



การวิเคราะห์จีโนมและการแสดงออกยีนของ *Acinetobacter baumannii* ระหว่างการติด
เชื้อแบคทีเรียโอเฟจเพื่อการนำเปปไทด์จากแบคทีเรียโอเฟจไปประยุกต์ใช้



สุพัฒน์ คงพัก

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การวิเคราะห์จีโนมและการแสดงออกยีนของ *Acinetobacter baumannii* ระหว่างการติด
เชื้อแบคทีเรียโอเฟจเพื่อการนำเปปไทด์จากแบคทีเรียโอเฟจไปประยุกต์ใช้



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การวิเคราะห์จีโนมและการแสดงออกยีนของ *Acinetobacter baumannii*
ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอฟีลเพื่อการนำไปใช้จากแบคทีเรียโอฟีลไปประยุกต์ใช้"

ของ สุพัฒน์ คงฟัก

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเวช อรรถวิวัฒนวงศ์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญญา ทศนภักดิ์)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.อัญชลี ฐานวิสัย)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ชันฉะเลิศ)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การวิเคราะห์จีโนมและการแสดงออกยีนของ <i>Acinetobacter baumannii</i> ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจเพื่อการนำเปปไทด์จากแบคทีเรียโอเฟจไปประยุกต์ใช้
ผู้วิจัย	สุพัฒน์ คงพัก
ประธานที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิริศักดิ์
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญญนิภา ทัศนภักดิ์ ดร.อัญชลี สุวานวิสัย
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2564
คำสำคัญ	อะซิเนโตแบคเตอร์ เบามานีไอ การหาลำดับเบสทั้งหมดภายในจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ เปปไทด์ต้านจุลชีพ

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และมีความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด แบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 มีความจำเพาะต่อ Extensively drug-resistant *A. baumannii* (XDR-AB) 329 ที่ดื้อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิด การศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ในการศึกษาจีโนมทั้งหมดของ XDR-*A. baumannii* 329 โดยใช้เทคโนโลยี Next generation sequencing (NGS) และศึกษาการแสดงออกยีนระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจ โดยเทคนิค quantitative PCR (qPCR) รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์จากเอนไซม์เอนโดไลซินของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ในการยับยั้ง *A. baumannii* 329 ผลการศึกษาพบว่า *A. baumannii* 329 มีขนาดจีโนม 3.94 Mbp มีความใกล้เคียงกันกับเชื้อ *A. baumannii* NIPH17_0019 และ *A. baumannii* XH856 และพบการมีอยู่ของยีนดื้อยาและยีนก่อโรคจำนวนมาก เมื่อศึกษาการแสดงออกยีนพบว่า *A. baumannii* 329 มีการแสดงออกยีนมากที่สุดในช่วง 30 นาทีแรกของการติดเชื้อ ในขณะที่แบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 มีการแสดงออกยีนมากที่สุดในช่วง 10 นาที โดยมียีน *gp114* และ *gp062* แสดงออกมากที่สุด สำหรับการศึกษาระสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านจุลชีพพบว่า เปปไทด์ vPhT02(7) มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *A. baumannii* 329 ได้ดีที่สุดและเมื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กับยา colistin พบว่า เสริมฤทธิ์กัน โดยมีค่าดัชนีวัดการเสริมฤทธิ์เท่ากับ 0.02 จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงข้อมูลเชิงลึก

ของเชื้อ *A. baumannii* 329 ที่มีความสามารถในการดื้อยาเกือบทุกชนิด และประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นทางเลือกหรือสารต้านจุลชีพตัวใหม่ในการควบคุม XDR-*A. baumannii* ต่อไป



Title	GENOMIC AND GENE EXPRESSION ANALYSIS OF <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> DURING PHAGE INFECTION: PHAGE-DERIVED PEPTIDES APPLICATION APPROACH
Author	SUPAT KHONGFAK
Advisor	Associate Professor Sutthirat Sitthisak, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Kannipa Tasanapak, Ph.D. Aunchalee Thanwisai, Ph.D.
Academic Paper	M.Sc. Thesis in Microbiology, Naresuan University, 2021
Keywords	<i>Acinetobacter baumannii</i> Next generation sequencing Bacteriophage Antimicrobial peptide

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative bacterium, which is a major cause of nosocomial infection and resistant to various antibiotics. vPhT2 is a bacterial virus that specific to extensively drug resistant *A. baumannii* (XDR-AB) 329. This study aim to investigate the whole genome of XDR-*A. baumannii* 329 using Next generation sequencing (NGS) technology, explore gene expression during phage infection by quantitative PCR(qPCR), and determine antimicrobial peptide activity derived from endolysin enzyme of vPhT2 to constrain *A. baumannii* 329. The results showed that the genome size of *A. baumannii* 329 was 3.94 Mbp and closely related to *A. baumannii* NIPH17_0019 and *A. baumannii* XH856. The presence of many drug resistance and virulence genes were found in the genome. The gene expression analysis of *A. baumannii* 329 were highly expressed at 30 minutes after infection with phage. Phage genes showed greatly expression at 10 minutes, with *gp114* and *gp062* genes. The antimicrobial activity results revealed that peptide vPhT02(7) has ability to inhibit *A. baumannii* 329. Moreover, synergistic effects of colistin were found with an impact on potency of the combination. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was 0.02.

This work provides insight into genome analysis XDR-*A. baumannii* 329 and efficacy of antimicrobial peptides to be used for developing of novel AMPs in the future.



ประกาศคุณูปการ

การศึกษาในครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความสำเร็จและความช่วยเหลือของ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะ ข้อบกพร่องต่าง ๆ และเสียสละเวลามาดูแลให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนจนถึง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญา ทักษณภักดิ์ และ ดร.อัญชลี สุวานวิสัย ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในระหว่างการพบเจอปัญหาต่าง ๆ ระหว่างการศึกษา และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเวช อรรถวิวัฒน์วงศ์ จากมหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ชันธเลิศ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.ระพี ธรรมมีภักดิ์ Assoc. Prof. Dr. Jason Sahl มหาวิทยาลัยนอร์เทิร์นเอริโซนา สหรัฐอเมริกา และนายวัชพันธ์ จันทาภากุล นักศึกษาปริญญาโท วิทยาการคอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยมิสซูรี สหรัฐอเมริกา ที่คอยให้คำแนะนำวิธีการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านชีวสารสนเทศ รวมถึงการติดตั้งโปรแกรมทางด้านชีวสารสนเทศ ทำให้ข้าพเจ้ามีความรู้ ความเข้าใจในการใช้เป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุก ๆ ท่าน รวมถึงพี่ ๆ นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาที่คอยสั่งสอน สนับสนุนให้การศึกษาค้นคว้าดำเนินไปได้อย่างดี ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และสมาชิก S.S. LAB ที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษาในระหว่างการการศึกษา

สุดท้ายข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดา มารดา รวมถึงโอกาสต่าง ๆ ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้เข้ามาศึกษาในระดับปริญญาโท จนทำให้ข้าพเจ้ามีโอกาสให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จ คุณค่าและคุณประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบเป็นกตัญญูตเวทีแด่ บิดา มารดา ครู อาจารย์ทุกท่าน ที่มีส่วนปลูกฝังความรู้ให้ข้าพเจ้า ตลอดจนคนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

สุพัฒน์ คงพัก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
บทที่ 2.....	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ทบทวนเอกสาร.....	4
2.1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	4
2.1.2 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค.....	6
2.1.3 ระบาดวิทยา.....	9
2.1.4 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ.....	9

2.1.5 การวินิจฉัย.....	10
2.1.6 เทคโนโลยี NGS ของ <i>A. baumannii</i>	11
2.1.7 แบคทีเรียโอเฟจ	14
2.1.8 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจ	19
บทที่ 3.....	22
วิธีดำเนินการวิจัย	22
3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจและสถานะการเจริญที่ใช้ในการศึกษา สายพันธุ์	22
3.2 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของ <i>A. baumannii</i> 329	22
3.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2	24
3.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค quantitative PCR.....	24
3.5 การศึกษาฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้ง <i>A. baumannii</i> 329	28
บทที่ 4.....	31
ผลการทดลอง	31
4.1 ผลการทดลอง	31
4.1.1 ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปภายในจีโนมและหน้าที่ของยีนแต่ละกลุ่มของเชื้อ <i>A.</i> <i>baumannii</i> 329	31
4.1.2 การวิเคราะห์ Pangenome ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329 และสายพันธุ์ ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการ	32
4.1.3 การตรวจหายีนดีเอ็นเอและยีนก่อโรคของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329 และสาย พันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการ.....	33
4.1.4 การตรวจหา Genomic Islands ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329	37

4.1.5 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 โดยวิธี One-step growth curved.....	38
4.1.6 การแสดงออกยีนของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329 และแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจ.....	38
4.1.7 ลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ.....	40
4.1.8 การหาปริมาณความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของเปปไทด์และยาปฏิชีวนะที่ สามารถยับยั้งเชื้อได้.....	41
4.1.9 การทดสอบ Checkerboard assay.....	41
บทที่ 5.....	44
อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย.....	44
5.1 อภิปรายผล.....	44
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	48
บรรณานุกรม.....	50
ภาคผนวก.....	64
ประวัติผู้วิจัย.....	82

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ข้อมูลการศึกษาจีโนมของ <i>A. baumannii</i> ในฐานข้อมูล NCBI.....	13
ตาราง 2 การศึกษาเอนไซม์เอนโดไลซินที่จำเพาะต่อ <i>A. baumannii</i>	16
ตาราง 3 เอนไซม์เอนโดไลซินที่ใช้ทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ	18
ตาราง 4 ไพรมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกยีนของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2...27	27
ตาราง 5 ไพรมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกยีนของ <i>A. baumannii</i> 329.....	27
ตาราง 6 ลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 และ vPhT02(7).....	40
ตาราง 7 ค่า MIC ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 vPhT02(7) ยาปฏิชีวนะ และEDTA ในการยับยั้งเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329.....	42

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 แสดงปัจจัยการก่อโรคของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	8
ภาพ 2 การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอเฟลจแบบ Lytic cycle และ Lysogenic cycle	15
ภาพ 3 โครงสร้างของเอนไซม์เอนโดไลซิน	17
ภาพ 4 การวิเคราะห์ COGs functional classes	31
ภาพ 5 แผนภาพวิวัฒนาการของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329.....	32
ภาพ 6 การแสดงชุดของยีนทั้งหมดภายในจีโนมของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329	33
ภาพ 7 การตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329	35
ภาพ 8 การตรวจหายีนก่อโรคของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329	36
ภาพ 9 การตรวจหา GIs ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329	37
ภาพ 10 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียโอเฟลจ vPhT2	39
ภาพ 11 การแสดงออกยีนของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329 ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟลจ vPhT2.....	39
ภาพ 12 การแสดงออกยีนของแบคทีเรียโอเฟลจ vPhT2 ระหว่างการติดเชื้อ <i>A. baumannii</i> 329.....	40
ภาพ 13 โครงสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 (A) และโครงสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7)(B).....	41
ภาพ 14 การทดสอบการมีปฏิริยาของเปปไทด์ต้านจุลชีพร่วมกับยาปฏิชีวนะ และ EDTA.....	43
ภาพ 15 การทดสอบ Checkerboard assay.....	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา สถานการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (Multidrug resistant *A. baumannii* ; MDR-AB) และดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิด (extensively drug-resistant *A. baumannii* ; XDR-AB) การติดเชื้อ *A. baumannii* ได้กลายเป็นปัญหาที่สำคัญไปทั่วโลก เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล สำหรับประเทศไทยมีระบบการติดตามและเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา ซึ่งดำเนินการโดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance, Thailand: NARST) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ทำงานร่วมกับโรงพยาบาลในเครือข่ายในการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์การดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ พบว่าในช่วงปี พ.ศ. 2543-2562 *A. baumannii* มีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะสูงที่สุด ตามด้วย *Pseudomonas aeruginosa* *Enterobacter cloacae* และ *Klebsiella pneumoniae* ตามลำดับ (NARST, 2021) ทำให้มีการศึกษา *A. baumannii* เป็นจำนวนมาก ร่วมกับการใช้เทคโนโลยีในปัจจุบันที่มีความทันสมัยมากยิ่งขึ้นคือ การหาลำดับเบสทั้งหมดภายในจีโนม โดยใช้เทคโนโลยี Next generation sequencing (NGS) ทำให้ทราบข้อมูลเชิงลึกภายในจีโนม เช่น ยีนก่อโรค ยีนดื้อยา การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ รวมถึงการเปรียบเทียบจีโนมกับเชื้อที่มีอยู่ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ทั้งหมดนี้เพื่อศึกษาข้อมูล และกลไกของเชื้อ *A. baumannii* เพื่อที่จะนำไปสู่ทางออกสำหรับการแก้ปัญหาหรือควบคุมเชื้อ *A. baumannii*

แบคทีเรียโอเฟลจเป็นไวรัสของแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียโดยใช้แบคทีเรียเป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวน และมีกลไกในการทำลายแบคทีเรีย ทำให้เซลล์ตายและปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกมา (Gorski et al., 2009) ในปี พ.ศ. 2562 ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียโอเฟลจ Abp1 กับเชื้อ XDR-AB พบ ยีน *gp34* มีความสัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับ host ribosomal protein จำนวนมากของเชื้อ *A. baumannii* (Yang, Yin, et al., 2019) คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้แบคทีเรียโอเฟลจถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ (Hanlon, 2007)

ต่อมาได้มีการใช้แบคทีเรียโอเฟจในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* หลังจากได้รับการผ่าตัด เมื่อทำการเก็บตัวอย่างมาทำการเลี้ยงบนอาหารพบว่าเชื้อมีจำนวนลดลงจนหมดในวันที่ 19 หลังจากทำการรักษาโดยใช้แบคทีเรียโอเฟจ (LaVergne et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีการสร้างโปรตีนลูกลูกผสมเอนโดไลซิน (endolysin) จากแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อ *A. baumannii* พบว่า โปรตีนลูกลูกผสมดังกล่าวสามารถทำลายเชื้อได้ (Lai et al., 2011; Thummeepak et al., 2016) ต่อมา มีการสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides ; AMPs) จากลำดับกรดอะมิโนของยีนที่กำกับการสร้างเอนไซม์เอนโดไลซินและทำการเติมกรดอะมิโนที่มีประจุบวกไปที่ด้านปลาย C-terminus ของ AMPs พบว่า AMPs ที่ถูกเติมกรดอะมิโนมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ได้มากกว่า AMPs ที่ไม่ได้ทำการเติมกรดอะมิโน (Peng et al., 2017)

ในประเทศไทย มีการรายงานการแยกแบคทีเรียโอเฟจจากบ่อน้ำบาดาลเสียในโรงพยาบาลที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* พบว่าแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 มีคุณสมบัติจำเพาะต่อ *A. baumannii* และมีความเป็นพิษต่อเซลล์กระเพาะปัสสาวะและเซลล์สมองของมนุษย์น้อย อีกทั้งยังช่วยเสริมฤทธิ์ในการทำงานร่วมกับยา colistin ช่วยลดระดับ MIC ของยาในการทำลายเชื้อ มีการวิเคราะห์จีโนมของ vPhT2 โดยใช้เทคโนโลยี NGS พบว่าแบคทีเรียโอเฟจมียีนที่กำกับการสร้างเอนไซม์หลายชนิดเช่น ไลโซไซม์ที่ส่วนหาง (tail-lysozyme) และเอนโดไลซิน โดยเอนไซม์เหล่านี้มีคุณสมบัติในการย่อย peptidoglycan ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Styles et al., 2020) แต่อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียโอเฟจกับเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจัง เพื่อที่จะเข้าใจข้อมูลในเชิงลึกเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียโอเฟจกับโฮสต์ ที่จะนำไปสู่การพัฒนาสร้างสารตัวใหม่ที่ยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาจีโนมทั้งหมดของ *A. baumannii* 329 และการแสดงออกยีนของ *A. baumannii* 329 และแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ระหว่างการติดเชื้อรวมถึงศึกษาประสิทธิภาพของ AMPs ที่ได้จากแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329 เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการยับยั้ง *A. baumannii* ต่อไป

1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดภายในร่างจีโนมของ *A. baumannii* 329 ที่เป็นโฮสต์ของ vPhT2 จำนวน 1 สายพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยี NGS โดยใช้ Illumina platform
2. ศึกษาการแสดงออกของยีนของแบคทีเรีย *A. baumannii* 329 และแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ระหว่างที่แบคทีเรียติดเชื้อด้วยแบคทีเรียโอเฟจโดยใช้เทคนิค qPCR

3. ออกแบบและศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์สังเคราะห์จากเอนไซม์ของแบคทีเรีย
โอเฟจ vPhT2 ในการทำลายแบคทีเรีย *A. baumannii*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดภายในร่างจีโนมของ *A. baumannii* 329
2. ทราบถึงระดับการแสดงออกยีนของแบคทีเรียโอเฟจระหว่างติดเชื้อแบคทีเรีย
3. ทราบถึงประสิทธิภาพของเปปไทด์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *A. baumannii* 329
4. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ศึกษากลไกการทำงานของแบคทีเรียโอเฟจระหว่างติดเชื้อ
A. baumannii และสามารถนำเปปไทด์ไปประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกในการควบคุม *A. baumannii*

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดภายในร่างจีโนมของเชื้อ *A. baumannii* 329 โดยใช้เทคโนโลยี NGS ผ่าน Illumina platform จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกยีนของ *A. baumannii* 329 และแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ระหว่างการติดเชื้อโดยใช้เทคนิค qPCR ก่อนทำการสังเคราะห์เปปไทด์ vPhT2 และ vPhT2(7) ที่ได้จากแบคทีเรียโอเฟจนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้ง *A. baumannii* 329

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทบทวนเอกสาร

2.1.1 *Acinetobacter baumannii*

2.1.1.1 จุลชีววิทยา

เชื้อ *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างกลมท่อน (cocci) ให้ผลการทดสอบบวกกับการทดสอบ catalase และผลลบกับการทดสอบ oxidase ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) และไม่มีการหมักน้ำตาล (non-ferment) และมีปริมาณของ Guanine และ Cytosine (G+C content) ประมาณร้อยละ 39 ถึง ร้อยละ 47 มีการเจริญเมื่อทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ขนาดโคโลนีประมาณ 1.5 - 3 มิลลิเมตร (Peleg et al., 2008)

2.1.1.2. การก่อโรค

A. baumannii มีความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และทนต่อยาปฏิชีวนะหลายขนานทำให้สามารถอยู่รอดและแพร่กระจายได้ เป็นเหตุให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีอาการวิกฤต ซึ่งมีส่วนในการทำให้ผู้ป่วยมีอาการแย่ลง นำไปสู่การเสียชีวิต (Antunes et al., 2014) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุว่า ปัจจัยส่งเสริมการได้รับเชื้อ *A. baumannii* เกี่ยวข้องกับการรักษาในห้อง ICU เป็นเวลานาน การใส่เครื่องช่วยหายใจ รวมถึงการล้างไต และการให้สารอาหารทางหลอดเลือด นอกจากนี้ *A. baumannii* สามารถติดเชื้อได้กับเด็กแรกเกิดที่มีน้ำหนักแรกเกิดน้อย หรือคลอดก่อนกำหนด (Baran et al., 2008; Djordjevic et al., 2016; Fukuta et al., 2013; Lee et al., 2018) สำหรับช่องทางการติดเชื้อ *A. baumannii* มีการสำรวจเป็นระยะเวลา 7 ปีในของการติดเชื้อ Multidrug resistant (MDR) *A. baumannii* ในศูนย์การรักษาระดับตติยภูมิในเลบานอน พบว่าแหล่งติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในตัวอย่างที่แยกได้คือ ทางเดินหายใจ (ร้อยละ 53.1) ตามด้วย แผลผ่าตัด (ร้อยละ 18.8) เลือด (ร้อยละ 15.6) ปัสสาวะ (ร้อยละ 10.2) และอื่น ๆ (ร้อยละ 2.3) (Kanafani et al., 2018)

2.1.1.3 การติดเชื้อของทางเดินหายใจ (Respiratory Infections)

มักเกี่ยวข้องกับโรคปอดอักเสบที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ Ventilator-associated pneumonia (VAP) เกิดขึ้นจากการติดเชื้อ multidrug resistant *A. baumannii* ที่เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต (Jaruratanasirikul et al., 2019) ซึ่งการติดเชื้อ *A. baumannii* จากการใช้เครื่องช่วยหายใจคิดเป็นร้อยละ 8 ถึงร้อยละ 14 ในสหรัฐอเมริกาและยุโรป (Lynch III et al., 2017)

2.1.1.4 การติดเชื้อในกระแสเลือด (Bloodstream infection)

มีการรายงานว่าสาเหตุการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในกระแสเลือดจาก *A. baumannii* มีอัตราการเสียชีวิตมากถึงร้อยละ 40 อันเนื่องมาจากการให้สารอาหารทางหลอดเลือดและการใช้เครื่องช่วยหายใจ (Wisplinghoff et al., 2012) และพบอัตราการเสียชีวิตสูงขึ้นไปมากถึงร้อยละ 68 ในผู้ป่วยมะเร็งที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ในประเทศบราซิล (Freire et al., 2016) มากไปกว่านั้น เชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อพบว่ามีการดื้อต่อยา colistin ถึงร้อยละ 42 (Papathanakos et al., 2020)

2.1.1.5 การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน (Skin and Soft Tissue Infections)

เชื้อ *A. baumannii* ถูกแยกออกจากผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ตัวอย่างเช่น แผลไฟไหม้ หรือการบาดเจ็บ เช่น ทหารที่ได้รับบาดเจ็บระหว่างปฏิบัติการทางทหาร หรือผู้ที่ประสบภัยพิบัติทางธรรมชาติ (Bouzari et al., 2005) ต่อมาในศูนย์การแพทย์ทหารในประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถแยกเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4 เป็นร้อยละ 55 ในระยะเวลา 8 ปี โดยตัวอย่างที่แยกได้ เป็นตัวอย่างจากแผลคิดเป็นร้อยละ 24 ของตัวอย่าง *A. baumannii* ทั้งหมด ยิ่งไปกว่านั้นประมาณของ MDR *A. baumannii* ที่แยกได้กลับสูงขึ้นในหมู่ผู้เสียชีวิตจากการรบในต่างประเทศร้อยละ 52 สูงกว่าในหมู่ผู้ป่วยท้องถิ่นร้อยละ 20 (Keen III et al., 2010) ยิ่งไปกว่านั้น หลังเกิดแผ่นดินไหวที่เมืองเหวินฉวน ประเทศจีน พบว่าประมาณร้อยละ 14 ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อที่แผลเกิดจากการติดเชื้อ *A. baumannii* (Zhang et al., 2013)

2.1.1.6 การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (Urinary Tract Infections)

สำหรับการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *A. baumannii* ส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อจากทางเดินหายใจ และการติดเชื้อทางกระแสเลือด แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าสามารถแยก *A. baumannii* ได้จากบริเวณกระเพาะปัสสาวะ (Di Venanzio et al., 2019) และมีการแยกเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาล 10 แห่งในประเทศเกาหลี พบว่าร้อยละ 55.6 มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและร้อยละ 19.8 ดื้อต่อยา imipenem ร้อยละ 25 ดื้อต่อยา meropenem ร้อยละ 13.5 ดื้อต่อยา polymyxin B และร้อยละ 17.7 ดื้อต่อยา colistin (Park et al., 2010)

2.1.1.7 โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis)

