

3. วัตถุประสงค์

- 3.1. เพื่อระบุ (identify) และวิเคราะห์ (analyze) โครงสร้างของ lipid A จากเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา colistin ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เพื่อระบุโครงสร้างที่จำเพาะในการดื้อยา
- 3.2. เพื่อระบุและจำแนกการกลายพันธุ์และการแสดงออกของยีน *pmrCAB* ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อ colistin
- 3.3. เพื่อทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา (inducible resistance) ของเชื้อ *A. baumannii* โดย colistin

4. วิธีการทดลอง

สายพันธุ์ของเชื้อและการสภาวะในการเจริญ

เชื้อ *A. baumannii* ที่จะใช้การทดลองนั้นจะได้อาจจากการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจต่างๆจำนวน 200 สายพันธุ์จาก เลือด เสมหะ ปัสสาวะ และอื่นๆ ที่นำส่งห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในระหว่างปีพ.ศ.2554-2555 *A. baumannii* สายพันธุ์ ATCC 19606 ใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุมในการทำ PCR *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 27853 และ *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 ใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุมในการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

เชื้อที่เก็บได้ทั้งหมดถูกเพิ่มจำนวนใน Lauria-Bertani (LB) medium การทดสอบความไวต่อยาทำใน Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) และการทดสอบการการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา ทำใน *Acinetobacter* minimal medium

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

ใช้ primer ที่มีลำดับเบส CCTTGACGCA โดยมี initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C 10 นาที แล้วตามด้วยวงรอบที่ประกอบด้วย denaturation ที่ 94°C 10 วินาที annealing ที่ 36°C 30 วินาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที เป็นจำนวน 40 วงรอบ แล้วปิดท้ายด้วย final extension ที่ 72°C 2 นาที ผลที่ได้วิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ PyElph โดยใช้ Dice coefficient และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) algorithm

การทดสอบการดื้อยาของเชื้อโดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อ colistin

โดยใช้วิธี broth microdilution และการแปลผลตามที่กำหนดไว้ใน Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) 2011 guideline

การสกัด lipid A จากเชื้อด้วยวิธี Carloff microextraction

โดยย่อคือเริ่มจากการใช้เซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม แล้วสกัดโดยใช้ isobutyric acid/1M ammonium hydroxide (5:3, vol:vol) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั่นแล้วแยกส่วน

ที่เป็นน้ำดำนบน แล้วจึงเจือจางด้วยน้ำและทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer ตัวอย่าง lipid A ทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry ณ University of Maryland, Baltimore ประเทศสหรัฐอเมริกา

การเพิ่มจำนวนยีน *pmrCAB* ด้วย PCR และหาลำดับเบสของยีน

เริ่มจากการเพิ่มจำนวนของยีน *pmrCAB* โดยวิธี PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีน จากนั้นจึงทำไปหาลำดับเบสของยีน

