



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii*
ที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์

เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการดื้อยากลุ่ม carbapenem ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์
หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์นายแพทย์เชิดศักดิ์ ธีระบุตร
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์สมหวัง ด้านชัยจิตร
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code: MRG4680064

Project Title: Study of mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections.

Investigator: Chanwit Tribuddharat, M.D., Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital

Mahidol University

E-mail Address: sictb@mahidol.ac.th

Project Period: July 1, 2003-February 29, 2008

Abstract

Objectives:

To identify carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* isolated in Thailand, to apply the knowledge gained from this study to other important nosocomial pathogens, to develop rapid and reliable molecular typing techniques for use in an outbreak investigation, and to improve the infection treatment through the evidence-based approaches using the analyzed genetic data from basic research.

Materials and Methods:

One hundred clinical isolates of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* were collected during the year 2002-2003. The production of metallo-beta-lactamase has been tested by 2-mercaptopropionic acid (2-MP), as an inhibitor, and ceftazidime, as a reporter antibiotic. The presence of metallo-beta-lactamase was tested by Southern blot hybridization using probes specific for the *bla_{IMP}* and *bla_{VIM}* genes. Thirty isolates were tested for the production of carbapenemase activity by meropenem hydrolysis using UV spectrophotometry. The presence of the class D beta-lactamase capable of carbapenem hydrolysis was also tested by polymerase chain reaction (PCR) using primers specific for the *bla_{OXA-23}* and *bla_{OXA-24}* genes. The clonal relatedness among all isolates was also tested by three molecular typing methods, i.e. 16S ribotyping, randomly-amplified polymorphic DNA (RAPD), and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Susceptibilities to other antibiotics have also been performed, i.e. susceptibilities to rifampin, polymyxins, and newly released tigecycline.

Results:

Two third of isolates (77.8%) of carbapenem-resistant *A. baumannii* in this study were resistant to carbapenem by the production of class D OXA-23 beta-lactamase. There was no metallo-beta-lactamase genes of the *bla_{IMP}* and *bla_{VIM}* families detected. Clonal cluster analysis could not be correlated by molecular methods of ribotyping, RAPD, and PFGE. These isolates were all resistant to rifampin (with 38% carrying *arr-2* gene), but susceptible *in vitro* to polymyxins and tigecycline.

Discussion and conclusions:

Majority of carbapenem-resistant *A. baumannii* seemed to spread from a clonal expansion of OXA-23 producing strain. There was no metallo-beta-lactamase genes detected. Combination treatment using rifampin, as suggested in the literatures, would not be appropriate in Thailand. The use of polymyxins and tigecycline should be carefully clinically evaluated under stringent control and close monitoring for clinical use; otherwise these two last antibiotics may lose their curing properties too quickly. The better molecular typing standard techniques should be developed, such as those that can be a good library methods, e.g. multi-locus sequence typing (MLST) for inter-laboratory comparison and long term monitoring and surveillance.

Keywords: Carbapenem resistance, OXA-23, molecular typing, *arr-2*.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์

เพื่อการศึกษาให้ทราบถึงกลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenem ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้ในประเทศไทย ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การประยุกต์หาเทคนิคการทำวิจัยกับเชื้อก่อโรคที่สำคัญชนิดอื่นๆในอนาคต เพื่อนำความรู้ไปพัฒนาเทคนิคการตรวจการดื้อยาทาง molecular (genotyping) ที่ทำให้ทราบผลรวดเร็วและแม่นยำกว่าวิธีดั้งเดิมที่ใช้การตรวจทาง phenotype และผลการศึกษาจะทำให้มีข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล

วิธีทดลอง

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อยาด้านจุลชีพลกลุ่ม carbapenem จำนวน 100 สายพันธุ์ได้ถูกเก็บจากตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลในช่วงปี 2545-2546 มาทำการศึกษาการสร้าง metallo-beta-lactamase ด้วยการให้ 2-mercaptopyrroline acid และ ceftazidime ในการการตรวจกรอง และทำการยืนยันด้วยการตรวจ Southern blot hybridization ด้วย specific probe สำหรับยีน *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}* ทำการตรวจการสร้าง carbapenemase จากเชื้อจำนวน 30 สายพันธุ์โดยการใช้ meropenem และทดสอบการทำลายยาโดยการตรวจทาง spectrophotometry และได้ตรวจหาการมียีน *bla_{OXA-23}* และ *bla_{OXA-24}* โดยการทำให้ polymerase chain reaction (PCR) มีการตรวจความใกล้เคียงทางสายพันธุ์ของเชื้อด้วยการตรวจโดยเทคนิค molecular typing 3 วิธีคือ ribotyping, randomly-amplified polymorphic DNA (RAPD), และ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความไวต่อยาด้านจุลชีพลอื่นๆ เช่น ยา rifampin, polymyxins, และ tigecycline เพื่อประโยชน์ต่อการรักษาด้วยยาแบบใหม่

