

การตรวจหายีนดื้อยาชนิดออกซาลิซิลิเนสในอะซิเน็ตแบคทีเรีย บอแมนนิโอ ที่แยกได้ จากโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช

Detection of Oxacillinase Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolated from the Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital

จิรารัตน์ สองสี^{1*} สุมนทา กล้าคง² หวันต์สกิน ปะดุกา³ อาชีเยาะ หะมะ⁴ และปิยะวิทย์ อรชร⁵
Jirarat Songsri^{1*}, Sumonta Klakong², Wantaskeen Paduka³, Arseeyoh Ha-ma⁴ and Piyawit Orachorn⁵

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหายีนดื้อยาชนิดออกซาลิซิลิเนสในอะซิเน็ตแบคทีเรีย บอแมนนิโอ จำนวน 68 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช การหาค่าความเข้มข้นของยาอิมิพีแนมและเมโรพิแนมที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธี agar dilution พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดคือต่อยาอิมิพีแนมและเมโรพิแนม โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 16 ถึง 64 และ 16 ถึง ≥ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การตรวจหายีนดื้อยาชนิด bla_{OXA-23} -like, bla_{OXA-24} -like, bla_{OXA-51} -like และ bla_{OXA-58} -like โดยวิธี multiplex-PCR พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลต (ร้อยละ 100) มียีน bla_{OXA-23} ซึ่งเป็นยีนดื้อยาที่พบบ่อยในอะซิเน็ตแบคทีเรีย บอแมนนิโอ ที่ต่อยาคาร์บาเพนิมส์ ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลสำคัญแก่เจ้าหน้าที่ในการหามาตรการเพื่อเฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาในโรงพยาบาลต่อไป

คำสำคัญ: อะซิเน็ตแบคทีเรีย บอแมนนิโอ อ็อกซาลิซิลิเนส bla_{OXA-23}

¹ อ.ดร., สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

² นักเทคนิคการแพทย์ งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลค่ายฉัตรบุรี นครศรีธรรมราช 80000

³ นักเทคนิคการแพทย์ งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิระภูเก็ต 83000

⁴ นักเทคนิคการแพทย์ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลศรีสาคร 96150

⁵ นักเทคนิคการแพทย์ กลุ่มงานจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช 80000

¹ Lecturer, Dr., Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Walailak University, 80161

² Medical technologist, Blood Transfusion Medicine Section, Wachirawut Camp Hospital, 80000

³ Medical technologist, Blood Transfusion Medicine Section, Vachira Phuket Hospital, 83000

⁴ Medical technologist, Medical Technology Unit, Srisakorn Hospital, 96150

⁵ Medical technologist, Clinical Microbiology Unit, Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital, 80160

* Corresponding author: Tel.:075-672138. E-mail address: jirarat.so@wu.ac.th

Abstract

This study aims to detect oxacillinase genes in 68 isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from clinical isolates in Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital. The minimal inhibitory concentration (MIC) of imipenem and meropenem for all isolates were determined by an agar dilution method. All isolates were resistant to imipenem and meropenem. The MIC range of imipenem and meropenem was 16 to 64 and 16 to ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The presence of *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, *bla*_{OXA-51}-like และ *bla*_{OXA-58}-like genes was explored using multiplex-PCR amplification. The results showed that all isolates (100%) harbored *bla*_{OXA-23} gene which is frequently found in carbapenem-resistant *A. baumannii*. These findings are needed for hospital staff to find measures for surveillance, control and prevention of antimicrobial agent resistant bacteria in hospital.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Oxacillinase, *bla*_{OXA-23}