เยื่อหุ้มสมองอักเสบอันเนื่องมาจาก *A. baumannii* ยังคงเป็นเป็นมหาภัยที่เพิ่มขึ้นในการรักษาจากการผ่าตัดสมองที่มีอัตราการตายมากถึงร้อยละ 70 (Siegman-Igra et al., 1993) และมีการรายงานว่าร้อยละ 21 ของเชื้อที่แยกได้จากผู้เสียชีวิตมีการติดเชื้อ *A. baumannii* เป็น

เชื้อที่ติดต่อยาหลายขนาน มากไปกว่านั้นในผู้ป่วยที่มีโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงที่ติดเชื้อ *A. baumannii* จะมีโอกาสเสียชีวิตสูงหลังจากการผ่าตัดสมอง (Xiao et al., 2019)

2.1.2 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค

Outer Membrane Proteins หรือ OMP

เป็นโปรตีนจากเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบโดยทั่วไปมีบทบาทสำคัญในการเจริญในสิ่งแวดล้อมและการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม รวมถึงเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรค (Wang et al., 2003) โดยมีโปรตีน OmpA ของ *A. baumannii* เกี่ยวข้องกับการบุกรุกเซลล์ (invasion) เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 38 kDa มีความสำคัญในการแทรกเข้าไปจับกับพื้นผิวของเซลล์โฮสต์ (Choi et al., 2005) ซึ่งมีการศึกษาการบุกรุกเซลล์ของ *A. baumannii* ในหนูทดลอง (wild-type) พบว่ามีการเกิดพยาธิสภาพที่ปอดและเม็ดเลือดขาวเกิดความเสียหาย ในขณะที่หนูทดลองที่ได้รับเชื้อ *A. baumannii* ที่ทำให้ยีน *OmpA* กลายพันธุ์ ไม่มีการเกิดพยาธิสภาพของปอดและเม็ดเลือดขาวไม่เกิดความเสียหาย นอกจากนี้ OmpA ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการตายของเซลล์โฮสต์ โดยการสร้าง biofilm เข้าสู่กระแสเลือดและมีความสัมพันธ์กับเซลล์เยื่อหุ้มผิวโดยการใส่ fibronectin ของโฮสต์ (Smani et al., 2012)

Cell Envelope

ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบ lipopolysaccharide (LPS) เป็นหนึ่งในปัจจัยความรุนแรงที่เกี่ยวข้องในหลายขั้นตอนของกระบวนการก่อโรค โดย LPS ของ *A. baumannii* มีความสำคัญในการทนต่อการทำงานของซีรัม สามารถทำให้มีชีวิตรอดอยู่รอดได้ (Knapp et al., 2006) และยังมี O-antigen ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พร้อมด้วย pili ที่ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะกับผนังเซลล์ของโฮสต์ใช้สำหรับการเจริญ (Haseley & Wilkinson, 1997)

Enzyme

เชื้อ *A. baumannii* มีเอนไซม์ Phospholipases ซึ่งเป็นปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงของ *A. baumannii* ทำหน้าที่เป็นตัวย่อยสลาย phospholipids ของเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ทำให้เกิดการบุกรุกเซลล์ได้ ในขณะที่เอนไซม์ phospholipase D ช่วยให้ *A. baumannii* ทนต่อซีรัมและเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ phospholipase C ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อหุ้มผิว (Camarena et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ glycan-specific adamalysin-like protease เป็นเอนไซม์ที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือดทำให้ช่วยส่งเสริมความสามารถในการแพร่กระจายของ *A. baumannii* (Waack et al., 2018)

Capsular Polysaccharide

เชื้อ *A. baumannii* ที่สามารถมีชีวิตรอดในสิ่งแวดล้อมได้ ส่วนหนึ่งมาจากการที่เชื้อมี capsular polysaccharides ล้อมรอบเซลล์ทั้งหมดทำหน้าที่ในการป้องกันสภาวะต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อมโดยมีการศึกษาเชื้อ *A. baumannii* ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างภายนอกเซลล์พบว่าเชื้อไม่สามารถคงตัวอยู่ในความแห้งได้ ซึ่งให้เห็นว่าองค์ประกอบภายนอกเซลล์มีส่วนช่วยให้ *A. baumannii* มีชีวิตรอดอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Al-Hassan et al., 2013)

Biofilm formation และ Quorum Sensing

การก่อตัวของไบโอฟิล์มเป็นสิ่งสำคัญของการก่อให้เกิดโรคของ *A. baumannii* ทำให้มีความสามารถต่อต้านยาหลายขนาน รวมถึงการทนต่อความแห้งและระบบภูมิคุ้มกัน (Doi et al., 2015) ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคและโฮสต์ใน *A. baumannii* ส่วนใหญ่เชื้อจะมีระบบ chaperon / usher pilus โดยจะมี Csu pili ควบคุมโดยระบบ BfmRS two-component (TC) ซึ่งเป็นกลุ่มของโมเลกุลที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนและช่วยสร้างแคปซูลป้องกันในการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ และยังเป็นสื่อกลางในการ pili ในการยึดเกาะกับเซลล์โฮสต์ (Greene et al., 2016)

Motility

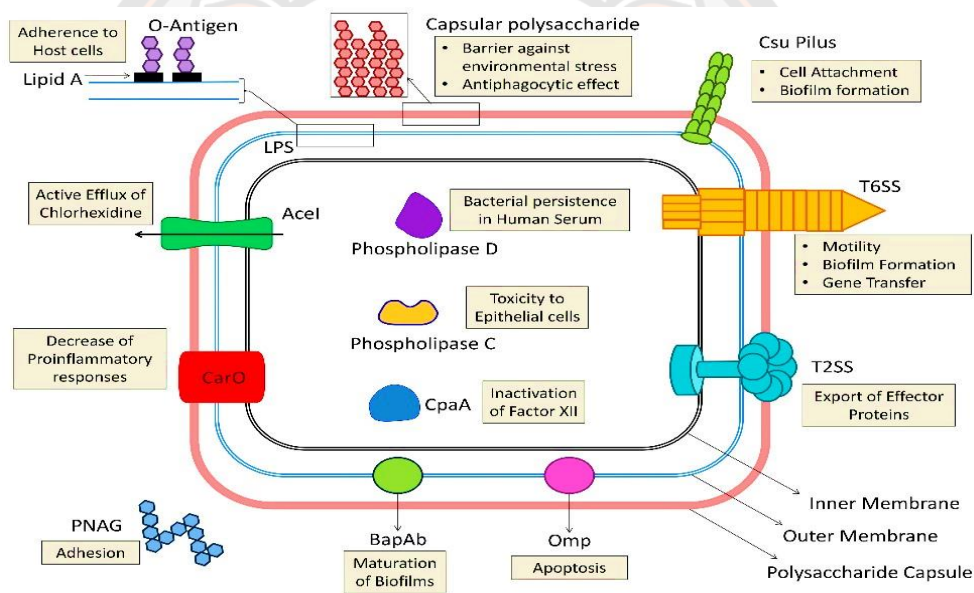
A. baumannii เป็นแบคทีเรียที่ไม่มีแฟลกเจลล่าและไม่เคลื่อนที่ (Skiebe et al., 2012; Vijayakumar et al., 2016) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *A. baumannii* สามารถอยู่รอดในระหว่างการติดเชื้อและสามารถแพร่กระจายบนพื้นผิวในโรงพยาบาลโดยการเคลื่อนไหวแบบกระตุก (jerky movement) (Harding et al., 2013) การเคลื่อนที่ดังกล่าวประกอบด้วยส่วนที่ต่อ ขยาย และการหดกลับ เพื่อผลักเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ type IV pili (Wilharm et al., 2013) นอกเหนือจากความสามารถในการเคลื่อนที่แล้ว pili ยังมีส่วนในการก่อตัวของไบโอฟิล์มและการถ่ายโอนยีน

Micronutrient Acquisition Systems

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ *A. baumannii* เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล มีความสามารถในการจับธาตุเหล็ก ซึ่งกลไกหลักที่ใช้สำหรับจับธาตุเหล็กก็คือโมเลกุลที่รู้จักกันในชื่อ siderophores ซึ่งมีตัวขนส่งและตัวรับสำหรับการดูดซึมเหล็ก เช่น FecA และ FecI ที่ใช้ในการเจริญเมื่อเข้าสู่กระแสเลือด (Morris et al., 2019)

Protein Secretion Systems

เชื้อ *A. baumannii* มีความสามารถในการหลั่งโปรตีนไปสู่ภายนอกเซลล์ช่วยให้เชื้อมีความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมและโฮสต์ โดยมี autotransporter trimeric (Ata) เป็นโปรตีนตัวแรกทำหน้าที่เป็นสื่อกลางระหว่างของเหลวของโฮสต์โดยเฉพาะคอลลาเจน และยังเกี่ยวข้องในการก่อตัวของไบโอฟิล์ม (Weber et al., 2015) นอกจากนี้ *A. baumannii* ยังใช้ระบบ secretion type II เพื่อส่งออกโปรตีนมหโมเลกุลออกนอกเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย CpaA, LipA และ LipH โดยที่ LipA และ LipH ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ไลเปส ที่จำเป็นสำหรับการย่อยไขมันและ CpaA เป็น metallo-endopeptidase ที่ย่อยสลาย fibrinogen และ factor V ซึ่งส่งผลกระทบต่อการแข็งตัวของเลือดอีกด้วย (Tilley et al., 2014) ดังภาพ 1



ภาพ 1 แสดงปัจจัยการก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii*

Acel = Acinetobacter chlorhexidine efflux protein; CpaA = glycan-specific adamalysin-like protease; Csu = chaperon/usher pilus system; LPS = lipopolysaccharide; Omp = outer membrane protein; PNAG = poly- β -1,6-N-acetylglucosamine; T2SS = type II secretion system; T6SS = type VI secretion system.

ที่มา: (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020)

2.1.3 ระบาดวิทยา

ระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *Acinetobacter* พบการระบาดเป็นวงกว้างเกี่ยวข้องกับ การติดเชื้อในพื้นที่เขตร้อน สงคราม และภัยทางธรรมชาติ รวมถึงการระบาดในโรงพยาบาลในเขตพื้นที่มีสภาพอากาศที่อบอุ่น (Leung et al., 2019) โดยปกติแล้วเชื้อมักจะอยู่ในน้ำและดิน นอกเหนือจากนี้ ได้แก่ สัตว์เลี้ยง สัตว์ขาปล้อง และอาหารสัตว์ (Houang et al., 2001) สำหรับในมนุษย์ *Acinetobacter* สามารถติดเชื้อได้ทาง ผิวหนัง บาดแผล ทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร (Albrecht et al., 2006) *Acinetobacter* บางสายพันธุ์สามารถอยู่รอดจากการทำให้แห้งในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลาหลายสัปดาห์ ซึ่งเป็นลักษณะที่ส่งเสริมการแพร่เชื้อผ่านการปนเปื้อนกับไรฝุ่นในโรงพยาบาล

การติดเชื้อในโรงพยาบาล *A. baumannii* มีแนวโน้มที่จะเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีอาการวิกฤตในห้องไอซียูทั้งเด็กและผู้ใหญ่ และในผู้ป่วยที่รักษาในโรงพยาบาลระยะยาว มีปัจจัยเสี่ยงได้แก่ การผ่าตัด การสวนหลอดเลือด การใส่ท่อที่หลอดลม การใช้เครื่องช่วยหายใจ การให้อาหารทางสาย และการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ cephalosporin fluoroquinolone หรือยา carbapenem (Fournier et al., 2006) การระบาดของเชื่อนั้นสืบเนื่องมาจากการปนเปื้อนในอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่มักพบบ่อย ได้แก่ เครื่องช่วยหายใจ เป็นต้น

2.1.4 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ

การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* สามารถแบ่งออกตามกลไกของการดื้อยาเป็น 3 กลุ่มคือ

1. การดื้อยาโดยลดการซึมผ่านของเมมเบรน (reducing membrane permeability) หรือเพิ่มการนำยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ (increasing efflux of the antibiotic) และการป้องกันการเข้าถึงเป้าหมาย (preventing access to the target)

2. การดื้อยาอันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์หรือผ่านขบวนการการดัดแปลงโมเลกุลหลังการถอดรหัส (post-translational modification)

3. การทำลายยาปฏิชีวนะหรือปรับเปลี่ยนโมเลกุลของยา (Blair et al., 2015)

การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* มีปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื่อนั้นมีความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะคือการมีพันธุกรรมที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอด (genetic plasticity) การกลายพันธุ์อย่างรวดเร็ว รวมถึงการได้รับส่วนพันธุกรรมของแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) ด้วยเหตุนี้ทำให้เชื้อ *A. baumannii* มีวิวัฒนาการในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้น โดยมีกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ดังนี้

การดื้อยาในกลุ่ม Beta-Lactams

ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ penicillin cephalosporins carbapenems monobactams และ beta-lactamase inhibitors โดยมีกลไกในการยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan (Aygün et al., 2002) มีการศึกษาพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ส่วนใหญ่ในปัจจุบันมีความสามารถในการดื้อต่อยา penicillin และ cephalosporins (Dijkshoorn et al., 2007)

การดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycosides

เอนไซม์ modifying enzymes (AMEs) มีผลทำให้ยาที่มีความสามารถในการจับกับ 16S rRNA methyltransferases ลดลงและลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ โดยมีการศึกษาพบว่า *A. baumannii* มีอัตราการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside ร้อยละ 19 ถึงร้อยละ 31 (Vázquez-López et al., 2020) สำหรับกลไกการทำงานของยาในกลุ่ม aminoglycoside โดยจะเข้าไปจับกับ 30S ribosomal subunit เพื่อขัดขวางขบวนการขั้นตอนต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาว ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่ amikacin kanamycin และ tobramycin (Huang et al., 2008)

การใช้เอนไซม์ย่อยสลายยา เชื้อ *A. baumannii* มีความสามารถในการใช้เอนไซม์ย่อยสลายยาในกลุ่มเบต้าแลคแทมส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ penicillin synthetic cephalosporins และ carbapenems สำหรับการดื้อต่อยา carbapenems พบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ class D, OXA-type จำนวนมากในการทำลายยา รวมถึง class B metallo – beta-lactamases (MBLs) (Brown & Amyes, 2006)

ลดการนำสารเข้าสู่เซลล์ ช่อง porin และโปรตีนเยื่อหุ้มชั้นนอกมีความสามารถในการนำโมเลกุลยาปฏิชีวนะเข้าสู่โปรตีนเป้าหมาย สำหรับ *A. baumannii* พบว่ามีลักษณะของช่อง porin ที่เล็กและน้อยกว่าใน *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ทำให้ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Mussi et al., 2005) ดังนั้น porin และ beta lactamase จะทำงานร่วมกัน เพื่อทนต่อยาปฏิชีวนะ นอกเหนือจากปัจจัยเหล่านี้แล้ว ยังมีกลไกการปั๊มยาออกซึ่งมีส่วนช่วยในการนำยาออกจากเซลล์

การเปลี่ยนแปลงของเป้าหมายหรือฟังก์ชันภายในเซลล์เนื่องจากการกลายพันธุ์ การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ และเซลล์เป้าหมายอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของยีน *gyrA* และเอนไซม์ *parC* topoisomerase ส่งผลให้ดื้อต่อยา quinolones ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์เป็นวงกว้าง อาจเป็นสาเหตุของการเกิดขึ้นของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Li et al., 2006)

2.1.5 การวินิจฉัย

Acinetobacter เป็นสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีบนอาหารแข็งที่ใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก เช่น blood agar หรือ tryptic soy both ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หากต้องการแยก *Acinetobacter* จากแบคทีเรียอื่น ๆ สามารถใช้อาหารที่เป็น selective media ในการแยก

Acinetobacter ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นโดยใช้อาหาร Leeds *Acinetobacter* (Jawad et al., 1998) และยังสามารถใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการระบุโดยการตรวจหายีน *bla*_{OXA-51-like} สำหรับ *A. baumannii* (Unal & Garcia-Rodriguez, 2005)

สำหรับเป้าหมายในการควบคุม *Acinetobacter* ที่ดีเยี่ยมหลายขนานคือ การทราบถึงการแพร่กระจายและป้องกัน ในแง่ของการทำความสะอาดสิ่งแวดล้อมและการฆ่าเชื้อที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากความสามารถของ *Acinetobacter* ในการอยู่รอดบนพื้นผิวที่แห้งและปนเปื้อนพื้นผิวอื่น ๆ (Wendt et al., 1997) เช่น ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างบุคลากรในโรงพยาบาลและผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลที่ติดเชื้อ *Acinetobacter* ที่ดีเยี่ยมหลายขนานพบว่า ร้อยละ 39 เกิดการปนเปื้อนของถุงมือและเสื้อคลุมของบุคลากรทางการแพทย์ (Morgan et al., 2010) จึงจำเป็นต้องมีมาตรการทำความสะอาด ซึ่งการทำความสะอาด โดยการใช้อุปกรณ์ฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตและการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Otter et al., 2010) เมื่อไม่มีแหล่งที่มาหรือแหล่งกักเก็บเชื้อ การควบคุมก็ขึ้นอยู่กับ การปฏิบัติตามสุขอนามัยและการดูแลความสะอาดของสายสวนหลอดเลือดและท่อช่วยหายใจ (Eder et al., 2017)

2.1.6 เทคโนโลยี NGS ของ *A. baumannii*

การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธี ในช่วงต้นทศวรรษ 1970 นักชีวเคมีคือ Walter Gilbert และ Frederick Sanger ได้คิดค้นวิธีการต่าง ๆ ในการหาลำดับดีเอ็นเอ โดยวิธีการของ Gilbert เป็นวิธีการทางเคมีเปลี่ยนแปลงเบสทั้งสี่ในสายนิวคลีโอไทด์ และทำการติดตามผลที่เปลี่ยนแปลงโดยติดฉลากด้วยสารรังสีก่อนนำไปวิเคราะห์บนแผ่นฟิล์มด้วยกระแสปริมาณไฟฟ้า ในทางกลับกันวิธีการของ Sanger ใช้ประโยชน์จากกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลลำดับบนดีเอ็นเอแม่แบบ โดยมีการใช้นิวคลีโอไทด์ดัดแปลงทางเคมีคือ dideoxy nucleotides (ddNTPs) เป็นตัวยุติการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ เนื่องจากโครงสร้างของ ddNTPs ขาดหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง 3' ส่งผลให้ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ตัวถัดไปไม่สามารถเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ได้ ทำให้การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอหยุดลง โดยการใช้ตัวยุติการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงแทนตัวยุติที่ติดฉลากกัมมันตภาพรังสี ทำให้ปลอดภัยยิ่งขึ้นสำหรับใช้งานและลำดับการตรวจจับที่แข็งแกร่งยิ่งขึ้น ต่อมาวิธีการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยการใช้แคปิลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสแทนแผ่นเจล ทำให้แยกลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Hess et al., 2020) การพัฒนาวิธีการของ Sanger ทั้งหมดนี้ นำไปสู่การนำไปใช้อย่างกว้างขวางและเป็นวิธีการที่เลือกใช้ศึกษาจีโนมของมนุษย์ แม้ในปัจจุบันวิธีนี้ก็ยังคงใช้กันอย่างแพร่หลายในการหาลำดับดีเอ็นเอ แต่วิธีการของ Sanger ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสปริมาณมากได้อย่างง่ายดาย

จึงมีการพัฒนาวิธีการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบใหม่มาใช้ ซึ่งวิธีนี้มีความสามารถในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในปริมาณมาก และสามารถทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน วิธีนี้เรียกว่า Next Generation Sequencing (NGS) มีหลักการในการอ่านลำดับเบสแบบสุ่ม โดยทำการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก ๆ และมีการต่อเข้ากับอะแดปเตอร์ทางด้านปลาย 5' และ 3' ของชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้ได้ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจำนวนมากเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสสายสั้น ๆ เรียกว่า reads เมื่อได้จำนวน reads จำนวนมากแล้ว ข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์โดยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ต่อไป (Woollard et al., 2011)

ปัจจุบันมีการศึกษาจีโนมทั้งหมด (Whole-Genome-Sequence; WGS) ของ *A. baumannii* ที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลทั้งหมดเมื่อทำการเปรียบเทียบกันแล้ว เชื้อมีการถ่ายโอนพลาสมิดระหว่างสายพันธุ์ ทำให้เป็นสาเหตุของการดื้อยาในโรงพยาบาล (Makke et al., 2020) มากไปกว่านั้นมีการศึกษาสายพันธุ์ *A. baumannii* 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กที่ป่วยเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่า เชื้อ *A. baumannii* มีความแตกต่างกันทางสายวิวัฒนาการและมีกลุ่มยีนสำคัญที่ส่งเสริมการอยู่รอดในสภาพแวดล้อมของโรงพยาบาล (Mancilla-Rojano et al., 2019) สำหรับการศึกษ WGS ของ *A. baumannii* สายพันธุ์อื่น ๆ ในฐานข้อมูลมีดังตาราง 1

ตาราง 1 ข้อมูลการศึกษาจีโนมของ *A. baumannii* ในฐานข้อมูล NCBI

สายพันธุ์	แพลตฟอร์ม	ขนาด(bp)	แหล่งที่แยก	ประเทศ
AbCTX1	Oxford nanopore	4,088,883	ช่องจมูก	ฝรั่งเศส
Ab-B004d-c	Oxford nanopore	4,091,477	sputum	กานาร์
MRSN15313	PacBio/Illumina	4,193,847	น้ำไขสันหลัง	บราซิล
Res13-Abat- PEA21-P4-01-A	Oxford nanopore/ Illumina	3,747,579	ช่องจมูก	แคนาดา
EC	PacBio	3,708,164	-	สาธารณรัฐเช็ก
EH	PacBio	3,752,576	-	สาธารณรัฐเช็ก
ACI713	Oxford Nanopore	3,935,674	-	เยอรมัน
9201	PacBio/Illumina	4,119,128	เลือด	เม็กซิโก
810CP	PacBio/Illumina	4,089,681	อุจจาระ	เม็กซิโก
ARLG_6295	Oxford Nanopore	3,749,854	ทางเดินหายใจ	อเมริกา

2.1.7 แบคทีเรียโอเฟจ

2.1.7.1 ชนิดและวงจรชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจ

แบคทีเรียโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรียที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่ง ถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนแคปซิดติดกับส่วนหาง (tail fiber) ใช้สำหรับยึดติดกับตัวรับบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วย่อยผนังเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นจึงปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อสารพันธุกรรมเข้าไปจะเกิดสภาวะอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ ไวรัสเลนซ์ (virulence) หรือ เวมเพอเวต (temperate)

Virulence phage

Virulence เป็นแบคทีเรียโอเฟจที่ปลดปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในแบคทีเรีย แล้วเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างสารพันธุกรรมของเฟจเพิ่ม และเกิดเป็นอนุภาคเฟจจำนวนมากภายในเซลล์แบคทีเรีย จนกระทั่งแบคทีเรียแตก (lysis) อนุภาคเฟจจำนวนมากจึงออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อไปบุกรุกเซลล์แบคทีเรียเซลล์อื่นที่จำเพาะเจาะจงสำหรับการบุกรุกต่อไป การดำรงชีวิตแบบนี้เรียกว่า วัฏจักรไลติก (lytic cycle)