ผลการทดลอง

77.8 % ของเชื้อ *A. baumannii* สร้าง class D OXA-23 beta-lactamase ทำให้เชื้อดื้อยาด้านจุลชีพลกลุ่ม carbapenem ไม่พบว่ายีนสร้าง metallo-beta-lactamase ในกลุ่ม *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}* การตรวจสายพันธุ์โดยวิธี ribotyping, RAPD, และ PFGE ให้ผลที่ไม่สัมพันธ์กัน เชื้อทั้งหมดดื้อต่อยา rifampin (38%ของเชื้อมียีน *arr-2*) แต่ทั้งหมดไวต่อยา polymyxins และ tigecycline

วิจารณ์ผลการทดลองและสรุป

เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา carbapenem ที่นำมาศึกษาน่าจะเป็นเชื้อที่มีความใกล้เคียงทางสายพันธุ์โดยเป็นเชื้อกลุ่มที่สร้าง class D OXA-23 beta-lactamase ไม่พบยีนดื้อยาในกลุ่ม *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}* การใช้ยา rifampin ร่วมกับยาในกลุ่ม carbapenem ตามคำแนะนำในบทความที่มีการตีพิมพ์ อาจใช้ไม่ได้ผลกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย เนื่องจาก 38% ของเชื้อ ดื้อ rifampin ในระดับสูง การใช้ยาในกลุ่ม polymyxins และ tigecycline ควรมีการควบคุมและติดตามการใช้อย่างเข้มงวด เนื่องจากเชื้ออาจกลายพันธุ์แล้วดื้อต่อยาได้หากมีการใช้ยามากเกินไป

คำสำคัญ: Carbapenem resistance, OXA-23, molecular typing, *arr-2*.

บทนำ

ปัญหาที่เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เป็นปัญหาที่ทวีความรุนแรงขึ้นมากในปัจจุบัน เนื่องมาจากคุณสมบัติการดื้อยาหลายขนานของเชื้อก่อโรค เชื้อที่เป็นปัญหามากที่สุดในขณะนี้ คือ *Acinetobacter baumannii* เชื้อสามารถก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและพบว่าอัตราการติดเชื้อด้วยเชื้อชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา [1] สาเหตุที่มีการติดเชื้อดื้อยาหลายขนานเพิ่มขึ้นมากนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งอาจเกิดได้จาก 2 ลักษณะสำคัญ คือ 1) ปัญหาการรักษาพยาบาลที่มี infection control เพื่อการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคทำได้ไม่ดีพอ และเนื่องจากบุคลากรส่วนใหญ่ไม่เข้าใจการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ทำให้ไม่มีการสืบค้นหาโรคร (identification of reservoir) เฝ้าระวังและติดตาม (active surveillance) ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพหลายขนาน ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน เกิดการระบาดทั่วโรงพยาบาล ทั่วประเทศ หรือแม้กระทั่งทั่วโลกโดยเชื้อกลุ่มเดียวกัน อาจเป็นแบบ monoclonal หรือ oligoclonal spread หรือ 2) มีการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียดื้อยาจากการใช้ยาด้านจุลชีพหลายขนานปริมาณมากในเวลาเดียวกัน ทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อดื้อยาหลายขนานจากทุกแหล่งที่เป็นที่อยู่อาศัยของเชื้อแบคทีเรีย โดยมีการใช้ยาด้านจุลชีพร่วมกันผ่านขบวนการถ่ายทอดยีนดื้อยาแบบ horizontal gene transfer และเชื้อดื้อยาเหล่านี้จะก่อปัญหาการแพร่ระบาดอยู่ได้หลายสายพันธุ์ในเวลาเดียวกันเป็นแบบ polyclonal spread

การศึกษากลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenem และการศึกษาคุณลักษณะความใกล้เคียงของสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* น่าจะนำไปสู่คำตอบที่สามารถนำไปใช้แก้ปัญหามาดื้อยาที่ดื้อต่อยาด้านจุลชีพหลายชนิดได้ ทำให้สามารถสร้างมาตรการการควบคุมและการแก้ไขที่ถูกต้องตามสาเหตุและป้องกันการสูญเสียงบประมาณในการรักษาเป็นจำนวนมากได้

วิธีการทดลอง

1. Bacterial isolates

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อยาด้านจุลชีพกลุ่ม carbapenem จำนวน 103 สายพันธุ์ได้ถูกเก็บจากตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลในช่วงปี 2545-2546 เป็นเชื้อที่เก็บจากโรงพยาบาลศิริราชจำนวน 87 สายพันธุ์ จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 16 สายพันธุ์ (จากโรงพยาบาลมหาราชานครศรีธรรมราชทั้งหมด)

2. Antibiotic Susceptibility Test (AST)

การทดสอบ antibiotic susceptibility test ในเชื้อ *A. baumannii* ทำด้วยวิธี disk diffusion method และการแปลผลความไวตามมาตรฐานของ the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) [2] ใช้ antibiotic disk จำนวน 21 ชนิดในการทดสอบและผลความไวเป็นดังตารางที่ 1

3. การศึกษากลไกการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม carbapenem โดยการหา carbapenemase genes และ antibiotic resistance-related genes เช่น class 1 integron integrase gene และ Extended-spectrum beta-lactamase genes (ESBLs)

3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่สามารถทำลายยา carbapenem ได้ โดยการหา meropenem hydrolysis ด้วยวิธี UV spectrophotometry

เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 30 สายพันธุ์ได้ถูกนำมาสกัดให้ได้ periplasmic proteins โดยวิธี sonication ให้ได้ crude extract ไปใช้ใน meropenem hydrolysis measurement เป็นเวลา 1-2 นาที โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงค่า O.D. ที่ wavelength 300 nm โดยเครื่อง UV spectrophotometer

3.2 การทดสอบการสร้าง metallo-beta-lactamase โดยการใช้ 2-mercaptopropionic acid (2-MP) inhibitor ร่วมกับ ceftazidime disk (double disk diffusion technique)

การทดสอบการสร้าง metallo-beta-lactamase โดยการใช้ 2-MP (5 µl ต่อ 1 blank disk) และ ceftazidime disk (30 µg) โดยวาง disk ทั้งสองชนิดบน bacterial lawn เตรียมจาก bacterial suspension ที่มีความขุ่น 0.5 McFarland เป็นการตรวจหาแบบ screening ตามวิธีที่ได้มีการตีพิมพ์ไว้แล้ว [3] ได้ทำการทดสอบกับเชื้อจำนวน 100 สายพันธุ์

3.3 การทดสอบการสร้าง metallo-beta-lactamase โดยวิธี Southern blot hybridization

ได้มีการทำ Southern blot hybridization โดยการใช้ carbapenemase gene ของ *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}* families มาทำเป็น probe โดยใช้ primers ดังนี้

- IMP forward 5'-CTTTGCCAGATTTAAAAAT-3'
- IMP reverse 5'-ACCAGTTTTGCCTTACCATA-3'
- BlaVIM_forward 5'-GTCTACCCGTCCAATGGTCTCA-3'
- BlaVIM_Reverse 5'-AGCAAGTCTAGACCGCCCG-3'

ใช้ DNA template ในการสร้าง probe จากยีนที่แยกได้จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ no. 52 ที่มี *bla_{IMP-14}* gene (GenBank accession number AY553332) และเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มี *bla_{VIM-2}* gene (ได้รับเชื้อโดยความอนุเคราะห์ของ Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Calgary, Alberta, Canada) การทำ Southern blot hybridization ใช้ชุดตรวจของ AmershamPharmacia: Gene Images Random Prime Labeling Kit และ CDP-Star™ detection module ใช้ stringent condition ในการทำ hybridization และ probe washing ตามคู่มือของบริษัท dot-blot membrane ที่นำมาใช้ซ้ำจะผ่านการต้มใน alkaline solution เพื่อ strip probe ออก

3.4 การทดสอบหายีนที่ควบคุมการสร้าง carbapenemase ที่อยู่ใน bla_{OXA} gene family

เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยากลุ่ม carbapenem ที่นำมาศึกษาอาจสร้าง beta-lactamase ที่ encode มาจาก *bla_{OXA}* gene family ได้แก่ *bla_{OXA-23}* ถึง *bla_{OXA-27}* จึงได้ทำการทดสอบหายีนใน family ดังกล่าว โดยใช้ primers [4] ดังต่อไปนี้

OXA Group 1 - OXA10F 5' TCA ACA AAT CGC CAG AGA AG 3' (OXA-10 group) 187 bp

- OXA10R 5' TCC CAC ACC AGA AAA ACC AG 3'

OXA group 2 - OXA2F 5' AAG AAA CGC TAC TCG CCT GC 3' (OXA-2 group) 478 bp
 - OXA2R 5' CCA CTC AAC CCA TCC TAC CC 3'

OXA group 3 - OXA1F 5' TTT TCT GTT GTT TGG GTT TT 3' (OXA-1 group) 427 bp
 - OXA1R 5' TTT CTT GGC TTT TAT GCT TG 3'
 - OXA23F 5'-GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG-3' (OXA-23 specific) 1065 bp
 - OXA23R 5'-TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG-3'
 - OXA24F 5'-TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT-3' (OXA-24 specific) 1023 bp
 - OXA24R 5'-GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA-3'

4. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาแบบต่าง ๆ

4.1 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาแบบ Ribotyping

4.1.1 การใช้เทคนิค Ribotyping แบบที่ 1 (preliminary testing)

การทำ Ribotyping โดยใช้ 16S ribosomal RNA gene (การทำ preliminary testing ใช้ DNA จาก *Leptospira sp.* มาเป็น template: ใช้ *EcoRI*-digested *A. baumannii* chromosomal DNA มาทำ Southern blot hybridization ด้วย 16S gene probe ที่เตรียมจาก universal bacterial primers [5])