บทนำ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสั้นขนาดเล็กคล้ายรูปกลม (Gram-Negative Coccobacilli) ไม่หมักย่อยน้ำตาล (Non-Fermentative Bacteria) เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล (Nosocomial Infection) ที่พบได้บ่อย เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อของบาดแผล และการติดเชื้อในกระแสเลือด [1] คาร์บาพีแนมส์ (Carbapenems) เป็นยาในกลุ่ม beta-lactams ที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับยาคณะอื่น ๆ ในกลุ่มนี้ และทนต่อเอนไซม์ beta-lactamases หลายชนิด เช่น เอนไซม์ Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBLs) แต่ไม่ทนต่อการถูกทำลายโดยเอนไซม์คาร์บาพีแนมเอส (Carbapenemases) เช่น *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), Metallo-Beta-Lactamases (MBLs) หรือ Oxacillinases (OXA) ดังนั้น คาร์บาพีแนมส์จึงเป็นยาทางเลือกสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิด เช่น *Pseudomonas aeruginosa* หรือ *A. baumannii* ตลอดจนแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs เป็นต้น [2] ตัวอย่างยาในกลุ่มคาร์บาพีแนมส์ ได้แก่ Imipenem, Panipenem, Meropenem, Biapenem, Ertapenem, Doripenem และ Tebipenem [2] มีการรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *A. baumannii* เพิ่มสูงขึ้นในประเทศไทย [3] โดยอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2-4 เป็นร้อยละ 10-30 ซึ่งพบมากในหอผู้ป่วย [4] ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเลือกยาที่เหมาะสม ต้องใช้ยาราคาแพงและมีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อการรักษาในปัจจุบันและอนาคต กลไกการดื้อยากลุ่มคาร์บาพีแนมส์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่มักพบบ่อย ได้แก่ การผลิตเอนไซม์คาร์บาพีแนมเอส โดยส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ชนิด OXA และ MBLs ซึ่งมีการรายงานจากประเทศต่างๆ ทั่วโลก เช่น ยุโรป อเมริกาเหนือ อาร์เจนตินา บราซิล ฝรั่งเศส สเปน เบลเยียม สิงคโปร์ จีน ฮองกง ไต้หวัน เกาหลีใต้ เป็นต้น หรือเกิดจากการขาดหายไปหรือการลดจำนวนของโปรตีน porin หรือ Outer Membrane Proteins (OMPs) หรือเกิดจากแบคทีเรียมีกลไกในการขับยาออกจากเซลล์โดยการสร้าง Efflux Pump หรือเกิดจากการลดการแสดงออกของ Penicillin-Binding Proteins (PBPs) [5]

เอนไซม์คาร์บาพีแนมเอสชนิด OXA เป็นเอนไซม์ beta-lactamases ที่อยู่ใน class D ซึ่งสามารถสลายยากลุ่มเพนิซิลลิน ออกซาลิซิน และคาร์บาพีแนมส์ ได้ เอนไซม์ชนิดนี้จะไม่ถูกยับยั้งโดย Ethylene Diaminetetraacetic Acid (EDTA) และ Clavulanic Acid (CA) [6-7] ปัจจุบันสามารถจำแนกชนิดของเอนไซม์ OXA ที่สลายยากลุ่มคาร์บาพีแนมส์ออกเป็น 5 กลุ่มตามความเหมือนกันหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ได้แก่ กลุ่ม OXA-23-like ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ชนิด OXA-23 OXA-27 และ OXA-49 กลุ่ม OXA-24-like ประกอบด้วยเอนไซม์ชนิด OXA-24 OXA-25 OXA-26,

