จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาอินทริกรอนส์ใน *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii*

โดย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์

สิงหาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติเงินทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2552 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านอณูชีววิทยา รวมทั้งผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาอินทริกรอนส์ใน *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii*

ชื่อผู้วิจัย รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ สิงหาคม 2553

บทคัดย่อ

ศึกษา class 1 integrons ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (*n*=101) และ *Acinetobacter baumannii* (*n*=176) ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล พบว่า เชื้อทุกตัวดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน เชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 96 isolates (95%) ให้ผลบวกต่อยีน *intI1* โดยในเชื้อเหล่านี้เชื้อจำนวน 70 isolates (73%) มี gene cassette จัดรูปแบบ integron profile ได้ 12 รูปแบบ ซึ่งที่พบมากที่สุดคือ *aadB-cmlA-aadA1* และมีเชื้อเพียง 1 isolate ที่สามารถถ่ายทอด class 1 integrons แบบขวางได้ ส่วน *A. baumannii* จำนวน 69 isolates (39%) ที่พบว่ามียีน *intI1* โดยเชื้อจำนวน 42 isolates (61%) มี gene cassette จัดรูปแบบ integron profile ได้ 8 รูปแบบ ซึ่งที่พบมากที่สุดคือ *dfrA1-orfC* เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 6 isolates ที่มี class 1 integrons บน conjugative plasmid ไม่พบ class 2 และ 3 integrons ในเชื้อตัวใดเลย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title	Characterization of integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*
Name of Investigators	Rungtip Chuanchuen
	Chanwit Tripuddharat
Year	August 2010

Abstract

Class 1 integrons were characterized in *Pseudomonas aeruginosa* (*n=101*) and *Acinetobacter baumannii* (*n=176*) isolated from patients in hospitals. All the bacterial isolates were multidrug resistant. Ninety-six isolates (95%) of *P. aeruginosa* were positive to the *intl1* gene. Among these isolates, seventy isolates (73%) carried gene cassettes. Integron profiles were defined into 12 patterns of which the most common one was *aadB-cmlA-aadA1*. Only one isolate could horizontally transfer its class 1 intgerons. Sixty-nine isolates (39%) of *A. baumannii* harbored the *intl1* gene. Forty-two isolates (61%) were found to carry gene cassettes. They were arranged into 8 integron profiles of which the most commonly identified was *dfrA1-orfC*. Six *A. baumannii* contained class 1 integrons on cojugative plasmid. None of the strains tested carried class 2 or 3 integrons.

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
รายการสัญลักษณ์	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีการวิจัย	7
ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อ	8
ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ	8
ระยะที่ 3 ศึกษาการปรากฏของ class 1, 2 และ 3 integrons	9
ระยะที่ 4 ศึกษา resistance gene cassettes ใน variable regions	10
ระยะที่ 5 ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons	11
ผลการวิจัย	13
ความชุกของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยา	13
class 1 integrons	17
ความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons	23
วิจารณ์ผลของการวิจัย	24
ข้อสรุปผลการวิจัย	26
ประโยชน์ในการนำไปใช้	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	31
Outputs ที่ได้จากผลงานวิจัยครั้งนี้	33

รายการตารางประกอบ

หน้าที่

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย 9

ตารางที่ 2 Primers และ conditions ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 10

ตารางที่ 3 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก transconjugants 12

ตารางที่ 4 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Pseudomonas aeruginosa* (*n*=101) 14

ตารางที่ 5 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (*n*=176) 16

ตารางที่ 6 Integron profiles (IPs) ของ class 1 Integrons gene cassettes ที่พบใน *P. aeruginosa* 18

ตารางที่ 7 Integron profiles (IPs) ของ class 1 Integrons gene cassettes ที่พบใน *A. baumannii* 21

ตารางที่ 8 class 1 integrons ใน *Acinetobacter* ที่สามารถถ่ายทอดแบบขวางไปยัง *E.coli* 23

รายการภาพประกอบ

		หน้าที่
รูปที่ 1	โครงสร้างของ A. class 1, B. 2 และ C. 3 Integrons	2
รูปที่ 2	อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *P. aeruginosa* แยกได้จากผู้ป่วย (*n* =101)	13
รูปที่ 3	อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *A. baumannii* แยกได้จากผู้ป่วย (*n* =176)	15
รูปที่ 4	Integron profiles of class 1 integrons in *P.aeruginosa*	20
รูปที่ 5	Integron profiles of class 1 integrons in *A. baumannii*	22

รายการสัญลักษณ์

A.	*Acinetobacter*
A_{540nm}	absorbance at 540 nm
A_{600nm}	absorbance at 600 nm
AMK	amikacin
AMP	ampicillin
ATM	azetronam
bla	β-lactamase encoding gene
bp	base pair(s)
CAR	carbenicillin
^{o}C	degree(s) Celcius
CFP	ceftaxidime
CHP	chloramphenicol
CIP	ciprofloxacin
cm	centimeter(s)
Da	Dalton(s)
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate(s)
E.	*Escherichia*
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EPI	efflux pump inhibitors
ERY	Erythromycin
GEN	gentamicin
h	hour(s)
kb	kilobase(s) or 1000 bp
kDa	kilodalton(s)
KAN	kanamycin
KEM	kanamycin
l	liter(s)
LB	Luria-Bertani medium
LBAp100	Luria-Bertani medium containing 100 µg/ml ampicillin
Mb	megabasepairs

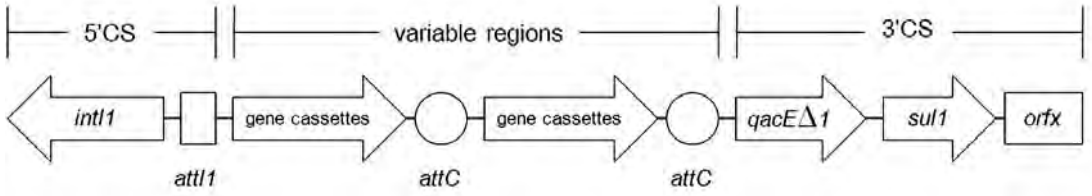
M	molar
mM	millimolar
MDR	multidrug resistance
mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
ml	milliliter(s)
NEO	neomycin
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s);
P.	*Pseudomonas*
PCR	polymerase chain reaction
PIP	piperacillin
^{r}	resistance/resistant
RT	room temperature
^{s}	sensitive/susceptible
sec	seconds
SPC	spectinomycin
STR	streptomycin
TET	tetracycline
TRI	trimethroprim
u	unit(s)
μl	microliter
μM	micromolar
μg	microgram(s)
v/v	volume by volume
WT	wild-type

บทนำ

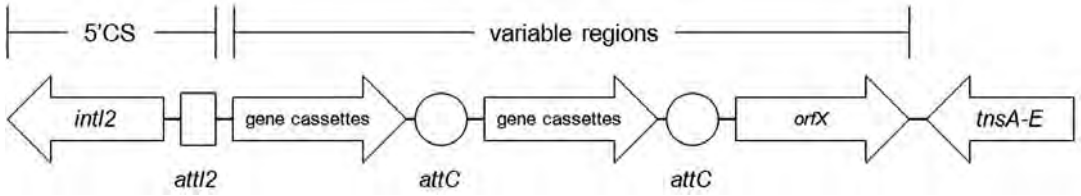
P. aeruginosa และ *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุสำคัญและพบบ่อยที่สุดของการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล (nosocomial infections) และผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ โรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาว ผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตรียรอยด์เป็นเวลานาน ผู้ที่มีแผลไฟไหม้ หรือแผลผ่าตัด เป็นต้น การติดเชื้อมีทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง รวมถึงการติดเชื้อในกระแสโลหิต แต่โดยส่วนใหญ่ มักเป็นแบบเรื้อรังและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดย *P. aeruginosa*และ *A. baumannii* มักดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multiple drug resistance, MDR) เพราะแบคทีเรียเหล่านี้ดื้อยาโดยพันธุกรรมอยู่แล้วและยังสามารถพัฒนาการดื้อยาขึ้นได้อีกในระหว่างการรักษา ดังนั้นจึงตอบสนองต่อยาแต่ละชนิดเพียงชั่วระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ส่งผลให้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า เพิ่มระยะเวลาในการรักษาและสูญเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น การรักษาอาจล้มเหลวและผู้ป่วยเสียชีวิตได้ในที่สุด ที่ผ่านมาพบว่า อัตราการดื้อต่อยาใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีแนวโน้มสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วยใน intensive care units (ICUs) ที่พบว่ามักดื้อต่อยาหลายกลุ่ม เช่น ceftazidime, imipenem, amikacin, gentamicin เป็นต้น (Tassios *et al.,* 1997)

