



การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii*  
ที่ดื้อต่อยา carbapenems



พลอยชมพู พูลักษณ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏ  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์  
ปีการศึกษา 2569  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยราชภัฏ

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii*  
ที่ดื้อต่อยา carbapenems



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์  
ปีการศึกษา 2569  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง “การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii*  
ที่ดื้อต่อยา carbapenems”  
ของ พลอยชมพู พูลักษณ์  
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ศินา งามสุก.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธันวา วงษ์สุก)

.....จิราส.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จิราส จงจิตวิมล)

.....C. นว.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยอดหทัย ทองศรี)

.....อรุมา เอ้านนท์.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ดร.อรุมา เอ้านนท์)

.....อนุมติ.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกษักรประยุทธ์ ภูวรรตนาวิธ)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

23 ก.ย. 2569

|                 |                                                                                                                                                                               |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อเรื่อง      | การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน <i>carO</i> ในเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i> ที่ดื้อต่อยา carbapenems                                                                       |
| ผู้วิจัย        | พลอยชมพู พูลลักษณ์                                                                                                                                                            |
| ประธานที่ปรึกษา | รองศาสตราจารย์ ดร. จิรภาส จงจิตวิมล                                                                                                                                           |
| ประเภตสารนิพนธ์ | วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์<br>มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2569                                                                                                           |
| คำสำคัญ         | เชื้อ <i>A. baumannii</i> , ยีน <i>carO</i> , ยา carbapenems, การดื้อยา<br>การกลายพันธุ์, โปรตีนเยื่อหุ้มชั้นนอก, ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง<br>การเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) |

### บทคัดย่อ

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems (CRAB) เป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุข โดยเฉพาะในโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ในปี 2567 พบอัตราการติดเชื้อ CRAB สูงถึง 68.3% การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *carO* และความสัมพันธ์กับค่า MIC ของยากลุ่ม carbapenems โดยทำการศึกษาในเชื้อ *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex จำนวน 83 isolates ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก ที่ผ่านการพิสูจน์แยกเชื้อและทดสอบความไวต่อยาด้วยเครื่อง VITEK®2 COMPACT ประกอบด้วยเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem (CSAB) 10 ไอโซเลต และ เชื้อ CRAB 73 ไอโซเลต โดยเชื้อส่วนใหญ่ดื้อยาแบบ XDR 71 isolates (85.54%) โดยทำการตรวจหายีน *bla<sub>OXA-51 like</sub>* และเพิ่มจำนวนยีน *carO* ด้วยเทคนิค PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท MacroGen ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับเชื้อ *A. baumannii* Ab242 ด้วยโปรแกรม SnapGene และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Fisher's exact test ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างเชื้อยืนยันเป็น *A. baumannii* 77 isolates (92.77%) แบ่งเป็น CSAB 7 isolates และ CRAB 70 isolates พบการกลายพันธุ์ 100% ในระดับนิวคลีโอไทด์ และพบการกลายพันธุ์ในระดับโปรตีน CarO 3 รูปแบบหลัก โดยการกลายพันธุ์แบบ missense mutation ร่วมกับ insertion พบมากที่สุดถึง 69 isolates (89.61%) โดยพบว่ากรดอะมิโน 35 ตำแหน่งมีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเชื้อกลุ่ม CRAB เมื่อเทียบกับกลุ่ม CSAB แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิดและรูปแบบการ mutation

**Title** STUDYING *carO* MUTATION IN CARBAPENEMS-RESISTANT  
*ACINETOBACTER BAUMANNII*

**Author** Ploychomphoo Poollak

**Advisor** Associate Professor Jirapas Jongjitvimol, Ph.D.

**Academic Paper** M.S. Thesis in Medical Technology, Naresuan University, 2026

**Keywords** *Acinetobacter baumannii*, carbapenems resistance, *carO* gene, outer membrane protein, mutation, Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

### ABSTRACT

Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) becomes a critical public health threat, particularly in Mae Sot Hospital, Tak Province, Thailand, showing the CRAB infection rate of 68.3% in 2024. This study aimed to characterize mutation patterns of the *carO* gene and evaluate their association with carbapenem minimum inhibitory concentrations (MICs). A total of 83 *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from clinical specimens were included. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed using the VITEK®2 COMPACT system. The isolates were classified as carbapenem-susceptible *A. baumannii* (CSAB; n = 10) and CRAB (n = 73), further categorized as extensively drug-resistant group (XDR; n = 71, 85.54%). The *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes was detected as *A. baumannii* confirmation. The *carO* gene was amplified by PCR and sequenced by MacroGen. Nucleotide and amino acid sequences were aligned against the reference strain *A. baumannii* Ab242 using SnapGene with Clustal Omega algorithm. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test. Of the 83 isolates, 77 (92.77%) were confirmed as *A. baumannii*, comprising 7 CSAB and 70 CRAB isolates. CarO protein mutation analysis revealed three distinct mutation patterns, showing the majority of missense mutation combined with insertion in 69 isolates (89.61%). A total of 35 amino acid positions were significantly mutated in CRAB compared with CSAB. However, no statistically significant association was observed between individual carbapenem MIC values and specific *carO* mutation patterns.

## ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. จิรภาส จงจิตวิมล ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นทั้งที่ปรึกษาพร้อมทั้งให้คำแนะนำ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์อันประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. ธันวา วงษ์สุข ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยอดหทัย ทองศรี และ อาจารย์ ดร. อรุมา เข้านนท์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จ ลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลแม่สอด ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ เพื่อใช้ในการเก็บข้อมูลและดำเนินงานวิจัยนี้จนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา คณะสหเวชศาสตร์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ เพื่อใช้ในการปฏิบัติการ และดำเนินงานวิจัยนี้จนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนเป็นอย่างดี และมีส่วนช่วยในการผลักดันให้ทำเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบและอุทิศแต่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานจุลชีววิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ต่อไป

พลอยชมพู พูลลักษณ์

## สารบัญ

### หน้า

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                                                            | ค  |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....                                                        | ง  |
| ประกาศคุุณูปการ.....                                                            | จ  |
| สารบัญ.....                                                                     | ฉ  |
| สารบัญตาราง.....                                                                | ช  |
| สารบัญภาพ.....                                                                  | ฌ  |
| บทที่ 1 บทนำ.....                                                               | 1  |
| ความเป็นมาของปัญหา.....                                                         | 1  |
| จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....                                                     | 3  |
| ขอบเขตของงานวิจัย.....                                                          | 3  |
| นิยามศัพท์เฉพาะ.....                                                            | 3  |
| สมมติฐานของการวิจัย .....                                                       | 4  |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....                                     | 5  |
| ข้อมูลของเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i> .....                             | 5  |
| กลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ของเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i> ..... | 5  |
| Porins .....                                                                    | 10 |
| ยีน <i>Carbapenem-associated resistance protein</i> หรือ <i>carO</i> .....      | 11 |
| การ mutation ของยีน <i>carO</i> .....                                           | 12 |
| ยาในกลุ่ม Carbapenems.....                                                      | 14 |
| Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique.....                                  | 15 |
| การวิเคราะห์หาลำดับ DNA (DNA Sequencing).....                                   | 17 |
| Minimum Inhibitory Concentration (MIC) .....                                    | 23 |
| ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics).....                                               | 24 |
| Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).....                                  | 26 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....                                                 | 27 |
| รูปแบบการวิจัย .....                                                            | 27 |
| จริยธรรมวิจัยในมนุษย์ .....                                                     | 27 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....                                                                                                                                 | 27 |
| น้ำยาและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....                                                                                                                     | 28 |
| วิธีดำเนินการวิจัย .....                                                                                                                                     | 29 |
| การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เครื่องมือทางสถิติ.....                                                                                                              | 40 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย .....                                                                                                                                     | 44 |
| ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับตัวอย่างทางคลินิก ผลการการพิสูจน์แยกเชื้อ <i>A. baumannii-calcoaceticus</i> complex ด้วยวิธีพีไนด์และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ..... | 44 |
| ผลการสกัด Genomic DNA โดยชุดสกัด PureDireX.....                                                                                                              | 48 |
| ผลการยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางจีโนไทป์ (Genotypic identification).....                                                                                          | 49 |
| ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>carO</i> .....                                                                                                                         | 50 |
| ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน <i>carO</i> ระดับนิวคลีโอไทด์.....                                                                                         | 51 |
| ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน <i>carO</i> ระดับ amino acid.....                                                                                          | 51 |
| บทที่ 5 บทสรุป.....                                                                                                                                          | 57 |
| สรุปผลการวิจัย.....                                                                                                                                          | 57 |
| อภิปรายผล.....                                                                                                                                               | 59 |
| บรรณานุกรม.....                                                                                                                                              | 63 |
| ภาคผนวก.....                                                                                                                                                 | 74 |
| ประวัติผู้วิจัย.....                                                                                                                                         | 76 |

## สารบัญตาราง

หน้า

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ตาราง 1 MIC Breakpoints for <i>Acinetobacter</i> spp. ....                                                                                                                         | 23 |
| ตาราง 2 ตัวอย่างตาราง 2 x 2 แสดงข้อมูลผลการวิเคราะห์ Point mutation ของกรดอะมิโน<br>ตำแหน่งที่ 77.....                                                                             | 41 |
| ตาราง 3 ข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....                                                                                                                            | 44 |
| ตาราง 4 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ <i>A. baumannii-calcoaceticus</i> complex<br>ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Vitek 2 Compact.....                                 | 46 |
| ตาราง 5 ตำแหน่งของ missense mutation ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.05) เมื่อ<br>เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยา carbapenem และเชื้อที่ไวต่อยา<br>carbapenem ..... | 53 |
| ตาราง 6 ตำแหน่งของการกลายพันธุ์แบบ insertion ในเชื้อกลุ่มที่ 2 โดยเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อ<br>กลุ่มที่ดื้อต่อยา carbapenem และเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem .....                   | 54 |
| ตาราง 7 ข้อมูลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน<br>CarO กับค่า MIC ของยา Imipenem.....                                                        | 55 |
| ตาราง 8 ข้อมูลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน<br>CarO กับค่า MIC ของยา Meropenem.....                                                       | 55 |
| ตาราง 9 ข้อมูลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน<br>CarO กับค่า MIC ของยา Doripenem.....                                                       | 55 |
| ตาราง 10 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO กับค่า MIC<br>ของยา carbapenem แต่ละชนิด ด้วย Fisher's Exact Test (4x3) .....                            | 56 |

## สารบัญภาพ

หน้า

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพ 1 การทดสอบ MBL ด้วยแผ่นยาชนิด E-test กับเชื้อ <i>Acinetobacter spp.</i> ปลายด้านซ้าย (IPI) เป็นยา imipenem ที่มี EDTA ร่วมด้วย ทำให้ MBL ทำงานไม่ได้ เกิดเป็น clear zone ชัดเจน ส่วนปลายด้านขวา (IP) มีเพียงยา imipenem จึงถูกทำลายโดย MBL ทำให้ค่า MIC ของยาที่มี EDTA มีค่า < 1 µg/ml ส่วน MIC ของยา imipenem เพียงอย่างเดียว มีค่าเท่ากับ 48 µg/ml จากรูปจึงรายงานผลว่า เชื้อดังกล่าวสร้างเอนไซม์ชนิด MBL ได้.....                | 7  |
| ภาพ 2 ระบบ Efflux pump ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อย คือ ส่วนที่อยู่ใน Cytoplasmic space (membrane fusion protein (MFP)) และส่วนที่อยู่ใน outer membrane (OM) .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 8  |
| ภาพ 3 การศึกษาขนาดของโปรตีน penicillin-binding protein (PBP) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems (CR- <i>A. baumannii</i> ) ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และย้อมด้วย Coomassie blue (ซ้าย) มีการสร้าง PBP ชนิด PBP 1a, 1b, 3a และ 5 ที่ลดลง และมีการหายไปของ PBP2 (ลูกศรชี้) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems (ขวา)..... | 9  |
| ภาพ 4 ยีน <i>carO</i> ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> AB242 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 11 |
| ภาพ 5 โครงสร้างของโปรตีน <i>carO</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 11 |
| ภาพ 6 ส่วนประกอบที่สำคัญของ carbapenems.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 14 |
| ภาพ 7 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 17 |
| ภาพ 8 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยวิธี Maxam-Gilbert Method.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 19 |
| ภาพ 9 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยวิธี Sanger แบบดั้งเดิม .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| ภาพ 10 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยวิธี Sanger แบบใหม่.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 20 |
| ภาพ 11 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วย Library preparation and Illumina method .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 21 |
| ภาพ 12 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยเทคนิค PacBio sequencing method.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 22 |
| ภาพ 13 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยเทคนิค Oxford nanopore technology method.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 22 |
| ภาพ 14 เครื่องตรวจวิเคราะห์แยกเชื้ออัตโนมัติ VITEK ® 2 COMPACT (Biomérieux, France) .29                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
| ภาพ 15 หน้าต่างการเข้าสู่เว็บไซต์ <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/</a> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 34 |
| ภาพ 16 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CarO ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> Ab242.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 34 |
| ภาพ 17 หน้าต่างการเปิด File ที่ต้องการในโปรแกรม SnapGene.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 35 |

|                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพ 18 หน้าต่าง Format Options ในโปรแกรม SnapGene.....                                                                                                                                                                              | 35 |
| ภาพ 19 หน้าต่างการเลือก Sequences ในโปรแกรม SnapGene.....                                                                                                                                                                           | 36 |
| ภาพ 20 หน้าต่างการลบนิวคลีโอไทด์ ในโปรแกรม SnapGene.....                                                                                                                                                                            | 36 |
| ภาพ 21 หน้าต่างการ save file ในโปรแกรม SnapGene .....                                                                                                                                                                               | 37 |
| ภาพ 22 หน้าต่างการ Align Multiple Sequences ในโปรแกรม SnapGene .....                                                                                                                                                                | 37 |
| ภาพ 23 หน้าต่างการการนำเข้า Sequences files และการเลือก files ในโปรแกรม SnapGene ..                                                                                                                                                 | 38 |
| ภาพ 24 หน้าต่างรูปแบบการ Align Multiple DNA Sequences ในโปรแกรม SnapGene.....                                                                                                                                                       | 39 |
| ภาพ 25 ผล Align Multiple Protein Sequences จากโปรแกรม SnapGene .....                                                                                                                                                                | 39 |
| ภาพ 26 ตัวอย่างการวิเคราะห์ Point mutation ในระดับกรดอะมิโน โดยเทียบกับลำดับกรดอะมิโน<br>ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> Ab242.....                                                                                                    | 40 |
| ภาพ 27 หน้าต่างการเปิดและเริ่มต้นใช้งานโปรแกรม GraphPad Prism.....                                                                                                                                                                  | 41 |
| ภาพ 28 การวางข้อมูลตารางขนาด 2 x 2 ในหน้าต่างโปรแกรม GraphPad Prism.....                                                                                                                                                            | 42 |
| ภาพ 29 การใช้เครื่องมือทางสถิติ Fisher's exact test ในการวิเคราะห์ข้อมูล .....                                                                                                                                                      | 42 |
| ภาพ 30 ผลการทดสอบโดยใช้เครื่องมือทางสถิติ Fisher's exact test.....                                                                                                                                                                  | 43 |
| ภาพ 31 ตัวอย่างผลการยืนยันเชื้อ <i>A. baumannii</i> โดยใช้ Species-specific PCR<br>ซึ่งใช้ Primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน <i>bla<sub>OXA-51 like</sub></i> ร่วมกับ 1% gel electrophoresis<br>ซึ่ง Marker คือ 100 bp DNA ladder ..... | 50 |
| ภาพ 32 ตัวอย่างผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>carO</i> โดยใช้เทคนิค PCR จากตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i><br>ร่วมกับ 1% gel electrophoresis โดย Marker คือ 1 kb DNA ladder .....                                                          | 51 |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาของปัญหา

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสในโรงพยาบาล ที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) จัดให้อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีความรุนแรงสูงและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า ESKAPE pathogens ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Enterobacter* spp. (Baraldi et al., 2018; Mulani et al., 2019; Navidinia, 2016; Rice, 2008) การวิเคราะห์ผลกระทบจากเชื้อดื้อยาทั่วโลก ในปี 2019 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตจากการดื้อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022) ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* คือ ความสามารถในการปรับตัวทางพันธุกรรม ซึ่งทำให้เชื้อสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมและคงอยู่ในโรงพยาบาลได้นานมากขึ้น (Lucidi et al., 2024) ปัญหาที่น่ากังวลคือเชื้อ *A. baumannii* มักจะมีลักษณะของการดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance: MDR) การดื้อยาแทบทุกขนาน (extensively drug-resistant: XDR) รวมถึงการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ด้วย (Fonseca É et al., 2020)

ยาปฏิชีวนะกลุ่ม carbapenems มีความสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่รุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนาน ยาปฏิชีวนะกลุ่ม carbapenems เช่นยา imipenem, meropenem และยา doripenem ถือเป็นทางเลือกสุดท้ายสำหรับการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน (Nguyen & Joshi, 2021; Uribe-Lorío et al., 2024) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบ *A. baumannii* ที่ดื้อยา carbapenems (carbapenem-resistant *A. baumannii*: CRAB) เป็นครั้งแรกในปี 1991 และมีรายงานการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์นี้เป็นจำนวนมากและมีการระบาดไปทั่วโลก (Gales et al., 2019; Peleg et al., 2008) และพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา carbapenems (CRAB) มีความเสี่ยงในการเสียชีวิตสูงกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยา carbapenems ประมาณ 2.5 เท่า (World Health Organization [WHO], 2017) ด้วยเหตุผลดังกล่าวในปี 2017 องค์การอนามัยโลก จึงได้ประกาศให้เชื้อ carbapenems-resistant *A. baumannii*: CRAB เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญสูงสุด ซึ่งต้องวินิจฉัยและพัฒนายาปฏิชีวนะใหม่อย่างเร่งด่วน

กลไกการดื้อต่อยา carbapenems แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลไกที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เช่น การสร้างเอนไซม์ carbapenemase มาทำลายยา carbapenems และกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ เช่น การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของโปรตีนที่จับเพนิซิลลิน (PBPs) การแสดงออกที่มากเกินไปของปั๊มขับยา (efflux pumps) และการสูญเสียหรือเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Porins) (Nguyen & Joshi, 2021; Vahhabi et al., 2021)

จากงานวิจัยของ Li-Jing Zhu และคณะ ในปี 2019 ที่ได้ศึกษาบทบาทของโปรตีนที่ผนังเซลล์ชั้นนอก (Porins) ในการดื้อต่อยา imipenem ของเชื้อ *A. baumannii* โดยทำการเก็บตัวอย่าง *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา imipenem (imipenem-resistant *A. baumannii*: IRAB) จำนวน 63 ไอโซเลท และ *A. baumannii* ที่ไวต่อ imipenem (imipenem-sensitive *A. baumannii*: ISAB) จำนวน 21 ไอโซเลท นำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพจำนวน 16 ชนิดด้วยวิธี Kirby-Bauer method ทำการตรวจหายีน *carO* และ *oprD* โดยใช้เทคนิค PCR และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนจากเชื้อในกลุ่ม IRAB และ ISAB และทำการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน CarO ผลการศึกษาพบว่าลำดับเบสของยีนจากเชื้อทั้ง IRAB และ ISAB มีการตรวจพบยีน *carO* และ *oprD* การหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบการกลายพันธุ์ที่สำคัญของยีน *carO* ใน IRAB เมื่อเทียบกับ ISAB นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในโครงสร้าง 3 มิติของโมเลกุลโปรตีน CarO ระหว่างเชื้อในกลุ่ม IRAB และ ISAB จากงานวิจัยดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า การกลายพันธุ์ของยีน *carO* เป็นหนึ่งในกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems (imipenem) ในเชื้อ *A. baumannii* (Zhu et al., 2019)

จากงานวิจัยดังกล่าวจึงนำมาซึ่งวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เนื่องจากการศึกษาในระดับโมเลกุลของกลไกการดื้อยา carbapenems ด้วยการลดการแสดงออกของโปรตีน CarO ในประเทศไทยยังมีไม่มาก โดยเฉพาะในพื้นที่โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งพบการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems เป็นจำนวนมาก อ้างอิงจากข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาลแม่สอดปี 2567 พบว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 246 ราย และพบว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems จำนวน 168 ราย คิดเป็นร้อยละ 68.3 งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารายการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก

### จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems กับการเพิ่มขึ้นของค่า MIC ในยา carbapenems แต่ละชนิด

### ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems อย่างน้อย 3 ชนิด (ยา imipenem, meropenem, และยา doripenem) โดยใช้เชื้อที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ที่ทราบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพว่าดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 73 ไอโซเลท และเก็บตัวอย่างที่ทราบผลการทดสอบว่าไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 10 ไอโซเลท โดยนำเชื้อดังกล่าวมาสกัด DNA แล้วนำไปเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *carO* ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา carbapenems เปรียบเทียบกับเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems และศึกษาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *carO* กับค่า MIC ในยาในกลุ่ม carbapenems แต่ละชนิด

### นิยามศัพท์เฉพาะ

1. *Acinetobacter baumannii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลมท่อน (coccobacilli) เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นเชื้อฉวยโอกาสและเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่มีความเสี่ยง คือ ผู้สูงอายุ ผู้ที่มีโรคประจำตัวผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ที่ได้รับการผ่าตัด การใส่เครื่องช่วยหายใจ การใส่สายสวน และการติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด เป็นต้น
2. Carbapenems-associated outer membrane protein (*carO*) คือ โปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *A. baumannii* ทำหน้าที่เป็นช่องทางในการนำเข้าสู่สารโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโนพื้นฐานและยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะกลุ่ม carbapenems
3. Multidrug-Resistance (MDR) การดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน หมายถึง การดื้อยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 1 ชนิดในยาอย่างน้อย 3 กลุ่มที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น

4. Extensively Drug-Resistance (XDR) การดื้อยาต้านจุลชีพแทบทุกขนาน หมายถึง การดื้อยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 1 ขนานในยาทุกกลุ่ม ยกเว้นยาต้านจุลชีพ 1-2 กลุ่มที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น

