

บทคัดย่อภาษาไทย

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา พบอุบัติการณ์การติดต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานของ *A. baumannii* เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วภายในโรงพยาบาลของทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายของยีนดื้อยาคลาสติปีต้า-แลคทาเมสเกือบทุกภูมิภาคทั่วโลก การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อนำเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลและเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมมาศึกษาในรูปแบบการติดต่อยาต้านจุลชีพ ตรวจสอบยีนดื้อยา และ virulence gene ศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวราบ ได้แก่กระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และ คอนจูเกชัน ศึกษาการระบาดขนาดของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาแบบรุนแรง (XDR-AB) โดยวิธี Repetitive-PCR (REP-PCR) วิธี blaOXA-51 sequence base typing (blaOXA-51 SBT) และวิธี Multilocus sequence typing (MLST) รวมทั้งศึกษาระบบควบคุมสมดุลคอปเปอร์ของเชื้อ *A. baumannii*

ผลการศึกษาในเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลในประเทศไทย 4 แห่ง จำนวน 339 ไอโซเลทและโรงพยาบาลในประเทศเนปาล 1 แห่งจำนวน 40 ไอโซเลท พบเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM) และ piperacillin/tazobactam (PIP) มากกว่าร้อยละ 75 โดยทุกไอโซเลทไวต่อยาต้านจุลชีพ colistin และ tigecycline พบรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่มคาร์บาพีเนม (CR-AB) ร้อยละ 65-98 กลุ่มดื้อยาหลายขนาน (MDR-AB) ร้อยละ 75-98 กลุ่มดื้อยาแบบรุนแรง (XDR-AB) ร้อยละ 2-21 การตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม OXA-type carbapenemase ตรวจพบยีนดื้อยา *bla*_{OXA-23} มากที่สุด รองลงมาได้แก่ ยีนดื้อยา *bla*_{OXA-58} ตามด้วยยีน *bla*_{OXA-24} ตรวจพบเพียง 1 ไอโซเลท การตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่ม metallo beta-lactamase ตรวจพบ *bla*_{NDM-1} ร้อยละ 8-18 ใน 3 โรงพยาบาล (ประเทศไทย 2 โรงพยาบาลและเนปาล 1 โรงพยาบาล) การตรวจหา virulence gene ในเชื้อ *A. baumannii* พบยีน *hly* (90-98%) ที่ความชุกสูงสุดรองลงมาคือยีน *ompA* (74-90%) และยีน *BauD-bauC* (2.8-5.5%) พบต่ำสุด โดยการมียีน *ompA* มีความสัมพันธ์กับเชื้อที่มีรูปแบบการดื้อยาแบบ XDR-AB ผลการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแนวราบ โดยอาศัยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน ทรานสดักชัน และ คอนจูเกชัน โดยใช้เชื้อ XDR-AB เป็นแบคทีเรียผู้ให้ *Acinetobacter* spp. ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีคุณสมบัติไวต่อ

ยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบและไม่มียีนดื้อยาเป็นแบคทีเรียผู้รับพบว่าเชื้อ XDR-AB สามารถส่งผ่านการดื้อยา kanamycin, tetracycline และ ticarcillin ไปสู่แบคทีเรียผู้รับได้ สามารถตรวจพบยีนดื้อยา *tet(B)* ซึ่งทำให้เชื้อดื้อยา tetracycline ในแบคทีเรียผู้รับของกระบวนการ ทรานสดักชั่น สามารถตรวจพบยีนดื้อยา *bla_{PER-1}* ซึ่งทำให้เชื้อดื้อยา ticarcillin ในแบคทีเรียผู้รับของกระบวนการคอนจูเกชันและตรวจพบยีนดื้อยา *aphA6* ซึ่งทำให้เชื้อดื้อยา kanamycin ในแบคทีเรียผู้รับของกระบวนการคอนจูเกชัน การศึกษาในเชื้อ XDR-AB ที่แยกได้จากประเทศไทยทั้งหมด 27 ไอโซเลท เพื่อตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่มเบต้า-แลคตาเมสทั้ง 4 classes พบยีนดื้อยาใน class A เฉพาะยีน *bla_{PER-1}* และ class B ตรวจพบเพียงยีน *bla_{NDM-1}* ยีนดื้อยาใน class C ตรวจพบเฉพาะยีน *bla_{ADC}* และยีนดื้อยาใน class D ตรวจพบยีน *bla_{OXA-23}* (100%) และ *bla_{OXA-51}* (100%) การศึกษารูปแบบการระบดทางอนุชีววิทยาโดยวิธี REP-PCR ในการศึกษาครั้งนี้สามารถจัดรูปแบบการระบดได้ทั้งหมด 4 รูปแบบ คือ รูปแบบ 1, 4, 15 และ 16 การศึกษารูปแบบการระบดโดยวิธี blaOXA-51 SBT ในการศึกษาครั้งนี้สพบรูปแบบการระบด ได้ 4 กลุ่มแบบ ได้แก่ OXA-64, OXA-83, OXA-104 และ OXA-508 และจากการจัดกลุ่มการระบดโดยวิธี Multilocus sequence typing (MLST) พบเชื้อ XDR-AB ทั้งหมด 27 ไอโซเลท สามารถจัดกลุ่มเป็น STs ได้ 23 ไอโซเลท และอีก 4 ไอโซเลทที่ไม่ถูกจัดอยู่ใน STs ไตเลย (non-type) เชื้อ 23 ไอโซเลท ถูกจัดอยู่ใน STs ที่มีความหลากหลาย ได้แก่ ST195, ST208, ST368, ST451, ST457 และ ST1166 ผลการศึกษาระบบควบคุมสมดุลคอปเปอร์ของเชื้อ *A. baumannii* จาก whole genome sequence ของเชื้อ *A. baumannii* ที่มีอยู่ใน GeneBank พบว่ามีระบบควบคุมสมดุลของคอปเปอร์ (cop operon) ทั้งหมด 3 ระบบคือระบบ cueR system ระบบ copRS system และ pCo-homolog system ซึ่งแต่ละระบบจะควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้ผลพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วย และแยกได้จากธรรมชาติ โดยวิธี PCR ตรวจพบระบบ cueR ทุกสายพันธุ์ (100%) พบระบบ copRS ในเชื้อที่แยกได้ผู้ป่วย 18.6% และ ในเชื้อที่แยกจากธรรมชาติ 16.6 % โดยส่วนใหญ่เชื้อที่มีระบบควบคุมสมดุลของคอปเปอร์ (cop operon) ทั้ง 2 ระบบจะมีค่าความต้านทานต่อคอปเปอร์สูง (MIC เท่ากับ 10 mM) โดยพบ 100% ในเชื้อที่แยกได้ผู้ป่วย และ 50% ในเชื้อที่แยกจากธรรมชาติ การแสดงออกของ copper resistance determinants ในทั้งสามระบบถูกชักนำโดยโลหะคอปเปอร์และเมื่อทำการ mutate ยีน *copA* ซึ่ง encoded multicopper oxidase จาก CopRS operon และยีน *actP1*

ซึ่ง encoded copper ATPase จาก Cue operon ในเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ AB 1521 จะพบว่าแบคทีเรียจะมี copper sensitivity ลดลง

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงข้อมูลของรูปแบบการดื้อยา ยีนดื้อยา virulence gene และรูปแบบการระบาด ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากประเทศไทยและประเทศเนปาล การศึกษาในครั้งนี้พบการการถ่ายทอดยีนดื้อยาใน แนวราบโดยอาศัยกระบวนการ ทรานสฟอร์มเมชัน ทรานสดักชัน และ คอนจูเกชัน ของเชื้อ XDR-AB ไปสู่เชื้อธรรมชาติ ซึ่งผล จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของยีนดื้อยา และเชื้อ แบคทีเรียดื้อยาในอนาคตต่อไป ส่วนข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาระบบควบคุมสมดุลคอปเปอร์จะช่วยอธิบายกลไกการติดต่อคอป เอร์และอาจนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนายาตัวใหม่ๆที่ยับยั้งเชื้อผ่านกลไกนี้ต่อไป

Abstract

Acinetobacter baumannii is a gram-negative bacteria, which is the major cause of nosocomial infection, especially in Intensive Care Units (ICUs). In the past decades, the prevalence of multi-drug resistant *A. baumannii* (MDR-AB) has been increasing rapidly in Asia and Thai hospitals. Moreover, the spread of class D β -lactamase resistance genes was detected in all region worldwide. The aims of this study were to determine the antimicrobial susceptibility patterns, detect the dissemination of drug resistance and virulence genes from *A. baumannii* collected from hospitals and environments. The horizontal gene transfer by transformation, transduction and conjugation of extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* (XDR-AB) to *Acinetobacter* spp. isolated from natural sources was determined. Molecular epidemiology of XDR-AB isolated from Thai hospitals was studied by repetitive-PCR (REP-PCR), blaOXA-51 sequence base typing (blaOXA-51 SBT) and multilocus sequence typing (MLST). In addition, copper homeostasis systems in *A. baumannii* was investigated.