4.1.2 การทำ Ribotyping โดยการใช้ agarose gel ขนาดเล็ก: รูปที่ 2 แสดงการใช้ 16S rRNA gene (ใช้ DNA ของ *A. baumannii* เป็น template ในการสร้าง probe)

4.1.3 ribotyping โดยใช้ DNA template จาก *A. baumannii* หลังจากที่ได้ทำ ribotyping โดยใช้ DNA template จาก *A. baumannii* ใช้ชุดตรวจของ Roche Applied Science: DIG DNA Labeling and Detection Kit Random primed DNA labeling with digoxigenin-dUTP

4.2 การทำ typing โดยใช้เทคนิค Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR

เป็นการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลอีกวิธีหนึ่งที่ได้ถูกนำมาทดสอบเนื่องจากสามารถทำการทดสอบกับเชื้อจำนวนมากได้ในเวลาอันสั้นและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างประหยัดกว่าวิธี Ribotyping ทดลองใช้ short primer (10-mer) จำนวน 4 แบบ มาทำการ amplification ลำดับเบสของ primer เป็นดังนี้

RAPD primers:

- R001 5'-GGACCCTTAC-3'
- R002 5'-TTCGAGCCAG-3'
- R003 5'-CCTTGACGCA-3'
- R004 5'-TCTGCCTGGA-3'

Amplification cycle: 94°C, 5 min, 1 cycle; 95°C, 1 min, 37°C, 2 min, 72°C 2 min, 5 cycles; 94°C, 1 min, 37°C, 1 min, 72°C 1 min, 35 cycles ; extension, 72°C, 5 min.

4.3 การทำ Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) เพื่อทำการ typing

ทำ PFGE โดยใช้ whole-cell DNA จาก *A. baumannii* ที่ถูกตัดด้วย *Apal* restriction enzyme ข้ามคืนที่ 25°C และใช้เครื่องมือ GenePath (BioRad) แยกสาย DNA ด้วย 1% agarose gel ใน 0.5X Tris-borate-EDTA buffer. การตั้งค่าการแยก DNA ทำดังนี้ ใช้ temperature controlled pump ควบคุม อุณหภูมิที่ 14°C; ตั้ง voltage ที่ 6 V/cm และองศาการแยก DNA ที่ 120° และ linear switch ramp, initial 5 seconds, final 20 seconds เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นย้อมดู DNA bands ด้วย ethidium bromide แล้วถ่ายรูปด้วย Geldoc system ผลการทดสอบสามารถใช้การมองดู banding patterns เพื่อ ใช้แยกเป็นสายพันธุ์ชนิดต่างๆ

5. การศึกษาการดื้อยา rifampin ในเชื้อ *A. baumannii*

5.1 Rifampin disk diffusion test: ทำการทดสอบเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 100 สายพันธุ์ ว่าเป็นเชื้อดื้อ ยา rifampin โดยวิธีการ disk diffusion test ใช้ rifampin disk 5 (µg) (BBL) และวัด inhibition zone รอบ rifampin disk การแปลผลใช้ standard inhibition zone ของ *Staphylococcus aureus* ในการแปล ผล เนื่องจาก NCCLS ไม่มี standard zone size สำหรับ *A. baumannii* (susceptible size สำหรับ *S. aureus* and *Streptococcus pneumoniae* เท่ากับ >20 mm และ >19 mm ตามลำดับ

5.2 การตรวจหา *rpoB* gene mutation โดยวิธี PCR amplification และ specific primers และ การทำ DNA sequencing

Forward primer: rpoBF2	5'-AGCGTTTAAGCCAAGCAGAA-3'
Reverse primer: rpoBR2	5'-AATCGTTGGCTTTTGCAT-3'
rpoB-inverse1	5'-TTCTGCTTGGCTTAAACGCT-3'
rpoB-inverse2	5'-ATACGCAAAAGCCAACGATT-3'

6. การทดสอบ polymyxins และ tigecycline susceptibility

ผลการตรวจความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยา polymyxins และตัวยาชนิดใหม่ คือ tigecycline ของบริษัท Wyeth Research การทดสอบได้ทำทั้งแบบใช้ disk ที่มียา tigecycline ใน disk (15 µg) และแบบ Etest (Etest strip, AB BIODISK, Sweden) ใช้ Mueller Hinton agar ในการทดสอบ ตาม guidelines ของ NCCLS การแปลผลความไวต่อ polymyxins ใช้ตาม standard ของ NCCLS ส่วน การแปลผลความไวต่อยา tigecycline ใช้เกณฑ์ของบริษัท Wyeth Research ที่ inhibition zone ≥19 mm เท่ากับไวต่อยา tigecycline และทำการทดสอบแบบ minimal inhibitory concentration ด้วย โดยใช้เทคนิค microbroth dilution กับยาที่เป็น standard powder ของบริษัท ใช้ breakpoint ที่ ≤2 µg/ml)