5. ยากลุ่ม carbapenems คือ ยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในกลุ่ม beta-lactam ซึ่งมีคุณสมบัติคือ ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีสเปกตรัมการออกฤทธิ์แบบกว้าง ครอบคลุมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงเชื้อที่ดื้อยาชนิดอื่นๆ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้เช่นยา imipenem, meropenem, ertapenem และยา doripenem มักใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียรุนแรงหรือดื้อยา

6. CRAB หมายถึง เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems

7. Porins คือ โปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein) ของแบคทีเรียแกรมลบ มีหน้าที่สร้างช่องทางให้โมเลกุลขนาดเล็กผ่านเข้า-ออกเยื่อหุ้มเซลล์ ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ และช่วยในการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์

8. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) คือความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

### สมมติฐานของการวิจัย

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems พบรูปแบบของการกลายพันธุ์ของยีน *carO* รวมทั้งการกลายพันธุ์ของยีน *carO* มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของค่า MIC ในยา carbapenems

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ข้อมูลของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง coccobacilli มีขนาดประมาณ  $1.0 - 1.5 \times 1.5 - 2.5$  ไมโครเมตร ให้ผลลบกับการทดสอบ oxidase test และ motility test (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996) เชื้อนี้สามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาลได้นาน (เฉลี่ย 13 วัน) เช่น มีการรายงานการเพาะเชื้อได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมบริเวณอ่างล้างมือ พื้นห้อง และเตียงผู้ป่วยในโรงพยาบาล (Crombach et al., 1989; Rosenthal, 1974) จึงเป็นเหตุผลว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยสามารถก่อโรคได้ในหลายระบบ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อจากแผลผ่าตัด เป็นต้น ซึ่งกลไกในการก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* ในมนุษย์ มี 4 กลไกคือ 1) เชื้อ *A. baumannii* มีสาร polysaccharide บริเวณแคปซูลทำให้สามารถจับกับเซลล์เยื่อได้ดี 2) เชื้อ *A. baumannii* มี fimbriae ทำให้สามารถจับกับเซลล์เยื่อได้ดี 3) เชื้อ *A. baumannii* สามารถสร้างเอนไซม์บางชนิดมาทำลายไขมันที่ปกคลุมเนื้อเยื่อทำให้เชื้อจับกับเซลล์ได้ง่ายขึ้น เช่น phospholipase D, phospholipase C, lipase เป็นต้น และ 4) เชื้อ *A. baumannii* มีความเป็นพิษกับเซลล์โดยตรงจากคุณสมบัติของ lipopolysaccharide (LPS) และ lipid A เช่น การกระตุ้นการอักเสบรุนแรงจากการที่ LPS จับกับตัวรับ Toll-like-receptor 4 (TLR4) ทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์เป็นจำนวนมาก (Antunes et al., 2011; Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Erridge et al., 2007)

#### กลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

กลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ของเชื้อ *Acinetobacter* มี 4 กลไกหลัก ได้แก่

##### 1. การสร้างเอนไซม์ทำลายยา

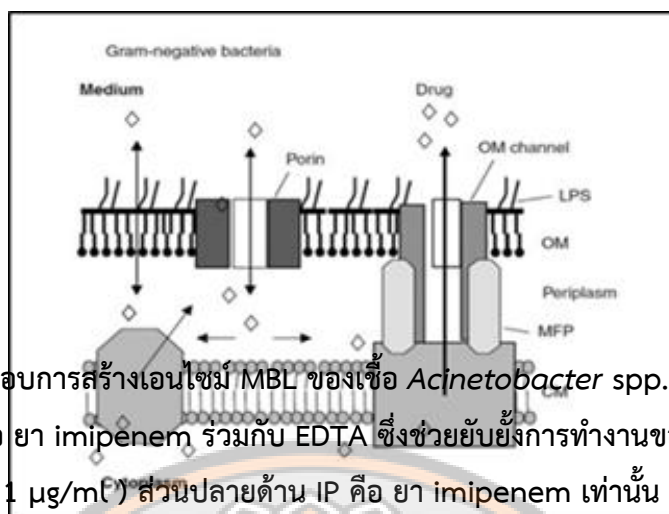
การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* โดยการสร้างเอนไซม์ พบว่ามีรายงานการสร้างเอนไซม์หลากหลายชนิดทั้งที่ทำลายกลุ่ม  $\beta$ -lactam ได้แก่เอนไซม์ Amp-C,  $\beta$ -lactamase, Oxacillin-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase (OXA-type carbapenemase) และ metallo  $\beta$ -lactamase ซึ่งกลุ่มนี้จะเป็นการทำลายโครงสร้างตรงบริเวณ  $\beta$ -lactam ring และการทำลายยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น aminoglycoside modifying enzyme กลุ่มนี้จะเป็นการเติมหมู่บางชนิดเข้าไปในโครงสร้างของยาทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้

Carbapenemase คือ เอนไซม์ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม carbapenems (imipenem และ meropenem) ได้ ซึ่งเป็นยาที่อยู่ในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ที่ในอดีตเป็นยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ได้ดี carbapenemase นอกจากจะทำลายยาในกลุ่ม carbapenems ได้แล้วยังสามารถทำลายยาชนิดอื่นในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ได้ เช่นยา ceftazidime, cefoperazone, cefepime, piperacillin (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Poirel & Nordmann, 2006) Carbapenemase ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะโครงสร้างโมเลกุลและ co-factor ที่ใช้ต่างกัน ได้แก่ 1) OXA-type carbapenemase และ 2) metallo  $\beta$ -lactamase (MBL)

1.1 OXA-type carbapenemase เป็นเอนไซม์  $\beta$ -lactamase จัดอยู่ในกลุ่ม D ตามโครงสร้างโมเลกุล หรือ 2d ตามชนิด substrate ของเอนไซม์ พบว่ามีรายงาน OXA-type carbapenemase มากกว่า 45 ชนิด จัดเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ชนิดที่พบใน *A. baumannii* ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ OXA-23, OXA-27 และ OXA-49 กลุ่มที่ 2 คือ OXA-24, OXA-25, OXA-26 และ OXA-40 กลุ่มที่ 3 คือ OXA-51 และกลุ่มที่ 4 คือ OXA-58 (Poirel & Nordmann, 2006; Walther-Rasmussen & Høiby, 2006) พบว่า OXA-type carbapenemase ที่สร้างจาก *A. baumannii* มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เช่น Valenzuela และคณะพบเชื้อ CR- *A. baumannii* ที่ผลิต OXA-23 และ OXA-51 ในประเทศออสเตรเลีย (Valenzuela et al., 2007) รายงานการพบ OXA-51 และ OXA-58 ในอิตาลี (Zarrilli et al., 2007) มีรายงานพบ OXA-40 ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Lolans et al., 2006) ส่วนในประเทศไทยมีรายงานว่าพบสายพันธุ์ที่ผลิต OXA-51 และ OXA-23 มากที่สุด (Santajit et al., 2023)

1.2 metallo  $\beta$ -lactamase (MBL) เป็น carbapenemase อีกชนิดหนึ่ง เป็นเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ที่อยู่ในกลุ่ม B ตามโครงสร้างโมเลกุล หรือกลุ่ม 3 ตามชนิด substrate ของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้ต้องการสังกะสี (Zn) เป็น co-factor ในปฏิกิริยาการทำลายยา ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ทำให้สามารถแยกเชื้อดื้อยาในกลุ่ม carbapenemase ว่าสร้าง MBL หรือไม่ โดยการใส่ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ซึ่งช่วยจับสังกะสีไว้ ทำให้ MBL ทำงานไม่ได้ เชื้อจึงกลับมาไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems ได้ (Walsh et al., 2005)





ภาพ 1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ MBL ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ด้วยวิธี E-test โดยปลายด้าน IPI คือ ยา imipenem ร่วมกับ EDTA ซึ่งช่วยยับยั้งการทำงานของ จึงเกิดบริเวณใสที่ชัดเจน ( $\text{MIC} < 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ส่วนปลายด้าน IP คือ ยา imipenem เท่านั้น เชื้อที่สร้าง MBL จึงทำลายยาได้ ( $\text{MIC} = 48 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) จึงสรุปได้ว่า เชื้อดังกล่าวสร้างเอนไซม์ MBL ได้

ที่มา: Walsh et al., 2005

นอกจากโครงสร้างโมเลกุล substrate และ co-factor แล้ว ความสามารถในการทำลายยาของกลุ่ม carbapenems ของ OXA-type carbapenemase และ MBL มีความแตกต่างกันด้วย โดยเอนไซม์ MBL มีประสิทธิภาพในการทำลายยาได้ดีกว่ากลุ่ม OXA-type carbapenemase ซึ่งในทางคลินิกเชื้อที่สร้าง MBL มักมีค่า MIC ที่สูงมากกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อที่สร้าง OXA-type carbapenemase (Poirel & Nordmann, 2006)

## 2. การขับยาออกจากเซลล์ (efflux pump)

Efflux pump เป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่ขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ลดลง ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างเต็มที่ และนำไปสู่การดื้อยา

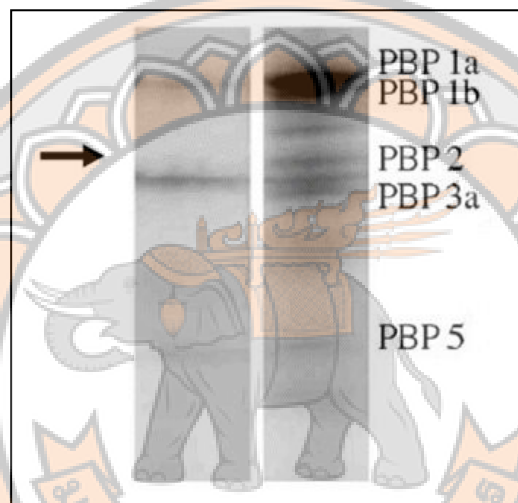
ภาพ 2 ระบบปั๊มขับยาออก (efflux pump) ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วย ได้แก่ โปรตีนส่วนที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน โปรตีนเชื่อมต่อในชั้นเพอริพลาซึม และ โปรตีนช่องทางออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Li et al., 2015

การดื้อยาโดยการสร้าง efflux pump สามารถขับยาต้านจุลชีพออกจากเซลล์ได้หลายกลุ่ม เช่นยา tetracyclines, chloramphenicol, aminoglycosides, quinolones และ  $\beta$ -lactam ซึ่งระบบของ efflux pump มีหลายชนิด เช่น major facilitator (MF) superfamily, small multidrug resistance (SMR) superfamily, multidrug and toxic compound extrusion (MATE) superfamily และ resistance-nodulation-cell division (RND) family ส่วนระบบที่พบใน CR- *A. baumannii* คือ RND family (Li et al., 2015; Poole, 2004) จากการศึกษาของ Magnet และคณะ พบว่าเชื้อ CR- *A. baumannii* ที่มี efflux pump ระบบ RND นอกจากจะขับยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam แล้ว ยังสามารถขับยาในกลุ่มอื่น ๆ ได้ด้วย เช่นยา aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol, fluoroquinolones, erythromycin และ trimethoprim (Magnet et al., 2001) เนื่องจากการดื้อยาโดยการสร้าง efflux pump ของ *A. baumannii* สามารถขับยาปฏิชีวนะได้หลายกลุ่ม ทำให้เชื้อชนิดนี้เกิดการดื้อยาแบบไม่จำเพาะหรือดื้อยาแบบหลายกลุ่มพร้อมกันได้

### 3. การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา

การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา เช่น การดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam เชื่อจะมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา คือ penicillin-binding protein (PBP) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มี 2 ลักษณะ คือ มีการสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่ยาไม่สามารถจับได้เพิ่มมากขึ้น หรือมีการลดการสร้าง PBP ชนิดที่ยาสามารถจับได้ ซึ่งทั้ง 2 กรณีล้วนทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam จากการศึกษาของ Fernández-Cuenca และคณะยังพบว่า CR-A. *baumannii* มีการขาดหายไปของ PBP ขนาด 73.2 kDa เมื่อเทียบกับเชื้อที่ไวต่อยา imipenem (ดังภาพ 3) (Fernández-Cuenca et al., 2003)



ภาพ 3 โปรตีน penicillin-binding proteins (PBPs) ที่ถูกแยกตามขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE ร่วมกับการย้อมสี Coomassie blue (ภาพถ่าย) เชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems (CRAB) พบการสร้าง PBPs ลดลงหลายชนิด เช่น PBP 1a, 1b, 3a และ 5 ส่วน PBP2 ไม่พบการสร้าง (ลูกศรชี้) เมื่อเปรียบเทียบกับ (ภาพขวา) เชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems (CSAB)

ที่มา: Fernández-Cuenca et al., 2003

### 4. ลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin

ยาต้านจุลชีพบางชนิด เช่น  $\beta$ -lactam ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์แบคทีเรียได้โดยตรง ต้องอาศัยช่องทางในการนำยาเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเรียกว่า porin ปกติแล้ว porin เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นรูอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรีย ทำหน้าที่นำสารที่ละลายน้ำได้ดี

เข้าสู่เซลล์ เมื่อเชื่อมีการลดการสร้าง porin ช่องทางสำหรับนำยาเข้าสู่เซลล์จึงลดลง ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยาด้านจุลชีพได้ (Bonomo & Szabo, 2006)

## Porins

เป็นโปรตีนที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการซึมผ่านของสารต่าง ๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

### 1. โครงสร้างและหน้าที่

Porins เป็นโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก มีโครงสร้างเป็นท่อ ( $\beta$ -barrel) ที่สร้างช่องทางให้โมเลกุลขนาดเล็กผ่านเข้าออกได้ เช่น สารอาหารและยาด้านจุลชีพ เป็นต้น

### 2. Porins ที่พบในเชื้อ *A. baumannii* มีหลายชนิด เช่น

2.1 Outer membrane protein A (OmpA) หรือ Omp38 เป็น porin ที่มีโครงสร้างแบบ  $\beta$ -barrel (เป็นท่อ) มีขนาดโมเลกุล 38,420 ดาลตัน (Da) ประกอบด้วย 356 amino acids (Choi et al., 2005) มีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะกับเซลล์โฮสต์โดยการจับกับ Fibronectin และกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis (Choi et al., 2008) ส่วนช่วยในกระบวนการขับยาออกจากเซลล์ พบว่าการสูญเสีย OmpA ทำให้เชื้อ *A. baumannii* มีความไวต่อยากลุ่ม chloramphenicol, aztreonam และ nalidixic acid มากขึ้น (Smani et al., 2014)

2.2 OprD Family porins เป็น porins ที่มีโครงสร้างแบบ  $\beta$ -barrel (เป็นท่อ) มีขนาดโมเลกุล 48,981 ดาลตัน (Da) ประกอบด้วย 436 amino acids ทำหน้าที่เป็นช่องทางให้สารโมเลกุลขนาดเล็กผ่านเข้า-ออกเซลล์แบคทีเรียได้เช่น ยาปฏิชีวนะ และพบว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ (Si-Tuan et al., 2017)

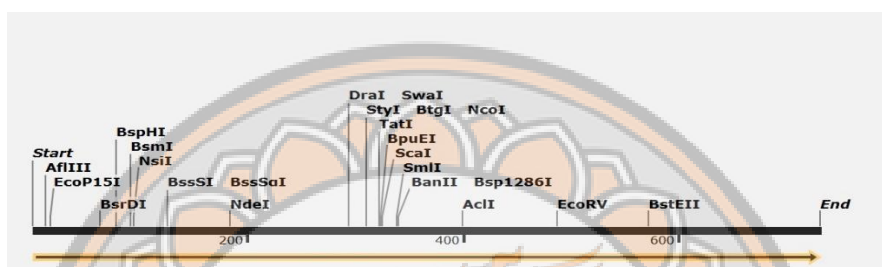
2.3 OmpW Family protein (OmpW) เป็น porins ที่มีโครงสร้างแบบ  $\beta$ -barrel (เป็นท่อ) มีขนาดโมเลกุล 40,037 ดาลตัน (Da) ประกอบด้วย 370 amino acids (Gallagher et al., 2015) ทำหน้าที่เป็นช่องทางสำหรับการนำเข้าสู่สารประกอบขนาดเล็กที่ไม่ชอบน้ำ (Hong et al., 2006) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ OmpW มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา colistin (Moffatt et al., 2010)

2.4 Omp22-33, Omp37, Omp43, Omp44 และ Omp47 เป็น porins อื่น ๆ ที่พบใน *A. baumannii* ส่วนใหญ่มีโครงสร้างแบบ  $\beta$ -barrel (เป็นท่อ) มีหน้าที่เป็นช่องทางให้สารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกเซลล์ (Fernández-Cuenca et al., 2011)

ยีน *Carbapenem-associated resistance protein* หรือ *carO*

### 1. โครงสร้างและหน้าที่ของยีน *carO*

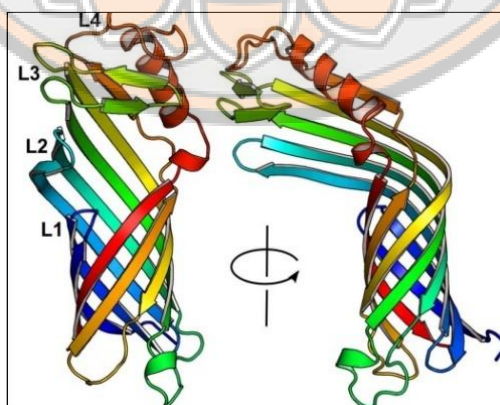
ยีน *carO* เป็นส่วนหนึ่งใน chromosomal genes ของเชื้อ *A. baumannii* มีความยาว 738 bp เข้ารหัสเป็นโปรตีนมีจำนวน 246 amino acid (ข้อมูลอ้างอิงจาก *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน AB242) (Consortium, 2024) ซึ่งทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านบนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (porin) ที่เรียกว่า CarO channel ของเชื้อ *A. baumannii*



ภาพ 4 ยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* AB242

ที่มา: Consortium, 2024

*carO* channel มีน้ำหนักโมเลกุล 26,506 ดาลตัน (Da) (Consortium, 2024) โครงสร้างเป็นมี 8 stranded  $\beta$ -barrel monomer มีลักษณะคล้าย "baseball glove" (Zahn et al., 2015) ดังแสดงในภาพ 5



ภาพ 5 โครงสร้างของโปรตีน *carO*

ที่มา: Zahn et al., 2015

carO channel ทำหน้าที่เป็นช่องทางจำเพาะสำหรับกรดอะมิโนพื้นฐาน เช่น ornithine และ glycine ซึ่งมีความสำคัญต่อ metabolism และ virulence ของเชื้อ และจากงานวิจัยของคุณ M. Catel-Ferreira และคณะ ที่ได้ทำการศึกษา “ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของ carO โปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา carbapenem ของ *Acinetobacter baumannii*” พบว่า carO channel มีตำแหน่งจับกับ imipenem (แต่ไม่จับ meropenem) และความจำเพาะของ carO channel นี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างปฐมภูมิของมัน (Zahn et al., 2015)

### การ mutation ของยีน carO

จากงานวิจัยเรื่อง A novel insertion sequence, ISAb10, inserted into ISAb1 adjacent to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii* ของ Y. Lee, C. et al. (2011) ได้ทำการศึกษาการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา carbapenem ในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิในเกาหลีใต้ โดยมีการเก็บตัวอย่างเชื้อที่ดื้อต่อยา carbapenem จำนวน 23 isolate จากผู้ป่วยจำนวน 23 ราย ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม-กรกฎาคม 2007 (เป็น outbreak ในโรงพยาบาล) พบ insertion sequence (IS) ใหม่ที่ตั้งชื่อว่า ISAb10 ซึ่งถูกแทรกเข้าไปใน element ISAb1 ที่อยู่ข้างหน้ายีน blaOXA-23 ใน isolates กลุ่มหนึ่งที่แสดงค่า MIC ของ carbapenem สูงขึ้น การมีอยู่ของ ISAb10 มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน OXA-23 น่าจะเป็นเพราะการให้ลำดับ promoter เพิ่มเติม ISAb10 ยังถูกแทรกเข้าไปในยีน carO ทำให้เกิดการทำลายยีน carO และลดการซึมผ่านของ carbapenem (Lee et al., 2011)

จากงานวิจัยเรื่อง Mutation of CarO participates in drug resistance in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ของ L. J. Zhu et al. (2019) ได้ทำการการประเมินรูปแบบการดื้อยาต่อยาปฏิชีวนะ และสำรวจบทบาทของเมมเบรน porin ในการดื้อยา imipenem ของเชื้อ *A. baumannii* โดยรวบรวมตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา imipenem (IRAB) จำนวน 63 ตัวอย่าง และเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยา imipenem (ISAB) จำนวน 21 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 16 ชนิดด้วยวิธี K-B และใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหายีน carO และ oprD และทำการ sequencing เพื่อเปรียบเทียบลำดับระหว่าง IRAB และ ISAB คณะผู้วิจัยได้สร้างแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีน CarO อีกด้วย ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่าง ISAB แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกกลุ่ม ตัวอย่าง IRAB แสดงอัตราการดื้อยาที่สูงมาก ยกเว้น tigecycline (3.2%), cefoperazone/sulbactam (28.6%), และ minocycline (30.2%) ตัวอย่างทั้ง 84 ตัวมียีน carO และ oprD ทั้งคู่ และผลการ sequencing แสดงให้เห็นการกลายพันธุ์ของยีน carO ที่มีอยู่ใน IRAB เมื่อเปรียบเทียบกับ ISAB ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในโครงสร้างสามมิติของ

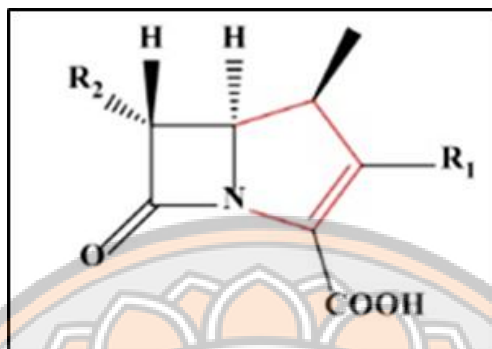
โมเลกุลโปรตีน CarO ระหว่าง IRAB และ ISAB คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า การกลายพันธุ์ของ CarO ถูกระบุว่าเป็นหนึ่งในกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา imipenem ใน *A. baumannii* (Zhu et al., 2019)