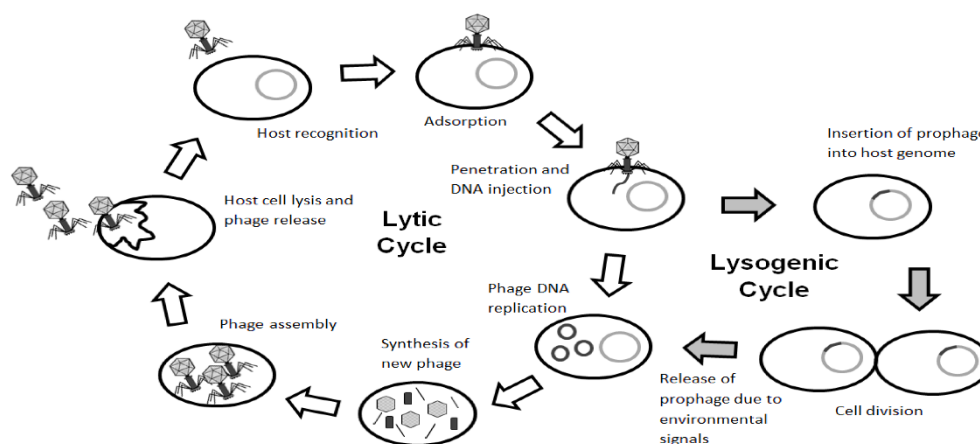
Temperate phage

Temperate phage คือ เฟจที่ปลดปล่อยสารพันธุกรรมตัวเองเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย โดยไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก ซึ่งสารพันธุกรรมของเฟจที่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียจะสร้างโปรตีนกอดัน มายับยั้งการเพิ่มจำนวนของเฟจ โดยสารพันธุกรรมของเฟจจะแทรกเข้าไปรวมกับโครโมโซมอล ดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) ของแบคทีเรียในบริเวณที่เป็นโฮโมโลกัสกัน สภาวะนี้เรียกว่า โปรเฟจ (prophage) เมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ยีนของไวรัสที่ติดอยู่จึงแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไปด้วย การดำรงชีวิตของเฟจแบบนี้เรียกว่า วัฏจักรไลโซเจนี (lysogeny)

หลังจากการค้นพบแบคทีเรียโอเฟจในช่วงต้นศตวรรษที่ 20 มีนักวิจัยหลายคนคิดเกี่ยวกับศักยภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เพื่อที่จะใช้เป็นตัวแทนในการรักษา แต่อย่างไรก็ตาม หลังจากเกิดสงครามครั้งที่ 2 มีการค้นพบยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโอเฟจได้รับความสนใจน้อยลง กระนั้นก็ยังมีการศึกษาแบคทีเรียโอเฟจเพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับงานทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเป็นสำคัญ ต่อมาเมื่อเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้แบคทีเรียโอเฟจกลับมาได้รับความน่าสนใจอีกครั้ง โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพที่จะใช้เป็นตัวแทนยาปฏิชีวนะ, phage display และใช้สำหรับนำไปผลิตวัคซีน (Clark & March, 2006)

สำหรับวงจรชีวิตของ lytic phage สิ้นสุดลงที่การทำให้แบคทีเรียเซลล์แตกเพื่อปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจที่สร้างใหม่ออกจากเซลล์ โดยทำให้เซลล์แตกจากการทำลาย peptidoglycan หรือ murein ที่ผนังเซลล์ ซึ่ง peptidoglycan เป็นโครงสร้างที่ช่วยเสริมความ

แข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ทนต่อสภาวะต่าง ๆ และทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถคงรูปอยู่ได้ peptidoglycan พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยในแบคทีเรียแกรมลบจะมี outer membrane (OM) หุ้มอยู่ด้านนอกสุดอีกชั้นหนึ่ง ดังนั้นหาก peptidoglycan ถูกทำลายหรือเสียหายจะส่งผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และสามารถทำให้เซลล์ไม่ทนทานต่อแรงดันภายในเซลล์ได้อีกต่อไปและทำให้เซลล์แตกในที่สุด (Pires et al., 2016) ดังภาพ 2



ภาพ 2 การเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจแบบ Lytic cycle และ Lysogenic cycle
ที่มา: (Doss et al., 2017)

2.1.7.2 แบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii*

การดื้อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดของ *A. baumannii* ทำให้แบคทีริโอเฟจถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกในการยับยั้ง *A. baumannii* เนื่องจากแบคทีริโอเฟจที่มีวงจรกิจิตแบบไลติก มีความสามารถที่จะทำลายแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียถูกทำลาย มีการแยกและศึกษาการนำแบคทีริโอเฟจ AB1 และ AB2 มาใช้ในการยับยั้ง *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนาน พบว่าแบคทีริโอเฟจมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *A. baumannii* (Lin et al., 2010) ในปี พ.ศ. 2555 Liu ได้แยกแบคทีริโอเฟจ ZZ1 ในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยภายในโรงพยาบาล (Liu et al., 2012) ต่อมา มีการแยกแบคทีริโอเฟจ AB7-IBB2 และ AB7-IBB1 ทำลายการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. baumannii* มีการรายงานของ Popova พบว่า แบคทีริโอเฟจ AP22 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ได้หลายสายพันธุ์ (Popova et al., 2012) ในปี พ.ศ. 2557 Huang ทำการแยกแบคทีริโอเฟจ Abp1 และนำเอนไซม์เอนโดไลซินจากแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* พบว่าเอนไซม์สามารถทำให้ผนังเซลล์ของ *A.*

baumannii เกิดความเสียหาย มีการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ (Huang & Masters, 2014) ในปี พ.ศ.2560 มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับวิวัฒนาการโดยศึกษาจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* 37 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้จัดอยู่ใน family Leviviridae (Turner et al., 2018) จึงมีการศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของแบคทีเรียโอเฟจเพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่ใช้ทำลายแบคทีเรีย โดยมีวิธีการหาลำดับเบสทั้งจีโนม หรือหายีนบางส่วนภายในจีโนม แสดงดังตาราง 2

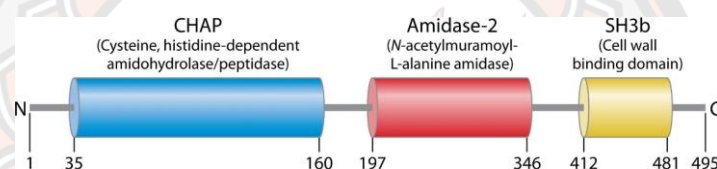
ตาราง 2 การศึกษาเอนไซม์เอนโดไลซินที่จำเพาะต่อ *A. baumannii*

แฟมิลี	ขนาดจีโนม (Kb)	เอนไซม์	อ้างอิง
133(Myoviridae)	43.665	Putative endolysin	(Petrov et al., 2010)
Abp2(Myoviridae)	45.373	Lysin and lysozyme	(Yang, Liu, et al., 2019)
AB1(Podoviridae)	41.526	Putative endolysin	(Chang et al., 2011)
Abp1(Podoviridae)	42.185	EF hand protein	(Huang et al., 2013)
ABP01	30	Endolysin	Thummeepak et al., 2016
AB2(Podoviridae)	40	Endolysin(lysAB2)	(Yang et al., 2010)

2.1.7.3 เอนไซม์ของแบคทีเรียโอฟาจ และเปปไทด์ต้านจุลชีพ

แบคทีเรียโอฟาจสามารถทำลาย peptidoglycan ของแบคทีเรียได้โดยการสร้างเอนไซม์ เอนโดไลซินและโฮลิน และมีกลไกทำให้เซลล์แตก มีโครงสร้างบริเวณที่ใช้จับกับผิวของเซลล์แบคทีเรีย และกิจกรรมของเอนไซม์ จากทางด้านปลาย C ไปยังปลาย N ตามลำดับดังภาพ 3

การประยุกต์ใช้เอนไซม์เอนโดไลซินเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้เป็นสารต้านจุลชีพ มีการศึกษาในการใช้เอนไซม์เอนโดไลซิน PlyGRCS ซึ่งมีประสิทธิภาพในการช่วยหนูให้มีชีวิตรอดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในกระแสเลือด (Linden et al., 2015) ใช้เอนไซม์ ABgp46 ในการยับยั้ง *A. baumannii* เมื่อถูกกระตุ้นร่วมกับกรดซิตริก และกรดมาลิกทำให้หนูมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (Oliveira et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เอนโดไลซินมาทดสอบทั้งใน *In vitro* และ *In vivo* แสดงดังตารางที่ 3



ภาพ 3 โครงสร้างของเอนไซม์เอนโดไลซินประกอบด้วยโดเมนที่การทำงานของเอนไซม์ 2 โดเมน (CHAP และอะมิเดส) และโดเมนการจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย SH3 (SH3b)

ที่มา: (Haddad Kashani et al., 2018)

นอกจากนี้ มีการนำลำดับกรดอะมิโนเอนไซม์ของแบคทีเรียโอฟาจไปใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides ; AMPs) เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6-100 อะมิโน กลุ่มกรดอะมิโนพวก amphipathic และกลุ่มกรดอะมิโนประจุบวก มีความสามารถที่จะเข้าไปทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียให้เกิดรูพรุน เป็นผลให้สารต่าง ๆ ของแบคทีเรียไหลออกมาภายนอกเซลล์แบคทีเรีย มีการศึกษาจำนวนมากในการนำลำดับกรดอะมิโนเอนไซม์เอนโดไลซินของแบคทีเรียโอฟาจไปใช้ในการสังเคราะห์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ จึงทำให้ AMPs เป็นทางเลือกที่จะนำไปสู่การใช้เป็นสารตัวใหม่หรือเป็นทางเลือกในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ในปี พ.ศ. 2558 มีการสร้าง recombinant protein PlyF307 ที่ได้จากแบคทีเรียโอฟาจ มาใช้รักษาหนูที่ติดเชื้อ *A. baumannii* พบว่าหนูมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รักษาด้วย PlyF307 ต่อมาในปี พ.ศ. 2559 ทำการดัดแปลงลำดับกรดอะมิโนของ

PlyF307 พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ที่เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถทำลายการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้ (Thandar et al., 2016) (Lood et al., 2015)

ตาราง 3 เอนไซม์เอนโดไลซินที่ใช้ทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ

เชื้อที่ทดสอบ	เอนโดไลซิน	ชนิดการทดลอง	อ้างอิง
<i>S. aureus</i>	PlyGRCS	<i>In vivo</i> (mouse)	(Linden et al., 2015)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PlyC	<i>In vitro</i>	(Shen et al., 2013)
<i>Streptococcus sp.</i>	Ply700	<i>In vitro</i>	(Celia et al., 2008)
<i>A. baumannii</i>	ABgp46	<i>In vitro</i>	(Oliveira et al., 2016)
<i>A. baumannii</i>	LysAB2	<i>In vitro</i>	Lai et al., 2011
<i>Ps. aeruginosa</i>	Artilysin	<i>In vivo</i> (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	(Briers & Lavigne, 2015)

ในปี พ.ศ.2560 มีการศึกษาการดัดแปลงลำดับของกรดอะมิโน LysAB2 P3 ที่ได้จากแบคทีเรียโอเฟจ AB2 พบว่า LysAB2 P3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *A. baumannii* ได้ดีที่สุด และมีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงน้อย นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า LysAB2 P3 มีความสามารถในการสร้างพิษต่อเซลล์น้อยเช่นกัน (Peng et al., 2017)

2.1.8 การประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจ

Phage therapy คือการนำแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย แบคทีริโอเฟจ ที่นำมาใช้ในงานนี้ต้องเป็น lytic phage เพราะสามารถทำลายแบคทีเรียเป้าหมายให้ลดน้อยลงหรือหมดไป ซึ่งจากการค้นพบแบคทีริโอเฟจโดย Felix d'Herelle ในปี ค.ศ.1917 ต่อมาในปี ค.ศ.1925 ได้รายงานการรักษาโรคระบาดโดยใช้แบคทีริโอเฟจ (Alcorlo et al., 2007) แต่ในทางกลับกันแนวคิดของการรักษาด้วยแบคทีริโอเฟจเริ่มทยอยออกไปในปี ค.ศ. 1940 เนื่องจากการค้นพบยาปฏิชีวนะ (d'Herelle, 1930) อย่างไรก็ตามสถานการณ์ของเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้นทำให้แบคทีริโอเฟจมีความน่าสนใจในการนำมาแก้ไขปัญหการยับยั้งและควบคุมเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหาในขณะนี้

Phage display เป็นเทคนิคระดับโมเลกุลที่ใช้ในการสังเคราะห์โพลีเปปไทด์เคลือบเฟจ (Smith et al., 1985) ได้แก่ แบคทีริโอเฟจ M13 จำเพาะต่อ *Escherichia coli* ที่ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังมีแบคทีริโอเฟจอื่น ๆ เช่น แบคทีริโอเฟจแลมบ์ดาและ T7 ที่ใช้สำหรับระบบ phage display นำไปใช้สำหรับการคัดเลือกและแยกเปปไทด์ที่มีความเฉพาะและมีความสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย สามารถใช้ได้ในการออกแบบยาเพื่อใช้ในการทำความเข้าใจการจดจำของโมเลกุล (Sidhu et al., 2000) นอกจากนี้เปปไทด์เหล่านี้สามารถใช้สำหรับการตรวจจับของเชื้อโรคและสารที่ถูกระบุว่าเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ (Petrenko & Vodyanoy, 2003)

Phage typing คือการนำแบคทีริโอเฟจมาใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดแบคทีเรียวิธีนี้อาศัยความจำเพาะ ระหว่างแบคทีริโอเฟจและแบคทีเรีย ทำให้สามารถการจำแนกแบคทีเรียได้ถึงระดับจีโนส และสปีชีส์ ถูกนำไปใช้สำหรับการตรวจหาแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (Clark & March, 2006) โดยมีวิธีการที่สามารถนำไปใช้ได้ตรวจจับแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเช่นการใช้ green fluorescent protein (GFP) ใส่เข้าไปในแบคทีริโอเฟจ เมื่อเกิดการบุกรุกแบคทีเรียทำให้โปรตีนดังกล่าวเรืองแสงสามารถที่จะตรวจวัดการติดเชื้อได้ (Smith et al., 1985)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจและสภาวะการเจริญที่ใช้ในการศึกษาสายพันธุ์

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด ศึกษาการแสดงออกของยีน และการทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านจุลชีพ คือ *A. baumannii* 329 ที่แยกได้จากโรงพยาบาลทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ ในปี 2558 (Leungtonkam et al., 2018) สำหรับแบคทีเรียโอเฟจที่ใช้ในการศึกษาคือ แบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* แยกได้จากบ่อน้ำบาดาลเสียโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (Kitti et al., 2015) โดยแบคทีเรียจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (HiMedia, India) หรือ LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.2 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของ *A. baumannii* 329

นำเชื้อ *A. baumannii* 329 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB agar จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้นำมาเลี้ยงในอาหาร LB broth 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลานำไปปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสออกให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำการ resuspend ส่วนใสและตะกอนเข้าด้วยกัน จากนั้นดูดใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube ทำการปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทั้งส่วนใสและเติม Digestion solution 180 ไมโครลิตร จากนั้นผสมตะกอนให้เข้ากันเติม Proteinase K solution 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จากนั้นเติม RNase A solution 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม Lysis solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที เติม 400 ไมโครลิตร ของ 50% ethanol ทำการผสมให้เข้ากัน ก่อนทำการย้ายใส่ Spin Cartridge ที่บรรจุใน Collection Tube ทำการปั่นตกตะกอน 6,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำส่วนที่ไหลผ่าน (flow-through) ที่ทิ้ง แล้วนำ Spin Cartridge ใส่กลับเข้าไปใน Collection Tube อีกครั้ง เติม Wash buffer I 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นตกตะกอนที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำส่วนที่ไหลผ่าน (flow-through) ที่ทิ้ง แล้วนำ Spin Cartridge ใส่กลับเข้าไปใน Collection Tube อีกครั้ง เติม Wash buffer II 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นตกตะกอนที่ 12,000 x g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำส่วนที่ไหลผ่าน (flow-through) ที่ทิ้ง ต่อจากนั้นนำ Spin Cartridge ออกแล้วไปใส่ใน Recovery Tube (1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube) เติม Elution

buffer 200 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางของ Spin Cartridge แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ Spin Cartridge ที่บรรจุใน Recovery Tube ไปปั่นที่ $8,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่าง DNA ที่อยู่ใน Recovery Tube ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nano drop และทำการส่งวิเคราะห์โดยบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี เมื่อได้ข้อมูลจากบริษัท นำ raw data ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสสายสั้น (reads) จำนวนมากในรูปแบบไฟล์ fastq นำมาประกอบ (assembly) กลับเป็น DNA สายยาวด้วยวิธี de novo assembly โดยเริ่มจากการ trim ด้วยเครื่องมือ Sickle v1.33 และใช้เครื่องมือ SPAdes v3.6.0. ในการประกอบ reads จำนวนมากเข้าด้วยกัน ก่อนนำไป annotation โดยใช้ RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<https://rast.nmpdr.org/>)

3.2.1 การวิเคราะห์ Clusters of Orthologous Genes (COGs)

นำไฟล์สกุล .faa ที่ได้จากการ annotate ไปทำการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนแต่ละกลุ่มโดยใช้ eggNOG-mapper v2 (<http://eggnog-mapper.embl.de/>) และทำการสร้างกราฟแท่งโดยใช้โปรแกรม R studio

3.2.2 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree และจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี Multilocus sequence typing (MLST) กับเชื้อ *A. baumannii* ที่มีจีโนมสมบูรณ์จากทวีปเอเชีย

นำ FASTA ไฟล์หลังจากทำการ assembly มาวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อ *A. baumannii* ที่มีจีโนมสมบูรณ์ในฐานข้อมูล NCBI (ข้อมูลเมื่อ 9 สิงหาคม 2564) ทั้งหมด 145 จีโนมในทวีปเอเชีย และทำการวิเคราะห์ Phylogenetic tree โดยใช้ CSI Phylogeny v.1.4 โดยใช้การตั้งค่าเริ่มต้น จากนั้นจะได้ไฟล์ผลลัพธ์เป็นไฟล์สกุล .newick ก่อนนำไปสร้างเป็นรูปแผนภูมิโดยใช้ Interactive Tree Of Life (iTOL) (<https://itol.embl.de/>) และจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ MLST Scans genomes against PubMLST schemes. (Galaxy Version 2.19.0)

3.2.3 การวิเคราะห์ Pangenome ของเชื้อ *A. baumannii* 329 กับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงในสายวิวัฒนาการ

นำไฟล์สกุล .GFF ที่ได้จากการ annotate มาทำการวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งหมด 7 สายพันธุ์โดยใช้ Roary (Galaxy Version 3.13.0+galaxy1) ผ่าน usegalaxy.eu โดยใช้การตั้งค่าเริ่มต้น จากนั้นนำไฟล์ผลลัพธ์ที่ได้มาทำการสร้างเป็นแผนภาพโดยใช้โปรแกรม R ผ่าน script ของ Lesley Sitter, Ph.D. (https://github.com/lamlam/pADAP_project/tree/master/Roary_stats)

3.2.4 การตรวจหายีนดื้อยาและยีนก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* 329

นำไฟล์ .gbk ของเชื้อ *A. baumannii* 329 และสายพันธุ์ใกล้เคียงมาทำการวิเคราะห์ยีนดื้อยาและยีนก่อโรคโดยดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดื้อยาจากฐานข้อมูล Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>) และยีนก่อโรคจาก virulence factor database (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) ก่อนนำไปตรวจหายีนโดยใช้ Large-Scale BLAST Score Ratio (LS-BSR) (github.com/jasonsahl/LS-BSR) ผ่าน Ubuntu 20.04.2 LTS และทำการสร้างภาพ heat map ผ่าน R studio โดยใช้แพ็คเกจ tidyverse และ pheatmap

3.2.5 การตรวจหา Genomic Islands (GIs) ของเชื้อ *A. baumannii* 329

นำไฟล์ FASTA ของเชื้อ *A. baumannii* 329 เพื่อศึกษาบริเวณของลำดับเบสที่มีขนาดมากกว่า 10 Kb และศึกษาการได้รับยีนจากสิ่งแวดล้อม หรือการได้รับชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ IslandViewer 4 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>) ทำการสร้างแผนภาพ GIs โดยใช้ R studio ผ่านแพ็คเกจ gggenes

3.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2

การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ (one-step grow curve) ทำโดยการนำเชื้อ *A. baumannii* 329 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 900 ไมโครลิตร มาเติม phage lysate vPhT2 ซึ่งมีความเข้มข้น 1×10^8 pfu/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยมีค่า Multiplicity of Infection (M.O.I.) = 0.01 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีเมื่อครบกำหนดนำ 10 ไมโครลิตร ของ *A. baumannii* 329 ที่ผสมกับแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการแบ่งใส่ 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทั้งหมด 11 tubes จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร ที่เวลา 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 70, 80, และ 90 นาที นำมาผสมกับ *A. baumannii* 329 ที่มีปริมาณ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ไปหาปริมาณแบคทีเรียโอเฟจโดยวิธี double agar layer plaque assay และนำปริมาณแบคทีเรียโอเฟจ (pfu/มิลลิลิตร) ที่นับได้ที่เวลาต่าง ๆ ไปสร้างกราฟ one-step growth curve

3.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค quantitative PCR

3.4.1 การสกัด total RNA

การทดลองนี้เป็นขั้นตอนการสกัด total RNA จาก แบคทีเรียและแบคทีเรียโอเฟจ ก่อนนำ RNA ไปเปลี่ยนเป็น cDNA ในขั้นตอนต่อไป เริ่มจากทำการเลี้ยง แบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ร่วมกับ *A. baumannii* 329 ที่มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร 10

มิลลิลิตร Luria-Bertani (LB) broth โดยมีค่า M.O.I. เท่ากับ 10 จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงเวลาที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0, 10, 30, และ 60 นาทีเมื่อครบเวลา ทำการเก็บเซลล์ โดยนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และเลี้ยงแบคทีเรีย *โอเฟจ* vPhT2 ที่ไม่ได้ทำการเลี้ยงร่วมกับ AB329 จากนั้นนำกลุ่มของแบคทีเรียที่ถูกติดเชื้อด้วยแบคทีเรีย *โอเฟจ* แต่ละช่วงเวลา และกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ได้ติดเชื้อด้วยแบคทีเรีย *โอเฟจ* ทำการสกัด total RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET RNA Purification Kit ทำการเติม TE buffer 100 ไมโครลิตร ที่เสริมด้วย 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร lysozyme บ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม lysis buffer 300 ไมโครลิตร ที่มี 1% 2-mercaptoethanol ใส่ลงในตะกอนเซลล์แล้วทำการบีบอัดขึ้นลงจนเซลล์แตกทั้งหมด เติม ethanol 180 ไมโครลิตร ก่อนนำสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน Spin Cartridge ที่บรรจุใน Collection Tube ก่อนนำไปปั่นที่ 12,000 × g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำส่วนที่ไหลผ่าน (flow-through) ทั้ง แล้วนำ Spin Cartridge ใส่กลับเข้าไปใน Collection Tube อีกครั้ง แล้วบีบอัดตัวอย่างสารละลายตัวอย่างที่เหลือ (ประมาณ 500 ไมโครลิตร) ใส่ลงใน Spin Cartridge แล้วทำการปั่นและทำเหมือนเดิมอีกครั้ง ต่อจากนั้นทำการล้างตัวอย่าง RNA ด้วยการเติม Wash Buffer I 700 ไมโครลิตร ลงไปใน Spin Cartridge ที่มี RNA ตัวอย่างจับอยู่ จากนั้นปั่นที่สภาวะเดิม หลังจากปั่นเรียบร้อยแล้วให้ทิ้งส่วนที่ไหลผ่าน และ Collection Tube จากนั้นนำ Spin Cartridge ที่มี RNA ตัวอย่างจับอยู่ไปใส่ใน Collection Tube อันใหม่ ก่อนทำการเติม Wash Buffer II 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกที่ 12,000 × g เป็นเวลา 15 วินาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้งโดยเติม Wash Buffer II 250 ไมโครลิตร และทำการปั่นแห้ง Spin Cartridge ที่ 12000 × g เป็นเวลา 1 นาที ต่อจากนั้นนำ Spin Cartridge ออกแล้วไปใส่ใน Recovery Tube (1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube) ทำการเติม RNase-Free Water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางของ Spin Cartridge แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ Spin Cartridge ที่บรรจุใน Recovery Tube ไปปั่นที่ 12,000 × g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่าง total RNA ที่อยู่ใน Recovery Tube ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nano drop และแยกขนาดของ RNA ด้วย 1% formaldehyde agarose gel electrophoresis