ผลการทดลอง

1. Antibiotic Susceptibility Test (AST)

ผลการทดสอบ AST กับยาด้านจุลชีพจำนวน 21 ชนิด ผลการทดสอบความไวแสดงไว้ในตาราง ที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงผลการทดสอบ Susceptibility test ในเชื้อ *A. baumannii* ตัวเลขแสดงร้อยละ (%) ของเชื้อที่ไวต่อยา, จำนวนในวงเล็บ = จำนวนที่ทำการทดสอบ

AMP	AUG	CFZ	GEN	SXT	FTX	CRO	CAZ	CIP	AMS	AMK
0(103)	0(103)	0(103)	2(103)	1(102)	0(102)	0(103)	2(103)	0(102)	8 (96)	6(103)
NET	PIR	FEP	PTA	IMP	MER	CFS	RIF	POL	TIG	
25(52)	0 (67)	0 (70)	0(103)	0(103)	1(103)	11(100)	0(100)	100(100)	100(100)	

AMP= ampicillin, AUG= amoxycillin+clavulanate, CFZ= cefazolin, GEN= gentamicin, SXT= sulfonamide/trimethoprim, FTX= cefotaxime, CRO= ceftriaxone, CAZ= ceftazidime, CIP= ciprofloxacin, AMS= Ampicillin+sulbactam, AMK= amikacin, NET= netilmicin, PIR= cefpirome, FEP= cefepime, PTA= piperacillin+tazobactam, IMP= imipenem, MER= meropenem, CFS= cefoperazone+sulbactam, RIF= rifampin, POL=polymyxin, TIG=tigecycline

2. การศึกษากลไกการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม carbapenem โดยการหา carbapenemase genes และ antibiotic resistance-related genes เช่น class 1 integron integrase gene และ Extended-spectrum beta-lactamase genes (ESBLs)

2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่สามารถทำลายยา carbapenem ได้ โดยการหา meropenem hydrolysis ด้วยวิธี UV spectrophotometry

ผลการทดสอบการสร้าง carbapenem hydrolyzing enzyme(s) พบว่าเชื้อ 27 ตัว จาก 30 ตัว สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำลาย meropenem ได้

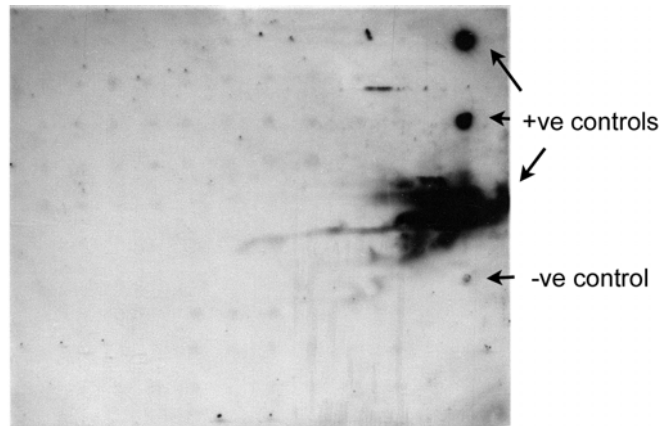
2.2 การทดสอบการสร้าง metallo-beta-lactamase โดยการใช้ 2-mercaptopropionic acid (2-MP) inhibitor ร่วมกับ ceftazidime disk (double disk diffusion technique)

การทดสอบการสร้าง metallo-beta-lactamase ที่ได้ทำกับเชื้อจำนวน 100 สายพันธุ์ ผลปรากฏว่าเชื้อที่ติดต่อกับ ceftazidime ทุกสายพันธุ์ไม่พบการมี synergistic inhibition ระหว่าง ceftazidime disk และ 2-MP

สำหรับกรณีที่เชื้อบางสายพันธุ์ที่ไวต่อยา ceftazidime จะมี inhibition zone รอบ ceftazidime disk การแปลผลอาจมีโอกาสดีพลาดได้เนื่องจาก inhibition zone ที่เห็น จะคล้ายกับการมี synergistic inhibition ได้ ทำให้อาจแปลผลเป็น positive ได้ (=false positive) ทำให้ต้องตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น เช่น การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้าง metallo-beta-lactamase โดยวิธี Southern blot hybridization

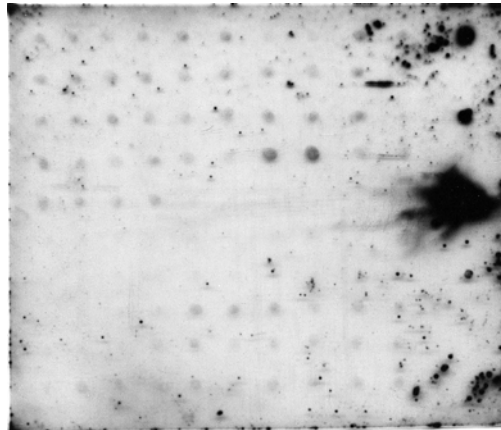
2.3 การทดสอบการสร้าง metallo-beta-lactamase โดยวิธี Southern blot hybridization