integrons เป็นสารพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) พบมากที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบและเป็นแหล่งสะสมของยีนดื้อยาหลายชนิด (Hall and Stokes, 1993; Partridge, et al., 2009) โดยยีนดื้อยาชนิดต่างๆ สามารถบรรจุอยู่ในรูปของ gene cassettes ใน integrons (รูปที่ 1) ยีนดื้อยาเหล่านี้สามารถแลกเปลี่ยน เพิ่มจำนวน จัดเรียงตัวใหม่และเคลื่อนย้ายไปยัง integrons อื่นๆ ได้ (Vo, et al., 2006) ในปัจจุบันพบว่า มี integrons มากถึง 9 รูปแบบ แต่ที่พบมากที่สุดคือ class 1 integrons ส่วนรูปแบบอื่นๆ ที่เคยมีรายงานในแบคทีเรียแกรมลบคือ class 2 และ 3 integrons ที่สำคัญคือ สามารถพบ integrons ได้ทั้งบนโครโมโซมและ conjugative plasmid โดย integrons ที่อยู่บนโครโมโซมจะมีความคงตัวไม่สูญหายไป ดังนั้นแบคทีเรียจะยังคงดื้อยาแม้ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ ส่วน integrons ที่อยู่บน conjugative plasmid จะสามารถถ่ายทอดระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกันและต่างชนิดได้ (Hsu, et al., 2006) ในกรณีนี้ ทั้ง *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่มี integrons-carrying plasmid จึงเป็นแหล่งสำคัญของการแพร่กระจาย

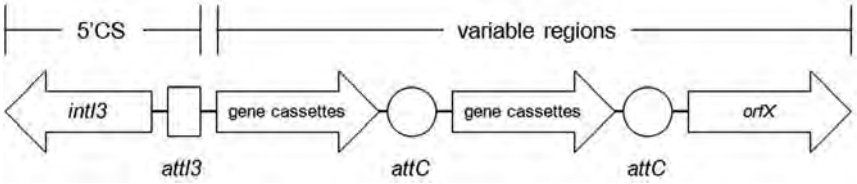
A.



B.



C.



รูปที่ 1 โครงสร้างของ A. class 1, B. 2 และ C. 3 Integrons โดยรวมประกอบด้วยยีน *IntI1, intI2* and *intI3* ตามลำดับ ควบคุมการผลิตโปรตีน integrase ทำหน้าที่ในการถ่ายทอดยีนดื้อยาใน gene cassette รับผิดชอบ *attI1, attI2* และ *attI3* เป็นตำแหน่งสำหรับ การเคลื่อนที่เข้ามาของ gene cassettes ส่วน variable regions ประกอบด้วย gene cassette ที่มีขนาดต่างกันขึ้นกับชนิดและจำนวนของยีนดื้อยาที่บรรจุอยู่ *qacE*Δ1 เป็นยีน multidrug efflux ที่ทำให้ดื้อต่อ quaternary ammonium compound และยาปฏิชีวนะได้ ยีน *sul*I ทำให้ดื้อต่อยา sulphonamides ทั้ง *orfX* และ *orf5* เป็น open reading frame ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ยีน *tnsA-E* เป็นตำแหน่งที่ให้เอนไซม์ tranposase มาจับเมื่อเกิด transposition (Fluit and Schmitz, 2004; Partridge, et al., 2009)

ยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ซึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจาย integrons คือ การใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็นขาดความระมัดระวังอย่างต่อเนื่องและการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวสามารถคัดเลือก *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่มี integrons และดื้อต่อยาหลายชนิดได้ (Fluit and Schmitz, 2004) ที่ผ่านมามีรายงานการระบาดของ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่มีclass 1 integrons พร้อมยีนดื้อยาในหลายโรงพยาบาลในต่างประเทศ เช่น จีน (Gu *et al*, 2007) กรีซ (Kraniotaki *et al*., 2006) สเปน (Sevillano *et al*, 2006) เกาหลี (Kim *et al*, 2006) ไต้หวัน (Liu *et al*, 2006) ส่งผลให้มีการวางมาตรการทำความสะอาดฆ่าเชื้อในโรงพยาบาลอย่างเข้มงวดและจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและศึกษาการดื้อยาของเชื้อ

เหล่านี้ในระดับโมเลกุล สำหรับประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการศึกษา integrons ใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ทั้งที่ในประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานานและในขณะเดียวกัน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* เป็นสาเหตุอันดับต้นๆ ของการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยและเชื้อที่แยกได้มักดื้อยาหลายชนิด

ดังนั้นในโครงการวิจัยครั้งนี้ จึงต้องการศึกษา integrons ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน โดยครอบคลุมถึง (i) รูปแบบการดื้อยา (ii) ความชุกของ class 1, 2 และ 3 integrons (iii) ยีนดื้อยาใน gene cassettes และ (iv) ความสามารถในการถ่ายทอด integrons ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจพันธุกรรมการดื้อยาของ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* มากขึ้นและทำให้ทราบถึงสถานการณ์จริงของการกระจายตัวของยีนดื้อยา การศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาจะชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ในการเป็นแหล่งแพร่กระจายยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ข้อมูลที่ได้ยังสามารถใช้วางแผนการควบคุมและป้องกันการติดเชื้ออย่างมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน รวมทั้งเป็นรากฐานสำคัญของการวิจัยต่อไป ได้แก่ ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้สมุนไพรเป็นสารในการยับยั้งการถ่ายทอด plasmid และ integrons เป็นต้น

วัตถุประสงค์โครงการ

คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า integrons เป็นกลไกสำคัญของการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล รวมทั้งเป็นแหล่งของการแพร่กระจายยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงจะทำการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาของ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* โดยมีวัตถุประสงค์ 3 ข้อคือ

1. เพื่อเก็บข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา
2. เพื่อศึกษาการปรากฏและลักษณะของ class 1, 2 และ 3 integrons
3. เพื่อทดสอบความสามารถในการถ่ายทอด integrons และยีนดื้อยา

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

P. aeruginosa และ *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุสำคัญและพบบ่อยที่สุดของการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล (nosocomial infections(ปัญหาสำคัญของการติดเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ การดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลในประเทศโปรตุเกสเป็นเชื้อที่ดื้อต่อ carbapenam เชื้อเหล่านี้ทุกตัวมียีน *bla*(IMP-5) อยู่ใน class 1 integrons และมี point mutation ในบริเวณ P1 promoter ทำให้ยีน *bla*(IMP-5) มีการแสดงออกในระดับสูง ได้ยืนยันผลการทดลองด้วย site-directed mutagenesis (Brizio, et al., 2006) เมื่อเร็วๆนี้ที่ประเทศเกาหลี พบว่า *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลดื้อยา amikacin และมี class 1 integrons เช่นกัน (Kim, et al., 2008) ที่ประเทศ South Africa มีรายงานว่า *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรค cystic fibrosis มี class 1 integrons ที่มียีน *aadB* ในอัตราที่สูงมาก (Syrmis, et al., 2008) ในขณะที่คณะผู้วิจัยอีกกลุ่มหนึ่งพบว่า *P. aeruginosa* มี class 1 integrons ที่มียีน GES-5 และ GES-5 like extended-spectrum beta lactamases ซึ่งถือเป็นเชื้ออุบัติใหม่ของประเทศ (Labuschagne Cde, et al., 2008)