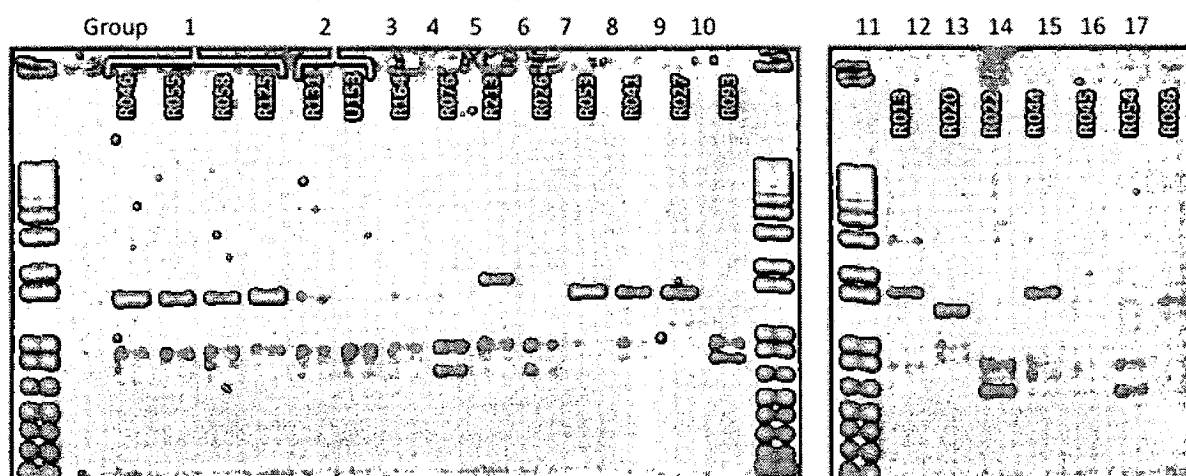
การทดสอบการกระตุ้นการดื้อยาของเชื้อ

นำเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาเลี้ยงใน Acinetobacter minimal media เป็นเวลาหนึ่งคืน หลังจากนั้นวัดค่า MIC ของเชื้อ รวมทั้งทำการสกัด lipid A และหาลำดับเบสของ *pmrCAB* ตามวิธีข้างต้น จากนั้นจึงทำการ subculture ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ colistin ต่ำกว่าค่า MIC จากนั้นจึงทำการทดสอบซ้ำทุกวันจนกระทั่งเชื้อมีค่า MIC สูงกว่าค่ามาตรฐานซึ่งได้แก่ 2 µg/ml จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชนิดที่ไม่มียาจนกระทั่งค่า MIC ของเชื้อลดลงเท่าเดิม

5. ผลการทดลอง

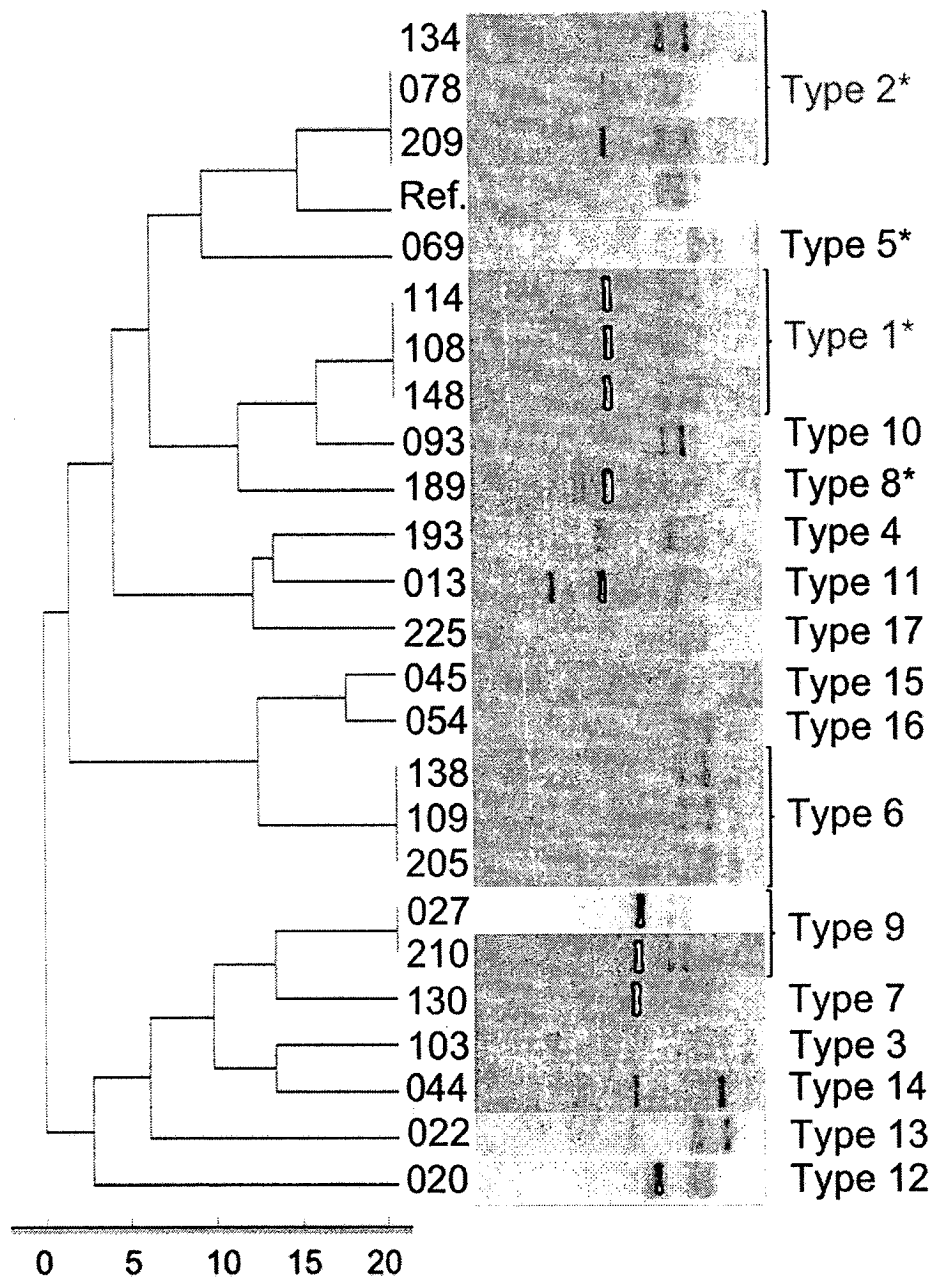
สายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา colistin ในโรงพยาบาลศิริราช

จากเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 200 สายพันธุ์ เมื่อนำมาจำแนกด้วยวิธี RAPD แล้วสามารถจำแนกได้เป็น 17 กลุ่ม โดยที่กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 นั้นมีสมาชิกมากที่สุดได้แก่ 133 และ 30 สายพันธุ์ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้อาจเป็นเชื้อประจำถิ่นในโรงพยาบาล นอกจากนั้นแล้วมีอีก 8 กลุ่มซึ่งมีจำนวนสมาชิก 2-6 สายพันธุ์ และยังมีอีก 7 กลุ่มซึ่งมีสมาชิกกลุ่มสายพันธุ์เดียว (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้ในร.พ.ศิริราชด้วยวิธี RAPD

เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ด้วยการสร้างเดนโดแกรมพบว่าเชื้อทั้ง 17 กลุ่ม เป็นสมาชิกของเชื้อ 2 กลุ่ม (cluster) ใหญ่ๆ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 17 กลุ่มที่จำแนกด้วยวิธี RAPD สีแดงหมายถึงกลุ่มหลักที่มีสมาชิกจำนวนมาก เครื่องหมาย * แสดงกลุ่มที่มีสายพันธุ์ดื้อยา colistin

ค่า MIC ของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยา colistin

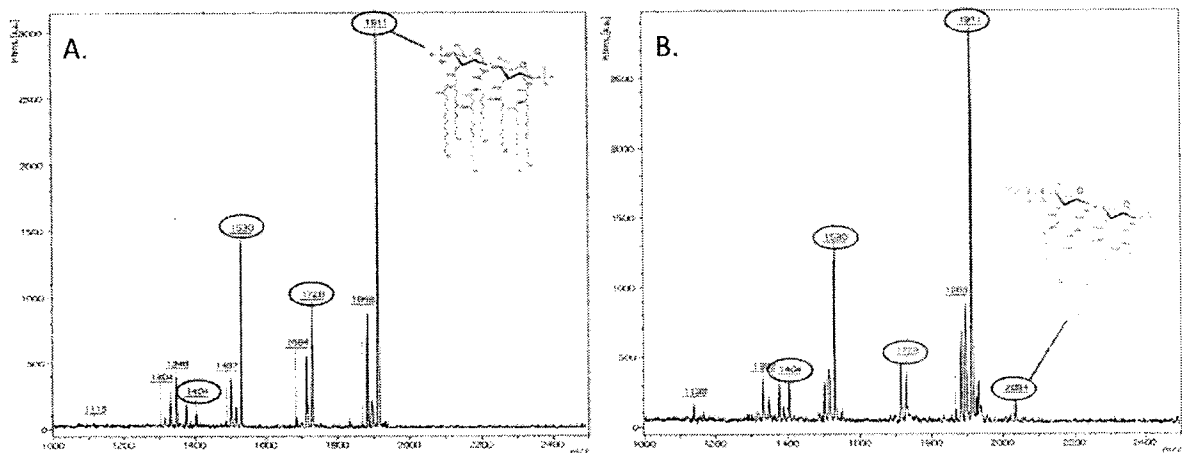
พบว่าการดื้อยา colistin ของเชื้อ *A. baumannii* มีความหลากหลายโดยมีค่า MIC ตั้งแต่ 4 จนถึง >128 µg/ml ส่วนมากของสายพันธุ์ที่ดื้อยาพบอยู่ในกลุ่ม 1 (ตารางที่ 1) ซึ่งพบว่าแม้แต่ในกลุ่มพันธุ์กรรมเดียวกันก็มีระดับการดื้อยาที่หลากหลาย ซึ่งบ่งว่ากลุ่มประชากรย่อยของเชื้อมีกลายพันธุ์เฉพาะที่ที่อาจขึ้นกับการใช้ยาในบริเวณที่มีเชื้ออยู่

RAPD type	Resistance categories	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Isolates
I	High level	> 128	2, 6, 7, 8
	Intermediate level	32-64	1, 3, 4, R017
	Low level	4-8	R004, R055, R090, R188
II	Low level	8	R088
V	Low level	4	R069
VII	Low level	4	R041

ตารางที่ 1 ค่า MIC ของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยา colistin

การดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา colistin

พบว่าในเชื้อ 4 สายพันธุ์ที่มีการดื้อยาพบว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ lipid A ตามที่เคยมีรายงานไว้ได้แก่ เกิดเติมหมู่ phosphoethanolamine เข้ากับโมเลกุลของ lipid A (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS แสดงโครงสร้างปกติของ lipid A ของเชื้อ *A. baumannii* (รูป 2A) และโครงสร้างที่มีการเติมหมู่ phosphoethanolamine ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยา colistin (รูปที่ 2B)

