

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

บทบาทของระบบ multidrug efflux pumps ต่อการดื้อยาใน
Acinetobacter baumannii

โดย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

ชาญวิทย์ ศรีพุทธรัตน์

มิถุนายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติเงินทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2556
คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตว
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านอนุ
ชีววิทยา รวมทั้งผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้วงปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

มิถุนายน 2556

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title Role of multidrug efflux pumps in antimicrobial resistance in
Acinetobacter baumannii

Name of Investigators Rungtip Chuanchuen
 Chanwit Tripuddharat

Year June 2013

Abstract

Role of multidrug efflux systems in antimicrobial resistance was studied in 121 *Acinetobacter baumannii* isolates from patients. The studies included antimicrobial susceptibility test, determination of distribution of multidrug efflux pumps using ATP and/or pmf, determination of expression of AdeABC, AdeIJK and AdeFGH, examination of the correlation between the AdeABC, AdeIJK and AdeFGH efflux pumps and antimicrobial resistance, and regulation of the three efflux systems. The results showed that multidrug-resistant *A. baumannii* are widely distributed among the patients admitted to the hospital. The multidrug efflux pumps using ATP and/or pmf as energy source play a role in antimicrobial resistance among these isolates. There is the simultaneous expression of many multidrug efflux pumps in the *A. baumannii* clinical isolates. The expression level of AdeABC, AdeFGH and AdeIJK was not well correlated to type and level of antimicrobial susceptibility. The regulation of AdeABC, AdeFGH and AdeIJK expression is complicated. The results indicate the need for judicious use of antimicrobials for treatment of patients

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
รายการสัญลักษณ์	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
วิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	16
วิจารณ์ผลของการวิจัย	28
ข้อสรุปผลการวิจัย	31
ประโยชน์ในการนำไปใช้	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	34
Outputs ที่ได้จากผลงานวิจัยครั้งนี้	36

รายการตารางประกอบ

	หน้าที่
ตารางที่ 1 ยาปฏิชีวนะที่ถูกขับออกส่งออกโดยระบบ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ใน <i>A. baumannii</i>	4
ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยามาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย	9
ตารางที่ 3 Primer ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้	11
ตารางที่ 4 ค่าความไวรับต่ำสุดในการเจริญเติบโตของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ และสารต้านจุลชีพของเชื้อที่ได้จากการทดสอบ	18
ตารางที่ 5 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ	19
ตารางที่ 6 ค่าความไวรับต่ำสุดในการเจริญเติบโตของเชื้อ อัตราการดื้อยา และ อัตราการลดลงของค่า MIC ลง 4 เท่า เมื่อใช้ efflux pump inhibitor ร่วมกับยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ	20
ตารางที่ 7 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeB และการกลายพันธุ์ในยีน <i>adeR</i>	23
ตารางที่ 8 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeB และการกลายพันธุ์ในยีน <i>adeS</i>	23
ตารางที่ 9 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeG และการกลายพันธุ์ในยีน <i>adeL</i>	24
ตารางที่ 10 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeJ และการกลายพันธุ์ในยีน <i>adeN</i>	24
ตารางที่ 11 ค่า MICs ของ <i>A. baumannii</i> ที่นำมาตรวจจะระดับการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK (n=10)	25
ตารางที่ 12 Expression of the Ade systems and mutations in the corresponding regulatory regions in <i>A. baumannii</i> isolates (n=10)	26

รายการภาพประกอบ

		หน้าที่
รูปที่ 1	แบบจำลองแสดงโครงสร้างของระบบ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ใน <i>A. baumannii</i>	3
รูปที่ 2	ชุดยีน (operon) ของระบบ multidrug efflux ใน <i>A. baumannii</i>	4
รูปที่ 3	A) ตำแหน่ง restriction sites ของชุดยีน <i>adeIJK</i> และ B) Plasmid map ของ pUC18 Δ (<i>adeIJK</i>)	14
รูปที่ 4	Plasmid map ของ A) pUC18 Δ (<i>adeIJK</i>)::Gm และ B) pEX18Ap Δ (<i>adeIJK</i>)::Gm	15
รูปที่ 5	DNA pattern สำหรับการยืนยันสายพันธุ์ <i>baumannii</i> ด้วยเทคนิค ARDRA	16
รูปที่ 6	อัตราการติดเชื้อต่ออายุปฏิชีวนะของ <i>A. baumannii</i> แยกได้จากผู้ป่วย ($n = 100$)	17
รูปที่ 7	การแสดงออกของระบบ multidrug efflux system AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK โดยทดสอบ transcription ของยีน <i>adeB</i> , <i>adeG</i> และ <i>adeJ</i> ตามลำดับ ด้วยวิธี RT-PCR	21
รูปที่ 8	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อที่มีการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK ($n = 100$)	22

รายการสัญลักษณ์

A.	<i>Acinetobacter</i>
A _{540nm}	absorbance at 540 nm
A _{600nm}	absorbance at 600 nm
AMK	amikacin
AMP	ampicillin
ATM	azetronam
<i>bla</i>	β -lactamase encoding gene
bp	base pair(s)
CAR	carbenicillin
°C	degree(s) Celcius
CFP	ceftaxidime
CHP	chloramphenicol
CIP	ciprofloxacin
cm	centimeter(s)
Da	Dalton(s)
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate(s)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EPI	efflux pump inhibitors
ERY	Erythromycin
GEN	gentamicin
h	hour(s)
kb	kilobase(s) or 1000 bp
kDa	kilodalton(s)
KAN	kanamycin
KEM	kanamycin
l	liter(s)
LB	Luria-Bertani medium
LBAp100	Luria-Bertani medium containing 100 μ g/ml ampicillin
Mb	megabasepairs

M	molar
mM	millimolar
MDR	multidrug resistance
mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
ml	milliliter(s)
NEO	neomycin
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s);
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	polymerase chain reaction
PIP	piperacillin
r	resistance/resistant
RT	room temperature
s	sensitive/susceptible
sec	seconds
SPC	spectinomycin
STR	streptomycin
TET	tetracycline
TRI	trimethoprim
u	unit(s)
μ l	microliter
μ M	micromolar
μ g	microgram(s)
v/v	volume by volume
WT	wild-type

บทนำ

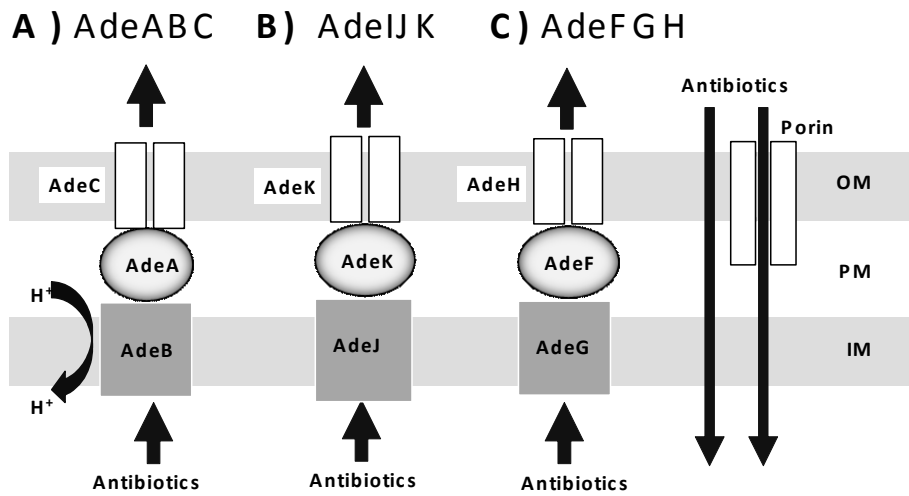
A. baumannii เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่พบบ่อยมากในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยอัตราการติดเชื้อนี้สูงขึ้นและกลายเป็นสาเหตุที่สำคัญอันดับ 2 รองจาก *Pseudomonas aeruginosa* ของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแทรกซ้อน ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตียรอยด์และผู้ป่วยใน intensive care units (ICUs) [1] ในปัจจุบัน *A. baumannii* ได้รับความสนใจจากนักวิจัยและแพทย์ทั่วโลกเนื่องจากอุบัติการณ์การติดเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สามารถก่อโรคได้หลายระบบ และที่สำคัญคือ เป็นเชื้อที่แยกได้บ่อยที่สุดจากบาดแผลของทหารที่ได้รับบาดเจ็บจากการทำสงครามในประเทศอิรักและอัฟกานิสถาน[2-4] ซึ่งสนับสนุนว่าการติดเชื้อชนิดนี้ไม่ได้จำกัดอยู่ในโรงพยาบาลเท่านั้น ปัญหาสำคัญที่สุดของการติดเชื้อ *A. baumannii* คือ การดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multiple drug resistance, MDR) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาเกือบทุกชนิดที่มีใช้ในการรักษาการติดเชื้อในปัจจุบัน ยกเว้น colistin[5-7] อย่างไรก็ตาม colistin มีผลข้างเคียงสูง เป็นพิษต่อไตและระบบประสาท รวมทั้งยับยั้งการทำงานของระบบประสาทในกล้ามเนื้อ ซึ่งจำกัดการนำมาใช้รักษาอาการติดเชื้อในระยะยาว[8-10]

กลไกการดื้อยาของ *A. baumannii* มีความหลากหลายและซับซ้อน เชื้อชนิดนี้ดื้อยาโดยพันธุกรรมอยู่แล้วและยังสามารถพัฒนาการดื้อยาขึ้นได้อีกในระหว่างการรักษา ส่งผลให้การติดเชื้อ *A. baumannii* ตอบสนองต่อการรักษาในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระบบ multidrug efflux pumps มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันในแบคทีเรียแกรมลบ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามแหล่งพลังงานที่ใช้คือ กลุ่มที่ใช้ ATP และกลุ่มที่ใช้ proton motif force (pmf) เป็นแหล่งพลังงาน[11] โดยที่ระบบ multidrug efflux pumps ใน the Resistance Nodulation and Cell division (RND) family ซึ่งใช้ pmf เป็นแหล่งพลังงานมีบทบาทสำคัญที่สุดต่อการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันในแบคทีเรียแกรมลบ[11, 12] และที่มีรายงานใน *A. baumannii* มีจำนวน 3 ระบบ คือ AdeABC, AdeJJK และ AdeFGH (รูปที่ 1 และ 2) [5-7] ทั้ง 3 ระบบสามารถขนส่งยาหลายชนิดออกนอกเซลล์ (ตารางที่ 1) ทำให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ได้ ดังนั้นการรักษาอาการติดเชื้อ *A. baumannii* ด้วยยาเหล่านี้จึงไม่มีประสิทธิภาพ