ที่ประเทศจีนมีรายงานว่า *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลดื้อยา imipenem มียีน *bla*(VIM) และ class 1 integrons ในอัตราสูงถึง 81.5% และ 45.3% ตามลำดับ เชื้อบางตัวมีทั้ง *bla*(VIM) และ class 1 integrons ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกในประเทศจีน (Cheng, et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ประเทศสเปน (Sevillano, et al., 2006)

ในประเทศกรีซได้เกิดการระบาดของ *A. baumannii* ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในห้อง ICUs ณ โรงพยาบาลแห่งหนึ่งเป็นเวลานานกว่า 3 เดือน ซึ่ง *A. baumannii* ที่แยกได้ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน จากการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 31 รายพบว่าเชื้อเหล่านี้มี class 1 integrons ที่มี variable regions มากถึง 5 รูปแบบ แสดงถึงความจำเป็นในการทำความสะอาดฆ่าเชื้อภายในโรงพยาบาลอย่างเข้มงวด รวมทั้งต้องมีระบบตรวจสอบสุขภิบาลอนามัยของโรงพยาบาลอย่างต่อเนื่อง (Kraniotaki, et al., 2006)

ที่เมือง Nanjing ประเทศจีนยังพบว่า *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมี class 1 integrons มากถึง 40.8% และ 52.8% ตามลำดับ ซึ่ง class 1 integrons เหล่านี้มี gene cassette arrays ที่แตกต่างกันและไม่เคยมีรายงานมาก่อน (Gu, et al., 2007) เมื่อไม่นานมานี้ ที่ประเทศออสเตรเลีย มีรายงานการถ่ายทอดแบบขวางของยีนดื้อยาใน และ *A. baumannii* ที่ดื้อยา carbapenam ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในห้อง ICUs ของโรงพยาบาลแห่งหนึ่ง พบว่าเชื้อเหล่านี้มี the ISAba1-blaOXA-23 structure และ class 1 integrons ที่สามารถถ่ายทอดได้ โดยสรุปว่า resistant determinants เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาในห้อง ICUs (Valenzuela, et al., 2007)

ก่อนหน้านี้ Agodi และคณะ (2006) ได้ศึกษาระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *A. baumannii* ในห้อง ICUs ของโรงพยาบาล Sicilian ประเทศอิตาลี พบว่ามีผู้ป่วยใหม่ที่ติดเชื้อนี้ 3 รายต่อ 100 ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา 100

ราย โดยเชื้อเหล่านี้มี class 1 integrons อย่างมีนัยสำคัญและมีบทบาทในการแพร่กระจายการดื้อยา (Agodi, et al., 2006)

จากการศึกษาในประเทศไต้หวันพบว่า *A. baumannii* ที่ดื้อยา imipenem ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลประจำท้องถิ่น พบว่า เชื้อเหล่านี้มี class 1 integrons ซึ่งไม่มียีน *bla*(IMP), *bla*(VIM) และ *bla*(CFI) แสดงว่า การดื้อยาเกิดขึ้นจากยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับ metallo-beta-lactamases และยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน (Liu, et al., 2006)

นอกจาก class 1 inegtons แล้วยังมีรายงานการพบ class 2 integrons ใน *A. baumannii* ซึ่งมี *sat2-aadB-catB2*(deltaattC)-*dfrA1-sat2-aadA1-orfX* อยู่ใน Tn7::In2-8 ใน variable region ซึ่ง gene cassettes แทรกตัวอยู่ที่ downstream ของ *glm* gene (Ramirez, et al., 2005)

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 5 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อ

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ระยะที่ 3 ศึกษาการปรากฏของ class 1, 2 และ 3 integrons

ระยะที่ 4 ศึกษา resistance gene cassettes ใน variable regions

ระยะที่ 5 ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อ

ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษาใน *P. aeruginosa* จำนวน 101 isolates และ *A. baumannii* จำนวน 176 isolates ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลศิริราช โดยเป็นเชื้อที่แยกได้ในช่วงปี พ.ศ. 2544–2547 และอยู่ใน stock collection ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เก็บรักษาเชื้อทั้งหมดใน 20% glycerol ที่ -80°C

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) หรือ Microdilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Muller Hinton Broth (MHB) โดยเจือจางแบบ two-foldตามวิธีมาตรฐานของ Clnical Laboratory Standard Institute (CLSI) ยาปฏิชีวนะที่ทดสอบจำนวน 15 ชนิด คือ carbenicillin, piperacillin, ceftaxidime, aztreonam, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, spectinomycin, ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ trimethroprim เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29212

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (µg/ml)	Breakpoint* (µg/ml)
1. carbenicillin (CAR)	8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	512
2. piperacillin (PIP)	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512	128
3. ceftaxidime (CEF)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
4. aztreonam (ATM)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
5. amikacin (AMK)	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512	64
6. gentamicin (GEN)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16
7. kanamycin (KAN)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16
8. neomycin (NEO)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16
9. streptomycin (STR)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
10. spectinomycin (SPC)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
11. ciprofloxacin (CIP)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	4
12. tetracycline (TET)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16
13. erythromycin (ERY)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	8
14. chloramphenicol (CHP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512	32
15. trimethroprim (TRI)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	4

* ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา

ระยะที่ 3 ศึกษาพันธุกรรมของการดื้อยา

3.1 ตรวจการปรากฏของยีน *intI1* ยีน *ins* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers int1F และ int1R และ conditions ตามที่แสดงในตารางที่ 2 ปฏิกิริยามีปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 5 µl of total DNA, 10 pmoles of each primer และ 12.5 µl 2.5 X PCR master mix eppendrof®MasterMix (Eppendrof, Hamburg, Germany) ตรวจสอบความจำเพาะของ primers ที่ใช้ด้วยการสกัด PCR products ด้วยชุดทดสอบ QIAQuick gel extraction kit (Qiagen) และส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ Macrogen (Seoul, South Korea)

3.2 เฉพาะเชื้อที่มียีน *intI1* ยืนยันด้วยการตรวจหา 3'-conserved regions ด้วย PCR โดยใช้ primers 2 คู่ คือ qacEF กับ sul1R และ qacEΔ1R กับ sul1R

3.3 ตรวจการปรากฏของยีน *intI2* และ *intI3* ในเชื้อทุกตัว ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer pairs Int2F/Int2R และ Int3F/Int3R สำหรับตรวจหายีน กับ Int2R สำหรับตรวจหายีน *intI2* และ *intI3* ตามลำดับ

ตารางที่ 2 Primers และ conditions ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	References
IntI1	Int1F	CCT GCA CGG TTC GAA TG	497	Chuanchuen et al., 2007
	Int1R	TCG TTT GTT CGC CCA GC		
IntI2	Int2F	GGCAGACAGTTGCAAGACAA	247	Chuanchuen and Padungtod,
	Int2R	AAGCGATTTTCTGCGTGTTT		2009
IntI3	Int3F	CCGGTTCAGTCTTTCCTCAA	155	Chuanchuen and Padungtod,
	Int3R	GAGGCGTGTACTTGCCTCAT		2009
Variable region	5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	variable	Levesque et al., 2007
	3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA		
qacEΔ1	qacEF	TAA GCC GTA CAC AAA TTG GGA GAT AT	363	Chuanchuen et al., 2007
	qacEΔ1R	GCC TCC GCA GCG ACT TCC ACG		
sul1	sul1F	CGG ACG CGA GGC CTG TAT C	591	Chuanchuen et al., 2007
	sul1R	GGG TGC GGA CGT AGT CAG G		
qacEΔ1-sul1	qacEF	TAA GCC GTA CAC AAA TTG GGA GAT AT	1,198	Chuanchuen et al., 2007
	sul1R	GGG TGC GGA CGT AGT CAG G		