3.4.2 การสร้าง complementary DNA และการวิเคราะห์ปริมาณด้วย qPCR

การทดลองนี้เป็นการสร้าง cDNA จาก mRNA ของแบคทีเรียที่ถูกติดเชื้อด้วยแบคทีเรีย *โอเฟจ* และติดเชื้อแบคทีเรีย *โอเฟจ* นำ 10 ไมโครกรัม ของ total RNA ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ มาเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (Tetro™ cDNA Synthesis Kit,

Bioline) เตรียม RNA mixture โดยนำ 10 ไมโครกรัม ของ total RNA มาผสมรวมกับ oligo(dT) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5x RT buffer 4 ไมโครลิตร Ribosafe RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร Tetro Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร และเติม DEPC-treated water ให้ปริมาตรรวมครบ 20 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ จากนั้นนำ RNA mixture ที่อยู่ใน PCR tube ไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต่อด้วย 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง จะทำให้ได้ cDNA สำหรับนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ที่สนใจด้วยเทคนิค qPCR ต่อไป หรือเก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค qPCR โดยใช้ SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit ทำการเตรียม PCR mixture โดยเติม 2X SensiFast No-RoX mix 6 ไมโครลิตร 10 ไมโครโมลาร์ forward primer 1 ไมโครลิตร reverse primer 1 ไมโครลิตร DNase free water 3 ไมโครลิตร และ cDNA 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เครื่อง Roche LightCycler 480 System โดยตั้งค่าสภาวะดังนี้ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นตามด้วย 35 รอบ ของขั้นตอน annealing 60 องศาเซลเซียส และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และทำการวิเคราะห์ปริมาณ DNA โดย Roche lightcycler 480 software สำหรับ primer ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 และ *A. baumannii* 329 มีลำดับเบสดังตาราง 4 และ 5 ตามลำดับ จากนั้นนำค่า Ct ที่ได้ ไปคำนวณการแสดงออกโดยใช้วิธี Delta Ct โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้ $\text{delta Ct} = \text{Ct} (\text{gene of interest}) - \text{Ct} (\text{housekeeping gene})$ และนำไปแสดงเป็นแผนภาพ heat map ต่อไป

ตาราง 4 โพรเบอ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกยีนของแบคทีเรียโอฟาจ vPhT2

Gene	Forward primer 5' to 3'	Reverse primer 5' to 3'
<i>gp69</i>	TCGAACTGCAATTGAGGCAT	ATCCTTTGCGCAATCATGGA
<i>gp72</i>	CGCCAATTTGAAGGCTTGAG	GCCTGTTCTTCTGTGCAAAC
<i>gp114</i>	ATATCCGTGAAGCAAAGCGT	GTGAGTTACACCCATGCGAA
<i>gp173</i>	GTTGCAGGTAACGAAACACG	GGCATTACCACCAACCTCAA
<i>gp229</i>	TTCTGGCTATACACCAGCCT	TTTACCGCAGTTTGTTCGCG
<i>gp89</i>	TTTGGGTGAAAGCTGATGCT	TGCGACATGTGCTATTTGGA
<i>gp237</i>	TCCGGGTGATGTAAACGAC	TTGCATTGTTTTTCGCAGCA
<i>gp035</i>	ACCGCTGGTAAAACAGTTGA	TGACATGCCACCAAGAGATG
<i>gp062</i>	TGGCTATATCGACGGCAATG	TCAACCGTTCAATACGAGCG
<i>gp090</i>	AGCTGAATGTTCCAGCCAAA	ACGCCAATTATCCCAAGACC

ตาราง 5 โพรเบอ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกยีนของ *A. baumannii* 329

Gene	Forward primer 5'to 3'	Reverse primer 5'to 3'
<i>16s rRNA</i>	GCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGG	ATCGTTTACGGCATGGACTAC
<i>gyrB</i>	CGAGGGTGACTCAGCGGGTG	GCGCACGCTCAACGTTTCAGG
<i>RpoH</i>	TACGCTTCGTCGTTACATT	GATACAAGACGTACGCCCAT
<i>dnaE</i>	ACAGCATGGTAAAAGCCCA	AGTCCGTTATTTTCGGCAGTC
<i>rho</i>	GGTCATGTGCTTAATCCGGT	ACGGTCTTACCAGCAATTT
<i>metXA</i>	TTTGCCGACCAGTCTTTTGA	CACACGCACCATGTCTCTTA
<i>clpP</i>	GATTCCGTGGTCAAGCATCA	CGATCGGTATCACGAGCAAT
<i>coaBC</i>	CCGTATGCCAGAACCAGAAG	TTACAACCTCGCTTACCTGCC
<i>kpdA</i>	CGCGACCTTAAGAGCTTTCT	CGGACTGTAGGGCGAATTAC
<i>dadA</i>	TGCTAATGAACTCGGTCGTG	TAGCAGTCGCCTGTTTCATC

3.5 การศึกษาฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้ง *A. baumannii* 329

3.5.1 การออกแบบเปปไทด์

จากการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* 329 (vPhT2) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Styles et al., 2020) นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเอนโดไลซินทำการค้นหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) โดยใช้ MOTIF search (<https://www.genome.jp/tools/motif/>) จากนั้นนำลำดับอนุรักษ์ที่ได้ทำการออกแบบเปปไทด์โดยใช้ Peptide Design Library (<https://www.biosyn.com/peptidescreeningtools.aspx>) ให้มีความยาว 25 กรดอะมิโน ก่อนนำไปทำนายความสามารถในการเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพโดยใช้ Antimicrobial Peptide Database (<https://aps.unmc.edu/>) และทำการทำนายโครงสร้างของเปปไทด์ต้านจุลชีพโดยใช้ I-TASSER web server (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>)

3.5.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC)

วิธีการนี้เป็นการหาค่าความเข้มข้นของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329 โดยใช้วิธี broth microdilution method โดยใช้ 96 Well Round (U) Bottom Plate Thermo Scientific™ เริ่มจากการนำเชื้อ *A. baumannii* 329 เลี้ยงบนอาหาร Mueller–Hinton Agar (MHA) ทำการบ่มเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเตรียม bacterial suspension โดยนำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารไปทำการปรับความขุ่นโดยมีค่า McFarland เท่ากับ 0.5 (1×10^8 CFU/มิลลิลิตร) ใน 0.85% NaCl โดยเครื่อง Densitometer จากนั้นทำการเจือจางเชื้อให้มีปริมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ในอาหาร 2X Cation-Adjusted Mueller–Hinton Broth (CAMHB) หลังจากนั้นเตรียมความเข้มข้นของเปปไทด์โดยให้คอลัมน์แรก ของ 96 Well Round (U) Bottom Plate Thermo Scientific™ มีความเข้มข้นสูงสุดและทำการเจือจางให้ความเข้มข้นของเปปไทด์ลดลงทีละสองเท่า (Two-fold dilution) ในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรรวมทั้งหมด 100 ไมโครลิตร สำหรับหลุมที่ไม่มีเปปไทด์ จะถูกใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ ในขณะที่หลุมที่มียาปฏิชีวนะใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก และความหนาแน่นของเชื้อแต่ละหลุมจะอยู่ประมาณ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับการอ่านค่า MIC คือการสังเกตค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อใน 96 Well Round (U) Bottom Plate (Conlon et al., 2009)

3.5.3 การศึกษาการเสริมฤทธิ์เปปไทด์ต้านจุลชีพ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพพร้อมกับยาปฏิชีวนะ โดยเริ่มจากการทดสอบปฏิกิริยาเบื้องต้นในการเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะทั้งหมด 5 ชนิดคือ colistin

imipenem tigecycline tetracycline และ ceftazidime และ chelating agent 1 ชนิดคือ EDTA โดยเริ่มจากนำเปปไทด์ต้านจุลชีพความเข้มข้นที่มีความเข้มข้น $0.25 \times \text{MICs}$ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาทำการทดสอบโดยนำไปผสมกับยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้น $0.25 \times \text{MICs}$ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมรวมกันกับเชื้อ *A. baumannii* 329 ที่มีปริมาณ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน Thermo Scientific™ 96 Well Round (U) Bottom Plate โดยใช้ sterilized water เป็นตัวควบคุมผลลบ และทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบเวลาแล้วทำการเติม 0.1 % TTC (2,3,5 Triphenyl tetrazolium chloride, Himedia™) 25 ไมโครลิตร ทุกหลุม จากนั้นทำการบ่มต่อในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* 329

จากนั้นนำยาที่มีปฏิกริยาร่วมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพมาทำการทดสอบ checkerboard assay และคำนวณดัชนีวัดการเสริมฤทธิ์ (fractional inhibitory concentration (FIC) index) เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดของเปปไทด์ต้านจุลชีพและยาที่สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329 เริ่มจากการนำเปปไทด์ต้านจุลชีพมาเจือจางแบบ 2-fold serial dilution ในแนวตั้งภายใน 96 Well Round (U) Bottom Plate Thermo Scientific™ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในแถว A ถึง แถว G จากนั้นทำการเจือจางยา colistin ให้มีความเข้มข้น 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายใน 1.5 ml tube ก่อนนำไปผสมรวมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้ทำการเจือจางไว้แล้วใน 96 Well Round (U) Bottom Plate Thermo Scientific™ ก่อนหน้านี้ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และทำการเติมเชื้อ *A. baumannii* 329 ให้มีความหนาแน่นภายในหลุมปริมาณ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับแถว H1 ถึง H10 เป็นหลุมในการทดสอบ MIC ของยา และคอลัมน์ A11 ถึง H7 เป็นหลุมการทดสอบ MIC ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ และใช้คอลัมน์ A12 ถึง D12 เป็นตัวควบคุมผลบวก และ E12 ถึง H12 เป็นตัวควบคุมผลลบก่อนนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบเวลาแล้วทำการเติม 0.1 % TTC (2,3,5 Triphenyl tetrazolium chloride, Himedia™) 25 ไมโครลิตร ทุกหลุม จากนั้นทำการบ่มต่อในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการสังเกตการเปลี่ยนสี และคำนวณการหาค่า FIC index โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้ โดยที่ A และ B คือค่า MIC ของสารที่ผสมรวมกัน และค่า MIC_A และ MIC_B คือค่า MIC ของสาร A และ B ที่ไม่ได้ผสมร่วมกับสารอื่น

สูตรการคำนวณหาค่า FIC index (Lorian, 2005)

$$FIC\ index = \frac{A}{MIC_A} + \frac{B}{MIC_B} = FIC_A + FIC_B$$

โดยมีค่าดัชนีวัดการเสริมฤทธิ์ ดังนี้

ค่า FIC index มีค่า < 0.5 แสดงถึงการเสริมฤทธิ์กัน

ค่า FIC index มีค่า > 4 แสดงถึงการไม่เสริมฤทธิ์

ค่า FIC index มีค่า 0.5 - 4 แสดงถึงการมีปฏิริยาที่ไม่แตกต่างกัน



บทที่ 4

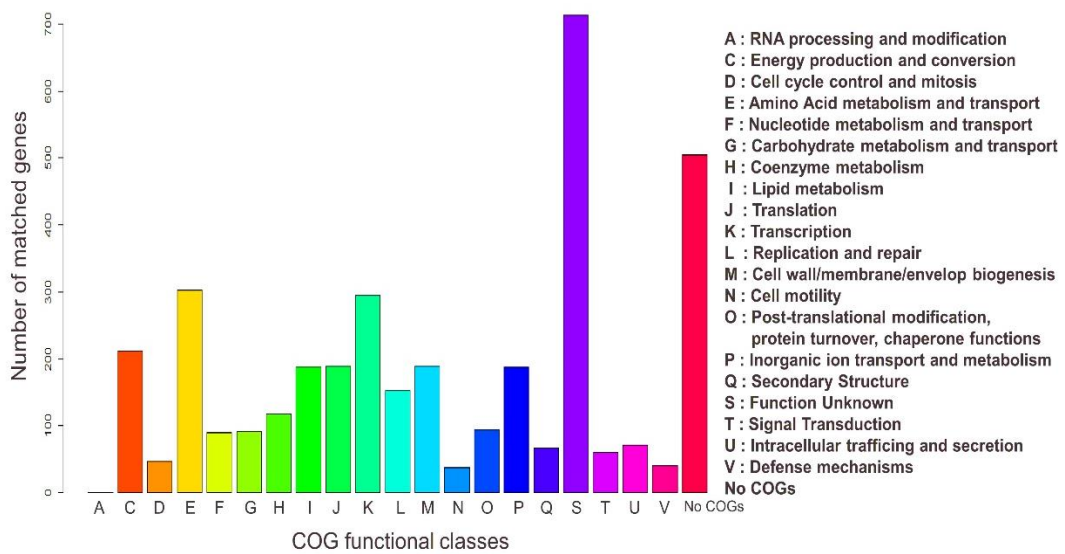
ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปภายในจีโนมและหน้าที่ของยีนแต่ละกลุ่มของเชื้อ

A. baumannii 329

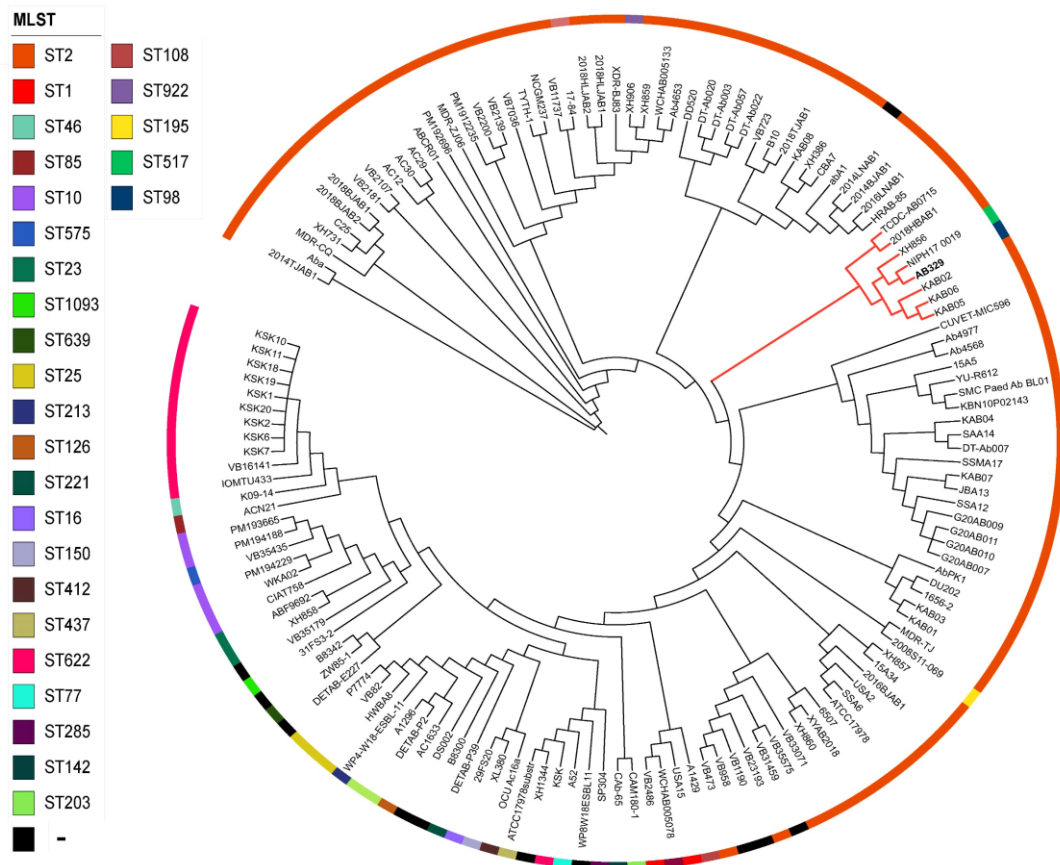
การศึกษาข้อมูลพื้นฐานทั่วไปภายในจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. baumannii* 329 พบว่ามีจำนวน contigs เท่ากับ 256 และมีขนาดจีโนม 3,943,615 bp ซึ่งมีส่วนที่สามารถแปลไปเป็นลำดับกรดอะมิโน (coding sequence (CDS)) 3,726 ยีน และมีจำนวน RNA ทั้งหมด 69 หลังจากนั้นทำการจัดกลุ่มยีนตามบทบาทการทำงานของแต่ละยีนผ่านการวิเคราะห์ COG พบว่า สามารถจัดกลุ่มยีนได้ทั้งหมดตามอักษร A C D E F G H I J K L M N O P Q S T U V และ No COGs โดยแต่ละตัวอักษรจะเป็นสัญลักษณ์ของหน้าที่ของยีนนั้น ๆ ดังภาพ 4



ภาพ 4 การวิเคราะห์ COGs functional classes ภายในจีโนมของเชื้อ *A. baumannii* 329

การวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการของเชื้อ *A. baumannii* 329 กับเชื้อ *A. baumannii* ในทวีปเอเชีย หลังจากการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของเชื้อ *A. baumannii* 329 ทำการศึกษาลำดับวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อ *A. baumannii* ในทวีปเอเชียพบว่า *A. baumannii* 329 จัดอยู่ใน ST98 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อ *A. baumannii* NIPH170019 จัดอยู่ใน ST517 แยกได้จากเลือด ประเทศกัมพูชา และ *A. baumannii* XH856 จัดอยู่ในกลุ่ม ST2 แยกได้จากน้ำในช่องปอดประเทศจีน และมีเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์อื่น ๆ ภายในกลุ่มเดียวกันคือ *A. baumannii* TCDC-AB0715 จัดอยู่ใน ST2 ประเทศไต้หวัน *A. baumannii* 2018HBAB1 จัด

อยู่ใน ST2 แยกได้จากน้ำซ่องห้อง ประเทศจีน *A. baumannii* KAB02 จัดอยู่ใน ST2 แยกได้จากทางเดินหายใจ ประเทศเกาหลีใต้ *A. baumannii* KAB05 จัดอยู่ใน ST2 แยกได้จากเลือด ประเทศเกาหลีใต้ และ *A. baumannii* KAB06 จัดอยู่ใน ST2 แยกได้จากแผล ประเทศเกาหลีใต้
 ดั่งภาพ 5

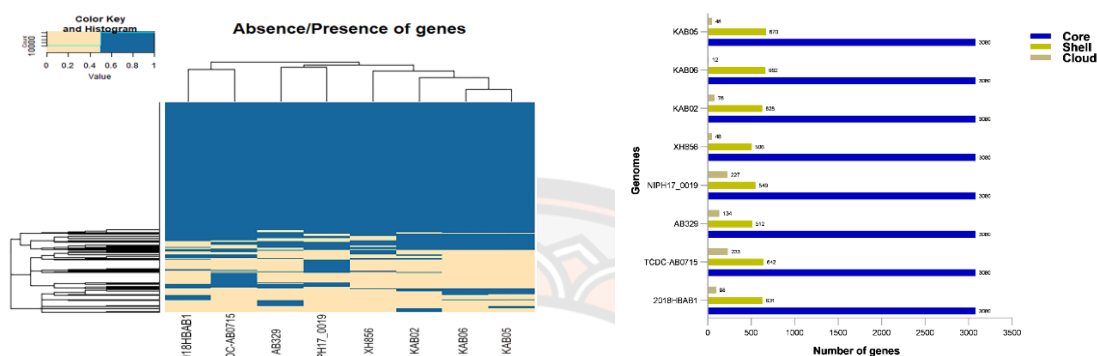


ภาพ 5 แผนภาพวิวัฒนาการของเชื้อ *A. baumannii* 329 ร่วมกับเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 145 สายพันธุ์ในทวีปเอเชีย

4.1.2 การวิเคราะห์ Pangenome ของเชื้อ *A. baumannii* 329 และสายพันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการ

จากการศึกษาลำดับวิวัฒนาการของเชื้อ *A. baumannii* 329 ร่วมกับเชื้อ *A. baumannii* ภายในทวีปเอเชียแล้ว หลังจากนั้นนำเชื้อที่อยู่ภายในกลุ่มเดียวกันภายในสายวิวัฒนาการมาทำการศึกษาคูของยีนทั้งหมดภายในจีโนม *A. baumannii* 329 ร่วมกับสายพันธุ์ข้างเคียงทั้งหมด 7 สายพันธุ์เพื่อศึกษาการได้รับหรือขาดหายของยีนในจีโนมของ *A. baumannii* แต่ละสายพันธุ์

ผลการทดลองหลังจากการวิเคราะห์พบว่า มีส่วนแกนยีน (core gene) จำนวน 3,080 ยีน ส่วนยีนรอบนอก (shell genes) จำนวน 1,108 ยีน และส่วนยีนคลาวด์ (cloud) จำนวน 876 ยีน โดยทำการวิเคราะห์และแสดงเป็นแผนภาพ heat map ดังภาพ 6



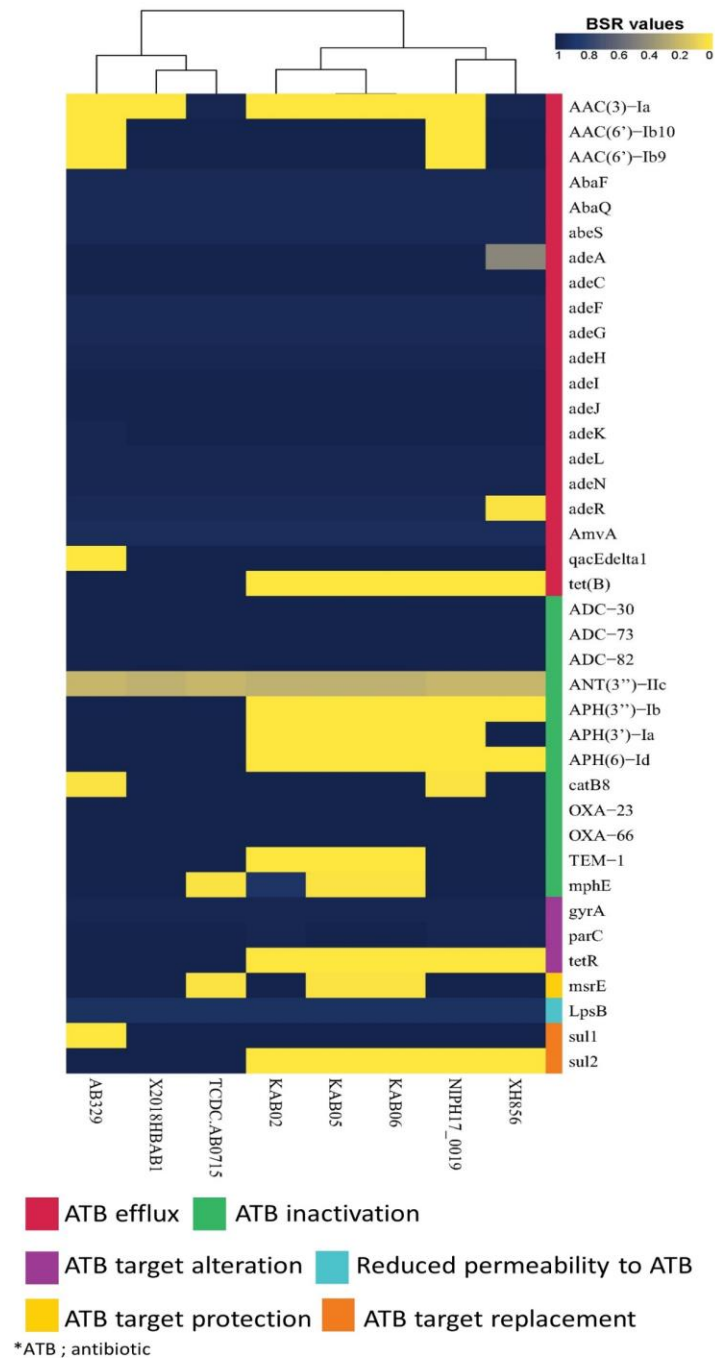
ภาพ 6 การแสดงชุดของยีนทั้งหมดภายในจีโนมของเชื้อ *A. baumannii* 329 เปรียบเทียบกับจีโนมของ *A. baumannii* สายพันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการ โดยสีน้ำเงินแสดงการมีอยู่ของยีน และสีครีมแสดงการไม่มีอยู่ของยีน

