

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันต่อเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานและความสัมพันธ์กับกลไกการดื้อยา: แนวทางในการรักษาการติดเชื้อจากสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนาน

Activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and the association with resistance mechanisms: implication for treatment of infections caused by multidrug-resistant isolates

รายนามผู้วิจัย

อ. ดร. ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. วันทนา ปวีณกิตติพร

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผศ. ดร. มดุงศรี ดับส์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กุมภาพันธ์ 2560

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Acinetobacter baumannii* เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้และขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ผ่านทุนอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘

บทคัดย่อภาษาไทย

ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems เพิ่มมากขึ้นทั่วโลก จึงมีการใช้ยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกันในการรักษาโรคติดเชื้อนี้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานและศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันกับกลไกการดื้อยาของเชื้อ โดยทำการศึกษาในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 200 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในปี พ.ศ. 2553-2558 พบว่า อัตราการดื้อยา imipenem, meropenem, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime amikacin, gentamicin, ciprofloxacin และ colistin คือ 86.5%, 87.5%, 87.5%, 87%, 85.5%, 91%, 78%, 80.5%, 85.5% และ 1.5% ตามลำดับ colistin เป็นยาที่มีฤทธิ์สูงสุดต่อเชื้อ *A. baumannii* ผลศึกษากลไกการดื้อยาในตัวแทนเชื้อ *A. baumannii* พบว่า ยีน *bla*_{OXA-23}, *bla*_{VEB-1}, *aph3I* และ *ormA* พบมากที่สุดในการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems, cephalosporins และ aminoglycosides ตามลำดับ โดยเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems พบยีนที่สร้าง carbapenemase ชนิด OXA-23 เพียงชนิดเดียว (100%) การดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolones พบการกลายพันธุ์แบบ amino acid substitution ใน GyrA ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง Ser83Leu และ ParC พบที่ตำแหน่ง Ser80Leu or Ser80Tyr สำหรับการศึกษาระบบ antibiotic resistance island ของเชื้อ *A. baumannii* 5 สายพันธุ์ พบว่าเป็นชนิด AbaR4 ในเชื้อทุกสายพันธุ์ ซึ่งมียีนที่สร้าง carbapenemase ชนิด *bla*_{OXA-23} อยู่บน Tn2006 การศึกษาฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันของยาในกลุ่ม carbapenems ร่วมกับ amikacin หรือ colistin หรือ fosfomycin ต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งมียีนที่สร้าง carbapenemase ชนิด OXA-23 ด้วยวิธี checkerboard และ time-kill พบว่าการใช้ imipenem ร่วมกับ fosfomycin ให้ผลดีที่สุด

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Carbapenem-resistant *A. baumannii* has been increasingly reported worldwide. The combination of antimicrobial agents is commonly used to treat *A. baumannii* infections. The objective of this study was to investigate activities of antibiotic combination combination against multidrug-resistant *A.baumannii* isolates and the association with resistance mechanisms. A total of 200 *A. baumannii* isolated from patients during 2010-2015 were included in this study .The resistance rates to imipenem, meropenem, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and colistin were 86.5%, 87.5%, 87.5%, 87%, 85.5%, 91%, 78%, 80.5%, 85.5% และ 1.5%, respectively. Colistin is the most active antimicrobial agent. The *bla*_{OXA-23}, *bla*_{VEB-1}, *aph3I* and *armA* were the most common antimicrobial resistance determinants in representative *A. baumannii* isolates for carbapenem, cephalosporin and aminoglycoside resistance, respectively. Only *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene (100%) was detected in carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates. Fluoroquinolone-resistance was mainly caused by amino acid substitutions at S83L in GyrA and S80L or S80Y in ParC. Five isolates were investigated for antibiotic resistance island. All isolates carried AbaR4 with the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene in Tn2006. The *in vitro* activities of carbapenems in combination with amikacin, colistin or fosfomycin were determined in carbapenem-resistant *A.baumannii* isolates carrying *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene by checkerboard and time-kill methods. The results demonstrated that the most effective combination was imipenem with fosfomycin

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญรูป	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	8
ขอบเขตของโครงการวิจัย	10
ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	11
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	11
วิธีดำเนินการวิจัย	12
วัสดุและวิธีการ	13
ผลการศึกษา	20
อภิปราย/วิจารณ์	33
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป	35
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก : ประวัตินักวิจัยและคณะ	42

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 1	ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
ตารางที่ 2	Primer ที่ใช้ในการศึกษา antibiotic resistance island ในเชื้อ <i>A. baumannii</i>	14
ตารางที่ 3	Primer สำหรับการตรวจหา Carbapenemase genes	16
ตารางที่ 4	Primers สำหรับการตรวจหา ESBL และ <i>AmpC</i> genes	17
ตารางที่ 5	Primers สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i>	17
ตารางที่ 6	Primers สำหรับการตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside	18
ตารางที่ 7	ผลการทดสอบความไวรับยาของเชื้อ <i>A.baumannii</i> 200 สายพันธุ์	20
ตารางที่ 8	การตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases ในเชื้อ <i>A. baumannii</i>	22
ตารางที่ 9	ผลการตรวจหา aminoglycoside-modifying enzyme genes	23
ตารางที่ 10	ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>A. baumannii</i> ที่ดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ตามยีนดื้อยาที่พบ	24
ตารางที่ 11	ผลการตรวจหา ESBL และ <i>AmpC</i> genes และการตรวจหา mutation ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i>	25
ตารางที่ 12	ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ amikacin	27
ตารางที่ 13	ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem ร่วมกับ amikacin	27
ตารางที่ 14	ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ colistin	28
ตารางที่ 15	ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem ร่วมกับ colistin	28
ตารางที่ 16	ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ fosfomycin	30
ตารางที่ 17	ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem ร่วมกับ fosfomycin	31
ตารางที่ 18	ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem ร่วมกับ fosfomycin	32

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 Dendrogram ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> 20 สายพันธุ์ จาก Apal PFGE pattern	21
รูปที่ 2 โครงสร้างของ antibiotic resistance island	26
รูปที่ 3 Time kill curve ของยา imipenem ร่วมกับยา amikacin ต่อเชื้อ <i>A. baumannii</i> isolate 29	29
รูปที่ 4 Time kill curve ของยา meropenem ร่วมกับยา amikacin ต่อเชื้อ <i>A. baumannii</i> isolate 29	30
รูปที่ 5 Time kill curve ของยา imipenem ร่วมกับยา fosfomycin ต่อเชื้อ <i>A. baumannii</i> isolate 3	31
รูปที่ 6 Time kill curve ของยา imipenem ร่วมกับยา fosfomycin ต่อเชื้อ <i>A. baumannii</i> isolate 29	32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

bp	Base pair
cfu	Colony forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
°C	Degree Celsius
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESBLs	Extended-spectrum beta-lactamases
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
mg	milligram
MIC	Minimal inhibitory concentration
l	Liter
ml	Milliliter
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
s	Second
TBE	Tris-borate ethylenediamine tetraacetic acid
UV	ultraviolet
V	voltage

บทนำ

Acinetobacter baumannii เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่รุนแรง เช่น การติดเชื้อในกระแสโลหิต, ปอดอักเสบจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ, เยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น การติดเชื้อจะมีความรุนแรงมากในผู้ป่วยที่อ่อนแอหรือมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* มีข้อจำกัดมากขึ้น เนื่องจากเชื้อดื้อยาเกือบทุกชนิดและการผลิตยาต้านจุลชีพชนิดใหม่มีน้อยมาก โดยยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่ imipenem และ meropenem นิยมใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน ปัจจุบันพบว่ามียารายงานการพบเชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems เพิ่มสูงขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงการดื้อยาชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย จึงมีการใช้ยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกัน (antimicrobial combinations) ในการรักษา อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ของยาด้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานให้ผลไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุประการ เช่น ความหลากหลายของสายพันธุ์ ความแตกต่างของวิธีที่ใช้ในการศึกษาและความแตกต่างของกลไกการดื้อยาของเชื้อที่นำมาศึกษา ซึ่งกลไกการดื้อยาหลายขนานพบว่ามียีนดื้อยาทั้งที่อยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด มียารายงานการพบ *A. baumannii* resistance islands หรือ AbaRs อยู่บนโครโมโซมของเชื้อ ซึ่งมีถึง 26 ชนิด ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของ AbaRs ในเชื้อที่ดื้อยาหลายขนานที่แยกได้จากประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ของยาด้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกัน (antimicrobial combinations) โดยวิธีมาตรฐาน คือ Checkerboard assay และ Time kill assay กับกลไกการดื้อยาของเชื้อ รวมถึงศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อให้ทราบถึงฤทธิ์ของยาด้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ของยาด้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันกับกลไกการดื้อยาของเชื้อเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการเลือกยาด้านจุลชีพในการรักษา

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสั้น สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไปทั้งในดินและในน้ำเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลหรือ nosocomial infection เนื่องจากเชื้อสามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน โดยมักจะก่อโรคในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำหรือผู้ที่รับการรักษาในโรงพยาบาลและได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเป็นเวลานาน รวมถึงผู้ป่วยที่ต้องใช้อุปกรณ์ เช่น สายสวน โดยเชื้อสามารถก่อโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย (1) เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น โดยปกติเชื้อ *A. baumannii* จะดื้อยาในกลุ่ม aminopenicillins (เช่น ampicillin และ amoxycillin), กลุ่ม first และ second generation cephalosporins (เช่น cefazolin และ cefuroxime) และยา chloramphenicol (2)

ในปัจจุบันการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* มีข้อจำกัดมากเนื่องจากเชื้อดื้อยาหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม aminoglycosides (เช่น amikacin และ gentamicin), กลุ่ม third และ fourth generation cephalosporins (เช่น ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime และ cefipime), กลุ่ม fluoroquinolones (เช่น ciprofloxacin) รวมถึงกลุ่ม carbapenems (เช่น imipenem และ meropenem) โดยยาในกลุ่ม carbapenems นิยมใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน ปัจจุบันพบว่ามีรายงานการพบเชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems เพิ่มสูงขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงการดื้อต่อยาชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย ปัจจัยสำคัญในการที่เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยาในกลุ่ม นี้ได้แก่ การที่เชื้อสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ชนิดต่างๆ มาทำลายยา ความสามารถในการขับยาออกจากเซลล์ (efflux pump) และลดการนำยาผ่านเข้าภายในเซลล์แบคทีเรีย รวมถึงการเปลี่ยนแปลง penicillin-binding protein ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา ทำให้ยาไม่สามารถจับได้

การรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* นั้น ถ้าเชื้อเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา การรักษาอาจจะใช้ยาชนิดเดียว (monotherapy) ยาที่นิยมใช้ เช่น aminoglycosides, third และ fourth generation cephalosporins, carbapenems, beta-lactam ร่วมกับ beta-lactamase inhibitors, polymyxin และ tigecycline (3) ในปัจจุบันอัตราการดื้อยาเหล่านี้ของเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มสูงขึ้นมาก และมักจะเป็นการดื้อยาในหลายขนาน ดังนั้นการรักษาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานจึงนิยมใช้ยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกัน (combination therapy)(4) เพื่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดเชื้อ ยาที่นิยมใช้คือ carbapenems โดยใช้ร่วมกับยาในกลุ่มอื่น(4) เช่น aminoglycosides, polymyxins หรือ beta-lactam ผสมกับ beta-lactamase inhibitors การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์กันของยาด้านจุลชีพต่อเชื้อ *A. baumannii* พบว่ามีความหลากหลาย เช่นการใช้ยาในกลุ่ม carbapenems ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycosides พบว่ามีทั้งการเสริมฤทธิ์และไม่มี การเสริมฤทธิ์กันต่อเชื้อดื้อยา (5) เช่นเดียวกับการใช้ยาในกลุ่ม carbapenems ร่วมกับยาในกลุ่ม polymyxins ที่พบว่า มีทั้งที่มี (6-8) และไม่มี การเสริมฤทธิ์กัน (9) สำหรับการให้ยาในกลุ่ม carbapenems ร่วมกับยาในกลุ่ม beta-lactam หรือ beta-lactamase inhibitors ก็ให้ผลเสริมฤทธิ์ (8, 10) เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ของยาด้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานให้ผลไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุประการ เช่น ความหลากหลายของสายพันธุ์ ความแตกต่างของวิธีที่ใช้ในการศึกษาและความแตกต่างของกลไกการดื้อยาของเชื้อที่นำมาศึกษา ซึ่งกลไกการดื้อยาหลายขนานพบว่ามียีนดื้อยาทั้งที่อยู่บนโครโมโซม และพลาสมิด