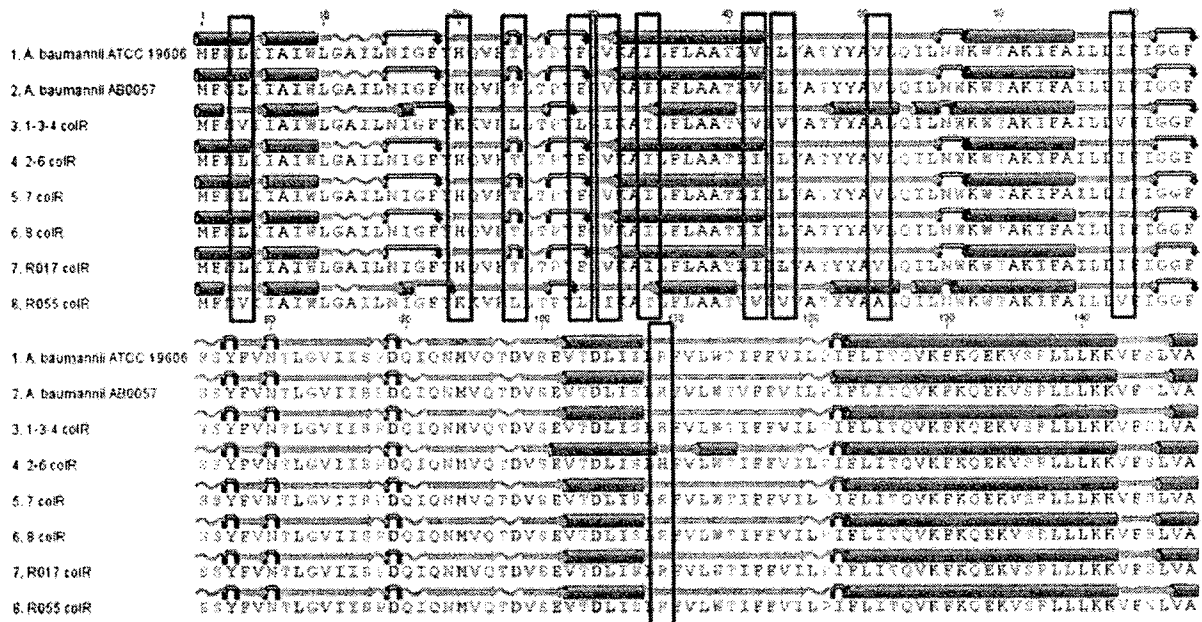
การกลายพันธุ์ในกลุ่มยีน *pmrCAB* ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา colistin

กลุ่มยีน *pmrCAB* เป็นกลุ่มยีนที่กำหนดรหัสของเอนไซม์ที่ใช้ในการเติมหมู่ phosphoethanolamine ใน lipid A ดังนั้นการกลายพันธุ์ในกลุ่มยีนนี้อาจมีผลต่อการดื้อยา colistin ได้ จากการหาลำดับเบสของกลุ่มยีนนี้ในเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา colistin พบว่ามี กลายพันธุ์จำนวนมากในกลุ่มยีนนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยีน *pmrB* ซึ่งพบว่าการกลายพันธุ์ของเบสตำแหน่งเดียวมีผลต่อระดับการดื้อยาได้ (ตารางที่ 2)

Isolate	<i>pmrC</i>		<i>pmrA</i>		<i>pmrB</i>		MIC (μg/ml)
	S	NS	S	NS	S	NS	
1, 3, 4	117	65	65	5	105	25	32
R055	117	65	65	5	105	24	8
2, 6	13	5	4	-	7	3	
7	13	4	4	-	8	4	>128
8	13	4	4	-	7	3	
R017	13	4	4	-	8	2	32

ตารางที่ 2 การกลายพันธุ์ในกลุ่มยีน *pmrCAB* ของเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา colistin

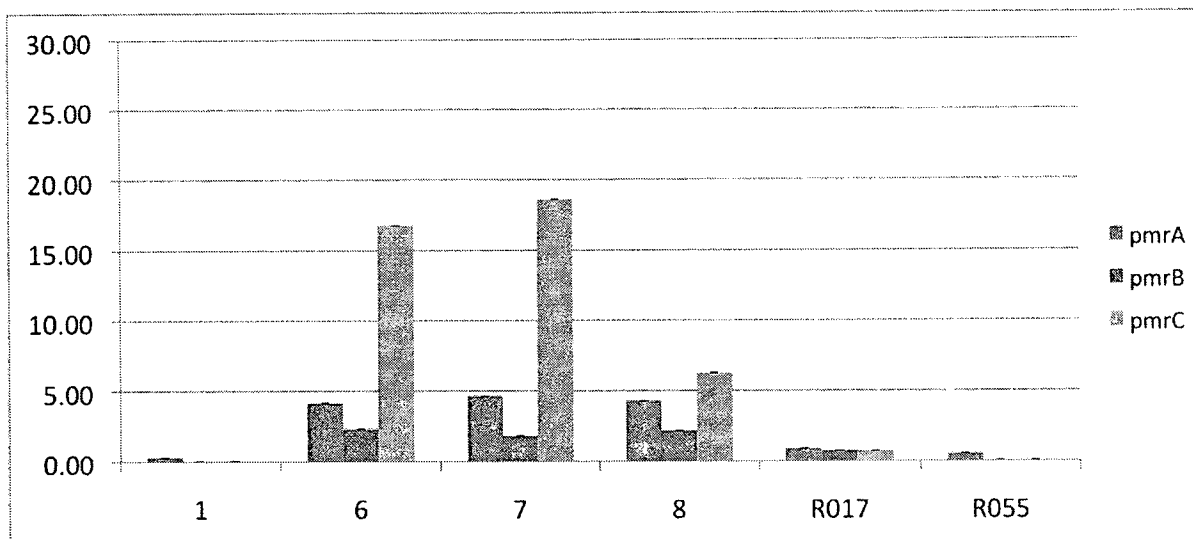
การกลายพันธุ์ใน DNA บางตำแหน่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนได้ (non-synonymous change) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การกลายพันธุ์ของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีน PmrB