OXA-40 และ OXA-143 กลุ่ม OXA-51-like ประกอบด้วยเอนไซม์ชนิด OXA-51 OXA-64 OXA-65 OXA-66 OXA-68 OXA-69 OXA-70 OXA-71 OXA-78 OXA-79 OXA-80 OXA-82 OXA-83 และ OXA-109 กลุ่ม OXA-58-like ซึ่งมีเอนไซม์ OXA-58 เพียงชนิดเดียว และกลุ่ม OXA-143-like ซึ่งจะมีเอนไซม์ OXA-143 เพียงชนิดเดียว [8] แบคทีเรียที่มียีนคือยาคัดลอกเหล่านี้สามารถถ่ายทอดยีนคือยาไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้ โดยผ่านทางโครโมโซม พลาสมิด หรือ Mobile Element ทำให้เกิดการแพร่กระจายและมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อคือยามากขึ้น [9] ปัจจุบันมีรายงานเชื้อ *A. baumannii* คือต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิมส์ โดยการผลิตเอนไซม์คาร์บาเพนิมชนิด OXA จากประเทศต่างๆ ทั่วโลกเพิ่มขึ้น เช่น มีรายงานการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* ที่คือยากลุ่มคาร์บาเพนิมส์โดยการสร้างเอนไซม์ OXA-23 ในบริเวณทวีปอเมริกาใต้ ยุโรป เอเชีย และออสเตรเลีย มีรายงานการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* ที่ผลิตเอนไซม์ OXA-24 หรือ OXA-40 ในบริเวณทวีปอเมริกาเหนือ และนอกจากนี้มีรายงานการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* ที่ผลิตเอนไซม์ OXA-58 ในบางประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรป และออสเตรเลีย [9-10] สำหรับในประเทศไทยจากการสำรวจความไวของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ต่อยา imipenem ในโรงพยาบาลศูนย์จำนวน 8 แห่ง ในปี พ.ศ. 2541 พบเชื้อคือต่อยา imipenem คิดเป็นร้อยละ 4 [11] จากนั้นมีการศึกษาอุบัติการณ์และความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาด้านจุลชีพชนิดต่างๆ ในช่วงปี พ.ศ. 2543-2548 โดยการรวบรวมข้อมูลการทดสอบความไวของเชื้อคือยาจากโปรแกรม WHONET ที่ส่งจากโรงพยาบาลในเครือข่ายเฝ้าระวังเชื้อคือยาด้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand, NARST) จำนวน 28 แห่งทั่วประเทศไทย พบเชื้อ *A. baumannii* มีการคือต่อยา imipenem เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.1 ในปี พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 46.7 ในปี พ.ศ. 2548 โดยในปี พ.ศ. 2548 พบเชื้อ *A. baumannii* ที่คือต่อยา imipenem ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง กรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ คิดเป็นร้อยละ 60.2 54.3 51.2 44.1 44.0 และ 23.5 ตามลำดับ [12] ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะตรวจหายีนคือยาคัดลอก OXA ในแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่คือต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิมส์ ที่แยกได้จากโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช เพื่อจะทราบกลไกการคือยากลุ่มคาร์บาเพนิมส์ในแบคทีเรียชนิดนี้

วิธีการวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา แบคทีเรีย *A. baumannii* จำนวน 68 ไอโซเลต ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ชนิดเสมหะ เลือด หนอง ปัสสาวะ และน้ำไขสันหลัง จำนวน 50, 8, 5, 4, และ 1 ตามลำดับ และเป็นผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำรายกันในโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2554 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2555 โดยแบคทีเรียเหล่านี้ให้ผลคือต่อยา imipenem และ/หรือ meropenem ด้วยวิธี disk diffusion โดยมีขนาดโซนยับยั้งต่อยา imipenem (10 ไมโครกรัม) และ meropenem (10 ไมโครกรัม) เท่ากับหรือน้อยกว่า 15 มิลลิเมตร [13]

การทดสอบความไวของเชื้อคือยาด้านจุลชีพ การหาค่าความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี agar dilution โดยการทดสอบความเข้มข้นของยา imipenem และ meropenem ในช่วงความเข้มข้น 0.25 ถึง 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อที่ใช้ในการทดสอบประมาณ 10^4 CFU/spot สำหรับแบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการทดสอบนี้ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 [13-14]

การตรวจหายีน oxacillinases (OXA) แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบทั้งหมด และแบคทีเรียอ้างอิงที่ไม่มียีนคือยา OXA ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27853 จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้ม จากนั้นนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาตรวจหายีน *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, *bla*_{OXA-51}-like และ *bla*_{OXA-58}-like ด้วยวิธี multiplex-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 1 [15] สำหรับปริมาณสุดท้ายของปฏิกิริยา multiplex-PCR เท่ากับ 25 ไมโครลิตร โดยมีปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ จำนวน 2 ไมโครลิตร และมีความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนผสมต่างๆ ได้แก่ ไพรเมอร์แต่ละเส้น, PCR buffer (Vivantis, Malaysia), Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs) (Vivantis, Malaysia), MgCl₂ (Vivantis, Malaysia) และเอนไซม์ Taq DNA

polymerase (Vivantis, Malaysia) เท่ากับ 0.80 ไมโครโมลาร์, 1x, 200 ไมโครโมลาร์, 2 มิลลิโมลาร์ และ 0.63 ยูนิต ตามลำดับ เพิ่มจำนวนของยีนที่สนใจโดยใช้เครื่อง PCR Mycycler™ (Biorad, England) สำหรับขั้นตอนการทำ multiplex-PCR ดังแสดงในตารางที่ 2 จากนั้นตรวจ PCR product ของยีนคือยา OXA (ตารางที่ 1) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel (Vivantis, Malaysia)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาชนิดยีน *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, *bla*_{OXA-51}-like และ *bla*_{OXA-58}-like [15]

ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด PCR product (bp)
<i>bla</i> _{OXA-23} -like	OXA23-F	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501
	OXA23-R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	
<i>bla</i> _{OXA-24} -like	OXA24-F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246
	OXA24-R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	
<i>bla</i> _{OXA-51} -like	OXA51-F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353
	OXA51-R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
<i>bla</i> _{OXA-58} -like	OXA58-F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599
	OXA58-R	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการทำ multiplex-PCR ในการตรวจหาชนิดยีน OXA [15]

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ (รอบ)
Initiation Denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	25 วินาที	30
Annealing	52	40 วินาที	
Extension	72	50 วินาที	
Final Extension	72	6 นาที	1

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน นำ PCR product ของยีนที่ตรวจพบมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek Inc., USA) จากนั้นตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน OXA ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยใช้ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ที่จำเพาะกับยีน OXA (ตารางที่ 1) เป็น sequencing primer ที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วย่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ความเหมือนกับยีน OXA ชนิดต่างๆ ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

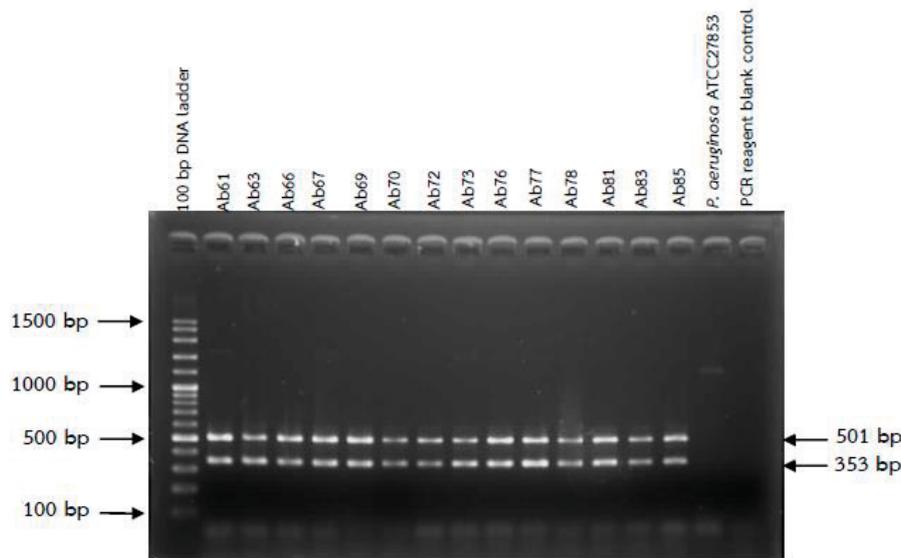
จากการนำแบคทีเรีย *A. baumannii* จำนวน 68 ไอโซเลต ซึ่งแยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยชนิดเสมหะ เลือด ปัสสาวะ หนอง และน้ำไขสันหลัง จำนวน 50 8 5 4 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ มาทดสอบความไวของเชื้อต่อยา imipenem และ meropenem ด้วยวิธี agar dilution พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดคือต่อยาทั้งสองชนิดสูง โดยมีค่า MIC ต่อยา imipenem อยู่ในช่วง 16 ถึง 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ เท่ากับ 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่มีค่า MIC ต่อยา meropenem อยู่ในช่วง 16 ถึง ≥128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ เท่ากับ 64 และ ≥128 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิเมตร (ตารางที่ 3) เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาตรวจหาชนิด OXA พบว่าแบคทีเรียทุกตัวอย่าง ตรวจพบ PCR product ขนาด 501 bp และ 353 bp (ภาพที่ 1) จากนั้นได้นำ PCR product ขนาด 501 bp และ 353 bp จากแบคทีเรียไอโซเลต Ab1 Ab26 Ab61 และ Ab116 ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วตรวจวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน OXA ชนิดต่างๆ ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า PCR product ขนาด 501 bp จากแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต มีความเหมือนกับยีน *bla_{OXA-23}* (GenBank accession no. LC103136.1) ร้อยละ 100 ในขณะที่ PCR product ขนาด 353 bp จากแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต มีความเหมือนกับยีน *bla_{OXA-51}* (GenBank accession no. KY126228.1) ร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 68 ไอโซเลต มียีน *bla_{OXA-23}* ร่วมกับ *bla_{OXA-51}* คิดเป็นร้อยละ 100 แบคทีเรียที่มียีน *bla_{OXA-23}* จะมีการสร้างเอนไซม์ OXA-23 มาทำลาย beta-lactam ring ในโครงสร้างของยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ แบคทีเรียจึงเกิดการดื้อยาขึ้น สำหรับยีน *bla_{OXA-51}* ซึ่งเป็นยีนที่พบโดยธรรมชาติใน *A. baumannii* และสามารถใช้นี้ในการพิสูจน์ชนิดของ *A. baumannii* ได้ [16] แต่หากมี insertion sequence เช่น *ISAbal* หรือ *ISAbag* สอดแทรกอยู่ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *bla_{OXA-51}* ทำให้มีการแสดงออกของยีนชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น (Overexpression) ส่งผลให้ *A. baumannii* ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ได้ [17-18] อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจหา insertion sequence ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *bla_{OXA-51}* จึงอาจจะยังไม่สามารถบอกได้ว่าการดื้อยา กลุ่มคาร์บาเพนิมส์ของแบคทีเรียเกิดจากการมี *bla_{OXA-51}* ร่วมด้วย สำหรับความชุกของแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา กลุ่มคาร์บาเพนิมส์ โดยมียีน *bla_{OXA-23}* ในการศึกษาที่สูงใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่นๆ ที่เคยมีรายงานทั้งจากประเทศไทยหรือประเทศอื่นๆ ที่พบว่าแบคทีเรีย *A. baumannii* ส่วนใหญ่ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ เกิดจากการที่แบคทีเรียมียีน *bla_{OXA-23}* โดย Niomsup และคณะ [19] ได้รายงานการพบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก โดยการสร้างเอนไซม์ OXA-23 เป็นครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *A. baumannii* บางไอโซเลต ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ โดยการสร้างเอนไซม์ OXA-23 ร่วมกับเอนไซม์ MBLs ชนิด IMP ต่อมา Thapa และคณะ [20] ได้รายงานการพบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ โดยการสร้างเอนไซม์ OXA-23 ในโรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร และเมื่อไม่นานมานี้ ศิริมา และคณะ [21] พบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกของผู้ป่วยในของโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี มียีน *bla_{OXA-23}* คิดเป็นร้อยละ 100 หรือรายงานจากประเทศต่างๆ ทั่วโลก เช่น มีรายงานการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์โดยการสร้างเอนไซม์ OXA-23 ในบริเวณทวีปอเมริกาใต้ ยุโรป เอเชีย และออสเตรเลีย [10]