Genomic islands คือกลุ่มของยีนขนาดใหญ่ประมาณ 10-200 kb ที่มีการเรียงตัวอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกันบนโครโมโซมของแบคทีเรีย ซึ่งยีนเหล่านี้เชื้อได้รับมาจากกระบวนการ horizontal gene transfer โดยกลุ่มยีนนี้มักจะมีประโยชน์ต่อเชื้อ(11) เช่น กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรค (pathogenicity islands) หรือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic islands) หรือกลุ่มยีนดื้อยา (antibiotic resistance islands) antibiotic resistance islands เป็นกลุ่มของยีนดื้อยาซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มยีนที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) เช่น integrons และ transposons ซึ่งมักมียีนดื้อยาอยู่ ทำให้ยีนดื้อยาสามารถเคลื่อนที่และส่งผ่านไปยังแบคทีเรียอื่นได้และเนื่องจากเชื้อสะสมยีนดื้อยาไว้ใน island ดังกล่าวจึงทำให้เชื้อดื้อยาหลายขนาน (multiple antibiotic-resistance traits) ตามลักษณะยีนดื้อยาที่มี (12) มีรายงานพบ antibiotic resistance islands ในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด

เช่น *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* และ *Salmonella* สำหรับเชื้อ *A. baumannii* มีรายงานการพบ antibiotic resistance island เรียกว่า *A. baumannii* resistance islands หรือ AbaRs โดย AbaRs จะแทรกตัวอยู่ใน ATPase gene (หรือเรียกว่า *comM* gene) ปัจจุบันมีรายงานพบ AbaRs 26 ชนิด คือ AbaR1-AbaR26 (13-23) โดย AbaR1(13) เป็น resistance island ที่พบครั้งแรกและมีขนาดใหญ่ที่สุด 86 kb ประกอบด้วยยีนดื้อยา 24 ยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยามากถึง 7 กลุ่ม สำหรับ AbaR ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ AbaR2 (14) ซึ่งมีขนาด 17 kb ประกอบด้วยยีนดื้อยา 4 ยีน ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพ 3 กลุ่ม

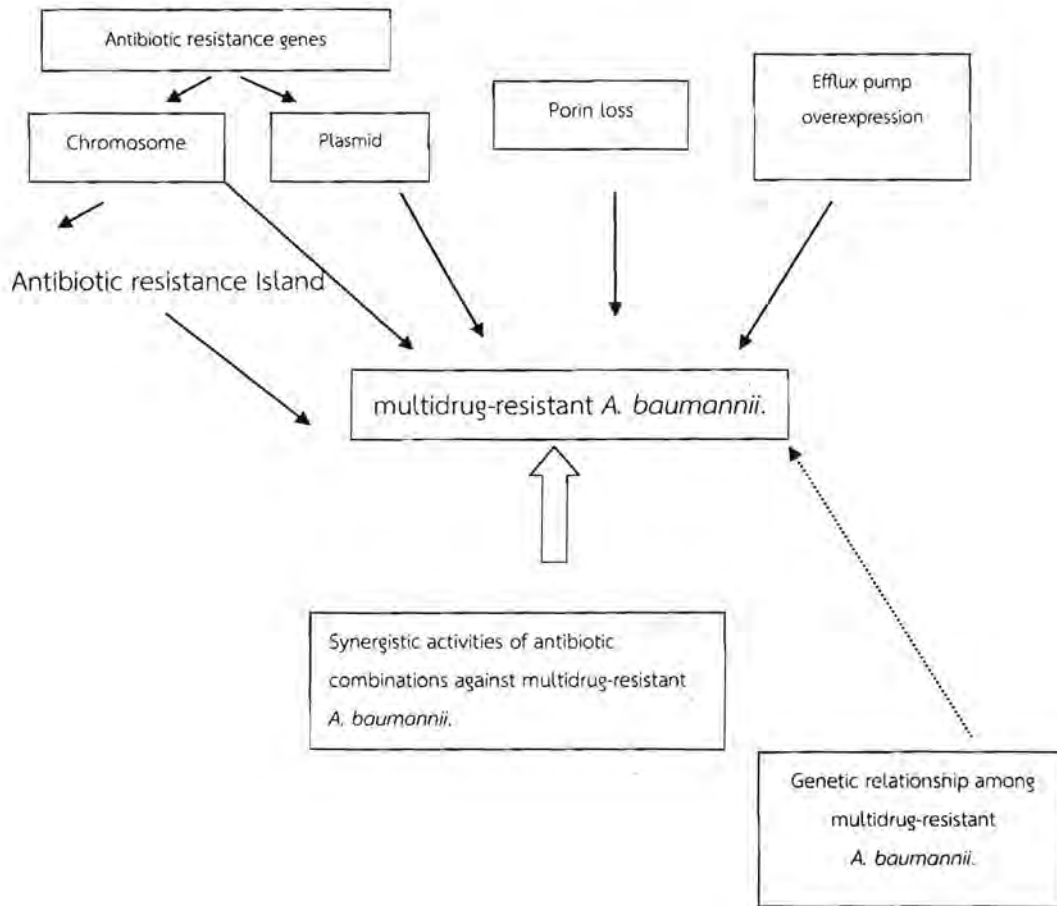
จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผลของการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพกลุ่มต่างๆต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา ให้ผลไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากสาเหตุประการ เช่น ความหลากหลายของสายพันธุ์ ความแตกต่างของกลไกการดื้อยาของเชื้อที่นำมาศึกษา หรือความแตกต่างของวิธีที่ใช้ในการศึกษาเนื่องจากมีหลายวิธีเช่น E-test เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว แต่ให้ผลแตกต่างจากวิธีที่เป็นมาตรฐาน (24) คือ Checkerboard assay และ Time kill assay ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานด้วยวิธี Checkerboard assay และ Time kill assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันกับกลไกการดื้อยาของเชื้อ รวมถึงศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนานต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้สามารถประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาโดยวิธีทางชีวโมเลกุลและเป็นแนวทางในการพัฒนายาเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อนี้ในอนาคต

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ประมาณ 200 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย โดยทุกสายพันธุ์จะนำมาทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพและศึกษากลไกการดื้อยา จากนั้นเลือกเชื้อที่ดื้อยาหลายขนานที่มีแบบแผนทางพันธุกรรมแตกต่างกัน มาศึกษาฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกัน (Antibiotic synergy) รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ร่วมกันกับกลไกการดื้อยา

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

Conceptual frameworks



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้แก่ กระทรวงสาธารณสุข สามารถนำข้อมูลไปเผยแพร่เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนานและเป็นแนวทางในการทบทวนการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วย สามารถนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติ และตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางการแพทย์ในระดับนานาชาติ

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

คณะผู้วิจัยจะนำเสนอผลงานในระดับชาติและนานาชาติและตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางการแพทย์ ในระดับชาติและนานาชาติ รวมถึงเผยแพร่ความรู้และถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้แก่ กระทรวงสาธารณสุข เป็นต้น

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ประมาณ 200 สายพันธุ์ ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย ในปี 2553-2558 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2. การทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ทดสอบความไวรับยาของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยากลุ่ม cephalosporins (ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime และ cefepime) ยากลุ่ม aminoglycoside (amikacin และ gentamicin) ยากลุ่ม carbapenems (imipenem และ meropenem) ยา กลุ่ม fluoroquinolones (ciprofloxacin) และยา colistin ด้วยวิธี Agar dilution อ่านค่า MIC ตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2016)

3. ศึกษา antibiotic resistance island

การศึกษา antibiotic resistance island ในเชื้อ *A. baumannii* ใช้การตรวจหายีนที่อยู่ใน island ด้วยวิธี PCR และศึกษาโครงสร้างของ island ซึ่งมีขนาด 17-84 kb ด้วยวิธี PCR mapping

4. ศึกษา antibiotic resistance determinants

ตรวจหายีนคือยา ได้แก่ carbapenemase genes (เช่น *bla_{OXA51}*, *bla_{OXA23}*, *bla_{OXA24}*, *bla_{OXA58}*, *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}*), ESBL (extended-spectrum beta-lactamases) และ AmpC genes, aminoglycoside-modifying enzyme genes และ 16S rRNA methylase genes ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* โดยใช้วิธี PCR และ DNA sequencing

5. ทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพหลายชนิดต่อเชื้อตัวอย่าง

Checkerboard assay

ทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพหลายชนิดต่อเชื้อ *A. baumannii* เบื้องต้นด้วยวิธี checkerboard assay โดยหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด (เช่น imipenem, meropenem, colistin, amikacin) ในภาวะที่มียาด้านจุลชีพเพียงชนิดเดียวและมียาด้านจุลชีพอื่นร่วมด้วย และคำนวณเป็นค่า FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index)

Time kill assay

ทดสอบยืนยันการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพหลายชนิดต่อเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี Time kill assay โดยเลี้ยงเชื้อใน Mueller-Hinton broth ที่มียาด้านจุลชีพชนิดเดียวและหลายชนิดและคำนวณหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่เวลา 0, 2, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

6. การศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ

ศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ ด้วยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)เตรียม *A. baumannii* DNA โดยนำเชื้อมาเตรียมเป็น agarose plug และทำการย่อยด้วย *Apa I* จากนั้นนำ DNA fragments ไปแยกโดย Pulsed-field gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose และ 0.5X Tris-borate-EDTA buffer และย้อมด้วย ethidium bromide อ่านผลภายใต้แสง UV จากนั้นนำ PFGE pattern มาวิเคราะห์

วัสดุและวิธีการ

1. Bacterial strains

ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* 200 สายพันธุ์ ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเชื้อ 1 สายพันธุ์แยกได้จากผู้ป่วย 1 ราย ซึ่งนำมาตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธีย้อมสีแกรม, ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังแสดงในตารางที่ 1 การตรวจโดยวิธีทางชีวโมเลกุลทำโดยตรวจหา *bla_{OXA-51}* ซึ่งเป็น intrinsic resistance gene ของเชื้อ *A. baumannii* จากการศึกษาพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มียีนนี้ เชื้อทั้งหมดเก็บไว้ที่ -80°C

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
การย้อมสีแกรม	Gram-negative coccobacilli
Triple Sugar Iron agar	Alkaline slant /neutral butt
Oxidase test	Negative
Motility	Non motile
OF glucose	Oxidation
Urease test	Negative
Growth at 42°C	Growth
Growth at 44°C	Growth
Nitrate Reduction	Negative

2. การทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ทดสอบความไวรับของเชื้อ *A.baumannii* ต่อยาในกลุ่ม cephalosporins (ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime และ cefepime) ยาในกลุ่ม aminoglycoside (amikacin และ gentamicin) ยาในกลุ่ม carbapenems (imipenem และ meropenem) ยา กลุ่ม fluoroquinolones (ciprofloxacin) และยา colistin ด้วยวิธี Agar dilution method เชื้อที่ใช้ทดสอบถูกปรับให้มีความขุ่น 0.5 McFarland ใน 0.85% NaCl และถูกเจือจางลง 10 เท่า ถ่ายเชื้อลงบน Mueller-Hinton agar โดยใช้ multi-inoculator ที่มียาต่างๆข้างต้น โดยยาได้ถูกเจือจางแบบ two-fold dilution ให้ได้ระดับความเข้มข้นของยาตั้งแต่ 0.016 ถึง 256 $\mu\text{g/ml}$ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ $35-37^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และอ่านค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentrations) ที่ความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และแปลผลตามมาตรฐานของ CLSI โดยเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมความถูกต้องของการทดสอบ เชื้อที่ติดต่อยา imipenem, meropenem, amikacin ,gentamicin, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, colistin จะมีค่า MIC $\geq 8, \geq 8, \geq 64, \geq 16, \geq 64, \geq 64, \geq 32, \geq 32, \geq 4, \geq 4$ ตามลำดับ

3. ศึกษา antibiotic resistance island

การศึกษา antibiotic resistance island ในเชื้อ *A. baumannii* ใช้การตรวจหายีนที่อยู่ใน island ด้วยวิธี PCR และศึกษาโครงสร้างของ island ซึ่งมีขนาด 17-84 kb ด้วยวิธี PCR mapping (25-26) ใช้ Primer ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Primer ที่ใช้ในการศึกษา antibiotic resistance island ในเชื้อ *A. baumannii* (25,26)

Region	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
Tn6020	RH601	GATGGAGCTGCACATGAACC	2114
	aphAI-F	AAACGTCTTGCTCGAGGC	
Tn6020	aphAI-R	CAAACCGTTATTCATTCGTGA	1212
	IS26F	ACCTTTGATGGTGGCGTAAG	
Tn6020-int1	aphAI-R	CAAACCGTTATTCATTCGTGA	2443
	int1-RV	GGGCATGGTGGCTGAAGG	
Tn6020-Tn5393	aphAI-F	AAACGTCTTGCTCGAGGC	2267
	RH520	CATGGCCCAGCGCGATACTTCAG	
comM	RH791	TGCTGCAATGAGCTGAAAGT	982
	RH913	GCCTCTCATTGAGGTTGAGG	
comM-AbaR	RH927	CAACCCTGTCTTTGCATTTG	846
	RH792	TTCGAGCTTGAAAACCTGCAC	
AbaR-comM	RH916	CCCAAATACTGCCATGTTGA	796
	RH928	GCCAGCAAGCTCAGCATAA	
uspA-Tn6018	RH793	CCCAAGAGAGCTGATTTTGC	1620
	RH767	CCTCCCGATGTTTGGATATG	
Tn6018-uspA	RH770	CGATGCCCTAGAGAGAGTGCGC	1615
	RH771	TGTA AAAATCTGGTGGTCGTAC	
Tn6018-L-MARR	RH770	CGATGCCCTAGAGAGAGTGCGC	1526
	RH901	GCGGCTCTATCCCTAGTTCC	
Tn6018-R-MARR	RH766	TCCTGCGTCAAAAATCTGCTGTG	1435
	RH767	CCTCCCGATGTTTGGATATG	
arsC	RH799	GCCACAAAGACACGCTAACT	984
	RH800	GATCGTAACCTCACGCTATGG	
uspA	RH919	TGTCAAAAATTATTGCATGT	632

Region	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>top</i>	RH793	CCCAAGAGAGCTGATTTTGC	1935
	RH903	GGGCAAGGTGAAGAAGATCA	
	RH904	GTCTGATAGCTGGCGTCACA	
Tn6018 (<i>cadA-tnpA</i>)	RH768	GAATCGCTGGTGATGATGGC	1630
	RH769	GGTCTGAGACTTCGTGAGCGC	
Tn6019 (left end)	RH791	TGCTGCAATGAGCTGAAAGT	3120
	RH909	GCGATTCAAATATCGGTCAA	
Tn6019 (left end)	RH910	GCGATAGTGAACGGATTGAGA	3607
	RH911	GCGATTCAAATATCGGTCAA	
Tn6019 (left end)	RH912	GGGGGAGAGTATGAATAGCACTT	3945
	RH800	GATCGTAACCTCACGCTATGG	
Tn6019 (left end)	RH799	GCCACAAAGACACGCTAACT	4350
	RH767	CCTCCCGATGTTTGGATATG	
Tn6019 (right end)	RH772	GCAGCCATAGGAATGACTTTTA	3949
	RH913	GCCTCTCATTGAGGTTGAGG	

4. ศึกษา antibiotic resistance determinants

ตรวจหายีนดื้อยาโดยวิธี PCR และ DNA sequencing เช่น carbapenemase genes (เช่น *bla_{Oxa51}*, *bla_{Oxa23}*, *bla_{Oxa24}*, *bla_{Oxa58}*, *bla_{IMP}* และ *bla_{VIM}*) , ESBLs และ AmpC genes, aminoglycoside-modifying enzyme genes และ 16S rRNA methylase genes ได้แก่ *aphA6*, *aadA1*, *aadB*, *aacC1*, *aacC2*, *aph3I*, *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *aac6'lb*, *aph3VI*, และ *aac6'lh* และตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* Primer ที่ใช้ในการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3-6

ตารางที่ 3 Primer สำหรับการตรวจหา Carbapenemase genes (27-35)

Gene	Primer	Primer sequence (5'- 3')	Product size (bp)
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501
	OXA23-R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT	
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	249
	OXA24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353
	OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599
	OXA58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	188
	IMP-R	CCAAACYACTASGTTATC	
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	GATGGTGTTTGGTCG CATA	390
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3'	798
	KPC-R	5'-CTTGTCACTCCTTGTTAGGCG-3'	
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
	OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	
<i>bla</i> _{OXA-143}	OXA143-F	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149
	OXA143-R	TAATCTTGAGGGGGCCAACC	
<i>bla</i> _{OXA-235}	OXA235-F	TTGTTGCCTTTACTTAGTTGC	768
	OXA235-R	CAAAATTTTAAGACGGATCG	
entire <i>bla</i> _{OXA23-like}	OXA23-likeF	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	1065
	OXA23-like R	TCACAACAACATAAAAGCACTG	
entire <i>bla</i> _{OXA24-like}	OXA24-like F	GTAATAATCAAAGTTGTGAA	1021
	OXA24-like R	TCCCCCTAACATGAATTTGT	
entire <i>bla</i> _{OXA51-like}	OXA51-like F	TACGCCAATCCATACAGCAA	1416

ตารางที่ 4 Primers สำหรับการตรวจหา ESBL และ AmpC genes (36-39)

Gene	Primer name	Primer sequence (5'- 3')	Product size (bp)
<i>blaSHV</i>	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTTG	392
	SHV-R	ATTTGCTGATTCGCTCG	
<i>blaTEM</i>	TEM-C	ATCAGCAATAAACCAGC	516
	TEM-H	CCCCGAAGAACGTTTTTC	
<i>blaVEB</i>	VEB-A	CCTTTTGCCTAAAACGTGGA	216
	VEB-B	TGCATTTGTTCTTCGTTTGC	
<i>blaCTX-M</i>	CTXM-A	CGCTTTGCGATGTGCAG	550
	CTXM-B	ACCGCGATATCGTTGGT	
<i>blaOXA</i>	OXA-F	ATATCTCTAACTGTTGCATCTCC	619
	OXA-R	AAACCCTTCAAACCATCC	
<i>blaMOX</i>	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	
<i>blaCIT</i>	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAA	462
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
<i>blaDHA</i>	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
<i>blaACC</i>	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346
	ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
<i>blaEBC</i>	EBCMF	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302
	EBCMR	TCACAACAATAAAAGCACTG	
<i>blaFOX</i>	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	

ตารางที่ 5 Primers สำหรับการศึกษากการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* (40)

Gene	Primer name	Primer Sequences (5' - 3')	Product size (bp)
<i>gyrA</i>	<i>gyrA_F</i>	AAATCTGCCCGTGTCTGTTGGT	344
	<i>gyrA_R</i>	GCCATACCTACGGCGATACC	
<i>parC</i>	<i>parC_F</i>	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAA	300
	<i>parC_R</i>	TTAAGTTGTCCTTGCCATTCA	

ตารางที่ 6 Primers สำหรับการตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside (41-45)

Target	Primer sequence (5'- 3')	Product size (bp)
aac6'lh	F : TGCCGATATCTGAATC R : ACACCACACGTTTCAG	407
aac6'lb	F : TATGAGTGGCTAAATCGAT R : CCCGCTTTCTCGTAGCA	395
aph3VI	F : CGGAAACAGCGTTTTAGA R : TTCCTTTTGTTCAGGTC	716
aadB	F : ATCTGCCGCTCTGGAT R : CGAGCCTGTAGGACT	404
aadA1	F : ATGAGGGAAGCGGTGATCG R : TTATTTGCCGACTACCTTGGTG	792
aph3I	F : ATGTGCCATATTCAACGGGAAACG R : TCAGAAAACTCATCGAGCATCAA	816
armA	F : ATTCTGCCTATCTAATTGG R : ACCTATACTTTATCGTCGTC	315
rmtB	F : GCTTTCTGCGGGCGATGTAA R : ATGCAATGCCGCGCTCGTAT	173
rmtC	F : CGAAGAAGTAACAGCCAAAG R : ATCCCAACATCTCTCCCACT	711
aphA6	F : CGGAAACAGCGTTTTAGA R : TTCCTTTTGTTCAGGTC	716
aacC1	F : GACATAAGCCTGTTTCGGTT R : CTCCGAACTCACGACCGA	372
aacC2	F : ATGCATACGCGGAAGGC R : TGCTGGCACGATCGGAG	822

5. ทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาด้านจุลชีพหลายชนิดต่อเชื้อตัวอย่าง

Checkerboard assay

ทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาด้านจุลชีพหลายชนิดต่อเชื้อ *A. baumannii* เบื้องต้นด้วยวิธี checkerboard assay ใน 96-well plate โดยหาค่า MIC ของยาด้านจุลชีพแต่ละชนิด ได้แก่ imipenem, meropenem, colistin, amikacin โดยวิธี broth microdilution โดยปรับเชื้อให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland ใส่ใน cation-adjusted Mueller–Hinton broth ที่มียาด้านจุลชีพเพียงชนิดเดียวและมียาด้านจุลชีพอื่นร่วมด้วย ได้แก่ carbapenems (imipenem and meropenem) ร่วมกับ amikacin หรือ colistin โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จึงอ่านผล ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของยาต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ และนำมาคำนวณค่า FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) ดังนี้

$$\text{FIC index}_{\text{combination}} = \frac{\text{MIC}_{\text{drug A in combination}}}{\text{MIC}_{\text{drug A alone}}} + \frac{\text{MIC}_{\text{drug B in combination}}}{\text{MIC}_{\text{drug B alone}}}$$

โดยแปลผลดังนี้

Synergy : FIC index \leq 0.5

Additive : 0.5 > FIC index \leq 1

Indifference : 1 > FIC index \leq 4

Antagonism : FIC index > 4

Time kill assay

ทดสอบยืนยันการเสริมฤทธิ์กันของยาด้านจุลชีพหลายชนิดต่อเชื้อ *A.baumannii* ด้วยวิธี Time kill assay โดยเลี้ยงเชื้อ 10⁶ cfu/ml ใน Mueller-Hinton broth ที่มียาด้านจุลชีพชนิดเดียวและหลายชนิด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และทำ colony count ที่ช่วงเวลาต่างๆ จำนวนหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่เวลา 0, 2, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

