

Prevalence of Oxacillinase and Metallo- β -lactamases Genes in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients at Srisangworn Sukhothai Hospital during 2010-2011

Sirilak Teeraputon^{1*}, Waraporn Daeng-art¹, Chanikarn Aiemkrang²,
Natwadee Gamyingsakun² and Valasinee Sangthai²

¹Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Srisangworn Hospital,
Sukhothai Province, Thailand

²Department of Medical Technology, Allied Health Sciences Faculty, Naresuan University,
Phitsanulok Province, Thailand

Abstract

Acinetobacter baumannii is an important nosocomial pathogen with high incidence of carbapenem resistance. It affects the choice of medication in the treatment of infectious diseases. The objective of this study was to determine the prevalence of carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) isolated from patients at Srisangworn Sukhothai Hospital during November 2010 to December 2011. Total of 121 strains were screened for carbapenemase production by disk diffusion. Then the oxacillinase (OXA) and metallo- β -lactamases (MBLs) genes were detected using multiplex PCR. The result showed that 89 strains were resistant to meropenem (73.55%). Three OXA genes; *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like} and *bla*_{OXA-58-like}, and four MBLs genes; *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SIM-1} were identified. The *bla*_{OXA-51-like} gene was the most common OXA genes found in every strain (100%), followed by *bla*_{OXA-23-like} (19.10%) and *bla*_{OXA-58-like} (7.87%), respectively. Organisms containing both OXA and MBLs genes were found in 17 strains (19.10%). In addition, 38 strains with more than one genes were found (42.70%). The results inform the prevalence and distribution of OXA and MBLs genes in *A. baumannii* of Srisangworn Sukhothai Hospital as a guideline for further surveillance and prevention of drug-resistant strains.

Keywords: Carbapenemase, Metallo- β -lactamases, Oxacillinase, Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

*Corresponding author E-mail address: sirilakt@nu.ac.th, ams027@hotmail.com

Received: 29 September 2022

Revised: 6 December 2022

Accepted: 6 January 2023

ความชุกของยีน Oxacillinase และ Metallo- β -lactamases ในเชื้อ Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย ปี พ.ศ. 2553-2554

ศิริลักษณ์ อีระภุช¹ วราภรณ์ แดงอา¹ ชนิกานต์ เอี่ยมกร่าง² ณัฐวดี งามยิ่งสกุล²
และ วาลาสิณี แสงไทย²

¹กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย จังหวัดสุโขทัย

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในโรงพยาบาลที่สำคัญ และมีอุบัติการณ์การดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ที่สูงขึ้น ส่งผลต่อการเลือกใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2553 ถึงเดือนธันวาคม 2554 จำนวน 121 สายพันธุ์ โดยตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี disk diffusion และตรวจหายีน oxacillinase (OXA) และ metallo- β -lactamases (MBLs) ด้วยวิธี multiplex PCR พบเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา meropenem จำนวน 89 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 73.55 และพบยีน OXA จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ $bla_{OXA-23-like}$, $bla_{OXA-51-like}$ และ $bla_{OXA-58-like}$ และยีน MBLs จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ bla_{VIM} , bla_{SPM-1} , bla_{IMP} และ bla_{SIM-1} โดยยีน OXA ที่พบมากที่สุดคือ ยีน $bla_{OXA-51-like}$ โดยพบในเชื้อทุกสายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 100 รองลงมาคือ $bla_{OXA-23-like}$ และ $bla_{OXA-58-like}$ คิดเป็นร้อยละ 19.10 และ 7.87 ตามลำดับ ส่วนยีน MBLs ที่พบมากที่สุด คือ bla_{VIM} คิดเป็นร้อยละ 12.36 รองลงมาคือ bla_{SPM-1} , bla_{IMP} และ bla_{SIM-1} คิดเป็นร้อยละ 5.62, 1.12 และ 1.12 ตามลำดับ และพบเชื้อที่มียีนร่วมกันระหว่าง OXA และ MBLs จำนวน 17 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 19.10 นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่มียีนมากกว่าหนึ่งชนิด จำนวน 38 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 42.70 จากการศึกษาทำให้ทราบถึงความชุกและการแพร่กระจายของยีน OXA และยีน MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* ของโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัยเพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาต่อไป