4.1.3 การตรวจหายีนดื้อยาและยีนก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* 329 และสายพันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการ

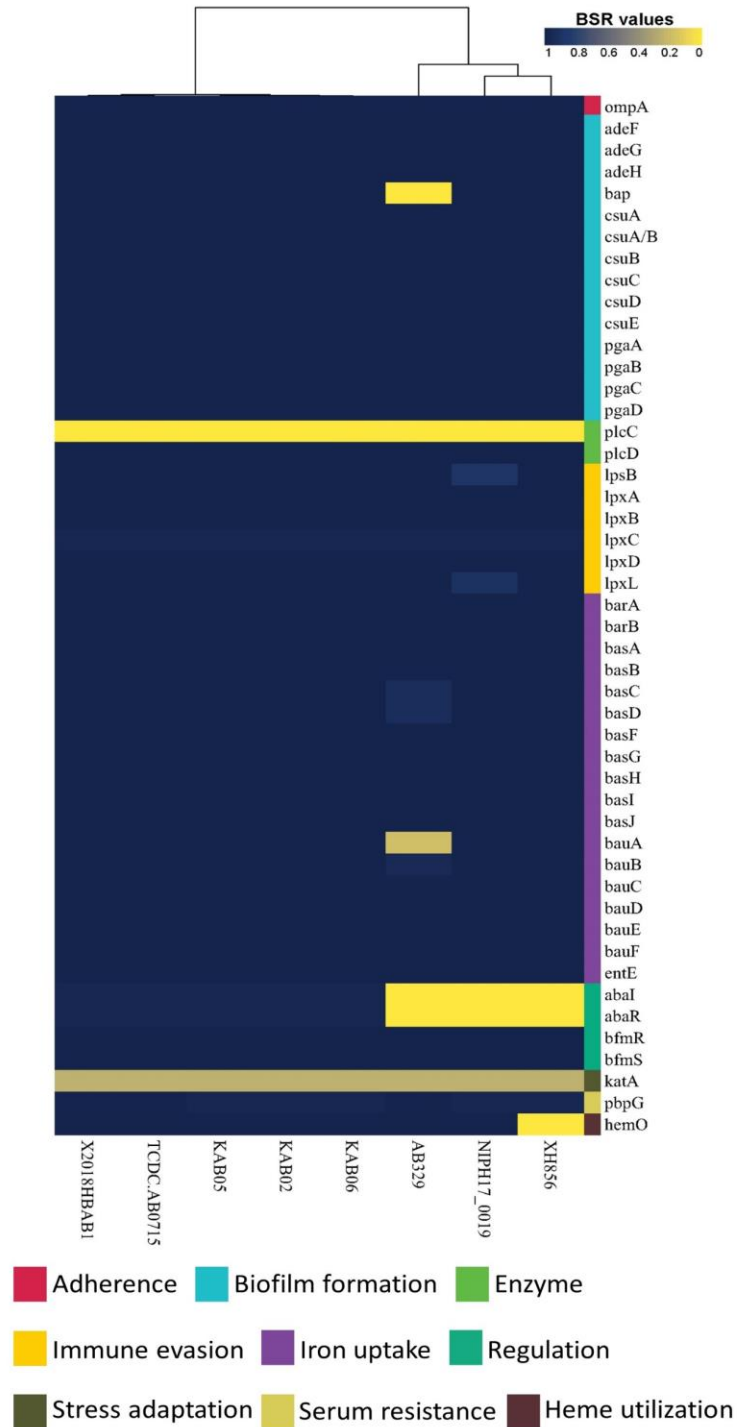
สำหรับการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาโดยใช้ฐานข้อมูลจาก CARD server ทำการตรวจหายีนดื้อยาโดยแบ่งเป็นกลุ่มของกลไกการดื้อยา พบว่าเชื้อ *A. baumannii* 329 และสายพันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการมีกลไกของกรดดื้อยา อาทิเช่น antibiotic inactivation ตามด้วย antibiotic efflux antibiotic target alteration antibiotic target protection reduced permeability to antibiotic และ antibiotic target replacement ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการมียีนดื้อยาพบว่า เชื้อ *A. baumannii* 329 มีรูปแบบยีนดื้อยาคัดล้ายกับเชื้อ *A. baumannii* 2018HBAB1 ที่แยกได้จากประเทศจีน และ *A. baumannii* TCDC-AB0715 จากประเทศไต้หวัน มากไปกว่านั้น เมื่อสังเกตการมีอยู่ของยีนดื้อยาในกลุ่มกลไกต่าง ๆ ที่มีเหมือนกันพบว่า เชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์มียีน กลุ่ม antibiotic inactivation ได้แก่ *AbaF* *AbaQ* *abeS* *adeC* *adeF* *adeG* *adeH* *adel* *adeJ* *adeK* *adeL* *adeN* *AmvA* กลุ่ม antibiotic efflux ได้แก่ *bla*_{ADC-30} *bla*_{ADC-73} *bla*_{ADC-82} *bla*_{OXA-23} *bla*_{OXA-66} กลุ่ม antibiotic alteration ได้แก่ *gyrA* *parC* และกลุ่ม reduced permeability to antibiotic ได้แก่ *LpsB* ดังภาพ 7

ในการตรวจหายีนก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* 329 และสายพันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการผ่านฐานข้อมูล VFDB เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนหรือไม่มี สามารถจัดกลุ่มของยีนก่อโรคได้ 8 กลุ่ม ได้แก่ adherence biofilm formation enzyme immune evasion iron uptake (Acinetobactin และ heme utilization) regulation stress adaptation และ serum resistance โดยพบว่ากลุ่มยีนก่อโรคที่พบได้ในทุกสายพันธุ์คือ กลุ่ม adherence ได้แก่ ompA กลุ่ม biofilm formation ได้แก่ *adeF adeG adeH csuA/B csuA csuB csuC csuD csuE pgaA pgaB pgaC* และ *pgaD* กลุ่ม enzyme ได้แก่ *plcD* กลุ่ม immune evasion ได้แก่ *lpsB lpxA lpxB lpxC lpxD lpxL* และ *lpxM* กลุ่ม iron uptake ได้แก่ *barA barB basA basB basC basD basF basG bash basI basJ bauA bauB bauC bauD bauE bauF entE* และ *hemO* กลุ่ม regulation ได้แก่ *bfmR* และ *bfmS* กลุ่ม serum resistance ได้แก่ *pbpG* สำหรับยีนที่ไม่พบในเชื้อ *A. baumannii* ทุกสายพันธุ์ ได้แก่ *plcC katA* และยีน *abaR abal* ใน *A. baumannii* 329 *A. baumannii* NIPH17-0019 *A. baumannii* XH856 นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *bap* ไม่พบใน *A. baumannii* 329 และไม่พบยีน *hemO* ในเชื้อ *A. baumannii* XH856

ดั่งภาพ 8



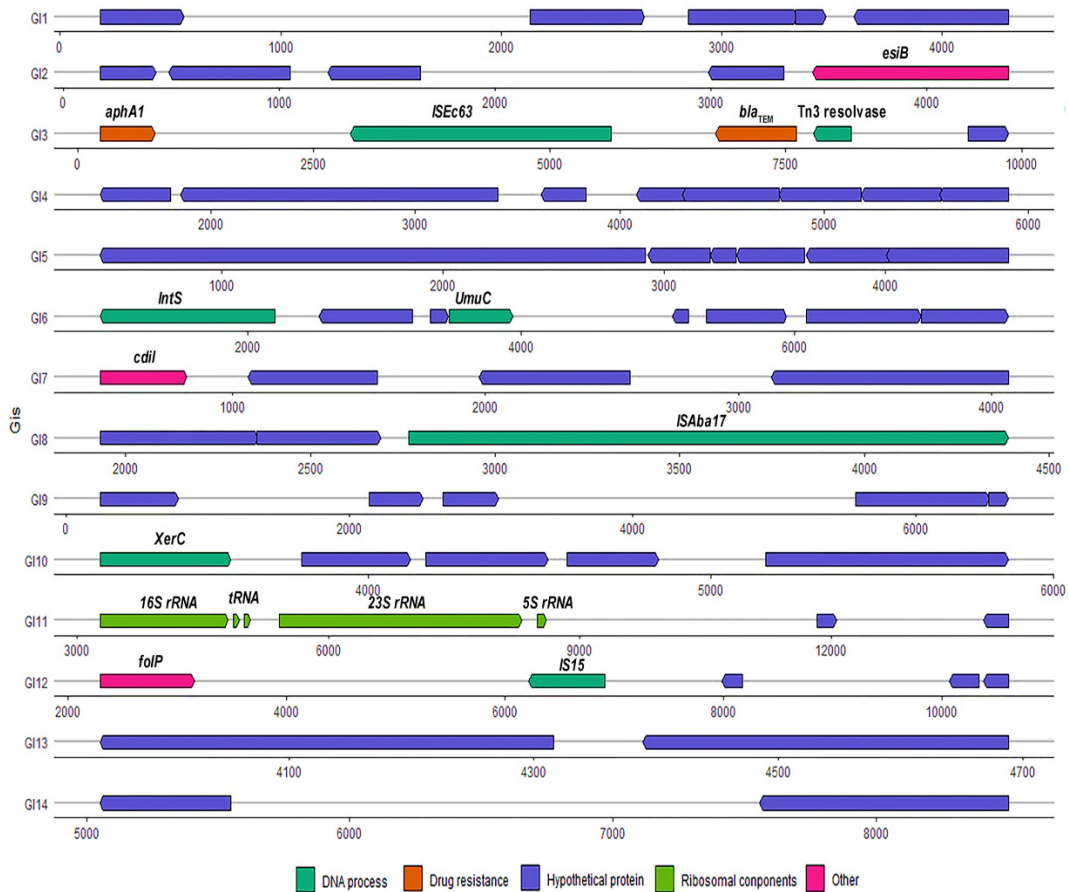
ภาพ 7 การตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* 329 ร่วมกับเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันทางสายวิวัฒนาการ ซึ่งจำแนกออกเป็นกลุ่มของกลไกในการดื้อยาปฏิชีวนะโดยค่า BSR มากกว่า 0.6 แสดงถึงการมีอยู่ของยีน และค่า BSR น้อยกว่า 0.4 แสดงถึงการไม่มีอยู่ของยีน



ภาพ 8 การตรวจหายีนก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* 329 ร่วมกับเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันทางสายวิวัฒนาการซึ่งจำแนกออกเป็นกลุ่มกลไกของยีนก่อโรค โดยค่า BSR มากกว่า 0.6 แสดงถึงการมีอยู่ของยีน และค่า BSR น้อยกว่า 0.4 แสดงถึงการไม่มีอยู่ของยีน

4.1.4 การตรวจหา Genomic Islands ของเชื้อ *A. baumannii* 329

การตรวจหา GIs ของเชื้อเพื่อศึกษาการได้รับยีนเข้ามาภายในจีโนมจากสภาพแวดล้อม พบว่ามีจำนวน GI ทั้งหมด 14 GIs ซึ่งในแต่ละ GI มียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาได้แก่ *aphA1* *bla_{TEM}* และ *folP* ยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอได้แก่ *umuC* และ *xerC* ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้แก่ *EsiB* (*E. coli* secretory immunoglobulin A-binding protein) และ *cdiI* โดยเฉพาะใน GI3, GI8, และ GI12 มี mobile genetic element (MGE) ได้แก่ ISEc63 ISAbA17 และ IS15 รวมถึงเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการ DNA recombination คือ Tn3 resolvase สำหรับใน GI11 มียีนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของไรโบโซมได้แก่ 16S rRNA tRNA 23S rRNA และ 5S rRNA ภาพ 9



ภาพ 9 การตรวจหา GIs ของเชื้อ *A. baumannii* 329 โดยใช้ Island viewer โดยลูกศรจะแสดงทิศทางการจัดเรียงตัวของยีนในแต่ละ GI

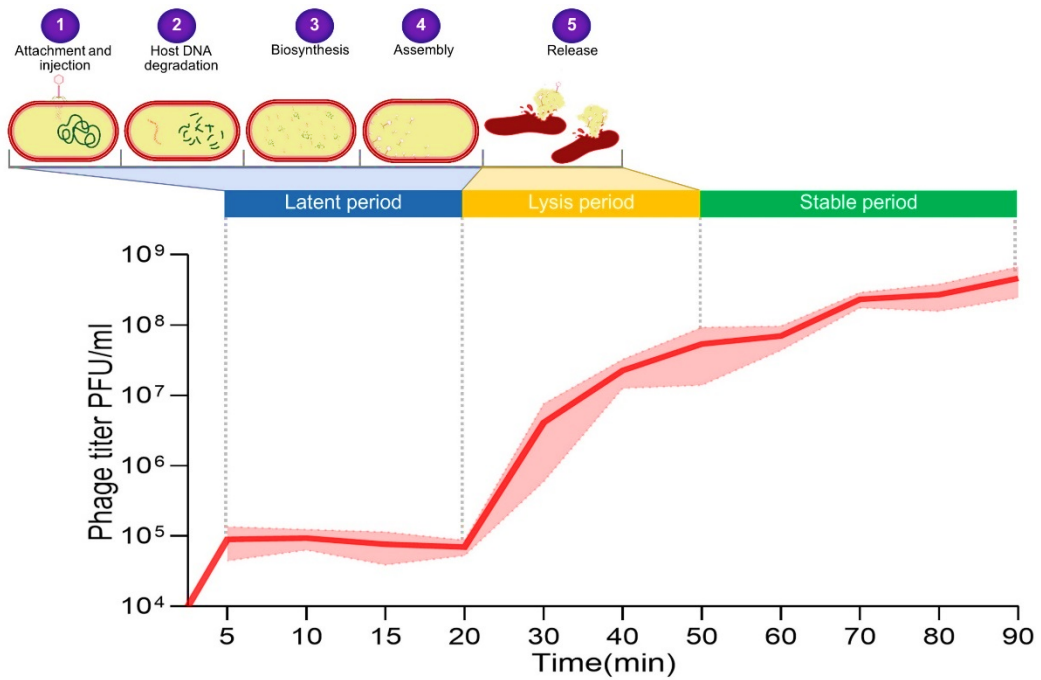
4.1.5 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจ vPhT2 โดยวิธี One-step growth curved

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโอฟาจในแต่ละช่วงเวลาจากนาที่ที่ 5 จนถึง 90 นาที พบว่าแบคทีเรียโอฟาจมีช่วงเวลาที่เข้าไปเกาะติดกับเซลล์แบคทีเรีย และฉีดสารพันธุกรรมเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย ก่อนเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ จนเข้าสู่กระบวนการประกอบรูปร่างให้สมบูรณ์ในช่วงระยะเวลา 5 นาที ถึง 20 นาทีแรกโดยสังเกตเห็นจากจำนวนอนุภาคของแบคทีเรียโอฟาจไม่มีการเพิ่มขึ้น จากนั้นแบคทีเรียโอฟาจจะเข้าสู่กระบวนการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียเพื่อปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจออกมาภายนอกเซลล์พบว่าแบคทีเรียโอฟาจมีช่วงเวลาที่ปลดปล่อยอนุภาคออกมาในช่วงเวลา 20 นาที ถึง 50 นาที ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณอนุภาคเพิ่มขึ้น ก่อนเข้าสู่ระยะคงที่โดยแบคทีเรียโอฟาจจะมีปริมาณการปลดปล่อยอนุภาคออกมากที่สุดในช่วงเวลา 50 นาที ถึง 90 นาที ดังภาพ 10

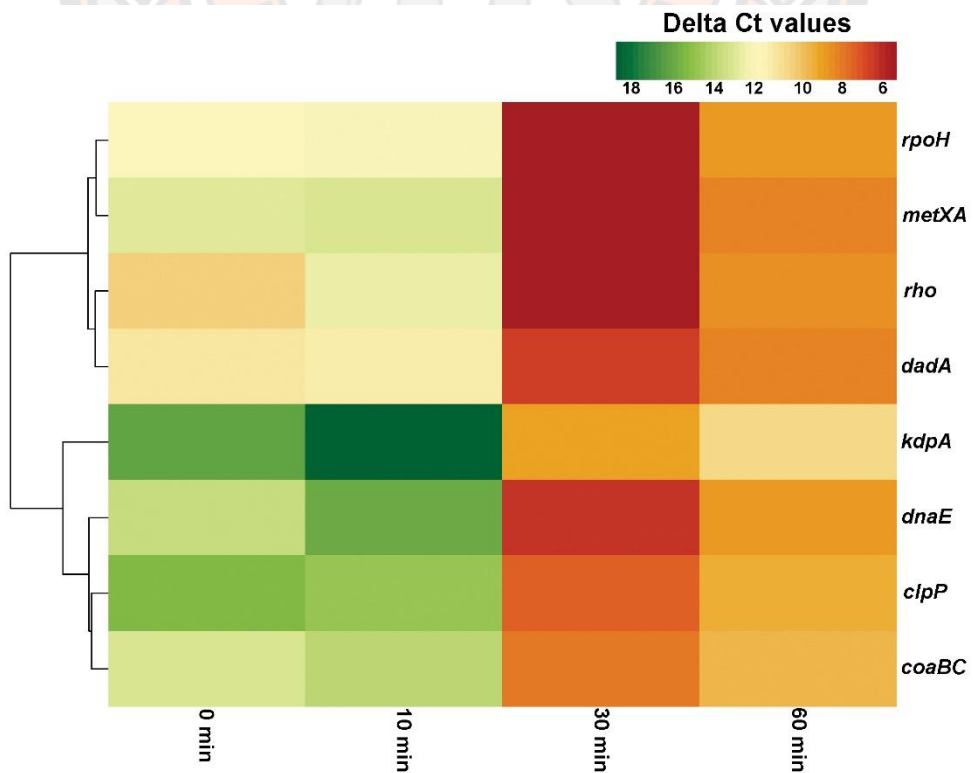
4.1.6 การแสดงออกยีนของเชื้อ *A. baumannii* 329 และแบคทีเรียโอฟาจ vPhT2 ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอฟาจ

การศึกษาปริมาณการแสดงออกยีนของเชื้อ *A. baumannii* 329 และแบคทีเรียโอฟาจ vPhT2 โดยใช้เทคนิค qPCR เพื่อศึกษาการแสดงออกยีนของเชื้อ *A. baumannii* 329 ในแต่ละช่วงเวลาโดยทำการคำนวณหา delta Ct โดยใช้ยีน *16S rRNA* เป็นตัวควบคุมภายใน พบว่ายีนมีการแสดงออกลดลงในช่วงเวลา 10 นาที ในช่วงของการติดเชื้อระยะแรกโดยแบคทีเรียโอฟาจ หลังจากนั้นพบว่าในช่วง 30 นาที ยีนของแบคทีเรียโอฟาจมีการแสดงออกมากหลังจากที่แบคทีเรียโอฟาจเข้าสู่ระยะทำลายเซลล์ของแบคทีเรีย และในระยะสุดท้ายของการติดเชื้อในช่วงเวลา 60 นาที พบว่ายีนมีการแสดงออกลดลงเมื่อทำการเปรียบเทียบกับช่วงเวลา 30 นาที ดังภาพ 11

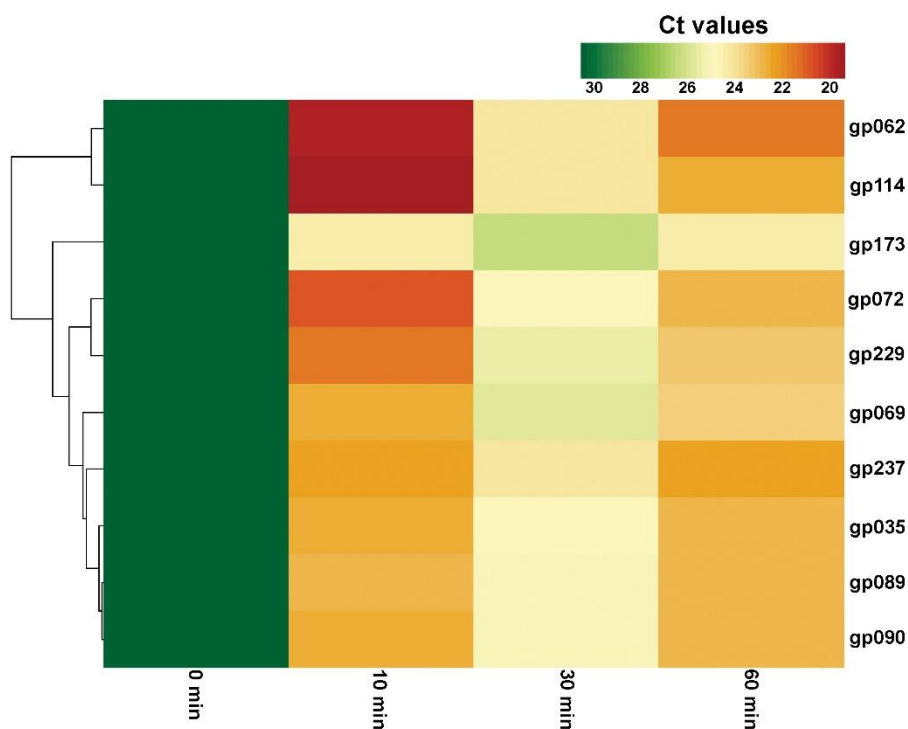
หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกยีนของแบคทีเรียโอฟาจ vPhT2 ในแต่ละช่วงเวลาของการติดเชื้อ *A. baumannii* 329 พบว่ายีนมีการแสดงออกมากในช่วง 10 นาที โดยมียีนที่แสดงออกมากที่สุดคือ *gp114* และ *gp062* หลังจากนั้นในช่วง 30 นาที พบว่าทุกยีนมีการแสดงออกลดลง และมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในช่วง 60 นาที อีกครั้งในระยะ stable period ดังภาพ 12



ภาพ 10 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียของแบคทีเรียไวรัส vPhT2 ในระหว่างการติดเชื้อ *A. baumannii* 329 โดยใช้วิธี One-step growth curve



ภาพ 11 การแสดงออกยีนของเชื้อ *A. baumannii* 329 ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียไวรัส vPhT2



ภาพ 12 การแสดงออกของโปรตีนของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 ระหว่างการติดเชื้อ *A. baumannii* 329

4.1.7 ลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

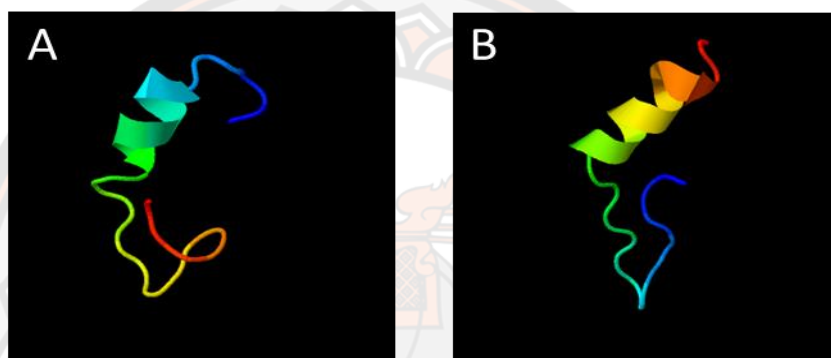
เปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์และทำนายความสามารถในการเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพโดยใช้โปรแกรมหลักคือ APD web application ได้ผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 ลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 และ vPhT02(7)