โดยแปลผลดังนี้

Synergistic activity : มีการลดลงของเชื้อ \geq 2log₁₀ (cfu/ml)

Bactericidal activity : มีการลดลงของเชื้อ \geq 3log₁₀ (cfu/ml)

6. การศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ

ศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ทำโดยเตรียม DNA โดยนำเชื้อมาเตรียมเป็น agarose plug และย่อยด้วยเอนไซม์ Apal 50 Unit ที่ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำ DNA fragments ไปแยกโดย Pulsed-field gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose และ 0.5X Tris-borate-EDTA buffer สภาพะที่ใช้ในการ run คือ initial pulse 5 s, final pulse 35 s, 6V/cm ใช้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมด้วย ethidium bromide อ่านผลภายใต้แสง UV จากนั้นนำ PFGE pattern มาวิเคราะห์ด้วย FPquest software (BIO-Rad) โดยใช้ Dice coefficient clustering และ unweighted-pair group method with arithmetic averages

ผลการศึกษา

1. การทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* จำนวน 200 สายพันธุ์ นำมาทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยทำการตรวจหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี agar dilution ยาปฏิชีวนะที่ทดสอบได้แก่ ยากลุ่ม cephalosporins (ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime และ cefepime) ยากลุ่ม aminoglycoside (amikacin และ gentamicin) ยากลุ่ม carbapenems (imipenem และ meropenem) ยา กลุ่ม fluoroquinolones (ciprofloxacin) และยา colistin

ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *A.baumannii* ตื้อยา carbapenems (imipenem และ meropenem), aminoglycosides (amikacin และ gentamicin), cephalosporins (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime และ cefepime), และ fluoroquinolone (ciprofloxacin) ในอัตราที่สูงถึง 78-91% ยกเว้น ยา colistin ที่พบอัตราการตื้อยาที่ต่ำมากคือ 1.5% ผลการทดสอบดังแสดงใน ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความไวรับยาของเชื้อ *A.baumannii* 200 สายพันธุ์

Antibiotics	MIC range (mg/l)	No. of isolates (% Resistance)
Imipenem	0.125 - 256	173 (86.5)
Meropenem	0.125 - 256	175 (87.5)
Amikacin	0.5 - >256	156 (78)
Gentamicin	0.125 - >256	161 (80.5)
Cefotaxime	2 - >256	175 (87.5)
Ceftriaxone	2 - >256	174 (87)
Ceftazidime	1 - >256	171 (85.5)
Cefepime	1 - >256	182 (91)
Ciprofloxacin	0.06 - >256	171 (85.5)
Colistin	0.5 - >256	3 (1.5)

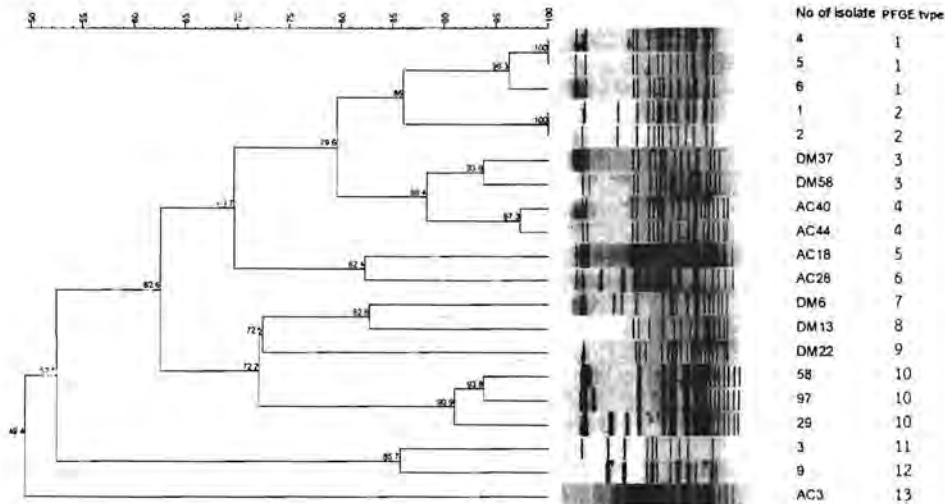
2. ศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรม โดย Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

ศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมด้วยวิธี PFGE โดยการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ ApaI ในตัวแทนเชื้อ *A. baumannii* 20 สายพันธุ์ ผลการศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรม โดย PFGE พบเชื้อ *A. baumannii* มีความหลากหลาย แบ่งได้เป็น 13 PFGE type (90% similarity) ซึ่งแสดงว่า ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งข้อมูลที่ได้จะช่วยในการคัดเลือกเชื้อที่มีแบบแผนทางพันธุกรรมชนิดต่างๆ ไปศึกษาต่อไป

AB-Apal-SET2-20 (20 entries)

Dise (0pt-1.00%) (1st 1.0%-1.0%) (P+0.0% S+0.0%) (0.0%-100.0%)
Apal-PFGE

Apal-PFGE

รูปที่ 1 Dendrogram ของเชื้อ *A. baumannii* 20 สายพันธุ์ จาก Apal PFGE pattern

3. การศึกษา antibiotic resistance determinants

ศึกษากลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ได้แก่ imipenem และ meropenem ในตัวแทนเชื้อ *A. baumannii* ที่มีระดับ MIC ต่างๆ จำนวน 120 สายพันธุ์ โดยเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems 102 สายพันธุ์ และไวต่อยา 18 สายพันธุ์ โดยตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases ได้แก่ bla_{OXA-51} , bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-58} , $bla_{OXA-143}$, $bla_{OXA-235}$, bla_{OXA-48} , bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM} โดยวิธี Multiplex PCR พบว่า เชื้อ *A. baumannii* 120 สายพันธุ์ มียีน bla_{OXA-51} ทุกสายพันธุ์ ซึ่งเป็น intrinsic resistance gene โดย OXA-51 มี weak hydrolytic activity ต่อยาในกลุ่ม carbapenems พบได้ในเชื้อ *A. baumannii* ทุกสายพันธุ์ เชื้อที่มี bla_{OXA51} เพียงชนิดเดียว เป็นเชื้อที่ไวต่อยาต่อยาในกลุ่ม carbapenems มีค่า MIC ในระดับต่ำ (MIC range 0.125-2 mg/L) สำหรับเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ทั้งหมด 102 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์มียีน bla_{OXA-23} ร่วมกับ bla_{OXA-51} แสดงว่า bla_{OXA-23} เป็นยีนดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ที่พบมากที่สุด ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย ตรวจไม่พบยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases ชนิดอื่นๆ ได้แก่ bla_{OXA-24} , bla_{OXA-58} , $bla_{OXA-143}$, $bla_{OXA-235}$, bla_{OXA-48} , bla_{IMP} , bla_{VIM} และ bla_{NDM} ผลดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases ในเชื้อ *A. baumannii*

Carbapenemase genes	จำนวนเชื้อ (%)	Imipenem MIC (mg/L)	Meropenem MIC (mg/L)
<i>bla</i> _{OXA-51} alone	18 (15)	0.125-1	0.125-2
<i>bla</i> _{OXA-51} and <i>bla</i> _{OXA-23}	102 (85)	8-256	16-128

การศึกษากลไกการดื้อยาของกลุ่ม aminoglycosides

ทำการตรวจหา aminoglycoside-modifying enzyme genes และ 16S rRNA methylase genes ได้แก่ *aphA6*, *aadA1*, *aadB*, *aacC1*, *aacC2*, *aph3I*, *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *aac6'lb*, *aph3VI*, และ *aac6'lh* ในเชื้อ *A.baumannii* ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ (โดยเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides 18 สายพันธุ์ และไวต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides 2 สายพันธุ์) ด้วยวิธี PCR ผลการทดสอบดังแสดงใน ตารางที่ 9 โดย aminoglycoside-modifying enzyme genes ที่พบมากที่สุดคือ *aph3I* พบ 12 สายพันธุ์ (คิดเป็น 66.67%) รองลงมาคือ *aadA1* 7 สายพันธุ์ (38.89%), *aadB* 5 สายพันธุ์ (27.78%), *aph3VI* 5 สายพันธุ์ (27.78%), *aphA6* 5 สายพันธุ์ (27.78%), *aacC2* 4 สายพันธุ์ (22.22%), และ *aac6'lb* 3 สายพันธุ์ (16.67%) ซึ่งไม่พบสายพันธุ์ที่มียีน *aacC1* และ *aac6'lh* เลย

สำหรับ 16S rRNA methylase genes พบเฉพาะยีน *armA* โดยพบเป็นจำนวนมากถึง 12 สายพันธุ์ (คิดเป็น 66.67%) โดยไม่พบยีน *rmtB* และ *rmtC* ในเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ทั้ง 18 สายพันธุ์ เมื่อจัดกลุ่มเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ตามยีนที่พบสามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงใน ตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ตามยีนดื้อยาที่พบ

ยีนดื้อยาที่พบ	จำนวนสายพันธุ์ (%)	Amikacin MIC range (mg/l)	Gentamicin MIC range (mg/l)
<i>aadA1, aph3I, armA, aac6'lb</i>	3 (16.67%)	>4096 - >4096	>256 - >256
<i>aph3I, armA</i>	8 (44.44%)	4096 - >4096	>256 - >256
<i>aadA1, aadB, aphA6, aacC2, aph3VI</i>	4 (22.22%)	16 - 512	32 - >256
<i>aph3I</i>	1 (5.56%)	1	>256
<i>armA</i>	1 (5.56%)	4096	>256
<i>aadB, aphA6, aph3VI</i>	1 (5.56%)	16	>256

การศึกษากลไกการดื้อยาในกลุ่ม extended-spectrum cephalosporins

ทำการตรวจหายีนสร้างเอนไซม์ ESBLs และ plasmid-mediated AmpC ใน *A.baumannii* ในเชื้อ *A.baumannii* ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะยีนที่สร้าง ESBL ชนิด VEB-1 4 สายพันธุ์ (20%) แต่ไม่พบ plasmid-mediated AmpC (ตารางที่ 11)

การศึกษากลไกการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolones

ทำการตรวจหา mutation ในยีน *gyrA* และ *parC* ในเชื้อ *A.baumannii* ที่ดื้อยา ciprofloxacin (MIC>4mg/L) พบการเกิด mutation ในยีน *gyrA* และ *parC* โดย *gyrA* พบที่ตำแหน่ง Serine 83 -> Leucine (S83L) สำหรับ *parC* พบที่ตำแหน่ง Serine 80 โดยพบการ mutation ได้สองรูปแบบคือ Serine 80 -> Leucine (S80L) และ Serine 80 -> Tyrosine (S80Y) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลการตรวจหา ESBL และ AmpC genes และการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC*

isolate	CTX MIC (mg/l)	CRO MIC (mg/l)	CAZ MIC (mg/l)	FEP MIC (mg/l)	CIP MIC (mg/l)	mutation of <i>gyrA</i>	mutation of <i>parC</i>	ESBL genes	AmpC genes
1	256	>256	256	64	32	S83L	S80L	-	-
2	>256	>256	>256	>256	64	S83L	S80L	-	-
3	32	64	16	64	0.5	ND	ND	-	-
4	>256	>256	>256	>256	128	S83L	S80L	-	-
5	>256	>256	>256	256	64	S83L	S80L	-	-
6	>256	>256	>256	128	128	S83L	S80L	-	-
9	32	32	16	128	1	ND	ND	-	-
29	256	256	>256	256	64	S83L	S80Y	VEB-1	-
58	256	256	>256	256	64	S83L	S80Y	VEB-1	-
97	256	256	>256	256	32	S83L	S80Y	VEB-1	-
AC3	>256	>256	>256	>256	64	S83L	S80L	-	-
AC18	256	>256	64	>256	128	S83L	S80L	-	-
AC28	>256	>256	256	>256	64	S83L	S80L	-	-
AC40	>256	>256	>256	>256	64	S83L	S80L	-	-
AC44	>256	>256	>256	>256	64	S83L	S80L	-	-
DM6	>256	>256	>256	>256	32	S83L	S80Y	VEB-1	-
DM13	>256	>256	>256	>256	64	S83L	S80L	-	-
DM22	>256	>256	>256	>256	64	S83L	S80Y	-	-
DM37	>256	>256	>256	>256	64	S83L	S80L	-	-
DM58	>256	>256	>256	>256	32	S83L	S80L	-	-