ระยะที่ 4 ศึกษา resistance gene cassettes ใน variable regions

เฉพาะเชื้อที่มียีน *intI1* นำมาตรวจหาการปรากฏของ resistance genes ใน variable regions ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ 5'CS และ 3'CS ศึกษายีนใน variable regions ด้วยการหาลำดับเบส (DNA sequencing) สกัด PCR products และส่งไปตรวจหาลำดับเบส ตรวจความถูกต้องของลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสFfp เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) สำหรับ PCR products ที่มีขนาดเดียวกันจะศึกษาด้วย Restriction endonuclease analysis โดยใช้เอนไซม์ *Alu*I, *BamH*I, *Bgl*II, *EcoR*I, *EcoR*V, *Nco*I และ *Xba*I ตรวจสอบ restriction pattern โดยการแยกบน 1.5-2% agarose gel PCR products ที่มีรูปแบบ digestion patterns เหมือนกันจัดเป็น Resistance genes ชนิดเดียวกัน จากนั้นจัดกลุ่ม class 1 integrons ตามขนาดและจำนวนของ amplicons และชนิดของยีนที่พบ

ระยะที่ 5 ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons

ทำการศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดของยีนดื้อยาที่พบ โดยทดสอบการอยู่บน plasmid ของ integrons ด้วยเทคนิค biparenteral mating ตามวิธีของ Sunde และ Sorum 2001 โดยตัวรับ (recipient) ที่ใช้ คือ MG1655rif^{r2} (MIC ต่อ rifampicin 256 µg/ml) ส่วนตัวให้ (donor) คือเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumanni* ที่มี resistance gene cassette บน class 1 integrons

เพาะเลี้ยงตัวให้และตัวรับในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวปริมาณ 4ml ใน shaking incubator อุณหภูมิ °37C นาน 24ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วย LB ในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงเชื้อต่อใน shaking incubator ที่ °37C นาน 4ชั่วโมง จนถึง Mid-log phase ผสมตัวให้และตัวรับในอัตราส่วน 1:1 (700:700 µl) ใน eppendorf tube ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 1นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และนำมาละลายใน LB ที่อุณหภูมิ °37C ปริมาตร 30-50 µl ไปเปต suspension ลงบนแผ่น nitrocellulose filter ที่มีขนาด pore size 0.45 µm และวางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเชื้อทั้งหมดที่อยู่บนแผ่น filter ในสารละลาย normal saline และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 1นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และนำตะกอนเซลล์มาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวปริมาตร 100 µl นำ suspension มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่ผสมยา rifampicin ความเข้มข้น 100 µg/ml สำหรับการคัดเลือกเชื้อ *P. aeruginosa* และ 40 µg/ml สำหรับการคัดเลือกเชื้อ *A. baumanni* และยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังตารางที่ 3 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ดื้อต่อยา rifampicin และยาปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการยืนยันเชื้อ transconjugant *E.coli* ที่ได้ด้วยการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillian Green Agar (BGA) และ Eosin Methylene Blue (EMB) agar ตรวจหาการปรากฏของ plasmid และการปรากฏ class 1 integrons จาก transconjugants ด้วยเทคนิค PCR

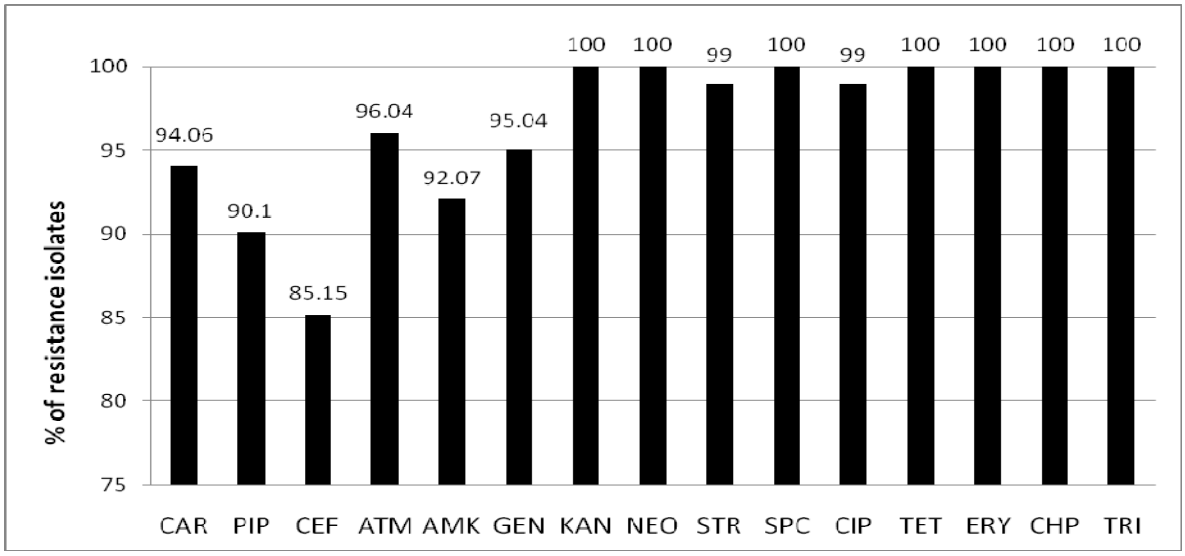
ตารางที่ 3 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก transconjugants

เชื้อตัวให้ (donor)	ยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือก (ความเข้มข้น)	Gene cassette
P. aeruginosa	Streptomycin (80 μg/ml)	*aadA6*
		aadA6-orfD
		bla$_{PSE-1}$*-aadA2*
		aadB-bla$_{OXA-10}$*-aadA1*
		aadB-arr-2-cmlA-bla$_{OXA-10}$*-aac(3")-Ia*
		aadB-cmlA-aadA1
		aadB-cmlA-bla$_{OXA-10}$*-aadA15*
	Gentamycin (100 μg/ml)	*aacA4*
		aacA7-cmlA
		bla$_{IMP-14}$*-aac(6')*
	Trimethoprim (10 μg/ml)	*dfrA1-orfC*
		bla$_{IMP-15}$*-dhfr-aac(6')*
A.baumanii	Streptomycin (80 μg/ml)	*dfrA12-orf-aadA2*
		aac(6')I1-aadA1
		aacC1-orfX-orfY-aadA1
		aacC1-orfX-orfX-orfY-aacA1
		aac(6')I1-aadA1-IS26-tnpA-IS26-aadA1
		aacA4-catB8-aadA1
	Trimethoprim ((10 μg/ml)	*dfrA1-orfC*
		dfrA12-orf-aadA2

ผลการวิจัย

ความชุกของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยา

P. aeruginosa จำนวน 101 isolates พบว่าเชื้อทุกตัวมีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance, MDR) โดยเชื้อทุกตัวดื้อต่อ kanamycin, neomycin, spectinomycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ trimethoprim (รูปที่ 2) จัดรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 14 รูปแบบ) ตารางที่ 4 โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ CAR, PIP,CEF, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (78.8%) แสดงดังตารางที่ 4



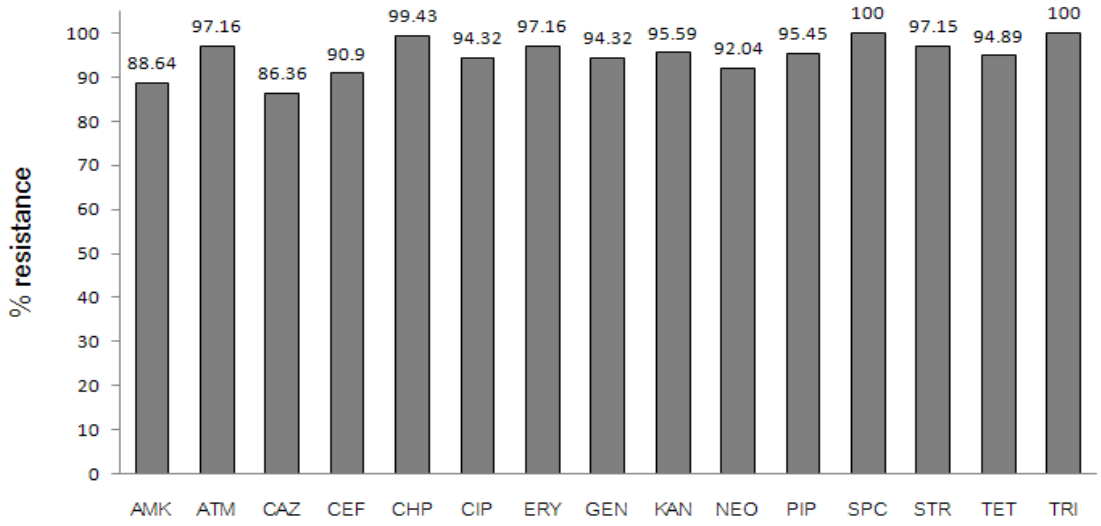
รูปที่ 2 อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *P. aeruginosa* แยกได้จากผู้ป่วย (*n* =101) ATM, aztreonam; AMK, amikacin; CAR, carbenicillin; PIP, piperacillin; CEF, ceftaxidime; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin: NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline; ERY, erythromycin; CHP, chloramphenicol; TRI, trimethroprim