No	Code	Sequence	AA-length	MW(Da)	Average hydrophathy value	Total hydrophobic ratio (%)	Total net charge
1	vPhT02	LNSKDYAGAAQ XXXXXXXXXXXXXXXX	25	2735	-0.34	44%	+4.00
2	vPhT02(7)	WNKGRVKGKLEV XXXXXXXXXXXXXXXX	25	2906	-1.32	28%	+7.00

*ตัวอักษรสีแดงแสดงถึงกรดอะมิโนที่มีประจุบวกภายในสายเปปไทด์

โดยเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 ขนาด 2.7 kDa มีค่าเฉลี่ย hydrophathy -0.34 มีร้อยละของ hydrophobic ratio เท่ากับ 44 และมีผลรวมประจุเป็นบวกจำนวน 4 สำหรับเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7) ขนาด 2.9 kDa มีค่าเฉลี่ย hydrophathy -1.32 มีร้อยละของ hydrophobic ratio เท่ากับ 28 มีผลรวมประจุเป็นบวกจำนวน 7 จากนั้นทำการทำนายโครงสร้างของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhTh02 และ vPhTh02(7) พบว่าในกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal ไปยัง C-terminal ในตำแหน่งที่ 1 ถึง 8 มีลักษณะขด (coil) ตำแหน่งที่ 9 ถึง 12 มีลักษณะเกลียว (helix) ตำแหน่ง 13 ถึง 16 มีลักษณะเป็นแผ่น (sheet) และตำแหน่งที่ 17 ถึง 25 มีลักษณะขด (coil) แสดงดังภาพ 13



ภาพ 13 โครงสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 (A) และโครงสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7)(B)

4.1.8 การหาปริมาณความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของเปปไทด์และยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

การศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 และ vPhT02(7) โดยการหาค่า MIC พบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 มีค่า MIC มากกว่า 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7) มีค่า MIC 1,250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะและ EDTA ทั้งหมด 7 ชนิด พบว่ายาที่มีค่า MIC น้อยที่สุดคือ tigecycline ตามด้วย colistin tetracycline ceftazidime EDTA imipenem ampicillin และkanamycin ตามลำดับ ดังตาราง 7

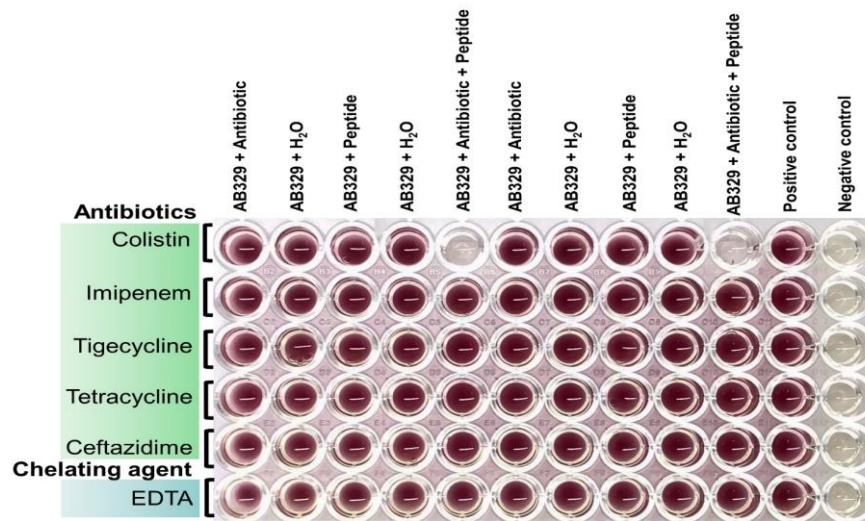
4.1.9 การทดสอบ Checkerboard assay

เมื่อทำการศึกษาการหาค่า MIC ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ ยาปฏิชีวนะ และ EDTA พบว่าค่า MIC ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ vPhT02 จึงทำการคัดเลือกมาทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ ร่วมกับยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด และ EDTA โดยนำค่าความเข้มข้น $0.25 \times \text{MIC}$ ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7) และความเข้มข้น $0.25 \times \text{MIC}$ ของยาปฏิชีวนะและ EDTA มาทำการทดสอบโดยมี

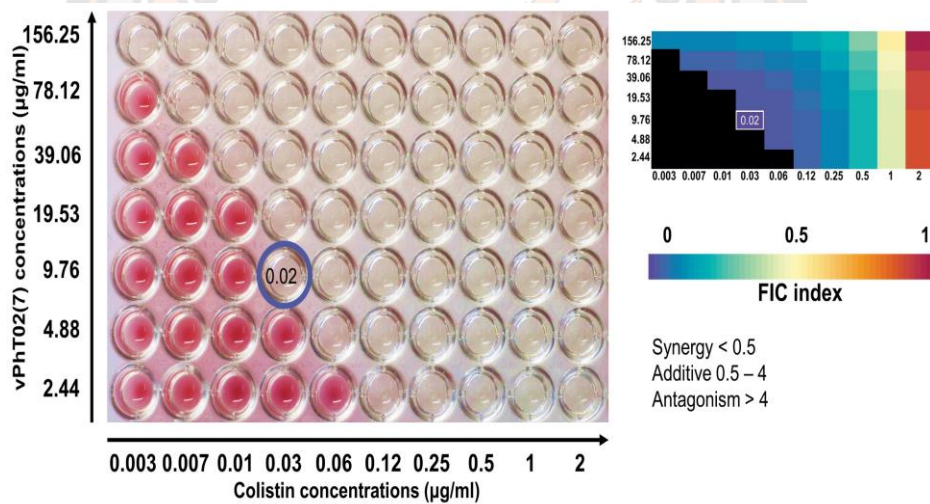
น้ำเปล่าบริสุทธิ์เป็นตัวควบคุม พบว่าในหลุมที่มีความเข้มข้น $0.25 \times \text{MIC}$ ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ ยาบปฏิชีวนะ และ EDTA เพียงชนิดเดียวไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329 ได้ ในขณะที่หลุมที่มีการผสมร่วมกันระหว่างยาปฏิชีวนะ $0.25 \times \text{MIC}$ colistin ร่วมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ $0.25 \times \text{MIC}$ vPhT02(7) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329 ได้ดังภาพ 14 ทำให้ทราบว่า มีเพียงยา colistin ชนิดเดียวที่สามารถมีปฏิกริยาร่วมกันกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7) จึงทำการคัดเลือกยา colistin มาทดสอบในขั้นต่อนต่อไป โดยนำยา colistin ที่มีปฏิกริยาร่วมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7) มาทำการทดสอบ checkerboard assay และคำนวณดัชนีวัดการเสริมฤทธิ์ พบว่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของเปปไทด์ต้านจุลชีพ 9.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของยา colistin 0.03 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อได้ เมื่อทำการคำนวณหาค่าดัชนีวัดการเสริมฤทธิ์พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.02 ซึ่งเป็นค่าที่ชี้วัดว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02(7) และ ยา colistin มีปฏิกริยาส่งเสริมฤทธิ์ในการยับยั้ง *A. baumannii* 329 ร่วมกัน ดังภาพ 15

ตาราง 7 ค่า MIC ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ vPhT02 vPhT02(7) ยาบปฏิชีวนะ และEDTA ในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329

Antimicrobial peptides	MIC	
	µg/ml	µM
vPhT02	>2500	>914
vPhT02(7)	1250	430
Antibiotics และ chelating agent	MIC	
	µg/ml	µM
colistin	2	34.62
imipenem	625	2087
tigecycline	1	34.15
tetracycline	500	1125
ceftazidime	500	914
ampicillin	10000	28620
kanamycin	>20000	>41279
EDTA	500	1710



ภาพ 14 การทดสอบการมีปฏิริยาของเปปไทด์ต้านจุลชีพร่วมกับยาปฏิชีวนะ และ EDTA



ภาพ 15 การทดสอบ Checkerboard assay เพื่อหาค่าดัชนีวัดการเสริมฤทธิ์ของเปปไทด์ที่มีปฏิริยาร่วมกันกับยา colistin ในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329

บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผล

การศึกษาค้างนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจีโนมและการแสดงออกยีนของเชื้อ *A. baumannii* 329 ระหว่างติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจ vPhT2 เพื่อนำเปปไทด์ที่ได้จากแบคทีเรียโอเฟจไปประยุกต์ใช้ การศึกษา COGs (ภาพ 4) พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ *A. baumannii* AB030 ที่เป็นเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิด พบว่ามีรูปแบบของจำนวนกลุ่มยีนมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะกลุ่ม No COGs และกลุ่ม S (Singh et al., 2020) ซึ่งเห็นว่ายีนจำนวนมากภายในจีโนมของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดเป็นยีนที่ยังไม่เคยถูกจัดกลุ่มลงในฐานข้อมูล COG และไม่ทราบกลไกของยีนตามลำดับ

การศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของเชื้อ *A. baumannii* 329 จัดอยู่ในกลุ่ม ST98 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่พบการระบาดมากในประเทศไทย พบการระบาดเพียงร้อยละ 2.96 จากการศึกษาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (Khuntayaporn et al., 2021) และมีการรายงานพบการระบาดของ ST98 ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem ในประเทศโปรตุเกส คูเวต และปาเลสไตน์ (Bolourchi et al., 2022) และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับใกล้เคียงกับกลุ่มสายพันธุ์ ST2 ที่เป็นสายพันธุ์แพร่กระจายอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชีย (Wareth et al., 2021) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการศึกษา MLST ไม่สอดคล้องกับการศึกษาลำดับวิวัฒนาการ เนื่องจาก MLST เป็นการนำยีน house keeping มาทำการศึกษาทำให้มีข้อมูลที่ใช้น้อยทำให้ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ต่างจากการศึกษาลำดับวิวัฒนาการ (Tsang et al., 2017)(ภาพ 5) เมื่อศึกษา pangenome ของเชื้อร่วมกับสายพันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการพบว่าเชื้อที่นำมาวิเคราะห์มีจำนวนแกนยีนจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวน่าจะมีบรรพบุรุษมาจากเชื้อสายพันธุ์เดียวกันและขนาดของ pangenome ที่แสดงมีส่วนที่เหมือนและแตกต่างกันออกไปในแต่ละช่วงโดยเกิดขึ้นได้เนื่องจาก 3 ปัจจัยหลักคือ (1.) เชื้อมีความสามารถที่รับ DNA ใหม่เข้ามาภายในโครโมโซมของตัวเอง (2.) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เชื้อมีการคัดเลือกยีนเข้ามาเพื่อที่จะปรับตัวให้สามารถดำรงอยู่ได้ และปัจจัยสุดท้าย(3.) วิวัฒนาการตามกาลเวลาทำให้เชื้อแต่ละสายพันธุ์สะสมความแตกต่างระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตนำไปสู่การเกิดวิวัฒนาการแบบเบนออก (divergence evolution) (Kim et al., 2020; Sela et al., 2021)(ภาพ 6)

จากนั้นได้ทำการศึกษาเชิงลึกภายในจีโนมของเชื้อ *A. baumannii* 329 และสายพันธุ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการ โดยทำการตรวจหายีนดื้อยาภายในจีโนมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (ภาพ

7) แสดงให้เห็นว่ายีน *ade* *abe* และ *aba* ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ antibiotic efflux สามารถพบได้ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยยกเว้นยีน *tet(B)* ที่พบได้บางสายพันธุ์เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ *A. baumannii* ที่แยกได้จากธรรมชาติพบว่าจะไม่พบยีนเหล่านี้ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ (Yakkala et al., 2019) ในกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ antibiotic inactivation ได้แก่ *bla_{OXA}* *bla_{TEM}* และ *bla_{ADC}* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยากลุ่ม beta lactamase พบว่า *A. baumannii* 329 มีความสามารถในการดื้อต่อยากลุ่มนี้ทุกชนิด (Tiwari et al., 2018) และมียีนที่ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycoside ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ O-phosphotransferases (APH) มาทำให้เกิด phosphorylation ของยา aminoglycoside แต่ไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ N-acetyltransferases(AAC) มาทำให้เกิด acetylation ที่หมู่ amino ของยา (Shaw et al., 1993) อีกทั้งยังมียีน *mphE* กำกับการสร้าง macrolide phosphotransferase มีผลต่อการดื้อต่อยากลุ่ม macrolide แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาไม่พบยีน *catB8* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา chloramphenicol (Pawlowski et al., 2018) สำหรับกลุ่ม antibiotic target alteration ยีน *parC* และ *gyrA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ciprofloxacin โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีนทั้งสองนี้จะทำให้เชื้อ *A. baumannii* มีความสามารถในการดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolone เพิ่มมากขึ้น (Aldred et al., 2014) ต่อมาพบการมีอยู่ของยีน *tetR* ส่งผลให้เชื้ออาจจะมีความสามารถในการทนต่อยา tetracycline เนื่องจาก *tetR* มีความสามารถในการจับกับ tetracycline แล้วทำให้ยีนที่กำกับการขนส่งยาออกภายนอกเซลล์ทำงาน (Cuthbertson & Nodwell, 2013) ถัดมาในกลุ่มของ antibiotic target protection พบการมีอยู่ของยีน *mshE* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยากลุ่ม macrolide โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีน *mshE* และ *mphE* มีความสามารถส่งเสริมในการดื้อต่อยาร่วมกัน (López-Durán et al., 2020) กลุ่มยีน reduce permeability to antibiotic คือ *IpsB* เป็นยีนที่กำกับการสังเคราะห์ lipopolysaccharide ที่ผนังเซลล์มีการศึกษาพบว่า มีผลทำให้ค่า MIC ของยากลุ่ม polymyxin เพิ่มมากขึ้น (Bojkovic et al., 2015) และในกลุ่มสุดท้าย กลุ่ม antibiotic target replacement พบยีน *sul2* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม sulfonamides มีการศึกษาการแยก *A. baumannii* ในประเทศไต้หวันพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการดื้อต่อยากลุ่ม sulfonamide มากถึงร้อยละ 71.3 แสดงให้เห็นว่า โดยทั่วไปแล้วเชื้อ *A. baumannii* มีความสามารถในการดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ (Chen et al., 2017)

จากการศึกษาการมีอยู่ของยีนดื้อยาพบว่ามีความสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ของ *A. baumannii* 329 ที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (Kongthai et al., 2021) จากนั้นได้ทำการศึกษายีนก่อโรค (ภาพ 8) ของเชื้อพบว่าเชื้อมียีนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มจำนวนมากที่สังเกตเห็น

ได้อย่างชัดเจนในกลุ่ม biofilm formation ได้แก่ csu pili chaperone-usher assembly system ที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์ม สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มมักจะพบในเชื้อ *A. baumannii* ที่ก่อโรค นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *pgaABCD* operon มีความสำคัญในการสร้างและเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของ poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (β -1,6-GlcNAc; PGA) N-deacetylase และ membrane porin มีการศึกษาพบว่าการไม่มียีน *pgaA* ส่งผลให้การสร้างไบโอฟิล์มลดลงใน *A. baumannii* DS002 แยกได้จากธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบกับ *A. baumannii* AYE เป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างไบโอฟิล์มจำนวนมาก (Yakkala et al., 2019) ต่อมาในกลุ่ม iron uptake พบยีนได้ทุกสายพันธุ์อันเนื่องมาจากเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อก่อโรคที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วย เมื่อเปรียบเทียบกับกรายงานของ Yakkala et al, 2019 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากธรรมชาติจะมียีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้ธาตุเหล็กน้อย และยังพบว่าการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งธาตุเหล็กมีส่วนช่วยให้ลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *A. baumannii* ส่งผลให้การก่อโรคลดทอนลง จากการศึกษาการตรวจหายีนก่อโรคและยีนดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่ให้เห็นว่ายีนก่อโรคของ *A. baumannii* จะพบการมีอยู่ของยีนก่อโรคจำนวนมากที่คล้ายคลึงกันในทุกสายพันธุ์ ในขณะที่การมีอยู่ของยีนดื้อยา เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ พบว่ามีแตกต่างกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าการก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* ในสายพันธุ์ต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อมีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษเดียวกันเปรียบเทียบกับการมีอยู่ของยีนดื้อยาพบแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก อันเนื่องมาจากการได้รับยีนต่าง ๆ เข้ามาผ่านขบวนการถ่ายทอดยีนในแนวราบ (Horizontal gene transfer, HGT) ซึ่งจะเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาเชื้อ *A. baumannii* ด้วยยาปฏิชีวนะที่ระบอบทั่วโลก

เมื่อทำการศึกษา GI พบว่า *A. baumannii* 329 มีจำนวน GI ทั้งหมด 14 GIs (ภาพ 9) ที่ให้เห็นว่าเชื้อมีการได้รับการถ่ายทอดยีนในแนวราบ โดยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน *esiB* ซึ่งมีการศึกษาพบว่าเชื้อ extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) และ intestinal pathogenic *E. coli* (InPEC) ที่มียีนดังกล่าวสามารถที่จะหลบหลีกการทำลายจากเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil ได้ (Pastorello et al., 2013) ยีน *CdiI* ซึ่งกำกับการสร้าง antitoxin ต่อสารที่กำกับโดยยีน *CdiA* ส่งผลให้เชื้อมีความสามารถที่จะดำรงอยู่ร่วมกับประชากรแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ในสภาพแวดล้อม (De Gregorio et al., 2019) นอกจากนี้ยังพบยีนดื้อยา *bla*_{TEM} และ *aphA1* ซึ่งเป็น antibiotic resistance island ที่จะส่งผลทำให้เชื้อสายพันธุ์นี้มีความสามารถที่จะถ่ายทอดยีนไปยังเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ได้ อีกทั้งใน GI11 ซึ่งเป็น genomic islet มีขนาดน้อยกว่า

10 Kbp ที่มียีนเกี่ยวข้องกับ ribosomal protein ภายใน GI แสดงให้เห็นถึงการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในระดับ intragenus หรือ intraspecies ของเชื้อ *A. baumannii* สอดคล้องกับการศึกษาการถ่ายโอนยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยขบวนการ transformation (Tian et al., 2015) จากการศึกษา GIs ภายในจีโนมของ *A. baumannii* 329 แสดงให้เห็นถึงความสามารถที่ส่งเสริมให้เจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ทำให้เชื้อสามารถที่จะดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้เป็นเวลานาน

สำหรับการการศึกษากการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ vPhT02 ในการเข้าไปติดเชื้อ *A. baumannii* 329 (ภาพ 10) พบว่าในแต่ละช่วงเวลาแบคทีเรียโอเฟจ vPhT02 มีช่วง latent period lysis period และ stable period สอดคล้องกับการศึกษากการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจ Abp1 ที่มีวงจชีวิตแบบไลติกเข้าไปติดเชื้อ MDR-AB (Yang, Yin, et al., 2019) จากนั้นเพื่อศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับการแสดงออกยีนของ *A. baumannii* 329 และแบคทีเรียโอเฟจ vPhT02 ระหว่างการติดเชื้อโดยใช้เทคนิค qPCR พบว่าการแสดงออกยีนของเชื้อ *A. baumannii* 329 (ภาพ 11) ได้แก่ *coaBC clpP dnaE kdpA metXA rho rpoH* และ *dadA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมแทบอลิซึม และขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีการแสดงออกน้อยลงเพียงเล็กน้อยในช่วง 10 นาทีแรกหลังจากที่แบคทีเรียโอเฟจเริ่มมีการใช้องค์ประกอบต่าง ๆ ของโฮสต์เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนอนุภาค ทำให้ยีนของโฮสต์มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในช่วง 30 นาที ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียโอเฟจมีการสังเคราะห์สารโมเลกุลต่าง ๆ เพื่อที่จะประกอบรูปร่างอนุภาค และทำลายเซลล์แบคทีเรีย ต่อมาในช่วง 60 นาที ยีนของ *A. baumannii* 329 มีการแสดงออกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วง 30 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียโอเฟจ PaP3 ที่จำเพาะต่อ *Ps. aeruginosa* ในการวิเคราะห์ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway ของเชื้อแบคทีเรียหลังจากติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟจ PaP3 พบว่าในช่วง 30 นาที มียีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมแทบอลิซึมที่ใช้สำหรับการสร้างพลังงานหรือสังเคราะห์สารโมเลกุลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Zhao et al., 2016) จากการศึกษาข้างต้นพบว่าเชื้อ *A. baumannii* 329 มีความสามารถที่จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด และมียีนที่ส่งเสริมการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะและออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพ เพื่อที่จะศึกษาแนวทางการควบคุมหรือยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329 โดยผลการศึกษาพบว่ายา colistin และtigecycline มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ ซึ่งในส่วนของเปปไทด์ต้านจุลชีพพบว่า vPhT02(7) มีค่า MIC เท่ากับ 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตาราง 7)ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า vPhT02 อันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของประจุบวกภายในสายเปปไทด์ที่เพิ่ม

มากขึ้นช่วยให้ vPhT02(7) มีความสามารถที่จะเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *A. baumannii* 329 ได้ ตามการรายงานก่อนหน้านี้ที่ได้มีการศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกในเปปไทด์ด้านจุลชีพ ทำให้ค่า MIC ลดลง(Jiang et al., 2010) ประกอบกับการศึกษาการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของ vPhT02(7)กับยา colistin (ภาพ 15) แล้วพบว่าค่า MIC มีค่าลดลง 128 เท่า และ66เท่าตามลำดับ โดยมีปัจจัยที่ส่งผลให้ colistin มีปฏิกริยาร่วมกับ vPhT02(7) เนื่องจากยา colistin เป็นยาที่มีประจุบวกสูงซึ่งมีความสามารถที่จะไปจับกับประจุลบที่ OM ของ *A. baumannii* 329 และผลึก divalent ions ได้แก่ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ที่ช่วยให้ชั้น OM มีความเสถียรภาพหลุดออกไป (Thummeepak et al., 2016) ในขณะเดียวกันเปปไทด์ด้านจุลชีพ vPhT02(7) ที่มีประจุรวม +7 สามารถที่จะผ่านเข้าสู่ชั้น OM เพื่อที่จะทำลายชั้น peptidoglycan สอดคล้องกับการศึกษาการทดสอบเปปไทด์ด้านจุลชีพที่ได้จากแบคทีเรียโอเฟลจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* ได้แก่ LysAB2 และPlyF307 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าเปปไทด์ด้านจุลชีพมีผลทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อเกิดรูพรุนและทำให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วไหลออกมาเป็นเหตุให้เชื้อตาย(Peng et al., 2017) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเปปไทด์ด้านจุลชีพ vPhT02(7) อาจจะทำให้ผลการศึกษาล้ำคลั่งกับการศึกษาดังที่กล่าวมานี้

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาจีโนมทั้งหมดของ *A. baumannii* 329 ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนาน เพื่อที่จะทราบกลไกการดื้อยา และความสามารถในการดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมรวมถึงการแสดงออกยีนขณะติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟลจ vPhT2 และการนำเปปไทด์ที่ได้จากแบคทีเรียโอเฟลจ vPhT2 มาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อ *A. baumannii* ที่เป็นปัญหาสำคัญในขณะนี้ พบว่าเปปไทด์ด้านจุลชีพเป็นทางเลือกที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับยา colistin เพื่อที่จะลดทอนขนาดและปริมาณของยาที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกาย หรือนำเปปไทด์ที่ได้นำไปพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น อาทิเช่น การดัดแปลงเปปไทด์ที่บริเวณต่าง ๆ รวมถึงการเติมสะพาน hydrocarbon ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาจีโนมและการแสดงออกยีนของเชื้อ *A. baumannii* 329 ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟลจ เพื่อการนำเปปไทด์ที่ได้จากแบคทีเรียโอเฟลจไปประยุกต์ใช้ พบว่า *A. baumannii* 329 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *A. baumannii*

