6/ct 131U, *A. junii*, *Acinetobacter* genomic species 9, *A. bereziniae*, *A. calcoaceticus* และ *A. radioresistens* (13)

ตาราง 3 เอนไซม์ β-lactamase จำแนกตามโครงสร้างโมเลกุล (6)

Resistant mechanism	Active site	Ambler class	Example
β – lactamase	Serine	A	ESBLs of the families TEM, SHV, CTX-M, PER and VEB SCO-1 (narrow spectrum) Carbapenem-hydrolyzing ESBL of GES-type (GES-11) KPC-2, KPC-3, KPC-5
	MBLs	B	NDM VIM GIM SIM IMP
	Serine	C	AmpC-69, AmpC-70, AmpC-71 and ADC-196
	Serine	D	OXA-23-like OXA-24/40-like OXA-51-like OXA-58-like OXA-143-like OXA-235-like

2. การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา (drug target alteration)

การดื้อยาในกลุ่ม β-lactams ด้วยกลไกนี้เชื้อจะเปลี่ยนเป้าหมายของยา คือ penicillin binding protein (PBP) ซึ่งมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ การสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่ยาจับไม่ได้ หรือไปลดการสร้าง PBP ชนิดที่ยาจับได้ ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา (14)

3. การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ (reduction of drug permeability)

เอนไซม์ β-lactamase ไม่สามารถซึมผ่านเซลล์แบคทีเรียได้โดยตรง ต้องมีการควบคุมการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เชื้อที่ดื้อยาจะไปลดปริมาณการสร้างโปรตีน porin ส่งผลให้ยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้น้อยลง ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา

4. การขับยาออกนอกเซลล์ (drug efflux)

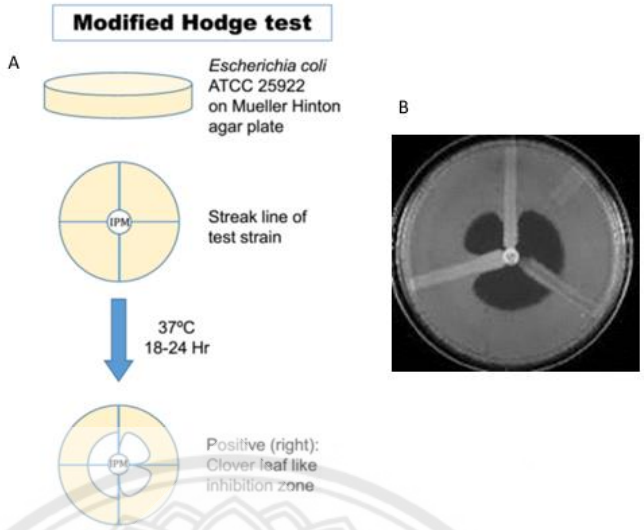
การขับยาออกนอกเซลล์แบคทีเรีย เกิดจากการทำงานของ efflux pump ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ยาที่ผ่านเข้ามาในเซลล์แบคทีเรียสามารถไปออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเป้าหมายได้ ส่งผลให้เชื้อมีการดื้อยาเกิดขึ้น (12)

กลไกที่สำคัญที่ทำให้เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนมที่พบได้บ่อยที่สุด ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ carbapenem hydrolyzing β-lactamase ประกอบไปด้วยเอนไซม์ Oxacillinase และเอนไซม์ MBLs โดยเชื้อเหล่านี้สามารถถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการดื้อยาไปยังแบคทีเรียตัวอื่น ๆ ผ่านทางโครโมโซมหรือพลาสมิด ทำให้ยีนดื้อยาแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียตัวอื่นได้ และยังมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อดื้อยาที่มากขึ้น ทำให้มีการเลือกใช้ยาที่เหมาะสมได้อย่างยากลำบาก ต้องใช้ยาที่มีราคาแพงและมีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อการรักษาในปัจจุบันและอนาคตทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก (12), (14)

การตรวจหาการดื้อยาคาร์บาพีเนมทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจทางฟีโนไทป์

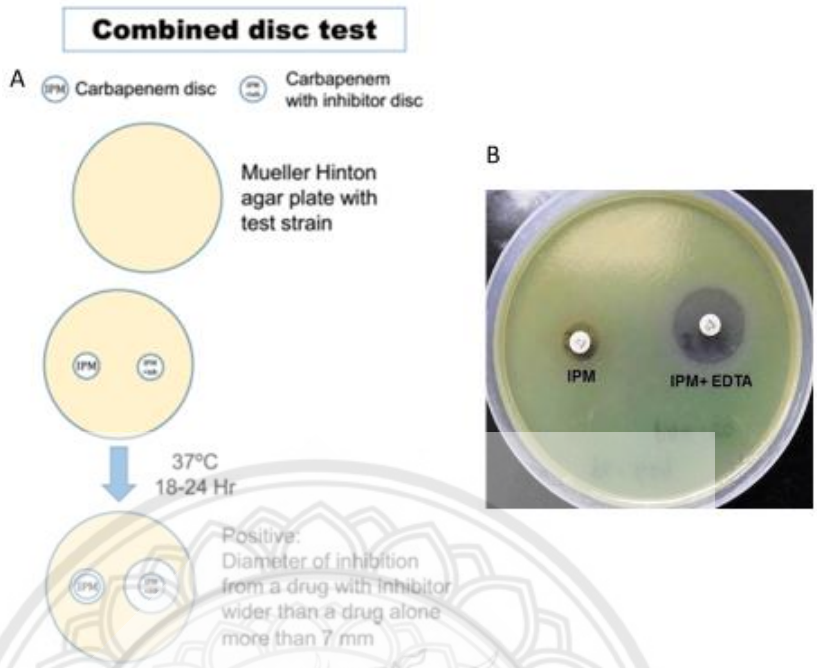
1.1. วิธี Modified-Hodge test (MHT) ทดสอบโดยเตรียมเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ปรับให้มีความขุ่น 0.5 McFarland standard แล้วนำไปป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) จากนั้นวางแผ่นยา ertapenem 10 µg หรือ meropenem 10 µg ที่กลาง plate แล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายเป็นเส้นตรงลากจากแผ่นยาทดสอบมาจนสุดขอบ plate แล้วนำไปบ่มที่ 35±2 °C เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง หากมีการเหนี่ยวนำการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ที่ตำแหน่งที่ตัดกับเชื้อที่ต้องการทดสอบ แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส (15)