ตารางที่ 4 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Pseudomonas aeruginosa* (*n*=101)

Antibiotic resistance pattern	No. of isolates (%)
KAN, NEO, STR, SPC,TET, ERY, CHP,TRI	1 (1)
ATM, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
AMK, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	2(2)
CEF, ATM, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
CAR, PIP, ATM, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
CAR, CEF, ATM, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
CAR, PIP, ATM, AMK, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
CAR, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
CAR, PIP,CEF, ATM, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	2(2)
CAR, CEF, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	2(2)
CAR, PIP,CEF, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	1(1)
CAR, PIP, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	7 (7.1)
CAR, PIP,CEF, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI	78 (78.8)

CAR, carbenicillin; PIP, piperacillin; CEF, ceftaxidime; ATM, aztreonam; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin: NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline; ERY, erythromycin; CHP, chloramphenicol; TRI, trimethroprim

ส่วน *A. baumannii* ทั้งหมด 176 isolates พบว่าทุกเชื้อมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน อัตราการดื้อยา amikacin, aztreonam, carbenicillin, ceftaxidime, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, neomycin, piperacillin, streptomycin และ tetracycline คือ 88.64%, 97.16%, 86.36%, 90.90%, 99.43%, 94.32%, 97.16%, 94.32%, 95.59%, 92.04%, 95.45%, 97.15% และ 94.89% ตามลำดับ และมีอัตราการดื้อยา spectinomycin และ trimethroprim เท่ากับ 100% (รูปที่ 3) จัดรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 30 รูปแบบ (ตารางที่ 5) โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ AMK- ATM-CAR-Ce-CHP-CIP-ERY-GEN-KAN-NEO-PIP-SPC-STR-TET-TRI (81.2%)



รูปที่ 3 อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *A. baumannii* แยกได้จากผู้ป่วย (*n* =176) ATM, aztreonam; AMK, amikacin; CAR, carbenicillin; PIP, piperacillin; CEF, ceftaxidime; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin: NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline; ERY, erythromycin; CHP, chloramphenicol; TRI, trimethroprim

ตารางที่ 5 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (*n*=176)

Antibiotic resistance	No. of isolates (%)
ATM, CEF, CHP, SPC, TET, TRI	1 (0.57)
ATM, CHP, ERY, SPC, STR, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CHP, KAN, SPC, STR, TRI	1 (0.57)
ATM, CEF, CHP, ERY, SPC, STR, TRI	1 (0.57)
ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, KAN, SPC, TRI	1 (0.57)
ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, SPC, STR, TRI	1 (0.57)
ATM, CHP, ERY, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CHP, CIP, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TRI	1 (0.57)
ATM, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
CEF, CHP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TRI	1 (0.57)
ATM, CEF, CHP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	3 (1.7)
CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TRI	1 (0.57)
AMK, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CAR, CEF, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	3 (1.7)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.57)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	143 (81.2)

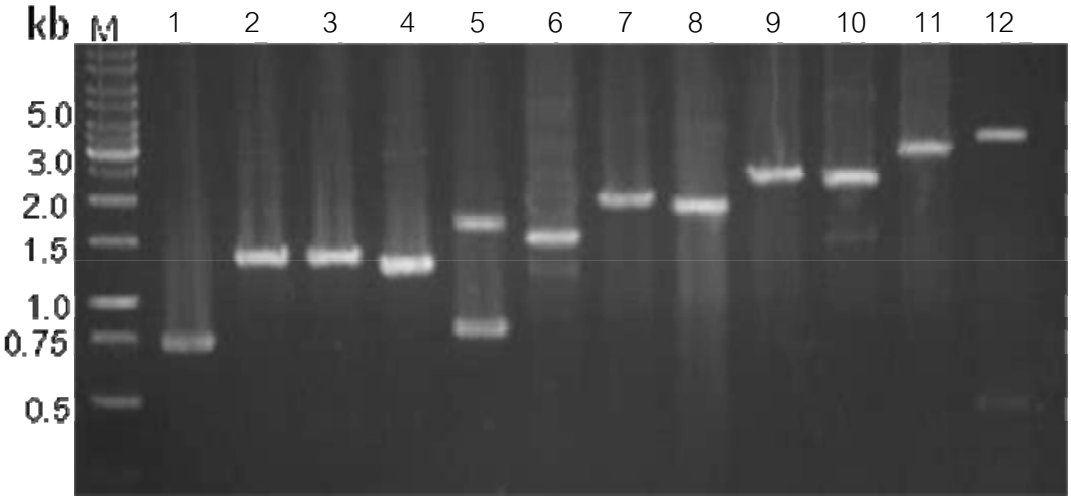
Class 1 integrons

ใน *P. aeruginosa* พบยีน *intI1* ในเชื้อจำนวน 96 isolates (95.04%) แต่ไม่พบยีน *intI2* และ *intI3* ซึ่งเมื่อนำเชื้อที่พบยีน *intI1* มาตรวจหาส่วน 3'CS พบยีน *qacEΔ1* ต่อกับ *sul1* (*qacEΔ1-sul1* fusion gene) จำนวน 84isolates ส่วนยีน *qacEΔ1* หรือยีน *sul1* พบในเชื้อจำนวน 8และ 1isolates ตามลำดับ พบเชื้อที่มี gene cassettes ใน variable region ทั้งหมด 70isolates โดย gene cassette array ที่พบมากที่สุดคือ *aadB-cmlA-aadA1* และจัด integron profiles (IPs) ได้ 12 รูปแบบ (ตารางที่ 6) โดยใช้ขนาดของ variable regions และจำนวนของ integrons ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR (รูปที่ 4)

ตารางที่ 6 Integron profiles (IPs) ของ class 1 Integrons gene cassettes ที่พบใน *P. aeruginosa*

IP	Size of amplicons (kb)	Inserted gene cassettes	No. of isolates (%)	Antibiotic resistance pattern
I	0.8	*aacA4*	3 (4.3)	CEF , ATM, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
				CAR, PIP, CEF , ATM, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
				CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI
II	1.3	*aadA6*	4(5.7)	CAR, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
				CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (3)
III	1.3	*aadA6-orfD*	2(2.9)	CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (2)
IV	1.3	*dfrA1-orfC*	1(1.4)	CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
V	0.8, 1.8	*aacA4,*	2(2.9)	CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (2)
		aacA7-cmlA		
VI	1.8	bla_{IMP-14}*-aac(6')*	1(1.4)	CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
VII	2.0	bla_{PSE-1}*-aadA2*	7(10)	CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (7)
VIII	2.0	bla_{IMP-15}*-dhfr-aac(6')*	1(1.4)	CAR, CEF , ATM, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
IX	2.5	*aadB-*bla_{OXA-10}*-aadA1*	7(10)	CAR, PIP, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (5)
				CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (2)
X	2.5	*aadB-arr-2-cmlA-*bla_{OXA-10}*-aac(3")-Ia*	1(1.4)	CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
XI	3.0	*aadB-cmlA-aadA1*	36(51.4)	AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (1)
				CAR, PIP, ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (2)
				CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (33)
XII	3.5	*aadB-cmlA-*bla_{OXA-10}*-aadA15*	5(7.1)	CAR, PIP, CEF , ATM, AMK, GEN, KAN, NEO, STR, SPC, CIP, TET, ERY, CHP,TRI (5)

aacA4 และ *aac(6')* ควบคุมการดื้อต่อยา amikacin, kanamycin และ tobramycin *aacA7* และ *aac(3")-Ia* ควบคุมการดื้อต่อยา gentamicin ยีน *aadA1, aadA2* และ *aadA6* ควบคุมการดื้อต่อยา streptomycin และ spectinomicin, *aadB* ควบคุมการดื้อต่อยา gentamicin, kanamicin และ tobramicin, *blaPSE-1* ควบคุมการดื้อต่อยากลุ่ม β-lactams, *blaOXA-10* ควบคุมการดื้อต่อยา oxacillin, *blaIMP-14* ควบคุมการดื้อต่อยา imipenem และ meropenem, *cmlA* ควบคุมการดื้อต่อยา chloramphenicol *dhfr* และ *dfrA1* ควบคุมการดื้อต่อยา trimethoprim