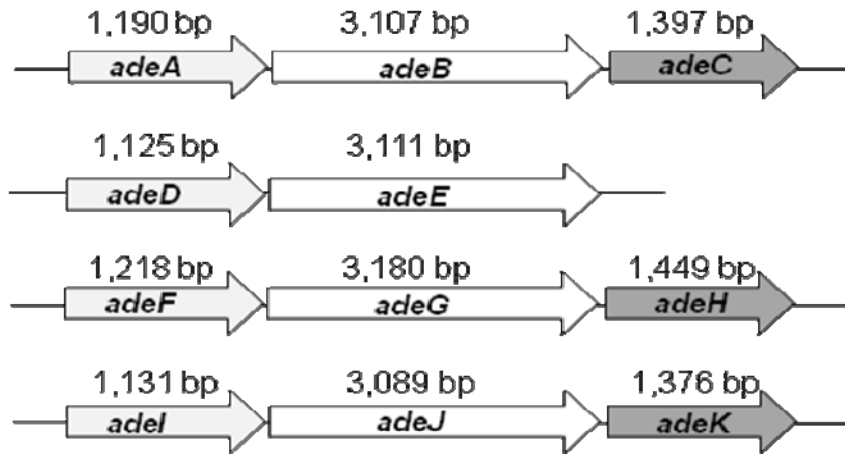
สำหรับวงการแพทย์ เป้าหมายใหม่สำหรับการผลิตยา (new drug target) เพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือ efflux pump inhibitor (EPI) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งหรือขัดขวางการทำงานของระบบ multidrug efflux pumps เมื่อนำมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะจะทำให้ความเข้มข้นภายในเซลล์ของยาปฏิชีวนะที่เป็น substrates ของระบบเพิ่มขึ้น จนถึงระดับที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ ส่งผลให้สามารถใช้อาหารเหล่านี้ในการรักษาได้อีกครั้ง[13] การพัฒนาเพื่อผลิต EPI ที่สามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่มีจำหน่ายในปัจจุบันเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาอาการติดเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาและยังอยู่ในระยะเริ่มต้น ซึ่งยังขาดข้อมูลสำคัญที่จำเป็นต่อการพัฒนาดังกล่าวและยังมีคำถามที่สำคัญเกี่ยวกับการแพร่กระจายและบทบาทของระบบ multidrug efflux pumps ใน *A. baumannii* clinical isolates ดังนี้

1. การแพร่กระจายและการมีส่วนร่วมของระบบ multidrug efflux pumps ทั้งชนิดที่ใช้ ATP และ pmf เป็นแหล่งพลังงานใน *A. baumannii* clinical isolates เป็นอย่างไร
2. ระบบ multidrug efflux pumps ทั้ง 3 ระบบคือ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ระบบใดบ้างที่มีการแสดงออกใน *A. baumannii* clinical isolates ในปัจจุบันยังมีข้อมูลน้อยมากและจำกัดอยู่ที่ระบบ AdeABC
3. ยาปฏิชีวนะตัวใดที่สามารถใช้เป็น phenotypic markers ของระบบ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ได้
4. บทบาทของระบบ AdeABC ต่อการดื้อยาใน *A. baumannii* clinical isolates เป็นอย่างไร เนื่องจากเป็นระบบแรกที่มีรายงาน ถึงแม้จะมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับระบบนี้มากกว่าระบบอื่นๆ แต่ก็ยังมีข้อมูลไม่มากโดยเฉพาะใน clinical isolates ซึ่งการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของระบบนี้จะสามารถนำไปใช้อ้างอิงและเป็นพื้นฐานการศึกษาระบบอื่นๆ ต่อไป
5. ประสิทธิภาพของ EPI ที่รู้จักในปัจจุบันต่อการลดความดื้อยาใน *A. baumannii* clinical isolates เป็นอย่างไร ที่ผ่านมามีการศึกษาไม่มากและมักทดสอบด้วย disk assay หรือการวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่สามารถบอกประสิทธิภาพของ EPI ในการเพิ่มของยาปฏิชีวนะได้ชัดเจนเท่ากับค่า MICs สารเคมีบางชนิดที่พบว่ามียุทธวิธีเป็น EPI ในแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ยังไม่เคยทดสอบด้วยเทคนิคที่มีประสิทธิภาพใน *A. baumannii* clinical isolates

โครงการวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาระบบ multidrug efflux pumps ใน *A. baumannii* clinical isolates เพื่อตอบคำถามดังกล่าว โดยจะศึกษาการแพร่กระจายของชุดยีนที่ควบคุมระบบ multidrug efflux pumps และการมีส่วนร่วมของระบบ multidrug efflux pumps ต่อการดื้อยาในเชื้อชนิดนี้



รูปที่ 1 แบบจำลองแสดงโครงสร้างของระบบ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ใน *A. baumannii* แต่ละระบบประกอบด้วย 3 ส่วนหรือเรียกว่า tripartite system ได้แก่ 1) ตัวขนส่งที่ฝังเซลล์ชั้นในหรือ transporters (AdeB, AdeJ และ AdeG) 2) outer membrane protein ที่ฝังเซลล์ชั้นนอกเป็นทางออกสู่ภายนอกของยา (AdeC, AdeK และ AdeH) และ 3) membrane fusion protein ในชั้น periplasm (AdeA, AdeI และ AdeF) ซึ่งเชื่อว่าทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างตัวขนส่งที่ฝังเซลล์ชั้นในกับ membrane fusion protein ยาที่ผ่านมาเข้าสู่เซลล์จะถูกจับโดยตัวขนส่งที่ฝังเซลล์ชั้นในและถูกส่งออกไปนอกเซลล์โดยผ่านระบบในชั้นตอนเดียว คำย่อ IMP, inner membrane protein; OMP, outer membrane protein, PM, periplasmic space



รูปที่ 2 ชุดยีน (operon) ของระบบ multidrug efflux ใน *A. baumannii*
 ลูกศรแสดงทิศทางของยีน ตัวเลขด้านบนของแต่ละยีนแสดงขนาดของยีน

ตารางที่ 1 ยาปฏิชีวนะที่ถูกขับออกส่งออกโดยระบบ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ใน *A. baumannii*

ระบบ	ยาปฏิชีวนะ
AdeABC	amikacin chloramphenicol cefotaxime erythromycin gentamicin kanamycin norfloxacin tetracycline netilmicin ofloxacin pefloxacin sparfloxacin tobracycline tobramycin trimethoprim
AdeIJK	β -lactams chloramphenicol tetracycline erythromycin lincosamide fluoroquinolones fusidic acid rifampicin trimethoprim novobiocin, clindamycin
AdeFGH	chloramphenicol clindamycin ciprofloxacinm trimethoprim

วัตถุประสงค์โครงการ

1. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายและการมีส่วนร่วมของระบบ multidrug efflux pumps ทั้งที่ใช้ ATP และ pmf เป็นแหล่งพลังงานต่อการดื้อยาใน *A. baumannii* clinical isolates
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ใน *A. baumannii* clinical isolates
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH กับชนิดของยาปฏิชีวนะ

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

A. baumannii เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections) ที่พบได้ในหลายระบบของร่างกาย โดยอัตราการติดเชื้อชนิดนี้ในผู้ป่วยได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก เมื่อเร็วๆ นี้ เชื้อชนิดนี้ได้กลายเป็นที่สนใจพิเศษเพราะเป็นเชื้อที่แยกได้มากที่สุดจากบาดแผลของทหารที่เข้าทำประจำการในประเทศอัฟกานิสถาน²⁻⁴ แสดงว่าเชื้อชนิดนี้ไม่ได้เป็นเชื้อแทรกซ้อนที่จำกัดอยู่ในโรงพยาบาลเท่านั้น ปัญหาสำคัญของการติดเชื้อชนิดนี้คือการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน พบว่า *A. baumannii* ดื้อต่อยาเกือบทุกชนิดที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดปัจจุบัน⁵⁻⁷

กลไกสำคัญของการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันในแบคทีเรียคือ ระบบ multidrug efflux pumps ที่มีการศึกษาเป็นอย่างดี คือ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นสาเหตุของ nosocomial infections เช่นกันและได้มีการพัฒนา EPI เพื่อใช้ในการรักษาควบคู่กับยาปฏิชีวนะสำหรับการรักษาการติดเชื้อชนิดนี้^{13 14} ในทางตรงกันข้าม การศึกษาเกี่ยวกับระบบ multidrug efflux pumps และ EPI ใน *A. baumannii* ยังมีไม่มากและยังไม่มีข้อมูลเพียงพอสำหรับการพัฒนา EPI เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษา

ในปัจจุบันระบบ multidrug efflux pumps ที่พบใน *A. baumannii* มีทั้งหมด 3 ระบบ คือ AdeABC, AdeIJK และ AdeFGH ซึ่งระบบ AdeABC และ AdeIJK มีรายงานการพบใน clinical isolates ที่แยกได้จากผู้ป่วย ส่วนระบบ AdeFGH พบการแสดงออกในเชื้อในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ระบบ AdeABC เป็นระบบที่มีการศึกษามากที่สุดในขณะนี้เพราะเป็นระบบแรกที่พบ โดยการแสดงออกของระบบทำให้เกิดการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาหลายชนิดที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางโครงสร้าง เช่น amikacin chloramphenicol cefotaxime erythromycin gentamicin kanamycin norfloxacin tetracycline tobramycin trimethoprim เป็นต้น⁵ ระบบ AdeIJK สามารถขับออกยาในกลุ่ม β -lactams chloramphenicol tetracycline erythromycin lincosamide fluoroquinolones fusidic acid rifampicin trimethoprim novobiocin และ clindamycin⁶ จากการศึกษาโดยการตัดยีนควบคุมการทำงานของระบบ AdeFGH ในเชื้อที่ไม่มีการแสดงออกของทั้งระบบ AdeABC และ AdeIJK พบว่าระบบ AdeFGH สามารถขับออก chloramphenicol ciprofloxacin trimethoprim⁷