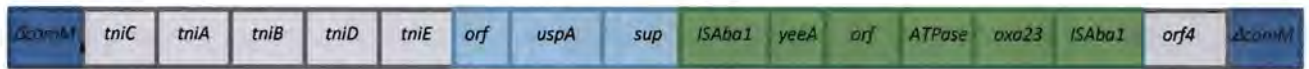
CTX=cefotaxime, CRO=ceftriaxone, CAZ=ceftazidime, FEP=cefepime, CIP=ciprofloxacin

4. การศึกษา antibiotic resistance island

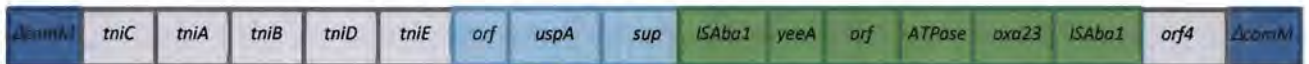
จากการศึกษา antibiotic resistance island ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาในกลุ่ม carbapenem 5 สายพันธุ์ ด้วยวิธี PCR mapping ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 โดย antibiotic resistance island นี้แทรกอยู่ในยีน *comM* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของเชื้อ โดยพบว่ายีนที่สร้าง carbapenemase ชนิด OXA-23 อยู่บน antibiotic resistance island ของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ มีลักษณะคล้ายกับ AbaR4 type ประกอบไป

ด้วย transposon Tn6022 ที่ประกอบด้วยยีน *tniC*, *tniA*, *tniB*, *tniD*, *tniE*, *uspA*, *sup* และ *orf4* และมี ส่วนประกอบของ carbapenemase gene แทรกอยู่ภายใน transposon Tn6022 ซึ่ง *bla_{OXA-23}* อยู่ใน transposon Tn2006 ประกอบด้วย *ISAbal*, *yeeA*, *orf*, *ATPase*, *bla_{OXA-23}*, และ *ISAbal* อย่างไรก็ตามใน isolate No.4 และ 29 ส่วนของ Tn6022 พบว่ามีการขาดหายไปของยีน *tniD*

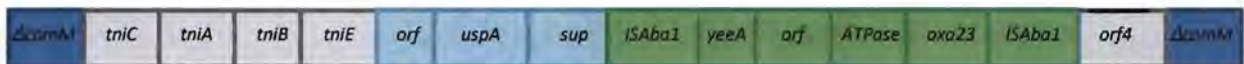
Isolate No. 1



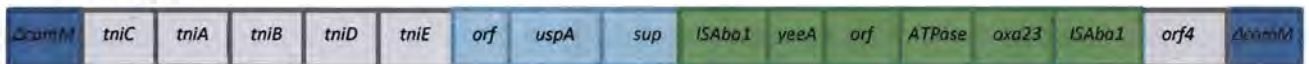
Isolate No.3



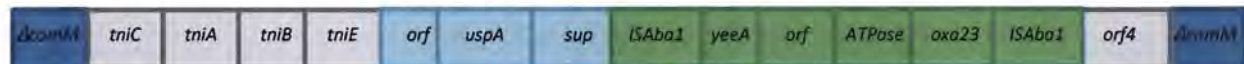
Isolate No. 4



Isolate No.5



Isolate No.29



รูปที่ 2 โครงสร้างของ antibiotic resistance island

5. การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยากลุ่ม carbapenems

ทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพ ต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน เบื้องต้น ด้วยวิธี checkerboard assay โดยหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด (imipenem, meropenem, colistin, amikacin) ในภาวะที่มียาต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียวและมียาต้านจุลชีพอื่นร่วมด้วย และคำนวณเป็นค่า FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index)

ผลการศึกษาพบว่ามีเพียงการใช้ยา imipenem ร่วมกับ amikacin เท่านั้นที่ให้ผลการเสริมฤทธิ์กัน ในเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ No.29 และ DM13 และ meropenem กับ amikacin 3 สายพันธุ์ คือ No.3, 29 และ 58 อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ไม่พบการแสดงออกแบบต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ดังแสดงในตารางที่ 12-15

ตารางที่ 12 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ amikacin

Isolates	Imipenem MIC (mg/L)	Amikacin MIC (mg/L)	Imipenem + Amikacin (FICI)
No. 1	32	>4096	ND
No. 29	32	512	0.313 (synergy)
No. 3	16	0.5	0.75 (additive)
No. 9	16	0.5	0.75 (additive)
No. AC44	128	>4096	ND
No. 5	64	>4096	ND
No. 6	32	>4096	ND
No. 58	32	32	0.516 (additive)
No. DM13	64	4096	0.375 (Synergy)
No. DM37	64	>4096	ND

ตารางที่ 13 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem ร่วมกับ amikacin

Isolates	Meropenem MIC (mg/L)	Amikacin MIC (mg/L)	meropenem + Amikacin (FICI)
No. 1	64	>4096	ND
No. 29	64	512	0.375 (synergy)
No. 3	16	0.5	0.5 (synergy)
No. 9	16	0.5	1 (additive)
No. AC44	128	>4096	ND
No. 5	128	>4096	ND
No. 6	32	>4096	ND
No. 58	64	32	0.375 (synergy)
No. DM13	64	4096	0.75 (additive)
No. DM37	128	>4096	ND

ตารางที่ 14 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ colistin

Isolates	Imipenem MIC (mg/L)	Colistin MIC (mg/L)	imipenem + colistin (FICI)
No. 1	32	2	0.625 (additive)
No. 29	32	1	2 (Indifference)
No. 3	16	2	0.625 (additive)
No. 9	16	2	0.625 (additive)
No. AC44	128	2	2 (Indifference)
No. 5	64	1	2 (Indifference)
No. 6	32	1	2 (Indifference)
No. 58	32	1	2 (Indifference)
No. DM13	64	1	1 (additive)
No. DM37	64	1	1 (additive)

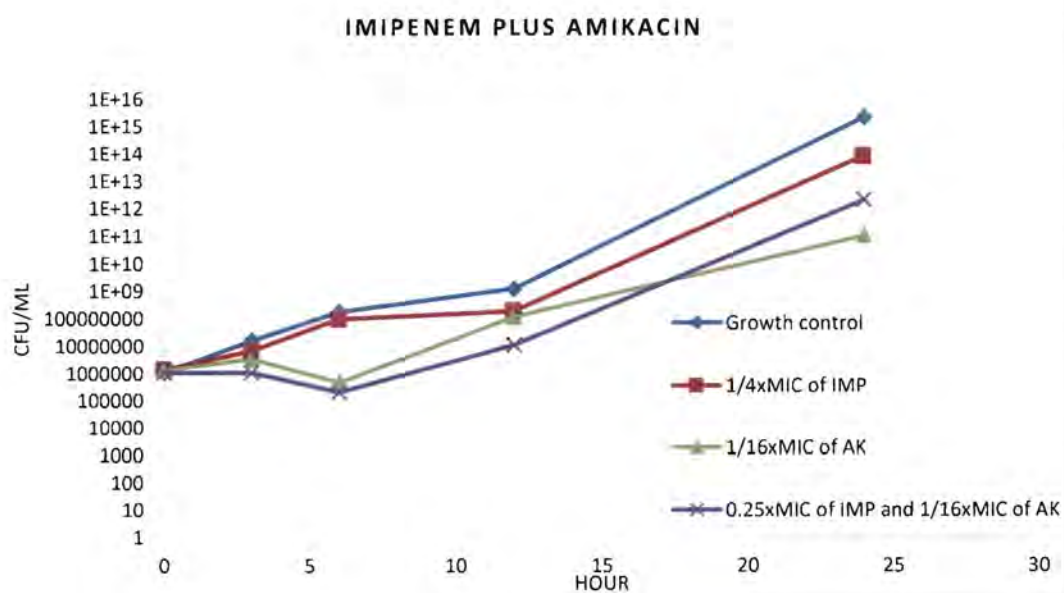
ตารางที่ 15 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem ร่วมกับ colistin

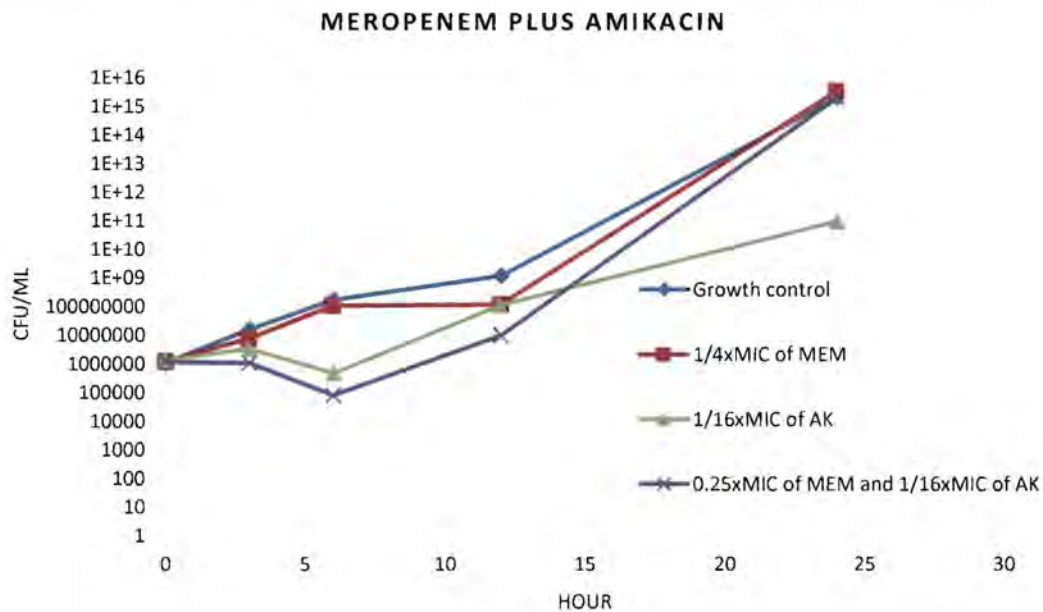
Isolates	Meropenem MIC (mg/L)	Colistin MIC (mg/L)	Checkerboard method meropenem + colistin (FICI)
No. 1	64	2	0.75 (additive)
No. 29	64	1	0.75 (additive)
No. 3	16	2	2 (Indifference)
No. 9	16	2	0.75 (additive)
No. AC44	128	2	1 (additive)
No. 5	128	1	1 (additive)
No. 6	32	1	0.625 (additive)
No. 58	64	1	0.625 (additive)
No. DM13	64	1	1 (additive)
No. DM37	128	1	0.75 (additive)

ทดสอบยืนยันการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธี Time kill assay

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem และ meropenem ร่วมกับ amikacin ด้วยวิธี Checkerboard assay จึงนำเชื้อ *A.baumannii* isolate 29 ที่ให้ synergy มาทดสอบยืนยันการเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธี Time kill assay โดยไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem และ meropenem ความเข้มข้น 1/4x MIC เมื่อร่วมกับ amikacin ความเข้มข้น 1/16x MIC สำหรับเชื้อ *A.baumannii* isolate 29 (รูปที่ 3 และ 4)

รูปที่ 3 Time kill curve ของยา imipenem ร่วมกับยา amikacin ต่อเชื้อ *A. baumannii* isolate 29