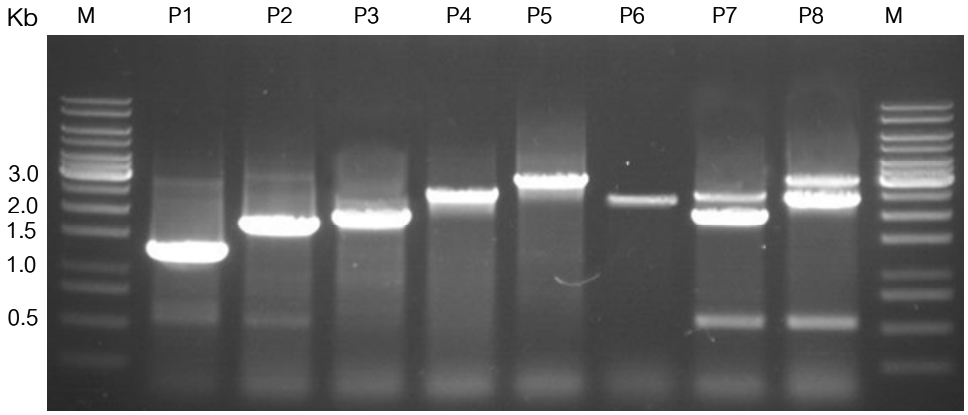
รูปที่ 4 Integron profiles of class 1 integrons in *P.aeruginosa*
M, molecular weight marker; lane 1-12, IPI-XII, respectively

สำหรับ *A. baumannii* พบยีน *intI1* ในเชื้อจำนวน 69 isolates (39.20%) แต่ไม่พบยีน *intI2* และ *intI3* จากเชื้อที่พบยีน *intI1* พบว่า เชื้อจำนวน 24 isolates (34.78%) มี class 1 integrons แต่ไม่มี variable regions โดยเชื้อจำนวน 34 isolates (49.27%) มี variable regions จัด integron profiles (IPs) ตามขนาดและจำนวนของ variable regions ได้ทั้งหมด 8 รูปแบบ(ตารางที่ 7 และรูปที่ 5)

ตารางที่ 7 Integron profiles (IPs) ของ class 1 Integrons gene cassettes ที่พบใน *A. baumannii*

IP	Size(s) of amplicons (kb)	Inserted gene cassettes	No. of isolates (%)	Antibiotic resistance pattern
I	1.2	*dfrA1-orfC*	12 (28.6)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (10)
				AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI (2)
II	1.6	*aac(6')I1-aadA1*	6 (14.3)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (6)
III	1.9	*dfrA12-orfF-aadA2*	1 (2.4)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (1)
IV	2.5	*aacC1-orfX-orfY-aadA1a*	8 (19)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (1)
V	3.0	*aacC1-orfX-orfY-aadA1a*	6 (14.3)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (6)
VI	2.3	*aac(6')I1-aadA1-IS26-tnpA-IS26-aadA1*	1 (2.4)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (1)
VII	1.9,	*dfrA12-orfF-aadA2,*	5 (11.9)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (5)
	2.5	*aacC1-orfX-orfY-aadA1a*		
VIII	2.2,	*aaCA4-catB8-aadA1,*	2 (4.8)	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI (2)
	3.0	*aacC1-orfX-orfY-aadA1a*		

dfrA1 และ *dfrA12* ควบคุมการดื้อยา trimethroprim, *aac(6')I1* และ *aacA4* ควบคุมการดื้อยา amikacin, kanamycin และ tobramycin, *aacC1* ควบคุมการดื้อยา gentamicin, *aadA1* และ *aadA2* ควบคุมการดื้อยา spectinomycin และ streptomycin, *catB8* ควบคุมการดื้อยา chloramphenicol



รูปที่ 5 Integron profiles of class 1 integrons in *A. baumannii*
M, molecular weight marker; lane 1-6, IPI-VI, respectively

ความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons

ก่อนทำการทดลอง ทำการสกัด plasmid เพื่อยืนยันว่า *P. aeruginosa* จำนวน 70 isolates และ *A. baumannii* ทั้ง 42 isolates ที่มี resistance gene cassette ใน class 1 integrons มี plasmid และ *E. coli* MG1655rif^{r2} ไม่มี plasmid

ใน *P. aeruginosa* จากจำนวนเชื้อที่พบ resistance gene cassette ใน class 1 integrons ทั้งหมด 70 isolates เมื่อทำการทดสอบการถ่ายทอดพบว่า class 1 integrons สามารถถ่ายทอดไปยัง *E. coli* MG1655rif^{r3} ได้เพียงแค่ 1 isolate โดยเป็นการถ่ายทอดที่ได้ใช้ยา streptomycin ในการคัดเลือก transconjugant ที่ได้มี class 1 integrons และ gene cassette เหมือน *P. aeruginosa* ตัวให้ โดยจัดอยู่ใน IP ที่ XI *aadB-cmlA-aadA1* ซึ่งมี resistance pattern คือ CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, SPC, STR, TET, TRI

สำหรับ *A. baumannii* ในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ *A. baumannii* จำนวน 42isolates ที่มี class 1 integrons เป็นตัวให้ หลังจากการทำ conjugation แล้วพบว่า *A. baumannii* ให้ transconjugants ที่เป็น *E.coli* ที่ดื้อต่อ rifampicin และ streptomycin เมื่อทำการสกัด plasmid พบว่า transconjugants ทุกตัวมี plasmid และ พบการปรากฏของ class 1 integrons ใน transconjugants 6 ตัว ได้แก่

ตารางที่ 8 class 1 integrons ใน *Acinetobacter* ที่สามารถถ่ายทอดแบบขวางไปยัง *E.coli*

Strain ID	Class 1 integrons	Resistance pattern
AB001	*aacC1-orfX-orfY-aadA1*	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI
AB005	*aacC1-orfX-orfY-aadA1*	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI
AB009	*aacC1-orfX-orfY-aadA1*	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI
AB028	*aacC1-orfX-orfY-aadA1; aaCA4-catB8-aadA1*	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI
AB050	*aacC1-orfX-orfY-aadA1; dfrA12-orf-aadA2*	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI
AB123	*aacC1-orfX-orfY-aadA1*	AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI

.