คำสำคัญ: เอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส, Metallo- β -lactamases, Oxacillinase, *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนม

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sirilakt@nu.ac.th, ams027@hotmail.com

รับบทความ: 29 กันยายน 2565

แก้ไขบทความ: 6 ธันวาคม 2565

รับตีพิมพ์บทความ: 6 มกราคม 2566

บทนำ

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถก่อให้เกิดโรคได้ในทุกระบบของร่างกาย และเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะในผู้ป่วยวิกฤติ⁽¹⁾ ปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งทวีความรุนแรงมากขึ้นและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในกลุ่มคาร์บาเพนิม ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactam ที่สามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้กว้างที่สุด และเป็นยาทางเลือกท้ายๆ สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา จากรายงานสถานการณ์เชื้อดื้อยาของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย (National Anti-microbial Resistant Surveillance Center Thailand; NARST) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2564 พบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ดื้อยา imipenem เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5.8 ในปี พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 30.4, 47.5, 58.2, 67.4 และ 74.3 ในปี พ.ศ. 2546, 2548, 2552, 2560 และ 2564 และมีอัตราการดื้อยา meropenem เพิ่มขึ้นเช่นกัน จากร้อยละ 45.5 ในปี พ.ศ. 2558 เป็นร้อยละ 66.9 ในปี พ.ศ. 2561 และเป็นร้อยละ 74.2 ในปี พ.ศ. 2564 นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาด้านจุลชีพหลายขนาน (multidrug resistance - *A. baumannii*; MDR-*A. baumannii*) ที่เพิ่มสูงขึ้นทุกปี โดยเฉพาะการดื้อยาด้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์แรงที่สุดและเป็นยารักษาหายๆ สำหรับการรักษาติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีอัตราเพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 64.7 ในปี พ.ศ. 2556⁽²⁾ และจากแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาด้านจุลชีพประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2560-2564 ได้จัดให้เชื้อ *Acinetobacter* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อใน

โรงพยาบาล⁽³⁾ ต้องมีการแจ้งเตือนระดับประเทศ และเป็นเชื้อดื้อยาที่องค์การอนามัยโลก (WHO) แนะนำให้มีการเฝ้าระวัง ซึ่งกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิม ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ carbapenem hydrolyzing β -lactamase ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ oxacillinase (OXA) และเอนไซม์ metallo- β -lactamase (MBLs) เชื้อเหล่านี้สามารถถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการดื้อยาผ่านทางโครโมโซม พลาสมิด หรือ mobile element ทำให้สามารถแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียอื่นได้ และส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อดื้อยามากขึ้น ทำให้เกิดความยากลำบากในการเลือกยาที่เหมาะสม ต้องใช้ยาราคาแพงและมีฤทธิ์ที่รุนแรงมากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อการรักษาทั้งในปัจจุบันและในอนาคตทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ทั่วโลก⁽⁴⁾

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจคัดกรองหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *A. baumannii* อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการตรวจทางจีโนมไทป์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR)⁽⁵⁾ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาพื้นที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มีประโยชน์และช่วยลดระยะเวลาในการตรวจหาการดื้อยาได้ ทำให้สามารถควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว และทำให้มีข้อมูลในการศึกษาทางระบาดวิทยาได้ต่อไป และยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาของเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) ของโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาชนิดของยีนดื้อยา carbapenem ทั้งยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ OXA และยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs ในเชื้อ CRAB ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศรีสังวรสุโขทัย

วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยเป็นผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำรายกันของโรงพยาบาลศรีสวรรค์สุโขทัย จังหวัดสุโขทัย ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 จำนวน 130 สายพันธุ์ ได้นำมาพิสูจน์ชนิดเชื้อซ้ำ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar, chocolate agar, MacConkey agar และการทดสอบทางชีวเคมี⁽⁶⁻⁷⁾ โดยโครงการวิจัยนี้ ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ECNU03-2: HE 55-Ex1-0059)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธี disk diffusion

ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยเจือจางเชื้อใน normal saline solution ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นนำเชื้อมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar นำแผ่นยามาวางบนผิวหน้าอาหาร ได้แก่ amikacin (30 ไมโครกรัม), gentamycin (10 ไมโครกรัม), ciprofloxacin (30 ไมโครกรัม), tetracyclin (30 ไมโครกรัม), cefotaxime (30 ไมโครกรัม), ceftazidime (30 ไมโครกรัม), ceftriazone (30 ไมโครกรัม) และ meropenem (10 ไมโครกรัม) แล้วนำไปบ่มที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และอ่านผลการทดสอบโดยวัด inhibition zone ตามมาตรฐาน CLSI M100-S22⁽⁸⁾ แล้วคัดกรองหาเชื้อ *A. baumannii* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยให้ผลการทดสอบเป็นคอตายา meropenem

การตรวจหาเอนไซม์การสร้างเอนไซม์ Oxacillinase และ Metallo-β-lactamases ด้วยวิธี Multiplex PCR

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *Acinetobacter* spp. หลังการบ่มเพาะข้ามคืนใน Tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด microtube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส (supernatant) แล้วนำตะกอนที่ได้ไปผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียว เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน โดยวิธี

Multiplex PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ได้แก่ กลุ่มยีน OXA และกลุ่มยีน MBLs โดยใช้เทคนิค multiplex PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ ดังแสดงใน Table 1 โดยแบ่งเทคนิค multiplex PCR ออกเป็น 2 ชุด การทดสอบ; ชุดที่ 1 สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มยีน OXA ได้แก่ *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} และ *bla*_{OXA-58-like} และชุดที่ 2 สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มยีน MBLs ได้แก่ *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SIM-1} และ *bla*_{SPM-1} โดยชุดน้ำยาการทดสอบปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2 × RBC blue Taq Mastermix (20 มิลลิโมลาร์ KCl, 3 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (พีเอช 8.3), 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA, 20 มิลลิโมลาร์ (NH₄)₂SO₄, 0.4 มิลลิโมลาร์ dNTP mix, 0.15 ยูนิตต่อไมโครลิตร

Table 1 Primers used for carbapenemase genes detection.

Gene	Primer	Sequences (5' to 3')	Product size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23-F	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'	501	(9)
	OXA-23-R	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'		
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	OXA-24-F	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	246	(9)
	OXA-24-R	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3		
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51-F	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	353	(9)
	OXA-51-R	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'		
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA-58-F	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3	599	(9)
	OXA-58-R	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3		
<i>bla</i> _{IMP-like}	IMP-23-F	5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C-3'	188	(5)
	IMP-23-R	5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATC T-3'		
<i>bla</i> _{VIM-like}	VIM-F	5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A-3'	390	(5)
	VIM-R	5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'		
<i>bla</i> _{GIM-1}	GIM-F	5'-TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA-3'	477	(5)
	GIM-R	5'-AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC-3'		
<i>bla</i> _{SIM-1}	SIM-F	5'-TAC AAG GGA TTC GGC ATC G-3'	570	(5)
	SIM-R	5'-TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG-3'		
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM-F	5'-AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG-3'	271	(5)
	SPM-R	5'-ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG-3'		

Note : a) F, sense primer; R, antisense primer, b) Y = C or T, c) S = G or T

RBC *Taq* DNA polymerase, stabilizers, blue dye (บริษัท RBC Bioscience) และมีความเข้มข้นของ forward primers และ reverse primers เท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ และ DNA template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วดำเนินการทดสอบโดยใช้เครื่อง thermocycler บริษัท Bio-Rad โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และขั้นที่ 2 การเพิ่มปริมาณยีน จำนวน 36 รอบ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน

30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที และขั้นตอน final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

จากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ได้ (PCR product) ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 (2% agarose gel electrophoresis) ใน 0.5 × TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 35 นาที และใช้ 100 base pairs DNA ladder เป็น DNA

marker นำเจลไปย้อมด้วยสีพิเศษเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพเก็บไว้ เปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอ ที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของเชื้อควบคุม โดยเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวกของยีน oxacillinase คือ *A. baumannii* ATCC BAA-2896 (bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-58}), *A. baumannii* ATCC BAA-2882 (bla_{OXA-24}) และ *A. baumannii* ATCC BAA-2893 (bla_{OXA-51}) และเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวกของยีน MBLs คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA-3103 (bla_{VIM}), *P. aeruginosa* ATCC BAA-3093 (bla_{IMP}) และ *P. aeruginosa* (Lab strain; bla_{GIM} , bla_{SIM} และ bla_{SPM}) และเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลลบ คือ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* ATCC 25922