การแสดงออกของกลุ่มยีน *pmrCAB* ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา colistin

จากการทดสอบการแสดงออกของกลุ่มยีน *pmrCAB* ในสายพันธุ์ที่ดื้อ colistin ด้วยวิธี real time RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของ ยีนมากขึ้นในสายพันธุ์ที่มี MIC > 128 μg/ml ซึ่งตรงกับผลการวิเคราะห์โครงสร้างของ lipid A ที่มีการเติมหมู่ phosphoethanolamine (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การแสดงออกของกลุ่มยีน pmrCAB จากวิธี real time RT-PCR

การกระตุ้นการดื้อยา colistin ของเชื้อ

เมื่อนำเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐานซึ่งไวต่อยา colistin (MIC = 2 µg/ml) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ colistin ในระดับที่ฆ่าเชื้อไม่ได้ (sub-MIC concentration) พบว่าในเชื้อมี MIC สูง กล่าวคือเชื้อมีการปรับตัวให้ดื้อยาสูงขึ้น นอกจากนั้นแล้ว ระหว่างการเลี้ยงเชื้อมีเชื้อสองกลุ่มเกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3

- เชื้อกลุ่มที่หนึ่ง มี MIC เพิ่มขึ้นจนถึง 4 µg/ml ในวันที่ 5 และมี MIC ลดลงจนปกติหลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา เชื้อกลุ่มนี้มีขนาดโคโลนีปกติ
- เชื้อกลุ่มที่สอง มี MIC เพิ่มขึ้นจนถึง 8 µg/ml ในวันที่ 5 และมี MIC ลดลงจนถึง 4 µg/ml จากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาแต่ก็ไม่ลดลงจนปกติ เชื้อกลุ่มนี้มีขนาดโคโลนีเล็กกว่าปกติ

ไม่พบว่าเชื้อทั้งสองกลุ่มมีการกลายพันธุ์ในกลุ่มยีน *pmrCAB* หรือมีการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A

Day(s)	MICs values	
	Big colony	Small colony
Day 0	2 µg/mL	
Day 5	4 µg/mL	8 µg/mL
(Antibiotic removed)		
Day 8	2 µg/mL	4 µg/mL
Day 10	2 µg/mL	4 µg/mL
Day 15	2 µg/mL	4 µg/mL

ตารางที่ 3 แสดงผล MIC ของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐานที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ colistin 1 µg/ml ในวันที่ 0-5 และ 0 µg/ml ในวันที่เหลือ

