

การศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้
ดื้อยา Amikacin



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A STUDY OF EXPRESSION OF EFFLUX PUMP IN AMIKACIN-INDUCED RESISTANT
Acinetobacter baumannii



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

ณัฐนิชา บัวงามดี : การศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา Amikacin. (A STUDY OF EXPRESSION OF EFFLUX PUMP IN AMIKACIN-INDUCED RESISTANT *Acinetobacter baumannii*)
 อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. ดร.รัชนิพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Acinetobacter baumannii* เป็นเชื้อฉวยโอกาส ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล และมีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จากหลายกลไกการดื้อยา รวมถึงการใช้ efflux pump ขับยาออกนอกเซลล์ การศึกษารังนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ต่อยา amikacin ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* 7 ตัวอย่างมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 – 4 µg/mL (ไวต่อยา) และเชื้ออีก 2 ตัวอย่างมีค่า MIC เท่ากับ 64 และมากกว่า 256 µg/mL (ดื้อต่อยา) เมื่อเหนี่ยวนำเชื้อด้วยยา amikacin โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มียา amikacin ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ทุก 48 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลาหลายวัน พบว่าเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ทั้ง 8 ตัวอย่าง มีค่า MIC เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 32 ถึงมากกว่า 256 µg/mL ผลการศึกษาการใช้สารยับยั้ง efflux pump ได้แก่ สาร carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) พบว่าเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ทั้ง 8 ตัวอย่าง มีค่า MIC ต่อยา amikacin เมื่อมีสาร CCCP ลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่าของค่า MIC ต่อยา amikacin ที่ไม่มีสาร CCCP แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบทุกตัวอย่างมีการแสดงออกของ efflux pump เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน efflux pump (*adeB*) ด้วยเทคนิค PCR และ Real-Time PCR พบยีน *adeB* ของเชื้อก่อนเหนี่ยวนำและหลังเหนี่ยวนำด้วย amikacin ทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อก่อนเหนี่ยวนำด้วย amikacin ในกลุ่มที่ดื้อยาหลายขนานมีการแสดงออกของยีน *adeB* เพิ่มขึ้น ร้อยละ 37.5 (3 ใน 8 ตัวอย่าง) ส่วนเชื้อหลังเหนี่ยวนำด้วย amikacin มีการแสดงออกของยีน *adeB* เพิ่มขึ้นทุกตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 100 จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็น อันอาจนำไปสู่การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งมีกลไกในการขับยาออกได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทาง ลายมือชื่อนิสิต

จุลชีวิทยาทางการแพทย์และ
 วิทยาภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6076751937 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: *Acinetobacter baumannii*, efflux pump, induced resistance

Nutnicha Buangamdee : A STUDY OF EXPRESSION OF EFFLUX PUMP IN AMIKACIN-INDUCED RESISTANT *Acinetobacter baumannii*. Advisor: Rachaneeporn Tiyawisutsri

Acinetobacter baumannii is an opportunistic gram negative bacteria that cause nosocomial infections. it has been resistant to many antimicrobial agents by using several mechanisms including overexpression of efflux pump mechanisms to extrude the agents. In this study determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of amikacin in eight clinical isolates and the *A. baumannii* ATCC 19606. The MIC range of amikacin in seven isolates were of 0.25 – 4 µg/mL (susceptible) and the other were 64 and greater than 256 µg/mL (resistance). Induction of amikacin resistance was performed by serial passaging every 48 hours with vary concentration of amikacin. All eight amikacin-induced isolates had increased the MIC of amikacin between 32 µg/mL to greater than 256 µg/mL. The phenotypic expression of the efflux pump was compared to MIC values of amikacin with and without efflux pump inhibitor, carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). All induced amikacin-resistant *A. baumannii* had decreased at least 4-fold in the presence of CCCP showing the phenotypic efflux pump expression. Expression of efflux pump was detected by PCR and Real-Time PCR technique, *adeB* gene was found in all isolates. In MDR -*A. baumannii* showed 37.5 % increase expression of *adeB* gene and all induced amikacin-resistant *A. baumannii* expressed the *adeB* gene. This study can show the effect of overusing antimicrobial agents that causes multidrug-resistant bacteria.

Field of Study: Molecular Science of Student's Signature
 Medical Microbiology and
 Immunology

Academic Year: 2021 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความเมตตากรุณา และความอนุเคราะห์จากอาจารย์ ดร.รัชนิพร ดิยะวิสุทธิศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้สละเวลา มอบความรู้ คำแนะนำ และ ความช่วยเหลือในทุกเรื่อง

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคกลางตอนบน ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อสำหรับการทำการศึกษาในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วน ช่วยในการเก็บตัวอย่างเชื้อ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบโครง ร้างวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ประธานกรรมการในการสอบป้องกัน วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกัน วิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิพย์ ที่สละเวลามาเป็นกรรมการภายนอกในการสอบ ป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ภัทริน ตั้งชนตระกูล และอาจารย์ ดร.กมลพร อมรสุมภ์ ที่ได้ให้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และกำลังใจในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ต่างๆ และให้ความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยนวัตกรรมวินิจฉัยตรวจเชื้อดี้อยา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุน อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุน และกำลังใจจากเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ใน การศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้มีพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ณัฐนิชา บัวงามดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 คำถามงานวิจัย	5
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	6
1.4 สมมติฐานงานวิจัย.....	6
1.6 กรอบแนวคิดของงานวิจัย.....	7
1.7 ขอบเขตงานวิจัย.....	8
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
2.1 ลักษณะของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	9
2.2 การก่อโรคของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	9
2.3 การรักษาโรคติดเชื้อ <i>A. baumannii</i>	11
2.4 กลไกการดื้อยาของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	14
2.5 กลไกการดื้อยาดัวยระบบ efflux pump ของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	16
2.6 การทำงานของ efflux pump inhibitor (EPI)	20

2.7 การเหนี่ยวนำเชื้อให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ.....	22
2.8 เทคนิคการตรวจวัด efflux pump.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	28
3.2 เชื้อที่ใช้ในการวิจัย.....	32
3.3 ศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยวิธี disk diffusion	32
3.4 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth microdilution	34
3.5 การเหนี่ยวนำเชื้อ <i>A. baumannii</i> ให้ดื้อยาปฏิชีวนะ	35
3.6 ศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ทางพีโนไทป์โดยทดสอบผลของ efflux pump inhibitor (EPI) ต่อความไวของยา amikacin.....	36
3.7 ตรวจสอบยีน <i>bla_{oxa-51-like}</i> และยีน efflux pump (<i>adeB</i>) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	37
3.7.1 การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	37
3.7.2 ตรวจสอบยีน <i>bla_{oxa-51-like}</i> และยีน efflux pump (<i>adeB</i>) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis.....	38
3.8 ศึกษาการแสดงออกของยีน efflux pump (<i>adeB</i>) โดยเทคนิค Real-Time PCR.....	40
3.8.1 การสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	40
3.8.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)	41
3.8.3 การตรวจวัดการแสดงออกของยีน efflux pump (<i>adeB</i>) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยเทคนิค Real-Time PCR	42
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	44

4.1 ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยวิธี disk diffusion และผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth microdilution	44
4.2 ผลการเหนี่ยวนำเชื้อ <i>A. baumannii</i> ให้ดื้อยาปฏิชีวนะ	46
4.3 ผลการทดสอบ efflux pump inhibitor (EPI) ต่อความไวต่อยา amikacin.....	48
4.4 ตรวจสอบยีน <i>bla</i> _{oxa-51-like} และยีน efflux pump (<i>adeB</i>) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	49
4.5 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน efflux pump (<i>adeB</i>) ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> ด้วยเทคนิค Real-Time PCR	53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล	58
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	58
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	60
5.3 ข้อเสนอแนะ	65
บรรณานุกรม.....	66
ประวัติผู้เขียน.....	79

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	28
ตารางที่ 2 แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> (99).....	34
ตารางที่ 3 แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. baumannii</i> (99).....	35
ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	39
ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	39
ตารางที่ 6 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ	41
ตารางที่ 7 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-Time PCR.....	42
ตารางที่ 8 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา Real-Time PCR.....	43
ตารางที่ 9 แสดงแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	45
ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ	46
ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อนเหนี่ยวนำ และหลังเหนี่ยวนำด้วย amikacin	47
ตารางที่ 12 แสดงแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>A. baumannii</i> หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin.....	48
ตารางที่ 13 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่มี และไม่มีสาร CCCP ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> หลังเหนี่ยวนำ.....	49
ตารางที่ 14 แสดงรอบปฏิกิริยาที่ตรวจพบยีน 16s RNA และ <i>adeB</i> ของเชื้อ <i>A. baumannii</i> โดยใช้อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง 56 – 66 องศาเซลเซียส	54

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงแนวโน้มอัตราการความถี่ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 – 2564 (5).....	15
ภาพที่ 2 แสดงแนวโน้มอัตราการการดื้อยา imipenem ของเชื้อ <i>A. calcoaceticus - baumannii</i> complex ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 – 2564 (5).....	15
ภาพที่ 3 แสดงแบบจำลองแสดงโครงสร้างของระบบ efflux pump หลักในเชื้อ <i>A. baumannii</i> (57).....	16
ภาพที่ 4 แสดงถึงการทำงานของ <i>adeABC</i> efflux pump ในเชื้อ <i>A. baumannii</i> (60)	18
ภาพที่ 5 แสดงเป้าหมายของ efflux pump inhibitor ในการยับยั้งการทำงานของ efflux pump (57).....	21
ภาพที่ 6 แสดงการเรืองแสงฟลูออเรสเซนภายใต้แสงยูวีที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> (บน) และ เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (ล่าง) หลังจากบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาร ethidium bromide ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (93)	24
ภาพที่ 7 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน <i>bla_{oxa-51-like}</i> โดยแถวที่ 1 คือ negative control (NC) แถวที่ 2 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 3 - 10 คือ ตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i> ก่อนเหนี่ยวนำด้วย amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน <i>bla_{oxa-51-like}</i>	50
ภาพที่ 8 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของเชื้อ <i>A. baumannii</i> หลังถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน <i>bla_{oxa-51-like}</i> โดยแถวที่ 1 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 2 - 9 คือ ตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i> หลังเหนี่ยวนำด้วย amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน <i>bla_{oxa-51-like}</i>	51
ภาพที่ 9 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของเชื้อ <i>A. baumannii</i> ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน <i>adeB</i> โดยแถวที่ 1 คือ negative control (NC) แถวที่ 2 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 3 - 10 คือ ตัวอย่างเชื้อ <i>A. baumannii</i> ก่อนเหนี่ยวนำด้วย amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน <i>adeB</i>	52

ภาพที่ 10 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน *adeB* โดยแถวที่ 1 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 2 - 9 คือ ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *adeB* 53

ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าความสัมพันธ์ของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin เทียบกับเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 (AB19606) โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละการทดสอบทำซ้ำสามครั้ง 55

ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าความสัมพันธ์ของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* ในกลุ่มที่ไวต่อยา amikacin เปรียบเทียบหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับก่อนเหนี่ยวนำในแต่ละเชื้อตัวอย่างเอง โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำสามครั้ง 56

ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าความสัมพันธ์ของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* ในกลุ่มที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน และเชื้อที่ดื้อต่อยา amikacin เปรียบเทียบหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับก่อนเหนี่ยวนำในแต่ละเชื้อตัวอย่างเอง โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำสามครั้ง 57

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลมแท่ง (coccobacilli) ต้องการอากาศในการเจริญ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มักเป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) (1) อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ สิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล และพบอยู่บริเวณผิวหนังได้ (2) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ปอด การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และเยื่อช่องท้องอักเสบ เป็นต้น ปัจจุบันโรคติดเชื้อ *A. baumannii* นับเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยและทั่วโลก จากการศึกษาในประเทศไต้หวันโดย Lee และคณะ (3) พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistance; MDR - *A. baumannii*) มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง มีอัตราการเสียชีวิตสูง ต้องอยู่ในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้น 13.4 วัน และเสียค่าใช้จ่ายเพิ่ม 3,758 เหรียญสหรัฐเมื่อเทียบกับผู้ป่วยติดเชื้อที่ไม่ใช่ MDR - *A. baumannii* และการศึกษาของ Kuo และคณะ (4) พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MDR - *A. baumannii* มีอัตราการตายที่ 30 วัน หลังจากการรักษาสูงถึงร้อยละ 49 จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทย ช่วงเวลา 5 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2557 – พ.ศ. 2561 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีการดื้อยา cefotaxime และ ceftriaxone สูงมากเฉลี่ยร้อยละ 96.4 ส่วนยา ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam และ ampicillin/sulbactam ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 69.9 - 72.5 ยาในกลุ่ม carbapenem (meropenem, imipenem) ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 70.2 และ 69.8 ตามลำดับ สำหรับยาในกลุ่ม aminoglycoside ได้แก่ gentamicin และ amikacin ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 63.3 และ 53.5 ตามลำดับ (5)

เกณฑ์ในการจัดเป็น MDR - *A. baumannii* คือเชื้อมีการดื้อยาด้านจุลชีพตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป จากกลุ่มยา หรือชื่อยาดังต่อไปนี้ aminoglycosides, antipseudomonal penicillins, carbapenems, cephalosporins, quinolones, colistin, ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam หรือ tetracyclines (6) โดยยาด้านจุลชีพที่นิยมใช้ในการรักษา *A. baumannii* คือ broad spectrum cephalosporins (ceftazidime และ cefepime) carbapenems (imipenem) และ

fluoroquinolones (ciprofloxacin และ levofloxacin) (7, 8) มีการใช้ยาต้านจุลชีพด้วยการใช้ชนิดเดียว ได้แก่ imipenem, meropenem, ampicillin/sulbactam, amikacin, polymyxin B, colistin, tigecycline และยาผสมที่เสริมฤทธิ์กัน เช่น rifampicin ร่วมกับ colistin หรือ imipenem การใช้ยา imipenem หรือ meropenem ร่วมกับ aminoglycosides เป็นต้น (9)

จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยช่วง 5 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2557 - พ.ศ. 2561 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีการดื้อยา cefotaxime และ ceftriaxone สูงมากเฉลี่ยร้อยละ 96.4 ส่วนยา ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam และ ampicillin/sulbactam ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 69.9 - 72.5 ยาในกลุ่ม carbapenem (meropenem, imipenem) ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 70.2 และ 69.8 ตามลำดับ สำหรับยาในกลุ่ม aminoglycoside ได้แก่ gentamicin และ amikacin ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 63.3 และ 53.5 ตามลำดับ (5) โดยปกติยา carbapenem เป็นยาในกลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน (10) หากมีการดื้อยาในกลุ่มนี้จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการรักษาการติดเชื้อ เนื่องจากเป็นยาขนานสุดท้าย (last resort antibiotic) ที่ใช้ในการรักษาทำให้ต้องมีการเปลี่ยนยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ ซึ่งในปัจจุบันจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาเกือบทุกชนิดที่มีใช้ในการรักษาการติดเชื้อในปัจจุบัน ยกเว้น colistin (11) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีความไวต่อยา colistin เริ่มลดลง จากร้อยละ 99.9 ในปี พ.ศ. 2559 เป็นร้อยละ 99.7 ในปี พ.ศ. 2560 ปัจจุบันความไวของเชื้อต่อยา colistin ลดลงเหลือร้อยละ 97.7 ในปี พ.ศ. 2563 (5)

ข้อมูลจากโรงพยาบาลศิริราชพบว่าการใช้ยา colistin ในการรักษา *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน ทำให้ผู้ป่วยตอบสนองทางคลินิกดีขึ้น ร้อยละ 30.8 และมีการตอบสนองต่อเชื้อดียิ่งขึ้น ร้อยละ 94.9 แต่พบ nephrotoxicity ร้อยละ 30.81 (12) การใช้ยาต้านจุลชีพยังพบข้อจำกัดในด้านประสิทธิผล และความปลอดภัยของยาแต่ละชนิด เชื้อ *A. baumannii* สามารถพัฒนาการดื้อยาจากหลายกลไก ผ่านทั้งทางโครโมโซม และพลาสมิด ซึ่งกลไกการดื้อยาหลักๆที่พบใน *A. baumannii* มีทั้งหมด 4 กลไก ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา และ การขับยาออกจากเซลล์ (13) ซึ่งอาจเกิดจากเพียงกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือ อาจเกิดขึ้นพร้อมกันด้วยหลายกลไกก็เป็นได้ โดยการขับยาออกจากเซลล์ด้วย efflux pump เป็นสาเหตุหลักในการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อใน

โรงพยาบาล กลไกนี้ทำให้ความเข้มข้นยาภายในเซลล์ลดลง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ระบบ efflux pump ในปัจจุบันมี 6 ชนิด ได้แก่ resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily, major facilitator superfamily (MFS), multidrug and toxic compound extrusion (MATE) superfamily, small multidrug resistance (SMR) family, ATP binding cassette (ABC) superfamily และ proteobacterial antimicrobial composite efflux (PACE) family (14) โดยมีการศึกษาพบ efflux pump ในกลุ่ม RND เป็นกลุ่มแรก เนื่องจากมีโมเลกุลขนาดใหญ่ พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเกือบทุกชนิด เป็นกลไกที่ทำให้เชื้อดื้อยาหลายขนานได้ พบว่าการแสดงออกของ AdeABC ซึ่งเป็นระบบย่อยหนึ่งในกลุ่ม RND family ทำให้เกิดการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาหลายชนิด ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางโครงสร้าง เช่น amikacin, chloramphenicol, cefotaxime, erythromycin, gentamicin, kanamycin, norfloxacin, tetracycline, tobracycline และ trimethoprim เป็นต้น (15) ในส่วนของระบบ MFS family ซึ่งเป็นระบบที่มีการศึกษารองลงมา พบว่ายีน *craA* มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการดื้อยา chloramphenicol, imipenem, quinolones, aminoglycosides และ tetracycline (16) มีการศึกษาพบว่ายีน *ermB* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม MFS family เกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายขนาน ซึ่งมักอยู่ในชิ้นส่วนสารพันธุกรรมพลาสมิด (plasmid) ในเชื้อ *Escherichia coli* พบการสังเคราะห์โปรตีน EmrB ในเชื้อ *A. baumannii* และเมื่อทำการทดสอบความสามารถของ efflux pump ด้วยเทคนิค spot assay เปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของยา colistin ตั้งแต่ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระหว่างเชื้อ *A. baumannii* เทียบกับ เชื้อ *A. baumannii* กลายพันธุ์โดยถูกตัดยีน *ermB* ออก พบว่าเชื้อกลายพันธุ์เจริญได้น้อยกว่า หรือไม่สามารถเจริญได้ เมื่อเทียบกับเชื้อ *A. baumannii* ที่ความเข้มข้นยาเท่ากัน (17) ระบบ MATE efflux pump ประกอบด้วยยีน *adeM* เป็นยีนสำคัญ เกี่ยวข้องกับการดื้อยา β -lactams หรือ cephalosporin (18),(19) แต่อาจมีความสัมพันธ์กับการดื้อยา aminoglycosides, trimethoprim, fluoroquinolones, erythromycin และ chloramphenicol ระบบ SMR efflux pump ประกอบด้วยยีน *abeS* ปรากฏอยู่บนจีโนมของเชื้อ *A. baumannii* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา novobiocin, fluoroquinolones, erythromycin และ chloramphenicol (20-22) ระบบ ABC efflux pump เป็น efflux pump เพียงระบบเดียวที่ใช้การย่อยสลาย ATP เป็นแหล่งพลังงาน ประกอบด้วยโปรตีนที่อยู่ภายในไซโตพลาซึมของเชื้อ และเนื้อเยื่อของเซลล์เจ้าบ้าน eukaryote พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา erythromycin และ

gramicidin (23),(24) ระบบ PACE efflux pump สามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด โดยพบยีน *aceI* ในเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อ chlorhexidine (25) กลไกการดื้อยาด้วยการขับยาออกบางชนิดที่อาจพบการแสดงออกต่างๆ ในเชื้อ *A. baumannii* ที่มีความไวต่อยาต้านจุลชีพ หรือได้รับสารพันธุกรรมจากเชื้ออื่นๆ ภายหลัง ระบบ efflux pump จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อพัฒนาความสามารถในการดื้อยาหลายชนิดเพิ่มขึ้น หากมีการใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณความเข้มข้นมากเกินไปจนความจำเป็น นำไปสู่การรักษาผู้ป่วยที่จำกัด และเป็นปัญหาสาธารณสุขต่อไป

การศึกษา efflux pump สามารถศึกษาได้จากการแสดงออกทางฟีโนไทป์ได้หลายเทคนิค เช่น การสังเกตการเรืองของสาร ethidium bromide (EB) ผ่านแสงยูวี โดยพบการเรืองแสงบริเวณที่เชื้อเจริญมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แสดงถึงการทำงานของ efflux pump ในการขับสาร EB ออกนอกเซลล์ (26) การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth microdilution เทียบกับการทำงานร่วมกับสารยับยั้ง efflux pump (efflux pump inhibitor, EPI) หรือเทคนิค spot assay เปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของยาปริมาณต่างๆ ระหว่างเชื้อ *A. baumannii* เทียบกับ เชื้อ *A. baumannii* กลายพันธุ์โดยถูกตัดยีน efflux pump ออก (18) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นการทำงานของ efflux pump ได้ทั้งทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ การศึกษาถึงจีโนไทป์ของ efflux pump ได้ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณและตรวจวัดชิ้นส่วนสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ เทคนิค Real-Time PCR ซึ่งสามารถตรวจการแสดงออกของยีนได้ทุกปฏิกิริยา การตรวจวัดปริมาณการสังเคราะห์โปรตีนจากสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เป็นต้น มีการศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ หรือเหนียวนำให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ เปรียบเทียบการแสดงออกของ efflux pump ในเชื้อสายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ หรือสายพันธุ์มาตรฐาน ทั้งวิธีการเหนียวนำเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในระดับต่างๆ และเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเรื่อยๆ จนถึงความเข้มข้น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่ดื้อยาที่ความเข้มข้นนี้ซ้ำ 5 ครั้ง และนำไปเลี้ยงซ้ำอีก 2 ครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่มียาเพื่อให้คงสภาพการดื้อยา (27) วิธี serial subcultivation ใช้แผ่นยา imipenem 10 ไมโครกรัม วางลงบน Mueller-Hinton Agar จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่เจริญบริเวณขอบ