ได้มีการทำ Southern blot hybridization โดยการใช้ carbapenemase gene ของ bla_{IMP} family มาทำเป็น probe แล้วทำ colony dot-blot hybridization ผลปรากฏว่าไม่พบ positive signal ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. แสดง Dot-blot hybridization โดยใช้ *bla_{IMP}* gene เป็น probe (over-exposure time of 24 hrs)

ได้มีการ strip probe และ reuse dot-blot จากนั้น hybridize อีกครั้งโดยใช้ *bla_{VIM}* gene เป็น probe (ไม่ได้ใช้ true positive control) พบว่าไม่มี hybridized signal เช่นกัน ถึงแม้จะ exposed X-ray film นานถึง 72 hrs. ดังรูปที่ 2

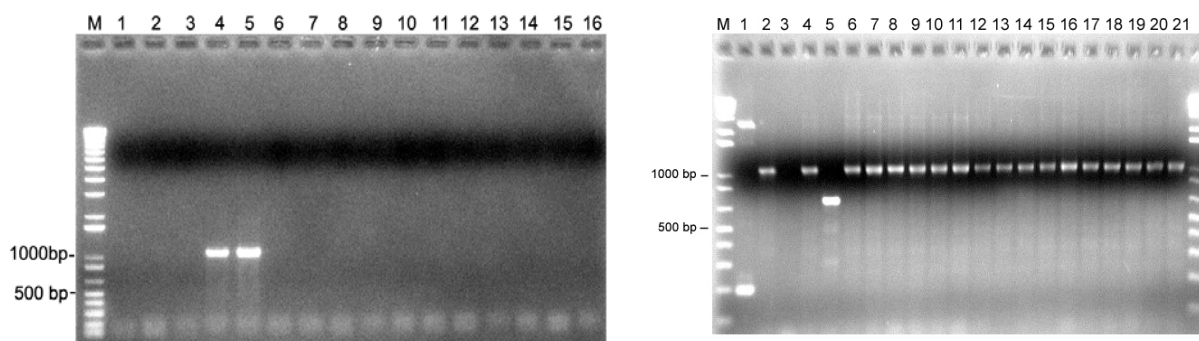


รูปที่ 2. แสดง การทำ Dot-blot hybridization โดยใช้ *bla_{VIM}* gene เป็น probe (exposure time = 72 hrs)

โดยสรุปของการทำ Dot-blot hybridization ไม่พบการมี metallo-beta-lactamase gene ใน family *bla_{IMP}* หรือ *bla_{VIM}* จากเชื้อ 100 สายพันธุ์ที่ได้ทำการทดสอบ

2.4 การทดสอบหายีนที่ควบคุมการสร้าง carbapenemase ที่อยู่ใน *bla_{OXA}* gene family

มีรายงานจากต่างประเทศว่าพบเชื้อ *A. baumannii* ที่สามารถสร้าง beta-lactamase ที่ encode มาจาก *bla_{OXA}* gene family ได้แก่ *bla_{OXA-23}* ถึง *bla_{OXA-27}* จึงได้ทำการทดสอบภาวะการมี gene ใน *bla_{OXA}* family โดยวิธี PCR พบว่าเชื้อ 35 สายพันธุ์จาก 45 สายพันธุ์ (77.8%) มียีน *bla_{OXA-23}* gene ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3. แสดงผล positive PCR amplification ของ *bla*_{OXA-23} gene

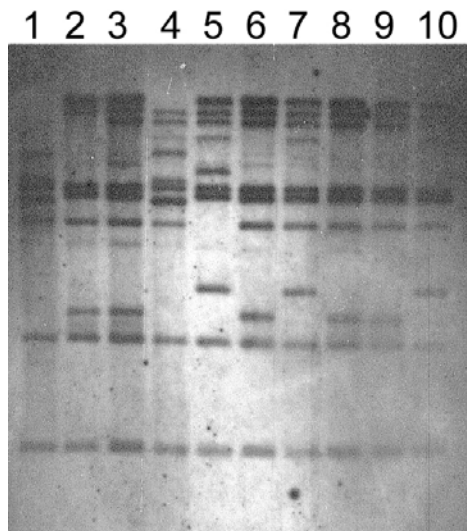
นอกเหนือจากผล positive ของ *bla*_{OXA-23} gene แล้ว เชื้อบางสายพันธุ์ยังให้ผลบวกในการทำ PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับ *bla*_{OXA-10} gene ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ integron element ที่พบได้บ่อยในเชื้อกลุ่ม gram-negative bacilli ซึ่งเชื้อกลุ่มดังกล่าวจะพบมี *bla*_{VEB-1} gene อยู่ด้วย *bla*_{VEB-1} เป็น ESBL gene ที่จัดได้ว่าเป็น genetic marker ที่พบได้ใน nosocomial pathogens ของประเทศไทย [6-9] จากการประมวลข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ามีภาวะที่เรียกได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้เป็น endemic strains