รูปที่ 4 Time kill curve ของยา meropenem ร่วมกับยา amikacin ต่อเชื้อ *A. baumannii* isolate 29

เนื่องจากพบว่า ยากลุ่ม carbapenems ที่นำมาใช้ร่วมกับ amikacin หรือ colistin ในเชื้อ *A. baumannii* ให้ผล synergy น้อย จึงนำยา fosfomycin มาทำการทดสอบร่วมกับ imipenem ในเชื้อ *A. baumannii* 10 สายพันธุ์ พบว่าให้ผล synergy ในเชื้อ 8 สายพันธุ์ (80%) และ additive (20%) โดยไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem และ fosfomycin ในเชื้อที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 16 และ 17

ตารางที่ 16 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ fosfomycin

Isolates	Imipenem MIC (mg/L)	Fosfomycin MIC (mg/L)	Checkerboard method imipenem + fosfomycin (FICI)
No. 1	32	128	0.56 (additive)
No. 3	16	128	0.31 (synergy)
No. 5	64	128	0.56 (additive)
No. 6	32	128	0.50 (synergy)
No. 9	16	128	0.31 (synergy)
No. 29	32	128	0.31 (synergy)
No. 58	32	256	0.38 (synergy)
No. AC44	128	256	0.28 (synergy)
No. DM13	64	128	0.28 (synergy)
No. DM37	64	128	0.31 (synergy)

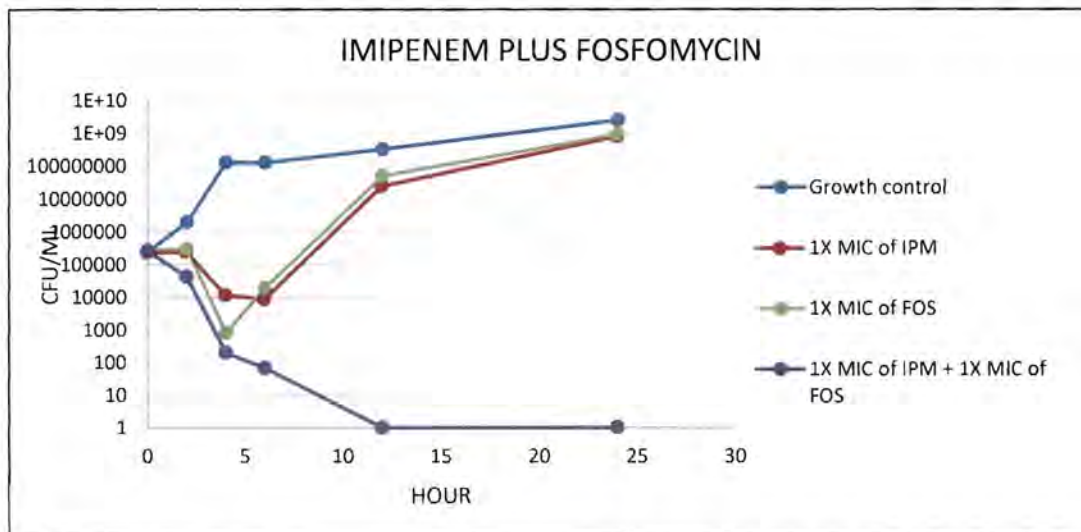
ตารางที่ 17 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา meropenem ร่วมกับ fosfomycin

Isolates	Meropenem MIC (mg/L)	Fosfomycin MIC (mg/L)	Checkerboard method meropenem + fosfomycin (FICI)
No. 1	64	128	0.75 (additive)
No. 3	64	128	0.75 (additive)
No. 5	16	128	1.00 (additive)
No. 6	16	128	1.00 (additive)
No. 9	128	128	0.53 (additive)
No. 29	128	128	0.53 (additive)
No. 58	32	256	2.00 (additive)

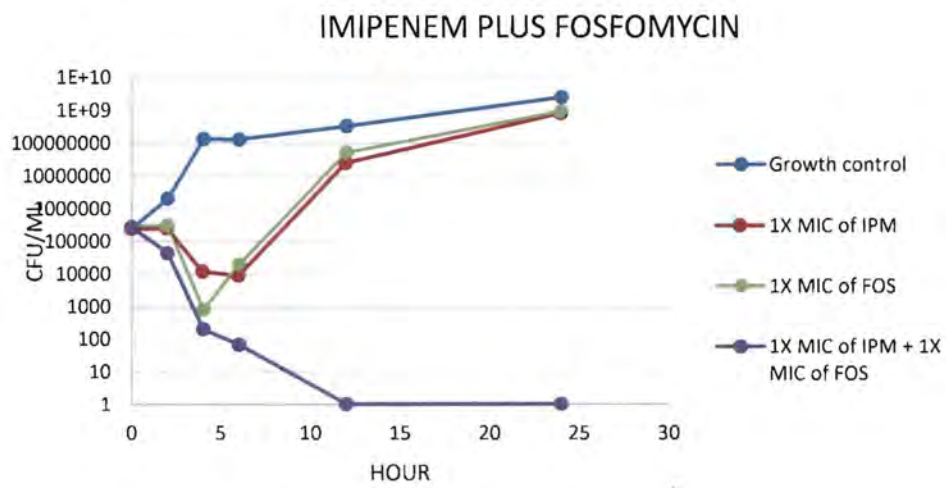
ทดสอบยืนยันการเสริมฤทธิ์กันของยาด้านจุลชีพด้วยวิธี Time kill assay

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ fosfomycin ด้วยวิธี Checkerboard assay จึงนำเชื้อ *A. baumannii* isolate 29 และ 3 ซึ่งให้ผล synergy มาทดสอบยืนยันการเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธี Time kill assay (รูปที่ 5 และ 6) โดยใช้ 1X MIC ของ imipenem และ 1X MIC ของ meropenem ซึ่งให้ผลการเสริมฤทธิ์กันในเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์

รูปที่ 5 Time kill curve ของยา imipenem ร่วมกับยา fosfomycin ต่อเชื้อ *A. baumannii* isolate 3



รูปที่ 6 Time kill curve ของยา imipenem ร่วมกับ fosfomycin ต่อเชื้อ *A. baumannii* isolate 29



อภิปราย/วิจารณ์

A. baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ปัญหาที่สำคัญในการทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล ในปัจจุบันเชื้อนี้คือตัวอันตรายด้านจุลชีพในระดับสูงและมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะยา กลุ่ม carbapenems ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย มีอัตราการดื้อยาของกลุ่ม cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones, และ aminoglycosides ในอัตราที่สูงมาก(78-91%) สำหรับยา colistin ถึงแม้ว่าจะเป็นยาที่มีอัตราการดื้อยาต่ำที่สุด (1.5%) แต่การใช้ยานี้มีข้อจำกัดเนื่องจาก มีอันตรายต่อระบบประสาทและไต

ยา กลุ่ม carbapenems เป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* แต่อัตราการดื้อยาได้สูงขึ้นในปัจจุบัน สำหรับกลไกการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ประกอบด้วย การสร้างเอนไซม์ carbapenemases, การแสดงออกของ porin proteins ที่ลดลง และเพิ่มการแสดงออกของ efflux pumps เพื่อขับยาออกสู่เซลล์ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลไกหลักของการดื้อยาของกลุ่มนี้คือการสร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยยีนที่พบคือ *bla_{OXA-23}* ซึ่งเป็นยีนที่พบได้บ่อยที่สุดในเชื้อ *A. baumannii* จากประเทศในแถบเอเชียและทั่วโลก

กลไกหลักของการดื้อยาของกลุ่ม aminoglycosides คือ การสร้าง aminoglycoside-modifying enzymes โดยยีนที่สร้าง aminoglycoside O-phosphotransferases (APHs) ที่พบ ได้แก่ *aph3I*, *aphA6* และ *aph3VI* พบในเชื้อที่ดื้อยา gentamicin สำหรับ aminoglycoside N-acetyltransferases (AACs) ที่พบได้แก่ *aac6'lb* และ *aacC2*, aminoglycoside O-nucleotidyltransferases (ANTs) ที่พบ ได้แก่ *aadA1* และ *aadB* นอกจากนี้ยังมี methyltransferases ได้แก่ *armA* ที่พบได้บ่อยใน *A. baumannii* (46) โดยมีผลให้เชื้อดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงทั้ง amikacin และ gentamicin เช่นเดียวกัน การศึกษาในครั้งนี้ เชื้อ isolate DM13 พบเพียง *armA* เพียงอย่างเดียวแต่ดื้อยา amikacin และ gentamicin ในระดับสูง (MIC > 256 mg/L) และมีรายงานการแพร่กระจายของยีนนี้ใน *A. baumannii* สายพันธุ์จากทวีปเอเชียมากขึ้นด้วย(47) นอกจากนี้ยีนที่พบในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ส่วนใหญ่จะมียีนดื้อยามากกว่า 1 ยีน และมีการดื้อยาในระดับสูงด้วย (48)

กลไกหลักของการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolones การเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณ Quinolone Resistance - Determining Region (QRDR) ของยีนที่อยู่บนโครโมโซมซึ่งสร้างเอนไซม์ DNA gyrase และ Topoisomerase IV มีรายงานการพบการกลายพันธุ์ที่ยีน *gyrA* และ *parC* ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ของ GyrA ได้แก่ S83L, G81V, G81C และ A84P และ ของ ParC ได้แก่ S80L, S80W, E84K, และ G78C (49) ในการศึกษาพบการ mutation S83L ของ GyrA ในทุกสายพันธุ์ที่ดื้อยา ciprofloxacin ในขณะที่ mutation ของ ParC พบสองรูปแบบคือ ที่ตำแหน่ง S80L และ S80Y โดยการเกิด mutation ที่ตำแหน่ง S80Y ยังไม่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolones หรือไม่ อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Park และคณะ (50) ที่พบว่า การ mutation ร่วมกันของ *gyrA* และ *parC* ทำให้เกิดการดื้อยา กลุ่ม fluoroquinolones ในระดับสูง (MIC ≥ 32 mg/L)

สำหรับการสร้างเอนไซม์ ESBLs และ plasmid-mediated AmpC ใน *A. baumannii* ในการศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะยีนที่สร้าง ESBL ชนิด VEB-1 เท่านั้น ซึ่งเป็นยีนที่มีการระบาดใน *A. baumannii* ทั่วโลกไม่ว่าจะเป็นยุโรป(51) อเมริกา(52) และเอเชีย (50) (51) โดย ESBLs ที่พบได้บ่อยใน *A. baumannii* ทั่วโลก คือ

PER-1 (53,54) แต่ไม่พบในการศึกษาคั้งนี้ สำหรับยีนที่สร้าง plasmid-mediated AmpC ไม่พบในการศึกษาคั้งนี้เช่นกัน ในขณะที่ *ampC* gene ใน *A. baumannii* ที่พบบ่อยทั่วโลก คือ *ampC* ที่อยู่บน chromosome ซึ่งจะทำให้เกิดการดื้อยาของกลุ่ม cephalosporins เมื่อมี insertion sequence บริเวณ upstream จะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น สร้างเอนไซม์ AmpC ออกมาทำลายยาได้มากขึ้น (55)