ของ inhibition zone นำมาเพาะเลี้ยงและทำการเหนี่ยวนำซ้ำเรื่อยๆ โดยบริเวณขอบที่เชื้อเจริญได้ มีความเข้มข้นของยาในระดับ subinhibitory (27) หรือวิธี serial passaging ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นยาเท่ากับค่า MIC เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำเชื้อมาเพิ่มจำนวนต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นยาเพิ่มขึ้นเป็น 8 เท่าของค่า MIC, 16 เท่าของค่า MIC ตามลำดับ และนำไปเลี้ยงซ้ำอีก 2 ครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นยา 16 เท่าของค่า MIC (27)

ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาถึงกลไกการดื้อยาด้วยการขับยาออกจากเซลล์ด้วย efflux pump ในเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนาน และสายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำให้ดื้อต่อยา amikacin โดยใช้วิธี serial passaging ในการเหนี่ยวนำเชื้อให้ดื้อยา จากนั้นตรวจวัดการแสดงออกของ efflux pump ทั้งวิธีทางพีโนไทป์ ด้วยการเปรียบเทียบค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งควรมีค่าลดลงอย่างน้อย 4 เท่า ในการทดสอบที่มีสาร EPI และวิธีทางจีโนไทป์ ด้วยการเพิ่มปริมาณและตรวจวัดชิ้นส่วนสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เปรียบเทียบรูปแบบการดื้อยา และการแสดงออกของ efflux pump ระหว่างเชื่อก่อนเหนี่ยวนำและหลังถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้จะก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เพิ่มขึ้น นำไปสู่การพัฒนาแนวทางการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *A. baumannii* และชี้ให้เห็นถึงความสำคัญในการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปจนความจำเป็นที่จะนำไปสู่การดื้อยาของเชื้อได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.2 คำถามงานวิจัย

1.2.1 การแสดงออกของ efflux pump ระบบ RND ทั้งทางพีโนไทป์ และทางจีโนไทป์ สัมพันธ์กับการดื้อต่อยา amikacin ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* หรือไม่

1.2.2 การแสดงออกของ efflux pump ระบบ RND แตกต่างกันในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาหลายขนาน สายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา และสายพันธุ์มาตรฐานหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

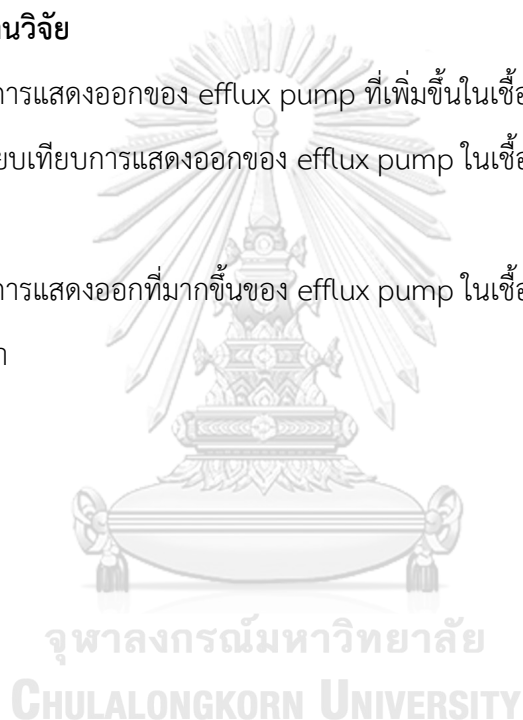
1.3.1 เพื่อศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ในการดื้อต่อยา amikacin ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* โดยวิธีทางพีโนไทป์ และทางจีโนไทป์

1.3.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ยีน *adeB* ในกลไก efflux pump ของ ระบบ RND และความไวต่อยา amikacin ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* หลังถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin

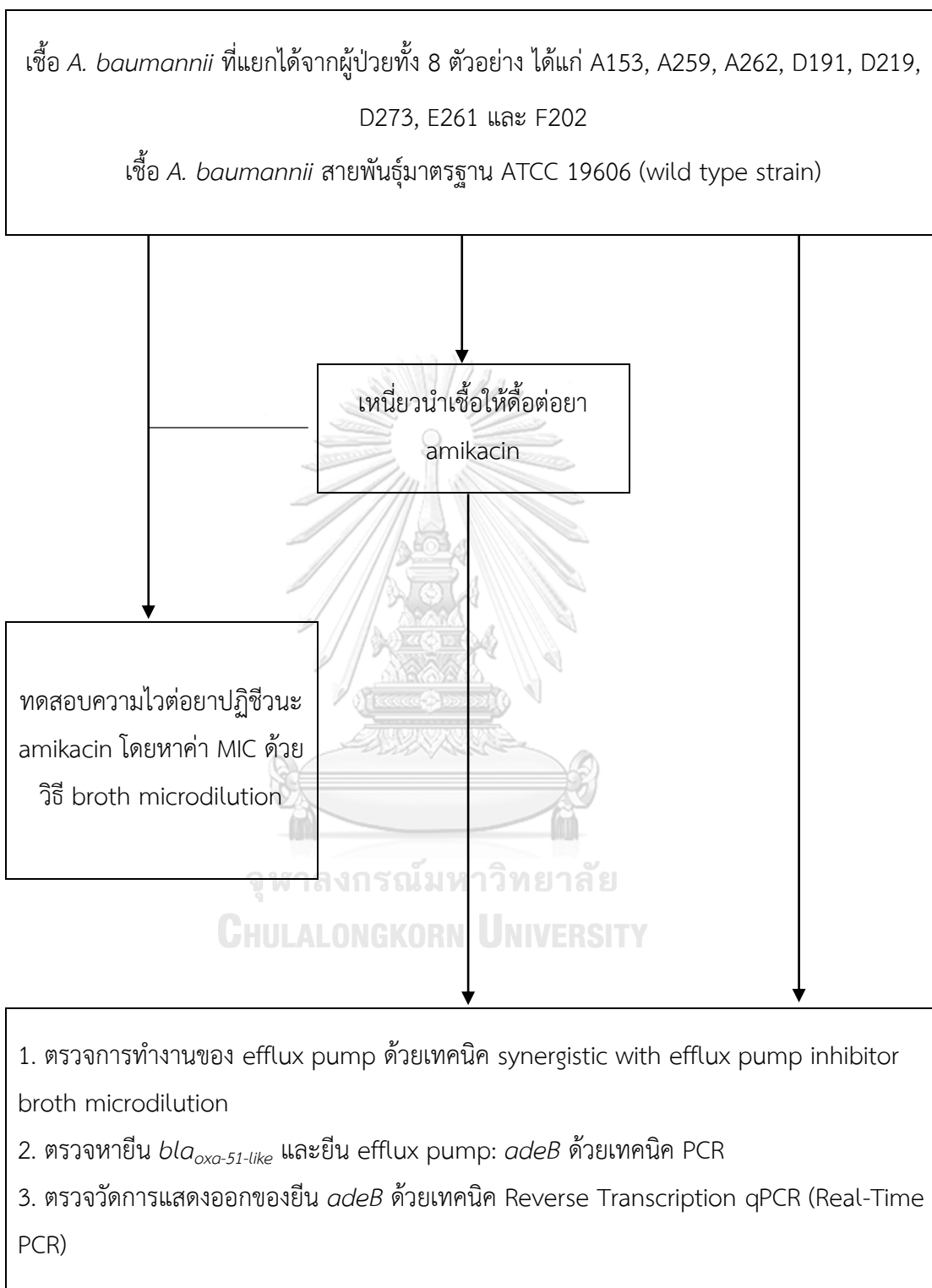
1.4 สมมติฐานงานวิจัย

1.4.1 พบการแสดงออกของ efflux pump ที่เพิ่มขึ้นในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่มีการดื้อยา เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ efflux pump ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ไวต่อยา

1.4.2 พบการแสดงออกที่มากขึ้นของ efflux pump ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา



1.6 กรอบแนวคิดของงานวิจัย



1.7 ขอบเขตงานวิจัย

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ผ่านการเพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคกลางตอนบน โดยคัดเลือกเชื้อที่มีแบบแผนความไวต่อยาต่างกัน 4 แบบ จำนวน 8 ตัวอย่าง

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.8.1 เข้าใจความสัมพันธ์ของการดื้อยาหลายขนานในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* กับการแสดงออกของยีน efflux pump

1.8.2 เป็นความรู้สำหรับการศึกษาต่อในอนาคตและเป็นข้อมูลให้แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ตระหนักในการเลือกใช้ยาในการรักษา



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะของเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *Acinetobacter* ถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ที่ชื่อว่า Willem Beijerinck ในปี พ.ศ. 2454 โดยแยกได้จากดิน (28) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลมแท่ง (coccobacilli) อาศัยอากาศในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) ไม่หมักย่อยน้ำตาล (non-fermentation) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบ oxidase เป็นลบ และการทดสอบ catalase เป็นบวก แบคทีเรียในจีนัสนี้ประกอบด้วยหลายสปีชีส์ สปีชีส์ที่พบได้บ่อยที่สุดในการแยกเชื้อในสิ่งส่งตรวจ คือ *A. baumannii* ทั้งนี้การรายงานจะระบุเป็น *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพคล้ายกัน จึงยากต่อการจำแนกสายพันธุ์ (29) มักเป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) สามารถอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ สิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล และอยู่บริเวณผิวหนังได้ จึงทำให้พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ไม่เพียงแต่ก่อโรคในสถานพยาบาล (hospital-acquired infection; HAI) แต่ยังสามารถก่อโรคในชุมชนได้อีกด้วย (community-acquired infection; CAI) เช่น โรคปอดบวมจากการติดเชื้อ (community-acquired pneumonia; CAP) โดยเชื้อที่เป็นสาเหตุ CAI จะมีอุบัติการณ์ เป็นเชื้อ Multidrug resistance; MDR - *A. baumannii* (MDRAB) น้อยกว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุ HAI จากรายงานของโรงพยาบาลสงขลา นครินทร์ ในปี พ.ศ. 2550 พบว่าโรคปอดบวมจากการติดเชื้อ ที่มีความไวต่อยา ciprofloxacin, co-trimoxazole, ceftazidime, imipenem, amikacin และ gentamicin ซึ่งผู้ป่วยมีภาวะปอดบวมรุนแรง มีความผิดปกติของหลายอวัยวะ และเสียชีวิตหลังจากเข้ารับการรักษา 30 ชั่วโมง (30) นอกจากนี้เชื้อ *A. baumannii* ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ปอด การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และเยื่อช่องท้องอักเสบ เป็นต้น

2.2 การก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii*

กลไกในการก่อโรคของ *A. baumannii* ในมนุษย์นั้น ประกอบด้วยสมมติฐาน 4 ข้อ ดังนี้ การสร้างสาร polysaccharide บริเวณแคปซูลทำให้สามารถจับเซลล์เยื่อปูดได้ดี การสร้าง fimbriae ทำให้สามารถจับกับเซลล์เยื่อปูดได้ดี การสร้างเอนไซม์บางชนิดที่ทำลายไขมันปกคลุมเนื้อเยื่อ ทำให้เชื้อ

จับเซลล์ได้ง่ายขึ้น และ ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงจากคุณสมบัติของ lipopolysaccharide และ lipid A ของเชื้อ (13) เชื้อ สามารถก่อโรคได้ในหลายระบบ แต่การติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในหออภิบาล ผู้ป่วยมี 3 ระบบ คือ ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ระบบโลหิต และระบบทางเดินปัสสาวะ (31)

ปอดอักเสบในโรงพยาบาล (hospital-acquired pneumonia; HAP) เป็นการติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุด ส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อในระยะหลัง (late-onset HAP) คือ หลังจากนอนโรงพยาบาลเกิน 4 วัน (32) การวินิจฉัยใช้หลักเกณฑ์เดียวกับปอดอักเสบทั่วไป คือ มีไข้ อุณหภูมิมากกว่า 38 องศาเซลเซียส มีลักษณะ และสีเสมหะเปลี่ยน มีเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงของภาพรังสีทรวงอก (33) ปอดอักเสบจาก *Acinetobacter* จะพบหลายกลีบปอด แต่มีรายงานที่พบเป็นโพรงน้ำในช่องปอด หนองในช่องปอด หรือเกิดรูเชื่อมระหว่างปอดและช่องเยื่อหุ้มปอด (34) ตามมาด้วยการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งบางรายงานพบได้ถึงร้อยละ 50 (35) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ต้องนอนโรงพยาบาลนาน 7 - 9 วัน และพบอัตราการเสียชีวิตสูงกว่าการติดเชื้อชนิดอื่น Fagon และคณะ (36) พบว่าผู้ป่วยที่ปอดอักเสบจาก MDR-*A. baumannii* มีอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 87 เมื่อเทียบกับเชื้อชนิดอื่นมีอัตราการเสียชีวิตเพียงร้อยละ 55 อย่างมีนัยสำคัญ อัตราการเสียชีวิตจะลดลงเมื่อผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสม มากกว่า 3 วัน (32, 37) แสดงให้เห็นว่าการให้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมตั้งแต่แรกจะช่วยลดอัตราการเสียชีวิตได้

การติดเชื้อในอวัยวะต่างๆ สามารถนำมาสู่การติดเชื้อในกระแสเลือดได้ โดยมักพบการติดเชื้อในกระแสเลือดในผู้ป่วยสูงอายุและผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำ (38) Vidal และคณะ (39) ศึกษาผู้ป่วย 296 ราย ที่ติดเชื้อ *Acinetobacter* ในกระแสเลือดพบว่าร้อยละ 26.3 ได้รับสารสเตียรอยด์ และร้อยละ 23.6 เป็นผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูกหรือปลูกถ่ายอวัยวะอื่น แหล่งสำคัญของการติดเชื้อในกระแสเลือดมาจากสายสวนหลอดเลือดดำส่วนกลางเกือบร้อยละ 40 รองลงมาเป็นปอดอักเสบ และติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (37) ผู้ป่วยมากถึงหนึ่งในสามจะมีภาวะช็อกตามมา (40, 41) ภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ที่สำคัญคือ การติดเชื้อในลิ้นหัวใจเทียม หลอดเลือดดำอุดตันอักเสบ และหนองในตับ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อจะมีอัตราการเสียชีวิต ร้อยละ 15-46 (42)

อุบัติการณ์การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ พบได้ร้อยละ 30 (43) โดยพบในผู้ป่วยเพศหญิงที่คาสายสวนปัสสาวะและนอนในหออภิบาลผู้ป่วยเป็นเวลานาน (44, 45) มีโอกาสเกิดกรวยไตอักเสบ และติดเชื้อในกระแสเลือด ตามมา การวินิจฉัยทำได้โดยเก็บปัสสาวะส่งตรวจ และ พบเชื้ออย่างน้อย

$10^2 - 10^5$ colony-forming unit (CFU/mL) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และควรส่งเพาะเลี้ยงเชื้อในเลือด ก่อนให้ยาต้านจุลชีพด้วย (46)

2.3 การรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii*

การรักษาการติดเชื้อ *Acinetobacter* ยังคงต้อง ใช้ยาต้านจุลชีพเป็นหลักร่วมกับการรักษา ประคับประคอง อื่นๆ การเลือกใช้ยาที่ครอบคลุมเชื้อแต่แรกยังคงมีความสำคัญ การรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* มีความซับซ้อนมากขึ้น เนื่องจากพบอุบัติการณ์ MDR - *A. baumannii* ที่ค่อนข้างสูง ซึ่งยาต้านจุลชีพที่สามารถใช้ในการรักษาในปัจจุบัน มีทั้งการใช้ยาต้านจุลชีพด้วยการใช้ยาชนิดเดียว ได้แก่ imipenem, meropenem, ampicillin/sulbactam, amikacin, polymyxin B, colistin, sulbactam, tigecycline และยาผสมที่เสริมฤทธิ์กัน เช่น rifampicin ร่วมกับ colistin หรือ imipenem การใช้ยา imipenem หรือ meropenem ร่วมกับ aminoglycosides เป็นต้น (12)

Amikacin เป็นยาในกลุ่ม Aminoglycosides เป็นยาที่มีประโยชน์มากในการรักษาโรคติดเชื้อ เนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยกลไกหลักในการออกฤทธิ์ คือ การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เนื่องจากยานี้มีใช้ในรูปแบบฉีดเท่านั้น และยังมีปัญหาของพิษต่อไต และหู ทำให้มีการใช้ยานี้ไม่มากเท่ายาในกลุ่มอื่น มักไม่ใช้เป็นยาการรักษาเดี่ยว โดยเฉพาะผู้ที่ได้รับการรักษาเป็นระยะเวลานาน (47)

Imipenem เป็นยาในกลุ่ม carbapenems ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นยาหลักที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ในอดีต อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบว่าเชื้อมีความไวต่อยาลดลงจากการมีกลไกการดื้อยาที่หลากหลาย จากกรณีศึกษาของโรงพยาบาลในประเทศสเปน ในผู้ป่วยที่เป็น Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) จากการติดเชื้อ *A. baumannii* มีความไวต่อ imipenem จำนวน 14 ราย และได้รับการรักษาด้วย imipenem cilastatin ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำขนาด 2-3 กรัม ต่อวัน ผลการรักษาพบว่าผู้ป่วย 8 ราย มีอาการทางคลินิกดีขึ้น ร้อยละ 57 (11) จากการศึกษา *in vitro* เพื่อประเมินค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชพลศาสตร์ซึ่ง เกี่ยวข้องกับระยะเวลาของการให้ meropenem โดยใช้เชื้อ *A. baumannii* พบว่าการให้ meropenem ขนาด 1 กรัม ทุก 8 ชั่วโมง หยดเข้าหลอดเลือดดำอย่างต่อเนื่องนาน 3 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีที่สุด (48) ในกรณีที่เชื้อมีความไวต่อ imipenem สามารถ

เลือกใช้นี้ได้ เนื่องจากยามีประสิทธิภาพปานกลาง และมีความปลอดภัยสูง แต่ไม่ควรใช้เป็น empirical therapy ในพื้นที่ที่เชื่อมีการดื้อต่อยานี้สูง

Colistin จัดเป็นยาเก่าในกลุ่ม polymyxins ปัจจุบันมีการนำยานี้กลับมาใช้ใหม่ในการรักษาโรค ติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา ผลการศึกษาทางคลินิกของโรงพยาบาลศิริราชในผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่ปอด กระแสเลือด ช่องท้อง ระบบทางเดินปัสสาวะ ผิวหนัง และไซนัสอักเสบ จำนวน 78 ราย เป็นผู้ป่วยติดเชื้อ multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 7 ราย ติดเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน จำนวน 71 ราย โดยศึกษาประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของยา colistin ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ขนาด 2.5-5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยแบ่งให้วันละ 1-2 ครั้ง พบว่าผู้ป่วยร้อยละ 80.8 และ 94.9 มีอาการแสดงทางคลินิกของการติดเชื้อหายไป และผลการเพาะเชื้อเป็นลบ ตามลำดับ โดยพบความเป็นพิษต่อไต จากการใช้ colistin ร้อยละ 30.8 ซึ่งปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตจากการใช้ colistin ได้แก่ โรคไตเสื่อมเรื้อรัง และภาวะพร่องสารน้ำ (12)

จากการศึกษาของ Pothirat C และคณะ (49) ได้เปรียบเทียบผู้ป่วยปอดอักเสบ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจำนวน 25 ราย เมื่อย้อมเสมหะด้วย Gram stain พบ gram-negative coccobacilli จะได้รับยา colistin เป็น empirical treatment ทั้งแบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำ และสูดพ่นแบบละอองฝอย ส่วนกลุ่มที่สองจำนวน 28 ราย ใช้น้ำยา colistin เป็น alternative treatment คือมีการเปลี่ยนยาภายหลังเมื่อทราบความไวของเชื้อ โดยทั้งสองกลุ่มมีความรุนแรงของโรคใกล้เคียงกัน พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 กลุ่มที่ได้ยา colistin แบบ empirical treatment มีอัตราการเสียชีวิตน้อยกว่ากลุ่มที่ได้แบบ alternative treatment ราวครึ่งหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 30.4 และร้อยละ 60.0, $p < 0.031$) ส่วนในแง่ของการเกิดพิษต่อไต พบว่าในวันที่ 28 กลุ่มที่ได้ยา colistin แบบ alternative มีการทำงานของไตผิดปกติสูงกว่ากลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่ให้น้ำยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมล่าช้าไป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกยาต้านจุลชีพที่ไวกับเชื้อตั้งแต่แรกมีผลดีกว่าในการศึกษาของ Rattanaumpawan P และคณะ (50) การใช้น้ำยา colistin ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ร่วมกับสูดพ่นแบบละอองฝอย (nebulizer) มีประสิทธิภาพในการรักษาปอดอักเสบได้ดีกว่าฉีดเพียงอย่างเดียว การศึกษาแบบสุ่มในผู้ป่วยปอดอักเสบจากเชื้อแกรมลบ โดยกลุ่มแรกจำนวน 51 ราย ให้น้ำยา colistin แบบละอองฝอยขนาดเท่ากับ 75 มิลลิกรัม ในน้ำเกลือ 4 มิลลิลิตร ส่วนกลุ่มที่ 2 ผู้ป่วยปอดอักเสบจำนวน 49 ราย ให้น้ำเกลืออย่างเดียว พบว่ากลุ่มที่ได้

ยา colistin ชนิดพ่นมีการกำจัดเชื้อที่ดีกว่า มีความปลอดภัย แต่ผลทางคลินิกทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างมีน้อย การใช้ยา colistin แบบสูดเป็นละอองฝอย มีปัญหาเรื่องเป็นฟองแต่คุณสมบัติของยาไม่เปลี่ยน หากพ่นผ่านเครื่องช่วยหายใจควรปิด flow sensor ก่อน เพราะอาจทำให้ flow sensor เสียได้ง่าย อีกประเด็นคือ nebulizer ที่ใช้ซ้ำต้องหมั่นทำความสะอาดเสมอ เพราะหากไม่ทำความสะอาดอาจทำให้ยาหมดซ้หรือผู้ป่วยได้รับยาน้อยกว่าปกติ (49)