ได้มีการศึกษาบทบาทของ active drug efflux ในเชื้อชนิดต่างๆ โดยใช้ EPI และสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการใช้พลังงานของระบบ เช่น การศึกษาความชุกของระบบใน *Klebsiella pneumoniae*¹⁵ โดยการหาค่า MICs ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มี PA β N และ carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) ใน *Streptococcus pneumoniae* ได้มีการศึกษาโดยใช้ reserpine, verapamil และ CCCP¹⁶ รวมทั้งใน *P. aeruginosa* ทำการศึกษาโดยใช้ EPI ที่ชื่อว่า MC-04,124¹⁷ เป็นต้น ที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาความชุกและส่วนร่วมของระบบต่อการดื้อยาใน *A. baumannii* เช่นกัน แต่ยังมีไม่มากนักและจำกัดที่ EPI ไม่กี่ชนิด ได้แก่ PA β N และ NMP^{18,19}

ที่ผ่านมาได้มีการนำความสัมพันธ์ระหว่างระบบที่แสดงกับยาปฏิชีวนะที่เป็น substrates จำเพาะของแต่ละระบบ มาใช้ในการพัฒนาเทคนิคในการตรวจหาการแสดงออกของระบบที่ทำให้เกิดการดื้อยาใน *P. aeruginosa* ซึ่งเป็น ผสมผสานระหว่าง phenotypic และ genotypic methods เพื่อให้ในการตรวจหาที่เหมาะสมต่อการรักษา²¹ ซึ่งพบว่าได้ดี แต่ยังไม่มีการพัฒนาเทคนิคการทดสอบในลักษณะนี้ใน *A. baumannii*

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *Acinetobacter* จำนวน 121 isolates แยกได้จากตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลศิริราช โดยเป็นเชื้อที่แยกได้ในช่วงปี พ.ศ. 2544–2554 และอยู่ใน stock collection ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เชื้อเหล่านี้ผ่านการยืนยันสายพันธุ์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ using the VITEK GNI card (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) and the API 20NE system (bioMérieux, Inc.). เก็บรักษาเชื้อทั้งหมดใน 20% glycerol ที่ -80°C

ทดสอบยืนยันสายพันธุ์ *baumannii* ด้วยวิธี Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) (Vaneechoutte) โดยนำเชื้อทั้งหมดมาเพิ่มจำนวนของยีน *16S rRNA* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ universal primer (ตารางที่ 3) จากนั้นตัด PCR amplicons ด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease คือ *A/I* และ *Mbol* (Fermentus[®], Mainz, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเชื้อเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของเชื้อที่ยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์ *baumannii* แล้วด้วยวิธี two-fold agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) หรือ Microdilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Muller Hinton Broth (MHB) ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ยาต้านจุลชีพที่ทดสอบจำนวน 15 ชนิด คือ carbenicillin, piperacillin, ceftaxidime, aztreonam, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, spectinomycin, ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ trimethoprim เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC25922 โดยเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance, MDR) หมายถึง เชื้อที่ดื้อยาในกลุ่มที่แตกต่างกันอย่างน้อย 5 ชนิด

ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

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

* ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา

การทดสอบผลของ efflux pump inhibitor (EPI) ต่อความไวต่อยาปฏิชีวนะ

หาค่า MIC ต่อยาต้านจุลชีพจำนวน 15 ชนิด คือ carbenicillin, piperacillin, ceftaxidime, aztreonam, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, spectinomycin, ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ trimethoprim ของเชื้อที่ยืนยันว่าเป็นสปีชีส์ baumannii แล้วด้วยวิธี two-fold agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) หรือ Broth microdilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Muller Hinton Broth (MHB) ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) โดย EPI ที่ใช้ทดสอบคือ reserpine (Sigma) ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml และ carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP (Sigma) ที่ความเข้มข้น 5µg/ml โดยการที่ค่า MIC ลดลงตั้งแต่ 4 เท่าถือว่ามี ความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ

เทคนิคทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับ DNA

เตรียม Chromosomal DNA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป QiAmp kit (Qiagen, Valencia, CA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต เตรียมพลาสมิดได้โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleospin[®] Plasmid Extraction Kit (MACHERY-NAGEL, Düren, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต สำหรับการสกัด DNA จาก gel และทำให้บริสุทธิ์ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Nucleospin[®] Extract II (MACHERY-NAGEL, Düren, Germany) เอนไซม์ Restriction endonuclease และ modified enzymes ซึ่งจากบริษัท (Fermentus[®], Mainz, Germany)

เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

Primers ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงในตารางที่ 3 ในการทำ PCR ปฏิกริยามีปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 5 μ l of total DNA, 10 pmoles of each primer และ 12.5 μ l 2.5 X PCR master mix eppendorf[®] MasterMix (Eppendorf, Hamburg, Germany) หรือ KAPATaq ReadyMix DNA polymerase (KAPAbiosystems, Boston, MA, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

สำหรับการศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ใน regulatory genes ของระบบ multidrug efflux pump แต่ละระบบ ได้แก่ AdeRS, AdeL และ AdeN ซึ่งเป็น regulatory genes ของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK ตามลำดับ ทำ conventional PCR โดยใช้ chromosomal DNA และ primers จำเพาะตามที่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Primer ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Reference
16S rRNA	UniversalprimerUp	TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC	
	Universalprimerdown	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA	
<i>adeB</i>	AdeB_Fw_P5	CCCTAATCAAGGACGTATGC	This study
	AdeB_Rv_P6	GGTGCCTTATTCCATTGTGG	
<i>adeG</i>	AdeG_Fw_P7	TTATCAGGTCCGTGCACAAG	This study
	AdeG_Rv_P8	GTGCAGCAATACGTTC AACC	
<i>adeJ</i>	AdeJ_Fw_P9	GCCGTATGATGCCTGAAGAC	This study
	AdeJ_Rv_P10	GCAGCCAAGCAAAGGAATAC	
<i>adeE</i>	AdeE_Fw_P11	CAGGGACGTGTTAAGCGAGT	This study
	AdeE_Rv_P12	CCAGACTTGCAGCCACTACA	
<i>adeR</i>	AdeR_Fw_P15	GTTAAGGCAATAAAAAGTTGCTT	This study
	AdeR_Rv_P16	TGGAGTAAGTGTGGAGAAATACG	
<i>adeS</i>	AdeS_Fw_P17	CTTGTTAGGTTAGATATGGCATT	This study
	AdeS_RV_P18	GGCGTGGGATATAGGCTAGATAA	
<i>adeL</i>	AdeL_Fw_P19	ATTTCGAACTTACTCATATGCTGA	This study
	AdeL_Rv_P20	GGAATGGACGGAGCATAAAA	
<i>adeN</i>	AdeN_Fw_P21	AAGCAGTGTTAGCCGTCGTT	This study
	AdeN_Rv_P22	GTTGTTGGCTGGGTGGAAGT	
<i>adeIJK</i>	IJK-OK up	CTCTaagcttCTGTAAACCAAG	This study
	IJK-OK down	GTTTGCAACAGCaagcttAAGAC	

การทำ Reverse Transcription PCR (RT PCR)

สกัด Total RNA จาก *A. baumannii* ทั้งหมด โดยใช้ชุดทดสอบ RNA Extraction Kit (RBC Bioscience, MA, USA) ทำการกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย RNase-free DNaseI (Fermentus®, Mainz, Germany) จากนั้นทำการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยชุดทดสอบ the SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR® Green (Invitrogen) และ/หรือ ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) โดยใช้ primer down ของยีนที่เกี่ยวข้อง นำ cDNA จำนวน 1 µg มาทำ conventional PCR ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น

ในการศึกษาการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK นำเชื้อที่ยืนยันว่าเป็นสปีชีส์ *baumannii* แล้วมาตรวจหาการแสดงออก (expression) ของชุดยีน (operon) ของระบบ multidrug efflux systems จำนวน 3 operons คือ *adeABC*, *adeFGH* และ *adeIJK* operon โดยตรวจการแสดงออกของยีน *adeB*, *adeG* และ *adeJ* จากแต่ละ operon ตามลำดับ ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ชุด primer ที่จำเพาะ ได้แก่ AdeB_Fw_P5 และ

AdeB_Rv_P6 สำหรับยีน *adeB* AdeG_Fw_P7 และ AdeG_Rv_P8 สำหรับยีน *adeG* AdeJ_Fw_P9 และ AdeJ_Rv_P10 สำหรับยีน *adeJ* AdeE_Fw_P11 และ AdeE_Rv_P12 สำหรับยีน *adeE* โดยเครื่อง Real-time PCR ที่ใช้คือ Corbett Research/Rotor Gene RG-3000 (Biocompare, South San Francisco, CA, USA)

การสร้าง pEX18Ap Δ (*adeIJK*)::Gm เพื่อใช้ในการ inactivate *adeIJK*

-การสร้าง pUC18 Δ (*adeIJK*)