จากการศึกษา resistance island ในเชื้อ *A. baumannii* พบว่า *comM* เป็นยีนที่เป็น hot spot ซึ่งมักมีการแทรกของ transposable element ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้พบการแทรกของ Tn6022 ซึ่งเป็น backbone structure ของ resistance island ชนิด AbaR4 โดย AbaR4 ที่พบในการศึกษานี้เป็น antibiotic resistance island ที่มีรายงานใน *A. baumannii* และ *A. nosocomialis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากประเทศไทยและเกาหลีใต้ (56,57) โดยพบทั้งที่เป็น typical AbaR4 และ variant ของ AbaR4 ซึ่งพบว่าในส่วนของ Tn2066 มีการขาดหายไปของ *tniD* จากการศึกษานี้พบ carbapenemase gene ชนิด *bla_{OXA-23}* อยู่บน resistance island ในเชื้อที่ทำการศึกษาทุกสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่า *bla_{OXA-23}* พบอยู่ antibiotic resistance island บนโครโมโซม ซึ่งสามารถทำให้การแพร่กระจายของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาของกลุ่ม carbapenems เป็นไปได้ง่ายขึ้น โดยกระบวนการ vertical gene transfer

จากปัญหาการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ของเชื้อ *A. baumannii* ทำให้การเลือกใช้ในการรักษามีข้อจำกัดเป็นอย่างมากเนื่องจาก carbapenems เป็นยาตัวเลือกแรกที่นิยมใช้กัน ดังนั้นการรักษาจึงจำเป็นต้องใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน เพื่อให้การรักษาได้ผล การศึกษานี้ได้ศึกษาผลของยาในกลุ่ม carbapenems ร่วมกับยา กลุ่ม aminoglycosides คือ amikacin ซึ่งการใช้ยาสองกลุ่มนี้ร่วมกันพบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาหลายขนาน (58,59) มีรายงานใน *A. baumannii* พบว่าการใช้ imipenem ร่วมกับ netilmicin ให้ผลเสริมฤทธิ์เพียง 1 ใน 5 สายพันธุ์ของ carbapenem-resistant *A. baumannii* ด้วยวิธี Etest (10) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ imipenem ร่วมกับ amikacin ด้วยวิธี checkerboard method ซึ่งให้ผลเสริมฤทธิ์กัน 46% ของเชื้อ carbapenem-resistant *A. baumannii* (60) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในคั้งนี้ คือ imipenem + amikacin ให้ผลเสริมฤทธิ์ 40% (2 ใน 5 สายพันธุ์) และ meropenem + amikacin ให้ผลเสริมฤทธิ์ 60% (3 ใน 5 สายพันธุ์)

สำหรับการใช้ carbapenems ร่วมกับ colistin นับเป็นอีกหนึ่งคู่ยาที่นิยมใช้มาก แต่ผลการศึกษาใน *A. baumannii* ในหลายการศึกษายังให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน คือมีรายงานการศึกษาที่พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กัน 100% เมื่อทดสอบด้วยวิธี checkerboard (8) และมีรายงานที่ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันเลย(61) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของยา imipenem ร่วมกับ colistin และ meropenem ร่วมกับ colistin เช่นกัน

เนื่องจากในการศึกษาคั้งนี้ การใช้ carbapenems ร่วมกับ colistin หรือ amikacin ให้ผลการเสริมฤทธิ์กันน้อย คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำยา fosfomycin มาทดสอบ ซึ่งพบว่าการใช้ imipenem ร่วมกับ fosfomycin แสดงผลการเสริมฤทธิ์กันที่ดีที่สุด และเมื่อยืนยันด้วยวิธี time-kill ก็พบว่าให้ผลการเสริมฤทธิ์กัน โดยความเข้มข้นของยา imipenem และ fosfomycin ที่ใช้ มีค่าเท่ากับค่า MIC คือ 32 และ 256 mg/L ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นนี้ยังน้อยกว่า ระเบิดยาในเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับยา (62-64) ดังนั้นการเสริมฤทธิ์กันยา imipenem และ fosfomycin นี้จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้ ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือ เชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ที่ได้จากการศึกษา

ครั้งนี้พบยีนที่สร้าง carbapenemase ชนิด OXA-23 เพียงชนิดเดียว ซึ่ง carbapenemase มีอยู่หลายชนิด ซึ่งควรศึกษาในเชื้อที่สร้าง carbapenemase ชนิดอื่นๆร่วมด้วยหรือมีกลไก

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

การศึกษานี้พบการเสริมฤทธิ์กันของการใช้ยา imipenem และ fosfomycin ร่วมกันต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานรวมถึง carbapenems จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาใน *A. baumannii* ในเชื้อจำนวนมากขึ้น มีกลไกการดื้อยาแตกต่างกัน และเพิ่มชนิดของยาที่นำมาใช้ในการทดสอบด้วย รวมถึงทำการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไป เพื่อสามารถนำข้อมูลนำไปใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้แก่ กระทรวงสาธารณสุข สามารถนำข้อมูลไปเผยแพร่เพื่อใช้ในการรักษาการติดตามเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนานและเป็นแนวทางในการทบทวนการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วย

บรรณานุกรม

1. Myrianthefs P, Gavala A, Baltopoulos G. *Acinetobacter* infection. The New England journal of medicine. 2008;358(26):2846; author reply -7.
2. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nature reviews Microbiology. 2007;5(12):939-51.
3. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010;51(1):79-84.
4. Michalopoulos A, Falagas ME. Treatment of *Acinetobacter* infections. Expert opinion on pharmacotherapy. 2010;11(5):779-88.
5. Rodriguez-Hernandez MJ, Pachon J, Pichardo C, Cuberos L, Ibanez-Martinez J, Garcia-Curiel A, et al. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2000;45(4):493-501.
6. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(3):753-7.
7. Pankuch GA, Lin G, Seifert H, Appelbaum PC. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(1):333-6.
8. Pongpech P, Amornnopparattanakul S, Panapakdee S, Fungwithaya S, Nannha P, Dhiraputra C, et al. Antibacterial activity of carbapenem-based combinations against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of the Medical Association of Thailand. 2010;93(2):161-71.
9. Wareham DW, Bean DC. In-vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2006;5:10.
10. Kiratisin P, Apisarntharak A, Kaewdaeng S. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. International journal of antimicrobial agents. 2010 ;36(3):243-6.
11. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS microbiology reviews. 2009;33(2):376-93.
12. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nature reviews Microbiology. 2004 ;2(5):414-24.

13. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS genetics*. 2006;2(1):e7.
14. Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, Bonnal RJ, et al. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(7):2616-25.
15. Krizova L, Nemec A. A 63 kb genomic resistance island found in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate of European clone I from 1977. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;65(9):1915-8.
16. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*. 2008;190(24):8053-64.
17. Post V, Hall RM. AbaR5, a large multiple-antibiotic resistance region found in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2667-71.
18. Post V, White PA, Hall RM. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(6):1162-70.
19. Post V, Hamidian M, Hall RM. Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* variants belonging to global clone 1. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(4):1039-40.
20. Adams MD, Chan ER, Molyneaux ND, Bonomo RA. Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(9):3569-77.
21. Krizova L, Dijkshoorn L, Nemec A. Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(7):3201-6.
22. Nigro SJ, Post V, Hall RM. The multiresistant *Acinetobacter baumannii* European clone I type strain RUH875 (A297) carries a genomic antibiotic resistance island AbaR21, plasmid pRAY and a cluster containing ISAba1-sul2-CR2-strB-strA. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. [Letter Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;66(8):1928-30.
23. Zhou H, Zhang T, Yu D, Pi B, Yang Q, Zhou J, et al. Genomic analysis of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06 widely spread in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;55(10):4506-12.

24. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1996;40(8):1914-8.
25. Kim, D. H., et al. Variations of AbaR4-type resistance islands in *Acinetobacter baumannii* isolates from South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* . 2012;56(8): 4544-4547.
26. Post, V., et al. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(6): 1162-1170.
27. Poirel, L., et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70(1): 119-123.
28. Woodford, N., et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27(4): 351-353.
29. Higgins, P. G., et al. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(3): 305.
30. Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2121–2126.
31. Segal, H., et al. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 243(2): 425-429.
32. Afzal-Shah, M. and D. M. Livermore. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp*. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 41(5): 576-577.
33. Heritier, C., et al. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(1): 115-118.
34. Afzal-Shah, M., et al. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(2): 583-588.
35. Ellington, M. J., et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* . 2007;59(2): 321-322.
36. Colom, K., et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, bla(SHV) and blaOXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;223(2): 147-151.
37. Mabilat, C. and P. Courvalin. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; 34(11): 2210-2216.

38. Bonnet, R., et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7): 1936-1942.
39. Agents Chemother . 2000;44(7): 1936-1942.
40. Perez-Perez, F. J. and N. D. Hanson . Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6): 2153-2162.
41. Park, S., et al. Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Osong Public Health Res Perspect*. 2011; 2(3): 164-170.
42. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect*. 2009;73(4):355-63.
43. Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernandez E, Rodriguez-Noriega E, et al. Metallo-beta-lactamase gene bla(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2943-6.
44. Nie L, Lv Y, Yuan M, Hu X, Nie T, Yang X, et al. Genetic basis of high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(4):295-300.
45. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 2007;45(1):88-94.
46. Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol*. 1999;150(5):317-22.
47. Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):4209-10.
48. Yu YS, Zhou H, Yang Q, Chen YG, Li LJ. Widespread occurrence of aminoglycoside resistance due to ArmA methylase in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(2):454-5.
49. Atasoy AR, Ciftci IH, Petek M. Modifying enzymes related aminoglycoside: analyses of resistant *Acinetobacter* isolates. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(2):2874-80.
50. Hamouda A, Amyes SG. Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(3):695-6.
51. Park S, Lee KM, Yoo YS, Yoo JS, Yoo JI, Kim HS, et al. Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Osong Public Health Res Perspect*. 2011;2(3):164-70.

52. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3542-7.
53. Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccione D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3222-4.
54. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(10):2265-9.
55. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter spp.* in Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(5):1749-51.
56. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(2):123-30.
57. Kim DH, Choi JY, Jung SI, Thamlikitkul V, Song JH, Ko KS. AbaR4-type resistance island including the blaOXA-23 gene in *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4548-9.
58. Kim DH, Park YK, Ko KS. Variations of AbaR4-type resistance islands in *Acinetobacter baumannii* isolates from South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4544-7.
59. Nakamura A, Hosoda M, Kato T, Yamada Y, Itoh M, Kanazawa K, et al. Combined effects of meropenem and aminoglycosides on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(6):901-4.
60. Drusano GL, Liu W, Fregeau C, Kulawy R, Louie A. Differing effects of combination chemotherapy with meropenem and tobramycin on cell kill and suppression of resistance of wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its isogenic MexAB efflux pump-overexpressed mutant. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2266-73.
61. Leite GC, Oliveira MS, Perdigo-Neto LV, Rocha CK, Guimaraes T, Rizek C, et al. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151270.
62. Santimaleworagun W, Wongpoowarak P, Chayakul P, Pattharachayakul S, Tansakul P, Garey KW. In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomycin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011;42(4):890-900.

63. Sauermann R, Karch R, Langenberger H, Kettenbach J, Mayer-Helm B, Petsch M, et al. Antibiotic abscess penetration: fosfomycin levels measured in pus and simulated concentration-time profiles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4448-54.
64. Schintler MV, Traunmüller F, Metzler J, Kreuzwirt G, Spendel S, Mauric O, et al. High fosfomycin concentrations in bone and peripheral soft tissue in diabetic patients presenting with bacterial foot infection. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):574-8.
65. Novelli A, Adembri C, Livi P, Fallani S, Mazzei T, De Gaudio AR. Pharmacokinetic evaluation of meropenem and imipenem in critically ill patients with sepsis. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(5):539-49.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ฐนิษฐา...ฉัตรสุวรรณ
(ภาษาอังกฤษ) Tanittha Chatsuwana
- หมายเลขบัตรประชาชน 3102000954549
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- ที่อยู่หน่วยงาน ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ. พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-256-4132 ต่อ 612 โทรสาร 02-252-5952
E-mail Address smedtcs@hotmail.com โทรศัพท์มือถือ 08-6989-1570
- ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่จบ
วิทยาศาสตรบัณฑิต	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2530
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	จุลชีววิทยาทางการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2534
Ph.D	Medical Microbiology	University of Edinburgh	2546

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Molecular Bacteriology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้วและที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Tuntiviriyapun P, Panyakhamlerd K, Triratanachat S, Chatsuwana T, Chaikittisilpa S, Jaisamrarn U, Taechakraichana N. Newly developed vaginal atrophy symptoms II and vaginal pH: a better correlation in vaginal atrophy? *Climacteric*. 2015 Apr;18(2):246-51
- Phongsamart W, Srifeungfung S, Chatsuwana T, Nunthapisud P, Treerauthaweeraphong V, Rungnobbhakhun P, Sricharoenchai S, Chokephaibulkit K. Changing trends in serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive diseases in Central Thailand, 2009-2012. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10, 1866-72
- Srifeungfung S, Phongsamart W, Tribuddharat C, Chatsuwana T, Rungnobbhakhun P, Sapcharoen S, Chokephaibulkit K. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in patients aged 50 years or older in Thailand. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10, 40-4.