จากการศึกษาของ วันวิสาข์ และพิรยา (51) โดยศึกษาข้อมูลการรักษาผู้ป่วยปอดอักเสบในโรงพยาบาล (ปอดอักเสบในโรงพยาบาล หรือ hospital-acquired pneumonia, HAP และปอดอักเสบที่เกี่ยวข้องกับเครื่องช่วยหายใจ หรือ ventilator-associated pneumonia, VAP) จากการติดเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน (MDR-*A. baumannii*) และ *A. baumannii* ดื้อยาเกือบทุกชนิด (XDR-*A. baumannii*) ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยมหาสารคามราชสีมา ณ หอผู้ป่วยอายุรกรรม ทั้งหอผู้ป่วยสามัญ หออภิบาลผู้ป่วยวิกฤต (Intensive Care Unit; ICU) และหออภิบาลผู้ป่วยหนักทางเดินหายใจ (Respiratory Care Unit; RCU) ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2559 ทั้งหมด 94 ราย พบว่ามีแบบแผนการใช้ยาต้านจุลชีพตามกลุ่มยาทั้งหมด 17 แบบแผน แบบแผนยาที่ผู้ป่วยได้รับมากที่สุด คือ การใช้ colistin ฉีดร่วมกับยากลุ่ม carbapenems 31 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.0 ผู้ป่วยกลุ่มนี้ 4 ราย มีผลลัพธ์ทางคลินิกดีขึ้นเมื่อได้ยาต้านจุลชีพ 72 ชั่วโมง เมื่อติดตามจนสิ้นสุดการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพพบว่า 8 รายหายจากโรค และ 22 รายเสียชีวิตในโรงพยาบาล การใช้ยาต้านจุลชีพที่มี colistin ให้ผลลัพธ์ทางคลินิกไม่ต่างจากการใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่มี colistin ผู้ป่วยที่มีการใช้ยาต้านจุลชีพพร้อมกันหลายชนิดมีอัตราการเสียชีวิตในโรงพยาบาลน้อยกว่าผู้ที่ใช้ยาต้านจุลชีพชนิดเดียว ($P=0.049$) แต่พบอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาต้านจุลชีพในผู้ป่วย 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 13.8 โดยพบอาการเป็นพิษต่อไตจาก colistin 11 ราย จากผู้ใช้ colistin ชนิดยาฉีด 37 ราย เพราะฉะนั้นแบบแผนยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยปอดอักเสบในโรงพยาบาลที่ติดเชื้อ MDR *A. baumannii* และ XDR *A. baumannii* มากที่สุด คือ การใช้ colistin ฉีดร่วมกับยากลุ่ม carbapenems และ ควรมีการติดตามการเกิดพิษต่อไต

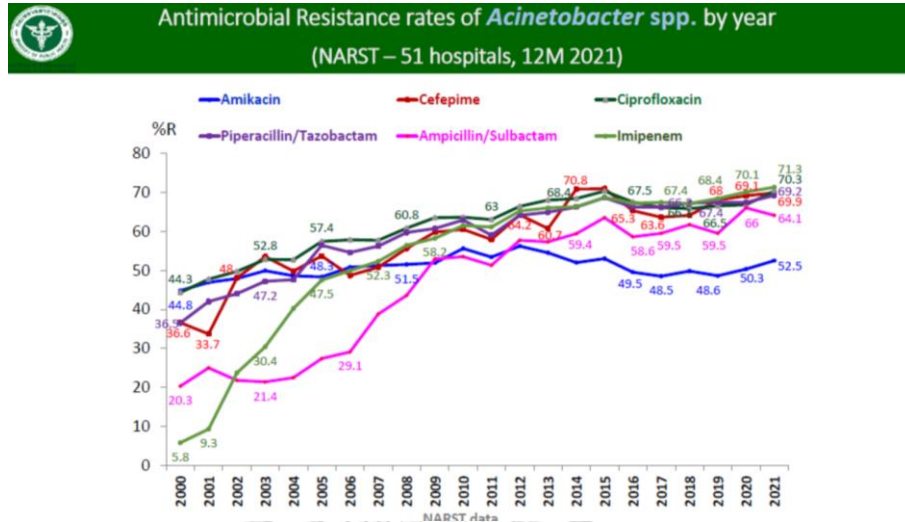
จากการศึกษาของ บุษยาและคณะ (52) โดยเปรียบเทียบผลการรักษาผู้ป่วยปอดอักเสบจากการติดเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน ด้วยแบบแผนการรักษาที่มี tigecycline, colistin และ tigecycline ร่วมกับ colistin ติดต่อกันอย่างน้อย 3 วัน ซึ่งเป็นข้อมูลย้อนหลังระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง ปีพ.ศ. 2558 พบว่าผู้ป่วย 264 ราย ประกอบด้วยเพศชายร้อยละ 61 จำแนกเป็น

กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย tigecycline 66 ราย colistin 85 ราย และ tigecycline ร่วมกับ colistin 113 ราย มีอัตราการเสียชีวิตภายใน 30 วัน ร้อยละ 62.1, 45.9 และ 58.4 ตามลำดับ มีอาการแสดงทางคลินิกดีขึ้นร้อยละ 34.8, 49.4 และ 39.8 ตามลำดับ แต่พบอาการไม่พึงประสงค์ ได้แก่ ไตบาดเจ็บเฉียบพลันร้อยละ 15.2, 47.1 และ 58.4 ตามลำดับ อาการตับบาดเจ็บร้อยละ 16.7, 5.9 และ 7.1 ตามลำดับสอดคล้องกับการศึกษาของ ศิรินาถ และคณะ (53) ที่พบว่าจากผู้ป่วยติดเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 49 รายที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลวชิระภูเก็ต ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน ปี พ.ศ. 2559 โดยมีผู้ป่วย 46 รายที่ได้รับยาอื่น ๆ ได้แก่ ceftriaxone, ceftazidime, meropenem, tigecycline, piperacillin/tazobactam, vancomycin และ amphotericin B ระหว่างรอผลยืนยันการติดเชื้อ *A. baumannii* และผู้ป่วย 3 รายที่ได้รับยาฉีด colistin ในทันที โดยศึกษาเปรียบเทียบผลการรักษาด้วยยา colistin เดี่ยว 11 ราย และได้รับ colistin ร่วมกับยาอื่น 38 ราย มีสัดส่วนของผู้ป่วยที่ได้รับยาฉีด colistin เดี่ยว (ร้อยละ 45.4) ที่เพาะเชื้อซ้ำแล้วไม่พบเชื้อ *A. baumannii* หลังสิ้นสุดการรักษา มากกว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาฉีด colistin ร่วมกับยาอื่น (ร้อยละ 31.6) แต่มักพบอาการแทรกซ้อน โดยพบการเกิดพิษต่อไตในผู้ป่วย 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.9

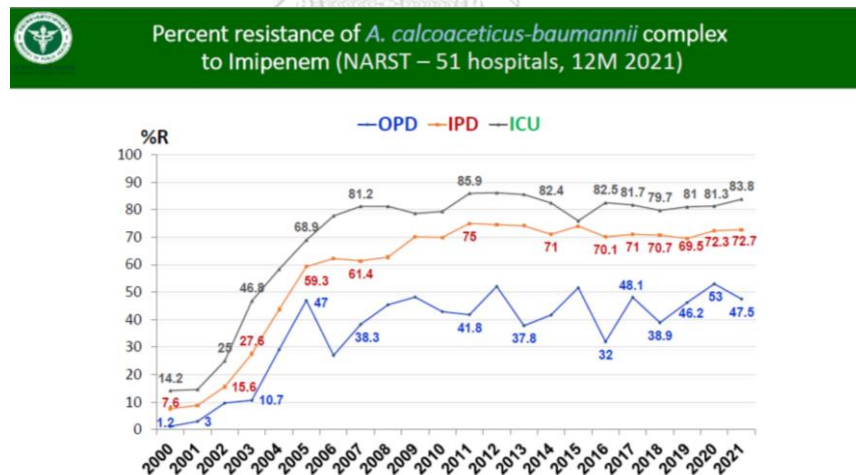
2.4 กลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*

ข้อมูลสถานการณ์เชื้อดื้อยาของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย (5) พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั่วประเทศ 51 โรงพยาบาล ในปี พ.ศ. 2564 มีความดื้อยาด้านจุลชีพแต่ละชนิด เฉลี่ยประมาณร้อยละ 66.2 โดยดื้อยา imipenem, ciprofloxacin, cefepime, piperacillin/tazobactam, ampicillin/sulbactam และ amikacin ร้อยละ 71.3, 70.3, 69.9, 69.2, 64.1 และ 52.2 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังคงมีความไวต่อยา colistin ถึงร้อยละ 97.5 เมื่อพิจารณาผลความไวต่อยาของเชื้อ *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* ที่จำแนกได้จากผู้ป่วยนอก (OPD) ผู้ป่วยใน (IPD) และผู้ป่วยวิกฤต (ICU) พบว่าเชื้อที่จำแนกได้จากผู้ป่วยหนักมีความไวต่อยาต่ำกว่าเชื้อที่จำแนกได้จากผู้ป่วยใน และผู้ป่วยนอกตามลำดับ โดยปี พ.ศ. 2564 มีอัตราความไวต่อยา amikacin ของเชื้อ *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* ที่จำแนกได้จากผู้ป่วยนอก ผู้ป่วยใน และผู้ป่วยหนัก ร้อยละ 60.5, 45.1 และ 39.9 ตามลำดับ ปัจจุบันพบการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่มีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อการรักษาที่จำกัด ซึ่งกลไกการดื้อยาที่พบในเชื้อ *A. baumannii* มีทั้งหมด 4 กลไก ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา การลดการนำยาเข้า

เซลล์โดยลดการสร้าง porin การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา และการขับยาออกจากเซลล์ (13)



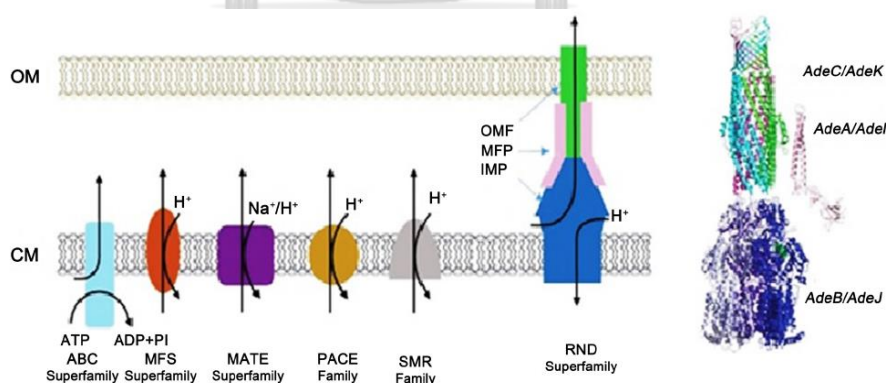
ภาพที่ 1 แสดงแนวโน้มอัตราการความดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 – 2564 (5)



ภาพที่ 2 แสดงแนวโน้มอัตราการการดื้อยา imipenem ของเชื้อ *A. calcoaceticus - baumannii* complex ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 – 2564 (5)

2.5 กลไกการดื้อยาด้วยระบบ efflux pump ของเชื้อ *A. baumannii*

การดื้อยาด้วยระบบ efflux pump เป็นกลไกที่ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ และสารพิษได้เร็ว และมีประสิทธิภาพที่สุด ซึ่งอาจมีแต่กำเนิด (intrinsic) และมีการแสดงออกมากขึ้น หรือได้รับสารพันธุกรรมกลายพันธุ์จากพลาสมิด โดยสังเคราะห์โปรตีนขนส่งชนิดที่ต้องการพลังงาน (energy-dependent transporter) (54) เภณที่ในการจัดระบบ efflux pump จะใช้ส่วนประกอบ สารตั้งต้น (substrate) แหล่งพลังงานที่ใช้ในการขับสารออกนอกเซลล์ และจำนวนของโปรตีนที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane spanning regions) (55) โดยปัจจุบันสามารถจัดระบบ efflux pump เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ ATP-binding cassette (ABC) family, major facilitator superfamily (MFS), multidrug and toxin extrusion (MATE) family, small multidrug resistance (SMR) family, resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily และ proteobacterial antimicrobial compound efflux (PACE) family (25) โดยกลุ่ม efflux pump ระบบ RND, MFS, SMR และ ABC เป็นโปรตีนขนส่งที่มีขนาดใหญ่สามารถขับสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ยาปฏิชีวนะ ผลผลิตจากกระบวนการเผาผลาญทางเคมี (metabolite) ออกนอกเซลล์ได้ ระบบ efflux pump สามารถพบได้ทั้งโครงสร้างองค์ประกอบเดี่ยว (single component) และหลายองค์ประกอบ (multiple component) ซึ่งพบลักษณะหลายองค์ประกอบได้ในกลุ่ม RND family โดย efflux pump มีหน้าที่ในการขับสารจากภายในไซโตพลาสซึม และบริเวณระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ (56)

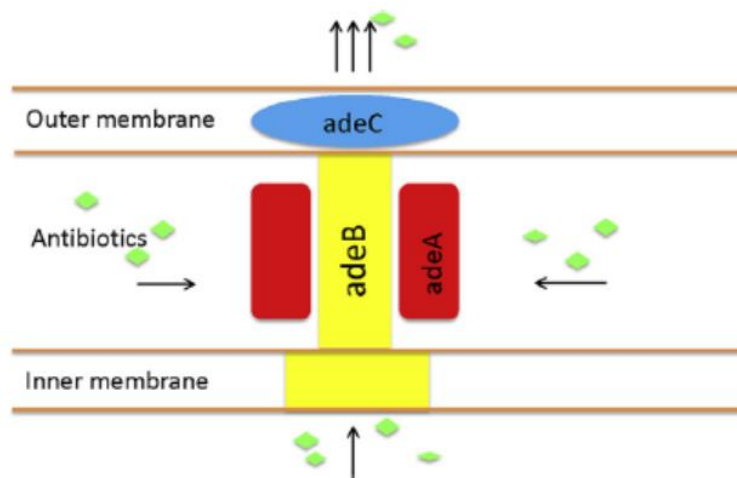


ภาพที่ 3 แสดงแบบจำลองแสดงโครงสร้างของระบบ efflux pump หลักในเชื้อ *A. baumannii* (57)

1.1. ระบบ RND efflux pump พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเกือบทุกชนิด เป็นกลไกที่ทำให้เชื้อดื้อยาหลายขนานได้ ทั้งใน *A. baumannii*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* (58) โดย RND

family ประกอบด้วยยีน 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ *adeABC*, *adeIJK* และ *adeFGH* (59) ซึ่งระบบ *AdeABC* และ *AdeIJK* มีรายงานการพบในสิ่งส่งตรวจที่แยกได้จากผู้ป่วย ส่วนระบบ *AdeFGH* พบการแสดงออกในเชื้อในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

1.1.1. *AdeABC* เป็นกลุ่มยีนที่พบเป็นกลุ่มแรก และมีการศึกษามากที่สุดในปัจจุบัน พบอยู่บนโครโมโซมของเชื้อ *A. baumannii* ประกอบด้วยยีน *adeA*, *adeB* และ *adeC* เรียงต่อกันทำหน้าที่สังเคราะห์ membrane fusion protein, multidrug transporter และ outer membrane channel protein ตามลำดับ โดยโปรตีน *AdeB* จะจับกับยาปฏิชีวนะหรือสารตั้งต้นภายในไซโตพลาสซึม หรือเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของชั้น phospholipid bilayer จากนั้นจะขับออกนอกเซลล์โดยผ่าน *AdeC* ซึ่งเป็น membrane channel protein (60) มีการตรวจพบยีน *adeB* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจสูง โดยพบได้ในทุกสายพันธุ์ (56) แม้ว่าบางการศึกษาพบร้อยละ 70-75 (61, 62) อาจพบยีน *adeA* มากกว่ายีน *adeB* (63, 64) อย่างไรก็ตามนักวิจัยส่วนใหญ่พบว่ายีน *adeB* มีความสำคัญมากที่สุดในระบบ *adeABC* และเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* (56, 65) ส่วนยีน *adeC* ตรวจพบได้ต่ำ คาดว่ายีน *adeC* น่าจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (56) พบว่ากลุ่มยีน *adeABC* มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาหลายชนิด ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางโครงสร้าง เช่น amikacin, chloramphenicol, cefotaxime, erythromycin, gentamicin, kanamycin, norfloxacin, tetracycline, tobracycline และ trimethoprim เป็นต้น โดยยีน *AdeABC* ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยกลุ่มยีน *AdeRS* อยู่ระหว่างกลุ่มยีน *AdeABC* (66) มีการศึกษาพบว่าหากการทำงานของยีน *adeR* หรือยีน *adeS* ไม่ปกติ เชื้อจะมีการดื้อยา tigecycline, chloramphenicol, minocycline, erythromycin, cefotaxime, tetracycline, fluoroquinolones และ trimethoprim มากขึ้น แต่ช่วยเพิ่มความไวต่อยา aminoglycoside (56)



ภาพที่ 4 แสดงถึงการทำงานของ *adeABC* efflux pump ในเชื้อ *A. baumannii* (60)

- 1.1.2. *AdeIJK* กลุ่มยีนขนาดใหญ่เป็นอันดับสองในระบบ RND ศึกษาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 พบการแสดงออกน้อยกว่า *AdeABC* ประกอบด้วยยีน *adeI*, *adeJ* และ *adeK* พบการแสดงออกของยีน *adeJ* ในเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจร้อยละ 86 - 100 สามารถขับออกยาในกลุ่ม β -lactams, lincosamide, fluoroquinolones, chloramphenicol, trimethoprim และ fusidic acid โดยยีน *adeJ* เกี่ยวข้องกับความไวต่อยา chloramphenicol, macrolides, lincosamides, tetracyclines, quinolones และ β -lactams (67) ยีน *AdeIJK* ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยยีน *adeN* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ *tetR* พบว่ายีน *adeN* เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ertapenem, aztreonam, tigecycline, meropenem และ minocycline
- 1.1.3. *AdeFGH* พบอยู่บนจีโนมของเชื้อ *A. baumannii* โดยพบยีน *adeG* เป็นส่วนใหญ่ร้อยละ 80 มากกว่ายีน *adeF* และ *adeH* กลุ่มยีน *AdeFGH* ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยยีน *adeL* ซึ่งเป็น *LysR* (LTTR) ในเชื้อที่ไม่มีการแสดงออกของทั้งระบบ *AdeABC* และ *AdeIJK* พบว่าระบบ *AdeFGH* สามารถขับออกยา chloramphenicol, ciprofloxacin และ trimethoprim (68)

1.2. ระบบ MFS efflux pump มีการศึกษารองมาจาก ระบบ RND อาศัยการเคลื่อนที่ของโปรตอน (motive force of proton, PMF) เป็นแหล่งพลังงานในการขับยาออกนอกเซลล์ (69) จัดเป็น secondary active transport ขนาดใหญ่ สังเคราะห์ได้ 400 ถึง 600 กรดอะมิโน พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และอาจพบได้ในเซลล์ยูคาริโอต โดยในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอาจพบลักษณะโครงสร้างหลายองค์ประกอบ (56) ประกอบไปด้วยยีน *tet(A/B)*, *cmlA*, *craA*, และ *floR* (70) โดยมีการศึกษาพบว่ายีน *tetA* นำไปสู่การดื้อยา tetracyclin ในขณะที่ยีน *tetB* เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tetracyclin และ minocycline (71) พบอัตราการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *tetA* และยีน *tetB* ร้อยละ 30 - 45 และ ร้อยละ 32 - 72 ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา tetracycline (71, 72) ส่วนยีน *cmlA* เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม β -lactams, chloramphenicol, fluoroquinolones, tetracycline และ rifampicin และ ยีน *craA* เกี่ยวข้องกับการดื้อยา chloramphenicol, imipenems, quinolones, aminoglycosides และ tetracyclines (73) มีรายงานพบการถ่ายถอดยีน *tetB-tetR* ผ่านพลาสมิดได้ ในขณะที่ยีน *floR* และ ยีน *cmlA* มีส่วนเกี่ยวข้องกับยีน *abaR* ในโครโมโซมของ *A. baumannii* (74-76) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Ming-Feng Lin และคณะ (17) พบกลุ่มยีน *EmrAB* ประกอบด้วยยีน *emrA* และ *emrB* ซึ่งพบได้ในพลาสมิดของเชื้อ *E. coli* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อสารพิษ รวมทั้ง carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), 2-chlorophenylhydrazine hydrochloride (CHH), tetrachlorosalicylanflide (TSA), nalidixic acid, และ phenylmercury acetate (PMA) การควบคุมการแสดงออกของ *emrAB* ด้วยยีน *emrR* ซึ่งเป็น negative regulator โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการกระตุ้น *EmrAB* efflux pump ในเชื้อ *A. baumannii* ช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อ osmotic stress และยา colistin ซึ่งเป็นยากลุ่มสุดท้ายที่ใช้รักษา MDR-*A. baumannii*

1.3. ระบบ MATE efflux pump สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่มีขนาด 400 ถึง 700 กรดอะมิโน อาศัยแรงขับโปรตอน และความแตกต่างความเข้มข้นของโซเดียมไอออน (Sodium ion gradient) เป็นแหล่งพลังงาน (56) โดยมียีน *AbeM* เป็นยีนสำคัญ พบได้ในเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนานถึงร้อยละ 63 - 100 (75, 77) สังเคราะห์โปรตีนที่มีขนาด 447 กรดอะมิโน มีลักษณะที่ละลายน้ำไม่ได้ อาจมีความสัมพันธ์กับการดื้อยา aminoglycosides, trimethoprim, fluoroquinolones, erythromycin, และ chloramphenicol

1.4. ระบบ SMR efflux pump จัดอยู่ใน Drug/Metabolite Transporter (DMT) superfamily สังเคราะห์โปรตีนขนาด 100 ถึง 120 กรดอะมิโน ประกอบเป็น transmembrane helices 4 ส่วน เชื่อมต่อกันเป็น homodimers (56) อาศัยแรงขับเคลื่อนจากการเคลื่อนที่ของโปรตอน ในการขับสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ SMR efflux pump ของเชื้อ *A. baumannii* จะพบยีน *abeS* สังเคราะห์โปรตีนขนาด 108 กรดอะมิโน มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา novobiocin, fluoroquinolones, erythromycin, detergents (benzalkonium chloride), chloramphenicol และ dye (19-21)