ภาพ 1 แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส
โดยวิธี Modified-Hodgetest (MHT)

หมายเหตุ : (A) ขั้นตอนการทำของวิธี MHT (16), (B) ผลของวิธี MHT (17)

1.2. **วิธี Combined disc test** ทดสอบโดยนำเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA จากนั้นนำแผ่นยาคาร์บาพีเนม และแผ่นยาคาร์บาพีเนมที่มีสารยับยั้งเอนไซม์ เช่น Ethylene Diamine Tetra Acetic (EDTA) ผสมอยู่มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C นาน 18 - 24 ชั่วโมง หากเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของแผ่นยาคาร์บาพีเนมที่มีสารยับยั้งเอนไซม์และเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของแผ่นยาคาร์บาพีเนมมีค่าต่างกันมากกว่า 7 mm จะอ่านผลว่าบวก แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส แต่ทั้งนี้เกณฑ์ในการแปลผลอาจแตกต่างกันไปตามประเภทของสารยับยั้งและเอนไซม์ วิธี Combined disc test จะมีความจำเพาะสูงกับเชื้อ *Pseudomonas* spp. แต่ในเชื้อ *A. baumannii* ยังพบผลที่ผิดพลาด และยังไม่สามารถตรวจพบในเชื้อที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสชนิด class D เนื่องจาก class D ไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid, tazobactam, boronic acid และ EDTA (16)

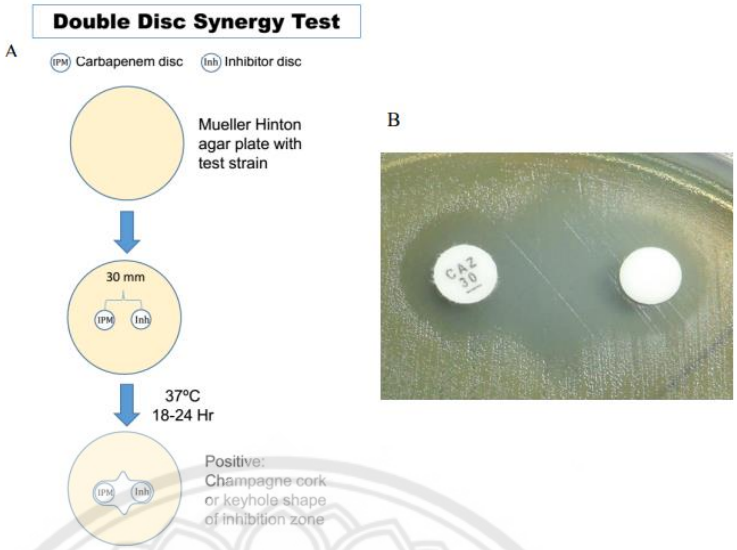


ภาพ 2 แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมลโดยวิธี Combined disc test

หมายเหตุ : (A) ขั้นตอนการทำของวิธี Combined disc test (16)

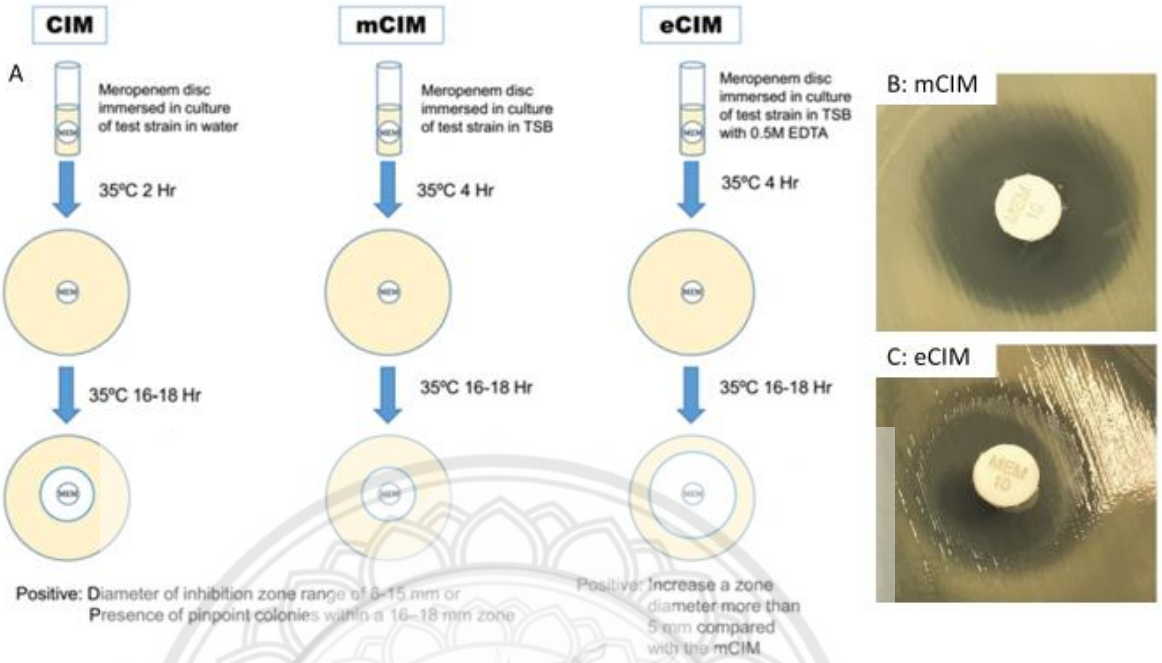
(B) ผลของวิธี Combined disc test (18)