จากงานวิจัยเรื่อง Virulence role of the outer membrane protein CarO in carbapenem - resistant *Acinetobacter baumannii* ของ G. Labrador-Herrera และคณะ (2020) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการค้นหา virulence factor ที่มีแนวโน้มที่ดีสำหรับการเป็นเป้าหมายของยาต้าน virulence เพื่อเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาการติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ดื้อต่อยา carbapenem (CRAB) โดยผู้วิจัยได้ทำการศึกษาตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา carbapenem จำนวน 6 isolates ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย ICU จำนวน 6 ราย (Non-survivors = 3 ราย, Survivors = 3 ราย) ผลการวิจัยพบว่า เชื้อ *A. baumannii* ที่มียีน *carO* แบบสมบูรณ์ มีความไวต่อยาต้านจุลชีพและมี virulence สูง พบในตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่ม Non-survivors ส่วนเชื้อ *A. baumannii* ที่มียีน *carO* แบบกลายพันธุ์ ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ และมี virulence ต่ำ พบในตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่ม Survivors ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงมุมมองในการเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาและความรุนแรงของการติดเชื้อ และเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการพัฒนายาต้าน CRAB ที่มุ่งเป้าไปที่การลด virulence มากกว่าการฆ่าเชื้อ (Labrador-Herrera et al., 2020)

จากงานวิจัยเรื่อง *Acinetobacter baumannii* Global Clone-Specific Resistomes Explored in Clinical Isolates Recovered from Egypt ของ S. M. Hamed et al. (2023) ได้ศึกษาระบาดวิทยาเชิงจีโนม (genomic epidemiology) และโครงสร้างรีซิสโตม (resistome structure) ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก 46 สายพันธุ์ โดยใช้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมทั้งหมด (whole-genome sequencing) โดยเชื้อที่คัดเลือกมาล้วนแสดงความไวต่อยาต้านจุลชีพลดลงอย่างน้อยสามกลุ่มยา (multidrug resistant) และได้รับการระบุชนิดเบื้องต้นด้วยเทคนิค MALDI-TOF/MS และยืนยันจีโนไทป์ด้วยการตรวจหายีน *blaOXA-51* ด้วยเทคนิค PCR และทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี broth microdilution ผลการวิจัยพบ resistome ที่อาจทำให้เชื้อดื้อยาส่วนใหญ่ที่ทดสอบ ในบรรดา ยีนดื้อยา carbapenem พบว่า *blaOXA-23* พบมากที่สุด (69.6%) รองลงมาคือ ISAb1-amplified *blaADC* (56.5%), *blaNDM-1* และ *blaGES-11* (21.7% ทั้งคู่) และ *blaGES-35* (2.2%) ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการดื้อยา carbapenem กับการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ซึ่งพบในเชื้อ 35 สายพันธุ์ (76.0%) พบว่าสายพันธุ์ที่มีทั้ง *blaOXA-23* และ *blaGES-11* มีอัตราการดื้อต่อยา carbapenem ต่ำกว่า (Hamed et al., 2023)

## ยากลุ่ม Carbapenems

ยาในกลุ่ม Carbapenems มีโครงสร้างหลักเป็น  $\beta$ -lactam ring มีอะตอมคาร์บอนที่ตำแหน่ง C-1 แทนที่อะตอมซัลเฟอร์ใน penicillin ดังแสดงในภาพ 6 (Sunagawa et al., 1990)



ภาพ 6 ส่วนประกอบที่สำคัญของ carbapenems

ที่มา: Sunagawa et al., 1990

### 1. กลไกการออกฤทธิ์ของ Carbapenems

Carbapenems ออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) ครอบคลุมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ carbapenems เข้าสู่เซลล์ผ่านทาง outer membrane protein หรือ Porins เมื่อผ่าน outer membrane แล้ว ยาจะแพร่ผ่าน periplasmic space จากนั้น carbapenems จะจับกับ Penicillin-binding protein (PBPs) ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน การจับนี้จะเป็นการจับแบบ permanently (เกิดพันธะโควาเลนต์ที่ค่อนข้างถาวร) ซึ่ง PBPs เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์ peptidoglycan ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์แบคทีเรีย carbapenems ไปยับยั้งการทำงานของ PBPs ทำให้การสร้าง cross-links ใน peptidoglycan ถูกรบกวน (Hashizume et al., 1984) ในขณะเดียวกันกระบวนการ autolysis (การย่อยสลายตัวเอง) ของผนังเซลล์ยังคงดำเนินไป นำไปสู่การตายของเซลล์ของแบคทีเรีย (van Dam et al., 2009) ยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่ ยา Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem, Biapenem, Panipenem, Tebipenem และยา Faropenem (Ueda & Vinet, 1992)

**Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique** (Bertholf, 2007; สุมาลี ตั้งประดับกุล, 2543)

**1. Polymerase Chain Reaction หรือ PCR** คือ การเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) ที่สนใจในหลอดทดลองแบบซ้ำ ๆ หลาย ๆ รอบ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน (thermostable DNA polymerase) โดยจำนวน DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะมีลักษณะแบบ exponential curve คำนวณได้เท่ากับ  $2^n$  (เมื่อ  $n$  คือจำนวนรอบของการทำ PCR) จนถึงระยะหนึ่งที่ปริมาณ PCR product คงที่ และองค์ประกอบในการทำ PCR ลดลง ซึ่งการดำเนินไปของปฏิกิริยาจะไม่ให้ product ตามสูตร  $2^n$  จะเรียกสิ่งที่เกิดขึ้นนี้ว่าปรากฏการณ์ Plateau effect

## **2. องค์ประกอบในการทำ PCR**

**2.1 Template หรือ DNA** ตั้งต้น (ในกรณีที่ Template ตั้งต้นเป็น RNA จะต้องเพิ่มขั้นตอนการสร้างสาย complementary DNA (cDNA) โดยใช้ RNA เป็นต้นแบบ หรือการทำอิกสายขึ้นมาคู่กับ RNA นั้นเองเพื่อให้เป็นสายคู่ที่จะเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ได้ จะเรียกขั้นตอนนี้ว่า Reverse transcription (RT) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เช่น M-MLV reverse transcriptase ที่ได้จาก Moloney Murine Leukemia Virus หรือ AMV reverse transcriptase ที่ได้จาก Avian Myeloblastosis Virus การสร้างสาย cDNA จะใช้ primer ที่เป็น oligo-dT, random hexamer หรือ gene specific primer ก็ได้ จากนั้นจึงนำสาย cDNA ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ขั้นตอน PCR ต่อไป) ปกติในปฏิกิริยา PCR จะใช้ DNA ตั้งต้นในช่วง 10-50 ng/reaction

**2.2 Primers** เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) สายสั้น ๆ นิยมใช้ความยาวประมาณ 20-24 bp และมีองค์ประกอบของ G และ C ระหว่าง 40-60% จะเป็นตัวเริ่มต้นในการสร้าง DNA สายใหม่ในบริเวณช่วง DNA template หรือยีนที่เราต้องการ โดย primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทั่วไปจะมี 2 เส้นคือ forward primer และ reverse primer โดย primers ที่ดีจะต้องมีค่า  $T_m$  ของทั้ง 2 เส้นเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR ของ primer แต่ละเส้นอยู่ในช่วง 0.1-2.0  $\mu\text{M}$

**2.3 Thermostable DNA Polymerase** เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสาย DNA เส้นใหม่ หรือ PCR product ในตำแหน่งยีนที่ต้องการ โดยการนำ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ได้แก่ เบส A, T, C, G มาต่อในตำแหน่งที่ถัดจาก primer ในแต่ละข้างด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์โดยให้มีความจำเพาะกับ DNA ต้นแบบในทิศทาง 5' ไป 3' (polymerase activity) รวมถึงเอนไซม์ยังทำหน้าที่ในการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ในบริเวณที่มีการเติมเบส A, T, C, G ไม่ถูกต้องในทิศทาง 3' ไป 5' (exonuclease activity) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติอีกประการหนึ่งคือ การตรวจสอบความผิดพลาดของการสร้าง

DNA สายใหม่ (5' ไป 3' exonuclease) หรือ proofreading activity โดยเอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้มากที่สุดในงาน PCR คือ Taq DNA polymerase แต่ถ้าต้องการความถูกต้องของการสร้างสาย DNA อาจใช้ Pfu DNA polymerase ในปฏิกิริยา PCR ปกติจะใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ 2.5-5 unit/100  $\mu$ l ของ PCR reaction

2.4 Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ A, T, G, C ที่จะใช้ในการสร้าง PCR product สายใหม่ โดยจะเตรียมเป็นสารผสมที่มีความเข้มข้นในช่วง 20-200  $\mu$ M

2.5 PCR buffer และองค์ประกอบอื่น ๆ ในปฏิกิริยา PCR โดย PCR buffer จะช่วยให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย buffer จะสอดคล้องกับ DNA polymerase ที่ใช้ ซึ่งปกติ buffer จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้น 10 เท่าของที่ใช้จริง ซึ่งผู้ใช้จะต้องใส่ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมในปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

องค์ประกอบอื่น ๆ ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ  $MgCl_2$  ซึ่งทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ DNA polymerase และมีผลต่อประสิทธิภาพของการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปความเข้มข้นสุดท้ายของ  $MgCl_2$  ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 1.5 mM แต่ในการทำงานจริงผู้ปฏิบัติงานสามารถปรับความเข้มข้นได้ โดยให้อยู่ในช่วง 1-5 mM โดยคำนึงถึงลักษณะ template และ primer ที่ใช้ รวมถึงการหาสภาวะที่เหมาะสมเมื่อมีการทำ PCR ครั้งใหม่ด้วย

น้ำที่ใช้ในการทำ PCR ก็มีความสำคัญ ควรใช้น้ำที่ปราศจาก DNase หรือ RNase และไม่มีการปนเปื้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อแบคทีเรีย ที่อาจมี enzyme nuclease ที่ทำลาย DNA template และ primer รวมถึงรบกวนปฏิกิริยา PCR ด้วย

### 3. ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

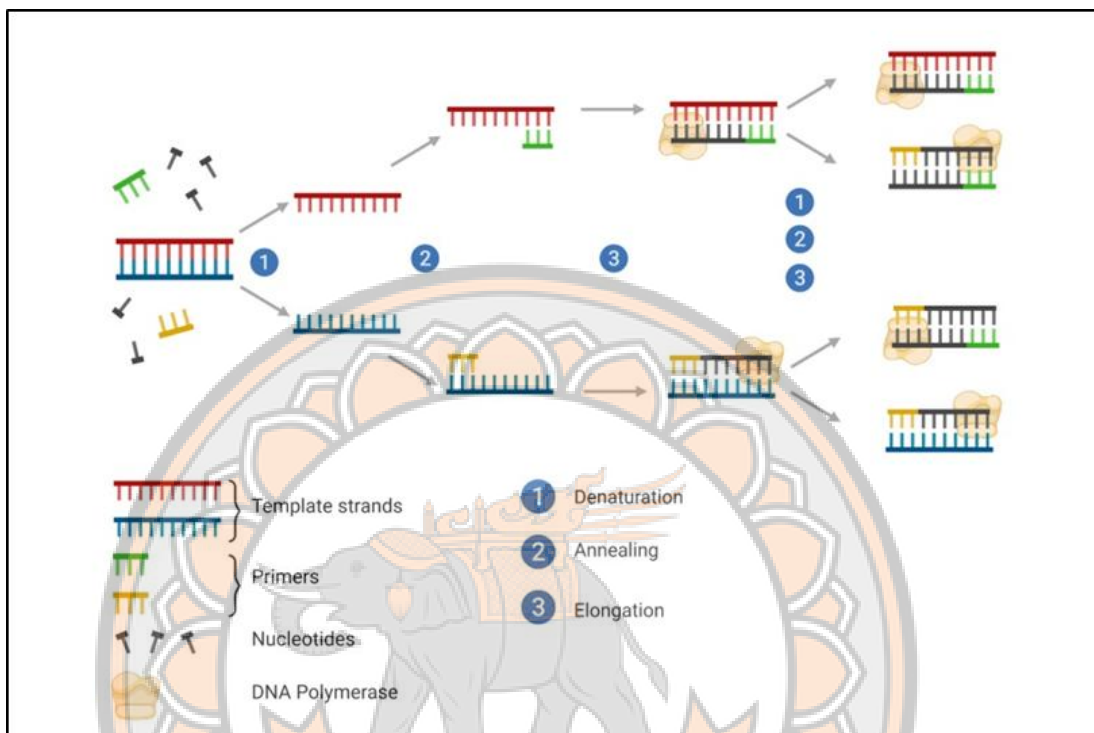
โดยทั่วไปขั้นตอนการทำ PCR มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.1 Denaturation step เป็นขั้นตอนการแยกสาย DNA template สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

3.2 Annealing step เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง เพื่อให้ primer ในปฏิกิริยา PCR เข้าจับกับ DNA template ในตำแหน่งที่จำเพาะ เพื่อเตรียมที่จะสร้าง PCR product ใหม่ ขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิในช่วงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิในช่วงนี้จะขึ้นกับค่า  $T_m$  ของ primer ที่ใช้ โดยทั่วไป Annealing temperature จะมีค่าต่ำกว่า  $T_m$  เฉลี่ยของ primer ทั้งสองประมาณ 3-5 องศาเซลเซียส

3.3 Extension step เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่โดยเริ่มจากจุดต้นของ primers ใน DNA template แต่ละข้างโดยการนำ dNTPs ต่าง ๆ มาต่อกันในลักษณะที่คู่สมกับ DNA template ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยจะต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม

กับเอนไซม์ที่ใช้ เช่น การใช้ Taq DNA polymerase จะใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมช่วง 70-75 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้ คือ 72 องศาเซลเซียส



ภาพ 7 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR)

ที่มา: สุมาลี ตั้งประดับกุล, 2543

### การวิเคราะห์ลำดับ DNA (DNA Sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับ DNA (DNA sequencing) เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลสารพันธุกรรม ซึ่งทำหน้าที่ถ่ายทอดลักษณะของสิ่งมีชีวิตจากรุ่นสู่รุ่นเมื่อมีการแบ่งเซลล์ โครงสร้างของ DNA เกิดจากหน่วยย่อยที่เรียกว่า nucleotide ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรจีนัสเบส แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กล่าวคือ กลุ่มพิวรีน (purine) ได้แก่ ไทมีน (thymine; T) และไซโตซีน (cytosine; C) และกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ อะดีนีน (adenine; A) และกวานีน (guanine; G)

สารประกอบไนโตรจีนัสเบสนี้จะรวมตัวกับน้ำตาลดีออกซีไรโบสและหมู่ฟอสเฟส ซึ่งเรียงต่อกันเป็นสายคู่สมโดยเบสพิวรีนเข้าคู่กับไพริมิดีน (A-T, G-C) การเรียงต่อกันของสายนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความหลากหลายทางพันธุกรรม

และมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การหาลำดับ DNA มีการคิดค้นและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้มีความก้าวหน้ามาเป็นเวลานาน สามารถแบ่งเป็นยุคต่างๆได้ดังนี้

## 1. First generation sequencing

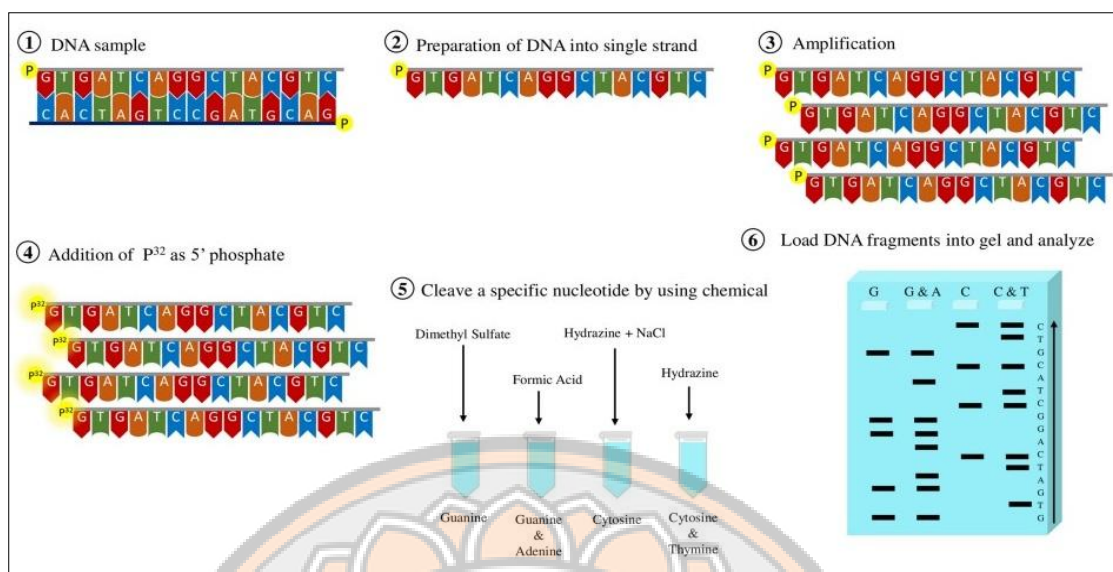
การวิเคราะห์ลำดับ DNA ในยุคแรก ประกอบด้วย 2 วิธีคือ

### 1.1 Maxam-Gilbert Method

วิธีการนี้เกิดขึ้นในช่วงปลายปี 1970 คิดค้นขึ้นโดย Maxam และ Gillbert ซึ่งอาศัยหลักการทางเคมี โดยใช้สารเคมีตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งจำเพาะ วิธีการคือ ดิดฉลาก DNA ต้นแบบด้วยสารกัมมันตรังสี คือ radioactive-phosphate group (P32) แทน phosphate group ในสาย DNA ที่ถูกทำให้แยกออกจากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase และทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR จากนั้น DNA ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นจะถูกตัดเป็นชิ้นส่วน โดยสารเคมีที่จำเพาะต่อเบสแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ดังนั้นปฏิกิริยาจะถูกแบ่งออกเป็น 4 หลอดทดลองที่แยกออกจากกันตามชนิดของสารเคมีที่จำเพาะต่อเบส ได้แก่

- 1.1.1 Dimethyl sulfate ตัดที่ตำแหน่งเบส guanine (G)
- 1.1.2 Hydrazine และ Sodium chloride ตัดที่ตำแหน่งเบส cytosine (C)
- 1.1.3 Formic acid ตัดที่ตำแหน่งเบส guanine และ adenine (G&A)
- 1.1.4 Hydrazine ตัดที่ตำแหน่งเบส cytosine และ thymine (C&T)

เมื่อปฏิกิริยาการตัดเสร็จสิ้น จะได้ผลผลิตเป็นชิ้น DNA ที่ขนาดแตกต่างกัน นำผลผลิตที่ได้จากทั้ง 4 ปฏิกิริยามาวิเคราะห์ขนาดด้วย Gel electrophoresis และใช้ Autoradiography ในการแสดงแถบ DNA บนแผ่นเอกซเรย์ และทำการอ่านลำดับเบสจากด้านล่างขึ้นด้านบน ปัจจุบันวิธีการของ Maxam และ Gillbert ไม่เป็นที่นิยมใช้ในงานประจำทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีความเป็นพิษสูงจาก phosphate isotope และสารเคมีที่ใช้ และยากต่อการอ่านลำดับเบสที่มีความยาวมากกว่า 500 bp อีกทั้งยังเกิด error ระหว่างการตัดสาย DNA ได้ (Eren et al., 2022)

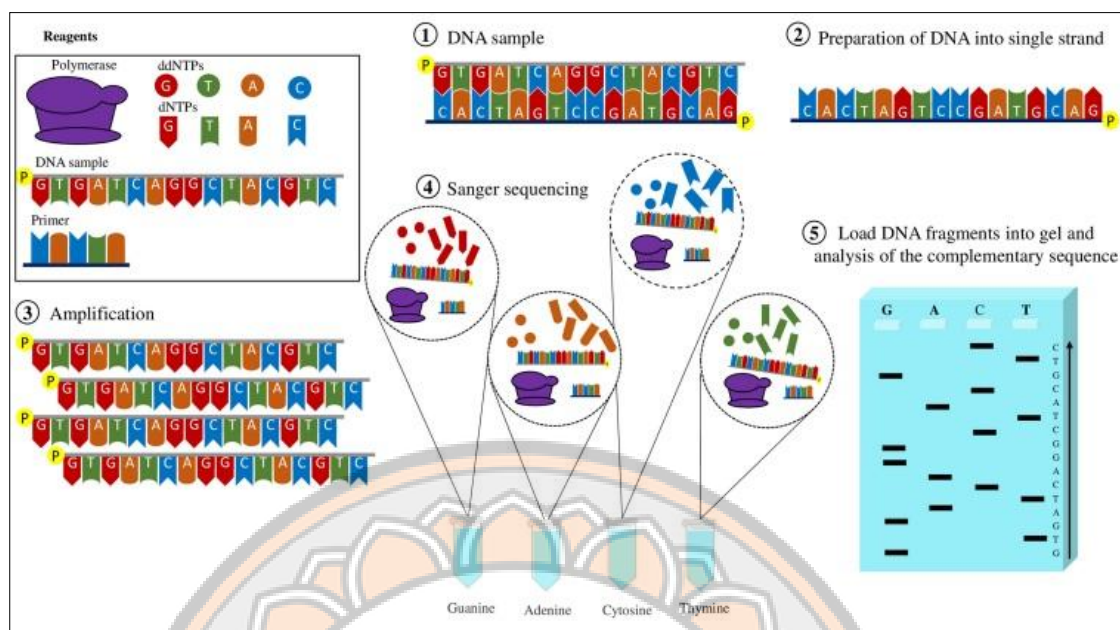


ภาพ 8 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยวิธี Maxam-Gilbert Method