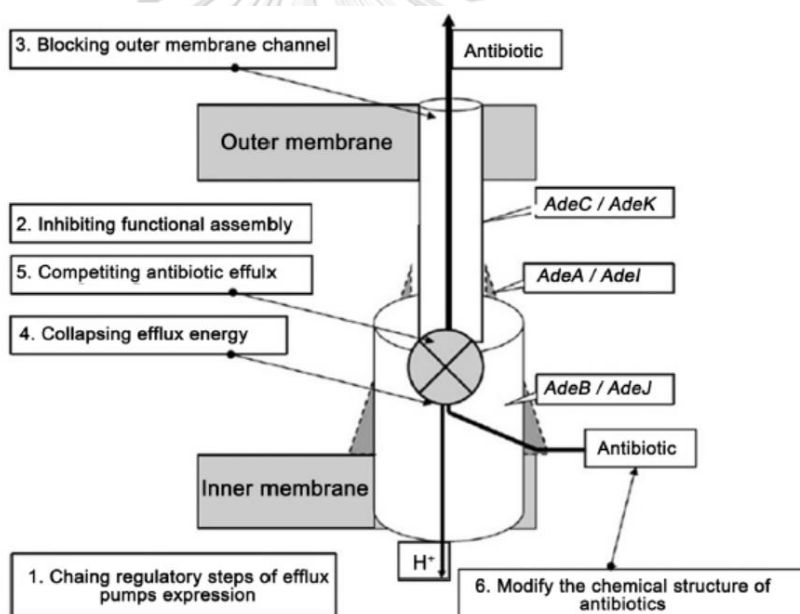
1.5. ระบบ ABC efflux pump จัดอยู่ในกลุ่มที่สังเคราะห์โปรตีนดื้อยาหลายขนานขนาดใหญ่ ประกอบด้วย nucleotide-binding domain(NBDs) 2 ส่วน และ Transmembrane domain(TMDs) 2 ส่วน โดย NBDs มีลักษณะที่มีขั้ว ละลายน้ำได้(hydrophilic) เป็นส่วนที่จำเพาะ และย่อยสลาย ATP โดย ATPase ในขณะที่ TMDs เป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณที่ไม่ละลายน้ำ(hydrophobic) เป็นส่วนที่จับและขับสารออก พบได้ทั้งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา และ เชลล์ยูคาริโอต (56) ABC efflux pump เป็น efflux pump เพียงระบบเดียวที่ใช้การย่อยสลาย ATP เป็นแหล่งพลังงาน โดยในแบคทีเรียแกรมลบ พบโครงสร้างสามส่วน ประกอบด้วยโปรตีนที่อยู่ภายในไซโตพลาซึมของเชื้อ และเมมเบรนของเซลล์เจ้าบ้าน พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา erythromycin และ gramicidin (78)

1.6. ระบบ PACE efflux pump เป็นระบบ efflux pump ที่มีการพบล่าสุด (25) สามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterobacter cloacae* และ *Salmonella enterica* serovar Typhi(18,29,86) โดยพบยีน *aceI* ในเชื้อ *A. baumannii* สังเคราะห์โปรตีนขนาด 150 กรดอะมิโน ประกอบด้วย transmembrane 2 ส่วนเรียงติดกัน (56) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อ chlorhexidine (25)

2.6 การทำงานของ efflux pump inhibitor (EPI)

Efflux pump inhibitor (EPI) เป็นโมเลกุลของสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น หรือพบได้ในธรรมชาติ มีความสามารถที่กระทำอย่างจำเพาะต่อระบบ efflux pump ทำให้ยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพตามปกติ (79) สารที่มีการศึกษาเป็น efflux pump inhibitor ได้แก่ Phenyl-arginine

beta naphthylamide (PA β N), carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), 1-naphthylmethyl-piperazine (NMP), phenothiazines, omeprazole (prochlorperazine, chlorpromazine, และ promazine), verapamil และ reserpine (57) ปัจจุบันยังไม่ทราบหลักการการทำงานของ EPI อย่างแน่ชัด (80, 81) มีข้อสันนิษฐานถึงเป้าหมายการทำงานของ EPI ดังนี้ การเปลี่ยนแปลงขั้นตอนควบคุมการแสดงออกของ efflux pump การยับยั้งการรวบรวมส่วนประกอบของ efflux pump ให้สมบูรณ์ การกีดขวางบริเวณ outer membrane channel การทำลายแหล่งพลังงานของ efflux pump การใช้สารที่ไม่ใช่ยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีบริเวณที่จับจำเพาะต่อ efflux pump จึงไม่เกิดการยับยั้งยาปฏิชีวนะ หรือ การเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ เพื่อลดความจำเพาะต่อ efflux pump และไม่เกิดการขับยาออกนอกเซลล์



ภาพที่ 5 แสดงเป้าหมายของ efflux pump inhibitor ในการยับยั้งการทำงานของ efflux pump (57)

การศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ด้วยวิธีเจือจางความเข้มข้นของสารยับยั้ง efflux pump ครั้งละ 2 เท่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (2-fold agar dilution) โดยพบว่าสาร phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่า MIC ของยา trimethoprim, clindamycin และ chloramphenicol ได้ (82,

83) ในขณะที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่า MIC ของ nicidixic acid ได้ถึง 16 เท่า (84) และ ลดค่า MIC ของ minocycline ได้มากกว่าเท่ากับ 4 เท่า เมื่อทดสอบด้วยสาร PABN ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (85) ส่วนสาร carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) มีส่วนช่วยให้เชื้อไวต่อยา colistin เนื่องจากสารนี้ออกฤทธิ์ขัดขวางการเคลื่อนที่ของโปรตอน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของ efflux pump ทำให้ไม่เกิดการขับยาออกนอกเซลล์ (86)

จากการศึกษาของ Wentao และคณะ (87) เปรียบเทียบผลของ efflux pump inhibitor ต่อการดื้อยา colistin ด้วยกลไก efflux pump ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสาร CCCP มีส่วนช่วยยับยั้ง และลดการดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาหลายขนาน โดยเฉพาะเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา colistin ในขณะที่ PABN และ NMP มีส่วนช่วยลดการเจริญของเชื้อ การใช้ reserpine ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่างๆ ทำให้เชื้อ *A. baumannii* มีค่า MIC ลดลงในยา amikacin, aztreonam, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamycin, kanamycin, neomycin, piperacillin และ tetracycline ในขณะที่ CCCP ช่วยลดค่า MIC ของยา amikacin, aztreonam, carbenicillin, ceftazidime, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, neomycin, piperacillin และ tetracycline

แม้ว่าจะมีนำสารหลายชนิดมาศึกษาถึงผลการยับยั้ง efflux pump ในห้องปฏิบัติการ (63) แต่ยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้รักษาผู้ป่วย เนื่องจากสารนั้นมีความเป็นพิษต่อมนุษย์สูง (82, 88) ปัจจุบันจึงมีความสนใจในการศึกษาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์เป็น efflux pump inhibitor เพิ่มขึ้น โดยสาร Biricodar-timcodar, Falvone, Berberis, Mahonia, Dalea versicolor, Lycopus europaeus และ Rosmarinus officinalis เป็นสารสกัดจากพืช นิยมใช้ศึกษาต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (89) จากการศึกษาพบว่า *Lycopus europaeus* และ *Rosmarinus officinalis* มีประสิทธิภาพในการลดการทำงานของ efflux pump ทำให้เชื้อกลับมาไวต่อยา ในเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาหลายขนาน (90)

2.7 การเหนี่ยวนำเชื้อให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

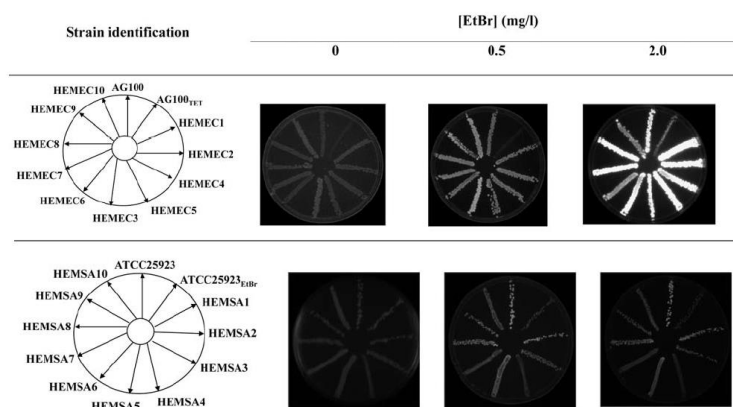
หลายการศึกษาทั่วโลกการดื้อยาด้วย efflux pump ทำการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการดื้อต่อยา และสายพันธุ์ก่อนเหนี่ยวนำ หรือสายพันธุ์มาตรฐาน เพื่อ

แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะสามารถถูกกระตุ้นให้มีการต่อยาปฏิชีวนะได้ เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยาความเข้มข้นต่ำ เป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังเป็นการกระตุ้นให้เชื้อมีการแสดงออกของ efflux pump เพิ่มขึ้น ดังการศึกษาของ Wan Zhu และคณะ (27) ที่ศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของ *adeB* efflux pump ทั้งทางพีโนไทป์ และจีโนไทป์ ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ต่อยา amikacin, netilmicin และ imipenem โดยเริ่มเหนี่ยวนำเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในระดับต่ำๆ และเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเรื่อยๆ จนถึงความเข้มข้น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่ต่อยาที่มีความเข้มข้นนี้ซ้ำ 5 ครั้ง และนำไปเลี้ยงซ้ำอีก 2 ครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่มียาเพื่อให้คงสภาพการต่อยา การศึกษาของ Yanpeng และคณะ (91) ทำการเหนี่ยวนำเชื้อ *A. baumannii* ให้ต่อยา imipenem โดยวิธี serial subcultivation ใช้แผ่นยา imipenem 10 ไมโครกรัม วางลงบน Mueller-Hinton Agar จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่เจริญบริเวณขอบของ inhibition zone นำมาเพาะเลี้ยงและทำการเหนี่ยวนำซ้ำเรื่อยๆ โดยบริเวณขอบที่เชื้อเจริญได้ มีความเข้มข้นของยาในระดับ subinhibitory ส่วนการศึกษาของ Ming Feng Lin และคณะ (92) เหนี่ยวนำเชื้อ *A. baumannii* ให้ต่อยา tigecycline โดยวิธี serial passaging ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นยาเท่ากับค่า MIC เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำเชื้อมาเพิ่มจำนวนต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นยาเพิ่มขึ้นเป็น 8 เท่าของค่า MIC, 16 เท่าของค่า MIC ตามลำดับ และนำไปเลี้ยงซ้ำอีก 2 ครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นยา 16 เท่าของค่า MIC แล้วนำศึกษาการแสดงออกของยีน *adeAB* เทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งเชื้อ *A. baumannii* ATCC 17978

2.8 เทคนิคการตรวจวัด efflux pump

2.8.1 การศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ทางพีโนไทป์

เทคนิค reproducible ethidium bromide (EB)-agar based อาศัยการตรวจวัดการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีของสาร ethidium bromide จากการขับสารออกนอกเซลล์ของเชื้อ เมื่อเชื้อถูกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสาร ethidium bromide ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีข้อจำกัดถึงประสิทธิภาพในการทำงานของ efflux pump ที่แตกต่างกันในเชื้อแต่ละชนิด (ดังแสดงในภาพที่ 7) และเรื่องความปลอดภัยต่อผู้วิจัยในการใช้สาร ethidium bromide แม้ว่าจะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ (93)



ภาพที่ 6 แสดงการเรืองแสงฟลูออเรสเซนภายใต้แสงยูวีที่แตกต่างกันของเชื้อ *Escherichia coli* (บน) และ เชื้อ *Staphylococcus aureus* (ล่าง) หลังจากบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาร ethidium bromide ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (93)

เทคนิคการตรวจวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ร่วมกับการทำงานของสารยับยั้ง efflux pump (EPI) อาศัยหลักการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยาปริมาณต่างๆ โดยมักเจือจางความเข้มข้นยาเป็นสองเท่า (2-fold dilution) มีการศึกษาทั้งแบบอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (27, 94) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (95) ร่วมกับการใส่สารยับยั้ง EPI ที่ความเข้มข้นคงที่ เปรียบเทียบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำสุดที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ หากเชื้อมีการดื้อยาด้วยกลไก efflux pump การทดสอบที่มีสาร EPI ควรมีการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำกว่า อย่างน้อย 4 เท่า การศึกษาของ Wan Zhu และคณะ (27) ทดสอบหาค่า MIC ต่อยา imipenem, nethilmicin และ amikacin ของเชื้อเปรียบเทียบกับ ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะทั้งสามชนิด ร่วมกับสาร CCCP ซึ่งเป็นสารยับยั้ง efflux pump พบว่าค่า MIC ที่มีสาร CCCP ของเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ น้อยกว่าสองเท่าของค่า MIC ที่ไม่มีสาร CCCP ในขณะที่เชื้อที่ดื้อต่อยา amikacin และ nethilmicin มีค่า MIC ที่มีสาร CCCP ร่วมด้วยลดลงอย่างน้อย 4 เท่า เมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มีสาร CCCP การศึกษาของ Chao Hu และคณะ (96) ทดสอบในเชื้อ *A. baumannii* 74 ตัวอย่าง พบว่ามีการออกฤทธิ์ร่วมระหว่างยา imipenem กับ EPI (amlodipine และ CCCP) ทำให้มีค่า MIC ลดลง และมีผลความไวต่อยา imipenem เพิ่มขึ้น จากร้อยละ 25 เป็น 45.31 และ 42.19 ตามลำดับ

2.8.2 การศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ทางจีโนม

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอจำนวนมากในหลอดทดลอง โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น เป็นการเลียนแบบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ จากดีเอ็นเอต้นแบบให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) และชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่ทราบลำดับเบส หรือ primer ในการเกิดปฏิกิริยา โดยขั้นตอน denature เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้คงอยู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 92 – 95 องศาเซลเซียส เพื่อเข้าสู่ขั้นตอน annealing ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิอยู่ในช่วง 50 - 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer เข้าจับคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ และเข้าสู่ขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากส่วนปลายด้าน 5' ของ primer ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส จากขั้นตอนทั้งหมดนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า (97) เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหายีนที่สนใจ ปัจจุบันถือว่าเป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยา การตรวจหายีน efflux pump ด้วยวิธี PCR มีหลายการศึกษา ดังการศึกษาของ Chao Hu และคณะ (96) ตรวจหายีน *adeB*, *adeE*, *adeJ*, *abeM* และ *abeS* ด้วยวิธี PCR ในเชื้อ MDR-A. *baumannii* ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง พบร้อยละ 100, 83.6, 100, 96.4 และ 96.4 ตามลำดับ แต่ไม่พบยีน *adeH* การศึกษาของ Ardehli และคณะ (98) ตรวจคัดกรองยีน efflux pump ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ที่จำแนกได้ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 พบยีน *adeF* และ *adeJ* ในเชื้อจำนวน 76 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 98

เทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction

การเกิด gene transcription เป็นกระบวนการสังเคราะห์ mRNA จากรหัสพันธุกรรมบน DNA มี บทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) ระดับของ gene transcription ภายในเซลล์หนึ่ง สามารถเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อสัญญาณมากมายที่เกิดขึ้นในขณะที่เกิดการ พัฒนา การเปลี่ยนแปลง และหน้าที่ทางสรีรวิทยาของเซลล์ การเปลี่ยนระดับ transcription เป็นสาเหตุให้ เกิดการแปรเปลี่ยนระดับของ mRNA แต่ละชนิดจากภาวะปกติ

(steady-state levels) ฉะนั้นการตรวจวิเคราะห์ระดับ mRNA ของยีนหนึ่งจึงจำเป็น และมีความสำคัญมากต่อการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการ แสดงออกของยีน ขั้นตอนสำคัญของเทคนิค RT-PCR (61) เริ่มต้นโดยสกัด RNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ แล้วใช้ RNA นี้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ให้สังเคราะห์ complementary DNA หรือ cDNA เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ คือ reverse transcriptase จากนั้นใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 สาย ที่สังเคราะห์มาเพื่อขยายตำแหน่งยีนที่สนใจบน cDNA นั้น ผลผลิต PCR ที่ขยายจำนวน cDNA สามารถตรวจวิเคราะห์ในทำนองเดียวกันกับผลผลิต PCR จากเทคนิคพื้นฐาน โดยการวิเคราะห์ ขนาดของผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และตรวจยืนยันโดยวิธี restriction digestion, hybridization หรือ nucleotide sequencing นิยมใช้ในการตรวจหาผลผลิตของยีน (gene transcripts) ในสิ่งส่งตรวจที่มี RNA ปริมาณน้อยๆ การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของหลายๆยีนได้พร้อมกัน (simultaneous analysis) การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (quantitative analysis) ของ mRNA ที่สนใจการสร้างตัวตรวจจำเพาะยีนที่เป็น cDNA (generation of cDNA hybridization probes) และการตรวจหา alternatively spliced gene transcripts เป็นเทคนิคที่ไม่มีผลกระทบ (interferences) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ intron RNA เป้าหมายถูกเพิ่มขยายจำนวนโดยธรรมชาติด้วยกระบวนการ transcription มาแล้ว การตรวจวิเคราะห์ทำได้กับ active genes และช่วยให้สามารถวิเคราะห์ RNA viruses ได้ แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของเทคนิคนี้ ได้แก่ RNA เป็นสารที่เสถียรน้อยกว่า DNA การแยกสกัด RNA ต้องทำหลายขั้นตอน และต้องการขั้นตอน reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ cDNA

จากการศึกษาของ Ming-Feng Lin และคณะ (18) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน efflux pump ของเชื้อ *MDR-A. baumannii* ซึ่งประกอบด้วย *A. baumannii* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อต่อยา amikacin, imipenem และ tigecycline 3 ตัวอย่าง และเชื้อที่จำแนกได้จากโรงพยาบาลต่างๆ ในประเทศได้หวั่น 7 ตัวอย่าง เทียบกับเชื้อ *A. baumannii* ATCC 17978 พบการแสดงออกของยีน *adeB*, *abeS* และ *abeM* มากขึ้นในเชื้อทุกตัวอย่าง แต่พบการแสดงออกของยีน *emrA-like* และ *emrB-like* ลดลงในเชื้อทุกตัวอย่าง ยกเว้นเชื้อที่เหนี่ยวนำให้ดื้อ tigecycline ในขณะที่พบการแสดงออกของยีน *adeJ*, *macB* และ *craA* เพิ่มสูงขึ้นในบางตัวอย่าง

การศึกษาของ Wan Zhu และคณะ (27) ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *adeB* ด้วยเทคนิค Reverse Transcription qPCR โดยเปรียบเทียบกับแสดงออกของยีน 16s rRNA ซึ่งเป็น internal

reference gene พบการแสดงออกของยีน *adeB* ร้อยละ 33.33 ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา nethilmicin ในขณะที่พบการแสดงออกของยีน *adeB* ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา amikamicin ทุกสายพันธุ์



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 1 แสดงเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1 ตู้อบ (Incubator) รุ่น INE 300	Memmert	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
3 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Orbital Shaker	Thermo Fisher	สหรัฐอเมริกา
4 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
5 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanyo Electric	ญี่ปุ่น
6 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส	Thermo Fisher	สหรัฐอเมริกา
7 เครื่อง Refrigerated centrifuge รุ่น Universal 320R	Hettich	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
8 เครื่องวัดปฏิกิริยาจากเพลท วัดปริมาณสารพันธุกรรม Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader	BioTek	สหรัฐอเมริกา
9 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น MJ PTC-1148 (Thermo Cycler)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
10 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Labcycler Gradient Thermoblock 48 ALU	SensoQuest GmbH	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
11 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม CFX96 Connect Real-Time PCR	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
12 ชุดถ่ายภาพเจล (Molecular Imager ChemiDocXRS)	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
13 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific	สหรัฐอเมริกา
14 เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น G-560E	Scientific Industries	สหรัฐอเมริกา
15 เครื่องวัดความขุ่น รุ่น Densimat	BioMérieux	ฝรั่งเศส
16 เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น CP2245	Sartorius	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
17 เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น Hiclave HVA-85	Hirayama	ญี่ปุ่น
18 ขวดฝาเกลียว ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร	Schott Duran	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
19 หลอดกั้นแหลมฝาเกลียวปราศจาก เชื้อ ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Corning	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
20 หลอดทดลอง และฝา ขนาด 13x100	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
21 หลอดกั้นแหลม ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร	Axygen	สหรัฐอเมริกา
22 ไมโครเพลทปราศจากเชื้อ 96 หลุม ก้นกลม	Nunc™ Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
23 0.2 ml 8-Tube PCR Strips, low profile, clear #TLS0801	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
24 Autopipette ขนาด 0.1-2, 2-20, 20-200 และ	Gilson	สหรัฐอเมริกา

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
100- 1,000 ไมโครลิตร		
25 Pipette tips ขนาด 0.1-2, 2-20, 20-200 และ 100- 1,000 ไมโครลิตร	Axygen	สหรัฐอเมริกา
26 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth	Oxoid	สหราชอาณาจักร
27 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth	Oxoid	สหราชอาณาจักร
28 Agar Bacteriological (Agar No.1)	Oxoid	สหราชอาณาจักร
29 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar	Difco™ & BBL™	สหรัฐอเมริกา
30 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted)	Difco™ & BBL™	สหรัฐอเมริกา
31 อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Triple Sugar Iron (TSI)	Oxoid	สหราชอาณาจักร
32 อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี Motile	BD	สหรัฐอเมริกา
33 อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชีวเคมี phenol red base	Oxoid	สหราชอาณาจักร
34 Glucose	MERCK	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
35 Lactose AR. grade	Ajax-Finechem Thermo Scientifi	สหรัฐอเมริกา
36 แผ่นยา	Oxoid	สหราชอาณาจักร
37 ชุดน้ำยา Maxime RT PreMix Kit	iNtRON Biotechnology	สาธารณรัฐเกาหลี

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
38 ชุดน้ำยา iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
39 ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase, 10x Buffer, MgCl ₂	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
dNTP Set	Promega	สหรัฐอเมริกา
41 GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
42 SYBR [®] Safe DNA gel stain	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
43 DNA Gel Loading dye (6x)	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
44 Agarose Power	Bio Rad	สหรัฐอเมริกา
45 Tris base	MERCK	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
46 Acetic acid glacial	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
47 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate,99%	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
48 Amikacin disulfate salt	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
49 Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl-hydrazone	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
50 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
51 UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Introvigen Thermo Fisher	สหรัฐอเมริกา
52 Trizol [®] Reagent	Introvigen Thermo Fisher	สหรัฐอเมริกา
53 Chloroform	MERCK	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
52 Absolute Ethanol	MERCK	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

	เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
53	Chloroform	MERCK	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
53	Absolute Ethanol	MERCK	สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