เพิ่มจำนวนยีน *adeIJK* ด้วย PCR โดยใช้ primers IJK-OK up, CTCTaagcttCTGTAAACCAAG) และ IJK-OK down, GTTTGCAACAGCaagcttAAGA ซึ่งครอบคลุมยีน *adeIJK* ตำแหน่ง 2563-6764 ได้ PCR product ขนาด 4,201 bp โดย thermocycler ที่ใช้คือ 97°C, 5 นาที; 97°C, 45 วินาที, 55°C, 45 วินาที; 72°C, 5 นาที จำนวน 30 cycles และ 72°C, 5 นาที จากนั้นตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ *HindIII* ได้ชิ้นส่วน DNA จำนวน 3 ขนาด คือ 837; 1,169 และ 2,190 bp จากนั้นสกัด DNA ขนาด 2190 bp จาก agarose gel แล้ว clone ลงใน pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* โดย incubate ที่ 16°C, overnight จากนั้นนำ ligation mixture มา transform เข้าสู่ *E. coli* DH₅ α competent cells แล้วเลือก transformants บน LB agar ที่มี ampicillin 150 μ g/ml และ Xgal 40 μ g/ml จากนั้นยืนยันว่า DH₅ α มี pUC18 Δ (*adeIJK*) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และได้ product ขนาด 2,686 และ 2,190 bp

ตัด pUC18 Δ (*adeIJK*) ด้วยเอนไซม์ *NsiI* ได้ชิ้นส่วน DNA 2 bands ขนาด 1,318 และ 3,554 bp สกัด DNA ขนาด 3,554 bp ทำ blunt end ด้วย T4 polymerase ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 5 นาทีและหยุดปฏิกิริยาโดย incubate ที่ 75°C นาน 10 นาที

-การสร้าง pUC18 Δ (*adeIJK*)::Gm

ตัด pPS856 ด้วยเอนไซม์ *SmaI* ได้ชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด 1,077 และ 3,709 bp สกัด DNA ขนาด 1,077 bp เพื่อใช้ ligation กับ pUC18 Δ (*adeIJK*) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *NsiI* ที่ 16°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมา transform เข้าสู่ *E. coli* DH₅ α แล้วเลือก transformants บน LB agar ที่มี ampicillin 150 μ g/ml และ gentamicin 15 μ g/ml ยืนยัน pUC18 Δ (*adeIJK*)::Gm ใน *E. coli* DH₅ α โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ได้ product ขนาด 1,948 และ 2,687bp

-การสร้าง pEX18Ap Δ (*adeIJK*)::Gm

ตัด pUC18 Δ (*adeIJK*)::Gm ด้วยเอนไซม์ *HindIII* เลือกเฉพาะ product ที่ขนาด 1,948 bp นำไป ligate กับ pEX18Ap ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ได้ linear DNA ขนาด 5,842 bp ที่ 16°C, overnight จากนั้นนำ ligation mixture นำมา transform เข้าสู่ *E. coli* DH₅ α จากนั้นคัดเลือก transformants บน LB agar ที่มี ampicillin 150

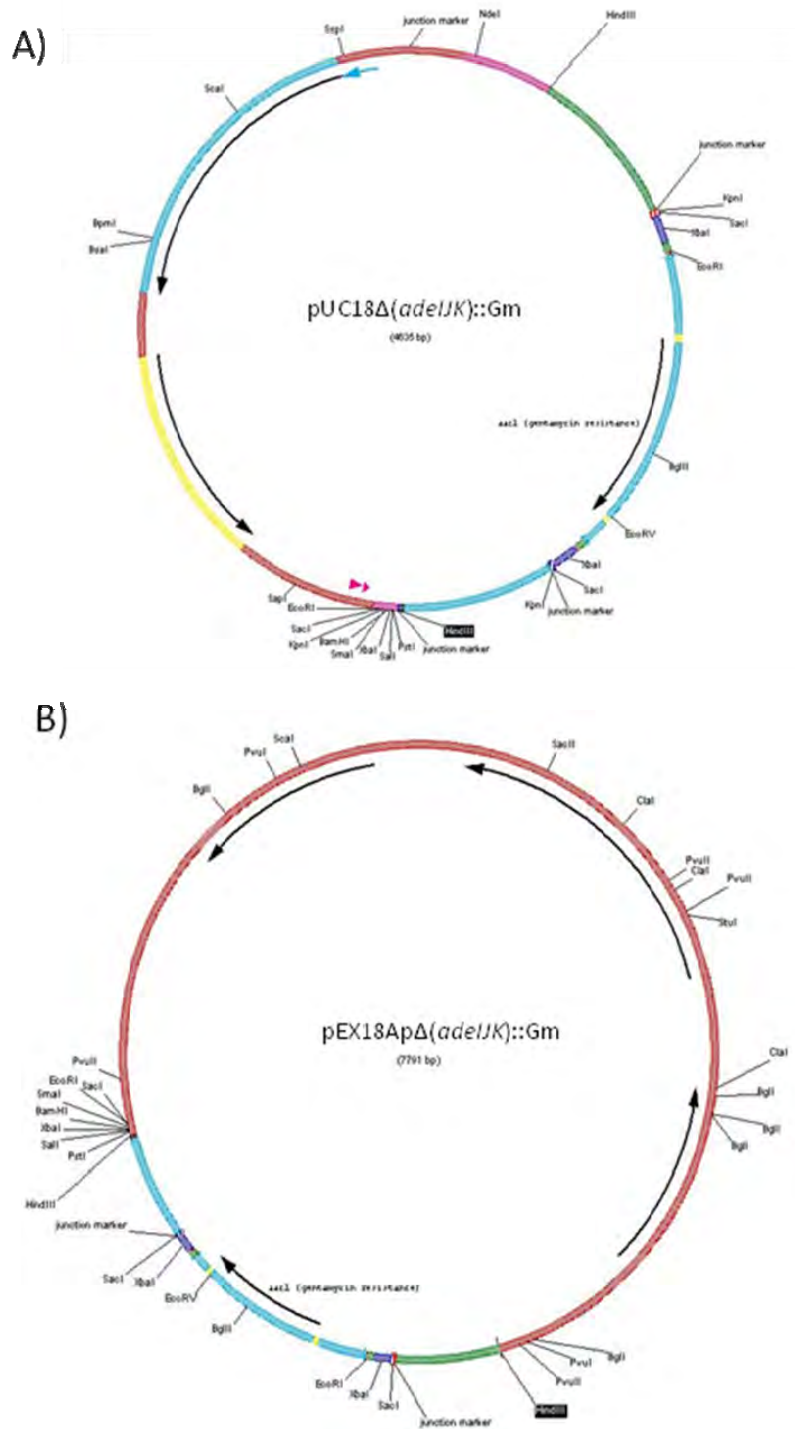
µg/ml และ gentamicin 15µg/ml ยีนย่น pEX18Ap Δ (adeIJK)::Gm ใน *E. coli* DH₅ α ด้วย เอนไซม์ HindIII ได้ product ขนาด 1,949 และ 5,842bp

-การสร้าง *A. baumannii* Δ (adeIJK)

นำ pEX18Ap Δ (adeIJK)::Gm จาก *E. coli* DH₅ α เข้าสู่ *A. baumannii* ด้วย conjugation คัดเลือก Transconjugants เพื่อให้ได้ *A. baumannii* Δ (adeIJK)

การถอดรหัสพันธุกรรม

เตรียม DNA โดยสกัด PCR products ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Nucleospin[®] Extract II (MACHERY-NAGEL, Düren, Germany) และส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) โดยใช้ primers ที่ใช้ในการทำ PCR เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่เผยแพร่ใน GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov)



รูปที่ 4 Plasmid map ของ A) pUC18 Δ (*adeIJK*)::Gm และ B) pEX18Ap Δ (*adeIJK*)::Gm

ผลการวิจัย

การยืนยันสปีชีส์ *baumannii*

จากเชื้อ *Acinetobacter* ที่ผ่านการยืนยันสปีชีส์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีจำนวน 121 isolates เมื่อทดสอบด้วย ARDRA พบว่ายืนยันสปีชีส์ *baumannii* จำนวน 100 isolates (รูปที่ 3) เมื่อตัด PCR amplicons ของ 16S rRNA ตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 190, 220 และ 400 bp และเมื่อตัดด้วย *MboI*, ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 160, 192, 328 และ 616 bp

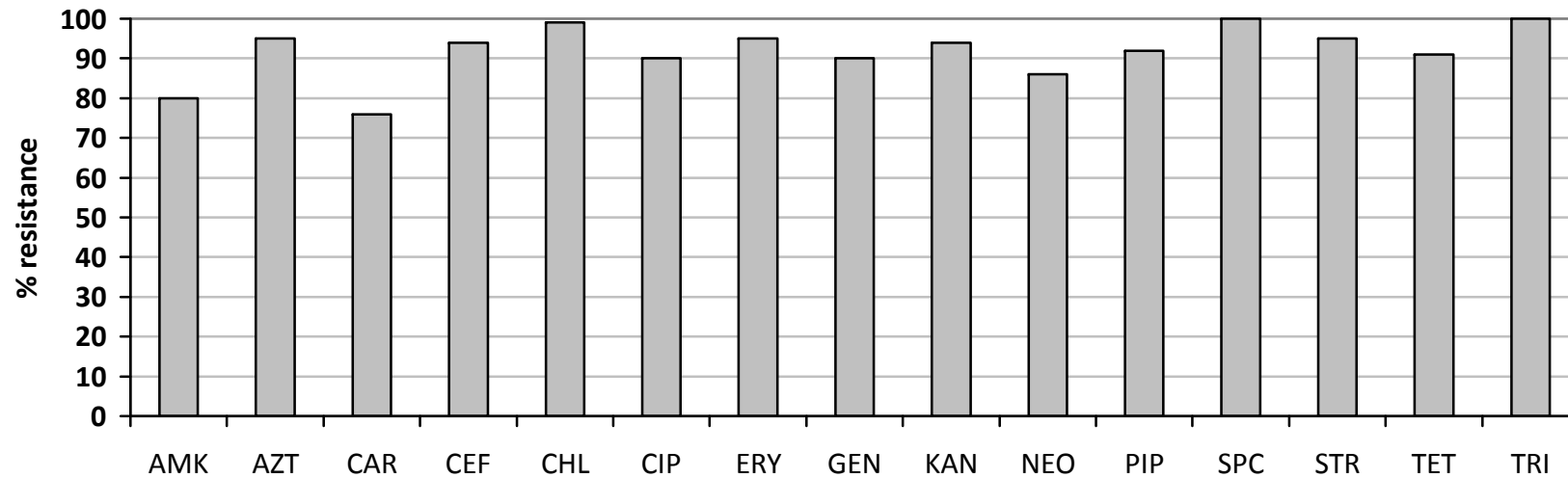


รูปที่ 5 DNA pattern สำหรับการยืนยันสปีชีส์ *baumannii* ด้วยเทคนิค ARDRA

M, marker; *AluI*, 16S rRNA ตัดด้วยเอนไซม์ *AluI*; *MboI*, 16S rRNA ตัดด้วยเอนไซม์ *MboI*

ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *A. baumannii*

A. baumannii ทั้งหมด 100 isolates พบว่ามีทุกเชื้อที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน อัตราการดื้อยา amikacin, aztreonam, carbenicillin, ceftaxidime, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, neomycin, piperacillin, streptomycin และ tetracycline คือ 80.0%, 95.0%, 76.0%, 94.0%, 99.0%, 90.0%, 95.0%, 90.0%, 94.0%, 86.0%, 92.0%, 95.0% และ 91.0% ตามลำดับ และมีอัตราการดื้อยา spectinomycin และ trimethoprim เท่ากับ 100% (รูปที่ 4) จัดรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 30 รูปแบบ (ตารางที่ 4) โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ AMK- ATM-CAR-Ce-CHP-CIP-ERY-GEN-KAN-NEO-PIP-SPC-STR-TET-TRI (65%)



รูปที่ 6 อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *A. baumannii* แยกได้จากผู้ป่วย ($n=100$) ATM, aztreonam; AMK, amikacin; CAR, carbenicillin; PIP, piperacillin; CEF, ceftaxidime; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline; ERY, erythromycin; CHP, chloramphenicol; TRI, trimethoprim

ตารางที่ 4 ค่าความไวรับต่ำสุดในการเจริญเติบโตของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพของเชื้อที่ได้จากการทดสอบ

ยาต้านจุลชีพ	Range of MIC ($\mu\text{g/ml}$)	% Resistance
amikacin	<8 to >2,048	80.0
aztreonam	16 to >256	95.0
carbenicillin	16 to >2,048	76.0
ceftaxidime	8 to >2,048	94.0
chloramphenicol	64 to 512	99.0
ciprofloxacin	0.25 to 256	90.0
erythromycin	<2 to >2,048	95.0
gentamicin	<8 to >2,048	90.0
kanamycin	<8 to >2,048	94.0
neomycin	<8 to >2,048	86.0
piperacillin	32 to >1,024	92.0
spectinomycin	32 to 2,048	100.0
streptomycin	<8 to >2,048	95.0
tetracycline	<8 to >2,048	91.0
trimethoprim	16 to >1,024	100.0

ตารางที่ 5 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ

รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ	No. of isolates (%)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	65 (65%)
AMK, ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	4 (4%)
ATM, CEF, CHP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	3 (3%)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	2 (2%)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TRI	1 (1%)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TRI	1 (1%)
AMK, ATM, CAR, CEF, CHP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
AMK, ATM, CAR, CEF, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
AMK, ATM, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
AMK, ATM, CHP, CIP, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TRI	1 (1%)
AMK, ATM, CHP, KAN, SPC, STR, TRI	1 (1%)
AMK, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
AMK, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CAR, CEF, CHP, CIP, ERY, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TRI	1 (1%)
ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, SPC, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, KAN, SPC, TRI	1 (1%)
ATM, CEF, CHP, CIP, ERY, SPC, STR, TRI	1 (1%)
ATM, CEF, CHP, ERY, SPC, STR, TRI	1 (1%)
ATM, CEF, CHP, SPC, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CEF, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CHP, ERY, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
ATM, CHP, ERY, SPC, STR, TRI	1 (1%)
CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
CEF, CHP, CIP, ERY, GEN, KAN, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
CEF, CHP, ERY, GEN, KAN, NEO, PIP, SPC, STR, TET, TRI	1 (1%)
Total	100 (100%)

การตอบสนองต่อสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็น EPI ของระบบ multidrug efflux ทั้งที่ใช้ ATP และ pmf เป็นแหล่งพลังงาน

ทำการศึกษาในเชื้อทั้งหมด 100 isolates พบว่าการใช้ reserpine ร่วมกับยาด้านจุลชีพชนิดต่างๆ เมื่อพิจารณาที่ค่า breakpoint พบว่าทำให้อัตราการดื้อยาจำนวน 9 ชนิดลดลง ยกเว้น carbenicillin, chloramphenicol, erythromycin, spectinomycin, streptomycin และ trimetoprim ส่วนการใช้ CCCP ร่วมกับยาด้านจุลชีพชนิดทำให้อัตราการดื้อยาจำนวน 13 ชนิดลดลง ยกเว้น spectinomycin และ trimetoprim โดยอัตราการดื้อยา carbenicillin, chloramphenicol, erythromycin และ streptomycin ลดลงเพียง 1-2 % ดังผลที่แสดงในตารางที่ 6

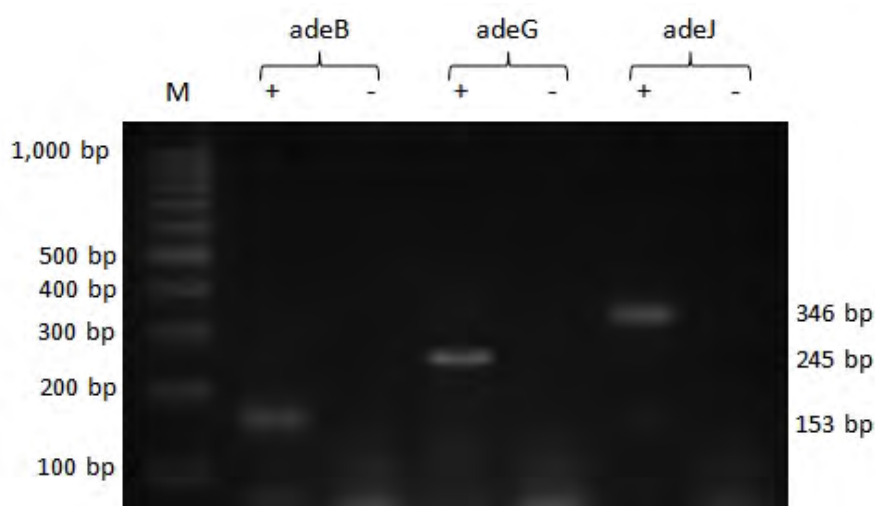
เมื่อพิจารณาที่การลดค่า MIC ตั้งแต่ 4 เท่า พบว่า reserpine และ CCCP มีผลที่ต่างกันดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าความไวรับต่ำสุดในการเจริญเติบโตของเชื้อ อัตราการดื้อยา และ อัตราการลดลงของค่า MIC ลง 4 เท่า เมื่อใช้ efflux pump inhibitor ร่วมกับยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ

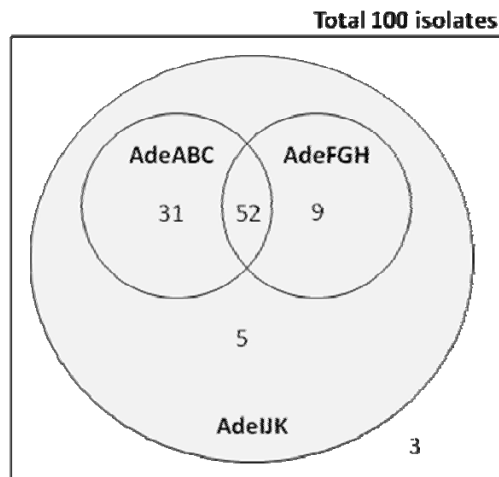
ยาด้านจุลชีพ	Resistance rate (%)			≥ 4 -fold reduction (%)		Range of reduction fold	
	none	+ res	+ cccp	+ res	+ cccp	+ res	+ cccp
amikacin	80	65	47	21	40	0 - 256	0 - >64
aztreonam	95	87	93	21	19	0 - ≥ 32	0 - >32
carbenicillin	76	76	75	21	6	0 - >4	0 - >128
ceftaxidime	94	83	79	43	40	0 - ≥ 256	0 - 256
chloramphenicol	99	99	98	15	18	0 - 16	0 - ≥ 32
ciprofloxacin	93	87	81	5	27	0 - 64	0 - ≥ 512
erythromycin	100	100	98	4	41	0 - 4	0 - ≥ 128
gentamycin	90	75	69	71	62	0 - >128	0 - 2048
kanamycin	90	88	75	27	32	0 - ≥ 128	0 - >256
neomycin	86	83	66	40	47	0 - >128	0 - >128
piperacillin	92	79	80	55	53	0 - 64	0 - 64
spectinomycin	100	100	100	10	14	0 - 32	0 - ≥ 128
streptomycin	95	95	94	31	28	0 - >8	0 - ≥ 16
tetracycline	91	78	86	60	51	0 - >512	0 - ≥ 512
trimethoprim	100	100	100	6	25	0 - >8	0 - >64

การแพร่กระจายและการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK

ผลการแสดงออกของระบบ multidrug efflux pump คือ AdeABC, AdeDE, AdeFGH และ AdeIJK ใน *A. baumannii* จำนวน 100 isolates (รูปที่ 7) พบว่าเชื้อจำนวน 97 isolates มีการแสดงออกของระบบ multidrug efflux pump อย่างน้อยหนึ่งระบบ ไม่พบการแสดงออกของระบบ AdeDE ในเชื้อตัวใดเลย ระบบที่พบการแสดงออกมากที่สุดคือ AdeIJK (97%) รองลงมาคือ AdeABC (83%) และ AdeFGH (61%) โดยรูปแบบที่พบบ่อยที่สุดคือ การแสดงออกพร้อมกัน 3 ระบบคือ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK (52%) รองลงมาเป็นการแสดงออกพร้อมกันของ 2 ระบบคือ AdeABC และ AdeIJK (31%) การแสดงออกพร้อมกันของระบบ AdeFGH และ AdeIJK (9%) เชื้อจำนวน 5% มีการแสดงออกเฉพาะระบบ AdeIJK และไม่พบการแสดงออกของระบบใดเลยที่ทดสอบในเชื้อจำนวน 3 % (รูปที่ 8)