1.3. วิธี Double disc synergy test วิธีนี้ได้รับการพัฒนาโดย Jarlier และคณะ ซึ่งคล้ายกับวิธี Combined disc test แต่จะวางแผ่นยาและแผ่นยาที่มีสารยับยั้งให้ห่างกัน 30 mm จากจุดศูนย์กลางของแผ่นยา และในการอ่านผลจะอ่านผลบวกเมื่อ inhibition zone ของแผ่นยาด้านที่ติดกับ inhibition zone ของแผ่นยาที่มีสารยับยั้งเกิด inhibition zone เพิ่มมากขึ้นจะเห็นเป็นลักษณะคล้ายจุกแชมเปญหรือรูกุญแจ (16)



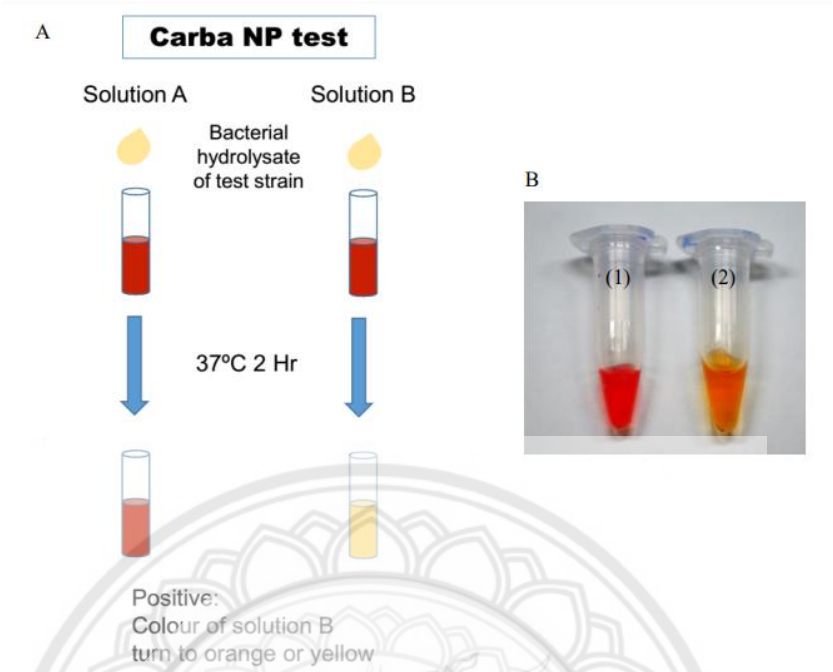
ภาพ 3 แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส
โดยวิธี Double disc synergy test
หมายเหตุ : (A) ขั้นตอนการทำของวิธี Double disc synergy test
(B) ผลของวิธี Double disc synergy test (16)

1.4. วิธี Carbapenem inactivation method (CIM) ถูกพัฒนาโดย van der Zwaluw และคณะในปีพ.ศ. 2558 โดยนำเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อแล้วใส่แผ่นยาเมอโรพีเนม นำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นยาเมอโรพีเนมที่บ่มร่วมกับเชื้อ ไปวางบนจานเพาะเชื้อที่ป้ายเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยาเมอโรพีเนม และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง หากเชื้อที่นำมาทดสอบมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสไปยับยั้งยาเมอโรพีเนม ทำให้เชื้อ *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดในการตรวจหาเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสที่มี activities ต่ำ เช่น OXA-type และ MBLs ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธี modified carbapenem inactivation method (mCIM) ขึ้นมาเพื่อเพิ่มความไวในการทดสอบ และยังมีการดัดแปลงวิธี mCIM เป็นวิธี EDTA-modified carbapenem inactivation method (eCIM) โดยการใส่ EDTA เพื่อตรวจหาการสร้างเอนไซม์ MBLs อย่างไรก็ตาม CLSI ยังไม่แนะนำให้ใช้วิธี mCIM และวิธี eCIM ในการตรวจการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสสำหรับเชื้อ *A. baumannii* (16)