3.2 เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 (AB19606) และเชื้อที่จำแนกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคกลางตอนบน ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง กำหนดให้ชื่อ A153, A259, A262, D191, D219, D273, E261 และ F202 ซึ่งมีรูปแบบความไวต่อยาแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 9 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เลือกลโคไลเดี่ยวของ *A. baumannii* ซึ่งให้โคไลลักษณะกลม สีขาวขุ่น มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ Triple Sugar Iron Agar (TSI), Motile, 10% Glucose และ 10% Lactose บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain heart infusion (BHI) 0.5 มิลลิลิตร ที่เติม glycerol ร้อยละ 20 ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสก่อนนำมาศึกษาต่อไป

3.3 ศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ

A. baumannii ด้วยวิธี disk diffusion

การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อทางกายภาพ (phenotypic method) โดยอาศัยการแพร่ของยาจากแผ่นกระดาษกรองซุบยาปฏิชีวนะไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะลดลงตามระยะห่างจากแผ่นยาปฏิชีวนะ เชื้อที่นำมาทดสอบถูกเพาะเลี้ยงโดยการกระจายเชื้อให้ทั่วพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มในสภาวะ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อ สังเกตระยะห่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากแผ่นยาปฏิชีวนะ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) ผ่านกึ่งกลางของแผ่นยาปฏิชีวนะ เทียบค่ามาตรฐานของเชื้อและยาชนิดนั้น ตามมาตรฐานของสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standard Institute : CLSI) M100, 28th ปี ค.ศ. 2018 (99) โดยทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

แบบที่เรียมาตรฐานเป็นตัวควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ (Quality control of system) ได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922

เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* ที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ต้องการทดสอบ ประมาณ 3 - 5 โคโลนี มาเจือจางในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นของ เชื้อประมาณ $1 - 2 \times 10^8$ CFU/mL หรือเทียบเท่าความขุ่น 0.5 McFarland Standard ใช้ไม้พันสำลี ปราศจากเชื้อจุ่มในสารละลายเชื้อ ปิดให้แห้งหมดกับหลอดทดลอง แล้วนำมากระจายเชื้อสาม ระบาย โดยหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 60 องศา ให้ทั่วพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร รอให้พื้นผิวแห้ง ไม่เกิน 15 นาที เติมน้ำเชื้อปากคืบ ก่อนนำไปหยิบแผ่นยาปฏิชีวนะวางให้ แนบติดกับพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ ampicillin/sulbactam (SAM) 10/10 ไมโครกรัม piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 ไมโครกรัม ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม imipenem (IMP) 10 ไมโครกรัม meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม gentamicin (CN) 10 ไมโครกรัม amikacin (AMK) 30 ไมโครกรัม ciprofloxacin (CIP) 5 ไมโครกรัม และ trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) 1.25/23.75 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง วัด inhibition zone เทียบค่า มาตรฐาน CLSI M100, 28th ปี ค.ศ. 2018 (99) ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) ของเชื้อ *A. baumannii* (99)

Antimicrobial Agents	Disk Content (μg)	Zone diameter (mm)		
		Interpretive Criteria		
		Susceptible	Intermediate	Resistant
Ampicillin-sulbactam (SAM)	10/10	≥ 15	12 - 14	≤ 11
Piperacillin-tazobactam (TZP)	100/10	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Ceftazidime (CAZ)	30	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Imipenem (IMP)	10	≥ 22	19 - 21	≤ 18
Meropenem (MEM)	10	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Gentamicin (CN)	10	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Amikacin (AMK)	30	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Ciprofloxacin (CIP)	5	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	1.25/23.75	≥ 16	11 - 15	≤ 10

3.4 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth microdilution

เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 8 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อที่เจริญแล้วละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton II Cation-Adjusted (CAMHB) ให้มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ $1-2 \times 10^8$ CFU/mL เท่ากับ 0.5 McFarland Standard เจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB ให้มีความเข้มข้นประมาณ $1 - 2 \times 10^6$ CFU/mL

เตรียมยา amikacin ความเข้มข้นตั้งต้น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ นำมาเจือจางด้วย CAMHB ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125 - 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการทดสอบหาค่า MIC ของยา amikacin ในไมโครเพลท 96 หลุม ดูดยา amikacin ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นของยา amikacin ก่อนใส่เชื้อ

ประกอบด้วย 0.125 – 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจุดเชื้อที่เจือจางแล้ว ใส่หลุมปฏิบัติการหลุมละ 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของยา amikacin จะประกอบด้วย 0.06 – 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ตามตารางที่ 3

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบหาค่า MIC ดังนี้ หลุมการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะ เป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อ (Growth control) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB 100 ไมโครลิตร เป็นตัวทดสอบปราศจากเชื้อ (sterility test) และใช้เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานเป็นตัวควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ (Quality control of system) ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* ATCC 25922 โดยค่า MIC ของยา amikacin ต้องอยู่ในช่วง 1 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI M100, 28th ปี ค.ศ. 2018 (99)

ตารางที่ 3 แสดงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. baumannii* (99)

Antimicrobial Agents	Susceptible	Intermediate	Resistant
amikacin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	≤16	32	≥64

3.5 การเหนี่ยวนำเชื้อ *A. baumannii* ให้ดื้อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 8 ตัวอย่าง ได้แก่ AB19606, A153, A259, A262, D191, D219, D273 และ E261 ที่เก็บอยู่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นเริ่มเหนี่ยวนำ โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาของ Lin M. และคณะ (100) ในวันที่ 1 โดยนำโคลนของเชื้อ *A. baumannii* แต่ละตัวอย่าง ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI) 5 มิลลิลิตร ที่มียา amikacin ความเข้มข้นเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่า MIC ของเชื้อนั้น โดยให้เชื้อมีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10⁵ CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

ที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในวันที่ 3 นำเชื้อ *A. baumannii* ที่เลี้ยงจากวันที่ 1 มา 25 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI 5 มิลลิตร ที่มียา amikacin ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ของเชื้อนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเลี้ยงเชื้อทุกๆ 48 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยา amikacin เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จนถึงความเข้มข้น 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร หรือความเข้มข้นสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ จากนั้นแบ่งเชื้อ *A. baumannii* ที่เหนียวมาให้ติดต่อยา amikacin ได้แล้ว เป็นหลอดเล็กประมาณ 0.5 มิลลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติม glycerol ร้อยละ 20 จัดเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป และเพาะเลี้ยงเชื้อหลังเหนียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งปราศจากยา amikacin เป็นเวลา 30 วัน นำไปทดสอบแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk diffusion อีกครั้ง

3.6 ศึกษาการแสดงออกของ efflux pump ทางพีโนไทป์โดยทดสอบผลของ efflux pump inhibitor (EPI) ต่อความไวของยา amikacin

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ร่วมกับสารยับยั้ง efflux pump (EPI) ได้แก่ สาร Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) ของเชื้อ *A. baumannii* หลังถูกเหนียวมาให้ต่อยา amikacin ด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งดัดแปลงมาจาก Jian Li และ คณะ (101)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนียวนำทั้ง 8 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อที่เจริญแล้วละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton II Cation-Adjusted (CAMHB) ให้มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ $1-2 \times 10^8$ CFU/mL เท่ากับ 0.5 McFarland Standard เจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB ให้มีความเข้มข้นประมาณ $1 - 2 \times 10^6$ CFU/mL

เตรียมยา amikacin ความเข้มข้นตั้งต้น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ นำมาเจือจางด้วย CAMHB ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125 - 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

เตรียมสารยับยั้ง efflux pump ได้แก่ CCCP ความเข้มข้นตั้งต้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย DMSO นำมาเจือจางในยา amikacin แต่ละความเข้มข้น ให้มีความเข้มข้นของ CCCP 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการทดสอบหาค่า MIC ของยา amikacin ที่มีสาร CCCP ในไมโครเพลท 96 หลุม ดูยา amikacin ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นของสาร CCCP ก่อนใส่เชื้อ เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของยา amikacin ก่อนใส่เชื้อ ประกอบด้วย 0.125 – 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูเชื้อที่เจือจางแล้ว ใส่หลุมปฏิริยาหลุมละ 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร CCCP เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของยา amikacin จะประกอบด้วย 0.06 – 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ อ่านค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยเปรียบเทียบค่า MIC ของเชื้อ *A. baumannii* ที่ทำการทดสอบทั้งที่มีและไม่มี CCCP โดยค่า MIC ของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยา amikacin ที่มีสาร CCCP ลดลงอย่างน้อย 4 เท่าเมื่อเทียบกับค่า MIC ต่อยา amikacin ที่ไม่ได้เติม CCCP แสดงว่าเชื้อ *A. baumannii* มีการแสดงออกของ efflux pumps (98)

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ ดังนี้ หลุมการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะและสารยับยั้ง efflux pump เป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อ (Growth control) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB 100 ไมโครลิตร เป็นตัวทดสอบปราศจากเชื้อ (sterility test) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB และตัวทำละลาย DMSO เป็นตัวควบคุมสารละลาย (solvent control) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CAMHB และ CCCP เป็นตัวควบคุมสารทดสอบ (reagent control) และใช้เชื้อ AB19606 เป็นตัวควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ

3.7 ตรวจหายีน *bla*_{oxa-51-like} และยีน efflux pump (*adeB*) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.7.1 การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii*

เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อเต็ม 1 ลูบมาละลายใน TE buffer (10 มิลลิโมลาร์ Tris, 1 มิลลิโมลาร์ EDTA,

pH 8.0 with HCl) ที่ปราศจากเชื้อ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีด้วยการแช่ในน้ำแข็ง ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คัดแยกส่วนใสไปยังหลอดที่เตรียมไว้สำหรับเก็บดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเครื่อง Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (บริษัท BioTek จำกัด สหรัฐอเมริกา) และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดสอบต่อไป

3.7.2 ตรวจหายีน *bla_{oxa-51-like}* และยีน *efflux pump (adeB)* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

ตรวจหายีน *bla_{oxa-51-like}* ขนาด 353 คู่เบส ซึ่งเป็นยีนที่มักใช้ในการบ่งชี้หรือยืนยันว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* (102) และยีน *adeB* ขนาด 457 คู่เบส ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมีหน้าที่ในการขับสารออกนอกเซลล์ (efflux pump) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 100 นาโนกรัม ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อปริมาตร 16.8 ไมโครลิตร, 1X Taq buffer with KCl (100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl; pH 8.8 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 500 มิลลิโมลาร์ KCl, 0.8%(V/V)) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, MgCl₂ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Forward primer และ Reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร และ 1.0 U Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส โดยใช้สภาวะดังแสดงในตารางที่ 5 โดยใช้เชื้อ AB19606 เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' - 3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	อ้างอิง
<i>bla_{oxa-51-like}</i>	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	(103)
	OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
<i>adeB</i>	adeB-F	GCTTTACTGGCTGCTCAAGA	457	(96)
	adeB-R	GTTGTTCCATTTACGCATT		

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

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

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis เตรียม 2% agarose ใน TAE buffer 100 มิลลิลิตร ต้มจนกระทั่ง agarose ละลายจนหมด แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลง ประมาณ 60 องศาเซลเซียส ใส่สี SYBR® Safe DNA stain 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปเทลงบน gel chamber พร้อมใส่หวี (comb) เพื่อทำช่องใส่ผลผลิตดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 - 30 นาที ในที่ปราศจากแสง ให้อุ่นแข็งตัวและป้องกันการเสื่อมของสี SYBR® Safe DNA stain จากนั้นให้ดึงหวีออก นำแผ่น agarose gel ที่ได้ใส่ใน electrophoresis tank และเท TAE buffer ให้ท่วมผิว agarose gel นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการทดสอบมา 5 ไมโครลิตร ผสมกับ DNA loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผสมสีแล้ว 5 ไมโครลิตร ลงใน agarose gel ที่เตรียมไว้ ต่อด้วยไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟ โดยให้กระแสจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 90 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที หรือ DNA Loading dye เคลื่อนที่ไปถึงเกือบสุดปลายอีกข้างของ

agarose gel นำ agarose gel ที่ได้ไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV ชุดถ่ายภาพ เจล (Molecular Imager ChemiDocXRS) และบันทึกผล

3.8 ศึกษาการแสดงออกของยีน efflux pump (*adeB*) โดยเทคนิค Real-Time PCR

3.8.1 การสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ A153, A259, A262, D191, D219, D273, E261 และ AB19606 และเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ A153-Ind, A259-Ind, A262-Ind, D191-Ind, D219-Ind, D273-Ind, E261-Ind และ AB19606-Ind ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบน Mueller Hinton Agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อจะละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ให้มีความเข้มข้น 1×10^8 CFU/mL หรือ 0.5 McFarland เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ให้มีความเข้มข้น 1×10^7 CFU/mL ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการปั่นตกตะกอนเชื้อ ด้วยความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกส่วนใสด้านบนออก ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TRIzol™ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ดูดชั้นลงให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาปั่นแยกชั้นด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารผสมที่แยกออกเป็นสามส่วน ได้แก่ ส่วน phenol-chloroform สีแดงด้านล่าง ส่วนของดีเอ็นเอ และโปรตีนตรงกลาง และส่วนใสด้านบน จากนั้นเอียงหลอด 45 องศา ดูดแยกส่วนใสไว้ในหลอดใหม่ ครั้งละ 50 ไมโครลิตร ให้ได้ประมาณ 450 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ เติม isopropanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เทกักับส่วนใส บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนอาร์เอ็นเอสีขาวคล้ายเจลตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ดูดทิ้งส่วนใสออก จากนั้นละลายตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้แห้ง ละลายด้วย RNase-free water, 0.1 มิลลิโมลาร์ EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดูดชั้นลงให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ โดยเครื่อง

Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (บริษัท BioTek จำกัด, สหรัฐอเมริกา) ทำให้ปราศจากดีเอ็นเอด้วยสารละลาย DNase I (RNase free) โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม 10X DNase I Buffer 5 ไมโครลิตร และเติม DNase I (2U) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย EDTA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จัดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดสอบต่อไป

3.8.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

ทำการสังเคราะห์ complementary DNA โดยใช้ชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (บริษัท Thermo Scientific™, สหรัฐอเมริกา) อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 11 ไมโครลิตร ผสมกับ Random Hexamer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมของ 5X Reaction Buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, RiboLock RNase Inhibitor (20 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ RevertAid M-MuLV RT (200 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น MJ PTC-1148 (Thermo Cycler) ตามขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นตรวจวัดคุณภาพ และปริมาณ cDNA กับเครื่อง Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (บริษัท BioTek จำกัด สหรัฐอเมริกา) จัดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดสอบต่อไป

ตารางที่ 6 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
cDNA Synthesis	25 องศาเซลเซียส	5 นาที
	42 องศาเซลเซียส	60 นาที
Termination	70 องศาเซลเซียส	5 นาที

3.8.3 การตรวจวัดการแสดงออกของยีน *efflux pump (adeB)* ในเชื้อ

A. *baumannii* ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

การตรวจการแสดงออกของยีน *adeB* โดยมียีน 16s rRNA เป็นยีนอ้างอิง ผู้วิจัยใช้น้ำยา iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (บริษัท Bio-rad จำกัด, สหรัฐอเมริกา) โดยหลักการคือ สี SYBR green ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง minor groove ของ ดีเอ็นเอสายคู่ได้ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของ ฟลูออเรสเซนต์ ในช่วงการคลายสายดีเอ็นเอจากเส้นคู่ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยวนั้น สี SYBR Green ยังไม่สามารถเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวได้ แต่เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ SYBR Green จะเข้าแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอเส้นคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต แต่เมื่อรอบ ของปฏิกิริยากลับมาถึงช่วงการคลายสายดีเอ็นเอ สี SYBR Green ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลง (104) โดยตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา)

ตารางที่ 7 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-Time PCR

ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' - 3')	อุณหภูมิ	ขนาด	อ้างอิง
			Melting (Tm) (องศาเซลเซียส)	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	
16S RNA	16S_F	ACGGTCGCAAGACTAAAACCTCA	61.19	108	(96)
	16S_R	GTATGTCAAGGCCAGGTAAGGT	59.42		
<i>adeB</i> -RT	<i>adeB</i> -F-RT	AACGGACGACCATCTTTGAGTATT	60.43	246	(105)
	<i>adeB</i> -R-RT	CAGTTGTTCCATTTACGCATT	59.99		

ตัวอย่างจะทำปฏิกิริยาในแถบพลาสติกหลุมแถวละ 8 หลุม การทดสอบใช้ปริมาตรรวมของ ปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA template 1 ไมโครลิตร เติม Forward primer และ Reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 10 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 7 อย่างละ 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำยา iTaq™ Universal SYBR Green Supermix 10 ไมโครลิตร จากนั้นปรับ

ปริมาณรวมด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ในการทำปฏิกิริยาจะทำการทดสอบด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์เป็นตัวควบคุมลบ (negative control) โดยทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา Real-Time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Polymerase Activation & DNA Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	5 วินาที	40 รอบ
Annealing	60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Melt-Curve Analysis	65-95 องศาเซลเซียส	Increment 0.5 องศาเซลเซียส/วินาที	

ระดับการแสดงออกของยีน วัดจากค่า cycle threshold (C_T) จากกราฟวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างโดยทำการทดสอบ 3 ครั้งแต่ละการทดสอบทำซ้ำสามครั้ง ผ่านโปรแกรม QuanStudio™ Design and Analysis Software โดยรายงานระดับการแสดงออกของยีนระหว่างยีน *efflux pump adeB* และยีน 16s RNA เทียบกับการแสดงออกของเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19606 เป็นจำนวนเท่าของความสัมพันธ์ Relative quantitative Real-Time PCR ด้วยวิธีคำนวณตามวิธีของ Livak และ Schmittgen ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณแบบสัมพันธ์จากการเปรียบเทียบค่า threshold cycle (CT) ของยีนที่สนใจเทียบกับยีนที่เป็น reference gene คำนวณเป็นจำนวนเท่าระหว่างตัวอย่าง (Sample) และตัวเปรียบเทียบ (Calibrator) (106)

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[(CT \text{ sample} - CT \text{ house keeping gene}) - (CT \text{ calibrator} - CT \text{ house keeping gene})]}$$

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

4.1 ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี disk diffusion และผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth microdilution

เชื้อที่นำมาทดสอบทั้ง 9 ตัวอย่าง ได้แก่ A153, A259, A262, D191, D219, D273, E261, F202 และ AB19606 ให้ผลการทดสอบทางปฏิกิริยาชีวเคมีดังนี้ TSI ให้ผลเป็น K/N, non-motile, 10% Glucose ให้ผลเป็น Acid, 10% Lactose ให้ผลเป็น Acid และเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส แสดงว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii*

เมื่อนำมาศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยขนาด Inhibition zone ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด ที่ทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มีขนาดอยู่ในเกณฑ์ตามมาตรฐาน CLSI M100, 28th ปี ค.ศ. 2018 (99) และพบว่าเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ A153, A259, A262 และ AB19606 ไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบทั้ง 9 ชนิด ส่วนเชื้อ E261 ตื้อต่อยา amikacin และ trimethoprim/sulfamethoxazole แต่ไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ เชื้อ D191, D219 และ D273 จัดเป็นเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน เนื่องจากดื้อยามากกว่าหรือเท่ากับ 3 กลุ่มยา โดยเชื้อ D191, D219 และ D273 ตื้อต่อยา ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem และ piperacillin/tazobactam ตื้อปานกลางต่อยา gentamicin ไวต่อยา amikacin, trimethoprim/sulfamethoxazole และ ampicillin/sulbactam ยกเว้นเชื้อ D219 ให้ผลดื้อปานกลางต่อยา ampicillin/sulbactam ส่วนเชื้อ F202 ตื้อต่อยา amikacin, gentamicin, ampicillin/sulbactam, imipenem, meropenem และ piperacillin/tazobactam แต่ไวต่อยา ceftazidime, ciprofloxacin และ trimethoprim/sulfamethoxazole

ตารางที่ 9 แสดงแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อที่ทดสอบ	SAM	TZP	CAZ	IMP	MEM	CN	AMK	CIP	SXT
AB19606	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A153	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A259	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A262	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D191	S	R	R	R	R	I	S	R	S
D219	I	R	R	R	R	I	S	R	S
D273	S	R	R	R	R	I	S	R	S
E261	S	S	S	S	S	S	R	S	R
F202	R	R	S	R	R	R	R	S	S

SAM ; ampicillin/sulbactam, TZP ; piperacillin/tazobactam, CAZ; ceftazidime, IMP; imipenem, MEM; meropenem, CN ; gentamicin, AMK ; amikacin, CIP ; ciprofloxacin, SXT ; trimethoprim-sulfamethoxazole

S ; susceptible, I ; intermediate, R ; resistance

เมื่อนำเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 9 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโต พบว่าค่า MIC ต่อยา amikacin ของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 9 ตัวอย่าง อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.25 ถึง มากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าเชื้อส่วนใหญ่จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ กลุ่มที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ ประกอบด้วยเชื้อ A153, A259, A262 และกลุ่มดื้อยาหลายขนาน ประกอบด้วยเชื้อ D191, D219 และ D273 ให้ผลไวต่อยา amikacin โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.25 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ E261 และ F202 ให้ผลดื้อต่อยา amikacin โดยมีค่า MIC เท่ากับ 64 และ มากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ AB19606 ไวต่อยา amikacin โดยมีค่า MIC เท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* ATCC 25922 ที่เป็นตัวควบคุมคุณภาพ มีค่า MIC ของยา amikacin อยู่ในช่วง 1 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ตามการแปลผล breakpoint ของ CLSI M100, 28th ปี ค.ศ. 2018 (99) โดยค่า MIC ต่อยา amikacin ของ

เชื้อ *A. baumannii* จำนวนทั้ง 9 ตัวอย่าง สอดคล้องกับแบบแผนความไวต่อยา amikacin โดยวิธี disk diffusion

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

เชื้อที่ ทดสอบ	ค่า MIC ของยา amikacin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			Range of MIC	แปลผล breakpoint
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
AB19606	16	16	16	16	S
A153	0.5	1	1	0.5	S
A259	2	4	4	4	S
A262	2	4	4	4	S
D191	0.5	2	2	2	S
D219	1	4	4	4	S
D273	0.25	0.5	0.5	0.5	S
E261	64	64	64	64	R
F202	>256	>256	>256	>256	R