ผลการวิจัย

ตัวอย่างเชื้อ *Acinetobacter* spp. จำนวน 130 สายพันธุ์ จากสิ่งส่งตรวจ เสมหะ (ร้อยละ 78.46) ปัสสาวะ (ร้อยละ 5.39) หนอง (ร้อยละ 9.23) และเลือด (ร้อยละ 6.92) ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยา meropenem ด้วยวิธี disk diffusion และผลการตรวจหายีน $bla_{OXA-51-like}$ พบเป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 121 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นเชื้อ *A. baumannii* ที่ให้ผลดื้อต่อยา meropenem จำนวน 89 สายพันธุ์ และให้ผลไวต่อยา meropenem จำนวน 32 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 73.55 และร้อยละ 26.45 ตามลำดับ (Table 2) และเมื่อตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีน OXA จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ $bla_{OXA-23-like}$,

$bla_{OXA-51-like}$ และ $bla_{OXA-58-like}$ และยีน MBLs จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ bla_{VIM} , bla_{SPM-1} , bla_{IMP} และ bla_{SIM-1} โดยยีน OXA ที่พบมากที่สุดคือยีน $bla_{OXA-51-like}$ ซึ่งพบในเชื้อ CRAB ทุกสายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 100 รองลงมาคือ ยีน $bla_{OXA-23-like}$ และยีน $bla_{OXA-58-like}$ คิดเป็นร้อยละ 19.10 (17/89) และ 7.87 (7/89) ตามลำดับ โดยพบเป็นเชื้อ CRAB ที่มียีน OXA มากกว่า 1 ชนิด จำนวน 38 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 42.70 คือ พบยีน $bla_{OXA-51-like}$ ร่วมกับ $bla_{OXA-23-like}$ จำนวน 17 สายพันธุ์ และยีน $bla_{OXA-51-like}$ ร่วมกับ $bla_{OXA-58-like}$ จำนวน 7 สายพันธุ์ ในส่วนของยีน MBLs ที่พบมากที่สุดคือยีน bla_{VIM} คิดเป็นร้อยละ 12.36 (11/89) รองลงมาคือ ยีน bla_{SPM-1} , bla_{IMP} และ bla_{SIM-1} คิดเป็นร้อยละ 5.62 (5/89), 1.12 (1/89) และ 1.12 (1/89) ตามลำดับ และยังพบเชื้อ CRAB ที่มียีนร่วมกันระหว่าง OXA และ MBLs จำนวน 17 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 19.10 โดยพบเชื้อที่มียีน carbapenemase ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป จำนวน 38 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 42.70 ดังแสดงใน Table 3

ในการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อ CRAB ทุกสายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบมีการดื้อต่อยาหลายขนาน ดังแสดงใน Table 4 โดยพบว่าเชื้อมีการดื้อต่อยาทุกชนิดที่ทำการทดสอบในเชื้อ CRAB ที่มีทั้งยีน OXA และ MBLs ร่วมกัน นอกจากนี้ยังตรวจพบยีน OXA และยีน MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ให้ผลไวต่อยา meropenem (meropenem susceptible) ด้วยจำนวน 32 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 26.45 ของเชื้อทั้งหมด (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

วิจารณ์และสรุปผล

จากอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

Table 2 Type of specimens of 130 *Acinetobacter* spp. Isolates.

Type of specimens	Amount (%)	Meropenem susceptibility test in 121 <i>A. baumannii</i>	
		Susceptible	Non-susceptible
Sputum	102 (78.46)	20	82
Urine	7 (5.39)	3	4
Pus	12 (9.23)	5	7
Blood	9 (6.92)	4	5
Total	130	32 (26.45)	89 (73.55)

Table 3 Carbapenemase genes among 89 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates.