ภาพ 4 แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส
โดยวิธี Carbapenem inactivation method (CIM)
หมายเหตุ : (A) ขั้นตอนการทำของวิธี CIM mCIM และ eCIM (16)
(B) ผลของวิธี mCIM
(C) ผลของวิธี eCIM (19)

1.5. วิธี Carba NP test วิธีนี้ได้รับการพัฒนาโดย Nordmann และ Poirel (NP) ในปีพ.ศ. 2555 โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ indicator เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH เนื่องจากยาคาร์บาพีเนมถูก hydrolyses ส่งผลให้ค่า pH ลดลงทำให้ indicator เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ในการทดสอบมีหลอดทดลอง 2 หลอด หลอดแรกใส่สาร A ซึ่งประกอบด้วย phenol red zinc sulphate และน้ำที่ pH 7.8 ± 0.1 และหลอดที่ 2 ใส่สาร B ซึ่งประกอบด้วยสาร A และยาอิมิพีเนม (6 mg) ที่ละลายแล้ว จากนั้นจะใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบที่ถูก hydrolyses ด้วย Tris-HCl lysis buffer (B-PERII) ลงไปทั้ง 2 หลอดบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หากสีของหลอดที่ 2 เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดในการตรวจเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสชนิด OXA-type ซึ่งพบมากในเชื้อ *A. baumannii* ดังนั้น CLSI จึงไม่แนะนำให้ใช้วิธีนี้ในการตรวจหา *Acinetobacter* spp. ที่ผลิตเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสตั้งแต่ปีพ.ศ. 2561 (16)



ภาพ 5 แสดงผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสโดยวิธี Carba NP test

หมายเหตุ : (A) ขั้นตอนการทำของวิธี Carba NP test, (B) ผลของวิธี Carba NP test (16)

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี MHT, วิธี Combined disc test, วิธี Double disc synergy test, วิธี CIM, วิธี mCIM, วิธี eCIM และวิธี Carba NP โดยในปีพ.ศ. 2555 CLSI M100-s22 (17) ได้กำหนดให้วิธี MHT เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจคัดกรองและยืนยันการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสทางฟีโนไทป์ในเชื้อตระกูล *Enterobacteriaceae* แต่ในปีพ.ศ. 2561 CLSI M100-s28 (20) ได้ตัดวิธี MHT ออกเนื่องจากมีวิธีที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า ได้แก่ วิธี mCIM, วิธี eCIM และวิธี carba NP แต่ทั้ง 3 วิธี ทาง CLSI ไม่แนะนำให้ตรวจในเชื้อ *A. baumanii* เนื่องจากมีความไวต่ำทำให้ได้ผลที่ไม่สมบูรณ์ ในปัจจุบันจึงได้การนำเอาวิธี carba NP มาพัฒนาเป็นวิธี carbaAcineto NP เพื่อใช้ในการตรวจการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสในเชื้อ *A. baumanii* อย่างไรก็ตาม CLSI ยังไม่แนะนำให้ใช้วิธีนี้ในการตรวจการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสชนิด OXA (21)

2. การตรวจทางจีโนไทป์

การศึกษาชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase และ Metallo-β-lactamases ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ดังนี้

2.1. Polymerase chain reaction (PCR)

เทคนิค PCR อาศัยหลักการในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 1 สายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ถึง 2 สาย โดยอาศัย oligonucleotide primer 1 คู่ โดยแต่ละเส้นจะจับกับดีเอ็นเอคู่ตรงข้ามกัน เพราะว่ามีลำดับเบสคู่สมในการสร้างสายดีเอ็นเอ และจะมีทิศทางจาก 5’ ไป 3’ ผลที่ได้ คือ ดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ และสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ด้วยเครื่อง Thermocycler ซึ่งปฏิกิริยา PCR จะประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน ได้แก่ Denature Annealing และ Extension หมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน จากนั้นทำการตรวจหาผลผลิตของดีเอ็นเอโดยนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น และนำแผ่นวุ้นมาย้อมด้วย ethidium bromide ทำให้สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet ; UV) (22)

2.2. Real-time polymerase chain reaction

2.2.1. DNA binding fluorescent assay

การตรวจวัดปริมาณสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่โดยใช้สาร fluorescent ตัวอย่างสีที่ใช้ ได้แก่ SYBR-Green I ซึ่งสามารถจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ ในขั้นตอน denature สี SYBR Green I จะยังไม่สามารถเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ และเมื่อถึงขั้นตอน annealing และ extension สี SYBR Green I จะแทรกตัวเข้าไปจับกับสายคู่ของดีเอ็นเอ และเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตร เมื่อรอบของปฏิกิริยา PCR กลับมาถึงช่วงขั้นตอน denature อีกครั้ง SYBR Green I จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลง จึงสามารถบอกได้ว่าสัญญาณของสาร fluorescent จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้น

2.2.2. TaqMan probe-based assay

ใช้หลักการในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยในหลอดปฏิกิริยาที่มี DNA polymerase และสารที่จำเป็นในการเพิ่มปริมาณ PCR ในบัฟเฟอร์จะมีคู่ primer ที่จำเพาะสำหรับดีเอ็นเอเป้าหมาย และมี probe ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น (10 - 20 bp) ที่มีสารเรืองแสง (Reporter) ติดไว้ที่ปลาย 5’ แต่จะถูกบังไว้ด้วยสารบังแสง (Quencher) ที่ติดไว้ที่ปลาย 3’การเพิ่มจำนวนจะเริ่มจากขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 °C เพื่อแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันให้เป็นสายเดี่ยว (ขั้นตอน denature) จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 – 60 °C ซึ่ง probe และ primers จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ

เป้าหมาย (ขั้นตอน annealing) จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase จะสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจาก primer ไปชนกับ probe ที่จับกับ target บนเส้นดีเอ็นเอเดียวกัน (ขั้นตอน extension) แล้วย่อย probe ทำให้ reporter หลุดออกมาและอยู่ห่างจาก quencher เครื่องจึงเห็นสัญญาณแสงจาก reporter และบันทึกปริมาณแสงที่เกิดขึ้นไว้ทุก ๆ รอบ จนครบรอบการทำปฏิกิริยา โดยปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา (23)

3. Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR)

เทคนิค Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค PCR พื้นฐาน โดยที่สามารถเพิ่มหลาย ๆ target DNA ด้วย primer หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยที่ต้องมีการออกแบบ primer ในแต่ละคู่ให้มีความจำเพาะ ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เป็นคู่สมกัน และให้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถแยก PCR product ได้ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis (24)

4. DNA sequencing

Sequencing เป็นวิธีวิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับเบสบนจีโนม เพื่อใช้แยกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ทำการยับยั้งการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเบสต่าง ๆ ด้วย dideoxy nucleotide triphosphates (ddNTPs) ได้แก่ ddATP, ddCTP, ddGTP และ ddTTP และทำการติดฉลาก primer ด้วยสาร fluorescent เพื่อความสะดวกในการอ่านผล และนำสายดีเอ็นไปแยกขนาดในสนามไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง automated DNA sequence (25)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

คณะผู้วิจัยได้นำข้อมูลจากงานวิจัยของคุณวราภรณ์ แดงอาจ ที่มีการเก็บตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย จังหวัดสุโขทัย ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 ซึ่งผ่านการจำแนกชนิดของเชื้อ *A. baumannii* complex โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาเมอโรพีเนมด้วยวิธี disk diffusion จากนั้นได้ทำการตรวจสอบหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase และ Metallo-β-lactamases ด้วยวิธี Multiplex PCR

ข้อมูลของแบคทีเรียในการวิจัย

เชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย จังหวัดสุโขทัย ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C ใน nutrient broth ที่ผสมกลีเซอรอล (26) และคัดกรองเชื้อ *A. baumannii* complex ที่ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนมโดยการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disk diffusion

การพิสูจน์ชนิดเชื้อ *A. baumannii* complex

เชื้อทั้งหมดได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ โดยนำเชื้อไปบ่มข้ามคืน จากนั้นจึงนำมา subculture ลงบน blood agar chocolate agar และ MacConkey agar จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ได้แก่ Oxidase test, Triple Sugar Iron test (TSI), Mile-indole-Lysine medium (MIL), Citrate test, Urea test, Malonate test, Oxidative-fermentative (O/F) และการเจริญเติบโตที่ 44 °C โดยให้ผลการทดสอบดังตาราง 1 และ 2 หลังจากที่ทำการทดสอบทางชีวเคมีแล้วให้ผลทดสอบว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* complex

การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสด้วยวิธี disk diffusion

การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสโดยการทดสอบความไวต่อยาเมอโรพีเนม 10 µg ด้วยวิธี disk diffusion เตรียม inoculum โดยเขี่ยเชื้อ 2 - 3 โคโลนีใส่ใน 0.85% Normal Saline Solution (NSS) เขย่าให้เข้ากัน ปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland standard ใช้ sterile swab จุ่มลงใน inoculum นำไปป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA วาง plate ทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อให้เชื้อซึมลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำแผ่นยาเมอโรพีเนม 10 µg วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ 35±2 ºC เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัด inhibition zone โดยใช้เกณฑ์การทดสอบและอ่านผลการทดสอบตามตามมาตรฐาน CLSI M100-s31 (19)

การตรวจหายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase และ Metallo-β-lactamases ด้วย Multiplex PCR

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ โดยนำเชื้อ *A. baumannii* complex จากการบ่มเพาะข้ามคืนใน Tryptic soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 35 ºC ปริมาตร 1.5 ml ใส่ใน micro tube นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วน supernatant แล้วนำตะกอนที่ได้ไปผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 500 µl จากนั้นไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วทำการเก็บส่วน supernatant ไว้ที่ – 20 ºC ไว้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) (25)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำ DNA template ที่มีความบริสุทธิ์แล้วมาทำการตรวจหายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase และ MBLs แล้วทำการเพิ่มจำนวนยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase ได้แก่ $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs ได้แก่ bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{GIM}, bla_{SIM} และ bla_{SPM} โดยใช้ไพร์เมอร์ดังที่แสดงในตาราง 4 และตาราง 5 ด้วยเครื่อง Thermocycler ซึ่ง PCR master mix แต่ละหลอดมีปริมาตรรวม 20 µL ประกอบด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 7 µL 10x PCR buffer 2 µL, dNTP ความเข้มข้น 2.5 µM 2 µL, Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 0.5 U 1 µL, $MgCl_2$ 25 µM 1 µL, forward primer ความเข้มข้น 10 µM 0.5 µL, reverse primer ความเข้มข้น 10 µM 0.5 µL และ DNA template 2 µL เมื่อทำ PCR เสร็จแล้ว นำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจหาดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน agarose gel ที่ความเข้มข้น 2% ใน 0.5X TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และใช้ 100 base pairs DNA ladder เป็น DNA marker และนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml

นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) เปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของเชื้อควบคุม (25)

สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase

- Initial activation 94 °c เวลา 5 นาที
- Denature 94 °c เวลา 30 วินาที
- Annealing 52 °c เวลา 40 วินาที } 40 รอบ
- Elongation 72 °c เวลา 50 วินาที
- Final elongation 72 °c เวลา 7 นาที

สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs

- Initial activation 94 °c เวลา 5 นาที
- Denature 94 °c เวลา 25 วินาที
- Annealing 53 °c เวลา 40 วินาที } 30 รอบ
- Elongation 72 °c เวลา 50 วินาที
- Final elongation 72 °c เวลา 7 นาที

การตรวจวัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอ

การตรวจวัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ด้วยเครื่อง Nanodrop โดยอาศัยหลักการที่กรดนิวคลิอิกสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ทำให้นำมาใช้วิเคราะห์หาได้ทั้งปริมาณและความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลิอิกได้ ซึ่งดีเอ็นเอเป็นสารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ จึงมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทำให้สามารถคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอในสารละลายได้ และการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้โดยการหาอัตราส่วนของค่า A260/A280 ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.8 – 2.0 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ แต่ถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ (27)

ตาราง 4 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase ในเชื้อ *A. baumannii* (22)

Primer	Sequence	Product size (bp)
bla_{OXA-23}-F	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA- 3’	501
bla_{OXA-23}-R	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT- 3’	
bla_{OXA-24}-F	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	246
bla_{OXA-24}-R	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3	
bla_{OXA-51}-F	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG- 3’	353
bla_{OXA-51}-R	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG- 3’	
bla_{OXA-58}-F	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3	599
bla_{OXA-58}-R	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3	

ตาราง 5 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* (22)

Primer	Sequence	Product size (bp)
bla_{IMP} -F	5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C- 3'	188
bla_{IMP} -R	5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATC T- 3'	
bla_{VIM}-F	5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A- 3'	390
bla_{VIM}-R	5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG- 3'	
bla_{GIM}-F	5'-TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA- 3'	477
bla_{GIM}-R	5'-AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC- 3'	
bla_{SIM}-F	5'-TAC AAG GGA TTC GGC ATC G- 3'	570
bla_{SIM}-R	5'-TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG- 3'	
bla_{SPM}-F	5'-AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG- 3'	271
bla_{SPM}-R	5'-ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG- 3'	

หมายเหตุ : Y = C หรือ T, S = G หรือ T

เชื้อแบคทีเรียควบคุม (Control)

1. เชื้อแบคทีเรียควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase

เชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวก : *A. baumannii* ATCC BAA-2896 ที่สร้างเอนไซม์ OXA-23 และ OXA-58

A. baumannii ATCC BAA-2882 ที่สร้างเอนไซม์ OXA-24

A. baumannii ATCC BAA-2893 ที่สร้างเอนไซม์ OXA-51

เชื้อแบคทีเรียควบคุมผลลบ : *P. aeruginosa* ATCC 27853

E. coli ATCC 25922

2. เชื้อแบคทีเรียควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs

เชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวก : *P. aeruginosa* ATCC BAA-3103 ที่สร้างเอนไซม์ VIM-2

P. aeruginosa ATCC BAA-3093 ที่สร้างเอนไซม์ IMP-7

P. aeruginosa ที่สร้างเอนไซม์ GIM SIM และ SPM (Lab strain)

เชื้อแบคทีเรียควบคุมผลลบ : *P. aeruginosa* ATCC 27853

E. coli ATCC 25922

สถิติที่ใช้การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการวิจัยของคุณวราภรณ์ แดงอาจ มาคำนวณหาความชุกของยีน Oxacillinase และ Metallo-β-lactamases ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงธันวาคม พ.ศ. 2554 โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2019 เพื่อหาค่าร้อยละของยีน Oxacillinase และ MBLs

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยของคุณวรภรณ์ แดงอาจได้ถูกนำมาวิเคราะห์ ดังนี้

เชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท

เชื้อที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ Oxidase test, Triple Sugar Iron test (TSI), Mile-indole-Lysine medium (MIL), Citrate test, Urea test, Malonate test, Oxidative-fermentative (O/F) และการเจริญเติบโตที่ 44 °C ร่วมกับการตรวจพบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase ชนิด $bla_{\text{OXA-51-like}}$ (Insintric resistance gene) จำแนกเป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 121 ไอโซเลท และเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 9 ไอโซเลท

ผลการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสด้วยวิธี disk diffusion

เชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท ที่ผ่านการทดสอบความไวต่อยาเมอโรพีเนม 10 µg ด้วยวิธี disk diffusion ตามมาตรฐาน CLSI M100-s31 ให้ผลเชื้อที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนม จำนวน 94 ไอโซเลท พบเป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 89 ไอโซเลทและเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 5 ไอโซเลท และเชื้อที่ไวต่อยาเมอโรพีเนม จำนวน 36 ไอโซเลท พบเป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 32 ไอโซเลทและเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 4 ไอโซเลท ดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลการทดสอบความไวต่อยาเมอโรพีเนมของเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท

A. baummannii			*A. baummannii* complex		
Non-susceptible	Susceptible	Total	Non-susceptible	Susceptible	Total
89 (73.55%)	32 (26.45%)	121	5 (55.56%)	4 (44.44%)	9

ผลการตรวจหายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase และ Metallo-β-lactamases ด้วยวิธี Multiplex PCR

เชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 130 ไอโซเลท ถูกนำมาตรวจหายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ และเอนไซม์ MBLs จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{GIM}, $bla_{\text{SIM-1}}$ และ $bla_{\text{SPM-1}}$ ด้วยวิธี Multiplex PCR

ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนม จำนวน 89 ไอโซเลท พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ โดยพบยีนชนิด $bla_{\text{OXA-51-like}}$ มากที่สุด จำนวน 89 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 100 (89/89) รองลงมาคือยีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ จำนวน 17 ไอโซเลท และยีน $bla_{\text{OXA-58-like}}$ จำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 19.10 (17/89) และ 7.87 (7/89) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{SIM} และ $bla_{\text{SPM-1}}$ ซึ่งยีนที่พบมากที่สุดคือ bla_{VIM} จำนวน 11 ไอโซเลท รองลงมาคือ $bla_{\text{SPM-1}}$ จำนวน 5 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 12.36 (11/89) และ 5.62 (5/89) ตามลำดับ โดยพบเชื้อที่มียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase มากกว่า 2 ชนิด จำนวน 24 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 26.97 (24/89) ได้แก่ ยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ร่วมกับ $bla_{\text{OXA-23-like}}$ จำนวน 17 ไอโซเลท, ยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ร่วมกับ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ จำนวน 7 ไอโซเลท และพบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase ร่วมกับยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs จำนวน 17 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 19.10 (17/89) โดยพบยีนชนิด $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ร่วมกับ bla_{VIM} มากที่สุด จำนวน 8 ไอโซเลท รองลงมาคือยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ร่วมกับ $bla_{\text{SPM-1}}$ จำนวน 5 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบยีน carbapenemase ตั้งแต่ 2 ชนิด จำนวน 38 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 42.70 (38/89) ดังตาราง 7

ตาราง 7 แสดงผลตรวจยีน Carbapenemase ในเชื้อ

***A. baummannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนม จำนวน 89 ไอโซเลท**

Carbapenemase genes	Total (%)
Oxacillinase	72 (80.90%)
OXA-23-like	0
OXA-24-like	0
OXA-51-like	51(57.30%)
OXA-58-like	0
OXA-51-like, OXA-23-like	15 (16.85%)
OXA-51-like, OXA-58-like	6 (6.74%)
Oxacillinase with Metallo-β-Lactamase	17 (19.10%)
OXA-51-like, VIM	8 (8.99%)
OXA-51-like, IMP	1 (1.12%)
OXA-51-like, SPM-1	5 (5.62%)
OXA-51-like, OXA-58-like, VIM	1 (1.12%)
OXA-51-like, OXA-23-like, VIM	1 (1.12%)
OXA-51-like, OXA-23-like, VIM, SIM-1	1 (1.12%)
Total	89 (100%)

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก โดยกลไกที่สำคัญ คือ การสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส ทำให้เชื้อมีการดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม โดยในปีพ.ศ. 2563 อัตราการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมของเชื้อ *Acinetobacter* spp. พบว่ามีการดื้อต่อยาอิมิพีเนมมากที่สุด รองลงมาคือเมอโรพีเนม (28, 29) โดยจากการศึกษาของ Turton พบว่าในเชื้อ *Acinetobacte baumannii* ที่ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนมทุกตัวมียีน $bla_{\text{OXA-51}}$ อยู่ เนื่องจากเป็นยีนดื้อยาที่พบในเชื้อนี้ (intrinsic resistance gene) ดังนั้น จึงสามารถใช้ยีน $bla_{\text{OXA-51}}$ ในการจำแนกเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนมออกจากเชื้อ *A. baumannii* complex ได้ (30) ซึ่งในการศึกษานี้พบยีน carbapenemase ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนม โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ oxacillinase ที่พบมากที่สุดคือยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ซึ่งพบในทุกไอโซเลท รองลงมาคือยีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ และยีน $bla_{\text{OXA-58-like}}$ ตามลำดับ และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs ที่พบมากที่สุดคือยีน bla_{VIM} รองลงมาคือยีน $bla_{\text{SPM-1}}$ และยีน bla_{IMP} ตามลำดับ สรุปได้ว่า ยีนที่เป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสในการศึกษาครั้งนี้ คือยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$, bla_{VIM}, $bla_{\text{SPM-1}}$ และ bla_{IMP}

