วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 5 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อ

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ระยะที่ 3 ศึกษาการปรากฏของ class 1, 2 และ 3 integrons

ระยะที่ 4 ศึกษา resistance gene cassettes ใน variable regions

ระยะที่ 5 ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อ

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

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

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

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

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

* ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา

ระยะที่ 3 ศึกษาพันธุกรรมของการดื้อยา

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

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

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

ตารางที่ 2 Primers และ conditions ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

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

ระยะที่ 4 ศึกษา resistance gene cassettes ใน variable regions

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

ระยะที่ 5 ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons

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

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

ตารางที่ 3 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก transconjugants

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