ที่มา: Eren et al., 2022

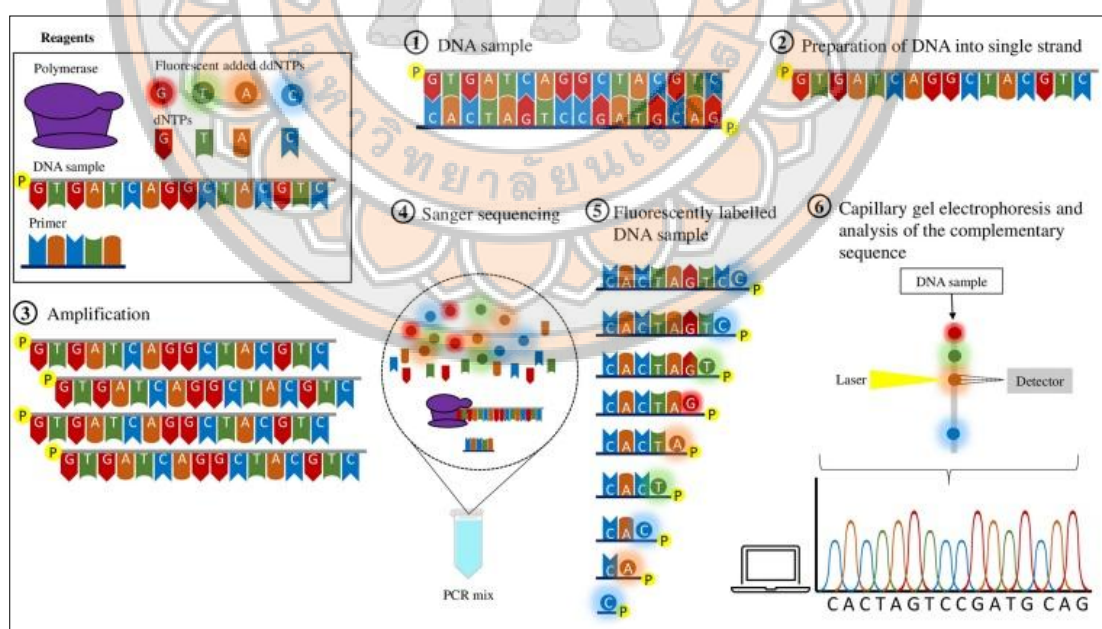
## 1.2 Sanger Method

วิธีการนี้เกิดขึ้นในปี ค.ศ.1977 คิดค้นขึ้นโดย Frederick Sanger มีการใช้สารยับยั้งการสังเคราะห์สาย DNA ที่จำเพาะ คือ dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) วิธีการคือ แบ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA ออกเป็น 4 หลอด โดยแต่ละหลอดประกอบด้วย primer ที่จำเพาะกับ DNA ต้นแบบ และเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์สาย DNA โดยใช้ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ที่เติมลงไปในปฏิกิริยา และในแต่ละหลอดของปฏิกิริยาจะเติม ddNTP คนละชนิด (ddATP, ddCTP, ddGTP และ ddTTP) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย DNA จะสิ้นสุดลงเมื่อมี ddNTP เข้ามาจับ ทำให้ได้ผลผลิต DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งจะนำผลผลิต DNA จากทั้ง 4 ปฏิกิริยามาวิเคราะห์ขนาดด้วย polyacrylamide gel และใช้ autoradiograph แสดงแถบ DNA และทำการอ่านลำดับเบสจากด้านล่างขึ้นด้านบน ต่อมาได้มีการพัฒนามาใช้ capillary electrophoresis แทนการใช้ polyacrylamide gel และใช้สี fluorescent ในการติดฉลาก ddNTP แต่ละชนิด แทนการใช้สารกัมมันตรังสีที่มีความเป็นพิษต่อคน ซึ่งสามารถทำให้การเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA เกิดขึ้นในหลอดเดียวกันได้ ผลของลำดับเบสที่ได้จากวิธีนี้จะเป็นแบบ complimentary หรือเบสคู่สมกับลำดับเบสเป้าหมาย ปัจจุบันวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้อยู่ในงานประจำทางห้องปฏิบัติการ (Eren et al., 2022)



ภาพ 9 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยวิธี Sanger แบบดั้งเดิม

ที่มา: Eren et al., 2022

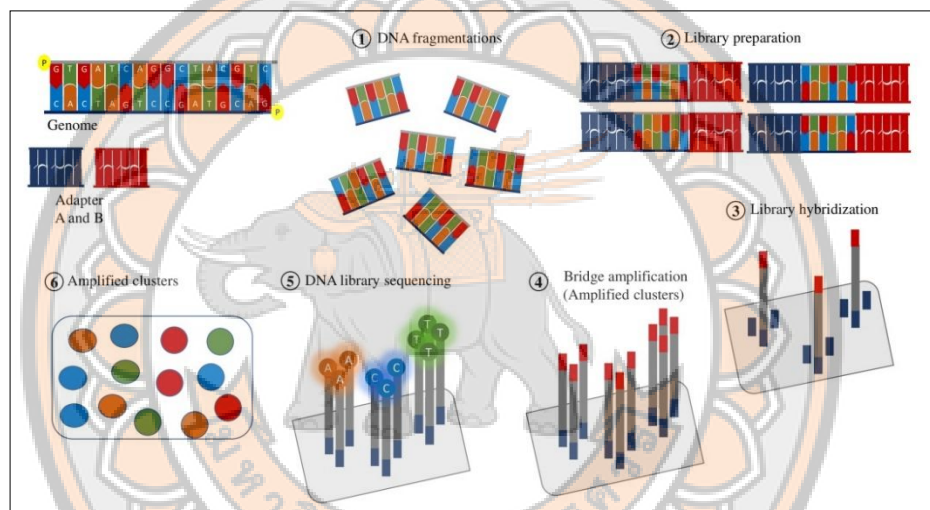


ภาพ 10 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยวิธี Sanger แบบใหม่

ที่มา: Eren et al., 2022

## 2. Second generation sequencing

การวิเคราะห์ลำดับ DNA ในยุคที่สอง มีการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้วิธี Next Generation Sequencing (NGS) ซึ่งมีชุด Kit และอุปกรณ์ที่ออกแบบมาเพื่อให้กระบวนการมีความคุ้มค่าด้านต้นทุนและประหยัดเวลามากยิ่งขึ้น มีการนำแพลตฟอร์มต่างๆ เข้ามาใช้งาน เช่น Roche 454, Illumina, SOLiD และ Ion Torrent ซึ่งแต่ละแพลตฟอร์มมีความแตกต่างกันตามการเตรียมคลัง DNA ต้นแบบ (Library preparation) การเพิ่มจำนวน DNA ต้นแบบ (amplification) วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส และความแตกต่างของความยาวเบสที่ได้ (Eren et al., 2022)

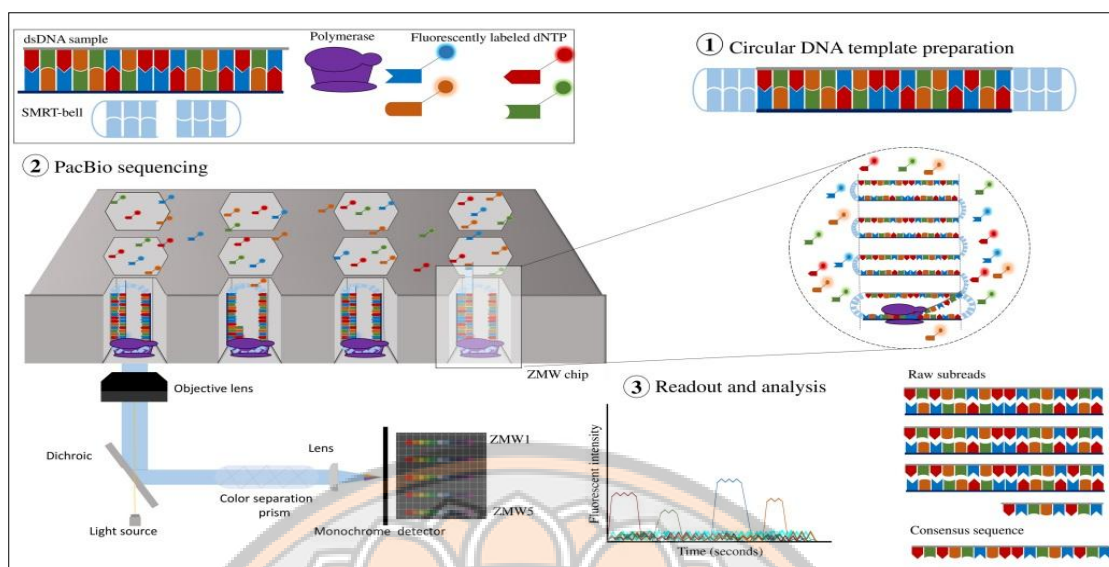


ภาพ 11 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วย Library preparation and Illumina method

ที่มา: Eren et al., 2022

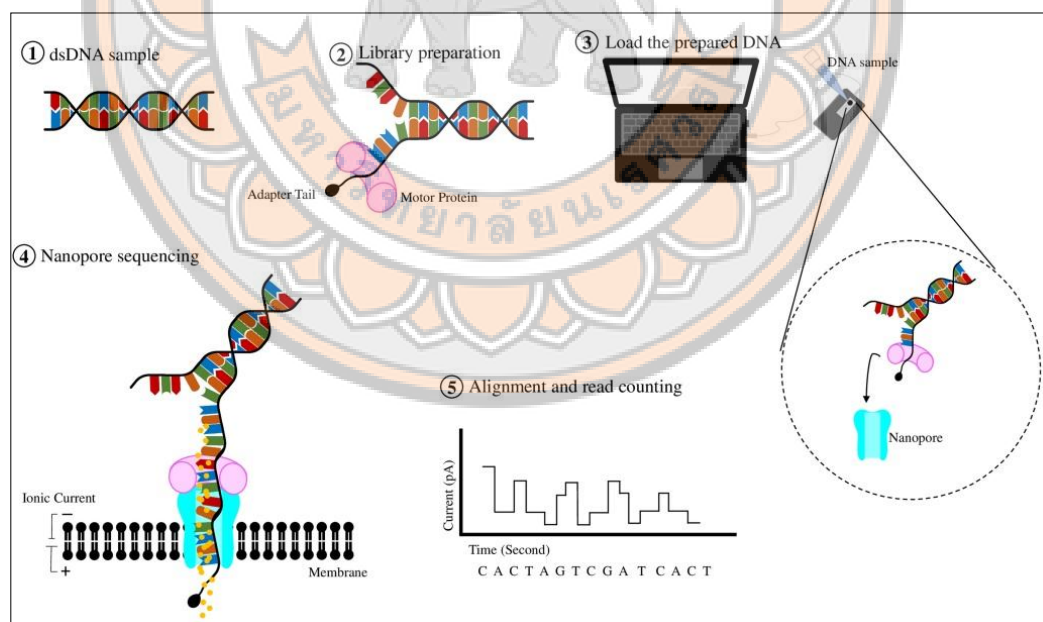
## 3. Third generation sequencing

การวิเคราะห์ลำดับ DNA ในยุคที่สาม มีการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสได้ยาวขึ้น ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำลง และมีความเร็วในการวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้น คุณสมบัติที่โดดเด่นของวิธีนี้คือไม่จำเป็นต้องมีการเพิ่มจำนวน DNA ต้นแบบ (amplification) และสามารถวิเคราะห์แบบเรียลไทม์ (real-time analysis) โดยไม่มีการตัดชิ้นส่วน DNA เทคนิคที่ใช้มี 2 เทคนิคได้แก่ Pacific Bioscience และ Oxford Nanopore Technology (Eren et al., 2022)



ภาพ 12 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยเทคนิค PacBio sequencing method

ที่มา: Eren et al., 2022



ภาพ 13 การวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยเทคนิค Oxford nanopore technology method

ที่มา: Eren et al., 2022

### Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ใช้ค่า MIC สำหรับประเมินความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยมี Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) เป็นองค์กรที่กำหนดมาตรฐานสำหรับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Humphries et al., 2021)

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 36th ed. CLSI supplement M100 กำหนดเกณฑ์ค่า MIC Breakpoints สำหรับ *Acinetobacter* spp. แสดงดังตาราง 1 (Humphries et al., 2021)

ตาราง 1 MIC Breakpoints for *Acinetobacter* spp.

| Antimicrobial Agent    | Interpretive Categories and MIC Breakpoints (µg/mL) |                  |               |
|------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|---------------|
|                        | Susceptible (S)                                     | Intermediate (I) | Resistant (R) |
| <b>Carbapenem</b>      |                                                     |                  |               |
| - Imipenem (T-2)       | ≤2                                                  | 4                | ≥8            |
| - Meropenem (T-2)      | ≤2                                                  | 4                | ≥8            |
| - Doripenem            | ≤2                                                  | 4                | ≥8            |
| <b>Cephalosporin</b>   |                                                     |                  |               |
| - Ceftazidime (T-1)    | ≤8                                                  | 16               | ≥32           |
| - Ceftriaxone (T-4)    | ≤8                                                  | 16-32            | ≥64           |
| <b>Fluoroquinolone</b> |                                                     |                  |               |
| - Ciprofloxacin (T-1)  | ≤1                                                  | 2                | ≥4            |
| <b>Polymyxin</b>       |                                                     |                  |               |
| - Colistin (T-4)       | -                                                   | ≤2               | ≥4            |

หมายเหตุ: T หมายถึง Teir

Teir 1 หมายถึง ทดสอบและรายงานผลเป็นประจำ (routine testing & reporting)

Teir 2 หมายถึง ทดสอบเป็นประจำ แต่รายงานเฉพาะเมื่อเชื้อดื้อต่อยา Tier 1

Teir 3 หมายถึง พิจารณาทดสอบเป็นประจำในสถาบันที่มีผู้ป่วย MDR สูง

Teir 4 หมายถึง ทดสอบเฉพาะเมื่อแพทย์ร้องขอ

ที่มา: Humphries et al., 2021

## ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) มาจากคำว่า อณูชีววิทยา (Molecular biology) และสารสนเทศ (Informatics) ดังนั้นคำว่าชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) จึงหมายถึงการบูรณาการของหลายสาขาวิชา โดยใช้ความรู้จากอณูชีววิทยา, ชีวเคมี, คณิตศาสตร์ประยุกต์, สถิติศาสตร์, สารสนเทศศาสตร์ และวิทยาการคอมพิวเตอร์ ที่ประกอบด้วยการจัดเก็บข้อมูลทางชีววิทยาและประมวลผลข้อมูลทางชีววิทยา และที่สำคัญคือการพัฒนาโปรแกรมประยุกต์ในการสืบค้น เพื่อใช้ในการหาคำตอบและแก้ปัญหาทางชีววิทยา หรือทำนายความเป็นไปได้ทางชีววิทยาโดยการสร้างแบบจำลอง จึงทำให้เกิดศาสตร์ใหม่ เช่น จีโนมิกส์ (Genomics), โปรตีโอมิกส์ (Proteomics), เมตาโบลอมิกส์ (Metabolomics) เป็นต้น (Samal et al. (2021)

ฐานข้อมูลทางชีวภาพเป็นแหล่งรวบรวมข้อมูลจากการวิจัยทางชีววิทยา ครอบคลุมข้อมูลลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเกิดจากความร่วมมือของนักวิจัยทั่วโลก ฐานข้อมูลที่ดีต้องเข้าถึงง่ายและรองรับผู้ใช้จำนวนมากพร้อมกันได้ ฐานข้อมูลลำดับเบสให้บริการ 2 หน้าที่หลักคือ 1) เปรียบเทียบลำดับใหม่กับลำดับเดิมในฐานข้อมูล และ 2) เป็นแหล่งข้อมูลสำหรับการทดลองและทดสอบสมมติฐานด้านวิวัฒนาการของโมเลกุล ตัวอย่างฐานข้อมูลของโปรตีนและลำดับกรดอะมิโน (Protein sequence databases) ได้แก่ PIR, Swiss-Prot, TrEMBL - Translated EMBL, GenPept และ NRL\_3D เป็นต้น ส่วนตัวอย่างฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence databases) ได้แก่ EMBL, GenBank และ DDBJ (Samal et al. (2021)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวภาพ โดยใช้ศาสตร์ด้านเทคโนโลยีสารสนเทศและวิทยาการคอมพิวเตอร์ในการสร้างเครื่องมือหรือโปรแกรมเพื่อจัดการข้อมูลชีวภาพ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นรูปแบบต่าง ๆ เช่น

### 1. Sequence Alignment

เป็นการจัดเรียงความเหมือนของสายลำดับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน เพื่อค้นหาช่วงลำดับที่สนใจ (conserved sequence) ผลลัพธ์ที่ได้สามารถนำไปทำนายโครงสร้างของดีเอ็นเอ หรือโปรตีน และใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ เช่น BLAST, HMMER และ FASTA เป็นต้น

### 2. Multiple Sequence Alignment

เป็นการเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างสายลำดับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอหรือโปรตีน มากกว่าสองเส้นของยีนเดียวกันหรือกลุ่มเดียวกันจากหลายแหล่ง ซึ่งอาจจะเป็นลำดับเบสจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต่างสายพันธุ์ ต่างชนิด หรือแม้แต่ต่างอาณาจักรมาเปรียบเทียบกันได้ นอกจากการเปรียบเทียบลำดับเบสแล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบ Primer ได้อีกด้วย เช่น MSAProbs, Alignment, MultAlin และ DiAlign เป็นต้น

### 3. Gene Finding

หรือ Gene Prediction คือกระบวนการระบุตำแหน่งของรหัสดีเอ็นเอ โปรตีน อาร์เอ็นเอ และองค์ประกอบการทำงานอื่น ๆ ในจีโนม รวมถึงการคาดการณ์ลำดับเบสที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ถือเป็นหนึ่งในขั้นตอนแรกและสำคัญที่สุดในการทำความเข้าใจจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลังจากการจัดลำดับ ตัวอย่างโปรแกรม เช่น GenScan, GenomeScan และ GeneMark

### 4. Protein Domain Analysis

เป็นการวิเคราะห์ส่วนหนึ่งของสายโพลีเปปไทด์หรือส่วนหนึ่งของโครงสร้างโปรตีนที่มีการพัฒนาหรือเพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่างใดอย่างหนึ่งและเป็นอิสระจากส่วนที่เหลือของโครงสร้างโปรตีน เช่น Pfam, BLOCKS และ ProDom

### 5. Pattern Identification

เป็นการระบุรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับโปรตีนที่สนใจ จากการเทียบเรียงดังกล่าวสามารถใช้ในการกำหนดความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการและการทำงานได้ เช่น Gibbs, Sampler และ AlignACE

### 6. Genomic Analysis

เป็นการระบุการวัด หรือการเปรียบเทียบคุณสมบัติของจีโนม เช่น ลำดับดีเอ็นเอ, การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง, การแสดงออกของยีนหรือคำอธิบายองค์ประกอบการทำงานในระดับยีน ด้วยวิธี microarrays ซึ่งเป็นเทคโนโลยีทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถผลิตข้อมูลจำนวนมากได้ในเวลารวดเร็ว (high throughput method) และสามารถใช้ร่วมกับเทคนิคทางชีวสารสนเทศอื่นได้ ตัวอย่างโปรแกรม เช่น SLAM และ Multiz

### 7. Motif finding

เรียกอีกอย่างคือ profile analysis คือการค้นหาลำดับของกรดอะมิโน ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโครงสร้างระดับทุติภูมิที่ทำหน้าที่เฉพาะในปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยเปรียบเทียบความเหมือนของสายลำดับแบบโกลบอลเพื่อค้นหาลำดับอนุรักษ์ที่มีความจำเพาะ (Motif) ในชุดลำดับเบส กระบวนการทำงานเริ่มจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับแบบกลุ่ม จากนั้นคัดแยกลำดับอนุรักษ์ที่มีค่าสูงออกมาสร้างเป็นชุดตารางเมทริกซ์ (Maiti & Mukherjee, 2015) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำนายตำแหน่งของ Promoter, Ribosome Binding Site และ Immunogenicity ได้ เช่น MEME/MAST และ eMOTIF (Samal et al. (2021)

## Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

BLAST เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่พัฒนาและดูแลโดย National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อใช้เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนกับฐานข้อมูลขนาดใหญ่ โดยอาศัยหลักการ Pairwise Local Alignment ตามอัลกอริทึม Smith-Waterman เพื่อค้นหาบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันระหว่างลำดับเบส โดยผลลัพธ์จากการค้นหาจะประกอบด้วยค่าสำคัญ 3 ค่า ได้แก่ E-value ซึ่งบ่งบอกนัยสำคัญทางสถิติ (ยิ่งต่ำยิ่งดี) Percent Identity ที่แสดงความเหมือนของลำดับเบส และ Query Cover ที่แสดงสัดส่วนของลำดับที่ถูกจับคู่ได้

BLAST มีหลายประเภทตามชนิดของลำดับที่ใช้ค้นหา เช่น BLASTn (นิวคลีโอไทด์ต่อนิวคลีโอไทด์), BLASTp (โปรตีนต่อโปรตีน), BLASTx และ tBLASTn เป็นต้น โดยมีการประยุกต์ใช้งานที่หลากหลาย ทั้งการระบุยีนที่มีความคล้ายคลึงกันข้ามสปีชีส์ การทำนายโครงสร้างโปรตีน การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ และการออกแบบ Primer สำหรับ PCR (Samal et al., 2021)



### บทที่ 3

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### รูปแบบการวิจัย

พื้นฐานทั่วไป (Basic Research)

### จริยธรรมวิจัยในมนุษย์

งานวิจัยนี้ ดำเนินการภายใต้การรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่การรับรอง IRB No. P1-0075/2568 และคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลแม่สอด เลขที่รับรอง MSHP 45/2568

### ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา แบ่งเป็น 2 กลุ่ม มีรายละเอียด ดังนี้

1. ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ที่แยกได้จากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งประกอบด้วย

1.1 ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ที่ทราบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพว่าติดต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 73 isolates

1.2 ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ที่ทราบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพว่าไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 10 isolates

โดยใช้สูตร W.G. Cochran

$$n = \frac{Z^2 p(1-p)}{e^2}$$

กำหนดให้ confidence level เท่ากับ 90%,  $Z = 1.645$ ,  $p = 0.13$  และ  $e = 0.11$

โดย  $p = 0.13$  ได้จากสถิติการติดต่อยา carbapenems ของเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex 4 ปีย้อนหลังของโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก

2. เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 เป็นเชื้อควบคุมในกระบวนการ PCR จำนวน 1 ตัวอย่าง