Carbapenemase genes	Number of meropenem resistance (%)
Oxacillinase	72 (80.90%)
OXA-23-like	0
OXA-24-like	0
OXA-51-like	51 (57.31%)
OXA-58-like	0
OXA-51-like, OXA-23-like	15 (16.85%)
OXA-51-like, OXA-58-like	6 (6.74%)
Oxacillinase with Metallo-β-Lactamase	17 (19.10%)
OXA-51-like, VIM	8 (9%)
OXA-51-like, IMP	1 (1.12%)
OXA-51-like, SPM-1	5 (5.62%)
OXA-51-like, OXA-58-like, VIM	1 (1.12%)
OXA-51-like, OXA-23-like, VIM	1 (1.12%)
OXA-51-like, OXA-23-like, VIM, SIM-1	1 (1.12%)
Total	89 (100%)

Table 4 Relationship between Carbapenemase genes and frequency of antimicrobial resistance by disk diffusion of 89 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates.

Carbapenemase genes	Total	Antimicrobial resistance / intermediate results (%)							
		Meropenem	Amikacin	Gentamycin	Ciprofloxacin	Tetracyclin	Cefotaxime	Ceftazidime	Ceftazone
Oxacillinase	72	72/0 (100)	44/3 (65.28)	57/5 (86.11)	72/0 (100)	72/0 (100)	71/0 (100)	72/0 (100)	72/0 (100)
OXA-51-like	51	51/0 (100)	31/3 (66.67)	42/3 (88.24)	51/0 (100)	51/0 (100)	50/1 (100)	51/0 (100)	51/0 (100)
OXA-51-like, OXA-23-like	15	15/0 (100)	10/0 (66.67)	9/2 (73.33)	15/0 (100)	15/0 (100)	15/0 (100)	15/0 (100)	15/0 (100)
OXA-51-like, OXA-58-like	6	6/0 (100)	3/0 (50)	6/0 (100)	6/0 (100)	6/0 (100)	6/0 (100)	6/0 (100)	6/0 (100)
Oxacillinase with Metallo-β Lactamase	17	17/0 (100)	14/0 (82.35)	15/0 (88.24)	16/0 (94.12)	17/0 (100)	16/1 (100)	17/0 (100)	16/1 (100)
OXA-51-like, VIM	8	8/0 (100)	8/0 (100)	8/0 (100)	8/0 (100)	8/0 (100)	8/0 (100)	8/0 (100)	8/0 (100)
OXA-51-like, IMP	1	1/0 (100)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	1/0 (100)	0/1 (100)	1/0 (100)	0/1 (100)
OXA-51-like, SPM-1	5	5/0 (100)	5/0 (100)	5/0 (100)	5/0 (100)	5/0 (100)	5/0 (100)	5/0 (100)	5/0 (100)
OXA-51-like, OXA-58-like, VIM	1	1/0 (100)	0/1 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)
OXA-51-like, OXA-23-like, VIM	1	1/0 (100)	0/0 (0)	0/0 (0)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)
OXA-51-like, OXA-23-like, VIM, SIM-1	1	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)	1/0 (100)
Total	89	89 (100)	61 (68.54)	77 (86.52)	88 (98.88)	89 (100)	89 (100)	89 (100)	89 (100)

(CRAB) ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก โดยกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม คือ การสร้างเอนไซม์ carbapenemase เพื่อทำลายโครงสร้างของยา จากผลการศึกษาที่พบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในกลุ่ม oxacillinase มากที่สุดคือ ยีน *bla*_{OXA-51-like} ซึ่งพบในเชื้อ *A. baumannii* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Turton

และคณะ ในปี พ.ศ. 2542 เนื่องจากยีนชนิดนี้เป็นยีนที่พบได้โดยกำเนิด (intrinsic resistance gene) สำหรับเชื้อ *A. baumannii*⁽¹⁰⁾ และยีนที่พบรองลงมาคือ *bla*_{OXA-23-like} และ *bla*_{OXA-58-like} คิดเป็นร้อยละ 14.05 และ 5.79 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ พิราภรณ์ จันทนาวิวัฒน์ และคณะ ในปี พ.ศ. 2559 และการศึกษาของ วิชัย สันติมาลีวรกุล และ