3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาแบบต่าง ๆ

3.1 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาแบบ Ribotyping

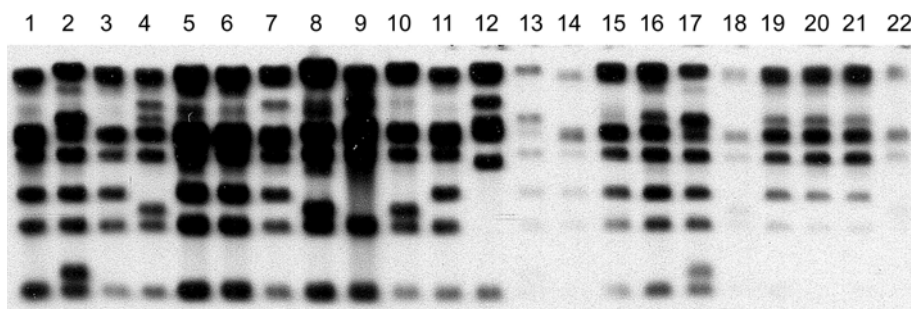
3.1.1 การใช้เทคนิค Ribotyping แบบที่ 1 (preliminary testing)

การทำ Ribotyping โดยใช้ 16S ribosomal RNA gene: รูปที่ 4 แสดงการใช้ *EcoRI*-digested chromosomal DNA มาทำ Southern blot hybridization ด้วย 16S gene probe ที่เตรียมจาก universal primers (การทำ preliminary ครั้งนี้ใช้ DNA จาก *Leptospira sp.* มาเป็น template) ผลที่ได้แสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้ 16S rRNA gene ร่วมกับการใช้ *EcoRI* enzyme มาใช้ในการทำ ribotyping ของ *A. baumannii* strains



รูปที่ 4. แสดงผลการทดสอบความใกล้เคียงของสายพันธุ์โดยการทำ ribotyping ของ *A. baumannii* จำนวน 10 สายพันธุ์ที่แยกได้จากหอภิบาล รพ.ศิริราช

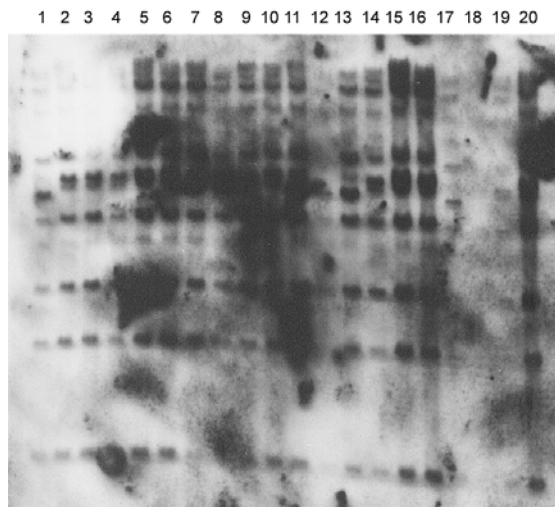
3.1.2 การทำ Ribotyping โดยการใช้ agarose gel ขนาดเล็ก: รูปที่ 5 แสดงการใช้ 16S rRNA gene (ใช้ DNA ของ *A. baumannii* เป็น template ในการสร้าง probe) ผลที่ได้พบว่า agarose ขนาดเล็กใช้แยก digested bands ได้ไม่ดีนัก อาจทำให้เกิดความยากลำบากในการแยก type ของเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันมากๆ



รูปที่ 5. แสดงการทำ ribotyping ของ *A. baumannii* จำนวน 22 สายพันธุ์ที่แยกได้จาก รพ.ศิริราช โดยใช้ minigel

3.1.3 ribotyping โดยใช้ DNA template จาก *A. baumannii* หลังจากที่ได้ทำ ribotyping โดยใช้ DNA template จาก *A. baumannii* ปรากฏว่าทางบริษัท Amersham Pharmacia ได้ยกเลิกการผลิตชุด GenelImage kit ที่ใช้ fluorescein-conjugated dUTP ในการสร้าง probe โดยไม่สามารถสนับสนุนการทดลองให้ดำเนินต่อไปโดยใช้ชุด kit เดิมจนจบงานวิจัยได้ ทำให้กลุ่มผู้วิจัยต้องหาชุด kit อื่นจากทาง