จากการศึกษาครั้งนี้ให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาย้อนหลังในประเทศไทยของพิราภรณ์ จันทนาวิวัฒน์ และคณะที่ทำการศึกษาในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ในปีพ.ศ. 2559 (26) และการศึกษาของจิรารัตน์ สองสี และคณะที่ทำการศึกษาในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราชในปีพ.ศ. 2560 (31) และการศึกษาของสมบัติ ลีลาสุภา และคณะที่ศึกษาในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลพญาไท 2 ในปีพ.ศ. 2562 (32) ซึ่งพบยีน oxacillinase ชนิด $bla_{\text{OXA-23}}$ มากกว่า $bla_{\text{OXA-58-like}}$ แต่ให้ผลที่แตกต่างกับการศึกษาของพิราภรณ์ จันทนาวิวัฒน์ที่ไม่พบยีน MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* ในช่วงที่ทำการศึกษา ซึ่งในการศึกษานี้นอกจากจะพบยีน Oxacillinase แล้วยังพบยีน MBLs ด้วย และในการศึกษานี้ยังให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาในแถบทวีปเอเชีย โดยจากการศึกษาของ Qutaiba Ababneh และคณะในประเทศจอร์แดน ในปีพ.ศ. 2564 ที่พบยีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ มากที่สุด (33) แต่ในการศึกษานี้ให้ผลที่แตกต่างกับการศึกษาของ Dewi Anggraini และคณะในประเทศอินโดนีเซีย ในปีพ.ศ. 2565 ที่พบยีน $bla_{\text{OXA-24-like}}$ มากกว่ายีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ (34) และให้ผลที่

สอดคล้องกับการศึกษาในแถบแอฟริกา โดยจากการศึกษาของ Noel – David และคณะในประเทศแอฟริกาใต้ ในปี พ.ศ. 2564 (3) แต่ในการศึกษานี้ให้ผลที่แตกต่างกับการศึกษาของ Rehab M. Abd El-bak และคณะในประเทศอียิปต์ ในปีพ.ศ. 2563 ที่พบยีน bla_{GIM} (35) เนื่องจากในการศึกษานี้ไม่พบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Oxacillinase และ MBLs ชนิด $bla_{OXA-24-like}$ และ bla_{GIM} โดยความชุกที่แตกต่างกันของยีนแต่ละพื้นที่นั้นอาจขึ้นอยู่กับลักษณะพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ สังคมวัฒนธรรมที่แตกต่างกัน รวมถึงการเดินทางระหว่างประเทศที่มีอุบัติการณ์ของยีนนั้น ๆ โดยการแพร่กระจายของยีนนั้นสามารถแพร่กระจายระหว่างโรงพยาบาล ชุมชน และสิ่งแวดล้อม และในการศึกษานี้ยังพบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสในเชื้อ *A. baumannii* และ *A. baumannii* complex เนื่องจากในการคัดกรองหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส โดยวิธี disk diffusion โดยใช้ยาเมอโรพีเนมเพียงชนิดเดียว ซึ่งเชื้อที่ไวต่อยาเมอโรพีเนมอาจมีการดื้อต่อยาชนิดอื่นในกลุ่มคาร์บาพีเนมได้ เช่น ยาโดริพีเนม ยาอิมิพีเนม เป็นต้น นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์พีเนมเมสในเชื้อ *A. baumannii* ที่มีความไวมากขึ้น คือ วิธี CarbaAcenito NP (21)

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความชุกของยีน $bla_{OXA-51-like}$, $bla_{OXA-58-like}$, $bla_{OXA-23-like}$, bla_{VIM}, bla_{SPM-1}, bla_{IMP} และ bla_{SIM-1} ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมของโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย ทำให้ทราบถึงข้อมูลทางระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ยาปฏิชีวนะ การเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนม รวมถึงเป็นแนวทางในการกำหนดมาตรการและการแก้ไขปัญหาการดื้อยาคาร์บาพีเนมของเชื้อ *A. baumannii* ในระดับโรงพยาบาลต่อไป รวมถึงเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น ๆ ที่นำมารักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CRAB โดยเฉพาะเชื้อ *A. baumannii* เนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการปรับตัวให้ดื้อต่อยาและแพร่กระจายยีนดื้อยาได้สูง

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสโดยวิธี disk diffusion ควรใช้ยามากกว่า 1 ชนิด เช่น ยาเมอโรพีเนม, ยาโดริเพเนม และยาอิมมิพีเนม เป็นต้น หรือตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสด้วยวิธีอื่น เช่น วิธี Combined disc test วิธี CarbaAcineto NP test เป็นต้น
2. ควรเพิ่มการตรวจหายีน MBLs ชนิด bla_{NDM} เนื่องจากในปัจจุบันพบการระบาดของยีน bla_{NDM} เพิ่มขึ้นในเชื้อ *A. baumannii* ที่มีการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมเมส

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสด้วยวิธี Multiplex PCR ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนม ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย จังหวัดสุโขทัย จำนวน 89 ไอโซเลท ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 ยีน Oxacillinase ที่พบมากที่สุด คือ ยีน $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ รองลงมาคือยีน $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ และยีน $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$ คิดเป็นร้อยละ 100, 19.10 และ 7.87 ตามลำดับ และยีน MBLs ที่พบมากที่สุด คือ ยีน bla_{VIM} รองลงมาคือยีน $bla_{SPM\text{-}1}$,ยีน bla_{IMP} และยีน $bla_{SIM\text{-}1}$ คิดเป็นร้อยละ 12.36, 5.62, 1.12 และ 1.12 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบยีน carbapenemase ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปในเชื้อเหล่านี้ จำนวน 38 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 42.70

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความชุกและการแพร่กระจายของยีน Oxacillinase และยีน MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไม่ไวต่อยาเมอโรพีเนมของโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาต่อไป