คณะ ที่ได้ศึกษาในเชื้อ CRAB ในช่วงปี พ.ศ. 2555-2556^(11, 12) ที่พบยีน *bla*_{OXA-23-like} มากกว่ายีน *bla*_{OXA-58-like} ซึ่งเป็นการศึกษาในตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ที่มีการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน แต่ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันคือในการศึกษานี้พบเชื้อ CRAB ที่มียีน OXA ร่วมกับยีน MBLs ด้วย โดยพบถึงร้อยละ 22.31 และจากรายงานในช่วงปีถัดๆ มาจนถึงปัจจุบัน จะพบความชุกของยีน *bla*_{OXA-23-like} มากกว่ายีน *bla*_{OXA-58-like} ในอัตราที่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งจากการศึกษาในประเทศไทยและในต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิก⁽¹³⁻¹⁷⁾ นอกจากนี้ยังเริ่มมีการพบยีน MBLs ชนิดอื่นๆ ในเชื้อ CRAB โดยเฉพาะยีน NDM อีกด้วย เนื่องจากยีนชนิดนี้มีอัตราการพบที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในตระกูล *Enterobacteriales* และ *Pseudomonas*⁽¹⁸⁻¹⁹⁾

การศึกษาค้นคว้านี้ทำให้ทราบถึงความชุกของยีน OXA: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like} และยีน MBLs: *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} และ *bla*_{SIM-1} ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิม ของโรงพยาบาลศรีสวรรค์สุขภาพ ทำให้ทราบถึงข้อมูลทางระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ การเฝ้าระวัง และมาตรการการแก้ไขปัญหาการดื้อต่อยาคาร์บาเพนิมในเชื้อมีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีสวรรค์สุขภาพ จังหวัดสุโขทัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรุณวดี ชนะวงศ์ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และรองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการ

การจุลชีววิทยา โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Nocera FP, Attili AR, Martino LD. *Acinetobacter baumannii*: Its clinical significance in human and veterinary medicine. Pathogens 2021; 10: 127.
2. National Antimicrobial Resistant Surveillance Center, Thailand; NARST. The situation of antimicrobial resistance in 2000-2020. [Internet]. 2022 Sep [cited 2022 Sep 2]. Available from: <http://narst.dmsc.moph.go.th>. (in Thai)
3. National Health Commission Office. Thailand national strategic plan on antimicrobial resistance 2017-2021. [Internet]. 2022 Sep [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://amrthailand.net/Strategy> (in Thai)
4. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 826-36.
5. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70: 119-23.
6. Constantiniu S, Romaniuc A, Lancu LS, Filimon R., Tarasi I. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. Strains isolated from hospital units. J Prev Med 2004; 12: 35-42.

7. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2012.
9. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents. 2006; 27: 351-3.
10. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol 2003; 44: 2974-6.
11. Juntanawiwat P, Thunyaharn S, Visawapoka U, *et al.* Prevalence of OXA-type carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in intensive care unit at Phramongkutklao Hospital. Arch AHS 2016; 28: 120-8. (in Thai)
12. Santimaleeworagun W, Thathong A, Samret W, *et al.* Identification and characterization of carbapenemase genes in clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from general hospital in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2014; 45: 874-80.
13. Thapa B, Tribuddharat C, Srifuengfung S, Dhiraputra C. High prevalence of bla (OXA)-23 in oligoclonal carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2010; 41: 625-35.
14. Teo J, Lim TP, Hsu LY, *et al.* Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Thai hospital: a molecular epidemiologic analysis and identification of bactericidal Polymyxin B-based combinations. Antimicrob Resist Infect Control 2015; 4: 2
15. Anggraini D, Santosaningsih D, Yulia Rosa, *et al.* Distribution of Carbapenemase Genes among Carbapenem-Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* Blood Isolates in Indonesia: A Multicenter Study. Antibiotics. 2022; 11: 366.

16. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 55-9.
17. Lee Y, Kim YR, Kim J, *et al.* Increasing prevalence of *bla*_{OXA-23}-carrying *Acinetobacter baumannii* and the emergence of *bla*_{OXA-182}-carrying *Acinetobacter nosocomialis* in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 77: 160-3.
18. Hansen GT. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among *Enterobacterales* and Other Gram-Negative Bacteria. Infect Dis Ther 2021; 10: 75-92.
19. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. World-wide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. Biomed Res Int 2014; 2014: 249856.