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความไวของแบคทีเรีย *A. baumannii* ทั้ง 68 ไอโซเลต ต่อยา imipenem และ meropenem ด้วยวิธี agar dilution

สารต้านจุลชีพ	MIC Breakpoint ^a			MIC (µg/ml)	
	S	R	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Imipenem (0.25-128)	≤4	≥16	16 ถึง 64	32	64
Meropenem (0.25-128)	≤4	≥16	16 ถึง ≥128	64	≥128

^aClinical and Laboratory Standard Institute (2012); S, Susceptible; R, Resistant



ภาพที่ 1 การตรวจหาชนิดของยีน OXA ในแบคทีเรียตัวอย่าง Ab61, Ab63, Ab66, Ab67, Ab69, Ab70, Ab72, Ab73, Ab76, Ab77, Ab78, Ab81, Ab83, Ab85 ด้วยวิธี multiplex-PCR

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความชุกของแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่มียีนคือยีนชนิด OXA จากแบคทีเรียจำนวน 68 ไอโซเลต ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ราชบุรี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 68 ไอโซเลต (ร้อยละ 100) มียีน *bla_{OXA-23}* แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คือคือยีนกลุ่มคาร์บาเพนิมเกิดจากแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ชนิด OXA-23 ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับแพทย์ในการเลือกใช้ยาในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องเหมาะสม และช่วยให้เจ้าหน้าที่ในโรงพยาบาลได้ตระหนักถึงการหามาตรการในการวางแผนป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของแบคทีเรียคือยีนในโรงพยาบาลต่อไป

คำขอขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณวดี ชนะวงษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับความอนุเคราะห์แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ และขอขอบพระคุณ คุณปิยวิทย์ อรรถร นักเทคนิคการแพทย์ หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ราชบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Maragakis, L.L. and Perl, T.M. (2008). "Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options", *Clinical Infectious Diseases*. 46(8), 1254-1263.
- [2] Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A. and Bonomo, R.A. (2011). "Carbapenems: past, present, and future", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(11), 4943-4960.

- [3] Dejsirilert, S., Tiengrim, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N. and Malathum, K. (2009). "Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*: six years of National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) Surveillance", **Journal of the Medical Association of Thailand**. 92(Suppl4), S34-S45.
- [4] Saelao, S. and Utiswannakul, A. (2008). "Therapy for patient with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*", **Journal of Health Research**. 22(3), 131-136.
- [5] Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N. and Bonomo, R.A. (2007). "Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51(10), 3471-3484.
- [6] Ambler, R.P. (1980). "The structure of β -lactamases", **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. 289(1036), 321-331.
- [7] Bush, K., Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A. (1995). "A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 39(6), 1211-1233.
- [8] Opazo, A., Dominguez, M., Bello, H., Amyes, S.G.B. and Gonzalez-Rocha, G. (2012). "OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America", **The Journal of Infection in Developing Countries**. 6(4), 311-316.
- [9] Peleg, A.Y., Seifert, H. and Paterson, D.L. (2008). "*Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen", **Clinical Microbiology Reviews**. 21(3), 538-582.
- [10] Zarrilli, R., Giannouli, M., Tomasone, F, Triassi, M. and Tsakris, A. (2009). "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities", **The Journal of Infection in Developing Countries**. 3(5), 335-341.
- [11] Biedenbach, D.J., Johnson, D.M. and Jones, R.N. (1999). "In vitro evaluation of cefepime and other broad-spectrum β -lactams in eight medical centers in Thailand", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 35(4), 325-331.
- [12] Dejsirilert, S., Tiengrim, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N. and Malathum, K. (2009). "Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*: six years of National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) surveillance", **Journal of the Medical Association of Thailand**. 92(Suppl 4), S34-S45.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement, M100-S22** (22nd ed). Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [14] Washington, J.A. (1985). **Laboratory procedures in clinical microbiology** (2nd ed). New York: Springer-Verlag.
- [15] Woodford, N., Ellington, M.J., Coelho, J.M., Turton, J.F., Ward, M.E., Brown, S. *et al.* (2006). "Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.", **International Journal of Antimicrobial Agents**. 27(4), 351-353.
- [16] Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L. (2006). "Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species", **Journal of Clinical Microbiology**. 44(8), 2974-2976.
- [17] Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M. *et al.* (2006). "The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*", **FEMS Microbiology Letters**. 258(1), 72-77.

- [18] Figueiredo, S., Poirel, L., Papa, A., Koulourida, V. and Nordmann, P. (2009). "Overexpression of the naturally occurring *bla*_{OXA-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS*Aba9*" , **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 53(9), 4045-4047.
- [19] Niumsup, P.R., Boonkerd, N., Tansawai, U. and Tiloklurs, M. (2009). "Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand" , **Japanese Journal of Infectious Diseases**. 62(2), 152-154.
- [20] Thapa, B., Tribuddharat, C., Srfuengfung, S. and Dhiraputra, C. (2010). "High prevalence of *bla*_{OXA-23} in oligoclonal carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand" , **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 41(3), 625-635.
- [21] ศิริมา สุวรรณกัญ จันต๊ะมา รัชฎพงษ์ คุณะวัฒน์กุล ศุภเดช แสงसानนท์ ศราวุฒิ เสมารัมย์ นิตยา วีระวัฒน์สุข และ เขมวิทช์ จันต๊ะมา. (2556). "ตรวจสอบเอนไซม์คาร์บาพีนิเมสและยีนกลุ่ม *bla*_{OXA-23} ในแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* ที่ติดต่อจากกลุ่มคาร์บาพีเนมในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์" , **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน**. 9(2), 99-109.