วิจารณ์ผลของการวิจัย

ผลการวิจัยพบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance, MDR) โดยมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบแต่ละชนิดสูงกว่า 85% ซึ่งยังพบว่ามีการแพร่กระจายของ class 1 integrons ใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล

Resistance gene cassette array ที่พบมากที่สุดใน variable regions ของ class 1 integrons ใน *P. aeruginosa* คือ *aadB-cmlA-aadA1* (36/70, 51.4%) โดย gene cassettes ที่พบมากที่สุดคือ ยีนในกลุ่ม *aad* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides โดยยีนที่พบมากที่สุดคือ ยีน *aadB* (41/70, 58.6%) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside adenyltransferase ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยา gentamycin, kanamycin และ tobramycin ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศอิหร่าน (Shahcheraghi, et al., 2010) โดยในการวิจัยที่ประเทศอิหร่านนี้พบ *aadA6-orfD* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้เช่นกันและยังสอดคล้องกับผลการวิจัยอื่นๆ ก่อนหน้านี้ด้วย (Gu, et al., 2007; Shahcheraghi, et al., 2010) (Naas, et al., 2006) โดยบางส่วนของ gene cassette array ที่พบในการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ bla_{PSE-1}-*aadA2* เคยมีรายงานใน SGI1-O ที่พบใน *P.mirabilis* ที่แยกได้จากอาหาร ทั้ง bla_{IMP-14}-*aac(6')* และ bla_{IMP-15}-*dhfr-aac(6')* พบใน GenBank โดยมีรหัส AY553332 และ AY553333 ตามลำดับ แต่ยังไม่มีการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ โดย *aacA7-cmlA* , *aadB-*bla_{OXA-10}-*aadA1*, *aadB-arr-2-cmlA-*bla_{OXA-10}*-aac(3")-Ia, aadB-cmlA-aadA1* และ *aadB-cmlA-*bla_{OXA-10}*-aadA15* ยังไม่เคยมีรายงานใน *P. aeruginosa* มาก่อน Girlin และคณะ (2002) พบว่า *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยมี $bla_{VEM-like}$-*aadB-arr-2-cmlA-*bla_{OXA-10}*-aac(3")-Ia* (Girlich, et al., 2002) ซึ่งใกล้เคียงกับ *aadB-arr-2-cmlA-*bla_{OXA-10}*-aac(3")-Ia* ที่พบในการวิจัยครั้งนี้ แสดงว่ามี recombination event เกิดขึ้นระหว่าง gene cassette combination ใน class 1 integrons ของ *P. aeruginosa*

ส่วน Resistance gene cassette array ที่พบมากที่สุดใน *A. baumannii* คือ *dfrA12-orfC* (18/42, 42.9%)และ gene cassettes ที่พบมากที่สุดใน class 1 integrons ของ *A. baumannii* คือ ยีนในกลุ่ม *aadA1* (28/42, 66.7%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยใน *P. aeruginosa* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ การพบยีนที่ควบคุมการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในอัตราที่สูงในเชื้อทั้ง 2 ชนิด อาจมีสาเหตุมาจากมีการใช้ยากลุ่ม aminoglycosides ในการรักษาผู้ป่วยอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังพบยีน *aadA1* และ *aacA4* บน class 1 integrons ทั้งใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* รวมทั้ง *dfrA1-orfC* และ *dfrA12-orfC* เคยมีรายงานใน *Salmonella enterica* และ *E.coli* (Miko, et al., 2005; Sunde, 2005; Hsu, et al., 2006; Khan, et al., 2009) โดย *dfrA1-orfC* ยังพบใน *Proteus mirabilis* (Boyd, et al., 2008) ด้วยเช่นกัน แสดงให้เห็นว่ามีการแลกเปลี่ยนหรือถ่ายทอดยีนเหล่านี้ ระหว่างแบคทีเรีย อย่างน้อยที่สุดระหว่างเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii*

โดยส่วนใหญ่ gene cassette array ที่พบใน *A. baumannii* ในการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ เช่น *aacA4-catB8-aadA1* และ *dfrA12-orfF-aadA2* เคยพบใน *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศจีน (Gu, et al., 2007; Xu, et al., 2008) และไต้หวัน (Lee, et al., 2009) *aacC1-orfX-orfY-aadA1a* เคยมีรายงานใน *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศจีน (Xu, et al., 2008) *aac(6')I1-aadA1-IS26-tnpA-IS26-aadA1* เคยมีรายงานใน *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศเกาหลีใต้ (Han, et al., 2008)

การที่พบว่า gene cassette array เดียวกันในเชื้อต่างชนิดกัน จากสถานที่ต่างกันและประเทศต่างกัน แสดงให้เห็นว่า class 1 integrons และ มีการแลกเปลี่ยนของ gene cassettes เกิดขึ้น ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของการแพร่กระจายของ class 1 integrons และวิวัฒนาการ (evolution) ของ gene cassettes ซึ่งจากการศึกษาว่า class 1 integrons ที่มียีนดื้อยามีการถ่ายทอดแบบขวางไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้ แต่พบในอัตราค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า อาจเกิดจากข้อจำกัดของเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยแสดงยืนยันว่า class 1 integrons สามารถถ่ายทอดตามขวางได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายของเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ดื้อยาในโรงพยาบาล

อย่างไรก็ตามยีนดื้อยาที่พบใน class 1 integrons ไม่สามารถครอบคลุม resistance phenotype ของเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ได้ทั้งหมด รวมทั้งมีเชื้อที่มี class 1 integrons แต่ไม่มี variable regions ซึ่งเรียกว่า empty class 1 integrons ซึ่งดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันแสดงว่า ยังมียีนดื้อยาอื่นๆ ที่ไม่ได้อยู่บน class 1 integrons การดื้อยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับ class 1 integrons เหล่านี้อาจมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์บนโครโมโซมหรือการแสดงออกของระบบ multidrug efflux ก็ได้ ซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้ไม่พบการปรากฏของ class 2 และ 3 integrons ถึงแม้ว่าเคยมีรายงานการพบทั้ง class 2 และ 3 integrons ในแบคทีเรียแกรมลบใน the Enterobacteriaceae family (van Essen-Zandbergen, et al., 2007) แต่ยังไม่เคยมีรายงานใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* มาก่อน แสดงว่า class 2 และ 3 integrons ยังไม่มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายยีนดื้อยาในเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล

ข้อสรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินการไปตามแผนการที่วางไว้ทุกประการ จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า

1. มีการแพร่กระจายของ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล
2. มีการแพร่กระจายของ class 1 integrons ใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล
3. Class 1 inetgrons ที่พบใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* สามารถถ่ายทอดแบบขวางไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้
4. มีการถ่ายทอดและแลกเปลี่ยน resistance gene cassettes ของ class 1 integrons ที่พบในเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii*

ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยให้เป็นไปอย่างถูกต้องและสุขุมรอบคอบ รวมถึงการส่งเสริมให้บุคคากรที่เกี่ยวข้องมีความเข้าใจถึงปัญหาที่เกิดขึ้นและสนับสนุนให้มีการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ทราบปัญหาที่แท้จริงของการดื้อยาในเชื้อและสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้อย่างถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปศึกษาวิจัยต่อเนื่องเกี่ยวกับพันธุกรรมการดื้อยาในเชื้อก่อโรค งานวิจัยในอนาคตและที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. ศึกษาความสัมพันธ์ด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล (fingerprinting) ของ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสภาวะแวดล้อมในโรงพยาบาล
2. ศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆ ในแนวลึกต่อไป เพื่อเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีและความรู้ของประเทศร่วมทั้งได้ข้อมูลที่มีคุณค่าและสามารถใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น เช่น multidrug efflux systems เป็นต้น

ประโยชน์ในการนำไปใช้

ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึง class 1 integrons ในเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วยในโรงพยาบาล โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. นำข้อมูลการดื้อยาในระดับโมเลกุลมาใช้วางแผนและประกอบการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยาและเป็นแนวทางในการจัดการความเสี่ยง รวมถึงกำหนดนโยบายควบคุมการใช้ยาต้านจุลชีพในคนต่อไป

2. ข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้ออามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลระบาดวิทยาและการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศไทย

3. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยอื่นๆและการพัฒนาทางเลือกอื่นๆในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ ได้แก่

3.1 ศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆ ในเชื้อที่มี empty class 1 integrons

3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ที่แยกได้ซึ่งเป็นเชื้อจากผู้ป่วย รวมทั้งครอบคลุมเชื้อที่แยกได้จากส่วนต่างๆในโรงพยาบาล เพื่อหาต้นตอที่แท้จริงของเชื้อทั้ง 2 ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของ nosocomial infections

4. สามารถใช้ในการเผยแพร่ความรู้ให้กับผู้ที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งนักวิชาการ แพทย์เภสัชกรรวมถึงประชาชนทั่วไป เพื่อให้เห็นความสำคัญของการใช้ยาอย่างถูกต้องและรอบคอบ

5. ประกอบการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยาและเป็นแนวทางในการจัดการความเสี่ยง

เอกสารอ้างอิง

Agodi, A., Zarrilli, R., Barchitta, M., Anzaldi, A., Di Popolo, A., Mattaliano, A., Ghiraldi, E. and Travali, S. 2006. Alert surveillance of intensive care unit-acquired *Acinetobacter* infections in a Sicilian hospital. Clin. Microbiol. Infect. 12(3): 241-247.