4.2 ผลการเหนี่ยวนำเชื้อ *A. baumannii* ให้ดื้อยาปฏิชีวนะ

จากผลการทดสอบค่า MIC ของเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 8 ตัวอย่าง ได้ค่าความเข้มข้นของยา amikacin สำหรับเริ่มต้นการเหนี่ยวนำให้เชื้อดื้อยาอยู่ในช่วง 0.25 - 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของยา amikacin เริ่มต้น เป็นครึ่งหนึ่งของค่า MIC ต่อยา amikacin ของเชื้อ *A. baumannii* แต่ละตัวอย่าง โดยเฉพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 110 รอบต่อนาที่ โดยทุกๆ 48 ชั่วโมง จะเพิ่มความเข้มข้นของยา amikacin เป็นสองเท่า พบว่าเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin มีค่า MIC ต่อยา amikacin ดังนี้ เชื้อ A153, D273, D219 และ D191 มีค่า MIC ต่อยา amikacin หลังเหนี่ยวนำเท่ากับ 32, 64, 128 และ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตามลำดับ ส่วนเชื้อ A259, A262, E261 และ AB19606 มีค่า MIC ต่อยา amikacin หลังเหนี่ยวนำมากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยเชื้อ *A. baumannii* ทุกตัวอย่างหลังเหนี่ยวนำเปลี่ยนจากไวหรือต้อยา เป็นดื้อต่อยา amikacin เพิ่มขึ้น 4 - 128 เท่า ยกเว้นเชื้อ A153 หลังเหนี่ยวนำเปลี่ยนจากไวเป็นดื้อยาปานกลาง โดยมีความเข้มข้นยา amikacin เพิ่มขึ้น 32 เท่า

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อนเหนี่ยวนำ และหลังเหนี่ยวนำด้วย amikacin

เชื้อที่ทดสอบ	ค่า MIC ของยา amikacin ก่อนเหนี่ยวนำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า MIC ของยา amikacin หลังเหนี่ยวนำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเท่าของค่า MIC ของยา amikacin ที่เพิ่มขึ้นหลังถูกเหนี่ยวนำ (เท่า)
AB19606	16	>256	>16
A153	1	32	32
A259	4	>256	>128
A262	4	>256	>128
D191	2	256	128
D219	4	128	32
D273	0.5	64	128
E261	64	>256	>4

เมื่อนำเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ปราศจากยา amikacin เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำไปทดสอบแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยา amikacin และ gentamicin เปลี่ยนเป็นดื้อต่อยาทั้งสองชนิด (AB19606-Ind, A153-Ind, A259-Ind, A262-Ind) ส่วนเชื้อที่ดื้อปานกลางต่อยา

gentamicin เปลี่ยนเป็นดื้อยา (D191-Ind, D219-Ind, D273-Ind) ยกเว้นเชื้อ A153 หลังเหนี่ยวนำ เปลี่ยนจากไวเป็นดื้อปานกลางต่อยา amikacin ซึ่งผลสอดคล้องกับค่า MIC ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin

เชื้อที่ทดสอบ	SAM	TZP	CAZ	IMP	MEM	CN	AMK	CIP	SXT
AB19606-Ind	S	S	S	S	S	R	R	S	S
A153-Ind	S	S	S	S	S	R	I	S	S
A259-Ind	S	S	S	S	S	R	R	S	S
A262-Ind	S	S	S	S	S	R	R	S	S
D191-Ind	S	R	R	R	R	R	R	R	S
D219-Ind	I	R	R	R	R	R	R	R	S
D273-Ind	S	R	R	R	R	R	R	R	S
E261-Ind	S	S	S	S	S	R	R	S	R

SAM ; ampicillin/sulbactam, TZP ; piperacillin/tazobactam, CAZ; ceftazidime, IMP; imipenem, MEM; meropenem, CN ; gentamicin, AMK ; amikacin, CIP ; ciprofloxacin, SXT ; trimethoprim-sulfamethoxazole

S ; susceptible, I ; intermediate, R ; resistance

4.3 ผลการทดสอบ efflux pump inhibitor (EPI) ต่อความไวต่อยา amikacin

เชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 8 ตัวอย่างหลังเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin เมื่อนำมาทดสอบการ แสดงออกของ efflux pump โดยวิธีทางพีโนไทป์โดยใช้ CCCP เป็นสารยับยั้ง efflux pumps พบว่า ค่า MIC ต่อยา amikacin ที่มี CCCP มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยลดลง มากกว่า 4 เท่าเมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มี CCCP แสดงว่าเชื้อ *A. baumannii* ทุกตัวอย่างที่นำมา เหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin ในหลอดทดลอง มีการแสดงออกของ efflux pump

ตารางที่ 13 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่มี และไม่
มีสาร CCCP ของเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำ

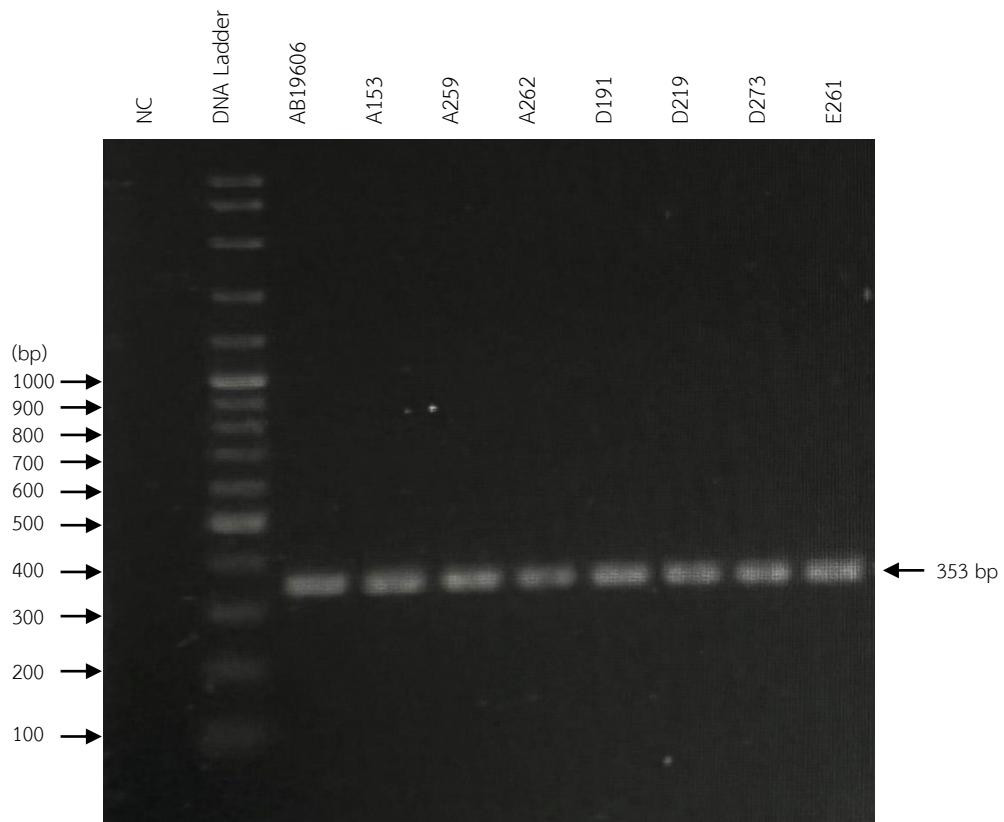
เชื้อที่ทดสอบ	ค่า MIC ของยา amikacin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า MIC ของยา amikacin+CCCP (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
AB19606-Ind	>256	≤0.25
A153-Ind	32	≤0.25
A259-Ind	>256	≤0.25
A262-Ind	>256	≤0.25
D191-Ind	256	≤0.25
D219-Ind	128	≤0.25
D273-Ind	64	≤0.25
E261-Ind	>256	≤0.25

4.4 ตรวจหายีน *bla_{oxa-51-like}* และยีน *efflux pump (adeB)* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

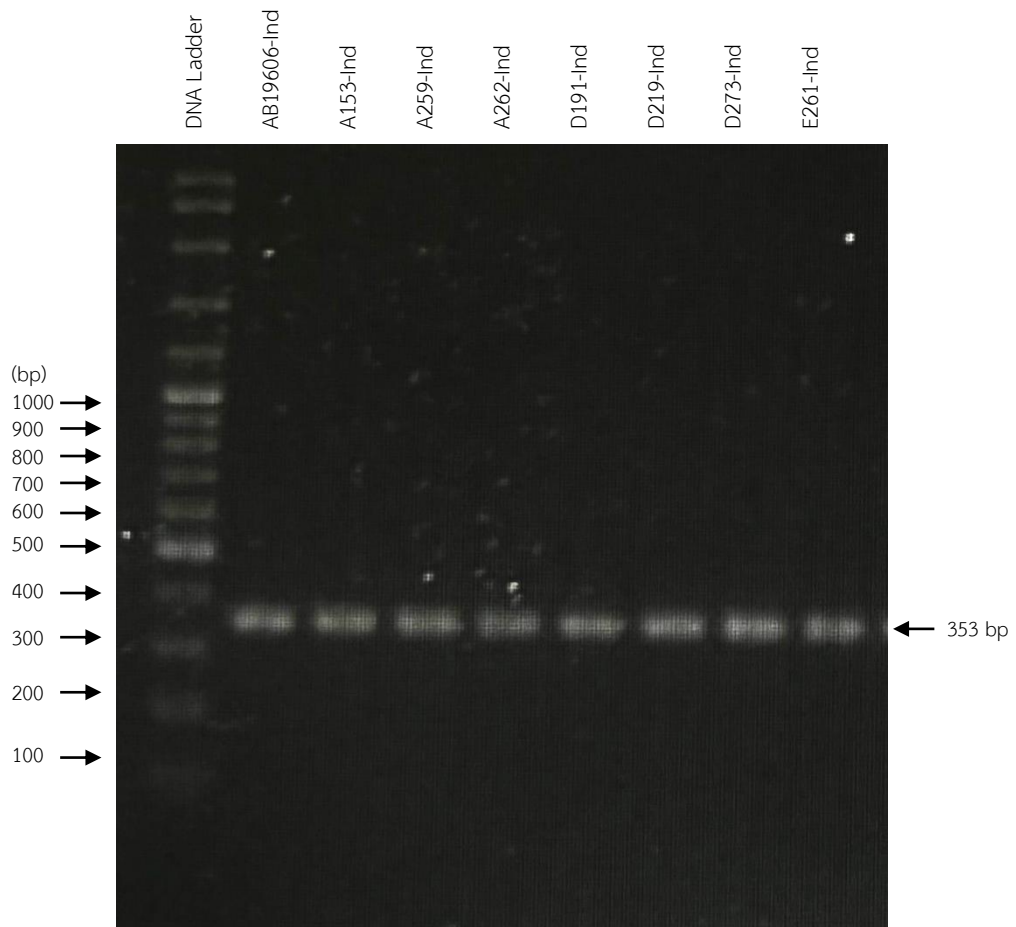
ดีเอ็นเอของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำจำนวน 8 ตัวอย่าง และหลังเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin 8 ตัวอย่าง ซึ่งสกัดด้วยวิธีการต้ม เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ส ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *bla_{oxa-51-like}* เป็น intrinsic gene ที่ใช้ยืนยันว่าเป็น เชื้อ *A. baumannii* และยีน *adeB* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีหน้าที่ในการขับสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ออก (efflux pump)

เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับขนาดของ DNA Ladder 100 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla_{oxa-51-like}* ขนาด 353 คู่เบส ในทุกตัวอย่างของเชื้อ *A. baumannii* ทั้งก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

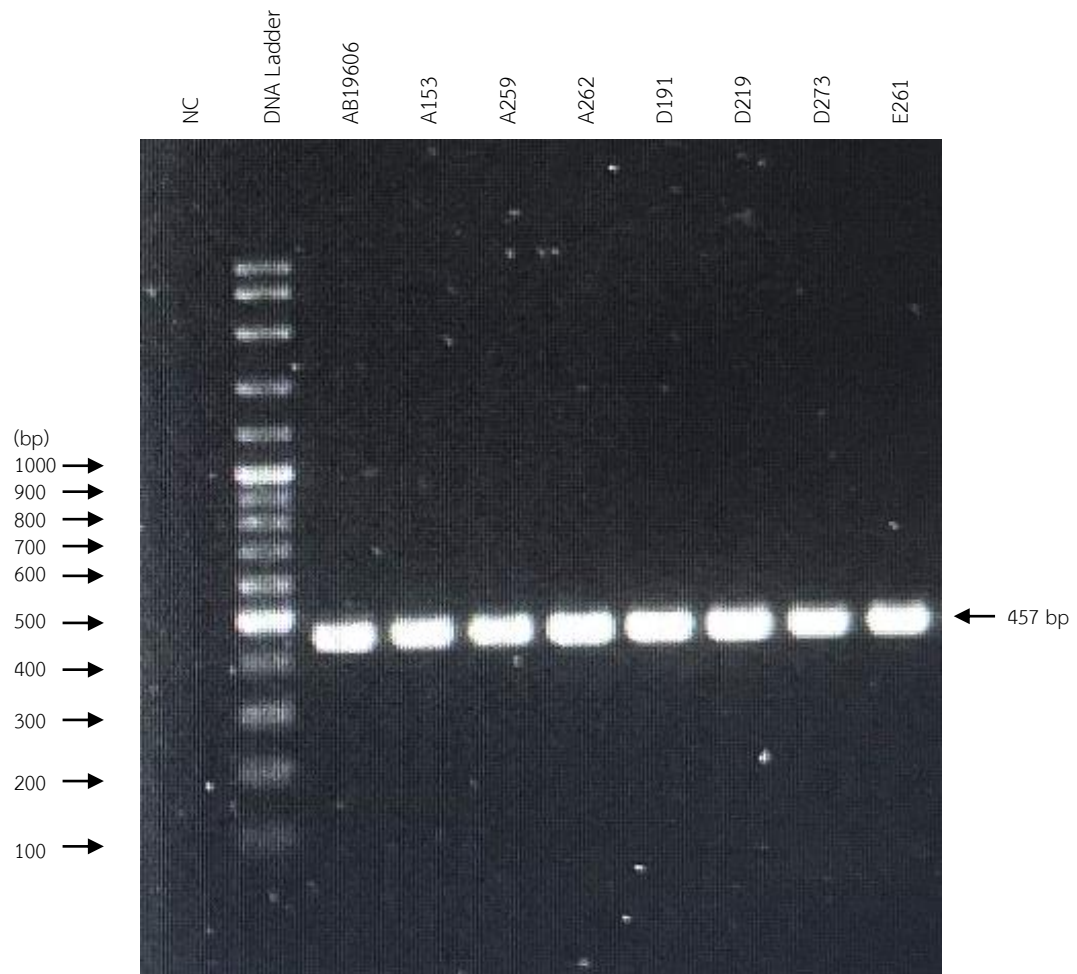
พบแถบดีเอ็นเอของยีน *adeB* ขนาด 457 คู่เบส ในทุกตัวอย่างของเชื้อ *A. baumannii* ทั้งก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin ดังแสดงในภาพที่ 9 และ 10 ตามลำดับ



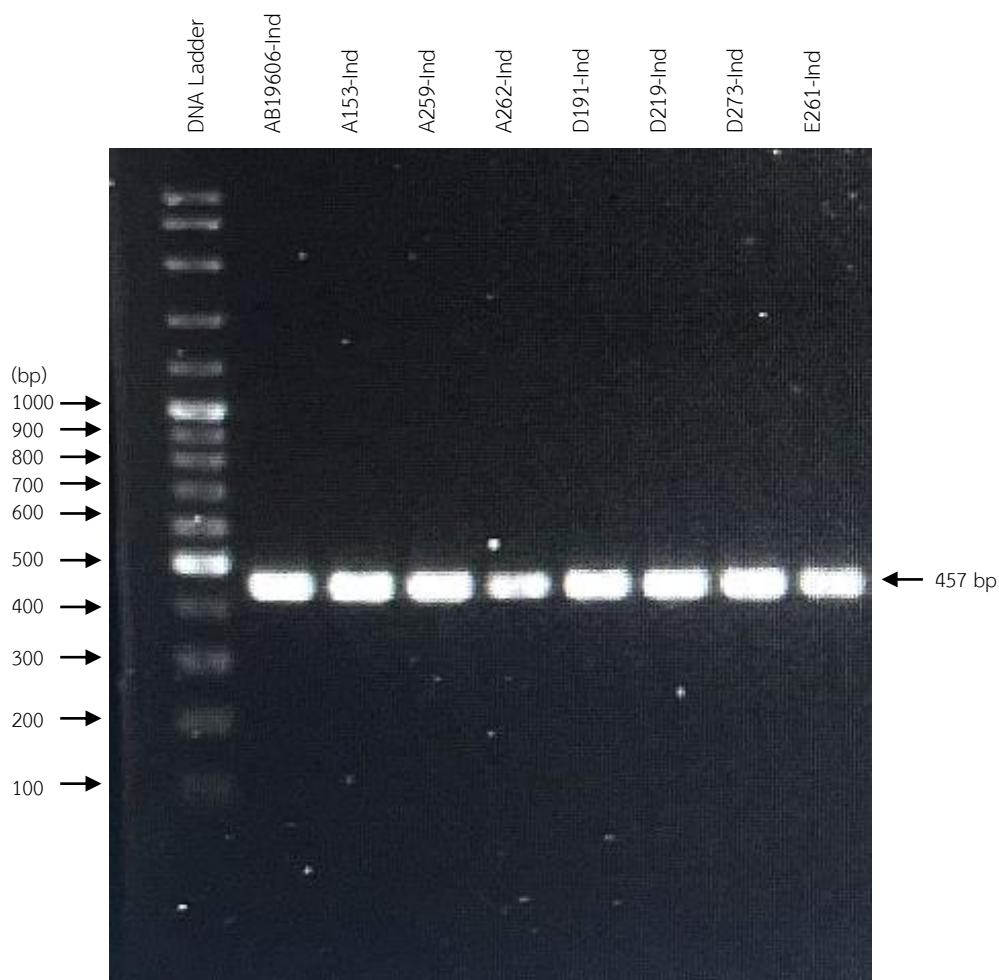
ภาพที่ 7 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน *bla_{oxa-51-like}* โดยแถวที่ 1 คือ negative control (NC) แถวที่ 2 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 3 - 10 คือ ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำด้วย amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla_{oxa-51-like}*



ภาพที่ 8 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของเชื้อ *A. baumannii* หลังถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน *bla_{oxa-51-like}* โดยแถวที่ 1 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 2 - 9 คือ ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วย amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla_{oxa-51-like}*



ภาพที่ 9 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน *adeB* โดยแถวที่ 1 คือ negative control (NC) แถวที่ 2 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 3 - 10 คือ ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำด้วย amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *adeB*



ภาพที่ 10 แสดงผลการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis หลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับไพรเมอร์ของยีน *adeB* โดยแถวที่ 1 คือ DNA Ladder 100 คู่เบส และแถวที่ 2 - 9 คือ ตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *adeB*

4.5 ตรวจวัดการแสดงออกของยีน efflux pump (*adeB*) ในเชื้อ *A. baumannii* ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

จากการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาทำการหาค่า Ta หรือ annealing temperature ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา PCR ที่ดีที่สุด โดยการทำ PCR gradient ระหว่างช่วงอุณหภูมิ 56 – 66 องศาเซลเซียส กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวของเชื้อ AB19606 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากผลการทดลอง พบว่าสามารถตรวจพบการเกิดปฏิกิริยาได้ที่ 8 อุณหภูมิ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 60

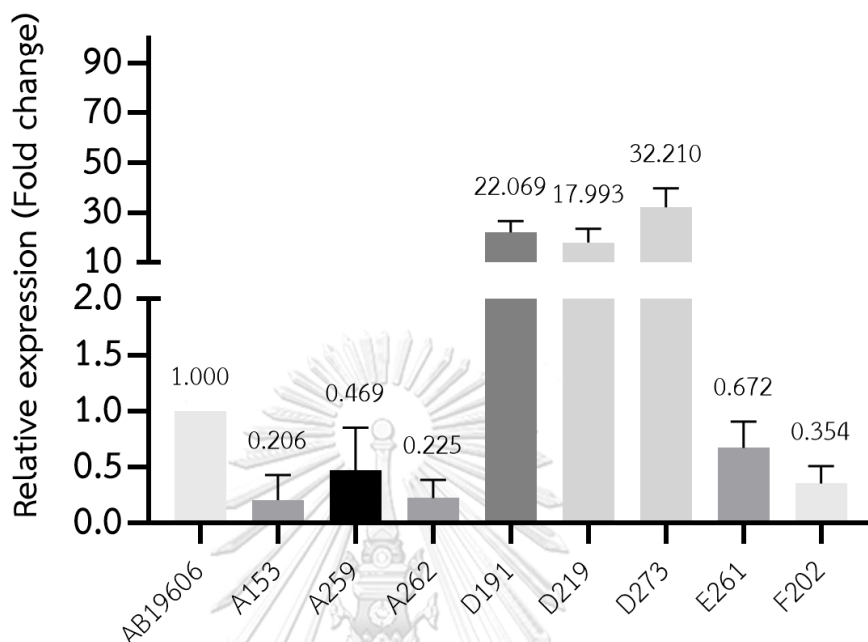
องศาเซลเซียส ตามคำแนะนำการใช้ของน้ำยา iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (บริษัท Bio-rad จำกัด, สหรัฐอเมริกา) ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 14 แสดงรอบปฏิบัติการที่ตรวจพบยีน 16s RNA และ *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้ อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง 56 – 66 องศาเซลเซียส

Ta (° C)	CT ของยีน	SD	CT ของยีน	SD	ΔCT
	16s RNA		<i>adeB</i>		
66.0	25.94	0.042	26.53	0.085	0.59
65.5	25.86	0.042	26.61	0.014	0.75
64.3	25.55	0.262	26.27	0.127	0.725
62.4	25.73	0.212	26.38	0.092	0.645
60	25.70	0.071	26.10	0.007	0.395
58	25.87	0.099	26.77	0.410	0.9
56.7	25.47	0.325	26.24	0.000	0.77
56	25.72	0.099	26.19	0.141	0.47

จากการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำเชื้อ *A. baumannii* ด้วยยา amikacin ว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีน efflux pump *adeB* ในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 17 ตัวอย่างโดยแบ่งเป็น เชื้อก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin จำนวน 9 ตัวอย่าง และเชื้อหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Real-Time PCR (ทำการทดลอง 3 ครั้งแต่ละครั้งทำซ้ำสามครั้ง) เมื่อเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีน *adeB* ในเชื้อก่อนเหนี่ยวนำด้วย amikacin จำนวน 9 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ค่าสัมพัทธ์ relative quantitative Real-Time PCR พบว่าเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน แต่ไวต่อยา amikacin (เชื้อ D191, D219 และ D273) มีการแสดงออกของยีน *adeB* ประมาณ 6 – 24 เท่า ยกเว้นเชื้อ F202 ที่ดื้อยาหลายขนาน และดื้อยา amikacin มีการแสดงออกของ efflux pump ยีน *adeB* ในระดับต่ำ (0.4 เท่า) เมื่อเทียบกับเชื้อ AB19606 ในขณะที่เชื้อ A153, A259 และ A262 ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะทั้งหมดที่นำมาทดสอบ และเชื้อ E261 ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ แต่ดื้อยา amikacin มีการ