### น้ำยาและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Biosafety cabinet class II
2. CO<sub>2</sub> Incubator
3. Autoclave
4. VITEK® 2 COMPACT Automation (Biomerieux, France)
5. Turbidity Meter รุ่น VITEK DENSICHECK (Biomerieux, France)
6. ชุดการ์ดจำแนกเชื้อสำหรับเครื่อง VITEK® 2 COMPACT (VITEK 2 GN Identify CARD) (Biomerieux, France)
7. ชุดการ์ดทดสอบความไวต่อยาสำหรับเครื่อง VITEK® 2 COMPACT (VITEK 2 AST-N288 Drug susceptibility CARD) (Biomerieux, France)
8. Vortex mixer
9. หลอดทดลองพร้อมฝาปิดหลอด ขนาด 13x100 มิลลิเมตร
10. Autopipette ชนิดปรับปริมาตร ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
11. Autopipette tip ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
12. Sterile inoculating loop และ Sterile inoculating needle
13. Sterile Normal saline
14. Sterile Distilled water
15. Blood agar
16. ชุดสกัด PureDireX (Genomic DNA Isolation Kit)
17. Luria Bertani (LB) Broth
18. Centrifuge
19. Microtube
20. Incubator
21. นาฬิกาจับเวลา
22. CC Column
23. Sterile Distilled water
24. เครื่อง Microvolume Spectrophotometers (Colibri LB 915, Titertek Berthold, Pforzheim, Germany)
25. Freezer
26. เครื่อง Thermal cycler (BIOER)

27. 1% Gel electrophoresis

28. เชื้อมาตรฐาน *A. baumannii* ATCC 19606

29. ลำดับอ้างอิงของ CarO variant III ของ *A. baumannii* Ab242 (GenBank: DQ309876.1)

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. การพิสูจน์แยกเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ทำการพิสูจน์แยกเชื้อ (Identification) และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (Susceptibility) ซึ่งทางโรงพยาบาลแม่สอดใช้ชุดน้ำยาทดสอบ VITEK 2 GN Identify CARD และ VITEK 2 AST-N288 Susceptibility CARD โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ VITEK ® 2 COMPACT ของบริษัท Biomerieux ประเทศฝรั่งเศส ดังแสดงในภาพที่ 14 (Nakasone et al., 2007)



ภาพ 14 เครื่องตรวจวิเคราะห์แยกเชื้ออัตโนมัติ VITEK ® 2 COMPACT (Biomerieux, France)

ที่มา: Nakasone et al., 2007

ขั้นตอนการพิสูจน์แยกเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเครื่องเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกเชื้ออัตโนมัติ VITEK ® 2 COMPACT มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1) เตรียม 0.45% NaCl ปลอดเชื้อในหลอดทดสอบพลาสติก (Polystyrene) ขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร จำนวน 2 หลอดทดสอบ หลอดละ 3 มิลลิตร (1 หลอดสำหรับ Identification และ 1 หลอด สำหรับ Susceptibility) นำหลอดทดสอบวางใส่ในแต่ละช่องของ cassette
- 2) เตรียมสารละลายเชื้อโดยเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบใส่ลงใน 0.45% NaCl ปลอดเชื้อสำหรับทดสอบ Identification และผสมสารละลายเชื้อให้เข้ากัน
- 3) นำสารละลายเชื้อที่ได้วัดความขุ่นโดยเครื่อง DENSICHEK ให้ได้ค่าอยู่ในช่วงที่กำหนดคือ 0.5-0.63 McFarland
- 4) ถ่ายโอนสารละลายเชื้อปริมาตร 145 ไมโครลิตรจากหลอดทดสอบที่ 1 (Identification) โดยใช้ปิเปตอัตโนมัติใส่ลงในหลอดทดสอบที่ 2 สำหรับทดสอบ Susceptibility และผสมสารละลายเชื้อให้เข้ากัน
- 5) เลือกแผ่นทดสอบ (Card) ชนิด GN สำหรับเชื้อ และ AST-N288 (Gram negative-bacilli)
- 6) แกะห่ออะลูมิเนียมฟลอยด์ออกโดยระวังไม่ให้จับโดนหลอดถ่ายสารละลายเชื้อ (Transfer- Tube) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ แล้วนำแผ่นทดสอบที่ได้วางในช่องคู่กับหลอดสารละลายเชื้อ
- 7) นำ cassette ที่มี card เข้า Carosel เพื่อทำการบ่มเชื้อที่ 35.5 องศาเซลเซียส และอ่านผลทุก 15 นาที
- 8) เวลาในการทดสอบจะเสร็จสิ้นภายใน 6-8 ชั่วโมง

## 2. สกัด DNA โดยชุดสกัด PureDireX (Genomic DNA Isolation Kit)

การสกัด DNA โดยชุดสกัด PureDireX (Genomic DNA Isolation Kit) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

### 2.1 การเตรียมเชื้อ

2.1.1 นำเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ที่เก็บไว้ออกมาทำการ subculture ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar (BA)

2.1.2 ถ่ายโอนเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจาก BA ลงใน Luria Bertani (LB) Broth

2.1.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.4 เทส่วนใสทิ้งทั้งหมดให้เหลือแต่ตะกอน และเติม CR Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

## 2.2 การสลายเซลล์ (Lysis)

2.2.1 เติม CC Buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในตะกอนที่ละลายแล้วจากข้อ 1) แล้ว mix ด้วย vortex mixer

2.2.2 ดูดสารละลายจากข้อ 2.1 มา 300 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงใน microtube จากนั้นนำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการ mix ทุก ๆ 3 นาที

## 2.3 การกำจัดโปรตีน (Protein Removal)

2.3.1 เติม CB Buffer 400  $\mu$ l ลงในตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2) และเขย่าแรงๆ

2.3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที

## 2.4 การจับ DNA (DNA Binding)

2.4.1 วาง CC Column ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร

2.4.2 ดูดส่วนใสจากข้อ 3) ปริมาตร 500  $\mu$ l แล้วใส่ลงใน CC Column

2.4.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที

2.4.4 เทของเหลวที่ไหลผ่าน Column ที่กั้นหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง และวาง CC Column กลับลงในหลอดเก็บตัวอย่างตามเดิม

## 2.5 การล้าง (Wash)

2.5.1 เติม W1 Buffer ปริมาตร 400  $\mu$ l ลงใน CC Column

2.5.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที

2.5.3 เทของเหลวที่ไหลผ่าน Column ที่กั้นหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง และวาง CC Column กลับลงในหลอดเก็บตัวอย่างตามเดิม

2.5.4 เติม W2 Buffer ปริมาตร 600  $\mu$ l ลงใน CC Column

2.5.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที

2.5.6 เทของเหลวที่ไหลผ่าน Column ที่กั้นหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง และวาง CC Column กลับลงในหลอดเก็บตัวอย่างตามเดิม

2.5.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000  $\times$  g เป็นเวลา 2 นาที อีกครั้งเพื่อกำจัด W2 Buffer ที่เหลือ

## 2.6 การชะ DNA (DNA Elution)

2.6.1 ถ่ายไอออน CC Column จากข้อ 5.7 ไปยังหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ที่ตัดฝาออกแล้ว)

2.6.2 เติม BE Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง matrix column

2.6.3 นำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2.6.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะ DNA

2.6.5 ได้ purified DNA

## 2.7 ตรวจสอบคุณภาพ

นำ purified DNA ที่ได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Microvolume Spectrophotometers โดยความบริสุทธิ์ของ DNA จะถูกตรวจสอบจากอัตราส่วนของ A260/A280 nm ซึ่งค่าที่ได้จะต้องอยู่ระหว่าง 1.9-2.1 จากนั้นนำตัวอย่าง DNA ทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

## 3. ยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางจีโนไทป์ (Genotypic identification)

การเพิ่มจำนวนยีน *blaOXA-51 like* ด้วยเทคนิค PCR เพื่อยืนยันจีโนไทป์ (Genotype confirmation) ของ *A. baumannii* มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Woodford et al., 2006)

### 3.1 ใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน *blaOXA-51 like*

3.1.1 OXA-51 like\_353\_F

SEQ: 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' (20 mer)

3.1.2 OXA-51 like\_353\_R

SEQ: 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3' (20 mer)

### 3.2 ทำการเพิ่มจำนวนยีน *blaOXA-51 like* โดยมีเงื่อนไขการทำ PCR ดังนี้

3.2.1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 2.20 นาที

3.2.2 ขั้นตอนการทำซ้ำ 40 รอบโดยการ

- 1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 20 วินาที
- 2) Annealing ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส 25 วินาที
- 3) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 75 วินาที

3.2.3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที

### 3.3 การตรวจสอบผลผลิต PCR

3.3.1 ใช้ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1%

3.3.2 ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

3.3.3 ขนาดที่คาดว่าจะพบ PCR product ที่ขนาด 353 bp

## 4. เพิ่มจำนวนยีน *carO* ด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มจำนวนยีน *carO* ด้วยเทคนิค PCR มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

### 4.1 ใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน *carO*

4.1.1 carO\_up\_1086\_F

SEQ: 5'- GCTGAGACATGATCTTCCTTCC-3' (22 mer)

#### 4.1.2 carO\_down\_1086\_R

SEQ: 5'-AAACGAGCCGAAGCTCG-3' (17 mer)

### 4.2 ทำการเพิ่มจำนวนยีน *carO* โดยมีเงื่อนไขการทำ PCR ดังนี้

4.2.1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที

4.2.2 ขั้นตอนการทำซ้ำ 40 รอบโดยการ

- 1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที
- 2) Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 25 วินาที
- 3) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 75 วินาที

4.2.3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที

### 4.3 การตรวจสอบผลผลิต PCR

4.3.1 ใช้ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1%

4.3.2 ตรวจดูแถบ DNA ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

4.3.3 ขนาดที่คาดว่าจะพบ PCR product ที่ขนาด 1086 bp

### 5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *carO*

นำผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *A. baumannii* ที่ผ่านการยืนยันจีโนมไปแล้ว ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยบริษัท Macrogen

### 6. การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศ

6.1 ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. baumannii* Ab242 เพื่อใช้เป็นลำดับอ้างอิงในการ Align ดังแสดงในภาพ 15-16

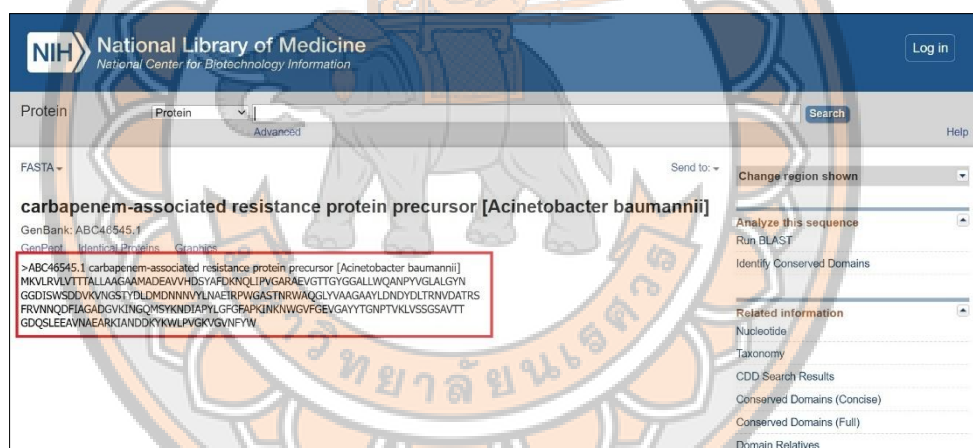
6.1.1 เข้าเว็บไซต์ผ่าน URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

6.1.2 พิมพ์คำว่า carbapenem-associated resistance protein precursor [*Acinetobacter baumannii*] ในช่องค้นหา

6.1.3 เลือก FASTA จะแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *carO* จากนั้นทำการคัดลอกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* Ab242 (GenBank: DQ309876.1) (M. A. Mussi et al., 2011) ไปใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนที่ 3)



ภาพ 15 หน้าต่างการเข้าสู่เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

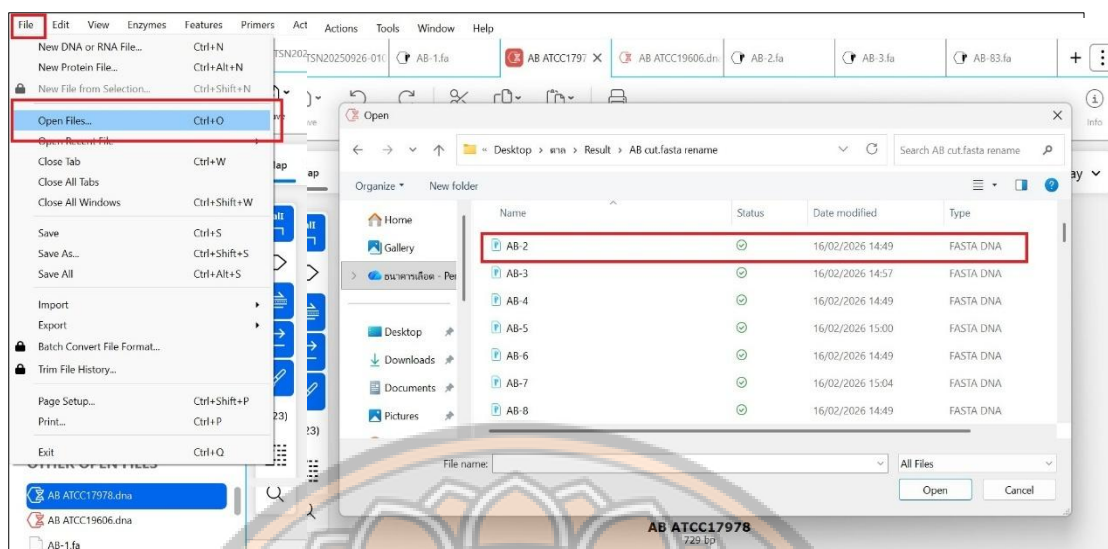


ภาพ 16 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CarO ในเชื้อ *A. baumannii* Ab242

6.2 หลังจากได้ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นไฟล์นามสกุล FASTA ทั้งหมดแล้ว นำมาทำการตัดบริเวณ Upstream และ Downstream ของยีน *carO* ให้เหลือเฉพาะส่วนของเนื้อยีน *carO* เพื่อนำไปทำการ Align Multiple DNA และ Protein sequences โดยมีขั้นตอนดังนี้

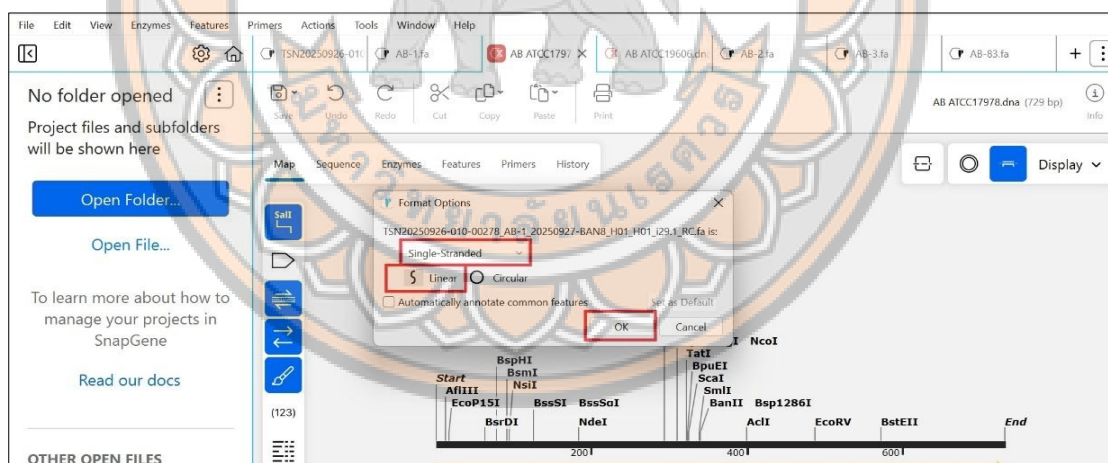
6.2.1 เปิดโปรแกรม SnapGene (ดาวน์โหลด <https://www.snapgene.com>)

6.2.2 เปิดผล Gene sequencing (ไฟล์นามสกุล FASTA) ที่ได้มาจากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท MacroGen โดยเลือก File > Open files > เลือก file ที่ต้องการแสดงในภาพ 17



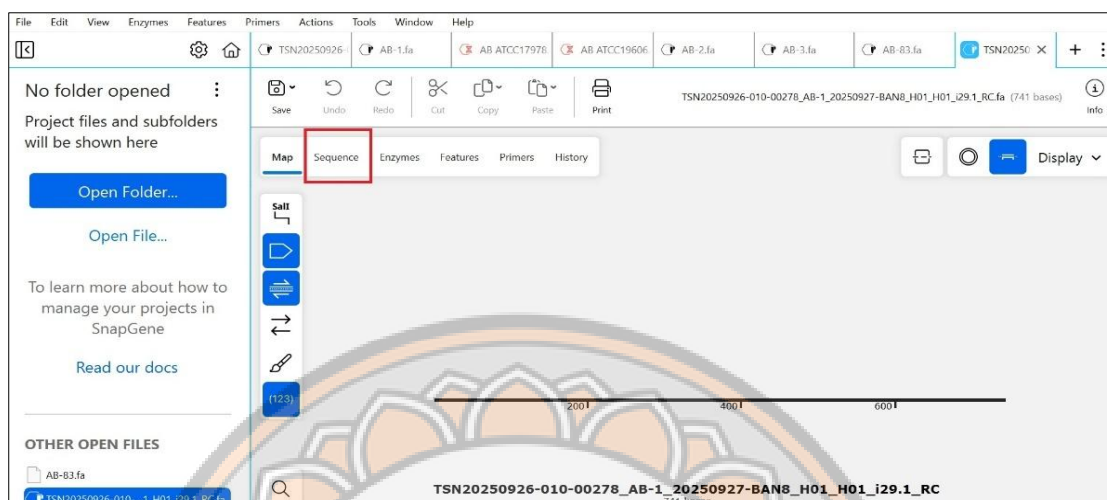
ภาพ 17 หน้าต่างการเปิด File ที่ต้องการในโปรแกรม SnapGene

6.2.3 เลือกร Single-Stranded > Linear > OK แสดงดังภาพ 18



ภาพ 18 หน้าต่าง Format Options ในโปรแกรม SnapGene

## 6.2.4 เลือกแถบ Sequences ดังแสดงในภาพ 19



ภาพ 19 หน้าต่างการเลือก Sequences ในโปรแกรม SnapGene

6.2.5 ทำการ Highlight ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่ง Upstream และ Downstream ของยีนที่ต้องการลบ โดยลบจากส่วนที่เป็น Downstream ก่อน > กด backspace ที่แป้นพิมพ์ > กด OK ดังแสดงในภาพ 20



ภาพ 20 หน้าต่างการลบนิวคลีโอไทด์ ในโปรแกรม SnapGene

6.2.6 ทำการ save file *carO* gene ที่ตัดส่วน Upstream และ Downstream เรียบร้อยแล้ว โดย save file เป็นนามสกุล FASTA และ SnapGene Protein Alignment ดังแสดงในภาพ 21 เพื่อนำไปทำ Align Multiple DNA and Protein Sequences ในขั้นตอนที่ 3)



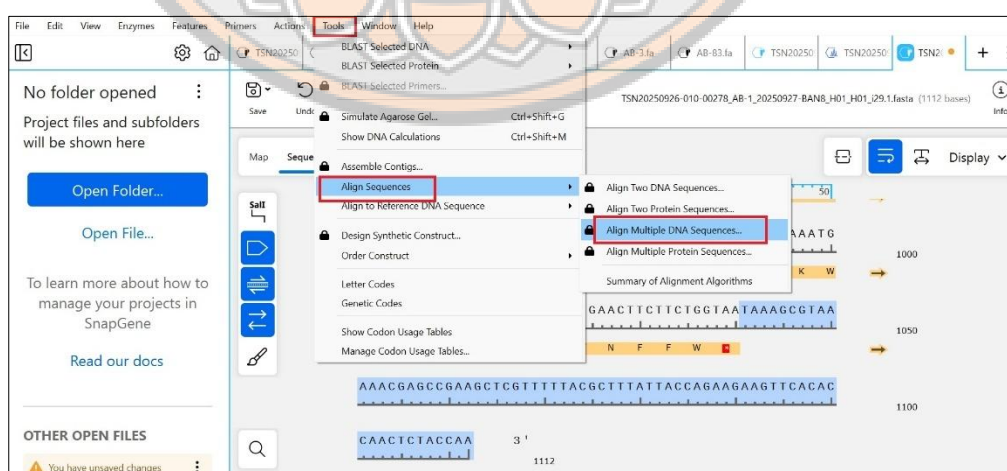
ภาพ 21 หน้าต่างการ save file ในโปรแกรม SnapGene

6.3 ทำการ Align Multiple DNA and Protein Sequences โดยมีขั้นตอนดังนี้

6.3.1 เปิดโปรแกรม SnapGene

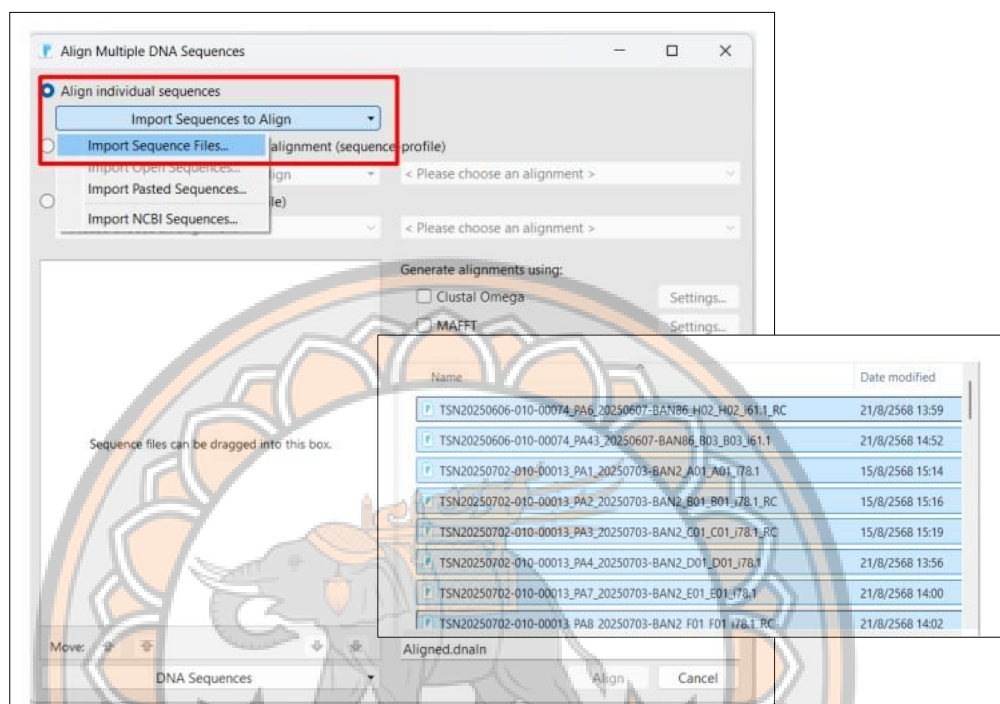
6.3.2 เลือก Tool > Align Sequences > Align Multiple DNA Sequences