รูปที่ 7 การแสดงออกของระบบ multidrug efflux system AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK โดยทดสอบ transcription ของยีน *adeB*, *adeG* และ *adeJ* ตามลำดับด้วยวิธี RT-PCR M, molecular weight marker; + มีการใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ - ไม่ใช้เอนไซม์ reverse transcriptase



รูปที่ 8 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อที่มีการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK (n=100)

บทบาทของระบบ AdeABC ต่อการดีออกซาปฏิชีวนะ

ในการศึกษาบทบาทของระบบ AdeABC ด้วยเทคนิค gene replacement (gene knockout) จำเป็นต้องทำการ knockout ชุดยีนของระบบ AdeIJK ก่อนเพราะเป็นระบบที่มีการแสดงออกในระดับต่ำอย่างต่อเนื่องและจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบ AdeABC อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถ inactivate ได้ โดยเมื่อสร้าง pEX18Ap Δ (adeIJK)::Gm ได้สำเร็จแล้ว ไม่สามารถนำ เข้าสู่ *A. baumannii* ด้วยวิธี conjugation ได้ จึงไม่สามารถ inactivate ชุดยีน adeIJK ได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาส่วนร่วมของระบบ AdeABC ต่อการดีออกซาปฏิชีวนะด้วยการวัดระดับการแสดงออกของระบบแทน

คัดเลือกเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 10 isolates ที่มีการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK จากการทดสอบด้วย RT-PCR นำมาวัดระดับการแสดงออกของแต่ละระบบและตรวจหาการกลายพันธุ์ใน regulatory gene ได้ โดยผลที่ได้สำหรับแต่ละระบบแสดงในตารางที่ 7-10 ค่า MICs ต่ออาปฏิชีวนะของเชื้อที่ทดสอบแสดงในตารางที่ 11 และนำผลมาแสดงเพื่อการเปรียบเทียบในตารางที่ 12

ตารางที่ 7 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeB และการกลายพันธุ์ในยีน *adeR*

Isolate	AdeB expression	AdeR (Amino acid position)							
		120	133	134	136	195	241	243	
ATCC 19606	1	V	A	N	A	H	P	V	
ABJ058	0.060	.	.	K	.	Q	L	.	
ABJ061	0.087	I	.	.	V	.	L	.	
ABJ068	0.008	I	.	.	V	.	L	.	
ABJ099	0.004	I	.	.	V	.	L	.	
ABJ111	0.241	L	.	
ABJ121	0.131	L	.	
ABJ162	0.139	L	.	
ABJ178	0.101	-	-	-	-	-	-	-	
ABJ203	0.096	I	T	.	.	.	L	I	
ABJ208	0.007	-	-	-	-	-	-	-	

ตารางที่ 8 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeB และการกลายพันธุ์ในยีน *adeS*

Isolate	AdeB expression	AdeS (AA position)																						
		41	42	43	44	45	73	153	167	168	174	186	214	245	263	268	279	280	281	331	341	348	354	355
ATCC 19606	1	G	W	I	S	L	I	A	D	G	E	G	L	V	S	N	V	A	D	V	S	V	S	M
ABJ058	0.060	V	T	F	I	A	.	A	S	Q	I	.	.	P	.
ABJ061	0.087	T	.	.	.	V	F	.	A	H	.	S	Q	I	.	I	.	.	.
ABJ068	0.008	T	.	.	.	V	F	.	A	H	.	S	Q	I	.	I	.	.	.
ABJ099	0.004	T	Y	C	.	V	F	.	A	H	.	S	Q	I	.	I	.	.	.
ABJ111	0.241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABJ121	0.131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABJ162	0.139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABJ178	0.101	A	G	L	V	stop	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABJ203	0.096	T	.	.	K	C	.	L
ABJ208	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeG และการกลายพันธุ์ในยีน *adeL*

Isolate	AdeG expression	AdeL (AA position)		
		2	227	264
ATCC19606	1	R	D	Q
ABJ058	0.479	.	.	.
ABJ061	0.413	C	.	.
ABJ068	0.314	.	.	.
ABJ099	0.025	C	.	.
ABJ111	0.479	.	.	R
ABJ121	0.810	.	A	R
ABJ162	4.522	.	.	.
ABJ178	3.073	.	.	.
ABJ203	1.181	.	.	.
ABJ208	1.195	.	.	.

ตารางที่ 10 ระดับการแสดงออกของระบบ AdeJ และการกลายพันธุ์ในยีน *adeN*

Isolate	AdeJ expression(qRT-PCR)	AdeN (AA position)		
		174	177	197
ATCC19606	1	M	G	M
ABJ058	0.418	.	.	T
ABJ061	0.257	.	.	T
ABJ068	0.544	T	.	T
ABJ099	0.000	.	.	T
ABJ111	1.411	.	stop	-
ABJ121	0.353	.	.	T
ABJ162	5.018	.	.	T
ABJ178	1.951	.	.	T
ABJ203	0.440	.	.	T
ABJ208	26.099	T	.	T

ตารางที่ 11 ค่า MICs ของ *A. baumannii* ที่นำมาตรวจระดับการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK (n=10)

Strain	amikacin	aztreonam	carbenicillin	ceftaxidime	chloramphenicol	ciprofloxacin	erythromycin	gentamycin	kanamycin	neomycin	piperacillin	streptomycin	spectinomycin	tetracycline	trimethoprim
ABJ058	8	32	32	8	512	0.5	64	2	2	≤8	1024	256	256	32	64
ABJ061	128	64	>2048	>2048	512	8	512	>512	2048	256	1024	≥2048	≥2048	1024	512
ABJ068	128	128	>2048	>2048	512	32	512	256	2048	64	1024	≥2048	≥2048	2048	128
ABJ099	64	>256	<64	512	128	32	512	>512	512	32	512	>1024	>1024	512	>256
ABJ111	>1024	>256	>2048	2048	256	128	1024	>512	512	>512	1024	512	>1024	64	>256
ABJ121	64	>256	2048	>2048	512	64	512	>512	256	256	1024	1024	>1024	128	>256
ABJ162	256	>256	>2048	>2048	512	64	1024	>512	>512	256	>1024	>1024	>1024	256	>256
ABJ178	<8	64	<64	16	128	64	1024	2	<8	<8	32	>1024	>1024	1	32
ABJ202	1024	>256	>2048	2048	256	128	512	>512	>512	>512	1024	>1024	>1024	>512	16
ABJ208	<8	128	>2048	512	256	64	512	2	<8	<8	1024	1024	64	128	64

ตารางที่ 12 Expression of the Ade systems and mutations in the corresponding regulatory regions in *A. baumannii* isolates (n=10)

Strain	Transcription level			Regulatory mutation			
	AdeB	AdeG	AdeJ	<i>adeR</i>	<i>adeS</i>	<i>adeL</i>	<i>adeN</i>
ATCC 19606	1	1	1	-	-	-	-
ABJ058	0.060	0.479	0.418	Asn(AAT)-134-Lys(AAA), His(CAC)-195-Gln(CAA), Pro(CCA)-241-Leu(CTA)	Iso(ATT)-73-Val(GTT), Ala(GCT)-153-Thr(GCG), Leu(TTG)-214-Phe(TTT), Val(GTA)-245-Phe(ATA), Ser(TCA)-263-Ala(GCG), Val(GTT)-279-Ala(GCA), Ala(GCA)-280-Ser(TCA), Asp(GAC)-281-Gln(CAA), Val(GTT)-331-Ile(ATT), Ser(TCT)-354-Pro(CCT)	-	Met(ATG)-197-Thr(ACA)
ABJ061	0.087	0.413	0.257	Val(GTC)-120-Ile(ATC), Ala(GCA)-136-Val(GTA), Pro(CCA)-241-Leu(CTA)	Ala(GCT)-153-Thr(ACG), Gly(GGT)-186-Val(GTT), Leu(TTG)-214-Phe(TTT), Ser(TCA)-263-Ala(GCG), Asn(AAT)-268-Ser(CAT), Ala(GCA)-280-Ser(TCA), Asp(GAC)-281-Gln(CAA), Val(GTT)-331-Ile(ATT), Val(GTT)-348-Ile(ATT)	Arg(CGT)-2-Cys(TGT)	Met(ATG)-197-Thr(ACA)
ABJ068	0.008	0.314	0.544	Val(GTC)-120-Ile(ATC), Ala(GCA)-136-Val(GTA), Pro(CCA)-241-Leu(CTA)	Ala(GCT)-153-Thr(ACG), Gly(GGT)-186-Val(GTT), Leu(TTG)-214-Phe(TTT), Ser(TCA)-263-Ala(GCG), Asn(AAT)-268-Ser(CAT), Ala(GCA)-280-Ser(TCA), Asp(GAC)-281-Gln(CAA), Val(GTT)-331-Ile(ATT), Val(GTT)-348-Ile(ATT)	-	Met(ATG)-174-Thr(ACG), Met(ATG)-197-Thr(ACG)
ABJ099	0.004	0.025	0.000	Val(GTC)-120-Ile(ATC), Ala(GCA)-136-Val(GTA), Pro(CCA)-241-Leu(CTA)	Ala(GCT)-153-Thr(ACG), Asp(GAC)-167-Tyr(TAC), Gly(GGC)-168-Cys(TGT), Gly(GGT)-186-Val(GTT), Leu(TTG)-214-Phe(TTT), Ser(TCA)-263-Ala(GCG), Asn(AAT)-268-Ser(CAT), Ala(GCA)-280-Ser(TCA), Asp(GAC)-281-Gln(CAA), Val(GTT)-331-Ile(ATT), Val(GTT)-348-Ile(ATT)	Arg(CGT)-2-Cys(TGT)	Met(ATG)-197-Thr(ACA)
ABJ111	0.241	0.479	1.411	Pro(CCA)-241-Leu(CTA)	*	Gln(CAG)-264-Arg(CGG)	Gly(GGA)-177-stop(TGA)
ABJ121	0.131	0.810	0.353	Pro(CCA)-241-Leu(CTA)	-	Asp(GAC)-227-Ala(GCC), Gln(CAG)-264-Arg(CGG)	Met(ATG)-197-Thr(ACA)