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และขอเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การติดเชื้อ *A. baumannii* ภายในโรงพยาบาลกำลังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญมากที่สุดปัญหาหนึ่งของประเทศ เนื่องจากเชื้อมีความคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมได้นาน หรือมีอัตราการดื้อยาสูง โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะทุกกลุ่มแล้ว การรักษาหลักในปัจจุบันคือการใช้ยา colistin ซึ่งเป็นยาเก่าแต่ได้ถูกนำกลับมาใช้ใหม่เพราะเชื้อ *A. baumannii* ส่วนใหญ่ยังไวต่อยา ต่อมาก็เริ่มพบสายพันธุ์ที่มีการดื้อ colistin บางแล้ว โดยอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆทุกปีอย่างน่าตกใจอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกการดื้อยา colistin ของเชื้อจึงมีความสำคัญ ในอดีตนั้นเชื่อว่ากลไกหลักการดื้อยาของเชื่อนั้นเกิดจากการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A ซึ่งเป็นเป้าหมายในการจับของยา ยังผลทำให้ยาจับไม่ได้และทำให้เกิดการดื้อยาในที่สุด การศึกษานี้จึงมุ่งที่จะศึกษาว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยานี้ดื้อด้วยกลไกมีเคยมีการรายงานนี้หรือไม่ หรือมีกลไกอื่นๆในการดื้อยา

จากเชื้อที่เก็บได้ทั้งหมด 200 สายพันธุ์ นั้นพบว่าสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มพันธุกรรมทั้งหมด 17 กลุ่ม โดยส่วนใหญ่เชื้อจะอยู่ในกลุ่มพันธุกรรมที่ 1 และ 2 ซึ่งบ่งถึงการมีอยู่ของเชื้อในโรงพยาบาลจนกลายเป็นเชื้อประจำถิ่น จึงทำให้เชื้อส่วนมากที่พบติดเชื้อในผู้ป่วยเป็นเชื้อสายพันธุ์เดิม อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีระดับการดื้อยา colistin ไม่เท่ากัน ซึ่งบ่งว่าอาจมีกลายพันธุ์อย่างเป็นเอกเทศในยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาถึงแม้ว่าจะอยู่ในกลุ่มพันธุกรรมเดียวกันก็ตาม ขึ้นกับว่ามีการใช้ยา colistin หรือไม่อย่างไรในบริเวณที่มีเชื้อสายพันธุ์นั้นๆอยู่ ซึ่งเข้าได้กับรายงานในต่างประเทศว่าเชื้อที่ดื้อยา colistin นั้นมัก เจริญได้ไม่ดีเมื่อเทียบกับเชื้อปกติ จึงทำให้มักไม่พบเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา colistin กลายเป็นเชื้อประจำถิ่นถาวรในโรงพยาบาล แต่มักพบการระบาดเป็นครั้งคราวมากกว่า

ในกลุ่มเชื้อที่ดื้อยา colistin พบว่ามีทั้งเชื้อดื้อยาในระดับต่ำ (4-8 µg/mL) ระดับกลาง (32-64 µg/mL) และระดับสูง (>128 µg/mL) ซึ่งการดื้อยานี้อาจพบว่ามีผลเกี่ยวข้องกับการดัดแปลง lipid A อย่างไรก็ตามเมื่อได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของ lipid A พบว่ามีเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงดังที่คาดการณ์ไว้คือมีการเติมหมู่ phosphoethanolamine เข้ากับโมเลกุลของ lipid A โดยที่เชื้อเหล่านั้นดื้อ colistin ในระดับกลางเท่านั้น

ในต่างประเทศมีการรายงานว่าพบการกลายพันธุ์ในกลุ่มยีน *pmrCAB* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อ colistin โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยีน *pmrB* ซึ่งมีผลต่อการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A อย่างไรก็ตามเมื่อได้ทำการหาลำดับเบสในกลุ่มยีน *pmrCAB* ของเชื้อดื้อยาที่พบในประเทศไทย พบว่ามีจำนวนการกลายพันธุ์ในกลุ่มยีนสูงกว่าที่เคยมีรายงานมา โดยสามารถจำแนกเชื้อดื้อยาเป็นสองกลุ่มได้อย่างชัดเจนตามจำนวนเบสที่มีการกลายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการกลายพันธุ์ในยีน *pmrB* ยังคงมีบทบาทมากที่สุดต่อระดับการดื้อยา ดังจะพบว่าการกลายพันธุ์ที่ต่างกัน 1-2 ตำแหน่งใน *pmrB* ทำให้ค่า MIC ของ colistin ต่างกันหลายเท่าได้ นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าการกลายพันธุ์ที่มีค่า MIC สูง มีการแสดงออกของกลุ่มยีน *pmrCAB* มากขึ้น ซึ่งบ่งถึงการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A และ MIC ที่สูงขึ้นได้