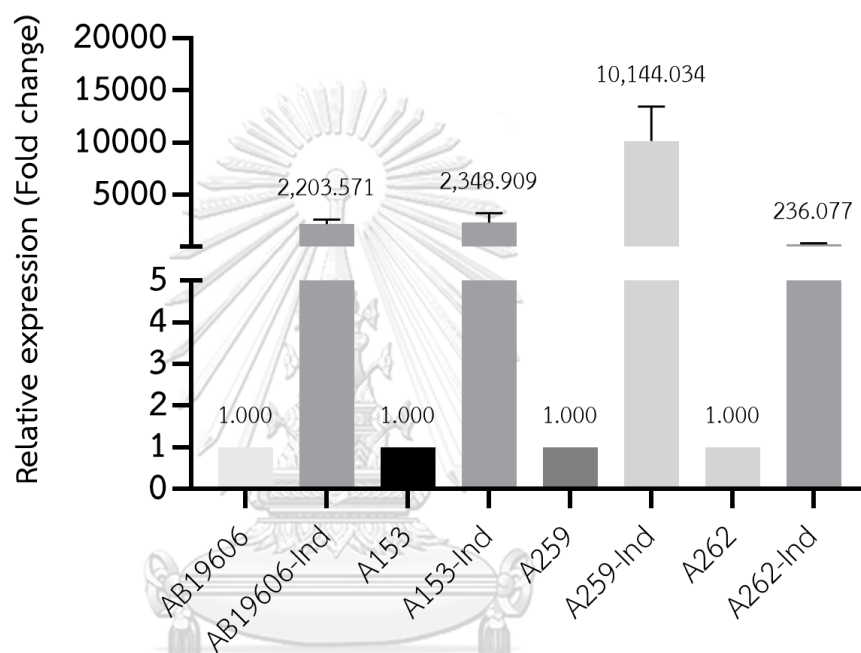
แสดงออกของยีน *adeB* ในระดับต่ำเช่นกันอยู่ในช่วงประมาณ 0.015 - 0.7 เท่าเมื่อเทียบกับเชื้อ AB19606 ดังแสดงในภาพที่ 11



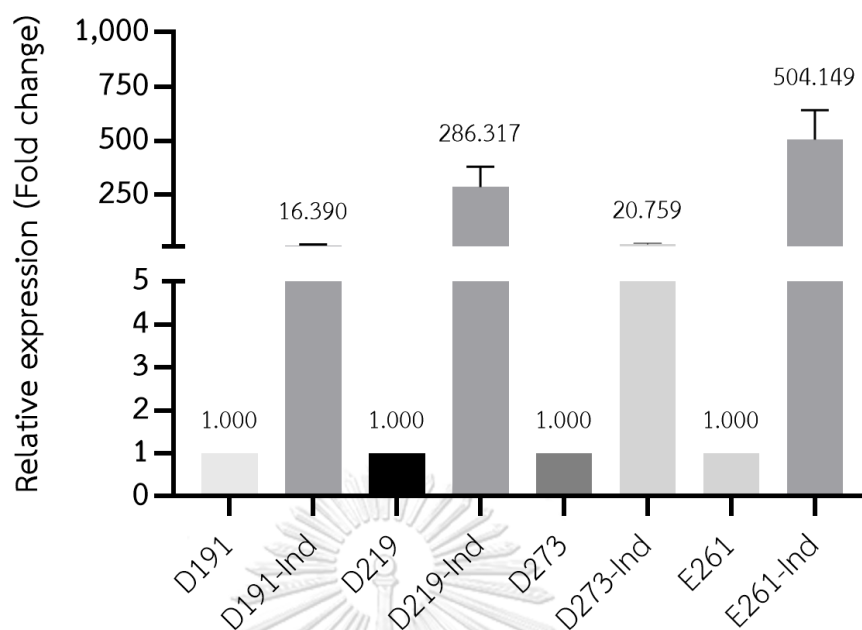
ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าความสัมพันธ์ของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin เทียบกับเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 (AB19606) โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละการทดสอบทำซ้ำสามครั้ง

การแสดงออกของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 8 ตัวอย่างหลังถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ได้แก่ A153-Ind, A259-Ind, A262-Ind, D191-Ind, D219-Ind, D273-Ind, E261-Ind และ AB19606-Ind พบว่ามีค่าสัมพันธ์ relative quantitative Real-Time PCR เพิ่มขึ้นประมาณ 10 - 15,230 เท่า เมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนเหนี่ยวนำในแต่ละตัวอย่างเอง ดังแสดงในภาพที่ 12 - 13 โดยเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เชื้อ AB19606-Ind, A153-Ind, A259-Ind และ A262-Ind มีการแสดงออกของยีน *adeB* เพิ่มขึ้นสูงกว่าก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin โดยมีค่าสัมพันธ์ relative quantitative Real-Time PCR เฉลี่ยเพิ่มขึ้นดังนี้ 2,203.571 (1,294.324 - 2,663.395), 2,348.908 (1,061.780 - 3,869.186), 10,144.034 (5,410.019 - 15,230.334), และ 236.076 (122.754 - 460.979) เท่าตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 12 ในขณะที่เชื้อ *A. baumannii* กลุ่มที่ดื้อยาหลายขนาน (D191, D219 และ D273) ก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin มีการแสดงออกของยีน *adeB* ในระดับต่ำอยู่แล้ว ดังแสดงในภาพ

ที่ 11 เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin (เชื้อ D191-Ind, D219-Ind และ D273-Ind) มีจำนวนเท่า การแสดงออกของยีนที่ไม่สูงมาก มีค่าสัมพัทธ์ relative quantitative Real-Time PCR ดังนี้ 16.390 (10.450 - 22.249), 286.317 (135.447 - 451.283) และ 20.760 (14.983 - 32.887) เท่าตามลำดับ ส่วนเชื้อ E261 ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะแต่ดื้อยา amikacin เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin มีค่าสัมพัทธ์ relative quantitative Real-Time PCR เพิ่มขึ้น 504.149 (312.362 - 650.246) เท่าดังแสดงใน ภาพที่ 13



ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าความสัมพันธ์ของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* ใน กลุ่มที่ไวต่อยา amikacin เปรียบเทียบหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับก่อนเหนี่ยวนำในแต่ละเชื้อ ตัวอย่างเอง โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำสามครั้ง



ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าความสัมพันธ์ของยีน *adeB* ของเชื้อ *A. baumannii* ในกลุ่มที่ติดต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน และเชื้อที่ติดต่อยา amikacin เปรียบเทียบหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin กับก่อนเหนี่ยวนำในแต่ละเชื้อตัวอย่างเอง โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำสามครั้ง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล

5.1 สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่จำแนกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ ภาคกลางตอนบน จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ A153, A259, A262, D191, D219, D273, E261, F202 และ AB19606 ให้ผลการทดสอบทางปฏิกิริยาชีวเคมี และการตรวจหายีน *bla_{oxa-51-like}* ด้วยเทคนิค PCR ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* เมื่อนำมาศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk diffusion และศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าให้ผลการทดลองสอดคล้องกัน

โดยเชื้อจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ A153, A259, A262 และ AB19606 ให้ผลไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบทั้ง 9 ชนิด และให้ค่า MIC ต่อยา amikacin เท่ากับ 0.5, 2, 2 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นค่าที่อยู่ในช่วงไวต่อยา amikacin

เชื้อ E261 ให้ผลดีต่อยา amikacin และ trimethoprim/sulfamethoxazole แต่ไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ซึ่งให้ค่า MIC ต่อยา amikacin เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงดีต่อยา amikacin

เชื้อตัวอย่างที่เหลือจัดเป็นเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายขนาน เนื่องจากให้ผลดีต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยสามกลุ่ม โดยเชื้อ D191, D219 และ D273 ดื้อต่อยา ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem และ piperacillin/tazobactam ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม cephalosporins, fluoroquinolones, carbapenems และ penicillins ตามลำดับ ดื้อปานกลางต่อยา gentamicin ไวต่อยา ampicillin/sulbactam, trimethoprim/sulfamethoxazole และ amikacin ยกเว้นเชื้อ D219 ให้ผลดีต่อยาปานกลางต่อยา ampicillin/sulbactam โดยเชื้อ D191, D219 และ D273 ให้ค่า MIC ต่อยา amikacin เท่ากับ 0.5, 1 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงไวต่อยา amikacin

ส่วนเชื้อ F202 ดื้อต่อยา amikacin, gentamicin, ampicillin/sulbactam, imipenem, meropenem และ piperacillin/tazobactam แต่ไวต่อยา ceftazidime, ciprofloxacin และ

trimethoprim/sulfamethoxazole ให้ค่า MIC ต่อยา amikacin มากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงดื้อต่อยา amikacin

ค่า MIC ต่อยา amikacin ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เชื้อดื้อยาในหลอดทดลอง มีค่าตั้งแต่ 0.25 - 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการเหนี่ยวนำเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา amikacin พบว่าเชื้อ *A. baumannii* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นได้ เมื่อทดสอบหาค่า MIC ต่อยา amikacin ของเชื้อหลังเหนี่ยวนำ พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ทุกตัวอย่างหลังเหนี่ยวนำเปลี่ยนจากไวหรือดื้อยา เป็นดื้อต่อยา amikacin เพิ่มขึ้น 4 - 128 เท่า โดยเชื้อ A153, D273, D219 และ D191 หลังเหนี่ยวนำ มีค่า MIC ต่อยา amikacin เท่ากับ 32, 64, 128 และ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ A259, A262, E261 และ AB19606 หลังเหนี่ยวนำ มีค่า MIC ต่อยา amikacin มากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบการแสดงออกของ efflux pump ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ โดยการหาค่า MIC ต่อยา amikacin ร่วมกับสารยับยั้งการทำงานของ efflux pump (efflux pump inhibitor, EPI) ได้แก่ carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) เปรียบเทียบค่า MIC ต่อยา amikacin ที่มี และไม่มีสาร CCCP โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสาร CCCP เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 8 ตัวอย่างหลังเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin มีค่า MIC ต่อยา amikacin ที่มีสาร CCCP มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยลดลงมากกว่า 4 เท่าเมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มีสาร CCCP แสดงว่าเชื้อ *A. baumannii* ทุกตัวอย่างหลังเหนี่ยวนำมีการแสดงออกของ efflux pumps

จากผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *bla_{oxa-51-like}* และ ยีน *adeB* สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสองได้ ในเชื้อ *A. baumannii* ทุกตัวอย่างทั้ง 16 ตัวอย่าง ก่อนและหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน efflux pump (*adeB*) ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ของเชื้อก่อน และหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin เทียบกับเชื้อ AB19606 พบว่าเชื้อก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin 3 จาก 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.5 ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน ได้แก่ D191, D219 และ D273 มีการแสดงออกของยีน *adeB* เพิ่มขึ้น โดยค่าสัมพัทธ์ relative quantitative Real-Time PCR เมื่อเทียบกับเชื้อ AB19606 เป็นจำนวน 17.47, 6.14 และ 24.22 เท่าตามลำดับ และพบการแสดงออกของยีน *adeB* เพิ่มขึ้นในเชื้อหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ทั้ง 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 โดยมีค่าสัมพัทธ์ relative

quantitative Real-Time PCR ในเชื้อ AB19606-Ind, A153-Ind, A259-Ind, A262-Ind, D191-Ind, D219-Ind, D273-Ind และ E261-Ind เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับเชื้อก่อนเหนี่ยวนำในแต่ละตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ย 2,203.571 (1,294.324 - 2,663.395), 2,348.908 (1,061.780 - 3,869.186), 10,144.034 (5,410.019 - 15,230.334), 236.076 (122.754 - 460.979), 16.390 (10.450 - 22.249), 286.317 (135.447 - 451.283), 20.760 (14.983 - 32.887) และ 504.149 (312.362 - 650.246) เท่าตามลำดับ

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ปัจจุบันมีแนวโน้มคือยาหลายชนิด (Multidrug-resistant, MDR) เพิ่มขึ้น หรืออาจกลายเป็นเชื้อดื้อยาทุกชนิด (Pandrug-resistant) ได้ ซึ่งเป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ เนื่องมาจากเชื้อนี้มีกลไกการดื้อยาหลายชนิด รวมถึงการกำจัดยาออกนอกเซลล์ด้วย efflux pump ที่อาจเป็นกลไกหลักทำให้เชื้อดื้อยาหลายขนาน (27) จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2557 – พ.ศ. 2561 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีการดื้อยา cefotaxime และ ceftriaxone สูงมากเฉลี่ยร้อยละ 96.4 ส่วนยา ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam และ ampicillin/sulbactam ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 69.9 - 72.5 ยาในกลุ่ม carbapenem (meropenem, imipenem) ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 70.2 และ 69.8 ตามลำดับ สำหรับยาในกลุ่ม aminoglycoside ได้แก่ gentamicin และ amikacin ดื้อยาเฉลี่ยร้อยละ 63.3 และ 53.5 ตามลำดับ โดยข้อมูลจาก 51 โรงพยาบาล ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2564 พบว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. มีอัตราการดื้อยา imipenem, ciprofloxacin, cefepime, piperacillin/tazobactam, ampicillin/sulbactam และ amikacin ร้อยละ 71.3, 70.3, 69.9, 69.2, 64.1 และ 52.5 ตามลำดับ โดยเชื้อ *Acinetobacter* spp. มีอัตราการดื้อยา amikacin เพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 49.5 ในปี พ.ศ. 2560 (5) เป็นร้อยละ 52.5 ในปี พ.ศ. 2564 ยากลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* คือยาต้านจุลชีพหลายขนาน ได้แก่ ยากลุ่ม carbapenem และ colistin (10) เนื่องจากเป็นยาขนานสุดท้าย (last resort antibiotic) ที่ใช้ในการรักษา ซึ่งในปัจจุบันจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อชนิดนี้คือดื้อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิดที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในปัจจุบัน (11) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีความไวต่อยา colistin เริ่มลดลง จากร้อยละ 99.9 ในปี พ.ศ. 2559 เป็น

ร้อยละ 99.7 ในปี พ.ศ. 2560 และ ลดลงเหลือร้อยละ 97.7 ในปี พ.ศ. 2563 (5) การดื้อยาที่พบในเชื้อ *A. baumannii* อาจเกิดจากกลไกการดื้อยาไกลโคไกลโหนิ่ง หรือหลายกลไกร่วมกัน หนึ่งในกลไกการดื้อยานั้น คือ การขับยาออกจากเซลล์ด้วย efflux pump (13)

การศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ความอนุเคราะห์เชื้อ *A. baumannii* ที่ผ่านการเพาะแยกได้จาก สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ เขตภาคกลางตอนบน จำนวน 8 ตัวอย่าง และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 โดยได้ตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีน *bla_{oxa-51-like}* ในทุกตัวอย่างของเชื้อ *A. baumannii* ที่นำมาทดสอบ โดยยีน *bla_{oxa-51-like}* เป็น intrinsic gene ที่พบอยู่บนโครโมโซมของเชื้อ *A. baumannii* เป็นหนึ่งในยีนที่นิยมใช้บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *A. baumannii* ได้ แต่อาจพบการถ่ายทอดยีนผ่านพลาสมิดได้ (27) นอกจากนี้ยังมียีน housekeeping gene อื่นๆ ที่สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้เช่นกัน ได้แก่ ยีน *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, และ *rpoD* (102, 107) เชื้อตัวอย่างที่นำมาทดสอบสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม ตามแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1. กลุ่มที่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบทุกชนิด (เชื้อ A153, A259, A262 และ AB19606) 2. กลุ่มดื้อยาหลายขนาน แต่ไวต่อยา amikacin (เชื้อ D191, D219 และ D273) 3. เชื้อดื้อยาหลายขนาน และดื้อต่อยา amikacin (เชื้อ F202) และ 4. เชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะอื่น แต่ดื้อต่อยา amikacin (เชื้อ E261) โดยพบว่าเชื้อ E261 ดื้อต่อยา amikacin แต่ไวต่อยา gentamicin ทางผู้วิจัยได้ทำการทดสอบแบบแผนความไวต่อยา amikacin และยา gentamicin ด้วยวิธี disk diffusion ซ้ำอีกครั้ง โดยพบว่าได้ผลการศึกษาเหมือนเดิม ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อมีการดื้อยา amikacin ด้วยกลไกอื่น เช่น การสร้างเอนไซม์ N-acetyltransferases ที่ทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะ โดยเอนไซม์นี้ประกอบไปด้วย 4 ชนิด โดยเอนไซม์แต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยาที่ต่างกันออกไป เช่น AAC(6)-I สัมพันธ์กับการดื้อยา tobramycin, dibekacin, amikacin, 5-episisomicin, netilmicin, 2'-N-ethylnetilmicin, และ sisomicin เป็นต้น (108)

จากผลการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) พบว่าค่า MIC ต่อยา amikacin ของเชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยา amikacin มีค่า MIC ตั้งแต่ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรขึ้นไป และเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยา amikacin มีค่า MIC ตั้งแต่ 0.5 – 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk

diffusion โดยเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยา amikacin ทั้ง 7 ตัวอย่าง จะมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา amikacin ที่สามารถยับยั้งการเจริญที่แตกต่างกันไป

เมื่อเหนี่ยวนำเชื้อ *A. baumannii* ให้ดื้อยา amikacin โดยเริ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละตัวอย่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นยา amikacin เป็นครึ่งหนึ่งของค่า MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เชื้อยังสามารถเจริญได้ และเพิ่มความเข้มข้นของยา amikacin เป็นสองเท่า ทุก 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างคงที่ จากการศึกษาของ Zahra Farshadzadeh และคณะ (109) ที่ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 ที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0 – 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นเพิ่มจำนวนช้าลงในช่วงเวลา 12 – 24 ชั่วโมง และเริ่มมีจำนวนคงที่ ตั้งแต่ช่วงเวลา 36 – 48 ชั่วโมง หลังจากเหนี่ยวนำเป็นระยะเวลาทั้งสิ้นประมาณ 30 วัน นำเชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin มาทดสอบหาค่า MIC พบว่า เชื้อ *A. baumannii* หลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin (Induced strains) มีค่า MIC เพิ่มขึ้น จากไวหรือดื้อยา เป็นดื้อยาปานกลาง หรือดื้อยา amikacin โดยเชื้อหลังเหนี่ยวนำมีค่า MIC เปลี่ยนแปลงไปโดยเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 4 – 128 เท่า โดยเชื้อในกลุ่มที่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบทุกชนิดและไวต่อยา amikacin (เชื้อ A153, A259 และ A262) มีค่า MIC เพิ่มขึ้น 32 ถึงมากกว่า 128 เท่า กลุ่มที่ดื้อยาหลายขนาน แต่ไวต่อยา amikacin (เชื้อ D191, D219 และ D273) มีค่า MIC เพิ่มขึ้น 32 – 128 เท่า ส่วนเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะอื่น แต่ดื้อต่อยา amikacin (เชื้อ E261) มีค่า MIC (27) เพิ่มขึ้น 4 เท่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Anton Y. Peleg และคณะ (105) และการศึกษาของ Zhu W และคณะ (27) โดย Anton Y. Peleg และคณะ (105) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller-Hinton Agar II ที่มียา tigecycline ความเข้มข้นเป็นครึ่งหนึ่งของค่า MIC ของเชื้อแต่ละตัว โดยเพิ่มความเข้มข้นของยาเป็นสองเท่า ทุก 24 ชั่วโมง จนเชื้อไม่สามารถเจริญได้ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้จนถึงความเข้มข้น 12 เท่าของค่า MIC ภายในเวลา 4 วัน ส่วนการศึกษาของ Zhu W และคณะ (27) ได้ทำการเหนี่ยวนำเชื้อ *A. baumannii* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller-Hinton broth ที่มียา amikacin ความเข้มข้นเป็นครึ่งหนึ่งของค่า MIC จนถึงความเข้มข้น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาในการเหนี่ยวนำประมาณสี่สัปดาห์ พบว่าเชื้อจำนวน 19 ตัวอย่าง ที่ไวต่อยา amikacin สามารถเปลี่ยนเป็นดื้อยา amikacin ได้ 11 ตัวอย่าง แสดงว่าเชื้อสามารถถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยาในหลอดทดลองได้ หากอยู่ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะความเข้มข้นระดับต่ำๆ เป็นระยะเวลานาน

เมื่อนำเชื้อ *A. baumannii* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin มาทดสอบแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อที่ไวต่อยา amikacin เปลี่ยนเป็นดื้อยาปานกลางหรือดื้อยา amikacin และพบว่าเชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin มีแนวโน้มไวต่อยาในกลุ่ม aminoglycoside ชนิดอื่นลดลง โดยเชื้อที่ไวต่อยา gentamicin เปลี่ยนเป็นดื้อยาทุกตัวอย่าง โดยกลไกการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside ชนิดอื่นอาจเกิดจากการทำงานของ efflux pump ที่สามารถขับยาออกจากเซลล์ได้หลายประเภทอย่างไม่จำเพาะ หรืออาจเกิดจากกลไกอื่น ๆ ร่วมด้วย ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป

จากผลการทดสอบแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk diffusion ของเชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำแล้ว พบว่าเชื้อที่มีความไวต่อยา amikacin เปลี่ยนเป็นดื้อยาปานกลาง และดื้อยา เป็นที่น่าสังเกตว่า เชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย amikacin มีแนวโน้มไวต่อยาในกลุ่ม aminoglycoside ชนิดอื่นลดลง โดยพบว่าเชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin มีความไวต่อยา gentamicin เปลี่ยนเป็นดื้อยาร่วมด้วย อาจเกิดจากการทำงานของ efflux pump ที่สามารถขับยาออกจากเซลล์ได้หลายประเภทอย่างไม่จำเพาะ