ABJ162	0.139	4.522	5.018	Pro(CCA)-241-Leu(CTA)	-	-	Met(ATG)-197-Thr(ACG)
ABJ178	0.101	3.073	2.000	-	Gly(GGC)-41-Ala(GCT), Trp(TGG)-42-Gly(GGA), Ile(ATT)-43-Leu(TTA), Ser(AGT)-44-Val(GTT), Leu(TTA)-45-stop(TAA)	-	Met(ATG)-197-Thr(ACG)
ABJ203	0.096	1.181	0.440	Val(GTC)-120-Ile(ATC), Ala(GCA)-133-Thr(ACA), Pro(CCA)-241-Leu(CTA), Val(GTA)-243-Ile(ATA)	Ala(GCT)-153-Thr(ACT), Glu(GAA)-174-Lys(AAA), Ser(AGC)-341-Cys(TGC), Met(ATG)-355-Leu(CTG)	-	Met(ATG)-197-Thr(ACG)
ABJ208	10.007	1.195	26.099	-	-	-	Met(ATG)-174-Thr(ACG), Met(ATG)-197-Thr(ACG)

Note; - : no mutations change

* : no PCR product for sequencing

วิจารณ์ผลความก้าวหน้าของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เริ่มต้นด้วยการยืนยันสปีชีส์ *baumanii* ด้วยเทคนิค ARDRA เป็นวิธีที่นำ genotype ของเชื้อมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ ทั้งนี้เพราะการตรวจจำแนกเชื้อในระดับ genospecies โดยใช้เทคนิคที่ขึ้นกับ phenotypes (phenotypic technique) เช่น การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เป็นต้น ไม่สามารถจำแนกเชื้อได้อย่างสมบูรณ์แบบ การใช้คุณสมบัติทางพันธุกรรมของเชื้อจะสามารถยืนยันสปีชีส์ได้แม่นยำกว่า [14] โดยทั่วไปเทคนิคสำหรับการจำแนกเชื้อในระดับ genospecies ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางคือ *recA*-RFLP ซึ่งอาศัยการเพิ่มจำนวนของยีน *recA* และตัดด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease ทั้งวิธี ARDRA และ *recA*-RFLP ต้องมีการเพิ่มจำนวน DNA และตัดด้วยเอนไซม์จึงใช้เวลาเท่ากัน แต่วิธี *recA*-RFLP จะให้ DNA fragments ที่มีขนาดเล็กกว่าจึงต้องอาศัยการแยกชิ้นส่วน DNA บน polyacrylamide gel และแปลผลได้ยากกว่า [14] ดังนั้นจึงเลือกใช้เทคนิค ARDR ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อได้ดี รวดเร็ว ง่ายและปลอดภัยกว่า ซึ่งพบว่าเชื้อที่เป็น *A. baumannii* มีจำนวน 100 isolates

ผลการวิจัยพบว่า *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน โดยมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบแต่ละชนิดสูงกว่า 85% ซึ่งสาเหตุที่สำคัญมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางในโรงพยาบาล

จากการตอบสนองต่อ reserpine และ CCCP ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของระบบ efflux systems ต่างๆที่ใช้ ATP และ pmf และเฉพาะ pmf เป็นแหล่งพลังงานเท่านั้นตามลำดับ พบว่า reserpine ทำให้อัตราการดื้อยาจำนวน 9 ชนิดลดลง ในขณะที่ CCCP ทำให้อัตราการดื้อยาจำนวน 13 ชนิดลดลง แสดงว่าระบบ active efflux systems เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อสารเหล่านี้และส่งผลให้เป็นการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน ส่วนการใช้ reserpine ไม่ส่งผลให้อัตราการดื้อยาต่อ carbenicillin, chloramphenicol, erythromycin, spectinomycin, streptomycin และ trimetoprim เปลี่ยนแปลงแสดงว่า ระบบ efflux systems ที่ใช้ ATP ไม่ได้มีบทบาทต่อการดื้อยาเหล่านี้ ส่วน CCCP ไม่ทำให้อัตราการดื้อยาต่อ spectinomycin และ trimetoprim ลดลง ในขณะเดียวกันทำให้อัตราการดื้อยา carbenicillin, chloramphenicol, erythromycin และ streptomycin ลดลงเพียง 1-2 % แสดงว่าระบบที่ใช้ pmf ไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาชนิดดังกล่าว สามารถอธิบายได้ว่าการดื้อยาเหล่านี้เกิดจากการทำงานของกลไกอื่นนอกเหนือไปจากระบบ multidrug efflux ที่ต้องใช้ ATP และ pmf โดยทั่วไปการดื้อยาแต่ละชนิดอาจเกิดจากการทำงานของกลไกการดื้อยาหลายระบบ การดื้อต่อ carbenicillin ซึ่งเป็น β -lactams เกิดได้จากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ β -lactamase การดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides มักเกิดจากการปรากฏของยีนควบคุมการสร้าง aminoglycoside-modifying enzyme ที่อยู่บน plasmid เช่น เอนไซม์ aminoglycoside-adenylylation ที่ทำลาย spectinomycin และ streptomycin ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาทั้ง 2 ส่วน นอกจากนี้ การดื้อยา erythromycin มักเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน 23S-rRNA และการดื้อยา trimetoprim มักเกิดจากการที่แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ dihydrofolate reductase เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงสามารถอธิบายกลไกการดื้อยาทั้ง 2 ชนิดในเชื้อที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้

ผลการศึกษพบว่าตรวจพบการแสดงออกของระบบ multidrug efflux pumps ทั้ง 3 ระบบ คือ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK พบการแสดงออกของระบบ AdeIJK สูงสุด (97%) ซึ่งสอดคล้องกับการที่ระบบนี้มีการแสดงออกที่ระดับต่ำตลอดเวลา (constitutive expression) และมีผลทำให้เชื้อดื้อยาแบบ low resistance ต่อยาปฏิชีวนะที่เป็น substrate ของระบบด้วย ส่วนระบบ AdeABC จากการศึกษาที่ผ่านมาพบได้ประมาณ 80% ของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า 84% ของเชื้อมีการแสดงออกของระบบนี้ [15] ทั้ง AdeABC และ AdeIJK มีส่วนสำคัญต่อการดื้อยาแบบ intrinsic resistance ของเชื้อ *A. baumannii*

ระบบ AdeFGH เป็นระบบใหม่ที่เพิ่งค้นพบ [15] โดยปกติจะไม่มีการแสดงออกตลอดเวลาในเชื้อ wide type และการแสดงออกเป็นแบบ acquired อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของระบบนี้ที่ชัดเจน

ส่วนระบบ AdeDE พบใน Acinetobacter genome species อื่นๆ ยังไม่มีรายงานการวิจัยอย่างเป็นทางการของการพบการแสดงออกของระบบนี้ใน *A. baumannii* ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ที่ไม่พบการแสดงออกของระบบนี้ในเชื้อใดๆ เลย อย่างไรก็ตามที่มนักวิจัยของ Dr. Ayush Kumar University of Ontario Institutes of technology, Oshawa, Ontario, Canada กำลังศึกษาระบบ AdeDE และพบการแสดงออกของระบบใน *A. baumannii* (personnel communication) ซึ่งเป็นเหตุผลให้คณะผู้วิจัยทำการตรวจการแสดงออกของระบบเพิ่มเติมขึ้นมา

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา การวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาใน laboratory strains ซึ่งเชื้อที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็น clinical isolates โดยตรวจพบการแสดงออกของระบบพร้อมกันถึง 3 ระบบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการมีโอกาสดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้นจะเพิ่มโอกาสของการแสดงออกของระบบด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้อง knock out ชุดยีนระบบ *adeIJK* ในเชื้อแต่ละตัวก่อนที่จะศึกษาส่วนร่วมของระบบ *adeABC* ด้วยเทคนิคเดียวกัน เนื่องจากระบบ *adeIJK* มีการแสดงออกตลอดเวลาและอาจส่งผลกระทบต่อส่วนร่วมของระบบ *adeIJK* แต่อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถ knockout ชุดยีนระบบ *adeIJK* ได้ เพราะไม่สามารถนำ recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์ด้วยเทคนิค conjugation ซึ่งปัญหานี้มักเกิดขึ้นในกรณีที่ recombinant plasmid มีขนาดใหญ่และเกิดได้จากความไม่เข้ากันของเชื้อตัวให้และตัวรับ สามารถแก้ไขได้โดยการนำ recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์ด้วยการทำ electroporation ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาทบาทของระบบ *adeABC* ด้วยการวัดระดับการแสดงออกของระบบและเปรียบเทียบกับค่า MICs ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดแทน โดยเชื้อส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบมีระดับการแสดงออกของระบบ AdeABC ต่ำและต่ำกว่าเชื้ออ้างอิง พบว่าส่วนร่วมของระบบ *adeABC* ไม่แน่นอน เชื้อที่มีการแสดงออกของ AdeABC ในระดับสูง (ABJ208) มีค่า MICs ต่อ amikacin ต่ำกว่าเชื้อที่มีการแสดงออกของระบบ AdeABC ในระดับต่ำกว่า (ABJ110 และ ABJ202) เชื้อที่มีระดับการแสดงออกของระบบนี้ใกล้เคียงกันมีค่า MICs ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ที่ทดสอบแตกต่างกัน แสดงว่าระดับการแสดงออกของระบบ AdeABC ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อและยังมีกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาที่ทดสอบแต่ไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งผลที่ได้

จากการศึกษาการแสดงออกของระบบ AdeFGH และ AdeIJK คล้ายคลึงกับผลที่ได้จากการศึกษาระบบ AdeABC เช่นกัน