แต่อย่างก็ตาม ถึงแม้ว่าจะพบการกลายพันธุ์ในยีน *pmrB* แต่ก็ไม่พบการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A โดยเฉพาะในสายพันธุ์ที่มีการดื้อยาในระดับสูง จึงทำให้สรุปได้ว่า การดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A มีผลทำให้เชื้อดื้อยา colistin ได้จริง แต่การดื้อยา colistin ไม่จำเป็นต้องเกิดจากการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A แต่เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสายพันธุ์ที่มีการดื้อยาในระดับต่ำ

การปรับตัวของเชื้อเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ทำให้เชื้อดื้อยาได้นอกเหนือไปจากการกลายพันธุ์ จากการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา colistin ในระดับต่ำกว่าค่า MIC จนไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ ในกรณีนี้ยาจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นได้ ดังจะเป็นว่าเชื้อมี MIC ที่สูงขึ้น และจะลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มียา จากการตรวจหาลำดับเบสใน *pmrCAB* รวมถึงการวิเคราะห์โครงสร้างของ lipid A ไม่พบการเปลี่ยนแปลง จึงสามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยน MIC นั้นไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ และไม่เกี่ยวกับการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A แต่อาจเกิดจากกลไกอื่น

สรุป

- 6.1. การระบาดของเชื้อ *A. baumannii* ในร.พ.ศิริราชมีลักษณะเป็น clonal คือเป็นสายพันธุ์เดียวกันที่เป็นสายพันธุ์ประจำถิ่น
- 6.2. สายพันธุ์ประจำถิ่นดังกล่าวมีกลายพันธุ์ในกลุ่มยีน *pmrCAB* ขึ้นเป็นสองกลุ่มอย่างเป็นเอกเทศซึ่งมีผลต่อระดับของการดื้อยา
- 6.3. การดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A มีผลทำให้เชื้อดื้อยา colistin มากขึ้นแต่การดื้อยานั้นไม่จำเป็นต้องเกิดจากการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A แต่เพียงอย่างเดียว
- 6.4. การกลายพันธุ์ในกลุ่มยีน *pmrCAB* มีจำนวนมากกว่าที่มีรายงานมา ซึ่งอาจเป็นผลจากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดื้อยาจากการใช้ยาในปริมาณมากในโรงพยาบาล
- 6.5. การใช้ยา colistin ในระดับต่ำกว่าที่จะสามารถฆ่าเชื้อได้ นอกจากจะทำให้การรักษาไม่ได้ผลแล้วยังทำให้เชื้อดื้อยามากขึ้นอีกด้วย
- 6.6. การดื้อยา colistin ของ *A. baumannii* เป็นผลพวงจากการดื้อยาหลายกลไกซึ่งยังระบุไม่ได้ว่าเป็นกลไกใดบ้างที่นอกเหนือไปจากการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ควรจะต้องมุ่งเน้นในการระบุกลไกอื่น ๆ ที่ใช้ในการดื้อยาโดยใช้แนวทางการวิจัยที่เป็น genomic มากขึ้น เช่น การทำ RNA-seq, Tn-seq หรือ whole genome sequencing เพื่อที่จำระบุยีนทั้งหมดที่อาจมีบทบาทในการทำให้เชื้อดื้อยา