ในฐานข้อมูลที่มีแหล่งที่มามาจากตัวอย่างจากผู้ป่วย มียีนดื้อยาและยีนก่อโรคจำนวนมาก และพบ GIs ที่ทำให้ทราบว่าเชื้อมีการได้รับการโอนถ่ายยีนจากสิ่งแวดล้อม สำหรับการศึกษ

การแสดงออกยีนระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอฟีจแสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อแบคทีเรียโอฟีจ และการเข้าควบคุมแบคทีเรียของแบคทีเรียโอฟีจ โดยมียีน *gp72* ที่กำกับการสร้างเอนไซม์เอนโดไลซินมีการแสดงออกมากในช่วงแรก และช่วงสุดท้าย ที่มีหน้าที่ในการทำลายชั้น peptidoglycan ถูกนำไปใช้ในการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพ ผลการทดลองประสิทธิภาพของเปปไทด์แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ vPhT02(7) สามารถยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* 329 ได้ อีกทั้งยังเสริมฤทธิ์กันร่วมกับยา colistin ทำลาย *A. baumannii* 329 จากการศึกษาครั้งแสดงให้เห็นถึงข้อมูลเชิงลึกของ XDR-*A. baumannii* 329 และแนวทางการควบคุมเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้จากแบคทีเรียโอฟีจ เพื่อการนำไปพัฒนาในอนาคตต่อไป



บรรณานุกรม

- Al-Hassan, L., El Mehallawy, H., & Amyes, S. (2013). Diversity in *Acinetobacter baumannii* isolates from paediatric cancer patients in Egypt. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(11), 1082-1088.
- Albrecht, M. A., Griffith, M. E., Murray, C. K., Chung, K. K., Horvath, E. E., Ward, J. A., Hospenthal, D. R., Holcomb, J. B., & Wolf, S. E. (2006). Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *Journal of the American College of Surgeons*, 203(4), 546-550.
- Alcorlo, M., Salas, M., & Hermoso, J. M. (2007). In vivo DNA binding of bacteriophage GA-1 protein p6. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8024-8033.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574.
- Antunes, L., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292-301.
- Aygün, G., Demirkiran, O., Utku, T., Mete, B., Ürkmez, S., Yılmaz, M., Yaşar, H., Dikmen, Y., & Öztürk, R. (2002). Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 52(4), 259-262.
- Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, 9(3), 119.
- Baran, G., Erbay, A., Bodur, H., Öngürü, P., Akıncı, E., Balaban, N., & Çevik, M. A. (2008). Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 16-21.
- Blair, J., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51.
- Bojkovic, J., Richie, D. L., Six, D. A., Rath, C. M., Sawyer, W. S., Hu, Q., & Dean, C. R. (2015). Characterization of an *Acinetobacter baumannii* lptD deletion strain:

- permeability defects and response to inhibition of lipopolysaccharide and fatty acid biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 198(4), 731-741.
- Bolourchi, N., Azizi, O., Tabrizi, A. M. A., Esmaeili, S., Fereshteh, S., & Badmasti, F. (2022). Clonal relatedness of *Acinetobacter baumannii* isolated from the middle east: A systematic review. *Reviews in Medical Microbiology*, 33(1), e48-e56.
- Bouzari, N., Pissani, F., Montero, R. B., & Davis, S. C. (2005). 143 The Effect of Various Antimicrobial Agents on *Acinetobacter baumannii*: An In Vitro Evaluation. *Wound Repair and Regeneration*, 13(2), A28-A48.
- Briers, Y., & Lavigne, R. (2015). Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiology*, 10(3), 377-390.
- Brown, S., & Amyes, S. (2006). OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 1-3.
- 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.
- Celia, L. K., Nelson, D., & Kerr, D. E. (2008). Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Veterinary Microbiology*, 130(1-2), 107-117.
- Chang, K.-C., Lin, N.-T., Hu, A., Lin, Y.-S., Chen, L.-K., & Lai, M.-J. (2011). Genomic analysis of bacteriophage ϕ AB1, a ϕ KMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Genomics*, 97(4), 249-255.
- Chen, Y., Gao, J., Zhang, H., & Ying, C. (2017). Spread of the blaOXA-23-containing Tn2008 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates grouped in CC92 from China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 163.
- Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S. K., & Lee, J. C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 7(8), 1127-1138.
- Clark, J. R., & March, J. B. (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene

- therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 212-218.
- Conlon, J. M., Ahmed, E., & Condamine, E. (2009). Antimicrobial properties of brevinin – 2-related peptide and its analogs: efficacy against multidrug – resistant *Acinetobacter baumannii*. *Chemical Biology & Drug Design*, 74(5), 488-493.
- Cuthbertson, L., & Nodwell, J. R. (2013). The TetR family of regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 440-475.
- d'Herelle, F. (1930). The bacteriophage and its clinical applications. *The Bacteriophage and its Clinical Applications*.
- De Gregorio, E., Zarrilli, R., & Di Nocera, P. P. (2019). Contact-dependent growth inhibition systems in *Acinetobacter*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Di Venanzio, G., Flores-Mireles, A. L., Calix, J. J., Haurat, M. F., Scott, N. E., Palmer, L. D., Potter, R. F., Hibbing, M. E., Friedman, L., & Wang, B. (2019). Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. *Nature Communications*, 10(1), 1-13.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews Microbiology*, 5(12), 939-951.
- Djordjevic, Z. M., Folic, M. M., Folic, N. D., Gajovic, N., Gajovic, O., & Jankovic, S. M. (2016). Risk factors for hospital infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(10), 1073-1080.
- Doi, Y., Murray, G. L., & Peleg, A. Y. (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance—treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*,
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barezzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3), 50.
- Eder, A. E., Munir, S. A., Hobby, C. R., Anderson, D. M., Herndon, J. L., Siv, A. W., Symes, S. J., & Giles, D. K. (2017). Exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) alter phospholipid composition, membrane permeability, biofilm formation and motility in

Acinetobacter baumannii. *Microbiology*, 163(11), 1626-1636.

- Fournier, P. E., Richet, H., & Weinstein, R. A. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 692-699.
- Freire, M., de Oliveira Garcia, D., Garcia, C., Bueno, M. C., Camargo, C., Magri, A. K., Francisco, G., Reghini, R., Vieira, M., & Ibrahim, K. (2016). Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(4), 352-358.
- Fukuta, Y., Muder, R. R., Agha, M. E., Clarke, L. G., Wagener, M. M., Hensler, A. M., & Doi, Y. (2013). Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among cancer patients. *American Journal of Infection Control*, 41(12), 1249-1252.
- Gorski, A., Miedzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., Lobočka, M., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Zimecki, M., & Filby, G. (2009). Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, 10(8), 766-774.
- Greene, C., Vadlamudi, G., Newton, D., Foxman, B., & Xi, C. (2016). The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *American Journal of Infection Control*, 44(5), e65-e71.
- Haddad Kashani, H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Seyed Hosseini, E., & Moniri, R. (2018). Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: current status of research and novel delivery strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), e00071-00017.
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118-128.
- Harding, C. M., Tracy, E. N., Carruthers, M. D., Rather, P. N., Actis, L. A., & Munson Jr, R. S. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a

role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio*, 4(4), e00360-00313.

- Haseley, S. R., & Wilkinson, S. G. (1997). Structural Studies of the Putative O⁻ Specific Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* O24 Containing 5, 7-Diamino - 3, 5, 7, 9-Tetradeoxy - L - Glycerol - D - Galacto - Nonulosonic Acid. *European Journal of Biochemistry*, 250(2), 617-623.
- Hess, J., Kohl, T., Kotrová, M., Rönsch, K., Paprotka, T., Mohr, V., Hutzenlaub, T., Brüggemann, M., Zengerle, R., & Niemann, S. (2020). Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnology Advances*, 41, 107537.
- Houang, E. T., Chu, Y., Leung, C., Chu, K., Berlau, J., Ng, K., & Cheng, A. (2001). Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 228-234.
- Huang, G., Le, S., Peng, Y., Zhao, Y., Yin, S., Zhang, L., Yao, X., Tan, Y., Li, M., & Hu, F. (2013). Characterization and genome sequencing of phage Abp1, a new phiKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Current Microbiology*, 66(6), 535-543.
- Huang, H., & Masters, M. (2014). Bacteriophage P1 pac sites inserted into the chromosome greatly increase packaging and transduction of *Escherichia coli* genomic DNA. *Virology*, 468, 274-282.
- Huang, L., Sun, L., Xu, G., & Xia, T. (2008). Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(3), 326-332.
- Jaruratanasirikul, S., Nitchot, W., Wongpoowarak, W., Samaeng, M., & Nawakitranngsan, M. (2019). Population pharmacokinetics and Monte Carlo simulations of sulbactam to optimize dosage regimens in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 136, 104940.

- Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A., Heritage, J., & Hawkey, P. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 1938-1941.
- Jiang, Y., Yu, D., Wei, Z., Shen, P., Zhou, Z., & Yu, Y. (2010). Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying bla KPC-2, bla DHA-1, qnrB4, and armA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 3967-3969.
- Kanafani, Z. A., Zahreddine, N., Tayyar, R., Sfeir, J., Araj, G. F., Matar, G. M., & Kanj, S. S. (2018). Multi-drug resistant *Acinetobacter* species: a seven-year experience from a tertiary care center in Lebanon. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 1-8.
- Keen III, 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.
- Khuntayaporn, P., Kanathum, P., Houngsaitong, J., Montakantikul, P., Thirapanmethee, K., & Chomnawang, M. T. (2021). Predominance of international clone 2 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Thailand: a nationwide study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1), 1-11.
- Kim, Y., Gu, C., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2020). Current status of pan-genome analysis for pathogenic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 63, 54-62.
- 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.
- Knapp, S., Wieland, C. W., Florquin, S., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Tshimbalanga, N., Akira, S., & van der Poll, T. (2006). Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumoniae*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(1), 122-129.
- Kongthai, P., Thummeepak, R., Leungtongkam, U., Pooarlai, R., Kitti, T., Thanwisai, A., Chantratita, N., Millard, A. D., & Sitthisak, S. (2021). Insight into molecular

- epidemiology, antimicrobial resistance, and virulence genes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Thailand. *Microbial Drug Resistance*, 27(3), 350-359.
- Lai, M.-J., Lin, N.-T., Hu, A., Soo, P.-C., Chen, L.-K., Chen, L.-H., & Chang, K.-C. (2011). Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ϕ AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 529-539.
- LaVergne, S., Hamilton, T., Biswas, B., Kumaraswamy, M., Schooley, R., & Wooten, D. (2018). Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection. *Open Forum Infectious Diseases*,
- Lee, H.-Y., Hsu, S.-Y., Hsu, J.-F., Chen, C.-L., Wang, Y.-H., & Chiu, C.-H. (2018). Risk factors and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in neonates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(3), 367-376.
- Leung, L. M., McElheny, C. L., Gardner, F. M., Chandler, C. E., Bowler, S. L., Mettus, R. T., Spychala, C. N., Fowler, E. L., Opene, B. N., & Myers, R. A. (2019). A prospective study of *Acinetobacter baumannii* complex isolates and colistin susceptibility monitoring by mass spectrometry of microbial membrane glycolipids. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(3), e01100-01118.
- Leungtongkam, U., Thummeepak, R., Tasanapak, K., & Sitthisak, S. (2018). Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PloS One*, 13(12), e0208468.
- Li, J., Rayner, C. R., Nation, R. L., Owen, R. J., Spelman, D., Tan, K. E., & Liolios, L. (2006). Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2946-2950.
- Lin, N.-T., Chiou, P.-Y., Chang, K.-C., Chen, L.-K., & Lai, M.-J. (2010). Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Research in Microbiology*, 161(4), 308-314.
- Linden, S. B., Zhang, H., Heselpoth, R. D., Shen, Y., Schmelcher, M., Eichenseher, F., & Nelson, D. C. (2015). Biochemical and biophysical characterization of PlyGRCS, a

- bacteriophage endolysin active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2), 741-752.
- Liu, J., Wang, G., Wang, Q., Liu, J., Jin, J., & Liu, X. (2012). Phylogenetic diversity and assemblage of major capsid genes (g23) of T4-type bacteriophages in paddy field soils during rice growth season in Northeast China. *Soil Science and Plant Nutrition*, 58(4), 435-444.
- Lood, R., Winer, B. Y., Pelzek, A. J., Diez-Martinez, R., Thandar, M., Euler, C. W., Schuch, R., & Fischetti, V. A. (2015). Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 1983-1991.
- López-Durán, P. A., Fonseca-Coronado, S., Lozano-Trenado, L. M., Araujo-Betanzos, S., Rugerio-Trujillo, D. A., Vaughan, G., & Saldaña-Rivera, E. (2020). Nosocomial transmission of extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* strains in a tertiary level hospital. *PloS One*, 15(4), e0231829.
- Lorian, V. (2005). *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Lynch III, J. P., Zhanel, G. G., & Clark, N. M. (2017). Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*,
- Makke, G., Bitar, I., Salloum, T., Panossian, B., Alousi, S., Arabaghian, H., Medvecky, M., Hrabak, J., Merheb-Ghoussoub, S., & Tokajian, S. (2020). Whole-genome-sequence-based characterization of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* hospital outbreak. *Msphere*, 5(1), e00934-00919.
- Mancilla-Rojano, J., Castro-Jaimes, S., Ochoa, S. A., Bobadilla del Valle, M., Luna-Pineda, V. M., Bustos, P., Laris-González, A., Arellano-Galindo, J., Parra-Ortega, I., & Hernández-Castro, R. (2019). Whole-genome sequences of five *Acinetobacter baumannii* strains from a child with leukemia M2. *Frontiers in Microbiology*, 10, 132.
- Morgan, D. J., Liang, S. Y., Smith, C. L., Johnson, J. K., Harris, A. D., Furuno, J. P., Thorn, K. A., Snyder, G. M., Day, H. R., & Perencevich, E. N. (2010). Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of

- healthcare workers. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(7), 716-721.
- Morris, F. C., Dexter, C., Kostoulias, X., Uddin, M. I., & Peleg, A. Y. (2019). The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1601.
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., & Viale, A. M. (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1432-1440.
- NARST. (2021). *Antimicrobial Resistance 2000-2020* <http://narst.dmsc.moph.go.th/>
- Oliveira, H., Vilas Boas, D., Mesnage, S., Kluskens, L. D., Lavigne, R., Sillankorva, S., Secundo, F., & Azeredo, J. (2016). Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-gram-negative bacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 208.
- Otter, J. A., Yezli, S., Schouten, M. A., van Zanten, A. R., Houmes-Zielman, G., & Nohlmans-Paulssen, M. K. (2010). Hydrogen peroxide vapor decontamination of an intensive care unit to remove environmental reservoirs of multidrug-resistant gram-negative rods during an outbreak. *American Journal of Infection Control*, 38(9), 754-756.
- Papathanakos, G., Andrianopoulos, I., Papathanasiou, A., Priavali, E., Koulenti, D., & Koulouras, V. (2020). Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: a serious threat for critically ill patients. *Microorganisms*, 8(2), 287.
- Park, Y. S., Lee, H., Lee, K. S., Hwang, S. S., Cho, Y. K., Kim, H. Y., Uh, Y., Chin, B. S., Han, S. H., & Jeong, S. H. (2010). Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases—a multicentre study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(5), 430-435.
- Pastorello, I., Rossi Paccani, S., Rosini, R., Mattera, R., Ferrer Navarro, M., Urosev, D., Nesta, B., Lo Surdo, P., Del Vecchio, M., & Ripa, V. (2013). EsiB, a novel pathogenic *Escherichia coli* secretory immunoglobulin A-binding protein impairing neutrophil activation. *MBio*, 4(4), e00206-00213.

- Pawlowski, A. C., Stogios, P. J., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A., & Wright, G. D. (2018). The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nature Communications*, 9(1), 1-12.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538-582.
- Peng, S.-Y., You, R.-I., Lai, M.-J., Lin, N.-T., Chen, L.-K., & Chang, K.-C. (2017). Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the *Acinetobacter baumannii* phage endolysin LysAB2. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Petrenko, V. A., & Vodyanoy, V. J. (2003). Phage display for detection of biological threat agents. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 253-262.
- Petrov, V. M., Ratnayaka, S., Nolan, J. M., Miller, E. S., & Karam, J. D. (2010). Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution. *Virology Journal*, 7(1), 1-19.
- Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2141-2151.
- Popova, A. V., Zhilenkov, E. L., Myakinina, V. P., Krasilnikova, V. M., & Volozhantsev, N. V. (2012). Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 332(1), 40-46.
- Sela, I., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2021). Assessment of assumptions underlying models of prokaryotic pangenome evolution. *BMC Biology*, 19(1), 1-15.
- Shaw, K., Rather, P., Hare, R., & Miller, G. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138-163.
- Shen, Y., Köller, T., Kreikemeyer, B., & Nelson, D. C. (2013). Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1818-1824.
- Sidhu, S. S., Weiss, G. A., & Wells, J. A. (2000). High copy display of large proteins on phage for functional selections. *Journal of Molecular Biology*, 296(2), 487-495.

- Siegman-Igra, Y., Bar-Yosef, S., Gorea, A., & Avram, J. (1993). Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, 17(5), 843-849.
- Singh, M., De Silva, P. M., Al-Saadi, Y., Switala, J., Loewen, P. C., Hausner, G., Chen, W., Hernandez, I., Castillo-Ramirez, S., & Kumar, A. (2020). Characterization of extremely drug-resistant and hypervirulent *Acinetobacter baumannii* AB030. *Antibiotics*, 9(6), 328.
- Skiebe, E., de Berardinis, V., Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., Hammer, B., Zimmermann, O., Ziesing, S., & Wichelhaus, T. A. (2012). Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1, 3-diaminopropane. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(3), 117-128.
- Smani, Y., McConnell, M. J., & Pachón, J. (2012). Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One*, 7(4), e33073.
- Smith, A., ZAMZE, S. E., & Hignett, R. (1985). Composition of lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and its digestion by bacteriophage A7. *Microbiology*, 131(4), 963-974.
- Styles, K. M., Thummeepak, R., Leungtongkam, U., Smith, S. E., Christie, G. S., Millard, A., Moat, J., Dowson, C. G., Wellington, E. M., & Sitthisak, S. (2020). Investigating bacteriophages targeting the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*, 9(4), 200.
- Thandar, M., Lood, R., Winer, B. Y., Deutsch, D. R., Euler, C. W., & Fischetti, V. A. (2016). Novel engineered peptides of a phage lysin as effective antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 2671-2679.
- Thummeepak, R., Kittit, T., Kunthalert, D., & Sitthisak, S. (2016). Enhanced antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01 endolysin (LysABP-01) in combination with colistin. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1402.
- Tian, R.-M., Cai, L., Zhang, W.-P., Cao, H.-L., & Qian, P.-Y. (2015). Rare events of intragenus and intraspecies horizontal transfer of the 16S rRNA gene. *Genome*

Biology and Evolution, 7(8), 2310-2320.

- Tilley, D., Law, R., Warren, S., Samis, J. A., & Kumar, A. (2014). CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiology Letters*, 356(1), 53-61.
- Tiwari, V., Mishra, N., Gadani, K., Solanki, P. S., Shah, N., & Tiwari, M. (2018). Mechanism of anti-bacterial activity of zinc oxide nanoparticle against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1218.
- Turner, D., Ackermann, H.-W., Kropinski, A. M., Lavigne, R., Sutton, J. M., & Reynolds, D. M. (2018). Comparative analysis of 37 *Acinetobacter* bacteriophages. *Viruses*, 10(1), 5.
- Unal, S., & Garcia-Rodriguez, J. A. (2005). Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 53(4), 265-271.
- Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S. G., Juárez Vignon-Whaley, J. J., Abello Vaamonde, J. A., Padró Alonzo, L. A., Rivera Reséndiz, A., Muleiro Álvarez, M., Vega López, E. N., Franyuti-Kelly, G., & Álvarez-Hernández, D. A. (2020). *Acinetobacter baumannii* resistance: a real challenge for clinicians. *Antibiotics*, 9(4), 205.
- Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., & Biswas, I. (2016). Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Frontiers in Public Health*, 4, 105.
- Waack, U., Warnock, M., Yee, A., Huttinger, Z., Smith, S., Kumar, A., Deroux, A., Ginsburg, D., Mobley, H. L., & Lawrence, D. A. (2018). CpaA is a glycan-specific adamalysin-like protease secreted by *Acinetobacter baumannii* that inactivates coagulation factor XII. *MBio*, 9(6), e01606-01618.
- Wang, S., Sheng, W.-H., Chang, Y.-Y., Wang, L., Lin, H., Chen, M., Pan, H., Ko, W., Chang, S., & Lin, F. (2003). Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 53(2), 97-102.
- Wareth, G., Brandt, C., Sprague, L. D., Neubauer, H., & Pletz, M. W. (2021). WGS based

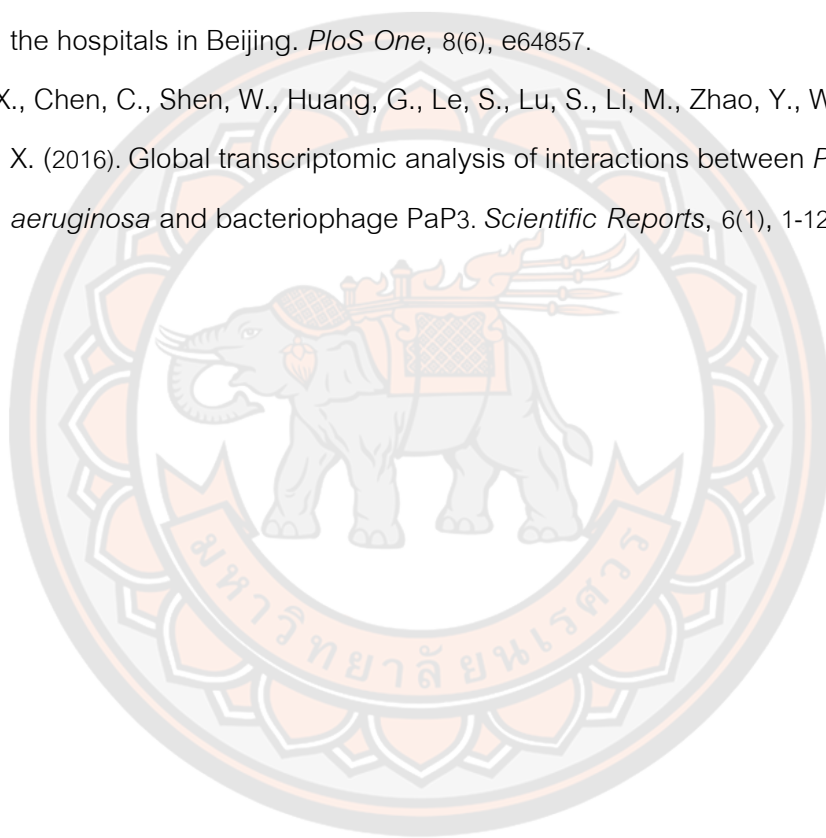
- analysis of acquired antimicrobial resistance in human and non-human *Acinetobacter baumannii* isolates from a German perspective. *BMC Microbiology*, 21(1), 1-13.
- Weber, B. S., Ly, P. M., Irwin, J. N., Pukatzki, S., & Feldman, M. F. (2015). A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9442-9447.
- Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., & Rüdén, H. (1997). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1394-1397.
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., & Skiebe, E. (2013). DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *Journal of Bacteriology*, 195(18), 4146-4153.
- Wisplinghoff, H., Paulus, T., Lugenheim, M., Stefanik, D., Higgins, P. G., Edmond, M. B., Wenzel, R. P., & Seifert, H. (2012). Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection*, 64(3), 282-290.
- Woollard, P. M., Mehta, N. A., Vamathevan, J. J., Van Horn, S., Bonde, B. K., & Dow, D. J. (2011). The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 16(11-12), 512-519.
- Xiao, J., Zhang, C., & Ye, S. (2019). *Acinetobacter baumannii* meningitis in children: a case series and literature review. *Infection*, 47(4), 643-649.
- Yakkala, H., Samantarai, D., Gribskov, M., & Siddavattam, D. (2019). Comparative genome analysis reveals niche-specific genome expansion in *Acinetobacter baumannii* strains. *PloS One*, 14(6), e0218204.
- Yang, H., Liang, L., Lin, S., & Jia, S. (2010). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 10(1), 1-10.
- Yang, Z., Liu, X., Shi, Y., Yin, S., Shen, W., Chen, J., Chen, Y., Chen, Y., You, B., & Gong, Y. (2019). Characterization and genome annotation of a newly detected bacteriophage infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Archives of*

Virology, 164(6), 1527-1533.