Our results of 339 *A. baumannii* isolates collected from 4 hospitals in Thailand and 40 *A. baumannii* isolates collected from one hospital in Nepal showed that more than 75% of the *A. baumannii* isolates were resistant to cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM) and piperacillin/tazobactam (PIP). All isolates were susceptible to colistin and tigecycline. The prevalences of carbapenem-resistant *A. baumannii* (CR-AB) from each hospitals were 65-98 %, MDR-AB were 75-98 % and XDR-AB were 2-21%. Class D β -lactamase genes were investigated by multiplex PCR amplification. High prevalence of bla_{OXA-23} gene (70-100%) was detected follow by the bla_{OXA-58} gene (2.5-10%) and bla_{OXA-24} was detected only in 1 isolate. Class B metallo beta-lactamase, bla_{NDM-1} (8-18%), was detected in 3 hospitals (2 hospitals from Thailand and one hospital from

Nepal). The detection of virulence gene found high prevalence of *hly* (90-98%) followed by *ompA* (74-90%) and *BauD-bauC* (2.8-5.5%) was detected in the lowest number. The presence of *ompA* in *A. baumannii* was associated with XDR-AB. Horizontal gene transfer by transformation, conjugation and transduction of extensively drug-resistant *A. baumannii* (XDR-AB) to drug-susceptible *A. baumannii* isolated from water environment showed that XDR-AB can transfer the recipients to kanamycin, tetracycline and ticarcillin resistance phenotype. The transfer of tetracycline resistant gene, *tet(B)*, was detected in transduction. The transfer of *bla_{PER-1}* which involved ticarcillin resistance and *aphA6* which involved kanamycin resistance were detected in conjugation. Molecular epidemiology among 27 XDR-AB isolates from Thailand to detected four class of β -lactamases (classes, A, B, C, and D) showed that only *bla_{PER-1}* gene (7.52%) of beta-lactamase class A was detected and class B beta-lactamase was detected only the *bla_{NDM-1}* gene (3.7%). Only *bla_{ADC}* gene in class C was detected in all isolates (100%) and class D beta-lactamase genes which were *bla_{OXA-23}* and *bla_{OXA-51}* were detected in all isolates. The study of genotyping method using REP-PCR represented 4 different genotypes which were 1, 4, 15 and 16. The blaOXA-51 SBT method was classified in four subgroups which were OXA-64, OXA-83, OXA-104 and OXA-508 and Multilocus sequence typing (MLST) among twenty-seven XDR-AB isolates demonstrated that twenty-three isolates could be typed by MLST method and four isolates were classified as Non-typable strains. Twenty-three XDR-AB isolates were classified in a variety of ST types including ST195, ST208, ST368, ST451, ST457 and ST1166. The study of copper homeostasis systems in *A. baumannii* from whole genome sequence of *A. baumannii* in GeneBank revealed that there are 3 system of copper homeostasis in *A. baumannii* which were *cueR* system, *copRS* system and *pCo-homolog* system. Each operons was contained different structural genes. The *cueR* system was detected in *A. baumannii* (100%) isolated from patients and environments by PCR. The *copRS* system was detected in 18.6% of *A. baumannii* isolated from patients

and 16.6 % of *A. baumannii* isolated from environments. Most of *A. baumannii* isolates (100 % of *A. baumannii* isolated from patients and 50% of *A. baumannii* isolated from environments) that contained two cop operon demonstrated high copper resistance with the MIC of 10mM. The gene expression of copper resistance determinants from 3 systems can be induced by copper. Deletion of *copA* gene which encoded multicopper oxidase (CopRS operon) and *actP1* which encoded copper ATPase (Cue operon) were performed in *A. baumannii* strain AB 1521. Decrease of the copper sensitivity of both mutant strains compared to wildtype was found when growing on the media with high copper concentration.

This study demonstrated the drug resistance pattern, drug resistance and virulence genes and molecular epidemiology of *A. baumannii* isolated from Thailand and Nepal. Horizontal gene transfer by transformation, conjugation and transduction of extensively drug-resistant *A. baumannii* (XDR-AB) to *A. baumannii* isolated from environments. The results of this study can be used as preliminary data for preventing and controlling the spread of drug resistance genes and drug resistance bacteria in the future. The data about copper homeostasis systems in *A. baumannii* will explain the mechanisms and pathway involved in intracellular copper transport mechanism of *A. baumannii* and can be used to develop the new antimicrobial agent to inhibit *A. baumannii* through this mechanism.