ส่วนการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานของ regulatory gene พบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ในยีน *adeR* และ/หรือ *adeS* มีระดับการแสดงออกของระบบ AdeABC ต่ำกว่าเชื้อที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์ทั้งในยีน *adeR* และ *adeS* (ABJ208) ผลการวิจัยนี้ยืนยันการทำงานของ ยีน *adeR* และ *adeS* แบบ two component system ในการควบคุมการทำงานของระบบ AdeABC ส่วนการแสดงออกของระบบ AdeFGH และ AdeIJK ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของยีน *adeL* และ *adeN* ตามลำดับ ซึ่งยีนทั้ง 2 เป็นตัวควบคุมลบ พบว่าการกลายพันธุ์ในยีนควบคุมไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของระบบเสมอไป เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ในยีน *adeL* ได้แก่ ABJ111 และ ABJ121 มีระดับการแสดงออกของระบบ AdeFGH ต่ำ เชื้อที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์ในยีน *adeL* ได้แก่ ABJ111 และ ABJ178 มีระดับการแสดงออกของระบบ AdeFGH สูง ในขณะที่เชื้อบางตัวที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์ในยีน *adeL* ได้แก่ ABJ068 ABJ203 และ ABJ208 มีระดับการแสดงออกของระบบ AdeFGH ต่ำมาก ในทำนองเดียวกัน เชื้อบางตัวที่มีการกลายพันธุ์ในยีน *adeN* ได้แก่ ABJ068 ABJ099 และ ABJ111 มีระดับการแสดงออกของระบบ AdeIJK ต่ำ ในทางตรงกันข้าม เชื้อบางตัวที่มีการกลายพันธุ์ในยีน *adeN* ได้แก่ ABJ162 และ ABJ208 มีระดับการแสดงออกของระบบ AdeIJK สูง ความไม่สัมพันธ์นี้แสดงให้เห็นว่า ยังมียีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของ ระบบ AdeFGH และ AdeIJK และการควบคุมการแสดงออกของระบบทั้ง 2 มีความซับซ้อน

ข้อสรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินการไปตามแผนการที่วางไว้ โดยมีการปรับเปลี่ยนเทคนิคที่ใช้ในและได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมจากที่เสนอไว้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนยิ่งขึ้น จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า

1. มีการแพร่กระจายของ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล
2. กลไกการดื้อยาที่ใช้ ATP และ/หรือ pmf เป็นแหล่งพลังงานมีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาใน *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วย
3. *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลมีการแสดงออกของระบบ multidrug efflux systems หลายระบบพร้อมกัน บ่งบอกถึงการได้สัมผัส selective pressure ที่หลากหลาย ที่สำคัญคือ ยาปฏิชีวนะ
4. ระดับการแสดงออกของระบบ AdeABC, AdeFGH และ AdeIJK ไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดและระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะ
5. การแสดงออกและการควบคุมการทำงานของระบบ multidrug efflux systems ใน *A. baumannii* มีความซับซ้อนและควรมีการศึกษาในแนวลึกต่อไป

ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างสมเหตุสมผล ต้องมีการส่งเสริมและเพิ่มพูนความรู้ให้กับบุคลากรที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้มีความเข้าใจถึงปัญหาเชื้อดื้อยา รวมทั้งสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อดื้อยาในแนวลึกอย่างต่อเนื่องและจริงจัง เพื่อให้ทราบถึงที่มาที่แท้จริงของปัญหาและสามารถวางแผนหรือกำหนดแนวทางแก้ปัญหาเหล่านี้ได้อย่างถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการต่อยอดการวิจัย ซึ่งหัวข้อที่ควรศึกษาเพิ่มเติม ได้แก่

1. ศึกษาความสัมพันธ์ด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสภาวะแวดล้อมในโรงพยาบาล
2. ศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆ เพื่อเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีและความรู้ของประเทศ รวมทั้งนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อพัฒนาหรือผลิตยาชนิดใหม่

ประโยชน์ในการนำไปใช้

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาระบบ multidrug efflux pumps ใน *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วย เชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วยในโรงพยาบาล โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. ข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อสามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลระดับวิทยาและการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศไทย โดยเฉพาะเชื้อที่ก่อโรคในโรงพยาบาล
2. นำข้อมูลการดื้อยาในระดับโมเลกุลมาใช้ประกอบการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยาและเป็นแนวทางในการจัดการความเสี่ยง รวมถึงกำหนดนโยบายควบคุมการใช้ยาต้านจุลชีพในคนต่อไป
3. นำข้อมูลการดื้อยาในระดับโมเลกุลมาใช้ประกอบการจัดทำแนวทางการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างสมเหตุสมผล
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยอื่น ๆ และการพัฒนาทางเลือกอื่น ๆ ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ ได้แก่
 - 5.1 ศึกษากลไกการดื้อยาอื่น ๆ ในเชื้อที่ไม่มีการแสดงออกของระบบที่ทดสอบ
 - 5.2 ศึกษาความสัมพันธ์ด้านระดับระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วย รวมทั้งครอบคลุมเชื้อที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ในโรงพยาบาล เพื่อหาที่มาของเชื้อที่ระดับในโรงพยาบาลและที่เป็นสาเหตุสำคัญของ nosocomial infections
 - 5.3 ศึกษาเพื่อพัฒนาทางเลือกใหม่หรือยาชนิดใหม่สำหรับการรักษา เช่น efflux pump inhibitor สารสกัดจากสมุนไพร เป็นต้น
4. ในการเผยแพร่ความรู้ให้กับนักวิทยาศาสตร์ นักวิชาการ เจ้าหน้าที่สาธารณสุข แพทย์ เภสัชกร รวมถึงประชาชนทั่วไป เพื่อให้เห็นความสำคัญของการใช้ยาอย่างถูกต้องและสมเหตุสมผล

เอกสารอ้างอิง

1. Tassios, P.T., et al., *Multiresistant Pseudomonas aeruginosa serogroup O:11 outbreak in an intensive care unit*. Clin. Microbiol. Infect., 1997. 3(6): p. 621-628.
2. Elston, J.W., et al., *Acinetobacter spp. in gunshot injuries*. Emerg. Infect. Dis., 2008. 14(1): p. 178-80.
3. Stuart, T.L., et al., *Acinetobacter baumannii in casualties returning from Afghanistan*. Can. J. Infect. Control, 2007. 22(3): p. 152-4.
4. Tien, H.C., et al., *Multi-drug resistant Acinetobacter infections in critically injured Canadian forces soldiers*. BMC Infect. Dis., 2007. 7: p. 95.
5. Magnet, S., P. Courvalin, and T. Lambert, *Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454*. Antimicrob. Agents Chemother., 2001. 45(12): p. 3375-80.
6. Damier-Piolle, L., et al., *AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother., 2008. 52(2): p. 557-62.
7. Coyne, S., et al., *Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother., 2010. 54(10): p. 4389-93.
8. Chusri, S., et al., *Enhancing antibiotic activity: a strategy to control Acinetobacter infections*. J. Antimicrob. Chemother., 2009. 64(6): p. 1203-11.
9. Kwa, A.L., et al., *Nebulized colistin in the treatment of pneumonia due to multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Infect. Dis., 2005. 41(5): p. 754-7.
10. Levin, A.S., et al., *Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii*. Clin. Infect. Dis., 1999. 28(5): p. 1008-11.
11. Poole, K., *Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria*. Antimicrob. Agents Chemother., 2000. 44: p. 2233-2241.
12. Poole, K., *Efflux-mediated antimicrobial resistance*. J. Antimicrob. Chemother., 2005. 56(1): p. 20-51.
13. Lomovskaya, O., et al., *Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy*. Antimicrob. Agents Chemother., 2001. 45: p. 105-116.
14. Jawad, A., et al., *Comparison of ARDRA and recA-RFLP analysis for genomic species identification of Acinetobacter spp.* FEMS Microbiol. Lett., 1998. 165(2): p. 357-62.
15. Cortez-Cordova, J. and A. Kumar, *Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide against the AdeFGH pump of Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents. 37(5): p. 420-4.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Muller Hinton Agar (MHA) (Difco™, MD, USA)

- Beef Extract Powder	2.0	g
- Acid Digest of Casien	17.5	g
- Starch	1.5	g
- Agar	17.0	g

2. Luria-Bertani Agar (LB) (Difco™, MD, USA)

- Trptone	10.0	g
- Yeast Extract	5.0	g
- Sodium chloride	5.0	g
- Agar	15.0	g

ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอื่นๆ

1. 50X TAE (Tris-Acetate buffer) ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Tris	242.0	g
- Acetic acid	57.1	g
- 0.5M EDTA pH 8.0	100.0	ml

2. 0.5 M EDTA, pH 8.0 ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Disodium ethylene diamine tetraacetate. 2H ₂ O	186.1	g
- Distilled deionized water	800.0	ml
- Adjust pH to 8.0		

3. 1 M Tris HCl, pH 8.0 ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Tris (ultrapure)	121.1	g
- Distilled deionized water	800.0	ml
- Adjust pH to 8.0 by adding conc. HCL	42.0	ml

4. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

Antibiotics	Solvents	Concentrations range ($\mu\text{g/ml}$)
Carbenicillin	Water	8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048
Piperacillin	Water	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
Ceftaxidime	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Aztreonam	Saturated sodium bicarbonate	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Amikacin	Water	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
Gentamicin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Kanamycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Neomycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Streptomycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Spectinomycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Ciprofloxacin	0.1N NaOH	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Tetracycline	70% ethanol	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Erythromycin	Water	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256
Chloramphenicol	95% ethanol	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
Trimethiprim	dimethylacetamide	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256

5. Vogel-Bonner Minimum medium (VBMM, pH7.0) ประกอบด้วย

$\text{Na}_3\text{Citrate}$	10 mM
Citric acid	10mM
K_2HPO_4	57mM
NaNH_4PO_4	17 mM
MgSO_4	1 mM
CaCl_2	0.1 mM

Outputs ที่ได้จากผลงานวิจัยครั้งนี้

Sirawit Pagdepanichkit, Chanwit Tribuddharat and Rungtip Chuanchuen. Role of the AdeABC, AdeFGH and AdeIJK multidrug efflux pumps in antimicrobial resistance in the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Microbiology and Immunology (Submitted)