ดังแสดงในภาพ 22



ภาพ 22 หน้าต่างการ Align Multiple Sequences ในโปรแกรม SnapGene

6.3.3 เลือก Align individual sequences > Import Sequence Files > เลือก Files ทั้งหมดที่ต้องการ Aligned ดังแสดงในภาพ 23



ภาพ 23 หน้าต่างการการนำเข้า Sequences files และการเลือก files ในโปรแกรม SnapGene

6.3.4 ทำการวางลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1.3 > กด OK

6.3.5 ทำการเลือกในส่วนของ Generate alignments using เป็น Clustal Omega > Align ดังแสดงในภาพ 24



### การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เครื่องมือทางสถิติ

ผู้วิจัยทำการทดสอบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ในยีน *carO* ระหว่างเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาและไวต่อยา Carbapenem ด้วยสถิติ Fisher's exact test โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 11.0.0 (Free trial version)

1. ผู้วิจัยได้นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.7 มาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. baumannii* Ab242 แต่เนื่องจากพบความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทุก Isolates ที่นำมาศึกษา ทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลในระดับนิวคลีโอไทด์มีความซับซ้อนมากเกินไป ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับกรดอะมิโน เพื่อหา Point mutation ในระดับกรดอะมิโนเพียงอย่างเดียว ซึ่งตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลแสดงดังภาพ 26

| No | ชนิด DNA | bla OXA-51<br>(553 bp) | PCR Car-O<br>(1086 bp) | CarO Fast NGS | Point mutation T7         | Point mutation B0         | Point mutation B1         | Point mutation B2         | Point mutation B5         | Point mutation B6         | Point mutation B9         |
|----|----------|------------------------|------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|    |          |                        |                        |               | <i>A. baumannii</i> Ab242 | <i>A. baumannii</i> Ab242 | <i>A. baumannii</i> Ab242 | <i>A. baumannii</i> Ab242 | <i>A. baumannii</i> Ab242 | <i>A. baumannii</i> Ab242 | <i>A. baumannii</i> Ab242 |
|    |          |                        |                        |               | R77                       | R77                       | B01                       | B02                       | T05                       | K06                       | V09                       |
| 1  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 2  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | T                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |
| 3  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | T                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |
| 4  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |
| 5  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 6  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 7  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 8  | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | T                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |
| 10 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | T                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |
| 11 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 12 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 13 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | T                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |
| 14 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 15 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 16 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Forward       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 17 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | T                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |
| 18 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 19 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | S                         | V                         | K                         | V                         | S                         | T                         | L                         |
| 20 | sDNA     | ✓                      | ✓                      | Reverse       | T                         | V                         | V                         | V                         | V                         | V                         | L                         |

ภาพ 26 ตัวอย่างการวิเคราะห์ Point mutation ในระดับกรดอะมิโน โดยเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *A. baumannii* Ab242

2. หลังจากทำการวิเคราะห์หา Point mutation ในระดับกรดอะมิโน ในแต่ละตำแหน่งแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการสรุปข้อมูลการ mutation ในแต่ละตำแหน่งออกมาในรูปแบบของตาราง 2 x 2 โดยข้อมูลในตารางประกอบด้วยจำนวนเชื้อที่พบและไม่พบการ mutation และในจำนวนนี้ประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อและไม่ดื้อต่อยา carbapenem ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ตัวอย่างตาราง 2 x 2 แสดงข้อมูลผลการวิเคราะห์ Point mutation ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 77

| Data analyzed | CRAB | CSAB |
|---------------|------|------|
| Mutation      | 63   | 6    |
| Non-MT        | 1    | 0    |

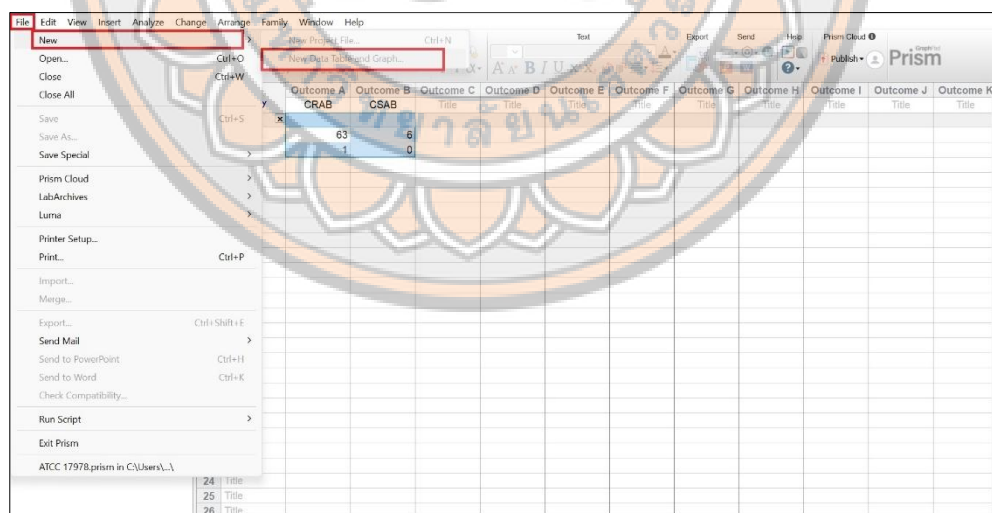
หมายเหตุ: CRAB คือ Carbapenem-Resistant *A. baumannii*  
CSAB คือ Carbapenem-Susceptible *A. baumannii*

3. นำข้อมูลจากตารางที่ได้มาทำการทดสอบความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Fisher's exact test โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 11.0.0 (Free trial version) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 ดาวน์โหลดโปรแกรม GraphPad Prism ที่ <https://www.graphpad.com>

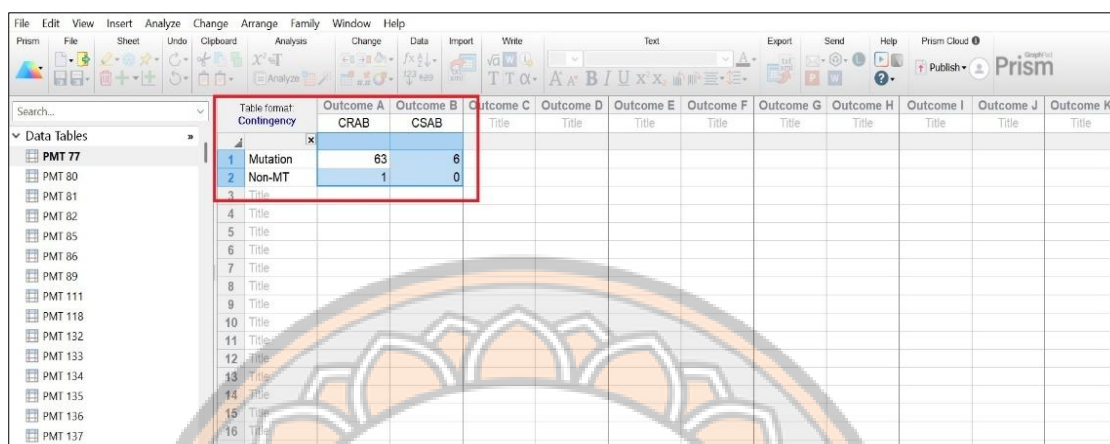
3.2 เปิดหน้าต่างโปรแกรมเลือก New > New Datatable and Graph ดังแสดงใน

ภาพ 27



ภาพ 27 หน้าต่างการเปิดและเริ่มต้นใช้งานโปรแกรม GraphPad Prism

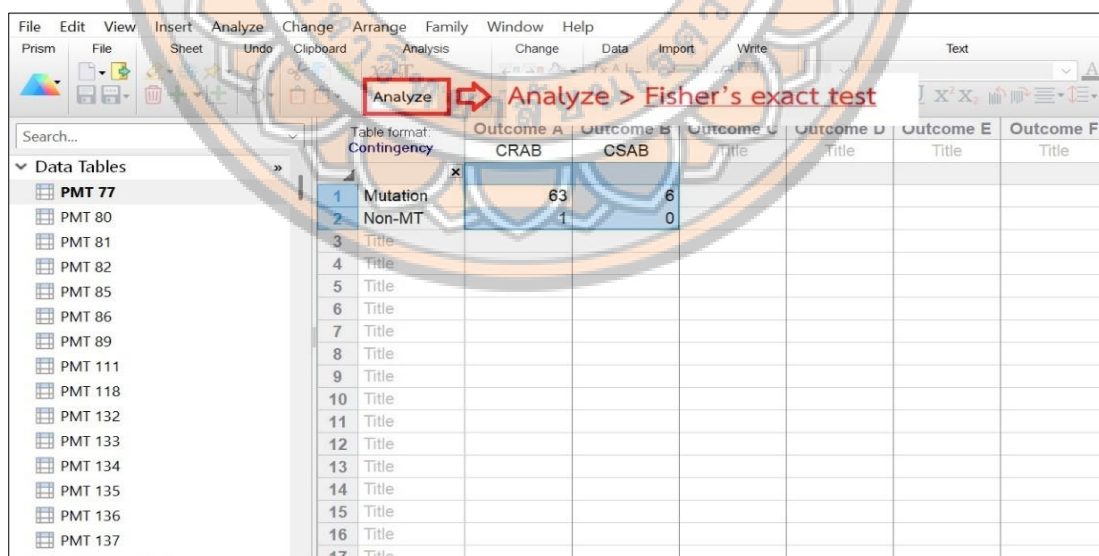
3.3 นำตาราง 2 x 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลในข้อ 2 มาวางในโปรแกรม GraphPad Prism ดังแสดงในภาพ 28



|            | Outcome A: CRAB | Outcome B: CSAB |
|------------|-----------------|-----------------|
| 1 Mutation | 63              | 6               |
| 2 Non-MT   | 1               | 0               |

ภาพ 28 การวางข้อมูลตารางขนาด 2 x 2 ในหน้าต่างโปรแกรม GraphPad Prism

3.4 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยเลือก Analyze > Fisher's exact test ดังแสดงในภาพ 29



|            | Outcome A: CRAB | Outcome B: CSAB |
|------------|-----------------|-----------------|
| 1 Mutation | 63              | 6               |
| 2 Non-MT   | 1               | 0               |

ภาพ 29 การใช้เครื่องมือทางสถิติ Fisher's exact test ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5 ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ Point mutation ในแต่ละตำแหน่ง ว่ามีตำแหน่งใดบ้างที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P \text{ value} < 0.05$  (Statistically significant,  $P < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพ 30

|                    |                                             | A                   | B       | C     |
|--------------------|---------------------------------------------|---------------------|---------|-------|
| <b>Contingency</b> |                                             |                     |         |       |
| 1                  | Table Analyzed                              | PMT 77              |         |       |
| 2                  |                                             |                     |         |       |
| 3                  | <b>P value and statistical significance</b> |                     |         |       |
| 4                  | Test                                        | Fisher's exact test |         |       |
| 5                  | P value                                     | >0.9999             |         |       |
| 6                  | P value summary                             | ns                  |         |       |
| 7                  | One- or two-sided                           | Two-sided           |         |       |
| 8                  | Statistically significant ( $P < 0.05$ )?   | No                  |         |       |
| 9                  |                                             |                     |         |       |
| 10                 | <b>Data analyzed</b>                        | CRAB                | CSAB    | Total |
| 11                 | Mutation                                    | 63                  | 6       | 69    |
| 12                 | Non-MT                                      | 1                   | 0       | 1     |
| 13                 | Total                                       | 64                  | 6       | 70    |
| 14                 |                                             |                     |         |       |
| 15                 | <b>Percentage of row total</b>              | CRAB                | CSAB    |       |
| 16                 | Mutation                                    | 91.30%              | 8.70%   |       |
| 17                 | Non-MT                                      | 100.00%             | 0.00%   |       |
| 18                 |                                             |                     |         |       |
| 19                 | <b>Percentage of column total</b>           | CRAB                | CSAB    |       |
| 20                 | Mutation                                    | 98.44%              | 100.00% |       |
| 21                 | Non-MT                                      | 1.56%               | 0.00%   |       |
| 22                 |                                             |                     |         |       |
| 23                 | <b>Percentage of grand total</b>            | CRAB                | CSAB    |       |
| 24                 | Mutation                                    | 90.00%              | 8.57%   |       |
| 25                 | Non-MT                                      | 1.43%               | 0.00%   |       |

ภาพ 30 ผลการทดสอบโดยใช้เครื่องมือทางสถิติ Fisher's exact test

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับตัวอย่างทางคลินิก ผลการการพิสูจน์แยกเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ด้วยวิธีพีโนไทป์และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้นำเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก (Clinical samples) จำนวน 83 ตัวอย่าง ที่ส่งตรวจวิเคราะห์ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก แบ่งเป็น Sputum จำนวน 54 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 65.06), Pus 17 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 20.48), Urine 4 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 4.82), Body fluid 4 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 4.82), และ Blood 4 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 4.82) ดังแสดงในตารางที่ 3 หากจำแนกตามเชื้อชาติ พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มาจากกลุ่มประชากรชาวไทยจำนวน 52 ราย (คิดเป็นร้อยละ 62.65) มีตัวอย่างทางคลินิกที่มาจากประชากรเพศชายจำนวนสองในสามจากจำนวนทั้งหมด (คิดเป็นร้อยละ 66.27) มีค่ามัธยฐานของอายุเป็น 63 ปี

ตาราง 3 ข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

| ข้อมูลของตัวอย่าง         |                  | จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ) (n=83) |
|---------------------------|------------------|-------------------------------|
| Nationality               | - Thai           | 52 (62.65)                    |
|                           | - Non-Thai       | 31 (37.35)                    |
| Sex                       | - Male           | 55 (66.27)                    |
|                           | - Female         | 28 (33.73)                    |
| Age (median): IQR (years) |                  | 63 (1-90)                     |
| Ward                      | - ผู้ป่วยวิกฤต   | 29 (34.94)                    |
|                           | - อายุรกรรมชาย   | 22 (26.51)                    |
|                           | - อายุรกรรมหญิง  | 15 (18.07)                    |
|                           | - ศัลยกรรมชาย    | 10 (12.05)                    |
|                           | - หอผู้ป่วยพิเศษ | 4 (4.82)                      |
|                           | - ศัลยกรรมหญิง   | 2 (2.41)                      |
|                           | - กุมารเวชกรรม   | 1 (1.20)                      |
| Specimen type             | - Sputum         | 54 (65.06)                    |
|                           | - Pus            | 17 (20.48)                    |

| ข้อมูลของตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ) (n=83) |
|-------------------|-------------------------------|
| - Body fluid      | 4 (4.82)                      |
| - Urine           | 4 (4.82)                      |
| - Blood           | 4 (4.82)                      |

โดยผู้วิจัยได้นำโคโลนีของเชื้อจากตัวอย่างทั้งหมดที่ผ่านการพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อ และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ VITEK® 2 COMPACT จากการใช้ชุดน้ำยาทดสอบ VITEK 2 GN Identify CARD และ VITEK 2 AST-N288 Susceptibility CARD ตามลำดับ ให้ผลดังในตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ตื้อยา Carbapenem จำนวน 73 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 87.95 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ไวต่อยา Carbapenem จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.05 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และหากจัดกลุ่มตามรูปแบบการดื้อยาของเชื้อสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ดื้อยาแบบ Extensively drug-resistant (XDR) จำนวน 71 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 85.54 กลุ่มที่ดื้อยาแบบ Multidrug-resistant (MDR) จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.41 และกลุ่มที่ไม่ดื้อยา จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.05

ตาราง 4 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Vitek 2 Compact

| Isolate No. | MIC (ug/mL) |      |     |      |       |        |      |       | interpretation |
|-------------|-------------|------|-----|------|-------|--------|------|-------|----------------|
|             | IPM         | MEM  | DOR | CRO  | TGC   | CIP    | CAZ  | Co    |                |
| 1           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 2           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | >=8   | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 3           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | >=8   | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 4           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | <=0.5 | <=0.25 | >=64 | <=0.5 | MDR            |
| 5           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 6           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 7           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | >=8   | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 8           | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 10          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | >=8   | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 11          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 12          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 13          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 14          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 15          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 16          | 8           | 8    | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 17          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 18          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 2     | XDR            |
| 19          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 20          | 8           | 8    | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 21          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 22          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 23          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 24          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 4     | XDR            |
| 25          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | 2     | XDR            |
| 26          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 4     | XDR            |
| 27          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 4     | XDR            |
| 28          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | >=8   | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 29          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 30          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 31          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 32          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 33          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 34          | >=16        | >=16 | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |

| Isolate No. | MIC (ug/mL) |       |     |      |       |        |      |       | interpretation |
|-------------|-------------|-------|-----|------|-------|--------|------|-------|----------------|
|             | IPM         | MEM   | DOR | CRO  | TGC   | CIP    | CAZ  | Co    |                |
| 35          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 36          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | >=8   | 4      | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 37          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 38          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 39          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 40          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 41          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 42          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 43          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 44          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 45          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 46          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 47          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 48          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | 2     | XDR            |
| 49          | 8           | 8     | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 50          | 2           | >=168 | >=8 | >=64 | <=0.5 | <=0.25 | 4    | <=0.5 | MDR            |
| 51          | 8           | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 52          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 53          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 54          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 55          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 58          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 59          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 60          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | 1     | XDR            |
| 61          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 62          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 63          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 65          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 67          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 68          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 69          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 70          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 72          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | <=0.5 | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 73          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 74          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 76          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 77          | >=16        | >=16  | >=8 | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |

| Isolate No. | MIC (ug/mL) |        |        |      |       |        |      |       | interpretation |
|-------------|-------------|--------|--------|------|-------|--------|------|-------|----------------|
|             | IPM         | MEM    | DOR    | CRO  | TGC   | CIP    | CAZ  | Co    |                |
| 78          | >=16        | >=16   | >=8    | >=64 | 4     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 79          | >=16        | >=16   | >=8    | >=64 | 2     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 80          | >=16        | >=16   | >=8    | >=64 | 1     | >=4    | >=64 | <=0.5 | XDR            |
| 81          | <=0.25      | <=0.25 | <=0.12 | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 8    | <=0.5 | Non-resistant  |
| 82          | <=2         | 0.5    | 0.25   | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 16   | <=0.5 | Non-resistant  |
| 83          | <=0.25      | <=0.25 | <=0.12 | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 4    | <=0.5 | Non-resistant  |
| 84          | <=0.25      | <=0.25 | <=0.12 | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 16   | <=0.5 | Non-resistant  |
| 85          | <=0.25      | <=0.25 | <=0.12 | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 4    | <=0.5 | Non-resistant  |
| 86          | <=0.25      | 1      | 1      | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 8    | 1     | Non-resistant  |
| 87          | <=0.25      | <=0.25 | <=0.12 | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 4    | <=0.5 | Non-resistant  |
| 88          | <=2         | 0.5    | 0.25   | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 4    | <=0.5 | Non-resistant  |
| 89          | <=0.25      | <=0.25 | <=0.12 | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 4    | <=0.5 | Non-resistant  |
| 90          | <=0.25      | <=0.25 | 0.25   | 16   | <=0.5 | <=0.25 | 16   | <=0.5 | Non-resistant  |

- หมายเหตุ: 1. IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, DOR: Doripenem, CRO: Ceftriaxone, TGC: Tigecycline, CIP: Ciprofloxacin, CAZ: Ceftazidime และ Co: Colistin
2. การรายงานผลของ Tigecycline ใช้ breakpoint อ้างอิงจาก FDA breakpoints for Enterobacteriales หรือ EUCAST (โดยกำหนด Susceptible ที่ค่า MIC  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$  และ Resistant ที่ค่า MIC  $> 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) (Marchaim et al., 2014)
3. XDR หมายถึง เชื้อที่ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะแทบทุกกลุ่ม มี  $\leq 2$  กลุ่มที่ยังไวต่อยา (Magiorakos et al., 2012)
4. MDR หมายถึง เชื้อที่ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด ในยาปฏิชีวนะ  $\geq 3$  กลุ่ม (Magiorakos et al., 2012)
5. กล่องสีเขียว หมายถึง ผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อเป็น Susceptible
6. กล่องสีเหลือง หมายถึง ผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อเป็น Intermediate
7. กล่องสีแดง หมายถึง ผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อเป็น Resistant

#### ผลการสกัด Genomic DNA โดยชุดสกัด PureDireX

ในการศึกษานี้ได้ทำการสกัด DNA ของเชื้อ *A. baumannii* complex ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก จากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 83 ไอโซเลท และเชื้อ *A. baumannii* ATCC19606 ที่เป็น

สายพันธุ์มาตรฐาน (Reference strain) จำนวน 1 ไอโซเลท โดยใช้ชุดสกัด PureDireX (Genomic DNA Isolation Kit) แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA โดยเครื่อง microvolume spectrometer โดยมีค่าอยู่ในช่วง 80-500 µg/ml และทำการตรวจสอบคุณภาพความบริสุทธิ์ของ DNA โดยอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 และอัตราส่วนระหว่าง A260/A230 มีค่าประมาณ 1.80-2.10 จึงบ่งชี้ว่า DNA ที่สกัดได้นั้นมีความบริสุทธิ์และสามารถนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้

### ผลการยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางจีโนไทป์ (Genotypic identification)

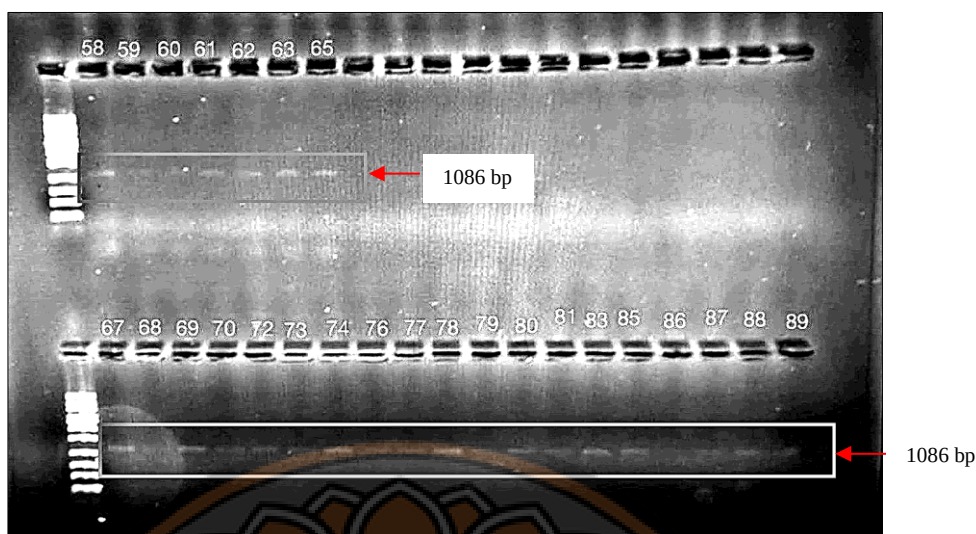
ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบยืนยันชนิดเชื้อ *A. baumannii* ออกจากเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน 83 ไอโซเลท ที่ผ่านการพิสูจน์แยกเชื้อด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ VITEK® 2 COMPACT ได้แก่ เชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenem จำนวน 73 ไอโซเลท และเชื้อที่มีความไวต่อยากลุ่ม Carbapenem จำนวน 10 ไอโซเลท โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีน *bla<sub>OXA-51 like</sub>* ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี PCR พบว่าเชื้อควบคุมผลบวก (*A. baumannii* ATCC 19606) จำนวน 1 ไอโซเลท และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 77 ไอโซเลท ปรากฏ PCR product ขนาดประมาณ 353 bp ตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 31 จึงยืนยันได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวเป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 77 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 85.56 จากตัวอย่างเชื้อทั้งหมด ดังนั้นตัวอย่าง Genomic DNA ของเชื้อทั้ง 77 ไอโซเลท กล่าวคือ เชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา Carbapenem จำนวน 70 ราย และ เชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยา Carbapenem จำนวน 7 ราย ถูกนำไปทดสอบในการทดลองต่อไป



ภาพ 31 ตัวอย่างผลการยืนยันเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้ Species-specific PCR ซึ่งใช้ Primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน *bla<sub>OXA-51 like</sub>* ร่วมกับ 1% gel electrophoresis ซึ่ง Marker คือ 100 bp DNA ladder

#### ผลการเพิ่มจำนวนยีน *carO*

ในการศึกษานี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน *carO* โดยใช้ตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ของเชื้อ *A. baumannii* ATCC19606 จำนวน 1 ตัวอย่าง (เชื้อควบคุมผลบวก) และเชื้อ *A. baumannii* จำนวนทั้งหมด 77 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อที่ดื้อต่อยา Carbapenem จำนวน 70 ตัวอย่างและเชื้อที่ไวต่อยา Carbapenem จำนวน 7 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR พบว่าตัวอย่างเชื้อจำนวน 77 ไอโซเลท พบ DNA เป้าหมายขนาดประมาณ 1,086 bp ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยา Carbapenem จำนวน 70 ไอโซเลท และเชื้อที่ไวต่อยา Carbapenem จำนวน 7 ไอโซเลท ตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพ 32 ตัวอย่างผลการเพิ่มจำนวนยีน *carO* โดยใช้เทคนิค PCR จากตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ร่วมกับ 1% gel electrophoresis โดย Marker คือ 1 kb DNA ladder

#### ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *carO* ระดับนิวคลีโอไทด์

ในการศึกษานี้ได้นำผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 77 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem จำนวน 70 ตัวอย่าง และเชื้อที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 7 ตัวอย่าง ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยบริษัท MacroGen แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SnapGene พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* จากตัวอย่างทางคลินิก เมื่อเทียบกับ *A. baumannii* AB242 (Reference Strain) ทั้งหมด 77 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100

#### ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *carO* ระดับ amino acid

##### 1. การวิเคราะห์ Point Mutation ในระดับ amino acid ของยีน *carO*

ในการศึกษานี้ได้นำผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 77 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem จำนวน 70 ตัวอย่าง และเชื้อที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 7 ตัวอย่าง ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยบริษัท MacroGen แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SnapGene พบว่ามีการเกิด Point mutation ระดับ amino acid ในโปรตีน CarO ของเชื้อ *A. baumannii* จากตัวอย่างทางคลินิกทั้ง 77 ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับ ลำดับอ้างอิงของโปรตีน CarO ในเชื้อ *A. baumannii* Ab242

คิดเป็นร้อยละ 100 โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO ได้แก่

**กลุ่มที่ 1** ตัวอย่างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ missense mutation กล่าวคือเป็นกลุ่มที่มีลำดับ amino acid เปลี่ยนไปจาก *A. baumannii* Ab242 ซึ่งตัวอย่างที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 1 ตัวอย่างคือ ไอโซเลตที่ 4 คิดเป็นร้อยละ 1.29 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด

**กลุ่มที่ 2** ตัวอย่างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ missense mutation ร่วมกับ insertion กล่าวคือเป็นกลุ่มที่มีลำดับ amino acid เปลี่ยนไปจาก *A. baumannii* Ab242 และมีความยาวของ amino acid เพิ่มขึ้นจากการมี insertion เกิดขึ้นในยีน *carO* ซึ่งตัวอย่างที่พบในกลุ่มนี้มีจำนวน 69 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 89.61 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด โดยในจำนวนนี้ประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 62 ตัวอย่างได้แก่ ไอโซเลตที่ 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 65, 67, 68, 69, 70, 72, 74, 76, 77, 78 และ 79 คิดเป็นร้อยละ 80.52 และเชื้อที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 7 ตัวอย่างได้แก่ ไอโซเลตที่ 80, 83, 85, 86, 87, 88 และ 89 คิดเป็นร้อยละ 9.09 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด โดยพบว่ามี mutation 35 ตำแหน่ง ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P$  value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยา carbapenem และเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยา carbapenem ซึ่งประกอบด้วย missense mutation จำนวน 32 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 5 และ insertion จำนวน 3 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 6

**กลุ่มที่ 3** ตัวอย่างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ deletion เป็นกลุ่มที่มีการสูญเสียลำดับ amino acid บางส่วนออกไปจาก DNA ซึ่งตัวอย่างที่พบในกลุ่มนี้มีจำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.09 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด ซึ่งในจำนวนนี้ประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 6 ตัวอย่างได้แก่ ไอโซเลตที่ 15, 16, 21, 25, 34 และ 73 คิดเป็นร้อยละ 7.79 และเชื้อที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 1 ตัวอย่างได้แก่ ไอโซเลตที่ 81 คิดเป็นร้อยละ 1.29 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด

ตาราง 5 ตำแหน่งของ missense mutation ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P$  value  $< 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยา carbapenem และเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem

| ตำแหน่ง | AB242 (Ref) | Mutation          | P value |
|---------|-------------|-------------------|---------|
| 81      | S81         | S $\rightarrow$ K | 0.0008  |
| 85      | T85         | T $\rightarrow$ S | 0.0008  |
| 86      | K86         | K $\rightarrow$ T | 0.0008  |
| 111     | R111        | R $\rightarrow$ P | 0.0006  |
| 118     | V118        | V $\rightarrow$ I | 0.0006  |
| 132     | T132        | T $\rightarrow$ A | 0.0006  |
| 133     | K133        | K $\rightarrow$ R | 0.0008  |
| 134     | R134        | R $\rightarrow$ N | 0.0008  |
| 138     | G138        | G $\rightarrow$ T | 0.0008  |
| 139     | T139        | T $\rightarrow$ S | 0.0008  |
| 142     | I142        | I $\rightarrow$ V | 0.0008  |
| 143     | N143        | N $\rightarrow$ D | 0.0006  |
| 144     | G144        | G $\rightarrow$ N | 0.0008  |
| 146     | N146        | N $\rightarrow$ D | 0.0008  |
| 147     | Y147        | Y $\rightarrow$ F | 0.0008  |
| 151     | G151        | G $\rightarrow$ V | 0.0008  |
| 153     | V153        | V $\rightarrow$ I | 0.0008  |
| 154     | N154        | N $\rightarrow$ R | 0.0006  |
| 156     | Q156        | Q $\rightarrow$ K | 0.0006  |
| 176     | N176        | N $\rightarrow$ S | 0.0006  |
| 194     | T194        | T $\rightarrow$ K | 0.0006  |
| 196     | E196        | E $\rightarrow$ K | 0.0008  |
| 201     | G201        | G $\rightarrow$ N | 0.0006  |
| 204     | V204        | V $\rightarrow$ P | 0.0006  |
| 211     | A211        | A $\rightarrow$ L | 0.0008  |

| ตำแหน่ง | AB242 (Ref) | Mutation | P value |
|---------|-------------|----------|---------|
| 217     | A217        | A → K    | 0.0006  |
| 220     | N220        | N → R    | 0.0008  |
| 221     | K221        | K → E    | 0.0006  |
| 223     | R223        | R → A    | 0.0008  |
| 226     | D226        | D → N    | 0.0006  |
| 229     | K229        | K → E    | 0.0006  |
| 241     | Y241        | Y → F    | 0.0006  |

ตาราง 6 ตำแหน่งของการกลายพันธุ์แบบ insertion ในเชื้อกลุ่มที่ 2 โดยเปรียบเทียบกันระหว่าง เชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยา carbapenem และเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem

| ตำแหน่ง | AB242 (Ref) | Insertion                                   | P value |
|---------|-------------|---------------------------------------------|---------|
| 138-139 | -           | R (CRAB only) or<br>D (CRAB and CSAB)       | 0.0006* |
| 148-149 | -           | AGA (CRAB only) or<br>QAVPG (CRAB and CSAB) | 0.0006* |
| 207-208 | -           | N                                           | 0.0006* |

## 2. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *carO* กับค่า MIC ของยาในกลุ่ม carbapenems

ในงานวิจัยนี้ได้นำผลการทดสอบค่า MIC ของยาในกลุ่ม Carbapenems แต่ละชนิดมาวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *A. baumannii* ที่มีการเกิด Point mutation ในโปรตีน CarO ทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างเชื้อมีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ missense mutation, กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างเชื้อมีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ missense mutation ร่วมกับ insertion และกลุ่มที่ 3 ตัวอย่างเชื้อมีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ deletion โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ทางสถิติคือ Fisher's Exact Test (4x3) โดยรายละเอียดของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 7-9 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO กับค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิดแสดงดังตาราง 7

ตาราง 7 ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO กับค่า MIC ของยา Imipenem

| MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Missense | Missense+Insertion | Deletion | รวม |
|--------------------------|----------|--------------------|----------|-----|
| $\geq 16$                | 1        | 61                 | 5        | 67  |
| 8                        | 0        | 2                  | 1        | 3   |
| $< 2$                    | 0        | 6                  | 1        | 7   |
| รวม                      | 1        | 69                 | 7        | 77  |

ตาราง 8 ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO กับค่า MIC ของยา Meropenem

| MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Missense | Missense+Insertion | Deletion | รวม |
|--------------------------|----------|--------------------|----------|-----|
| 16                       | 1        | 62                 | 5        | 68  |
| 8                        | 0        | 1                  | 1        | 2   |
| 2                        | 0        | 0                  | 0        | 0   |
| $< 2$                    | 0        | 6                  | 1        | 7   |
| รวม                      | 1        | 69                 | 7        | 77  |

ตาราง 9 ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO กับค่า MIC ของยา Doripenem

| MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Missense | Missense+Insertion | Deletion | รวม |
|--------------------------|----------|--------------------|----------|-----|
| 8                        | 1        | 63                 | 6        | 70  |
| 4                        | 0        | 0                  | 0        | 0   |
| 2                        | 0        | 0                  | 0        | 0   |
| $< 2$                    | 0        | 6                  | 1        | 7   |
| รวม                      | 1        | 69                 | 7        | 77  |

ตาราง 10 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO กับค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิด ด้วย Fisher's Exact Test (4x3)

| ชนิดของยา Carbapenem | P value | ผลการวิเคราะห์ (P value < 0.005) |
|----------------------|---------|----------------------------------|
| Imipenem             | 0.474   | ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ            |
| Meropenem            | 0.286   | ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ            |
| Doripenem            | 1.000   | ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ            |

จากตาราง 10 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างรูปแบบการ mutation ของยีน *carO* กับค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิด



## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* โดยผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii*-*calcoaceticus* complex ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 83 ไอโซเลท ซึ่งตัวอย่างส่วนใหญ่เป็น Sputum และ Pus คิดเป็นร้อยละ 65.06 และ 20.48 ตามลำดับ โดยตัวอย่างส่งตรวจส่วนใหญ่มาจากหอผู้ป่วยวิกฤต (ICU) คิดเป็นร้อยละ 34.94 โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชาวไทยและเป็นเพศชาย คิดเป็นร้อยละ 62.65 และ 66.27 ตามลำดับ มีค่ามัธยฐานของอายุอยู่ที่ 63 ปี ซึ่งในจำนวนนี้ประกอบด้วยเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem จำนวน 10 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 12.05 และ เชื้อที่ดื้อต่อยา carbapenem จำนวน 73 ไอโซเลท โดยจำแนกตามรูปแบบการดื้อยาออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อที่มีการดื้อยาแบบ XDR จำนวน 71 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 85.54 และ MDR จำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 2.41 จากการยืนยันชนิดของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธีจีโนมไทป์โดยการตรวจหายีน *bla<sub>OXA-51</sub> like* ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีตัวอย่างเชื้อจำนวน 77 ไอโซเลท พบ PCR product ขนาดประมาณ 353 bp และยืนยันว่าเชื้อจำนวน 77 ไอโซเลทนั้นเป็นเชื้อ *A. baumannii* คิดเป็นร้อยละ 92.77 โดยในจำนวนนี้ประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยา carbapenem จำนวน 70 ไอโซเลท และเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem จำนวน 7 ไอโซเลท และจากการนำเชื้อทั้ง 77 ไอโซเลท มาทำการเพิ่มจำนวนยีน *carO* ด้วยเทคนิค PCR และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยบริษัท MacroGen แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SnapGene จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับ amino acid พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์และระดับ amino acid ในเชื้อ *A. baumannii* จากตัวอย่างทางคลินิกทั้ง 77 ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับเชื้อ *A. baumannii* AB242 (Carbapenem-resistance reference strain) คิดเป็นร้อยละ 100 เมื่อผู้วิจัยทำการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO ในเชื้อ *A. baumannii* จากตัวอย่างทางคลินิกทั้ง 77 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO ได้แก่ **กลุ่มที่ 1** ตัวอย่างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ missense mutation ซึ่งตัวอย่างที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 1 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 1.29 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด **กลุ่มที่ 2** ตัวอย่างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ missense mutation ร่วมกับ insertion ซึ่งตัวอย่างที่พบในกลุ่มนี้พบมากที่สุดถึง 69 ตัวอย่าง

คิดเป็นร้อยละ 89.61 ของตัวอย่างทั้งหมด ในจำนวนนี้ ประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 62 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 80.52 และเชื้อที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.09 โดยพบว่ามี 32 ตำแหน่งของ missense mutation ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P$  value  $< 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยา carbapenem และเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem และยังพบว่ามี insertion ในยีน *carO* อีก 3 ตำแหน่งร่วมด้วย โดยการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ทั้ง 35 ตำแหน่งในเชื้อกลุ่มนี้เกิดขึ้นพร้อมกันทุกตำแหน่งอย่างเป็นระบบ ไม่ใช่การกลายพันธุ์แบบสุ่ม บ่งชี้ว่าเชื้อกลุ่มนี้มี *carO* variant ที่เป็น haplotype เดียวกัน และ **กลุ่มที่ 3** ตัวอย่างเชื้อมีการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO แบบ deletion ตัวอย่างที่พบในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 9.09 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด ในจำนวนนี้ ประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 6 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 7.79 และเชื้อที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems จำนวน 1 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 1.29 จากนั้นผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของโปรตีน CarO ทั้ง 3 กลุ่มกับค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิด ด้วย Fisher's Exact Test ( $4 \times 3$ ) จากการวิเคราะห์ไม่พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างรูปแบบการ mutation ของยีน *carO* กับค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิด

งานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าพบการกลายพันธุ์ระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 77 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งที่ไวและดื้อต่อยา carbapenem (คิดเป็นร้อยละ 100) และส่งผลให้พบการกลายพันธุ์ระดับกรดอะมิโนของโปรตีน CarO ในเชื้อ *A. baumannii* ด้วย โดยพบว่าเป็นการกลายพันธุ์แบบ missense mutation ร่วมกับ insertion มากที่สุด (พบสูงถึง 69 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 89.61) โดยมีกรดอะมิโน 35 ตำแหน่ง ที่มีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยา carbapenem เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยา carbapenem โดยพบว่าการกลายพันธุ์ทั้ง 35 ตำแหน่งเกิดขึ้นพร้อมกันอย่างเป็นระบบ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้มี *carO* variant ไกล่เคียงกัน และมีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิด และรูปแบบการ mutation ของยีน *carO*

## อภิปรายผล

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อ *A. calcoaceticus-baumannii* complex ที่แยกได้จากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งผ่านการพิสูจน์แยกเชื้อและทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ VITEK® 2 COMPACT จำนวน 83 ตัวอย่าง เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ VITEK® 2 COMPACT ที่ไม่สามารถแยกเชื้อ *A. baumannii* ออกจาก *A. calcoaceticus-baumannii* complex ได้ ทางผู้วิจัยจึงต้องทำการยืนยันจีโนมไทป์ของ *A. baumannii* ด้วยการเพิ่มจำนวนยีน *bla<sub>OXA-51 like</sub>* โดยใช้เทคนิค PCR (Turton et al., 2006) ซึ่งพบว่าจากตัวอย่างเชื้อจำนวน 83 ตัวอย่าง มีเพียง 77 ตัวอย่างที่ตรวจพบยีน *bla<sub>OXA-51 like</sub>* และยืนยันจีโนมไทป์เป็น *A. baumannii* ในจำนวนนี้ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา carbapenem จำนวน 70 ตัวอย่าง และไวต่อยา carbapenem จำนวน 7 ตัวอย่าง หลังจากนั้นทางผู้วิจัยได้เพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *carO* และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen

จากงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex แยกได้จากตัวอย่างที่เป็น sputum คิดเป็นร้อยละ 65.06 ของตัวอย่างทั้งหมด และมาจากผู้ป่วยที่นอนพักรักษาในหอผู้ป่วยวิกฤต (ICU) คิดเป็นร้อยละ 34.94 ซึ่งเป็นชนิดตัวอย่างและหอผู้ป่วยที่มีอัตราการพบเชื้อสูงที่สุดในงานวิจัยนี้ และเชื้อที่แยกได้จากหอผู้ป่วยวิกฤตนี้พบว่ามีอัตราการดื้อยาแบบ Extensively drug-resistant (XDR) สูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 31.33 ของตัวอย่างทั้งหมด จากข้อมูลดังกล่าวพบว่ามี ความสอดคล้องกับข้อมูลจาก NARST ที่พบว่าความชุกของเชื้อ *A. baumannii-calcoaceticus* complex ในประเทศไทยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8 ในปี 2000 เป็นร้อยละ 14 ในปี 2022 โดยหอผู้ป่วยวิกฤต (ICU) มีอัตราการดื้อยาของเชื้อสูงที่สุด และ sputum เป็นชนิดตัวอย่างที่พบมากที่สุดเช่นกัน จากข้อมูลในปี 2022 พบว่าเชื้อมีอัตราการดื้อยาเกินร้อยละ 70 (Kasemteerasomboon et al., 2025) ซึ่งผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สะท้อนถึงความจำเป็นในการเสริมสร้างมาตรการควบคุมการติดเชื้อในโรงพยาบาล และการดำเนินนโยบายการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุสมผล (antibiotic stewardship) รวมถึงการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลและการพัฒนาแนวทางการรักษาทางเลือก

อีกหนึ่งประเด็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับข้อมูลการดื้อยา colistin ในเชื้อตัวอย่างที่ทำการศึกษานในงานวิจัยนี้ พบว่ามีเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 3 ไอโซเลท ดื้อต่อยา colistin คิดเป็นร้อยละ 3.61 จากตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าเฝ้าระวังเนื่องจากรายงานสถานการณ์การดื้อยา colistin ของประเทศไทย ในเขตสุขภาพที่ 2 จาก NARST ในช่วงปี 2018 - 2023 พบรายงานอัตราการดื้อยา colistin คิดเป็นร้อยละ 1.11 ((NARST), 2018-2023) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยมองว่าเป็นสัญญาณ

อันตราย เนื่องจาก colistin เป็นหนึ่งในยาไม่กี่ชนิดที่ยังมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อ XDR – *A. baumannii* หากเชื้อดื้อต่อ colistin จะเข้าสู่สถานะ pandrug-resistant (PDR) ซึ่งแทบไม่มีทางเลือกในการรักษา