4. Poovorawan K, Chatsuwan T, Lakananurak N, Chansaenroj J, Komolmit P, Poovorawan Y. *Shewanella haliotis* associated with severe soft tissue infection, Thailand, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19, 1019-21.
5. Sungpradit S, Chatsuwan T, Nuchprayoon S. Susceptibility of *Wolbachia*, an endosymbiont of *Brugia malayi* microfilariae, to doxycycline determined by quantitative PCR assay. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012; 43, 841-50.
6. Srifeungfung S, Tribuddharat C, Comerungsee S, Chatsuwan T, Treerauthanaweeraphong V, Rungnobbhakhun P, Nunthapisud P, Chokeyhaibulkit K. Serotype coverage of pneumococcal conjugate vaccine and drug susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive or non-invasive diseases in central Thailand, 2006-2009. *Vaccine.* 2010; 28, 3440-4.
7. Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj D, Klaikaew N, Chatsuwan T. Curcumin suppress garlic NF- κ B activation and macromolecule leakage in *Helicobacter pylori* - infected rats. *World J Gastroenterol.* 2010; 16, 4039-45.
8. Thong-Ngam D., Sintara K., Chayanupatkul M, Klaikaew N, Chatsuwan T. The rat models of gastric cancer using *Helicobacter pylori* infection, N-methyl-n-nitrosourea and high salt induced carcinogenesis. *Thai J Gastroenterol.* 2010; 11, 41-8.
9. Sungpradit S, Nuchprayoon S, Chatsuwan T. Cost-effectiveness analysis of alkaline lysis, MagNa Pure, and phenol-chloroform DNA extraction methods followed by measurement of single gene copy number using quantitative real-time PCR for *Dirofilaria immitis* microfilaria. *Chula Med J.* 2010; 54, 549-61.
10. Wangsabtawin N, Premrudee J, Bouted P, Niwetpathomwat A, Chatsuwan T, Doungchawee G, Sailasuta A. Potential use of *Helicobacter pylori* Western blot for serodiagnosis. *J Health Res.* 2008; 22, 143-6.
11. Kulwichit W, Chatsuwan T, Unhasuta C, Pulsrikarn C, Bangtrakulnonth A, Chongthaleong A. Drug-resistant nontyphoidal *Salmonella* bacteremia, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2007;13, 501-2.
12. Kulwichit W, Nilgate S, Chatsuwan T, Krajiw S, Unhasuta C, Chongthaleong A. Accuracies of *Leuconostoc* Phenotypic Identification: A Comparison of API Systems and Conventional Phenotypic Assays. *BMC Infect Dis.* 2007;7:69.
13. Prachasilpchai W, Nuanualsuwan S, Chatsuwan T, Techangamsuwan S, Wangnaitam S, Sailasuta A. Diagnosis of *Helicobacter* spp. infection in canine stomach. *J Vet Sci.* 2007; 8,139-45.
14. Phongsamart W, Srifeungfung S, Dejsirilert S, Chatsuwan T, Nunthapisud P, Treerauthaweeraphong V, Rungnobbhakhun P, Chokeyhaibulkit K. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in Thai children younger than 5 years old, 2000-2005. *Vaccine.* 2007; 25,1275-80.

15. Thong-Ngam D. and Chatsuwan T. Antibacterial activity of *Aloe vera*, curcumin, garlic and plau-noi against *Helicobacter pylori*. Thai J Gastroenterol. 2007; 8, 5-11.
16. Sailasuta A, Niwetpathomwat A, Techangamsuwan S, Chatsuwan T, Duangchawee G, Puchadapirom P. The detection of antibody response during immunization with *Helicobacter pylori* in rabbits by indirect immunofluorescent assay (IFA). Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007; 38, SUP1, 240-4.
17. Prabjone R, Thong-Ngam D, Wisedopas N, Chatsuwan T and Patumraj S. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* on leukocyteendothelium interaction in the gastric microcirculation of *Helicobacter pylori*-infected rats. Clin Hemorheol Microcirc.2006;35,359-66.
18. Hiranrattana A, Mekmullica J, Chatsuwan T, Pancharoen C, Thisyakorn U. Childhood shigellosis at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand: a 5-year review (1996-2000). Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005; 36, 683-5.
19. Chatsuwan T, Amyes SG. Setting the standard for determining the in-vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to metronidazole. J Antimicrob Chemother. 1999 ;44, 291-3.
20. Charoenwongse P, Kangwanshiratada O, Chatsuwan T, Boonnam R, Tumwasorn S, Bhattarakosol P. The studies of HLA class II (HLA-DR) system by PCR-SSO typing and the relationship with serological method. J Med Assoc Thai. 1996;79 Suppl 1:522-32.

ผู้ร่วมวิจัย 1

- | | |
|---|---|
| 1.ชื่อ (ภาษาไทย) | นางสาววันทนา ปวีณกิตติพร |
| (ภาษาอังกฤษ) | Miss Wantana Paveenkittiporn |
| 2.หมายเลขบัตรประชาชน | 31018 00259 038 |
| 3.ตำแหน่งปัจจุบัน | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. หน่วยงาน | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ |
| อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000 เบอร์โทรศัพท์ 02-951-0000-11 ต่อ 99404 / 087-705-9541 | |
| 5 .ประวัติการศึกษา | |
| 2527 วท.บ.(จุลชีววิทยา) | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2538 M.App.Sc.(Biotechnology) | University of New South Wales |
| 2553 Ph.D.(Tropical Medicine) | มหาวิทยาลัยมหิดล |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Bacteriology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ผลงาน

1. Yamamoto T, Koyama Y, Matsumoto M, Sonoda E, Nakayama S, Uchimura M, **Paveenkittiporn W.**, Tamura K, Yokota TEcheverria P.1992. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *Journal of Infectious Disease*. 166:1295-310.
2. **Paveenkittiporn W.**, Ratchtrachenchai, O., 1994. Prevalent serogroups and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *Journal of Medical Technologist Association Thailand*. 22: 25-33.
3. Ratchtrachenchai, O., **Paveenkittiporn W.**1994. Identification of enterovasive *Escherichia coli* by colony-hybridization using DNA probe conjugated with horseradish Peroxidase. *Bulletin of the Department of Medical Sciences* 36: 20-24.
4. **Paveenkittiporn W.**, Dejsirilert S., Kusum M. *Legionella* species and Nontuberculous Mycobacteria in water reservoirs in the Ministry of Public Health and nearby Hospitals. *Journal of Health Science*. 7:338-47
5. **Paveenkittiporn W.**, Wootta W., Dejsirilert S., Harnwongsa T., Bovornkitti S. 2004. Pathogenic Organisms in Nature Hot Spring Water. *Journal of Health Science*13:27-31
6. Wootta W., Wanabongse P., **Paveenkittiporn W.**, Dejsirilert S., Kruasilp J, Charanasri C, and Bovornkitti S. 2004. Study of Nature Hot Springs: Rachaburi Province. *Journal of Health Science*. 13:32-6.
7. Kwanmuaeng H. , Wiwat L. , Sukthana Y., Lekkla A., Wootta W., **Paveenkittiporn W.**, Dejsirilert S., Kruasilp J, Suthikornchai C., Wanabongse P., Bovornkitti S. 2004. Study of Nature Hot Springs in Nakorn Si Thammarat and Surat Thani Provinces *Internal Medicine Journal of Thailand* 20: 168-73
8. Sudthikanawiwat S., Chanasit V., **Paveenkittiporn W.** , Wootta W., Wanabongse P., Dejsirilert S., Kruasilp J, Bovornkitti S. 2004. Study of Nature Hot Springs in Eastern Thailand. *Internal Medicine Journal of Thailand*. 20: 165-7
9. **Paveenkittiporn W.**, Karnpakdee U., Polwichai P., Chantaroj S., Dejsirilert S. 2005. Molecular Epidemiology of *Neisseria meningitidis* isolated from patients and asymptomatic carriers. *Bulletin of the Department of Medical Sciences* 13:27-31
10. Phares CR, Wangroongsarb P, Chantra S, **Paveenkittiporn W**, Tondella ML, Benson RF, Thacker WL, Moore MR, Fisher Jdowell SF, Olsen SJ. 2007. Epidemiology of severe pneumopnia caused by *Legionella longbeachae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydia pneumoniae*: 1-year, population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand. *Clinical Infectious Disease* 45(2): e147-55
11. **Paveenkittiporn W**, Apisarntharak A, Dejsirilert S, Trakulsomboon A, Thongmali O, Sawanpanyalert P, Aswapokee N. 2009 Five-Year Surveillance for *Burkholderia*

- pseudomallei* in Thailand from 2000 to 2004: Prevalence and Antimicrobial susceptibility. Journal of Medical Association of Thailand. 92-Suppl. 4. p. S46-S52
12. Paveenkittiporn W, Dejsirilert S, Kalambaheti T. 2012. Genetic speciation of environmental *Legionella* isolates in Thailand. Infection Genetic and Evolution 12:1368-1376.

ผู้ร่วมวิจัย 2

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง ผดุงศรี ดับส์
(ภาษาอังกฤษ) Padungsri Dubbs
2. หมายเลขบัตรประชาชน 3739900433660
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา และ หน่วยวิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำแบบคทีเรีย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 02-2015676 โทรสาร 02-5446411
E-mail Address padungsri.vic@mahidol.ac.th โทรศัพท์มือถือ 086-7727296

5. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	คุณวุฒิ	ปีการศึกษา	สถานศึกษา
ปริญญาตรี	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)	2524-2528	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาโท	M.S. (Biology)	2535-2538	University of Illinois at Urbana-Champaign, USA
ปริญญาเอก	Ph.D. (Microbiology)	2538-2544	Ohio State University, USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular Bacteriology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ผลงาน

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Paoli G.C., Vichivanives, P., and Tabita, F.R. 1998. Physiological control and *cbb* gene regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **180**:4258-4269.
- Vichivanives, P., Bird T.H, Bauer, C.E., and Tabita, F. R. 2000. Multiple regulators and their interactions *in vivo* and *in vitro* with the *cbb* regulons of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* **300**:1079-1099.
- Dubbs, P., Dubbs, J. M. and Tabita, F. R. 2004. Effector-mediated interaction of CbbR_I and CbbR_{II} regulators with target sequences in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **186**:8026-8035.
- Kansakar, P., Dorji, D., Chongtrakool, P., Mingmongkolchai, S., Mokmake, B. and Dubbs, P. 2011. Local dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a Thai hospital. *Microb. Drug Resist.* **17**: 109-119
- Eribo B., Mingmongkolchai S., Yan T., Dubbs P., Nelson K.E. 2012. Leptospire genomic diversity revealed by microarray-based comparative genomic hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 3045-50.