Yang, Z., Yin, S., Li, G., Wang, J., Huang, G., Jiang, B., You, B., Gong, Y., Zhang, C., & Luo, X. (2019). Global transcriptomic analysis of the interactions between phage ϕ Abp1 and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *MSystems*, 4(2), e00068-00019.

Zhang, C., Qiu, S., Wang, Y., Qi, L., Hao, R., Liu, X., Shi, Y., Hu, X., An, D., & Li, Z. (2013). Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PloS One*, 8(6), e64857.

Zhao, X., Chen, C., Shen, W., Huang, G., Le, S., Lu, S., Li, M., Zhao, Y., Wang, J., & Rao, X. (2016). Global transcriptomic analysis of interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophage PaP3. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.





ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนครพนม

ภาคผนวก ก

ตารางข้อมูลสายพันธุ์ *A. baumannii* จำนวน 145 สายพันธุ์

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
1	CAM180-1	โครโมโซม	CP044356.1	ช่องปาก	กัมพูชา	2559
2	NIPH17_0019	โครโมโซม	AP024415.1	เลือด	กัมพูชา	2560
3	2014LNAB1	โครโมโซม	CP059352.1	เลือด	จีน	2557
4	17-84	โครโมโซม	CP059479.1	NA	จีน	2560
5	2014BJAB1	โครโมโซม	CP059354.1	เลือด	จีน	2557
6	2014TJAB1	โครโมโซม	CP059349.1	เลือด	จีน	2557
7	2016BJAB1	โครโมโซม	CP059355.1	เสมหะ	จีน	2559
8	2016LNAB1	โครโมโซม	CP059353.1	น้ำไขสันหลัง	จีน	2559
9	2018BJAB1	โครโมโซม	CP059351.1	เสมหะ	จีน	2561
10	2018BJAB2	โครโมโซม	CP059350.1	ทางเดินหายใจ	จีน	2561
11	2018HBAB1	โครโมโซม	CP059356.1	น้ำช่องท้อง	จีน	2561
12	2018HLJAB1	โครโมโซม	CP059358.1	หนอง	จีน	2561
13	2018HLJAB2	โครโมโซม	CP059357.1	น้ำช่องท้อง	จีน	2561

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
14	2018TJAB1	โคโรโมไซม	CP059359.1	เลือด	จีน	2561
15	29FS20	โคโรโมไซม	CP044519.1	อุจจาระ	จีน	2560
16	31FS3-2	โคโรโมไซม	CP044517.1	อุจจาระ	จีน	2560
17	A1296	โคโรโมไซม	CP018332.1	เสมหะ	จีน	2553
18	A1429	โคโรโมไซม	CP046898.1	สารคัดหลั่ง	จีน	2553
19	A52	โคโรโมไซม	CP034092.1	เสมหะ	จีน	2558
20	Ab4568	โคโรโมไซม	CP024613.1	เสมหะ	จีน	2554
21	Ab4653	โคโรโมไซม	CP024612.1	เสมหะ	จีน	2554
22	Ab4977	โคโรโมไซม	CP024611.1	เสมหะ	จีน	2554
23	Aba	โคโรโมไซม	CP030083.1	NA	จีน	2559
24	Aba1	โคโรโมไซม	CP060732.1	ทางเดินหายใจ	จีน	2563
25	ABF9692	โคโรโมไซม	CP048827.1	ทางเดินหายใจ	จีน	2560
26	B10	โคโรโมไซม	CP079942.1	เสมหะ	จีน	2561
27	C25	โคโรโมไซม	CP032743.1	น้ำไขสันหลัง	จีน	2558
28	DD520	โคโรโมไซม	CP075321.1	ตัวอย่างผู้ป่วย	จีน	2564

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
29	DETAB-E227	โคโรนาไวรัส	CP072526.1	NA	จีน	2562
30	DETAB-P2	โคโรนาไวรัส	CP047973.1	ไม้ป้ายทวารหนัก	จีน	2562
31	DETAB-P39	โคโรนาไวรัส	CP073060.1	ตัวอย่างผู้ป่วย	จีน	2562
32	DT-Ab003	โคโรนาไวรัส	CP050916.1	สเต็มโทสโคป	จีน	2560
33	DT-Ab007	โคโรนาไวรัส	CP050914.1	เสมหะ	จีน	2560
34	DT-Ab020	โคโรนาไวรัส	CP050911.1	เสมหะ	จีน	2561
35	DT-Ab022	โคโรนาไวรัส	CP050907.1	เสมหะ	จีน	2560
36	DT-Ab057	โคโรนาไวรัส	CP050904.1	ทางเดินหายใจ	จีน	2562
37	HRAB-85	โคโรนาไวรัส	CP018143.1	เสมหะ	จีน	2557
38	MDR-CQ	โคโรนาไวรัส	CP019114.1	NA	จีน	2559
39	MDR-TJ	โคโรนาไวรัส	CP003500.1	NA	จีน	NA
40	MDR-ZJ06	โคโรนาไวรัส	CP001937.2	NA	จีน	2549
41	WCHAB005078	โคโรนาไวรัส	CP027246.2	NA	จีน	NA
42	WCHAB005133	โคโรนาไวรัส	CP026750.2	NA	จีน	NA
43	XDR-BJ83	โคโรนาไวรัส	CP018421.1	NA	จีน	2550

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
44	XH1344	โครโมโซม	CP061541.1	NA	จีน	2562
45	XH386	โครโมโซม	CP010779.1	ทางเดินหายใจ	จีน	2559
46	XH731	โครโมโซม	CP019217.1	เสมหะ	จีน	2557
47	XH856	โครโมโซม	CP014541.1	น้ำในช่องปอด	จีน	2553
48	XH857	โครโมโซม	CP014540.1	เสมหะ	จีน	2553
49	XH858	โครโมโซม	CP014528.1	เสมหะ	จีน	2559
50	XH859	โครโมโซม	CP014539.1	แผล	จีน	2552
51	XH860	โครโมโซม	CP014538.1	NA	จีน	2552
52	XH906	โครโมโซม	CP023140.1	เลือด	จีน	2559
53	XL380	โครโมโซม	CP046536.1	cucumber rhizosphere	จีน	2561
54	XYAB2018	โครโมโซม	CP060285.1	เลือด	จีน	2561
55	ZW85-1	โครโมโซม	CP006768.1	NA	จีน	2556
56	ACN21	โครโมโซม	CP038644.1	เลือด	อินเดีย	2561
57	B8300	โครโมโซม	CP021347.1	เลือด	อินเดีย	2558
58	6507	โครโมโซม	CP045528.1	NA	อินเดีย	2562

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
59	B8342	โคโรโมไซม	CP021342.1	เลือด	อินเดีย	2557
60	CIAT758	โคโรโมไซม	CP038500.1	เลือด	อินเดีย	2561
61	DS002	โคโรโมไซม	CP027704.2	ดิน	อินเดีย	2548
62	KSK1	โคโรโมไซม	CP072122.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2563
63	KSK10	โคโรโมไซม	CP072280.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2564
64	KSK11	โคโรโมไซม	CP072285.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2563
65	KSK18	โคโรโมไซม	CP072290.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2564
66	KSK19	โคโรโมไซม	CP072295.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2564
67	KSK20	โคโรโมไซม	CP072398.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2563
68	KSK20	โคโรโมไซม	CP072300.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2564
69	KSK6	โคโรโมไซม	CP072270.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2564
70	KSK7	โคโรโมไซม	CP072275.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2564
71	KSKSensitive	โคโรโมไซม	CP072305.1	ทางเดินหายใจ	อินเดีย	2563
72	P7774	โคโรโมไซม	CP040259.1	หนอง	อินเดีย	2562
73	PM1912235	โคโรโมไซม	CP050410.1	หนอง	อินเดีย	2552

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
74	PM192696	โคโรนาไวรัส	CP050412.1	เสมหะ	อินเดีย	2562
75	PM193665	โคโรนาไวรัส	CP050415.1	เสมหะ	อินเดีย	2562
76	PM194188	โคโรนาไวรัส	CP050425.1	น้ำล้างหลอดลม	อินเดีย	2562
77	PM194229	โคโรนาไวรัส	CP050432.1	น้ำล้างหลอดลม	อินเดีย	2562
78	SP304	โคโรนาไวรัส	CP040080.1	เสมหะ	อินเดีย	2562
79	VB11737	โคโรนาไวรัส	CP050400.1	เลือด	อินเดีย	2562
80	VB1190	โคโรนาไวรัส	CP040047.1	เลือด	อินเดีย	2562
81	VB16141	โคโรนาไวรัส	CP040050.1	เลือด	อินเดีย	2562
82	VB2107	โคโรนาไวรัส	CP051474.1	เสมหะ	อินเดีย	2562
83	VB2139	โคโรนาไวรัส	CP050526.1	เสมหะ	อินเดีย	2562
84	VB2181	โคโรนาไวรัส	CP050401.1	NA	อินเดีย	NA
85	VB2200	โคโรนาไวรัส	CP050421.1	NA	อินเดีย	NA
86	VB23193	โคโรนาไวรัส	CP035672.1	NA	อินเดีย	NA
87	VB2486	โคโรนาไวรัส	CP050403.1	เสมหะ	อินเดีย	2563
88	VB31459	โคโรนาไวรัส	CP035930.1	เลือด	อินเดีย	2560

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
89	VB33071	โคโรนาไวรัส	CP040084.1	เลือด	อินเดีย	2561
90	VB35179	โคโรนาไวรัส	CP040053.1	เลือด	อินเดีย	2561
91	VB35435	โคโรนาไวรัส	CP040056.1	เลือด	อินเดีย	2561
92	VB35575	โคโรนาไวรัส	CP040087.1	เลือด	อินเดีย	2561
93	VB473	โคโรนาไวรัส	CP050388.1	เสมหะ	อินเดีย	2562
94	VB7036	โคโรนาไวรัส	CP050523.1	เลือด	อินเดีย	2562
95	VB723	โคโรนาไวรัส	CP050390.1	เลือด	อินเดีย	2562
96	VB82	โคโรนาไวรัส	CP050385.1	เลือด	อินเดีย	2563
97	VB958	โคโรนาไวรัส	CP040040.1	เลือด	อินเดีย	2562
98	IOMTU433	โคโรนาไวรัส	AP014649.1	NA	ญี่ปุ่น	NA
99	OCU_Ac16a	โคโรนาไวรัส	AP023077.1	ทางเดินหายใจ	ญี่ปุ่น	2558
100	OCU_Ac18	โคโรนาไวรัส	AP024802.1	โรงพยาบาล	ญี่ปุ่น	2559
101	WP4-W18-ESBL-11	โคโรนาไวรัส	AP022077.1	น้ำเสีย	ญี่ปุ่น	2561
102	WP8-W18-ESBL-11	โคโรนาไวรัส	AP022238.1	น้ำเสีย	ญี่ปุ่น	2561
103	AC12	โคโรนาไวรัส	CP007549.1	เลือด	มาเลเซีย	2554

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
104	K09-14	โครโมโซม	CP043953.1	ดิน	มาเลเซีย	2560
105	AC1633	โครโมโซม	CP059300.1	เลือด	มาเลเซีย	2559
106	AC29	โครโมโซม	CP007535.2	ทางเดินหายใจ	มาเลเซีย	2554
107	AC30	โครโมโซม	CP007577.1	ทางเดินหายใจ	มาเลเซีย	2554
108	CAb-65	โครโมโซม	CP060994.1	อุจจาระ	มาเลเซีย	2561
109	AbPK1	โครโมโซม	CP024576.1	ทางเดินหายใจ	ปากีสถาน	2555
110	15A34	โครโมโซม	CP020590.1	เลือด	เกาหลีใต้	2557
111	DU202	โครโมโซม	CP017152.1	NA	เกาหลีใต้	NA
112	1656-2	โครโมโซม	CP001921.1	NA	เกาหลีใต้	NA
113	15A5	โครโมโซม	CP020574.1	เลือด	เกาหลีใต้	2556
114	ATCC17978	โครโมโซม	CP007535.2	ปัสสาวะ	เกาหลีใต้	2554
115	ATCC17978substr.PMR-High	โครโมโซม	CP039025.2	NA	เกาหลีใต้	2561
116	CBA7	โครโมโซม	CP020586.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2556
117	G20AB007	โครโมโซม	CP066237.1	เลือด	เกาหลีใต้	2563
118	G20AB009	โครโมโซม	CP066235.1	เลือด	เกาหลีใต้	2563

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดลกุล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเภท	ปีที่แยก
119	G20AB010	โคโรนาไวรัส	CP066232.1	เลือด	เกาหลีใต้	2563
120	G20AB011	โคโรนาไวรัส	CP066229.1	เลือด	เกาหลีใต้	2563
121	HWBA8	โคโรนาไวรัส	CP020597.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2556
122	JBA13	โคโรนาไวรัส	CP020584.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2556
123	KAB01	โคโรนาไวรัส	CP017642.1	ทางเดินหายใจ	เกาหลีใต้	2558
124	KAB02	โคโรนาไวรัส	CP017644.1	ทางเดินหายใจ	เกาหลีใต้	2558
125	KAB03	โคโรนาไวรัส	CP017646.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2558
126	KAB04	โคโรนาไวรัส	CP017648.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2558
127	KAB05	โคโรนาไวรัส	CP017650.1	เลือด	เกาหลีใต้	2558
128	KAB06	โคโรนาไวรัส	CP017652.1	แผล	เกาหลีใต้	2558
129	KAB07	โคโรนาไวรัส	CP017654.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2558
130	KAB08	โคโรนาไวรัส	CP017656.1	แผล	เกาหลีใต้	2558
131	KBN10P02143	โคโรนาไวรัส	CP013924.1	หนอง	เกาหลีใต้	2555
132	SAA14	โคโรนาไวรัส	CP020579.1	เลือด	เกาหลีใต้	2556
133	SMC_Paed_Ab_BL01	โคโรนาไวรัส	CP025266.1	เลือด	เกาหลีใต้	2555

ลำดับ	สายพันธุ์	โมเดล	Accession No.	แหล่งที่พบ	ประเทศ	ปีที่แยก
134	SSA12	โครโมโซม	CP020578.1	เลือด	เกาหลีใต้	2556
135	SSA6	โครโมโซม	CP020591.1	ทางเดินหายใจ	เกาหลีใต้	2562
136	SSMA17	โครโมโซม	CP020581.1	ทางเดินหายใจ	เกาหลีใต้	2556
137	USA15	โครโมโซม	CP020595.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2556
138	USA2	โครโมโซม	CP020592.1	ปัสสาวะ	เกาหลีใต้	2556
139	WKA02	โครโมโซม	CP020598.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2556
140	YU-R612	โครโมโซม	CP014215.1	เสมหะ	เกาหลีใต้	2557
141	2008S11-069	โครโมโซม	CP033516.1	NA	ไต้หวัน	2551
142	TCDC-AB0715	โครโมโซม	CP002522.2	NA	ไต้หวัน	2554
143	TYTH-1	โครโมโซม	CP003856.1	NA	ไต้หวัน	NA
144	ABCR01	โครโมโซม	CP042931.1	เสมหะ	ไทย	2562
145	CUVET-MIC596	โครโมโซม	CP041148.1	ปัสสาวะ	ไทย	2560

ตาราง ค่า Ct ของยีนแบคทีเรียโอเฟลจ vPhT2 ระหว่างการติดเชื้อ *A. baumannii* 329

Genes	0 min	10 min	30 min	60 min
<i>gp035</i> dCTPase	30	22.79	24.70333	23.01
<i>gp062</i> anti-sigma factor	30	19.95667	24.1	21.79333
<i>gp69</i> exonuclease A	30	22.77333	25.67333	23.59
<i>gp72</i> putative lysozyme	30	21.06667	24.83	22.88667
<i>gp89</i> holin lysis	30	22.83	24.99667	22.93333
<i>gp090</i> tail fibre	30	22.74667	24.97667	23.00333
<i>gp114</i> inhibitor of host transcription	30	19.75	24.23	22.71333
<i>gp173</i> tail lysozyme	30	24.44667	26.11667	24.29333
<i>gp229</i> sigma factor	30	21.76333	25.37667	23.31667
<i>gp237</i> RNA polymerase	30	22.48667	24.19	22.42

ตาราง ค่า Delta Ct ของยีน *A. baumannii* 329 ระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียโอเฟลจ vPhT2

Genes	0 min	10 min	30 min	60 min
<i>rpoH</i>	11.56	11.83333	4.986667	8.446667
<i>dnaE</i>	13.489	15.65333	5.806667	8.406667
<i>rho</i>	10.035	12.34	5.026667	7.966667
<i>metXA</i>	12.576	12.97333	5.143333	7.813333
<i>clpP</i>	15.12	14.43667	7.066667	8.96
<i>coaBC</i>	12.97	13.76333	7.453333	9.176667
<i>kdpA</i>	15.682	18.35	8.586667	10.31
<i>dadA</i>	10.61	11.02333	6.133333	7.856667

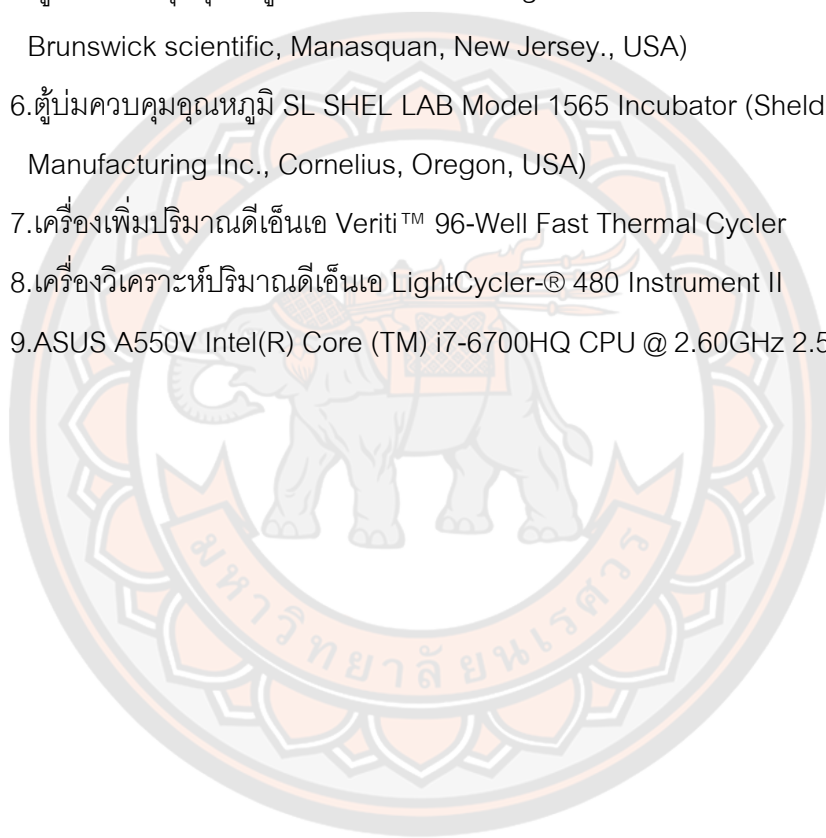
ค่า FIC index ที่คำนวณได้จากประสิทธิภาพของเปปไทด์ vPhT02(7) และยา colistin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.126953	0.128906	0.132813	0.140625	0.15625	0.1875	0.25	0.375	0.625	1.125
B	0.064453	0.066406	0.070313	0.078125	0.09375	0.125	0.1875	0.3125	0.5625	1.0625
C	0.033203	0.035156	0.039063	0.046875	0.0625	0.09375	0.15625	0.28125	0.53125	1.03125
D	0.017578	0.019531	0.023438	0.03125	0.046875	0.078125	0.140625	0.265625	0.515625	1.015625
E	0.009766	0.011719	0.015625	0.023438	0.039063	0.070313	0.132813	0.257813	0.507813	1.007813
F	0.005859	0.007813	0.011719	0.019531	0.035156	0.066406	0.128906	0.253906	0.503906	1.003906
G	0.003906	0.005859	0.009766	0.017578	0.033203	0.064453	0.126953	0.251953	0.501953	1.001953

ภาคผนวก ข

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ScanSpeed 2236 R (LaboGene Aps, Denmark)
2. ตู้บ่มเชื้อ UNB300 (MEMMERT, Federal Republic, Germany)
3. หม้อนึ่งความดันไอ SS-325 (TOMY, Contherm, New Zealand)
4. ตู้ปลอดเชื้อ HVR 2472 (Holton LaminAir: Denmark)
5. ตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker (New Brunswick scientific, Manasquan, New Jersey., USA)
6. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ SL SHEL LAB Model 1565 Incubator (Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Oregon, USA)
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler
8. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ LightCycler-® 480 Instrument II
9. ASUS A550V Intel(R) Core (TM) i7-6700HQ CPU @ 2.60GHz 2.59 GHz



อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหาร LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง LB	1.25	กรัม
เติมน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมอาหาร soft medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง TSB	9	กรัม
ผงวุ้น	0.7	กรัม
เติมน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียมอาหาร 2X CAMHB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร CAMHB	5	กรัม
เติมน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 12 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมี

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

NaCl	29	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	กรัม
1 M Tris-Cl (pH 7.5)	25	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่าง ๆ ทั้งหมด ก่อนทำการปรับปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลูทนามิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

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

Tris base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่าง ๆ ทั้งหมด ทำการปรับปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5X สำหรับนำไปใช้ในการเตรียม agarose gel และการทำ agarose gel electrophoresis และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย disodium EDTA·H₂O ปริมาตร 18.16 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปรับ pH โดยใช้ 3 M NaOH จนได้ pH 8.0 จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลูทนามิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม 0.85% NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง NaCl	0.85	กรัม
เติมน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลูทนามิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5.เตรียม 10X FA buffer และ 1X FA buffer สำหรับนำไปใช้วิเคราะห์ RNA

การเตรียม 10X FA buffer ประกอบด้วย

50 mM NaCH₃COO

10 mM EDTA

ทำการปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย NaOH

การเตรียม 1X FA buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

10 X FA buffer 20 มิลลิลิตร

37% (12.3 M) formaldehyde 4 มิลลิลิตร

RNase free water 176 มิลลิลิตร

6.การเตรียมเจลสำหรับการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ผงวุ้น agarose 0.5 กรัม

37% (12.3 M formaldehyde) 900 ไมโครลิตร

10X FA buffer 5 มิลลิลิตร

RNase free water 45 มิลลิลิตร

7.การเตรียม 10X reaction buffer

100 mM Tris-HCl (pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)

25 MgCl₂

1 mM CaCl₂

ระบบปฏิบัติการคอมพิวเตอร์ และซอฟต์แวร์

- 1.Windows 10 Pro
- 2.Windows Subsystem for Linux 2
- 3.Ubuntu 20.04 LTS
- 4.Conda เวอร์ชัน 4.11.0
- 5.Python เวอร์ชัน 3.8.10
- 6.R studio เวอร์ชัน 4.1.2
- 7.GraphPad Prism เวอร์ชัน 8.0
- 8.Adobe Photoshop 2020
- 9.Office 365
- 10.IBS software เวอร์ชัน 1.0.3