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก โดยผู้วิจัยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับ amino acid ของยีน *carO* จากไอโซเลทกับลำดับอ้างอิงของ CarO variant III ของ *A. baumannii* Ab242 (GenBank: DQ309876.1) (M. A. Mussi et al., 2011) เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานว่า CarO variant III เป็นโปรตีน CarO ที่สมบูรณ์และได้รับการอธิบายลักษณะทางหน้าที่อย่างครบถ้วน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 246 ตำแหน่ง มีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -barrel ที่ได้รับการยืนยันแล้ว ทำให้ *A. baumannii* Ab242 เป็น International reference standard สำหรับการเปรียบเทียบ *carO* sequences (María Alejandra Mussi et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ CarO variant III อย่างแพร่หลายในไอโซเลทของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก (Labrador-Herrera et al., 2020; María Alejandra Mussi et al., 2011; Novovic et al., 2015) และจากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในงานวิจัยนี้ พบการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์และระดับ amino acid ของเชื้อทั้ง 77 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mussi และคณะในปี 2011 ที่ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *carO* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก และได้ค้นพบว่า CarO variant มีความหลากหลายสูงถึง 4 variants (I–IV) ซึ่งส่งผลให้พบ *carO* allele ทั้งหมด 16 alleles แปรออกมาได้เป็น CarO protein homologs จำนวน 10 ชนิด (María Alejandra Mussi et al., 2011) อีกทั้งพบว่าการแลกเปลี่ยนยีน *carO* แบบ assortative recombination (ทั้งยีน) ภายใน *A. baumannii* population อีกด้วย (Simo Tchuinte et al., 2019) ดังที่กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยมีความเห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสามารถในการแลกเปลี่ยนยีน *carO* ของเชื้อ *A. baumannii*นี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในทุกไอโซเลทจากคลินิกที่นำมาศึกษา

ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ Point mutation ในระดับ amino acid ของโปรตีน CarO และพบรูปแบบการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO จำแนกได้เป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ missense mutation, missense mutation ร่วมกับ insertion และ deletion ซึ่งในงานวิจัยนี้พบการกลายพันธุ์ในรูปแบบ missense mutation ร่วมกับ insertion มากที่สุดในตัวอย่างเชื้อที่นำมาศึกษา โดยพบสูงถึง 69 ไอโซเลท คิดเป็น ร้อยละ 89.61 ของตัวอย่างเชื้อทั้งหมด โดย mutation ที่พบส่วนใหญ่เป็นแบบมีการเปลี่ยนชนิดของ amino acid และพบว่ามี 32 ตำแหน่งของ amino acid ที่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P value = 0.0006-0.0008 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่ดื้อยา carbapenem

และเชื้อที่ไวต่อยา carbapenem นอกจากนี้ยังพบรูปแบบการ mutation แบบ insertion 3 ตำแหน่งที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P \text{ value} = 0.0006$  ซึ่งการกลายพันธุ์ในระดับ amino acid ของโปรตีน CarO นี้ มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Novovic et al. (2015) ที่พบการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO ในรูปแบบดังกล่าวเช่นกัน (Novovic et al., 2015)

จากผลการวิจัยพบว่าการกลายพันธุ์ของโปรตีน CarO พบในงานวิจัยนี้ในรูปแบบ missense กล่าวคือมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของ amino acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สูงถึง 32 ตำแหน่ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ amino acid จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประจุที่ pore ของ CarO channel ยกตัวอย่าง เช่น E196K มีการเปลี่ยนแปลงจาก Glutamic acid ในตำแหน่งที่ 196 เป็น Lysine ทำให้ประจุบริเวณ pore เปลี่ยนจากประจุลบเป็นประจุบวกมากขึ้น หรือในทางตรงกันข้ามกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 221 มีรูปแบบการกลายพันธุ์เป็น K221E จึงมีการเปลี่ยนประจุจากบวกเป็นลบมากขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของประจุบริเวณ pore นี้มีผลต่อการดึงดูดหรือผลักโมเลกุลที่มีประจุ เช่น กรดอะมิโนพื้นฐานหรือยาปฏิชีวนะ (María Alejandra Mussi et al., 2011; Novovic et al., 2015) นอกจากนี้การมี insertion 3 ตำแหน่งที่พบ ได้แก่ ตำแหน่งที่ 138-139, 148-149 และ 207-208 ทำให้มี amino acid เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของ pore ใน CarO channel ได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Catel-Ferreira และคณะ ที่แสดงว่าโครงสร้างปฐมภูมิของ CarO มีผลโดยตรงต่อการจับกับยาในกลุ่ม carbapenem โดยเฉพาะ imipenem (Catel-Ferreira et al., 2011)

ในงานวิจัยนี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างรูปแบบการ mutation ของยีน *carO* กับระดับค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิด โดยมีค่า  $P \text{ value}$  ระหว่าง 0.286-1.000 ทั้งนี้อาจเกิดจากขนาดและการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ไม่สมดุลเป็นอย่างมาก โดยพบว่าข้อมูลมีการกระจุกตัวอยู่ใน กลุ่มที่ 2 คือการกลายพันธุ์ของยีน *carO* แบบ missense ร่วมกับ inserton ซึ่งทำให้การวิเคราะห์ทางสถิติมีอำนาจทางสถิติที่ต่ำมาก (Low statistical power) และจากการวิเคราะห์พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่มีค่า  $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/mL}$  ในยา imipenem และ meropenem คิดเป็นร้อยละ 89.61 และมีค่า  $\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g/mL}$  ในยา Doripenem คิดเป็นร้อยละ 90.91 ซึ่งพบในทุกรูปแบบของการ mutation บ่งชี้ว่าระดับค่า MIC ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างรูปแบบของ mutation แต่ละชนิด ผู้วิจัยให้ข้อเสนอแนะว่าหากสามารถเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการวิจัย หรือมีการกำหนดกลุ่มตัวอย่างตามค่า MIC ในจำนวนที่ใกล้เคียงกันและมากพอ จะช่วยให้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ mutation ของยีน *carO* กับระดับค่า MIC ของยา carbapenem แต่ละชนิดได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เนื่องจากงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบหาเอนไซม์ carbapenemases ในกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา ทำให้ไม่สามารถตัดกลไกการดื้อยา carbapenem ด้วยเอนไซม์ออกได้ จึงสรุปไม่ได้ว่าการดื้อยา carbapenem ในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาเป็นผลมาจาก *carO* โดยตรง และจากการศึกษาพบว่าเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยา carbapenem จำนวน 6 ไอโซเลท พบการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในรูปแบบ missense ร่วมกับ insertion และมี 1 ไอโซเลท ที่พบการกลายพันธุ์แบบ deletion เช่นเดียวกับเชื้อกลุ่มที่ดื้อยา carbapenem ซึ่งบ่งชี้ว่าการดื้อยา carbapenem ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *carO* เท่านั้น กล่าวโดยสรุป เชื้อที่ดื้อต่อยา carbapenem ในตัวอย่างทางคลินิกที่นำมาศึกษา อาจไม่ได้มีเพียงกลไกเดียวที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยา carbapenem โดยกลไกการดื้อยา carbapenem อาจเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น กลไกการสร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยเฉพาะ OXA-type การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน CarO (de Souza et al., 2025; Stoian et al., 2025) การแสดงออกของ efflux pump (Hou et al., 2012) ซึ่งเป็นประเด็นที่ควรศึกษาเพิ่มเติม

เนื่องด้วยข้อจำกัดด้านงบประมาณ ทำให้จำนวนตัวอย่างที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มีจำนวนเพียง 77 ตัวอย่าง อีกทั้งจำนวนตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* กลุ่มที่ไวต่อยา carbapenem มีจำนวนน้อยมาก คิดเป็นร้อยละ 10 ของตัวอย่างที่ศึกษา ผู้วิจัยเสนอแนะว่าควรมีตัวอย่างในกลุ่มที่ไวต่อยา carbapenem ประมาณร้อยละ 30 อ้างอิงตามรายงานสถานการณ์การดื้อยา carbapenem ของประเทศไทย ในช่วงปี 2021-2023 จาก NARST ((NARST), 2018-2023)



บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

- สุมาลี ตั้งประดับกุล. (2543). *โครงการศึกษาความผันแปรของยีนแฟลกเจลลินในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ต่างๆ ของ Pseudomonas ribotype I และ ribotype II (Burkholderia)* [Genetic variation of flagellin gene(s) among species and isolates of pathogenic Pseudomonas ribotype I and ribotype II (Burkholderia)]. สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม.
- Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (london, england)*, 399(10325), 629.
- Antunes, L. C., Imperi, F., Carattoli, A., & Visca, P. (2011). Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS ONE*, 6(8), Article e22674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022674>
- Baraldi, E., Lindahl, O., Savic, M., Findlay, D., & Årdal, C. (2018). Antibiotic pipeline coordinators. *Journal of Law, Medicine & Ethics*, 46(1\_suppl), 25–31. <https://doi.org/10.1177/1073110518782912>
- Bergogne-Bérézin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148–165. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.2.148>
- Bertholf, R. L. (2007). Fundamentals of molecular diagnostics [Review of the book *Fundamentals of molecular diagnostics*, by D. E. Bruns, E. R. Ashwood, & C. A. Burtis]. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 37(4), 378–379.
- Bonomo, R. A., & Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(Suppl. 2), S49–S56. <https://doi.org/10.1086/504477>
- Catel-Ferreira, M., Coadou, G., Molle, V., Mugnier, P., Nordmann, P., Siroy, A., Jouenne, T., & Dé, E. (2011). Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 2053–2056. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr267>

- Choi, C. H., Hyun, S. H., Lee, J. Y., Lee, J. S., Lee, Y. S., Kim, S. A., Chae, J. P., Yoo, S. M., & Lee, J. C. (2008). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cellular Microbiology*, 10(2), 309–319. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x>
- Consortium, T. U. (2024). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Crombach, W. H., Dijkshoorn, L., van Noort-Klaassen, M., Niessen, J., & van Knippenberg-Gordebeke, G. (1989). Control of an epidemic spread of a multi-resistant strain of *Acinetobacter calcoaceticus* in a hospital. *Intensive Care Medicine*, 15(3), 166–170. <https://doi.org/10.1007/bf01058568>
- De Souza, J., D'Espindula, H. R. S., Ribeiro, I. F., Gonçalves, G. A., Pilonetto, M., & Faoro, H. (2025). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms, therapeutics, and innovations. *Microorganisms*, 13(7), Article 1501. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071501>
- Eren, K., Taktakoğlu, N., & Pirim, I. (2022). DNA sequencing methods: From past to present. *Eurasian Journal of Medicine*, 54, S47–S56. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.22280>
- Erridge, C., Moncayo-Nieto, O. L., Morgan, R., Young, M., & Poxton, I. R. (2007). *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *Journal of Medical Microbiology*, 56(2), 165–171. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46823-0>

- Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Conejo, M. C., Ayala, J. A., Perea, E. J., & Pascual, A. (2003). Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 565–574. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg097>
- Fernández-Cuenca, F., Smani, Y., Gómez-Sánchez, M. C., Docobo-Pérez, F., Caballero-Moyano, F. J., Domínguez-Herrera, J., Pascual, A., & Pachón, J. (2011). Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(6), 548–549. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.08.002>
- Fonseca É, L., Caldart, R. V., Freitas, F. S., Morgado, S. M., Rocha, L. T., Dos Santos, R. C., & Vicente, A. C. P. (2020). Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying bla(OXA-72) and bla(CTX-M-115) in the Brazilian Amazon region. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.014>
- Gales, A. C., Seifert, H., Gur, D., Castanheira, M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2019). Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016). *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Suppl. 1), S34–S46. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy293>
- Gallagher, L. A., Ramage, E., Weiss, E. J., Radey, M., Hayden, H. S., Held, K. G., Huse, H. K., Zurawski, D. V., Brittnacher, M. J., & Manoil, C. (2015). Resources for Genetic and Genomic Analysis of Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, 197(12), 2027–2035. <https://doi.org/10.1128/jb.00131-15>

- Hamed, S. M., Elkhatib, W. F., Brangsch, H., Gesraha, A. S., Moustafa, S., Khater, D. F., Pletz, M. W., Sprague, L. D., Neubauer, H., & Wareth, G. (2023). *Acinetobacter baumannii* global clone-specific resistomes explored in clinical isolates recovered from Egypt. *Antibiotics*, 12(7), Article 1149. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071149>
- Hashizume, T., Ishino, F., Nakagawa, J., Tamaki, S., & Matsushashi, M. (1984). Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: Binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *The Journal of Antibiotics*, 37(4), 394–400. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.394>
- Hong, H., Patel, D. R., Tamm, L. K., & van den Berg, B. (2006). The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7568–7577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512365200>
- Hou, P. F., Chen, X. Y., Yan, G. F., Wang, Y. P., & Ying, C. M. (2012). Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*, 58(2), 152–158. <https://doi.org/10.1159/000335599>
- Humphries, R., Bobenchik, A. M., Hindler, J. A., & Schuetz, A. N. (2021). Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(12), Article e0021321. <https://doi.org/10.1128/jcm.00213-21>
- Kasemteerasomboon, P., Mahikul, W., Leerach, N., Siripongwutikorn, P., Krobanan, K., Leethongdee, P., Kamjumphol, W., Unahalekhaka, A., Rukluarh, N., Sreesuk, S., & Prem Suriya, J. (2025). Trends in prevalence and antibiotic non-susceptibility of *Acinetobacter baumannii*–*calcoaceticus* complex in Thailand (2000–2022): A secondary data analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 45, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2025.08.010>

- Labrador-Herrera, G., Pérez-Pulido, A. J., Álvarez-Marín, R., Casimiro-Soriguer, C. S., Cebrero-Cangueiro, T., Morán-Barrio, J., Pachón, J., Viale, A. M., & Pachón-Ibáñez, M. E. (2020). Virulence role of the outer membrane protein CarO in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 11(1), 1727–1737. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1855912>
- Lee, Y., Kim, C. K., Lee, H., Jeong, S. H., Yong, D., & Lee, K. (2011). A novel insertion sequence, ISAb10, inserted into ISAb1 adjacent to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 361–363. <https://doi.org/10.1128/aac.01672-09>
- Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/cmr.00117-14>
- Lolans, K., Rice, T. W., Munoz-Price, L. S., & Quinn, J. P. (2006). Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2941–2945. <https://doi.org/10.1128/aac.00116-06>
- Lucidi, M., Visaggio, D., Migliaccio, A., Capecci, G., Visca, P., Imperi, F., & Zarrilli, R. (2024). Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: Factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. *Virulence*, 15(1), Article 2289769. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2289769>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

- Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3375–3380. <https://doi.org/10.1128/aac.45.12.3375-3380.2001>
- Marchaim, D., Pogue, J. M., Tzuman, O., Hayakawa, K., Lephart, P. R., Salimnia, H., Painter, T., Zervos, M. J., Johnson, L. E., Perri, M. B., Hartman, P., Thyagarajan, R. V., Major, S., Goodell, M., Fakih, M. G., Washer, L. L., Newton, D. W., Malani, A. N., Wholehan, J. M., ... Kaye, K. S. (2014). Major variation in MICs of tigecycline in Gram-negative bacilli as a function of testing method. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1617–1621. <https://doi.org/10.1128/jcm.00001-14>
- Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St Michael, F., Cox, A. D., Adler, B., Nation, R. L., Li, J., & Boyce, J. D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 4971–4977. <https://doi.org/10.1128/aac.00834-10>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., Relling, V., Ravasi, P., Arakaki, A., Actis, L. A., & Viale, A. M. (2011). Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single carO gene, encoding a major outer membrane protein channel. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 4736–4748. <https://doi.org/10.1128/jb.01533-10>
- Nakasone, I., Kinjo, T., Yamane, N., Kisanuki, K., & Shiohira, C. M. (2007). Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(2), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.008>

- National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand. (NARST) (2018–2023).  
*AMR dashboard: Acinetobacter baumannii, all specimen, all ward, year 2018–2023* [Dashboard]. Retrieved [May 14, 2026], from <https://narst.dmsc.moph.go.th/Dashborad>
- Navidinia, M. (2016). The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Journal of Paramedical Sciences*, 7(3), 43–57.  
<https://research.ebsco.com/linkprocessor/plink?id=d33bb9eb-c7c4-3eb4-99ac-61f771275ab3>
- Nguyen, M., & Joshi, S. G. (2021). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: A scientific review. *Journal of Applied Microbiology*, 131(6), 2715–2738. <https://doi.org/10.1111/jam.15130>
- Novovic, K., Mihajlovic, S., Vasiljevic, Z., Filipic, B., Begovic, J., & Jovicic, B. (2015). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO classification. *PLoS ONE*, 10(3), Article e0122793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122793>
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538–582.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.00058-07>
- Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 826–836. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x>
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(1), 12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x>
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rosenthal, S. L. (1974). Sources of pseudomonas and acinetobacter species found in human culture materials. *American Journal of Clinical Pathology*, 62(6), 807–811.  
<https://doi.org/10.1093/ajcp/62.6.807>

- Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program and a step-by-step guide for its use in life science research. *Quarterly Research Journal of Plant & Animal Sciences / Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 36(1), 55–61. <https://doi.org/10.18805/BKAP283>
- Santajit, S., Bhoopong, P., Kong-Ngoen, T., Tunyong, W., Horpet, D., Paehoh-Ele, W., Zahedeng, T., Pumirat, P., Sookrung, N., Hinthong, W., & Indrawattana, N. (2023). Phenotypic and genotypic investigation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital, Thailand. *Antibiotics*, 12(3), Article 580. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030580>
- Simo Tchuente, P. L., Rabenandrasana, M. A. N., Kowalewicz, C., Andrianoelina, V. H., Rakotondrasoa, A., Andrianirina, Z. Z., Enouf, V., Ratsima, E. H., Randrianirina, F., & Collard, J. M. (2019). Phenotypic and molecular characterisations of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Madagascar. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8, Article 31. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0491-9>
- Si-Tuan, N., Ngoc, H. M., Hang, P. T. T., Nguyen, C., Van, P. H., & Huong, N. T. (2017). New eight genes identified at the clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* DMS06669 strain in a Vietnam hospital. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16, Article 74. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0250-9>
- Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., & Pachón, J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1806–1808. <https://doi.org/10.1128/aac.02101-13>
- Stoian, I. A., Balas Maftai, B., Florea, C. E., Rotaru, A., Costin, C. A., Pasare, M. A., Crisan Dabija, R., & Manciu, C. (2025). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Resistance mechanisms, emerging therapies, and prevention—A narrative review. *Antibiotics*, 15(1), Article 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics15010002>

- Sunagawa, M., Matsumura, H., Inoue, T., Fukasawa, M., & Kato, M. (1990). A novel carbapenem antibiotic, SM-7338 structure-activity relationships. *J Antibiot (Tokyo)*, 43(5), 519-532. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.43.519>
- Turton, J. F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M. E., & Pitt, T. L. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2974–2976. <https://doi.org/10.1128/jcm.01021-06>
- Ueda, Y., & Vinet, V. (1992). Synthesis and in vitro activity of novel quaternary ammonium carbapenems: 2-pyridiniopropyl and 1-pyridinioethyl carbapenems. *The Journal of Antibiotics*, 45(6), 940–953. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.940>
- UniProt Consortium. (2024). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Uribe-Lorío, L., Uribe, L., Rodríguez, C., García, F., & Aráuz, L. F. (2024). Diversity and antibiotic resistance in bacteria associated with symptoms of bacterial infection in Costa Rican crops. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42(2), 1–24. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-5>
- Vahhabi, A., Hasani, A., Rezaee, M. A., Baradaran, B., Hasani, A., Samadi Kafil, H., Abbaszadeh, F., & Dehghani, L. (2021). A plethora of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: No end to a long insidious genetic journey. *Journal of Chemotherapy*, 33(3), 137–155. <https://doi.org/10.1080/1120009x.2020.1847421>
- Valenzuela, J. K., Thomas, L., Partridge, S. R., van der Reijden, T., Dijkshoorn, L., & Iredell, J. (2007). Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 453–460. <https://doi.org/10.1128/jcm.01971-06>
- Van Dam, V., Olrichs, N., & Breukink, E. (2009). Specific labeling of peptidoglycan precursors as a tool for bacterial cell wall studies. *ChemBioChem*, 10(4), 617–624. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800678>

- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 306–325. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.2.306-325.2005>
- Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 373–383. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>
- Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Amyes, S. G., & Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(4), 351–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>
- World Health Organization. (2017). *Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities*. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee.
- Zahn, M., D'Agostino, T., Eren, E., Baslé, A., Ceccarelli, M., & van den Berg, B. (2015). Small-molecule transport by CarO, an abundant eight-stranded  $\beta$ -barrel outer membrane protein from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Molecular Biology*, 427(14), 2329–2339. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.016>
- Zarrilli, R., Casillo, R., Di Popolo, A., Tripodi, M. F., Bagattini, M., Cuccurullo, S., Crivaro, V., Ragone, E., Mattei, A., Galdieri, N., Triassi, M., & Utili, R. (2007). Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(5), 481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01675.x>
- Zhu, L. J., Chen, X. Y., & Hou, P. F. (2019). Mutation of CarO participates in drug resistance in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(8), Article e22976. <https://doi.org/10.1002/jcla.22976>



ภาคผนวก

## หนังสือรับรองโครงการวิจัย

COA No. 0217/2025  
IRB No. P1-0075/2568

AF 11/6.0



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์  
99 หมู่ 9 ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมืองพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก 65000 หมายเลขโทรศัพท์ 05596 8572

### หนังสือรับรองโครงการวิจัยครั้งแรก

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *carO* ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยา carbapenems  
ผู้วิจัยหลัก : นางสาวพลอยชมพู พูลลักษณะณ์  
สังกัดหน่วยงาน : คณะสหเวชศาสตร์  
วิธีทบทวน : แบบเร่งรัด  
รายงานความก้าวหน้า : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี

#### เอกสารรับรอง

1. IF 01 Research Ethical Application (Secondary Research) เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 1 พฤษภาคม 2568
2. IF 02 Conflict of Interest and Funding Form เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 17 พฤษภาคม 2568
3. IF 03 สำหรับอาสาสมัครอายุ 18 ปีขึ้นไป เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 17 พฤษภาคม 2568
4. IF 04 สำหรับอาสาสมัครอายุ 18 ปีขึ้นไป เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 17 พฤษภาคม 2568
5. IF 05 ประวัติผู้วิจัย เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 1 พฤษภาคม 2568
6. IF 06 Budget เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 1 พฤษภาคม 2568
7. แบบบันทึกข้อมูล เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 17 พฤษภาคม 2568
8. Full Protocol เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 1 พฤษภาคม 2568

ลงนาม:   
(นายแพทย์สมบูรณ์ หันสูงสวัสดิกุล)  
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์  
มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วันที่รับรอง : 21 กรกฎาคม 2568  
วันหมดอายุ : 21 กรกฎาคม 2569

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)