Boyd, D.A., Shi, X., Hu, Q.H., Ng, L.K., Doublet, B., Cloeckaert, A. and Mulvey, M.R. 2008. *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), variant SGI1-I, and new variant SGI1-O in *Proteus mirabilis* clinical and food isolates from China. Antimicrob. Agents Chemother. 52(1): 340-344.

Brizio, A., Conceicao, T., Pimentel, M., Da Silva, G. and Duarte, A. 2006. High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Int. J. Antimicrob. Agents. 27(1): 27-31.

Cheng, X., Wang, P., Wang, Y., Zhang, H., Tao, C., Yang, W., Liu, M. and Jia, W. 2008. Identification and distribution of the clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-*beta*-lactamase and/or class 1 integron genes. J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. 28(3): 235-238.

Fluit, A.C. and Schmitz, F.J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 10(4): 272-288.

Girlich, D., Naas, T., Leelaporn, A., Poirel, L., Fennewald, M. and Nordmann, P. 2002. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-pectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. Clin. Infect. Dis. 34(5): 603-611.

Gu, B., Tong, M., Zhao, W., Liu, G., Ning, M., Pan, S. and Zhao, W. 2007. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J. Clin. Microbiol. 45(1): 241-243.

Hall, R.M. and Stokes, H.W. 1993. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. Genetica. 90(2-3): 115-132.

Han, H.L., Jang, S.J., Park, G., Kook, J.K., Shin, J.H., Shin, S.H., Kim, D.M., Cheon, J.S., Moon, D.S. and Park, Y.J. 2008. Identification of an atypical integron carrying an IS26-disrupted aadA1 gene cassette in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents. 32(2): 165-169.

Hsu, S.C., Chiu, T.H., Pang, J.C., Hsuan-Yuan, C.H., Chang, G.N. and Tsen, H.Y. 2006. Characterisation of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons among *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strains isolated from humans and swine in Taiwan. Int. J. Antimicrob. Agents. 27(5): 383-391.

Khan, A.A., Ponce, E., Nawaz, M.S., Cheng, C.M., Khan, J.A. and West, C.S. 2009. Identification and characterization of Class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from imported seafood. Appl. Environ. Microbiol. 75(4): 1192-1196.

Kim, J.Y., Park, Y.J., Kwon, H.J., Han, K., Kang, M.W. and Woo, G.J. 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. J. Antimicrob. Chemother. 62(3): 479-483.

Kraniotaki, E., Manganelli, R., Platsouka, E., Grossato, A., Paniara, O. and Palu, G. 2006. Molecular investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, with characterisation of class 1 integrons. Int. J. Antimicrob. Agents. 28(3): 193-199.

Labuschagne Cde, J., Weldhagen, G.F., Ehlers, M.M. and Dove, M.G. 2008. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. Int. J. Antimicrob. Agents. 31(6): 527-530.

Lee, Y.T., Huang, L.Y., Chen, T.L., Siu, L.K., Fung, C.P., Cho, W.L., Yu, K.W. and Liu, C.Y. 2009. Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons. J. Microbiol. Immunol. Infect. 42(3): 210-219.

Liu, S.Y., Lin, J.Y., Chu, C., Su, L.H., Lin, T.Y. and Chiu, C.H. 2006. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. Int. J. Antimicrob. Agents. 27(1): 81-84.

Miko, A., Pries, K., Schroeter, A. and Helmuth, R. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J. Antimicrob. Chemother. 56(6): 1025-1033.

Naas, T., Aubert, D., Lambert, T. and Nordmann, P. 2006. Complex genetic structures with repeated elements, a *sul*-type class 1 integron, and the *blaVEB* extended-spectrum *beta*-lactamase gene. Antimicrob. Agents Chemother. 50(5): 1745-1752.

Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E. and Iredell, J.R. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol. Rev. 33(4): 757-784.

Ramirez, M.S., Quiroga, C. and Centron, D. 2005. Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(12): 5179-5181.

Sevillano, E., Valderrey, C., Canduela, M.J., Umaran, A., Calvo, F. and Gallego, L. 2006. Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Pathol. Biol. (Paris). 54(8-9): 493-497.

Shahcheraghi, F., Badmasti, F. and Feizabadi, M.M. 2010. Molecular characterization of class 1 integrons in MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical settings in Iran, Tehran. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 58(3): 421-425.

Sunde, M. 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. J. Antimicrob. Chemother. 56(6): 1019-1024.

Syrmis, M., Bell, S., Bye, P., Coulter, C., Harbour, C., Iredell, J., Kidd, T., O'Carroll, M., Rose, B., Wainwright, C., Sloots, T. and Nissen, M. 2008. High prevalence of a class 1 integron-associated *aadB* gene cassette in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an Australian cystic fibrosis patient population. Pathology. 40(5): 524-525.

Valenzuela, J.K., Thomas, L., Partridge, S.R., van der Reijden, T., Dijkshoorn, L. and Iredell, J. 2007. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 45(2): 453-460.

van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K. and Mevius, D. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. J. Antimicrob. Chemother. 59(4): 746-750.

Vo, A.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Wannet, W.J., Verbruggen, A.J., Maas, H.M. and Gaastra, W. 2006. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. Int. J. Antimicrob. Agents. 28(3): 172-179.

Xu, X., Kong, F., Cheng, X., Yan, B., Du, X., Gai, J., Ai, H., Shi, L. and Iredell, J. 2008. Integron gene cassettes in *Acinetobacter* spp. strains from South China. Int. J. Antimicrob. Agents. 32(5): 441-445.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Muller Hinton Agar (MHA) (Difco™, MD, USA)

- Beef Extract Powder	2.0	g
- Acid Digest of Casien	17.5	g
- Starch	1.5	g
- Agar	17.0	g

2. Luria-Bertani Agar (LB) (Difco™, MD, USA)

- Trptone	10.0	g
- Yeast Extract	5.0	g
- Sodium chloride	5.0	g
- Agar	15.0	g

ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอื่น ๆ

1. 50X TAE (Tris-Acetate buffer) ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Tris	242.0	g
- Acetic acid	57.1	g
- 0.5M EDTA pH 8.0	100.0	ml

2. 0.5 M EDTA, pH 8.0 ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Disodium ethylene diamine tetraacetate. $2H_2O$	186.1	g
- Distilled deionized water	800.0	ml
- Adjust pH to 8.0		

3. 1 M Tris HCl, pH 8.0 ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Tris (ultrapure)	121.1	g
- Distilled deionized water	800.0	ml
- Adjust pH to 8.0 by adding conc. HCL	42.0 ml	

4. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

Antibiotics	Solvents	Concentrations range (µg/ml)
Carbenicillin	Water	8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048
Piperacillin	Water	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
Ceftaxidime	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Aztreonam	Saturated sodium bicarbonate	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Amikacin	Water	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
Gentamicin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Kanamycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Neomycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Streptomycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Spectinomycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Ciprofloxacin	0.1N NaOH	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Tetracycline	70% ethanol	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Erythromycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Chloramphenicol	95% ethanol	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
Trimethiprim	dimethylacetamide	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256

Outputs ที่ได้จากผลงานวิจัยครั้งนี้

Kanchana Poonsuk, Chanwit Tribuddharat and Rungtip Chuanchuen. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated human clinical cases. Southeast Asian Journal of Public Health and Tropical Medicine **(submitted on 27/1/2011)**