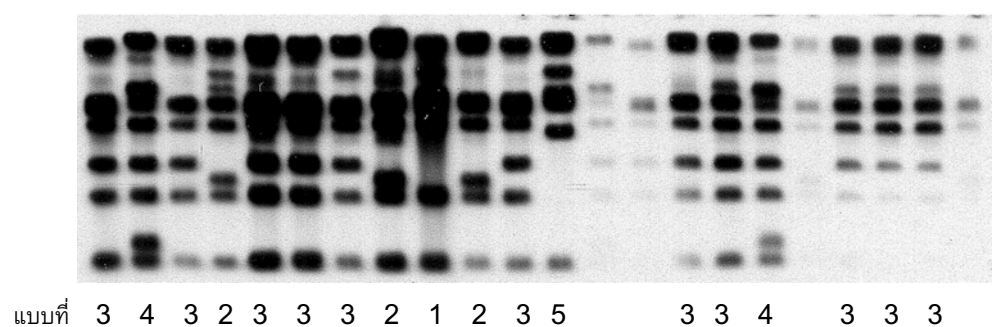
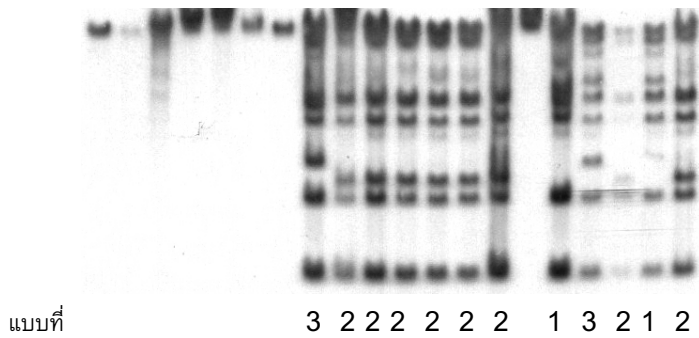
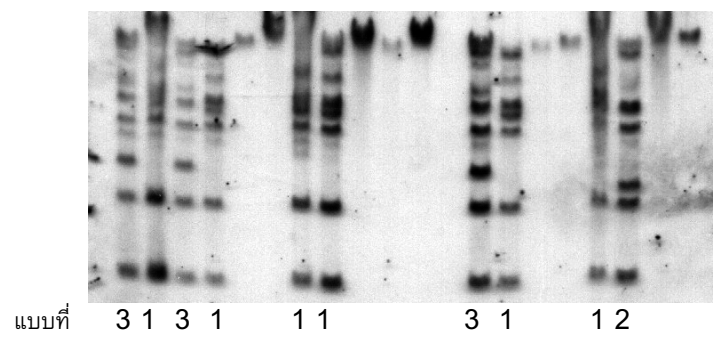
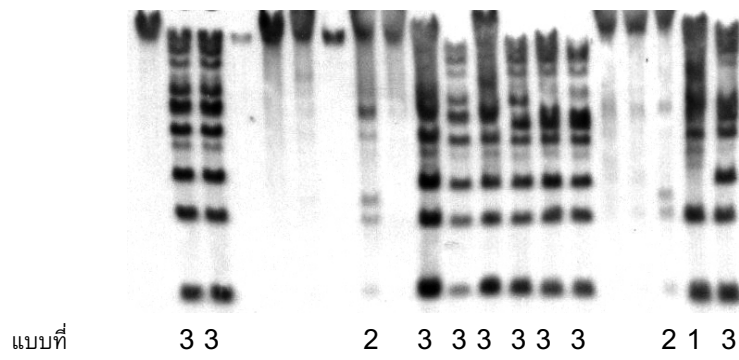
บริษัทมาทดลองใช้ ได้แก่ชุด Direct alkaline phosphatase labeling kit พบว่าไม่สามารถทดแทนกันได้ จึงต้องเปลี่ยนบริษัทและใช้ชุด digoxigenin labeling kit จากบริษัท Roche แทน รูปที่ 6 แสดงผลการทำ Ribotyping โดยใช้ชุด labeling kit ใหม่ ซึ่งได้ผลไม่ค่อยเป็นที่น่าสนใจ



รูปที่ 6. แสดง Ribotyping pattern โดยการใช้ digoxigenin kit สายพันธุ์ที่ใช้จำนวน 20 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์จากโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค

อย่างไรก็ตาม ผลการทำ Ribotyping ของเชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบน่าจะมีความเหมือนหรือใกล้เคียงกันมากเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยพ.ศิริราช

ได้ทำ ribotyping เพิ่มเติมอีกหลายครั้งกับเชื้อที่เหลืออยู่ แต่เกิดปัญหา restriction endonuclease enzyme ของหลายบริษัทมีคุณภาพไม่ค่อยดี ทำให้การตัดสาย DNA ไม่ดีเท่าที่ควร มีความพยายามในการทำซ้ำ เปลี่ยนสารเคมีต่างบริษัท และ condition ต่างๆ และข้อจำกัดด้านงบประมาณ ทำให้ผลการทดสอบออกมาไม่ครบ 100 สายพันธุ์ตามที่ได้ตั้งเป้าเอาไว้ ผลการทดสอบดังกล่าวแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7. แสดงผลการตรวจ ribotyping ของเชื้อ *A. baumannii*