จากผลศึกษาการแสดงออกของ efflux pump โดยวิธีทางพีโนไทป์ ด้วยการหาค่า MIC ต่อ ยา amikacin ร่วมกับสาร CCCP พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 8 ตัวอย่างภายหลังเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin มีการแสดงออกของ efflux pump เนื่องจากมีค่า MIC ต่อยา amikacin ที่มีสาร CCCP น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยลดลงมากกว่า 4 เท่าเมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มีสาร CCCP ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Anton Y. Peleg และคณะ (105) ที่ศึกษาการแสดงออกของ efflux pump พบว่าค่า MIC ต่อยา tigecycline เมื่อมีสารยับยั้ง efflux pump ได้แก่ phenyl-arginine- β -naphthylamide (PA β N) มีค่าลดลงอย่างน้อย 4 เท่าเมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มี Pa β N และสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhu W และคณะ (27) ได้ทำการทดสอบการแสดงออกของ efflux pump โดยใช้สารยับยั้ง efflux pump ชนิด CCCP พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin มีค่า MIC ที่มีสาร CCCP ลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า เมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มี CCCP คิดเป็นร้อยละ 90.9 (10/11)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของนักวิจัยท่านอื่นที่ได้ทดสอบการแสดงออกของ efflux pump ต่อยา ciprofloxacin และ meropenem พบว่าค่า MIC ที่มีสาร CCCP ลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า เมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มีสาร CCCP คิดเป็นร้อยละ 46.1 (30/65) และ 71.43 (20/28)

ตามลำดับ (27, 90) (88, 110) ในส่วนของการศึกษาในยา imipenem, cefepime และ tigecycline พบค่า MIC ที่มี CCCP ลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า เมื่อเทียบกับค่า MIC ที่ไม่มี CCCP เพียงร้อยละ 2.1 (1/47), 8.5 (4/47) และ 22.5 (18/80) ตามลำดับ (111, 112)

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน efflux pump ชนิด RND (*adeB*) ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ของเชื้อก่อน และหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin เทียบกับเชื้อสาย AB19606 พบว่าเชื้อก่อนเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin จำนวน 3 จาก 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.5 ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน ได้แก่ D191, D219 และ D273 มีการแสดงออกของยีน *adeB* เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับเชื้อ AB19606 เป็นจำนวนเฉลี่ย 17.47, 6.14 และ 24.22 เท่าตามลำดับ และพบการแสดงออกของยีน *adeB* เพิ่มขึ้นในเชื้อหลังเหนี่ยวนำด้วยยา amikacin ทั้ง 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 โดยพบการแสดงออกของยีน *adeB* ในเชื้อ A153-Ind, A259-Ind, A262-Ind, D191-Ind, D219-Ind, D273-Ind, E261-Ind และ AB19606-Ind เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเชื้อก่อนเหนี่ยวนำแต่ละตัวอย่าง แต่ไม่อาจสรุปได้ว่า การทำงานของ efflux pump มีความสัมพันธ์อย่างจำเพาะกับการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ในทุกตัวอย่าง เนื่องจากเชื้อที่ไวต่อยาอย่างเชื้อ A262 เมื่อเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin แล้ว (A262-Ind) มีจำนวนเท่าการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น แต่ไม่สูงมากเท่าเชื้อ AB19606, A153 และ A259 รวมถึงการแสดงออกของยีน *adeB* ในเชื้อ E261-Ind ที่มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นหลังจากถูกเหนี่ยวนำ แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่มากกว่าเชื้อ AB19606 แม้ว่าเชื้อ E261 จะดื้อยา amikacin อยู่ก่อนแล้ว อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาสามารถพิสูจน์สมมติฐานของงานวิจัยที่ว่า เชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา สามารถพบการแสดงออกของ efflux pump เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhu W และคณะ (27) ได้ทำการทดสอบการแสดงออกของ efflux pump โดยตรวจพบการแสดงออกของยีน *adeB* ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ในเชื้อที่ดื้อยา amikacin 10 ตัวอย่าง จากเชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา amikacin จำนวน 11 ตัวอย่าง

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เจริญ และดื้อต่อยาปฏิชีวนะในหลอดทดลองได้ หากอยู่ในสภาวะที่มียาในระดับต่ำๆเป็นเวลานาน ซึ่งตอบสนองต่อสภาวะในการเจริญที่มียาปฏิชีวนะ โดยการแสดงออกของ efflux pump เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในกลไกการดื้อยาของเชื้อที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อยา แต่อาจสัมพันธ์กับเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน และเชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อยา อาจมีการแสดงออกของ efflux pump ร่วมกับ

กลไกการดื้อยาอื่นของเชื้อในตัวอย่างต่างกันออกไป หากไม่มีการใช้ยาในการรักษาอย่างถูกต้อง จะทำให้แนวโน้มการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อ *A. baumannii* ที่ปัจจุบันพบว่าการดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานมากขึ้น ยาที่มีไม่สามารถรักษาผู้ป่วยได้ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.1 ควรทำการศึกษาตัวอย่างเชื้อ *A. baumannii* เพิ่มเติมจากโรงพยาบาลทั่วประเทศ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมมากขึ้น

5.2 ควรศึกษายีน efflux pump กลุ่มอื่นๆ หรือยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ efflux pump ที่มีส่วนในการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น

5.3 ควรศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา หรือ การกลายพันธุ์ของเป้าหมายในการจับของยา

บรรณานุกรม

1. Montefour, Frieden, Hurst, Helmich, Headley, Martin, et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. Crit Care Nurse 2008;28:15-25.
2. Jane F. Turton, Mary E. Kaufmann, Martin J. Gill, Rachel Pike, Paul T. Scott, Joel Fishbain, et al. Comparison of *Acinetobacter baumannii* Isolates from the United Kingdom and the United States That Were Associated with Repatriated Casualties of the Iraq Conflict. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2006;44:2630-4.
3. Lee NY, Lee HC, Ko NY, et al. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. Infection Control and Hospital Epidemiology 2007;28:713-9.
4. L.-C. Kuo, C.-C. Lai, C.-H. Liao, C.-K. Hsu, Y.-L. Chang, C.-Y. Chang, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2007;13:196-8.
5. Center NARS. Result of antimicrobial resistance surveillance Thailand: National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2018
6. Falagas ME, Koletsis PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medical Microbiology 2006;55:1619-29.
7. Saelao S, Utiswannakul A. Therapy for patients with multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Health Research 2008;22:131-6.
8. Chaladchalam S, Diraphat P, Utrarachkij F, Suthienkul O, Samakoses R, Siripanichgon K. Bed rails and endotracheal tube connectors as possible sources for spreading *Acinetobacter baumannii* in ventilator-associated pneumonia patients. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 2008;39:676-85.
9. Rungruanghiranya S, Somboonwit C, Kanchana-poom T. *Acinetobacter* infection in the intensive care unit. Journal of INFECTIOUS DISEASES and ANTIMICROBIAL AGENTS 2005;22:77-92.

10. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 2014;27:241-63.
11. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barrero-Almodovar AE, Garcia-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM, et al. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin : a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases* 2003;36:1111-8.
12. Koomanachai P, Tiengrim S, Kiratisin P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in siriraj hospital, Bangkok, Thailand. . *International Journal of Infectious Diseases* 2007;11:402-6.
13. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* 1996;9:148-65.
14. Temgoua, F.T.D., Wu L. Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. *Journal of Biosciences and Medicines* 2019;7:48-70.
15. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001;45:3375-80.
16. Yan. N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 2015;44:257-83.
17. Ming-Feng Lin, Yun-You Lin, Chung-Yu Lan. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology* 2017;55:130-6.
18. Ming-Feng Lin, Yun-You Lin b, Chi-Chao Tu c, Chung-Yu Lan. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2017;50:224-31.

19. Ling BD, Zhang L, Li X.Z. Antimicrobial Resistance and Drug Efflux Pumps in *Acinetobacter* in Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Efflux -Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria* 2016:329-58.
20. Zhao SY, Jiang DY, Xu PC, Zhang YK, Shi HF, Cao HL, et al. An Investigation of Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections in a Comprehensive Hospital of East China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2015;14.
21. Zou L., Meng J., McDermott PF, Wang F., Yang Q., Cao G., et al. Presence of Disinfectant Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Retail Meats in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014;69:2644-9.
22. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global Evolution of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clonal Lineages. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2013;41:11-9.
23. Locher KP. Mechanistic Diversity in ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* 2016;23:487-94.
24. Lopez M, Alvarez-Fraga L, Gato E, Blasco L, Poza M, Fernandez-Garcia L, et al. Genome Sequence of a Clinical Strain of *Acinetobacter baumannii* Belonging to the ST79/PFGE-HUI-1 Clone Lacking the *AdeABC* (Resistance-Nodulation-Cell Division-Type) Efflux Pump. *Genome Announcement* 2016;4:e00962-e16.
25. Hassan KA, Liu Q, Henderson PJ, Paulsen IT. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* *AceI* transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. . 2015.
26. Martins M, Santos B, Martins A, et al. An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. *in vivo* 2006:657-64.
27. Zhu W, Wang H, Zhang JP. A comparison of *adeB* gene expression levels under conditions of induced resistance by different drugs in vitro in *Acinetobacter baumannii*. *Exp Ther Med* 2017;13:2177-82.
28. Kuo L, Teng L, Yu C, Ho S, Hsueh P. Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a University Hospital in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1759-63.
29. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology* 1991;29:277-82.

30. Ruangchan S, Siripaitoon P. Community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Journal of INFECTIOUS DISEASES and ANTIMICROBIAL AGENTS* 2012;29:157-60.
31. Larson E. A decade of nosocomial *Acinetobacter*. *American Journal of Infection Control* 1984;14:83-91.
32. Anstey NM, Currie BJ, Withnall KM. Community acquired *Acinetobacter* pneumonia in Northern Territory of Australia. *Clinical Infectious Diseases* 1992;14:83-91.
33. American Thoracic Society IDSoA. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005:388-416.
34. Keenan SP, Heyland DK, Jacka MJ, *et al.* Ventilator-associated pneumonia. Prevention, diagnosis and therapy. *Critical Care Clinics* 2002;18:107-25.
35. Husni RN, Goldstein LS, Arroliga AC, *et al.* Risk factors for outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter* nosocomial pneumonia among intubated patients. *Chest* 1999;115:1378-82.
36. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, *et al.* Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *The American review of respiratory disease* 1989;139:877-84.
37. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernandez Hinojosa E, *et al.* *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med* 2005;31:649-55.
38. Velero C, Garcia Palomo JD, Motorras P, *et al.* *Acinetobacter* bacteremia in the teaching hospital, 1989-1998. *Eur J Intern Med* 2001;12:425-9.
39. Vidal F, Mensa J, Almela M, *et al.* Bacteremia in adult due to glucose non-fermentative Gramnegative bacilli other than *P. aeruginosa*. *QJM* 2003;96:227-34.
40. Seifert H, Strake A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* 1995;75:340-9.

41. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, *et al.* Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Epidemiology, clinical findings and prognostic features. Clin Infect Dis 1996;22:1026-32.
42. Glew RH, Moellering RC Jr, Kunz LJ. Infections with *Acinetobacter baumannii* (*Herella vaginicola*): clinical and laboratory studies. Medicine (Baltimore) 1997;56:79-97.
43. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, *et al.* Nosocomial infections in medical intensive care unit in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med 1999;27:887-92.
44. Basic B, Beus I, Marton E, *et al.* Nosocomial infections in critically ill infectious disease patients: results of a 7-year focal surveillance. Infection 1999;27:16-22.
45. Stapleton A. Urinary tract infection in patients with diabetes. . Am J Med 2002;113.
46. Avecillas JF, Mazzone P, Arroliga AC. A rational approach to the evaluation and treatment of the infected patient in the intensive care unit. Clin Chest Med 2003;24:645-69.
47. Joel Fishbain, Anton Y. Peleg. Treatment of *Acinetobacter* Infections. Clinical Infectious Diseases 2010;51:79-84.
48. Frei CR, Burgess DS. Continuous infusion beta lactams for intensive care unit pulmonary infections. . Clin Microbiol Infect 2005;11:418-21.
49. Pothirat C, Deesomchoke A, Liewsrisakul C, *et al.* Impact of the 'appropriateness' and 'time to start' antibiotic treatment on hospital-acquired pneumonia outcome: a survival analysis (Abstract). Proceedings of annual meeting of Thoracic Society of Thailand 2005 2006.
50. Rattanaumpawan P, Lorsutthitham J, Ungprasert P, *et al.* Randomized controlled trial of nebulized colistimethate sodium as adjunctive therapy of ventilator-associated pneumonia caused by Gram negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2010;65:2645-9.
51. Wanwisa Kanankaeng PS. Regimens and Clinical Outcomes of Antimicrobial Uses in Hospital-Acquired Pneumonia Caused by Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. Thai Journal of Pharmacy Practice 2019;11:470-82.
52. Budsaya Dejpun PharmD, Wittaya Wangsomboonsiri, Thitima Wattanavijitkul. Outcomes of Tigecycline-based Versus Colistin-based Therapy in the Treatment of

Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Pneumonia. Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine 2018;62:209-22.

53. Sirinart Wongsampan, Apichat Jittsue, Naiyana Santiyanon, Suwimon Yeepu, Kanjanapa Ariyawithaya, Nattaphon Kitjakarn. Efficacy and Safety of the Treatment of *Acinetobacter baumannii* Infection with Colistin Injection. Thai Journal of Pharmacy Practice 2018;10.

54. Dijun Du, Xuan Wang- Kan, Arthur Neuberger, Hendrik W. van Veen, Klaas M. Pos, Laura J. V. Piddock, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. Nature 2018;16:523-39.

55. Jingjing Sun, Ziqing Deng, Aixin Yan. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications 2014;453:254-67.

56. Spengler G, Kincses A, Gajdacs M, Amaral L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. Molecules (Basel, Switzerland) 2017;22:468.

57. Francis T. Dongmo Temgoua, Liang Wu. Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. Journal of Biosciences and Medicines 2019;7:48-70.

58. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003;51:565-74.

59. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs 2004;64:159-204.

60. C. Xu, S. R. Bilya, W. Xu. adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. New Microbe and New Infect 2019;30.

61. G.L. French. The continuing crisis in antibiotic resistance. International Journal of Antimicrobial Agents;36S3 S3-S7.

62. Mark S Butler, Mark A Blaskovich, Matthew A Cooper. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. The Journal of Antibiotics 2013;66:571-91.

63. Olga Lomovskaya, Will Watkins. Inhibition of Efflux Pumps as a Novel Approach to Combat Drug Resistance in Bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2001;3:225-36.
64. Kelvin Wong, Jerome Ma, Alice Rothnie, Philip C. Biggin, Ian D. Kerr. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends in Biochemical Sciences* 2013;39:8-16.
65. Gerard D. Wright. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology* 2016;24:862-71.
66. Ann H. West, Ann M. Stock. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2001;26:369-76.
67. Xing L., Barnie P.A., Su Z, Xu H. Development of Efflux Pumps and Inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection* 2014;3:135.
68. Schindler B.D., Frempong-Manso E., DeMarco C.E., Kosmidis C., Matta V., Seo S.M., et al. Analyses of Multidrug Efflux Pump-Like Proteins Encoded on the *Staphylococcus aureus* Chromosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59:747-8.
69. Si H., Zhang W.J., Chu S., Wang X.M., Dai L., Hua X., et al. Novel Plasmid-Borne Multidrug Resistance Gene Cluster Including Lsa (E) from a Linezolid-Resistant *Enterococcus faecium* Isolate of Swine Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59:7113-6.
70. Yan N. Structural Advances for the Major Facilitator Superfamily (MFS) Transporters. *Trends in Biochemical Sciences* 2013;38:151-9.
71. Vilacoba E., Almuzara M., Gulone L., Traglia G.M., Figueroa S.A., Sly G., et al. Emergence and Spread of Plasmid-Borne tet (B): ISCR2 in Minocycline-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57:651-4.
72. Wallace L., Daugherty S.C., Nagaraj S., Johnson J.K., Harris A.D., Rasko D.A. Use of Comparative Genomics to Characterize the Diversity of *Acinetobacter baumannii* Surveillance Isolates in a Health Care Institution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016;60:5933-41.
73. Yan N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 2015;44:257-83.

74. Bellmann-Sickert K., Stone T.A., Poulsen B.E., Deber C.M. Efflux by Small Multidrug Resistance Proteins Is Inhibited by Membrane-Interactive Helix- Stapled Peptides. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290:1752-9.
75. Blanco P. H-AS, Reales-Calderon J.A., Corona F., Lira F., Alcalde-Rico M., Bernardini A., et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms* 2016;4:14.
76. Ruzin A., Keeney D., Bradford P.A. AdeABC Multidrug Efflux Pump Is Associated with Decreased Susceptibility to Tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* Complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;59:1001-4.
77. Chang G., Szewczyk P., He X. Structures of Multidrug Efflux Pumps from the MFS, SMR, MATE and ABC Transporter Families. *Microbial Efflux Pumps : Current Research* 2013;21:886-7.
78. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003;67:593-656.
79. Cheesman M.J., Ilanko A., Blonk B., Cock I.E. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? *Pharmacognosy Reviews* 2017;11:57.
80. Pages J.M., Amaral L. Mechanisms of Drug Efflux and Strategies to Combat Them: Challenging the Efflux Pump of Gram-Negative Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1794:826-33.
81. Pannek S., Higgins P.G., Steinke P., Jonas D., Akova M., Bohnert J.A., et al. Multidrug Efflux Inhibition in *Acinetobacter baumannii* : Comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:970-4.
82. Gholami M., Hashemi A., Hakemi-Vala M., Goudarzi H., Hallajzadeh M. Efflux Pump Inhibitor Phenylalanine-Arginine β -Naphthylamide Effect on the Minimum Inhibitory Concentration of Imipenem in *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran. *Jundishapur. Journal of Microbiology* 2015;8.

83. Li X.Z., Elkins C.A., Zgurskaya H.I. Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications 2016;66:324-6.
84. Siriyong T., Chusri S., Srimanote P., Tipmanee V., Voravuthikunchai S.P. Holarrhena Antidysenterica Extract and Its Steroidal Alkaloid, Conessine, as Resistance-Modifying Agents against Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Microbial Drug Resistance 2016;22:273-82.
85. Jamshidi S., Sutton J.M., Rahman K.M. Computational Study Reveals the Molecular Mechanism of the Interaction between the Efflux Inhibitor Pa β N and the AdeB Transporter from *Acinetobacter baumannii*. ACS Omega 2017;2:3002-16.
86. Rhee J.Y., Choi J.Y., Ko K.S. Efflux Pump Inhibitor Carbonyl Cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) Enhances Bacteriostatic Activity of Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Korea. Journal Bacteriology and Virology 2016;46:185-92.
87. Wentao Ni, Yanjun Li, Jie Guan, Jin Zhao, Junchang Cui, Rui Wang, et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016;60:3215-8.
88. Ardebili A., Talebi M., Azimi L., Lari A.R. Effect of Efflux Pump Inhibitor Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone on the Minimum Inhibitory Concentration of Ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Jundishapur Journal of Microbiology 2014;7.
89. Rana T., Singh S., Kaur N., Pathania K., Farooq U. A Review on Efflux Pump Inhibitors of Medically Important Bacteria from Plant Sources. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2014;26:101-11.
90. Saviuc C., Gheorghe I., Coban S., Drumea V., Banu O., Bezirtzoglou E., et al. *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Eucalyptol Act as Efflux Pumps Inhibitors and Increase Ciprofloxacin Efficiency against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* MDR Strains. Romanian Biotechnological Letters 2016;21:11783.
91. Yanpeng Zhang, Zhuocheng Li, Xiaolong He, Fanglin Ding, Weiqing Wu, Yong Luo, et al. Overproduction of efflux pumps caused reduced susceptibility to carbapenem

under consecutive imipenem-selected stress in *Acinetobacter baumannii*. Infection and Drug Resistance 2018;11:457-67.

92. Ming-Feng Lin, Yun-You Lin, Hui-Wen Yeh, Chung-Yu Lan. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii adeAB* genes and its correlation with tigecycline susceptibility. BMC Microbiology 2014;14.

93. Marta M, Miguel V, Isabel C, *et al.* Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. *in vivo* 2011;25:171-8.

94. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, *et al.* Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. Journal of Clinical Microbiology 2000;38:3299-305.

95. Kifah Ahmed Jassim, Kais Kassim Ghaima, Shurook Mohammad K. Saadedin. AdeABC Efflux Pump Genes in Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. Clinical Microbiology and Infection 2016;3.

96. Chao Hu, Yujun Li, Ziwen Zhao, Shuquan Wei, Zhuxiang Zhao, Huiling Chen, *et al.* *In vitro* synergistic effect of amlodipine and imipenem on the expression of the AdeABC efflux pump in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE 2018;13.

97. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. Journal of Investigative Dermatology 2013;133:1-4.

98. S. H. Ardehali, T. Azimi, Fatemeh Fallah, M. Owrang, N. Aghamohammadi, L. Azimi. Role of efflux pumps in reduced susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. New Microbe and New Infect 2019;30.

99. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Approved Standard M100-S15 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2018.

100. Lin M., Lin Y., Lan C. Induction of Tigecycline Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Bio-protocol 2014;4.

101. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, *et al.* Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2946-50.

102. 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* 2006;44:2974-6.
103. Hou C, Yang F. Drug-resistant gene of bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51} and bla_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Investigative Dermatology* 2015;8:13859-63.
104. Löfström C, Josefsen MH, Hansen T, Søndergaard MSR, Hoorfar J. 9 - Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens. In: Bhunia AK, Kim MS, Taitt CR, editors. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment*: Woodhead Publishing; 2015. p. 219-48.
105. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2065-9.
106. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001;25:402-8.
107. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:4382-90.
108. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57:138-63.
109. Farshadzadeh Z, Taheri B, Rahimi S, Shoja S, Pourhajibagher M, Haghighi MA, et al. Growth Rate and Biofilm Formation Ability of Clinical and Laboratory-Evolved Colistin-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology* 2018;9.
110. Lei Huang LS, Guobing Xu, Tiewan Xia. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008;62:326-32.
111. Sanchez-Carbonel A MB, López-Chegne N, Peña-Tuesta I, Huayan-Dávila G, Blitchtein D, et al. The effect of the efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide m-

Chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE 2021; 16(12).

112. Owrang M, Karimi, A., Azimi, L., Motaghi Nezhad, R., Fallah, F. Relative Gene Expression of RND-Type Efflux Pumps in Tigecycline Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from Training Hospitals in Tehran, Iran. International Journal of Pediatrics 2018; 6:8669-74.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณัฐนิชา บัวงามดี
วัน เดือน ปี เกิด	13 มีนาคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	314/464 ซอยสรองประภา 16 สีกัน ดอนเมือง กรุงเทพฯ 10210



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY