ผลกระทบของสารสกัดจากหม่อนต่อการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ

นางสาวพิทยา ใหม่ตา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชา
เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

EFFECT OF MULBERRY EXTRACTS ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION FROM CLINCAL SPECIMENS

Miss Pittaya Maita

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology
Department of Transfusion Medicine and Clincal Microbiology
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของสารสกัดจากหม่อนต่อการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ
โดย	นางสาวพิทยา ใหม่ตา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

.....กรรมการ

(ดร.รัชนีพร ติยะวิสุทธิ์ศรี)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา	เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา	2556	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department:	Transfusion Medicine and Clincal Microbiology	Student's Signature	.....
		Advisor's Signature	.....
Field of Study:	Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology		
Academic Year:	2013		

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ได้นั้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ.ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง ที่ได้สละเวลา ให้ความกรุณา ให้ข้อเสนอแนะ แนวคิด ให้คำปรึกษาในทุก ๆ ด้าน และให้กำลังใจในการศึกษา ตลอดจนการเอาใจใส่ในการดำเนินการ จนปริญญานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์ และ อาจารย์ ดร.รัชนีพร ติยะวิสุทธิ์ศรี ที่กรุณารับเป็นกรรมการภายนอกและภายในมหาวิทยาลัยในการสอบวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สมศักดิ์ ราหุล และโรงพยาบาลราชวิถี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.สุมิตรา บุญบำรุง และสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดใบหม่อนที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณามอบ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คุณนันทนัช เมืองโคตร และคุณสกนธ์รัตน์ เมืองโคตร พร้อมกันนี้ขอขอบคุณบุคคลากร และเจ้าหน้าที่ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่างๆเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกๆคนในครอบครัว ที่คอยรับฟังปัญหา ให้คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจตลอดเวลา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
รายการอ้างอิง 83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 106

บทที่ **หน้า**

บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 7
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 7
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 8
2.1 *Pseudomonas aeruginosa* 8
2.2 ปัจจัยความรุนแรงการก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa* 9
2.3 การก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa* 12
2.4 การรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* 14
2.5 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. aeruginosa* 17
2.6 ไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* 22
2.7 กระบวนการพัฒนาของไบโอฟิล์ม 24
2.8 การรักษาโรคติดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม 30
2.9 หม่อน (Mulberry) 34

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 36
3.1เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2 วิธีการวิจัย..... 40
3.2.1 ศึกษาแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility test) ของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion..... 40
3.2.2 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa*..... 41
3.2.3 ทดสอบผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มจากสารสกัดบหม่อนด้วยตัวทำละลาย อีเทอร์..... 42
3.2.3.1 ทดสอบผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มด้วยการย้อมสี 0.1% crystal violet CV)..... 43
3.2.3.2 ทดสอบลกระทบต่อการเจริญโดย 0.005% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)..... 43
3.2.3.3 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อเชิงปริมาณ (Quantitative) ด้วยวิธี Spread plate..... 44
3.2.4 ศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับจีโนไทป์..... 45
3.2.4.1 สกัด Chomosomal DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* นำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ(template)..... 45
3.2.4.2 ตรวจสอบหายีน Pellicle(*PelA*), Pseudomonas Quinolone signal (*PqsA*) และ Polysaccharide synthesis licus (*PslA, PslD, PslH*) ในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยใช้ ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส Polymerase chain reaction : PCR..... 46
3.2.4.3 ตรวจสอบผลผลิตลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis..... 47
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 48
4.1 ศึกษาแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility test) ของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion..... 48
4.2 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa*..... .51
4.3 ทดสอบผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มจากสารสกัดใบหม่อนด้วยตัว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทำละลายอีเทอร์..... 55
4.3.1 ผลกระทบของสารสกัดต่อการสร้างไบโอฟิล์มด้วยการย้อมสี 0.1% crystal violet (CV)..... 55
4.3.2 ผลกระทบของสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ต่อการเจริญโดยตรวจสอบจาก 0.005% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)..... 56
4.3.3 ผลเปรียบเทียบจำนวนเชื้อเชิงปริมาณ (Quantitative) ด้วยวิธี Spread plate..... 57
4.4 ศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับจีโนไทป์..... 60
4.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *P. aeruginosa*..... 67

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 73
5.1 สรุปผลการวิจัย 73
5.2 อภิปรายผล 76
5.3 ข้อเสนอแนะ..... 82

ภาคผนวก..... 103

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa*..... 46

4.1 แสดงจำนวนของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ทั้งหมด จำนวน 136 สายพันธุ์ โดยจำแนกเป็นกลุ่มเชื้อที่สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm former, biofilm non-former) ตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD*, *pslH*..... 65

4.2 แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ทั้งหมด จำนวน 136 สายพันธุ์ โดยจำแนกเป็นกลุ่มเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์ม 108 สายพันธุ์ ดังนี้ ระดับต่ำ (weak) 13 สายพันธุ์, ปานกลาง (moderate) 15 สายพันธุ์ และ สูง (strong) 80 สายพันธุ์ ตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD*, *pslH* และ *pqsA*..... 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 แผนภาพแสดงขั้นตอน quorum sensing และกลไกของ IFN-γ จาก การกระตุ้นของ autoinducer 3O–C_{12}–HSL ที่ถูกสังเคราะห์โดย *las* regulon และถูกนำส่งออกนอก cellular membrane โดยผ่าน MexAB–OprM ด้วยกลไก efflux pump..... 23

2.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนในกระบวนการพัฒนาไบโอฟิล์มของเชื้อ *P.* aeruginosa..... 24

2.3 การพัฒนาโครงสร้างของไบโอฟิล์มในเชื้อ *P. aeruginosa* แสดงส่วนประกอบที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนต่างๆของการสร้างไบโอฟิล์ม..... 29

3.1 แสดงลักษณะของ 96 microwell plate (prong)..... 43

4.1 แสดงปริมาณร้อยละของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่รวบรวมได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม-เดือนเมษายน ปีพุทธศักราช 2552 จำนวน 136 สายพันธุ์ โดยจำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ..... 48

4.2 กราฟแสดงแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 11 ชนิด..... 50

4.3 แสดงจำนวนร้อยละของ *P. aeruginosa* ตามคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์ม โดยพิจารณาจากค่า SBF Index บ่งชี้ปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* เป็น 4 ระดับ negative (SBF index < 0.35), weak (SBF index ในช่วง 0.35 ถึง 0.7), moderate (SBF index ในช่วง 0.7 ถึง 1.1), และ strong (SBF index > 1.1)..... 52

4.4 กราฟแสดงร้อยละของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ11 ชนิด amikacin (AK), gentamicin (GN), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), levofloxacin (LEV), ciprofloxacin (CIP), cefoperazone/

sulbactam (SCF) และ piperacillin/tazobactam (TZP) โดยจำแนกเป็นกลุ่มที่สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm former, biofilm non-former)..... 53

4.5 แสดงสัดส่วนร้อยละของเชื้อ multidrug resistant *P. aeruginosa* (MDR *P. aeruginosa*) ที่โดยจำแนกเป็นกลุ่มที่สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm former, biofilm non-former)..... 54

4.6 แสดงค่า OD_{620nm} บ่งชี้ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 24 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm, non-biofilm) ทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง) 56

4.7 แสดงค่า OD_{650nm} บ่งชี้การเจริญโดยมี 0.0 05% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) เป็นตัวชี้วัดค่า metabolic activity ของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 24 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm, non-biofilm) ทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง)... 57

4.8 แสดงจำนวนของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 24 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm, non-biofilm) ทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง)..... 58

4.9 แสดงจำนวนของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 18 สายพันธุ์ โดยแบ่งตามระดับการสร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำ (weak), ปานกลาง (moderate) และสูง (strong) เมื่อทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง) 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.10 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pelA-F และ pelA-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa pelA* No.50283 และ No. 50274 เป็นเชื้อควบคุม..... 61

4.11 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pslA-F และ pslA-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa pslA* No.20276 และ No. 50185 เป็นเชื้อควบคุม..... 61

4.12 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pslD-F และ pslD-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa pslD* No.50129 และ No. 50167 เป็นเชื้อควบคุม..... 62

4.13 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pslH-F และ pslH-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa pslH* No.20453 และ No. 50225 เป็นเชื้อควบคุม..... 62

4.14 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pqsA-F และ pqsA-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa pqsA* No.50399 และ No. 60503 เป็นเชื้อควบคุม..... 63

4.15 แสดงร้อยละของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ โดยตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD*, *pslH* และ *pqsA*... 63

4.16 แสดงร้อยละของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (biofilm former) โดยจำแนกตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD*, *pslH* และ *pqsA* 64

4.17 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.50274 และ No.50283 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pelA* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304)..... 67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.18 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.20276 และ No.50185 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pslA* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304)..... 68

4.19 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.50129 และ No.50167 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pslD* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304) 69

4.20 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.20453 และ No.50225 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pslD* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304) 70

4.21 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.50399 และ No.60503 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pqsA* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304) 71

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยเป็นอย่างมาก สาเหตุเนื่องจากอัตราการติดเชื้อในผู้ป่วยที่สูงขึ้น การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคและการรักษาไม่ถูกต้อง ทำให้เกิดการระบาดของแบคทีเรียดื้อยารวมถึงโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลเพิ่มมากขึ้นจากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center , Thailand) (1) ในปีพ.ศ. 2553 รายงานเชื้อ *แบคทีเรียแกรมลบ*ก่อโรคที่สำคัญทางสาธารณสุข ในสิ่งส่งตรวจดังนี้ คือ เลือด เสมหะ อุจจาระและปัสสาวะ จาก 46 โรงพยาบาลในประเทศไทย ที่พบได้มากที่สุด คือ *Escherichai coli* ร้อยละ 30.24 (42,667 สายพันธุ์), *Klebsiella pneumonia* ร้อยละ19.68 (27,770 สายพันธุ์), *Acinetobacter* ร้อยละ 15.11 (21,324 สายพันธุ์) และ *Pseudomonas aeruginosa* ร้อยละ 14.73 (20,786 สายพันธุ์) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุโรคติดเชื้อนั้นมีปริมาณสูงมาก เชื้อก่อโรคเหล่านี้เป็นเชื้อที่อยู่ในโรงพยาบาล จึงมักมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในอัตราสูง เนื่องจากเป็นเชื้อที่เคยสัมผัสกับยาต้านจุลชีพมาก่อน ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสซึ่งจะเกิดกับผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติ เกิดอาการรุนแรงกับคนไข้ที่สวนท่อปัสสาวะและคนไข้ที่มีบาดแผลไฟไหม้ แผลอักเสบ ดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลจึงได้ผลน้อยกว่าโรคติดเชื้อนอกโรงพยาบาล และส่วนใหญ่ต้องใช้ยาต้านจุลชีพที่มีราคาแพงและมีฤทธิ์ข้างเคียงสูง คาดได้ว่าผู้ป่วยที่อ่อนแอจะมีมากขึ้น มีโอกาสรับเชื้อและติดเชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่รักษาให้หายได้ยากอยู่แล้ว มีรายงานการศึกษาจาก Koomanachai และคณะ ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อจาก Multidrug resistance (MDR) *P. aeruginosa* หรือจากเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ตั้งแต่เดือน มกราคม 2548 ถึงเดือนเมษายน 2549 ให้การรักษาด้วยการให้ยา Colistin (colistimethate sodium) ปริมาณ 5 mg/kg/day ในผู้ป่วย 93 คน พบว่า มีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อจาก MDR *P. aeruginosa* หรือ *A. baumannii* ได้ (2) มีรายงานการศึกษาจาก Cirioni และคณะ ถึงคุณสมบัติยา Colistin ว่ายังสามารถรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในการรักษาคือยา Colistin ไม่ถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อตามระบบจึงต้องใช้ยาฉีด Colistin จะสะสมที่ตับ ไต หัวใจ กล้ามเนื้อ และปอดได้ แต่ยาไม่ผ่านเยื่อหุ้มสมองที่ไม่อักเสบในปริมาณมากพอที่รักษาโรคติดเชื้อที่ระบบประสาทได้ (3) ปัจจุบันมียาต้านจุลชีพกลุ่มอื่นๆที่มีประสิทธิผลมากขึ้นและปลอดภัยมากขึ้น ความนิยมใช้ยา Colistin จึงลดลงมาก

ในประเทศไทยมีการใช้ยาต้านจุลชีพมาก อัตราการดื้อยาจึงอยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบ

กับประเทศที่มีการควบคุมการใช้ยาที่เข้มงวด นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการ ดื้อยาของเชื้อโรคอีกด้วย มีรายงานการศึกษาจาก Kiddee และคณะ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 50 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือ ประเทศไทย ตรวจสอบด้วยวิธี antimicrobial susceptibility พบว่าเชื้อทั้งหมดเป็นแบบ multiresistant แต่เมื่อตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาพบเชื้อ *P. aeruginosa* มีการดื้อยาแบบ extensively drug-resistant *P. aeruginosa* (XDR-PA) ที่ 2 % และพบเชื้อที่มี ยีน class 1 integrons ที่ 82 % โดยเชื้อเหล่านี้ดื้อต่อยา aminoglycosides (4) และมีรายงานที่สนับสนุนจาก Fraimow และ Tsigrelis พบว่าการถ่ายทอดยีนการดื้อยาในเชื้อ *P. aeruginosa* (5) เมื่อกล่าวถึงการดื้อยาของเชื้อนั้นมีผู้ศึกษามากมายที่แสดงถึงความสามารถในการส่งผ่านคุณสมบัติการดื้อยาของเชื้อดื้อยาเหล่านี้ผ่านทางการถ่ายทอดรหัสพันธุกรรม ไปสู่เชื้อสายพันธุ์เดียวกัน และข้ามสายพันธุ์ได้เช่นกัน ทำให้ปัญหาการดื้อยาทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น (6, 7) มีรายงานการศึกษาจาก Gomez และPrince พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งจัดเป็นเชื้อจุลชีพฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) ที่เป็นสาเหตุก่อโรคติดเชื้อหลายระบบในร่างกาย เช่น โรคปอดบวม ติดเชื้อในกระแสเลือด พบการดื้อยาได้ถึงร้อยละ 20-40 (8) นอกจากนี้การใช้ยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะขนานที่มีฤทธิ์กว้างอย่างแพร่หลายจะทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยามากขึ้นถ้าไม่ควบคุมการใช้ยาเหล่านี้ให้ดี เชื้อดื้อยาจะเป็นปัญหาใหญ่ของการติดเชื้อในผู้ป่วยในอนาคต

ถ้าพิจารณาปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลแล้ว คาดได้ว่าผู้ป่วยที่อ่อนแอจะมีมากขึ้น มีโอกาสรับเชื้อและติดเชื้อสูงขึ้น การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบในสถานพยาบาลโดยมากมักเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistance) สาเหตุของการดื้อยาต้านจุลชีพนั้นมีกลไกต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้องโดยพบว่ามีการถ่ายทอดยีน หรือชะลอการดูดซึมยาเข้าในตัวเชื้อเอง และอีกหนึ่งปัญหาที่พบและมีความสำคัญมาก อันเนื่องมาจากแบคทีเรียนั้นสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายขนานนั้น จึงส่งผลให้เชื้อนี้เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญมาก เนื่องมาจาก ไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถดื้อต่อยาที่ใช้รักษาได้หลายชนิดโดยพบว่ายาปฏิชีวนะไม่สามารถที่จะแทรกหรือซึมผ่านชั้นของไบโอฟิล์มได้ เมื่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษานั้นไม่สามารถเข้าถึงเชื้อแบคทีเรียได้จึงทำให้เชื้อดื้อต่อยาที่ใช้รักษา ก่อให้เกิดการติดเชื้อซ้ำและโรคติดเชื้อเรื้อรัง ทำให้ยากแก่การรักษา สาเหตุที่พบบ่อยของการติดเชื้อถาวรเกิดเนื่องจาก เชื้อแบคทีเรียที่รวมตัวกันอยู่ภายในโครงสร้างพอลิเมอริกซ์ของเซลล์แบคทีเรียที่เชื้อผลิตเองหรือที่แบคทีเรียต่างชนิดสร้างขึ้นอาศัยอยู่บนพื้นผิวใดๆ เมื่อแบคทีเรียที่ล่องลอยไปในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำหรือเปียกชื้น โดยเริ่มต้นในการสร้างอาณานิคมตามพื้นผิวต่างๆของเชื้อแบคทีเรียนั้นพบว่า มีการหลั่งสารที่มีลักษณะข้นหนืดที่สามารถยึดแบคทีเรียให้เกาะติดได้ในวัสดุทุกชนิด เช่น โลหะหรือพลาสติก ในทางการแพทย์แบคทีเรียนั้นจะเกาะติดแน่นบนวัสดุเทียม (ลิ้นหัวใจเทียม) สายสวนต่างๆ และเนื้อเยื่อในมนุษย์หรือสัตว์ เป็นต้น การยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียนั้นเกิดจากการกระตุ้นด้วยพันธะอ่อนๆที่เรียกว่า พันธะ

แวนเดอร์วานส์ โดยพบว่าเมื่อแบคทีเรียที่เกาะบนพื้นผิวอย่างถาวรใช้ flagella, pilli หรือ appendage ยึดเกาะบนพื้นผิว ในกระบวนการนี้เรียกว่า กระบวนการเกาะติด เมื่อ กระบวนการนี้เกิดขึ้นแล้วจะสามารถทำให้แบคทีเรียที่ล่องลอยผ่านมาสามารถมาเกาะติดกับเซลล์ก่อนหน้าได้เร็วยิ่งขึ้น และสะดวกต่อการสร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มเข้าด้วยกัน หากมีแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่สามารถที่จะเกาะติดกับพื้นผิวได้นั้นก็สามารถที่จะยึดเกาะตัวเองโดยตรงกับโครงสร้างไบโอฟิล์มก่อนหน้านี้ได้ ในช่วงเวลาที่ไบโอฟิล์มจะถูกสร้างขึ้นนั้นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายในสามารถสื่อสารกัน แม้ว่ากลไกเหล่านี้จะยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก แต่จากการศึกษานั้นพบว่า แบคทีเรียเซลล์เดียวสามารถที่จะรับรู้ว่ามีแบคทีเรียอื่นๆในบริเวณใกล้เคียง หรือหากแบคทีเรียสามารถรู้สึกว่าถูกล้อมรอบด้วยประชากรที่หนาแน่นขึ้น ก็เป็นแนวโน้มนำไปสู่การก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ โดยแบคทีเรียส่งสารสื่อสัญญาณทางเคมีนี้ไปยังเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน รวมทั้งระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน เชื้อ *P. aeruginosa* ใช้สารสื่อสัญญาณเพียงชนิดเดียวจากสองชนิดในระบบ quorum sensing ในกระบวนการเริ่มต้นการสร้างไบโอฟิล์ม มีรายงานจาก Singh และคณะ ศึกษายีนที่ถูกควบคุมด้วยระบบ quorum sensing พบว่ามียีนที่ถูกควบคุมถึง 39 ยีนด้วยกัน พบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรังนั้นสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้โดยอาศัยสารสื่อสัญญาณจากระบบ quorum sensing โดยเมื่อทำการศึกษาสารสื่อสัญญาณทั้งสองชนิดที่ *P. aeruginosa* หลั่งออกมานั้นพบว่า ชนิดที่หนึ่งสามารถส่งสัญญาณได้นานและอีกชนิดจะส่งสัญญาณสั้นกว่านั้นพบว่าชนิดที่หนึ่งหลั่งมาจากแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวๆ ซึ่งสามารถส่งสัญญาณได้นานกว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรังที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ ในขณะเดียวกันเมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรังนี้ไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เชื้อส่งสัญญาณสั้นลง เป็นไปได้ว่าเชื้อ *P. aeruginosa* นี้สามารถเปลี่ยนสารสื่อสัญญาณไปตามรูปแบบของเชื้อนั้นๆ การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียนั้นเพื่อเป็นการพยายามหลบหลีกระบบอิมมูนของร่างกาย รักษาสมดุลของสภาวะแวดล้อมและปกป้องเชื้อจากสภาวะกดดันต่างๆ เช่น ความดัน อุณหภูมิและสารเคมีต่างที่ไม่เหมาะสม เมื่อไบโอฟิล์มเริ่มพัฒนาโดยมีการรวมกันของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน จนถึงขั้นตอนของการสร้างไบโอฟิล์มและการพัฒนาไบโอฟิล์มอาจมีการเปลี่ยนแปลงในรูปทรงและขนาด การพัฒนาของไบโอฟิล์มนี้จะช่วยให้แบคทีเรียที่อยู่ภายในทนต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาตามมาตรฐาน ในแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันโดยเพาะเลี้ยงให้เชื้อสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม เมื่อนำมาทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพบว่า การทดลองในแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มมีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าได้ถึงพันเท่า การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อนั้นสามารถสร้างได้ในสถานที่ที่มีความหลากหลาย และการติดเชื้อจุลินทรีย์มักจะแสดงอาการออกมาช้าหรือแสดงอาการไม่ชัดเจน แบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วนั้นสามารถเคลื่อนย้ายได้ในหลายวิธีในขณะที่ยังรวมกลุ่มกันอยู่ ช่วยให้แบคทีเรียสามารถติดเชื้อเนื้อเยื่อใหม่ ได้อย่างง่ายดาย โดยพบว่าวิธีการเคลื่อนย้ายแผ่นไบโอฟิล์มนั้นเรียกว่า rippling หรือ rolling กลิ้งไปบนพื้นผิว

บางครั้งใช้วิธีการกระจายเรียกว่า "swarming หรือ seeding" โครงสร้างของไบโอฟิล์มนั้นเปรียบเสมือนกำแพงที่ถูกสร้างมาจากเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ stationary phase ในขณะที่พื้นที่ด้านในของไบโอฟิล์ม มีลักษณะเป็นของเหลวช่วยให้เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ออกมาจากไบโอฟิล์มได้ง่ายขึ้น การวิจัยในระดับโมเลกุลและพื้นฐานทางพันธุกรรมของการพัฒนาไบโอฟิล์มได้ทำการศึกษาจนเป็นที่ชัดเจนว่าเมื่อเซลล์เปลี่ยนรูปแบบจาก planktonic ไปอยู่ในรูปของชุมชนไบโอฟิล์มนั้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงในพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับของยีนจำนวนมาก โดยยีนที่เฉพาะเจาะจงจะต้องถ่ายทอดในช่วงของกระบวนการเกาะติดของการพัฒนาไบโอฟิล์ม ในหลายกรณีการทำงานของยีนเหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ extracellular matrix ที่ช่วยปกป้องเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายใน การรายงานจาก Costerton และคณะ พบว่ายีนที่ช่วยในการพัฒนาไบโอฟิล์มนั้นจะถูกกระตุ้นหลังจากที่เซลล์เกาะแน่นไปกับพื้นผิวของแข็งก่อน จึงปรากฏว่ามียีนเป็นสิ่งที่ช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ extracellular matrix ให้แบคทีเรียสามารถฝังตัวได้ ลักษณะบางอย่างนี้ก็อาจจะอำนวยความสะดวกในความสามารถของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม จากการศึกษาเชื้อ *P. aeguinosa* ที่ถูกสร้างให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้าง pili ของเชื้อนั้นพบว่าเชื้อที่กลายพันธุ์นี้ไม่สามารถที่จะสร้างไบโอฟิล์มได้ เนื่องจากพบว่า pili นี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการเคลื่อนที่ของ เชื้อที่เกี่ยวข้องบนพื้นผิวเรียกว่า twitching การ twitching นี้จำเป็นสำหรับการรวมตัวของเซลล์แบคทีเรีย ที่ต่อมากลายเป็นไบโอฟิล์มในรูปร่างหรือลักษณะที่เรียกว่า microcolonies เมื่อไบโอฟิล์มได้ถูกสร้างขึ้น ก็มักจะมีช่องทางในการให้สารอาหารสามารถหมุนเวียน แบคทีเรียที่ต่างชนิดกันก็จะแสดงให้เห็นรูปแบบที่แตกต่างกันของการแสดงออกของยีน เพราะการพัฒนาโครงสร้างนี้เกิดจากการเผาผลาญอาหารของเชื้อเอง เกิดจากการรวมตัวของเซลล์ที่อยู่ใกล้กันให้ทำงานร่วมกัน เมื่อแบคทีเรียที่อยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมแบคทีเรียจะรวมกลุ่มกันในรูปแบบที่เรียกว่าไบโอฟิล์ม ตามธรรมชาติแล้วโครงสร้างนี้มีความซับซ้อนมากขึ้นและยากที่จะเจาะหรือทำลายได้ การติดเชื้อเรื้อรังนั้นส่วนหนึ่งพบว่าเกิดจาก แบคทีเรียที่ถูกปล่อยออกมาเป็นระยะ ๆ จากไบโอฟิล์ม ซึ่งในแต่ละครั้งเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อเยื่อของร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันก็ดำเนินการตอบสนองต่อเชื้อโดยการดักจับเชื้อเหล่านั้นและเกิดการอักเสบขึ้น ดังนั้นการถูกปลดปล่อยเป็นระยะของเชื้อแบคทีเรียนั้นอาจจะเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังได้สำหรับแบคทีเรียที่จะอยู่รอดภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมดังกล่าวนั้น คือเชื้อแบคทีเรียนั้นต้องอาศัยอยู่ในไบโอฟิล์ม โดยมีหลักฐานแสดงให้เห็นถึงการเจริญของไบโอฟิล์มซึ่งพบว่ามีบทบาทสำคัญทั้งในการปรับตัวและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ไบโอฟิล์มเพิ่มความต้านทานของแบคทีเรียที่จะถูกกำจัดและอาจทำให้สิ่งมีชีวิตนี้สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย จนในที่สุดความรุนแรงนี้อาจทำให้แบคทีเรียสามารถมีช่วงชีวิตที่นานขึ้นในโฮสต์ มีรายงานการศึกษาจาก Moreau-Marquis และคณะ พบว่าการสร้าง biofilm ของเชื้อ มีความสัมพันธ์กับการรักษาที่ไม่ได้ผล

และยังเป็นโครงสร้างที่มีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อซ้ำและโรคติดเชื้อเรื้อรัง ความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียแกรมลบ ยังเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ คือชั้นของลิโปโพลีแซคคาไรด์ หรือชั้นเอนโดทอกซิน ที่จะกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยการสร้างไซโตไคน์ ทำให้เกิดการอักเสบ และเกิดความเป็นพิษได้ (9, 10) จากรายงานการสนับสนุนของ Sharma และคณะ พบว่าการสร้างไบโอฟิล์มอาจช่วยทำให้แบคทีเรียได้รับประโยชน์ในด้านการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อม (11) ดังนั้น ไบโอฟิล์มจึงมีความสำคัญต่อความอยู่รอดของแบคทีเรีย

จากปัญหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน รวมทั้งเกิดการระบาดของเชื้อดื้อยานั้น ดังนั้น การใช้พืชสมุนไพรไทย จึงเป็นกรรมวิธีทางเลือกหนึ่งเพื่อลดอัตราการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษา ค้นคว้า หาสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยในการรักษามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการศึกษาจาก Avato และคณะ พบว่าสารสกัดจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรวมถึงเชื้อรา (12) มีรายงานการศึกษาจาก Borges และคณะ พบว่าสารสำคัญ isothiocyanates นี้มีความสามารถในการยับยั้งระบบ Quorum sensing (QS) และความรุนแรงของโรคในเชื้อ *P. aeruginosa* รวมถึงยับยั้งสารที่ช่วยในการกระบวนการสร้างอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาหาสารสำคัญอื่นๆที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ (13) พืชสมุนไพรในประเทศไทยทำให้ผู้วิจัยสนใจประโยชน์ของพืชตระกูลหม่อน (mulberry : *Morus* spp.) หม่อนเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่าย โตง่าย ดูแลไม่ยาก สามารถเจริญได้ทุกสภาพแวดล้อมและในปัจจุบันกำลังจะเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง นอกจากจะใช้ใบหม่อนในการเลี้ยงไหมแล้ว สรรพคุณตามแพทย์แผนไทย ใช้ใบหม่อน แก้ตาแดง ตาแฉะ ตามัว ตาฟาง ระงับประสาท แก้ไอ แก้เจ็บคอ แพทย์พื้นบ้านในหลายประเทศ เช่น สเปน เปรู ยูโกสลาเวีย และชิลี ใช้ใบหม่อนสำหรับรักษาเบาหวาน โดยจะทำในรูปชาเขียว ชาจีน และชาฝรั่ง หรือรับประทานใบและยอดอ่อนโดยตรงโดยการใส่ในต้มหรือแกงก็ได้ โดยไม่มีรายงานพบอาการข้างเคียงใดๆ สารที่มีประสิทธิภาพสูงในใบหม่อน ได้แก่ flavonoid ซึ่งเป็นสารไฟโตอีสโทรเจน (phytoestrogen) triterpene, ceramide, mulberroside และน้ำมันหอมระเหย ผลหม่อน มีรงควัตถุ (pigment) หลักคือ แอนโทไซยานิน (anthocyanins) สารนี้มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคมะเร็ง (14) นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยจาก Silberberk และคณะ พบว่าในผลหม่อนมีสารเคอร์ซีทิน (quercetin) ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่มีคุณสมบัติลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง และป้องกันการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด (15) และยังพบว่าเมื่อผลหม่อนมีระยะการสุกเพิ่มขึ้น ปริมาณสารออกฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้นจะมีมากเพิ่มขึ้นเช่นกัน สาร anthocyanins เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารให้สีตามธรรมชาติ มีคุณสมบัติแตกต่างกัน

ทั้งทางเภสัชวิทยาและชีววิทยา เช่น เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถลดอาการอักเสบ (antiinflammatory) ก่อนหน้านี้มีรายงานจาก Wang และคณะ ศึกษาถึงผลกระทบของสารสกัดจากผลหม่อน (Berberine) ทดสอบเชื้อ *S. epidermidis* ในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มพบว่าสามารถฆ่าเชื้อและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้ (16) มีรายงานการศึกษาจาก Caillet และคณะ พบว่าน้ำ Cranberry และ Blueberry สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *E. coli* ได้ (17) สอดคล้องกับการศึกษาจาก Nowax และคณะ (18) จากคุณประโยชน์มากมายของสารสกัดต่างๆจาก พืชสมุนไพรในประเทศไทยทำให้ผู้วิจัยสนใจประโยชน์ของพืชตระกูลหม่อน (mulberry : *Morus* spp.) มีการวิจัยจากหลายทีมยืนยันว่าในใบหม่อน มีสารสำคัญ Antioxidant และยังมีฤทธิ์ช่วยต้านการอักเสบได้อีกด้วย (19, 20) มีรายงานการวิจัยจาก Demet และคณะ พบว่า เมื่อทดสอบสารสกัดจากใบหม่อนด้วยวิธี disc-diffusion และ minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อเชื้อ *Enterobacter aerogenes, E. coli, Proteus mirabilis, P. Aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* รวมทั้งหมด 77 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีมาก อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. aerogenes, E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ได้ (21)

ในประเทศไทยใบหม่อนได้รับความนิยมนำมาบริโภคในรูปของชาชงเป็นเวลานาน จากองค์ความรู้ที่ได้ศึกษาก่อนหน้านี้จึงเป็นแนวทางในการค้นคว้า ศึกษาการยับยั้งโรคติดเชื้อดังกล่าวได้การใช้พืชสมุนไพรไทย จึงเป็นกรรมวิธีทางภูมิปัญญาที่ผู้วิจัยสนใจศึกษาการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทย ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อเพื่อลดการเกาะติด และลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ และมิใช่สิ่งเก่าใช้ไม่ได้ หรือพ้นสมัย แต่ยังเป็นนวัตกรรมทางความคิด และอิงธรรมชาติ วิถีคนไทย ที่ยังก้าวต่อไปในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยร่วมกับแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ

2. เพื่อศึกษาสารสกัดใบหม่อนที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งหรือลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบหม่อนที่มีผลกระทบต่อเชื้อ *P. aeruginosa* และการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ในไบโอฟิล์ม

4. เพื่อศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa*

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ผู้วิจัยจะศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. aeruinosa* จะทำการศึกษาในระดับจีโนไทป์ โดยทำการศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ ทั้งนี้จะศึกษาถึงการสร้างและโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruinosa* ที่เก็บได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด ระบบทางเดินปัสสาวะ ทางเดินหายใจส่วนล่าง และการติดเชื้อที่บาดแผลจากโรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพมหานคร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทราบความสัมพันธ์ของความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) และความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ

2.สารสกัดจากใบหม่อนและลูกหม่อน ซึ่งมีคุณสมบัติในทางเภสัชศาสตร์ในหลายขนาน มีผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบอุบัติการณ์การดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ทางผู้วิจัยมุ่งหวังว่าพืชสมุนไพรไทยจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ร่วมในรักษาโรคติดเชื้อ ป้องกัน และช่วยชะลอปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จัดเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาส (opportunitics) พบการติดเชื้อกับผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือผิดปกติ ผู้ที่มีแผลเปื่อยอักเสบ และเกิดอาการรุนแรงในคนไข้ที่มีแผลไฟซึ่งพบว่าคนไข้ในโรงพยาบาลจะมีการติดเชื้อได้ง่ายและรุนแรง หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน จึงเรียกได้ว่าเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากภายในโรงพยาบาล หรือโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) โรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* นี้ สามารถแพร่ภายในโรงพยาบาลโดยผ่านทางบุคลากร อุปกรณ์การแพทย์ ผิวหนัง น้ำยาฆ่าเชื้อ และ/หรือ อาหาร โรคติดเชื้อนี้เป็นนับปัญหาที่รุนแรงสำหรับโรงพยาบาลมาก เนื่องจากผู้ป่วยที่มีอาการอยู่ในขั้นวิกฤติ หรือผู้ป่วยที่จำเป็นต้องใส่อุปกรณ์ทางการแพทย์ และพักฟื้นในโรงพยาบาล มีโอกาสเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ปัจจุบันพบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในอัตราที่สูงมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ส่งผลกระทบโดยตรง และเป็นข้อจำกัดต่อแนวทางการรักษา เชื้อ *P. aeruginosa* จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Pseudomonadaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) แบคทีเรียในวงศ์นี้ถูกค้นพบเมื่อปี คศ. 1975 มีรูปร่างเป็นท่อนและเคลื่อนที่ได้โดยอาศัย flagella ซึ่งอยู่ที่ปลายเซลล์ ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) สำหรับเมแทบอลิซึมในการหายใจ จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญซึ่งทำให้มีปฏิกิริยา catalase-positive และ oxidase-positive แบคทีเรียที่สำคัญในวงศ์ *Pseudomonadaceae* ซึ่งมีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* และ *Burkhoderia* เป็นต้น (22) *P. aeruginosa* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่สามารถ ferment น้ำตาลได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีการก่อโรคที่คล้ายคลึงกัน เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล เรียกว่า nosocomial infection และเมื่อติดเชื้อโรคกลุ่มนี้มักมีปัญหาดื้อต่อยาหลายขนาน (Multidrug resistance; MDR) (23) มีรายงานการศึกษาถึงสถานการณ์การติดเชื้อในโรงพยาบาล และการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของผู้ป่วยโรคมะเร็งที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 365 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่เข้ารับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2550 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2551 พบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลได้

(Fermentation) คือ *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* และ *Stenotrophomonas maltophilia* พบร้อยละ 48.6, 18.9 และ 5.4 ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรีย แกรมลบดื้อต่อยากลุ่ม Cephalosporins มากที่สุด และพบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกกลุ่มมีอัตราการดื้อยากลุ่ม Penicillins สูงที่สุด (24)

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย ดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วย polar flagella และ pili อยู่บริเวณผิวเซลล์ มีขนาด 0.5 - 0.8 × 1.5 - 8.0 ไมโครเมตร มีลักษณะเด่น คือกลิ่นที่พิเศษเฉพาะของเชื้อคล้ายกลิ่นองุ่นจากผลการผลิตสาร 2-aminoacetophenone (25) เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส ลักษณะของโคโลนีจะมันเงาคล้ายโลหะ (metallic sheen) (26) มีการผลิตรงควัตถุที่เรืองแสงอัลตราไวโอเลต ชนิดไพโอซายานิน (pyocyanin) มีสีฟ้าและ ไพโอเวอดิน (pyoverdin) สีเหลือง โดยพบว่าไพโอไซยานินมีคุณสมบัติสามารถสลายเม็ดเลือดแดงแกะได้อย่างสมบูรณ์ (completed hemolysis) (27) และเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวจะจับกันเป็นแผ่นบริเวณผิวหน้าอาหาร (pellicle) ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้ชอบออกซิเจน (strict aerobe) *P. aeruginosa* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล (non-fermented Gram-negative bacteria) ดังนั้นเชื้อจึงใช้น้ำตาลโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) เมื่อแบคทีเรียย่อยน้ำตาลได้จะเกิดกรดเปลี่ยนสี bromthymol blue จากสีเขียวเป็นสีเหลือง เฉพาะบริเวณที่สัมผัสออกซิเจน ซึ่งแตกต่างจากปฏิกิริยาการหมัก (fermentation) ที่จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองทั้งหมด (28)

2.2 ปัจจัยความรุนแรงการก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa*

ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีหลายปัจจัยที่ส่งเสริมทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อมีอาการรุนแรง ได้แก่ ปัจจัยจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ จำนวนของเชื้อโรคที่ได้รับเข้าไป ความรุนแรงของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้น สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น ล้วนมีผลต่อร่างกาย และอาศัยโครงสร้างของตัวเชื้อเอง เช่น pili มีความสามารถในการเกาะติด กับเยื่อบุทางเดินหายใจ บางสายพันธุ์สามารถสร้างเมือกเยิ้ม ห่อหุ้มเซลล์เรียกว่า slime layer ซึ่งจะประกอบไปด้วยพอลิแซกคาไรด์และมี pili อยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ซึ่งเมือกเยิ้มนี้จะช่วยให้จุลชีพเกาะติดกันและติดกับผิวเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันจุลชีพจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจากภายนอก ปัจจัยจากโฮสต์ (host factors) คือ ความต้านทานของผู้ป่วยเอง และ ปัจจัยจากอุปกรณ์ (device factors) ชนิดของพื้นผิวที่เชื้อเข้าไปเกาะติด

เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป มีความทนทานในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ พืช และยังสามารถพบได้บนผิวหนังของคน (29) โดยทั่วไปมีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ ยกเว้นในผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ (30) พบว่าทำให้เกิดโรคหรือเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน สัตว์ แมลง และพืชได้ (31) การก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa* อาศัยโครงสร้างและปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน เช่น สารพิษ (toxin) เอนไซม์ (enzyme) หรือรงควัตถุ (pigment) เชื้อ *P. aeruginosa* สร้างทอกซินที่สำคัญ คือ Exoenzyme S และ Exotoxin A ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน หรือเป็นส่วนประกอบของโปรตีน โดยพบว่า Exoenzyme S เป็นทอกซินที่ขับออกมานอกเซลล์ พบใน *P. aeruginosa* บางสายพันธุ์ สารพิษนี้จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ตรวจพบได้ในผู้ป่วยแผลไฟไหม้ และอาจตรวจพบได้ในกระแสเลือดก่อนที่จะตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย โดย Exoenzyme S มีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ฟาโกไซโทซิสในกระแสเลือด และระบบต่างๆ ภายในร่างกาย ทำให้สูญเสียการทำงานไป มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า Exoenzyme S จำเป็นสำหรับการบุกรุกของเชื้อ *P. aeruginosa* (PAO1) ผ่านเซลล์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (32) และนอกจากนี้ยังพบว่ามี Exotoxin A เป็นทอกซินที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงสูงขึ้น ทอกซินนี้จะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ยูคาริโอต เป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือน diphtheria toxin ถึงแม้ว่า Exotoxin A จะมีบางส่วนที่คล้ายกับ diphtheria toxin แต่ตัวรับหรือ receptor นั้นจะมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน การผลิต Exotoxin A นั้นถูกควบคุมโดย exogenous iron และพบว่า Exotoxin A สามารถปรากฏได้ เมื่อมีการติดเชื้อและโรคติดเชื้อในระบบต่างๆ ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. aeruginosa* ส่งผลให้บริเวณที่มีการติดเชื้อเกิดภาวะเนื้อตาย และนำไปสู่การเพิ่มจำนวน ในสายพันธุ์ toxinogenic ทำให้เกิดความรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคปอดบวมมากกว่าสายพันธุ์ nontoxinogenic ในแง่ของความรุนแรงนั้น Exotoxin A มีบทบาทที่รุนแรงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การตรวจสอบหา Exotoxin A ในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่อยู่ในภาวะโลหิตเป็นพิษนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสการรอดชีวิตของผู้ป่วย การหาความสัมพันธ์กับ titer ของสารต่อต้าน Exotoxin A หรือ แอนติบอดีในซีรั่มต่อ Exotoxin A เนื่องจากสารพิษนี้สามารถทำให้เกิดพิษได้แม้ว่าในขณะนั้นจะไม่พบเชื้อแบคทีเรียแล้วก็ตาม (33)

เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถผลิตรงควัตถุหรือ pigment ที่สามารถละลายน้ำได้ 2 ชนิด คือ pyoverdin (fluorescent pigment) และ pyocyanin (blue pigment) โดยพบว่ามีการหลั่งสารสีมาก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณเหล็ก (iron) ต่ำ และยังพบว่ายีน *pvdE* (pyoverdin) จำเป็นสำหรับการเจาะผ่านของเซลล์แบคทีเรียต่อเยื่อบุผิว (epithelial cells) (32) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า pyoverdin, protease และ phospholipase A มีการทำงานร่วมกับ quorum sensing (QS) และการสร้างไบโอฟิล์ม เป็นที่น่าสนใจ ในสายพันธุ์ที่แยกได้จากการติดเชื้อในสายสวนปัสสาวะแสดงให้เห็นว่า มีการสร้างไบโอฟิล์มที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การเคลื่อนที่ (motility) ลดลง และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของปัจจัยความรุนแรงจากการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะเฉียบพลัน (34)

เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถผลิต adhesins ที่ช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุแตกต่างกันไป เช่น flagella และ pili เหนี่ยวนำทำให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีความสามารถในการยึดเกาะ กับพื้นผิวได้แตกต่างกัน นอกจากนี้กระบวนการยึดเกาะของ เชื้อ *P. aeruginosa* กับพื้นผิวยังเป็นกระบวนการพัฒนาที่ไม่ได้เกิดเพียงขั้นตอนเดียว คือ ในระยะเริ่มต้นนั้น จะเกิดปฏิกิริยาทางเคมีฟิสิกส์ระหว่างเชื้อกับพื้นผิว โดยอาศัยแรงทางฟิสิกส์ที่นำเชื้อไปยังพื้นผิววัสดุ ได้แก่ แรงโน้มถ่วง แรงแวนเดอร์วาลส์ นอกจากนี้ยังมีประจุไฟฟ้าของพื้นผิววัสดุ รวมถึงปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำก็ส่งผลต่อการยึดเกาะ ซึ่งในระยะต่อมาของการยึดเกาะ จะเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างโครงสร้างพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์และพื้นผิวที่เชื้อยึดเกาะ ทำให้การยึดเกาะแน่นขึ้นจากการทำงานของโครงสร้างพื้นผิว pili มีความสำคัญในการจับกับ epithelial cells โดยปกติเชื้อ *P. aeruginosa* สร้างเอนไซม์ neuraminidase เพื่อทำลาย sialic acid ที่ตกค้างที่ pili receptor ด้วยเหตุนี้จึงเหนี่ยวนำให้เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถจับกับ epithelial cells ได้ดีขึ้น (35, 36) โครงสร้างที่สำคัญอีกชนิดได้แก่ polysaccharide capsule ซึ่งประกอบด้วย exopolysaccharide และ alginate หรือ glycocalyx จัดเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเกาะติดกับ epithelial cells และ tracheobronchial mucin ซึ่ง capsule นี้สามารถปกป้องเชื้อจากกระบวนการฟาโกไซโทซีสและยาปฏิชีวนะ เช่น ยาในกลุ่ม aminoglycosides (37)

ปัจจัยการต้านทานใน โฮสต์ หรือ เซลล์เจ้าบ้าน พบว่ามีอิทธิพลต่อการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย กับพื้นผิวอุปกรณ์ ที่สามารถส่งเสริมหรือยับยั้งการคงอยู่ของเชื้อ มีการศึกษาที่สนับสนุนว่าประสิทธิภาพของการทำลายเชื้อของเม็ดเลือดขาวซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อรอบๆ อวัยวะเทียมลดลง ทำให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตได้โดยไม่ถูกทำลาย (38) แม้จะพบว่า IFN-γ ของระบบภูมิคุ้มกัน สามารถยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรียที่เกาะอยู่แล้วบนผิวอุปกรณ์ก็ตาม (39)

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ เกี่ยวกับวิธีการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย บนอุปกรณ์ทางการแพทย์ อาจยังไม่สามารถมั่นใจได้ว่า มีประสิทธิภาพที่ดี เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อในร่างกาย ดังนั้น จึงมีการพยายามปรับเปลี่ยนพื้นผิวของอุปกรณ์ทางการแพทย์ เพื่อป้องกันหรือลดการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า ลักษณะของพื้นผิวอุปกรณ์ที่ไม่เรียบนั้น ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียสามารถยึดเกาะได้ดีกว่าพื้นผิวอุปกรณ์ที่เรียบ (40) เมื่อกล่าวถึงชนิดของวัสดุที่ใช้ผลิตอุปกรณ์ทางการแพทย์ มีรายงานการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับ polyethylene ได้ดีกว่า polyurethane (41, 42) ผลการทดสอบการเกาะติดของเชื้อ *P. aeuginosa* บนสาย catheter ที่ผลิตด้วยวัสดุชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อสามารถเกาะกับวัสดุชนิด Polyvinylchloride (PVC), siliconized latex (SL) ได้มากกว่า polyurethane (PU) (43)

2.3 การก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa*

เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาส ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ ติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ ติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร โรคผิวหนัง ติดเชื้อที่เนื้อเยื่ออ่อน ในผู้ที่ใช้ลิ้นหัวใจเทียม โรคติดเชื้อในกระแสเลือด โดยมากจะเกิดกับผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือด และผู้ที่ติดเชื้อในบริเวณอื่นๆ ของร่างกาย การติดเชื้อในกระแสเลือดจะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อที่กระดูกและข้อต่อ รวมทั้งทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งอาจเกิดจากการที่สมองได้รับบาดเจ็บจากการผ่าตัด หรือจากการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้อย่างรุนแรง ผู้ป่วยโรคมะเร็งและผู้ป่วยโรคเอดส์ การติดเชื้อที่ตา มักเกิดจากการได้รับบาดเจ็บหรือการใส่คอนแทคเลนส์ มีผลในการทำให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อที่ตา อาจทำให้สูญเสียการมองเห็นได้ และเชื้อนี้สามารถติดได้จากการใช้เครื่องมือทางการแพทย์หรือการผ่าตัด เช่น การสอดใส่สายสวนต่างๆ

ในสหรัฐอเมริกา การติดเชื้อในโรงพยาบาลถูกจัดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต ที่มากเป็นอันดับที่ 4 โดยมีอัตราการตายของผู้ป่วย ประมาณ 2 ล้านคนต่อปี ซึ่งทำให้สูญเสียค่าใช้จ่ายทางการแพทย์ มากกว่าห้าพันล้านเหรียญต่อปี (44) ความต้านทานต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยที่รักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาล ด้วยโรคมะเร็ง โรคปอดเรื้อรัง และแผลไฟไหม้ พบว่า มีอัตราการตายถึงร้อยละ 50 ตามที่ The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ได้รายงานอุบัติการณ์โดยรวม ของการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลที่สหรัฐอเมริกา เฉลี่ยพบประมาณร้อยละ 0.4 ในผู้ป่วยที่ใช้สายสวนต่างๆ และ เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด 4 ลำดับแรก คิดเป็นร้อย

ละ 10.1 ของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่จำแนกได้ทั้งหมด (45) ในทางคลินิค ยังไม่มีเกณฑ์ที่ชัดเจนในการบอกว่า โรคติดเชื้อชนิดใดเกิดจาก ไบโอฟิล์ม Parsek และ Singh ได้เสนอเกณฑ์ ที่เป็นจุดของการเริ่มต้นในลักษณะการติดเชื้อที่เกิดจากไบโอฟิล์ม มี 4 ขั้นตอน คือ (1) เชื้อที่ก่อโรคเป็นเชื้อที่ยึดเกาะกับพื้นผิว (2) เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อนั้นโดยตรง พบเชื้ออยู่เป็นกลุ่มเซลล์หรือเป็นลักษณะเมือก ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยด้วยเมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (3) การติดเชื้อมักอยู่เฉพาะที่ แม้ว่าการแพร่กระจายอาจเกิดขึ้นได้แต่ไม่ใช่ลักษณะเด่น (4) การติดเชื้อนั้นยากที่จะกำจัดด้วยยาปฏิชีวนะแม้ว่าเชื้อที่ก่อโรคนั้นจะไวต่อการถูกทำลายด้วยยาในสภาวะ planktonic cells ก็ตาม (46) ที่เห็นได้ชัดมากที่สุดคือ การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยที่ต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ เช่น ผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรัง (cystic fibrosis) (47) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิต polysaccharide ได้อย่างน้อย 3 ชนิด คือ Alginate (Alg), pellicle (Pel) และ polysaccharide synthesis locus (Psl) ซึ่งเชื้อนี้สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์ จากที่ไม่สร้างเมือกไปเป็นรูปแบบที่สร้างเมือกได้ มีรายงานที่พบว่า ในระยะแรกของผู้ป่วยโรค cystic fibrosis จะพบอยู่ในรูปแบบที่ไม่สร้างเมือก แต่ในระยะต่อมาเมื่อการดำเนินโรคมากขึ้น จะพบเชื้อในรูปแบบที่สามารถสร้างเมือกได้ (48) ซึ่งเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงนี้ เป็นผลมาจากการตอบสนองต่อ oxidative stress ของระบบภูมิคุ้มกัน (49) การคงอยู่ของ *P. aeruginosa* ในปอดของผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยต้องกลับไปพบแพทย์เพื่อรับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหลายครั้ง ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลมาจากการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อนั่นเอง (50) การติดเชื้อ *P. aeruginosa* แบบถาวรในผู้ป่วยนั้น พบมีความสัมพันธ์กับเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์ม เพื่อชวยให้เชื้อดำรงชีวิตอยูภายในรางกายไดนาน กอให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง (chronic infection) และไบโอฟิล์มยังทำใหเชื้อทนตอการทำลายดวยยาตานจุลชีพ รวมถึงยากตอการทำลายจากการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เชื้อนี้ยังเปนสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่ผิวหนังโดยเฉพาะกรณีแผลไฟไหม้และมักจะลุกลามไปเปน การติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) ผู้ติดเชื้อมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงขึ้น การติดเชื้อ *P. aeruginosa* นี้เป็นปัญหาที่รุนแรงมากในโรงพยาบาล เนื่องจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* จะซ้ำเติมอาการของโรคที่เป็นอยู่ทำให้ผู้ป่วยมีอาการทรุดลง และโดยมากจะเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จในการรักษา

การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นการติดเชื้อทางคลินิคอย่างแรก ที่ถูกระบุว่า มีสาเหตุมาจากไบโอฟิล์ม และแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่อการอักเสบของโฮสต์ สามารถส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์ม เนื่องจากพบว่ามีปฏิกริยาระหว่างเซลล์ของเชื้อ และโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง

กับการอักเสบ ที่ผลิตจากโฮสต์ ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิวของอุปกรณ์ทางการแพทย์ ในปัจจุบันมีการใช้อุปกรณ์ปลูกฝังหรือท่อสวนชนิดต่างๆ ในผู้ป่วยมากขึ้น เช่น การติดเชื้อที่เยื่อหุ้มหัวใจเป็นตัวอย่างที่แสดง ให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียจากผิวหนังหรือช่องปากที่เข้าสู่กระแสเลือดสามารถตั้งถิ่นฐานบนลิ้นหัวใจที่ผิดปกติหรือลิ้นหัวใจเทียมได้ และมีอัตราการติดเชื้อที่สูงขึ้น ในผู้ป่วยที่มีการใส่อวัยวะเทียมเข้าไปในครั้งที่ 2 (51)

2.4 การรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa*

ความก้าวหน้าในการรักษาโรคติดเชื้อ คือ ความสำเร็จที่สำคัญอย่างหนึ่งของการแพทย์สมัยใหม่ ซึ่งผลจากความรู้ทางวิทยาศาสตร์นี้ ทำให้การรักษาการติดเชื้อเฉียบพลันด้วยยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพและได้ผลดี ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* (antipseudomonal drugs) ในปัจจุบันนี้มีประมาณ 11 ชนิด คือ amikacin (AK), gentamicin (GN), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), levofloxacin (LEV), ciprofloxacin (CIP), cefoperazone/sulbactam (SCF), piperacillin/tazobactam (TZP) และ colistin (CL) (52) อย่างไรก็ตาม การรักษาโรคติดเชื้อก็ยังคงเป็นปัญหาที่เกิดจากการดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากการที่เชื้อ *P. aeruginosa* อยู่ในรูปแบบของไบโอฟิล์ม ทำให้ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ รวมถึงสารต้านจุลินทรีย์ต่างๆ มีมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในรูปแบบ planktonic cells (53) อย่างไรก็ตามกลไกการดื้อยาของเชื้อจุลชีพ ไม่ได้มีแต่เพียงการสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมาเท่านั้น เชื้อจุลชีพชนิดหนึ่งๆ สามารถดื้อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดร่วมกันโดยผ่านกลไกหลายชนิดได้ เช่น เชื้อ *P. aeruginosa* จะผลิต เอนไซม์ AmpC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อพัฒนาความต้านทานต่อยาในกลุ่มของ beta-lactams (54) ซึ่งพบมากบนเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์ เชื้อ *P. aeruginosa* มีบทบาทสำคัญในการช่วยสร้าง AmpC ปริมาณมากพอที่จะผลักดัน ยา Cefepime ไม่ให้เข้าไปในเซลล์ เกิดการต้านทานยานี้ได้ (55) ในช่วงปี 1990 เริ่มพบผลกระทบจากการไหลย้อนกลับของยาโดยผ่านกลไก MexAB-OprM ซึ่งระบบจะผลักเอายากลุ่ม beta-lactams, chloramphenicol, fluoroquinolones, macrolides, novobiocin, Sulfonamides, tetracycline และ trimethoprim ออกจากเซลล์ (56)

ปัจจุบันด้วยอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงขึ้น ทำให้ยาที่เคยใช้รักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพเริ่มลดลงและบางชนิดไม่สามารถใช้ได้ในบางพื้นที่แล้ว ส่งผลให้ทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อนี้ด้วยยาปฏิชีวนะมีความจำกัดและจำเป็นต้องเพิ่มความรอบคอบมากขึ้น เพื่อป้องกันและชะลอการดื้อยา

ของเชื้อในปัจจุบันไม่ให้เกิดการดื้อยาข้ามกลุม และยาขนานที่ใช้รักษาอยู่ยังคงสามารถประสิทธิภาพให้มากที่สุด เชน tigecycline และ colistin ในส่วน tigecycline เปนยากลุมใหมที่ไดรับการรับรองใหใชในการรักษา *A. baumannii* multidrug-resistant (MDR) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตามยาชนิดนี้ไม่ครอบคลุมเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเปนเชื้อที่พบไดบอยในโรงพยาบาลและยาชนิดนี้ยังมีขอจำกัดในการรักษาโรคติดเชื้อในกระแสเลือด เนื่องจากยาสามารถกระจายตัวเขาสูเนื้อเยื่อตางๆ ไดดีจึงมีความเขมขนในกระแสเลือดต่ำ (57) ส่วนยา colistin เป็นยาตานจุลชีพในอดีต ที่ถูกนำกลับมาใชใหม มีราคาถูก แตยาชนิดนี้มีพิษตอการทำงานของไต และระบบประสาท colistin มีขอมูลดานเภสัชจลนพลศาสตรที่ยังไมแน่ชัด (58) ในปจจุบัน ประเทศไทยยังมีข้อมูลการศึกษาดานประสิทธิภาพ การรักษาของยาทั้งสองชนิดอย่างจำกัด โดยการศึกษาในโรงพยาบาลศิริราช พบวา ผูปวยโรคติดเชื้อ MDR *P. aeruginosa* หรือ *A. baumannii* ที่ไดรับยา colistin มีอัตราการเสียชีวิตต่ำ กวาผูปวยที่ไดรับยาตานจุลชีพอื่น (ร้อยละ 46.2 และ ร้อยละ 80) ตามลำดับ (59) และถึงแม้จะทราบว่ายา Colistin มีผลข้างเคียง (side effect) ที่รุนแรง แต่เนื่องจากการเกิดขึ้นของเชื้อดื้อยาหลายขนานได้ขยายวงกว้าง จึงจำเป็นต้องเลือกใช้ยานี้ในการรักษา การศึกษาในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ metallo-beta-lactamase (MBL) ที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* ภายใน Calgary Health Region (Calgary, Alberta) พบว่าผู้ป่วย 28 ราย ตอบรับยา colistin 22 ราย ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยที่ได้รับ Colistin แบบละอองฝอย หรือ nebulize จากผู้ป่วยทั้งหมด มี 12 ราย ที่เชื้อสามารถสร้าง MBL ได้รับยา colistin ทางหลอดเลือดดำ (intravenous; IV) ปริมาณสูงสุดที่ใช้เป็น 125 มิลลิกรัม ในทุก 6 ชั่วโมงหรือ 6 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม/ วัน จำนวนผู้ป่วย 8 จาก 12 ราย (ร้อยละ 67) ที่รักษาโดยการให้ยาทางหลอดเลือดดำนั้นตอบสนองบ้างบางส่วน ผู้ป่วย 2 รายที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำที่เป็นผู้ป่วยนอก เมื่อพิจารณาผลกระทบที่เกิดจากการใช้ยา colistin คือ มีอาการไข้ เป็นพิษต่อไตและพิษต่อระบบประสาท ผู้ป่วย 5 รายจาก 9 ราย (ร้อยละ 56) ที่มีข้อมูลที่สมบูรณ์สำหรับการประเมินผล พบว่า มีระดับ creatinine เพิ่มขึ้นอย่างน้อยสองเท่าจากค่าปกติ (60) หรือในแนวทางการรักษาอื่นต่อเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ โดยการให้ยาปฏิชีวนะสองชนิดร่วมกัน เช่น gentamicin, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam หรือ tobramycin ให้โดยฉีดเข้าเส้นเลือดดำ หรือรับประทาน เป็นเวลา 2 - 6 สัปดาห์ (61)

เทคนิคในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในปัจจุบัน ยังไม่สามารถตรวจเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มได้ ทำให้อัตราการติดเชื้อที่ตรวจพบ ต่ำกว่าความเป็นจริง วิธีการเก็บตัวอย่างไปตรวจหาเชื้อ อาจไม่เหมาะสม จึงทำให้ตรวจพบเชื้อน้อยกว่าความเป็นจริง หรือผู้ป่วยอาจได้รับยาปฏิชีวนะก่อนการเก็บตัวอย่างไปตรวจหาเชื้อ จึงทำให้ผลการตรวจเป็นลบ ทั้งๆที่มีการติดเชื้ออยู่ ดังนั้นการป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม คือ การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่เชื้อจะเริ่มสร้างไบโอฟิล์ม แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิว ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการพัฒนาของไบโอฟิล์ม เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและใช้เวลาไม่กี่นาที ดังนั้น การปรับเปลี่ยนพื้นผิวจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ การเคลือบสาร α-tropomyosin ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการยึดเกาะ และต้านการเกิดไบโอฟิล์มของแบคทีเรียได้ดีกว่าพื้นผิวที่ไม่เคลือบประมาณ 100 เท่า α-tropomyosin เป็นโปรตีนที่มีประจุลบมากและชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งพื้นผิวของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีประจุลบและชอบน้ำเช่นกัน (62) ดังนั้นการยึดเกาะของเชื้อก็จะลดลง ที่น่าสนใจคือ สารนี้มีราคาไม่แพงและไม่เป็นพิษ จึงเป็นประโยชน์หากนำมาเคลือบบนอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น ท่อสวนปัสสาวะ หรือ คอนแทคเลนส์ เพื่อชะลอการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย

2.5 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. aeruginosa*

การที่แบคทีเรียมีความต้านทานต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้น จึงเป็นปัญหาใหญ่ในทางการแพทย์ ร่วมกับปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะมีเพิ่มมากขึ้น จึงก่อให้เกิดแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นตามมาเป็นลำดับ และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ยังสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าหนึ่งชนิด ปัจจัยที่นำไปสู่การแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ การได้รับยาอย่างไม่เหมาะสม เช่น การซื้อยามารับประทานเอง หรือการรับประทานยาไม่ครบตามที่แพทย์สั่ง การใช้ยาปฏิชีวนะในวงการปศุสัตว์ เป็นต้น สิ่งเหล่านี้เป็นการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและสามารถแพร่กระจายได้มากขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรีย แบ่งได้ 2 แบบ คือ

1. ความต้านทานที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ (Intrinsic resistance) ยาปฏิชีวนะบางชนิดไม่สามารถใช้ได้ในเชื้อบางกลุ่ม ตามธรรมชาติของการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ เช่น การใช้ยา vancomycin กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacilli) หรือ aminoglycoside กับเชื้อจุลชีพชนิดแอนแอโรบ์ (anaerobic bacteria)

2. ความต้านทานชนิดรับมา (Acquired resistance) เป็นกลไกที่แบคทีเรียพัฒนาขึ้นมาเพื่อจะขจัด หรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 4 กลไก ซึ่งในเชื้อแต่ละชนิดอาจจะใช้หลายๆ กลไกร่วมกัน ในการดื้อยาปฏิชีวนะแต่ละขนาน

2.1 การสร้างเอนไซม์มาทำลายฤทธิ์ยาหรือดัดแปลงฤทธิ์ยา (Drug inactivation / modification)

แบคทีเรียสร้างเอนไซม์มาทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะ เพื่อทำให้ยาหมดฤทธิ์ ตัวอย่างเอนไซม์ที่พบบ่อย ได้แก่ penicillinases, beta-lactamases, cephalosporinases ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถผ่านเข้าไปในตัวเชื้อ หรือไม่สามารถจับกับตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา กลไกนี้มีผลต่อยาในกลุ่ม penicillins, carbapenems, cephalosporins, monobactam และ glycopeptides ส่วนมากทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เนื่องจากยากลุ่มนี้มีประโยชน์ทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง กลไกนี้จึงมีบทบาทที่สำคัญมากและพบได้บ่อย ตัวอย่างกลุ่มยาต่างๆ ที่เชื้อเกิดการดื้อด้วยกลไกนี้ ได้แก่

2.1.1 β-lactam ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ penicillins และ cephalosporins ถูกทำลายฤทธิ์ได้ด้วย เอนไซม์ β-lactamases ไปทำลายโครงสร้างวงแหวน (β-lactam ring) ของยาในกลุ่ม β-lactams ก่อนที่ยาจะเข้าถึงเป้าหมาย จะทำให้ยาไม่สามารถจับกับโปรตีนที่เป็นเป้าหมาย โดยโมเลกุลหนึ่งของ β-lactamases สามารถทำลายโครงสร้างวงแหวนของยาได้ 1000 โมเลกุลต่อวินาที ถ้าเซลล์แบคทีเรียสามารถหลั่งเอนไซม์ β-lactamases ในปริมาณ 10^5 โมเลกุลต่อหนึ่งเซลล์ จะสามารถทำลายโครงสร้างวงแหวนของยาได้ 100 ล้านโมเลกุลต่อวินาที

(63) เอนไซม์ β-lactamases มีอยู่หลายชนิด มีการถ่ายทอดการดื้อยาผ่านโครโมโซมหรือพลาสมิด

2.1.2 Aminoglycosides ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ amikacin และ gentamicin มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย กลไกการออกฤทธิ์ คือ การไปจับกับอาร์เอ็นเอเป้าหมายในไรโบโซม 30S ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านรหัส t-RNA และแบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียสร้าง aminoglycoside-modifying enzymes ขึ้นมา เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยา มีผลทำให้ยามีประสิทธิภาพในการจับกับอาร์เอ็นเอเป้าหมายในไรโบโซมลดลง หรือไม่สามารถจับได้เลย โดยพบว่าสามารถถ่ายทอดผ่านพลาสมิดเป็นส่วนใหญ่ ผ่านทาง transposon และ integrons เป็นส่วนน้อย

2.1.3 Choramphenicol เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyl transferase พบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เอนไซม์นี้ช่วยเติม acetate ลงในโครงสร้างของ chloramphenicol ได้เป็น monoacetate ทำให้ไม่สามารถจับกับไรโบโซมในเซลล์แบคทีเรีย จึงไม่มีผลต่อการสร้างโปรตีน acetyltransferases

2.1.4 Macrolides การดื้อยากลุ่มนี้มักเกิดจากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งบนไรโบโซมที่ใช้จับกับยา การดื้อยาวิธีนี้ถ่ายทอดผ่านพลาสมิด และพบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์มาทำลายฤทธิ์ยา เช่น *E.coli* สร้าง erythromycin esterases มาไฮโดรไลซ์ lactone ring ของยาทำให้ยาหมดฤทธิ์ไป

2.2 การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่จับกับยา (Alternative of target site)

ตำแหน่งที่ยาไปจับเพื่อการออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ คือ เอนไซม์หรือโปรตีนที่สำคัญ เชื้อจะเปลี่ยนแปลงตำแหน่งดังกล่าวทำให้จับกับยาลดลง การดื้อยาชนิดนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ทำให้ตำแหน่งที่ยาไปจับเกิดการเปลี่ยนแปลง หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของเอนไซม์ อาจทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดที่ไม่สัมพันธ์กัน การดื้อยาแบบนี้เกิดได้รวดเร็ว มีแนวทางการป้องกันคือการใช้ยาร่วมกันหลายๆ ชนิดในการ

รักษา ตัวอย่าง กลุ่มยาที่เชื้อเกิดการดื้อยาด้วยกลไกนี้ ได้แก่ β-lactams การที่เชื้อดื้อต่อยากลุ่มนี้นอกจากการสร้าง β-lactamases มาทำลายยาแล้ว เชื้อยังอาจดื้อต่อยาโดยการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่จับกับยา กลไกนี้พบมากในเชื้อแกรมบวก เช่น เชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ที่ลดความไวต่อเพนนิซิลลินโดยการเปลี่ยนแปลง penicillin-binding proteins (PBPs) ทำให้จับกับยาได้ลดลง การดื้อยาลักษณะนี้ เกิดจากการกลายพันธุ์ (64, 65) และอาจพบได้บ้างในเชื้อแกรมลบ เช่น *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenza* (66-68)

2.3 Metabolic pathway

เชื้อบางชนิดเกิดการดื้อยาโดยใช้ metabolic pathway อื่นทดแทน pathway ที่ถูกยายับยั้ง อย่างเช่นยากลุ่ม sulfonamide ออกฤทธิ์หยุดการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่ดื้อต่อ sulfonamide สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ dihydropteroate synthetase ชนิดใหม่ที่เป็น plasmid-encoded โดยเอนไซม์นี้ไม่ถูกยับยั้งด้วย sulfonamide ทำให้ metabolic pathway ยังคงดำเนินต่อไป เชื้อจึงดื้อต่อยา หรือ trimetroprim ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งในขั้นตอนต่อจาก sulfonamide โดยยับยั้งการสังเคราะห์กรดโฟลิก และยับยั้งการทำงานของ dihydrofolate reductase ของแบคทีเรีย พบมากในเชื้อแกรมลบ (69)

2.4 การรบกวนการนำเข้าสู่ภายในเซลล์ (Decreased uptake)

การที่ยาต้านแบคทีเรียออกฤทธิ์ได้ ต้องผ่านผนังเซลล์และเมมเบรนรอบนอก เพื่อเข้าไปยังตำแหน่งที่ยาจะไปออกฤทธิ์ภายในเซลล์ของเชื้อ โดยพบว่า ยิ่งการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ยากขึ้น ก็จะทำให้เชื้อดื้อต่อยามากขึ้น แบคทีเรียมีกลไกยับยั้งไม่ให้ยาผ่านเข้าไปในเซลล์ หรือมีการใช้ energy-requiring membrane efflux pump นำยาออกนอกเซลล์ ยาบางชนิดผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์โดย active transport บางชนิดออกฤทธิ์ทำให้เซลล์เมมเบรนแตกโดยที่เชื้อไม่ต้องเข้าไปภายในเซลล์ และการที่เชื้อไวต่อยาแตกต่างกัน อาจเนื่องจากโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ มีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมลบ มี outer membrane ที่เป็นด่านแรก ซึ่งประกอบด้วย

โปรตีนที่เรียกว่า porin ซึ่งเป็นช่องทางที่ยอมให้สารต่างๆ รวมถึงยาปฏิชีวนะผ่านเข้า-ออกไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ เมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง ขนาด และหน้าที่ หรือพัฒนาให้ไม่มี porin จึงขัดขวางการผ่านของยา ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา โดยเฉพาะยาในกลุ่ม β-lactams ได้แก่ การดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem เช่น ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อ imipenem เนื่องจากมีโครงสร้าง chromosomal β-lactamases แล้วยังเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ D2 porin (70, 71) และยังพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* นี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม Quinolones โดยการรบกวนเมมเบรนรอบนอกของแบคทีเรีย (72) ใน *Salmonella typhi* มีการเพิ่ม expression ของยีนที่สร้าง multidrug efflux pump จึงทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดตามมา (73, 74)

จากกลไกการดื้อยาต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ยังมีกลไกอื่นที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถต้านทานต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่นสภาวะที่อยู่ในไบโอฟิล์ม ทีมวิจัยหลายทีมพบว่าเชื้อจุลินทรีย์เมื่ออยู่ในรูปแบบไบโอฟิล์มจะมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และสารต้านจุลชีพต่างๆ มากกว่าเชื้อชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาพ planktonic cells ได้ตั้งแต่ 10 – 1,000 เท่า (75-78) ดังนั้นกลไกในการต้านทานต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่อยู่ในไบโอฟิล์ม จึงน่าจะมีความแตกต่างกันของแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพ planktonic cells มีรายงานจากทีมวิจัยที่เสนอว่า glycocalyx หรือ extra cellular matrix ของไบโอฟิล์มอาจขัดขวางการแพร่ของยาปฏิชีวนะเนื่องจาก extra cellular matrix มีประจุลบจับกับประจุบวกของยาปฏิชีวนะ ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการแพร่ของสารต้านจุลชีพ (79) extra cellular matrix ของไบโอฟิล์มทำให้ระยะทางที่สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ต้องแพร่ผ่านเพิ่มขึ้น มีความหนืดของ extra cellular matrix ช่วยจำกัดการแพร่ของสารและการแพร่ของสารถูกจำกัดด้วยขนาดโมเลกุล (80, 81) แต่ในบางงานวิจัยพบว่า ยากลุ่ม fluoroquinolones สามารถแพร่ลึกลงไปในไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* (82) เช่นเดียวกับยา Tobramycin ก็สามารถแทรกซึมผ่านไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* (83) สารต้านเชื้อจุลินทรีย์อาจถูกเอนไซม์ในชั้นของไบฟิล์มเข้าไปจับและทำลายโดยเอนไซม์ จากงานวิจัยที่พบว่ายา imipenem และ ceftazidime ถูกทำลายอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ β-lactamases ภายในไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* (84)

ปัจจัยการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียที่อยู่ในไบโอฟิล์ม สามารถ

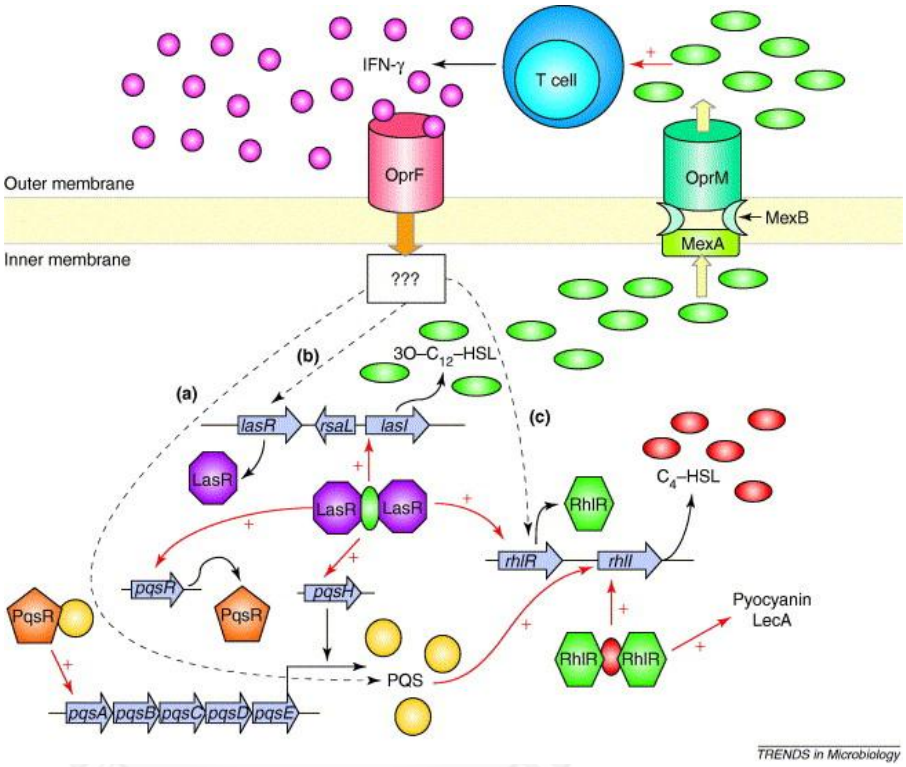
เพิ่มการแสดงออกของยีน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่แสดงออกทางฟีโนไทป์ ที่มีความต้านทานต่อสารต้านจุลชีพต่างๆ เพิ่มขึ้นหลังจากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยมีรายงานการวิจัยที่สนับสนุนว่า หลังจากที่เชื้อ *P. aeruginosa* สัมผัสกับยาในกลุ่ม β- lactams เป็นเวลานาน พบว่ามีการแสดงออกของ chromosomal β- lactamases เพิ่มมากขึ้น (85) อีกปัจจัยคือ อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อยู่ในไบโอฟิล์มลดลงหรือไม่เจริญเติบโตเลย ซึ่งถูกเรียกว่า persister cells (86) ทำให้สารต้านเชื้อจุลชีพที่มีผลต่อเชื้อซึ่งเจริญเติบโตดี ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ความแตกต่างระหว่างเชื้อที่อยู่ในรูป planktonic cells และไบโอฟิล์ม คือ พบ persister cells ในไบโอฟิล์มมากกว่า และจะพบในปริมาณค่อนข้างมากในส่วนลึกของไบโอฟิล์ม สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมุ่งเป้าไปที่เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในไบโอฟิล์มจึงมีความสำคัญ ในการทำให้เกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ ในส่วนของยีนที่จำเพาะต่อการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่อยู่ในไบโอฟิล์มนั้น มีรายงานการวิจัยที่พบว่าในเชื้อ *P. aeruginosa* มียีนที่แสดงออกเฉพาะเมื่ออยู่ในไบโอฟิล์ม คือยีน *ndvB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กลูแคนส์ (glucan) ในชั้น periplasm ซึ่งกลูแคนส์นี้จะจับกับยา tobramycin และป้องกันไม่ให้ยาปฏิชีวนะเข้าถึงตำแหน่งของเซลล์ที่ยาสามารถออกฤทธิ์ได้ (87)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

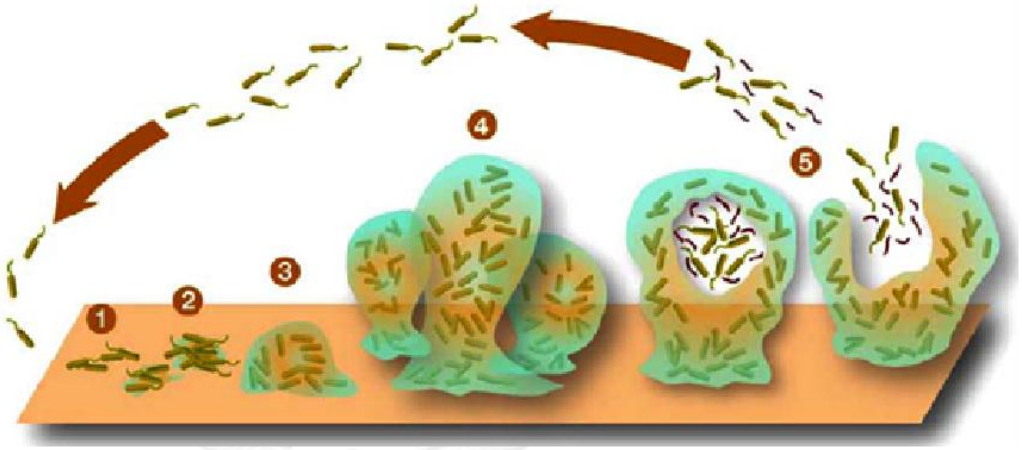
2.6 ไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa*

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์นั้น จะเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียได้รับสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือได้รับสารเคมีบางอย่างที่หลั่งออกจากเซลล์ โดยจะล่องลอยอย่างอิสระในความเข้มข้นที่ต่ำ ได้มีการศึกษาจากทีมวิจัยหลายทีมพบว่า การที่แบคทีเรียจะรวมตัวกันขึ้นมานั้นเกิดจากการส่งสัญญาณ (communication network) ซึ่งเรียกสารเคมีบางอย่างนี้รวมๆ ว่า Quorum sensing (QS) (88), (89) แบคทีเรียแต่ละชนิดก็มีการติดตอสื่อสารระหวางเซลลเรียกวา “quorum sensing system” ซึ่งเปนการสื่อสารที่เกิดจากการสรางสารที่เรียกวา autoinducer ทำหนาที่เปรียบเสมือนสื่อกลางในการสื่อสาร การสื่อสารที่เกิดขึ้นระหวางเซลลแบคทีเรีย เปนกลไกสำคัญอยางหนึ่งที่แบคทีเรียใชควบคุมการตอบสนองตอสิ่งแวดลอม และควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด รวมทั้งยีนที่เกี่ยวของกับปจจัยกอโรค (virulence gene) ดวยเชื้อ *P. aeruginosa* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยปัจจุบันพบว่ามี QS ถึง 3 ระบบ โดยมี 2 ระบบที่จัดเปน LuxI/LuxR homolog คือระบบ Las และ Rhl และอีกหนึ่งระบบที่ไมจัดอยูใน LuxI/LuxR homolog เรียกว่า Pseudomonas quinolone signal (PQS) system ทั้งสามระบบมี autoinducer ที่แตกตางกัน autoinducer หรือสารสัญญาณ (signaling molecule) ที่แบคทีเรียสรางนี้ จะหลั่งออกมาภายนอกเซลล เมื่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในกลุมเพิ่มมากขึ้น สารส่งสัญญาณที่สรางก็จะมีปริมาณมากขึ้น และจะแพรกลับเขาไปจับกับตัวรับที่อยูภายในเซลลแบคทีเรียและจะไปมีผลกระตุนเซลลแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ที่อยูในบริเวณใกลเคียงรวมทั้งตัวเอง ใหตอบสนองโดยการแสดงออกของยีนตาง ๆ หลายชนิด ปจจุบันพบสารในกลุมนี้หลายชนิด ในแบคทีเรียแกรมลบเรียกชื่อรวม ๆ วา Acyl Homoserine Lactones (AHLs) โมเลกุลของสารพวก AHL จะถูกสร้างจากภายในเซลล โดยเอนไซม AHL synthase ที่ควบคุมการสรางโดยยีนชื่อวา *luxI* เมื่อ AHL ที่สราง ถูกสง ออกมาภายนอกเซลล และมีการสะสมในปริมาณที่มากขึ้นจะแพร กลับเขาสูเซลลไปกระตุนเซลล โดยจะจับกับโปรตีนที่เรียกวา LuxR โปรตีนคอมเพล็กซ ระหวาง AHL และ LuxR ทำหนาที่เปรียบเสมือนเปน transcription factor ไปกระตุนการ แสดงออกของยีนตางๆ รวมทั้ง *luxI* ใหสราง AHL เพิ่มมากขึ้นดวย นอกจากนี้พบวาการแสดงออกของปจจัยก่อโรค (virulence factors) หลายชนิด ในเชื้อแบคทีเรียกอโรคแกรมลบ ถูกควบคุมดวยระบบของ LuxI/LuxR homologs กรณีของระบบ PQS การสร้าง autoinducer คือ 2-heptyl-3-hydroxi-4-quinolone นั้นจะถูกควบคุมดวยยีนจำนวนหลายยีน ไดแกยีน *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, *pqsD* และ *pqsH* รูปแบบการทำงานของ

ระบบ PQS นั้นคล้ายกับระบบ อื่นๆ โดย autoinducer ที่สร้างขึ้นมา จะแพรผานเมมเบรนของเซลล เชนเดียวกับระบบอื่นๆ และเมื่อ 2-heptyl-3-hydroxi-4-quinolone นั้นแพรกลับเขาสูเซลล จะจับกับตัวรับคือ PqsR สารประประกอบที่เกิดขึ้นจะไปกระตุนการแสดงออกของยีนตางๆ (90) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 แผนภาพแสดงขั้นตอน quorum sensing และกลไกของ IFN-γ จากการกระตุ้น ของ autoinducer 3O–C_{12}–HSL ที่ถูกสังเคราะห์โดย *las* regulon และถูกนำส่งออกนอก cellular membrane โดยผ่าน MexAB–OprM ด้วยกลไก efflux pump ภายนอกเซลล์ 3O–C_{12}–HSL กระตุ้น T cells ให้สร้าง IFN-γ จากนั้น IFN-γ จะไปจับที่ OprF เป็นสารส่งสัญญาณกระตุ้นให้เกิด *rhl* QS system ดังนี้ **(a)** การกระตุ้นระบบ PQS system; **(b)** กระตุ้นให้เกิด *las* system ซึ่งเป็นสารควบคุม (regulator); **(c)** สามารถกระตุ้นการทำงานในระบบอื่นๆได้อีกโดยต้องศึกษาต่อไป (91)



ภาพที่ 2.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนในกระบวนการพัฒนาไบโอฟิล์มของเชื้อ*P. aeruginosa* ใน 5 ขั้นตอน : ขั้นตอนที่ 1 การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิวในระยะเริ่มต้น ขั้นตอนที่ 2 การผลิตสารพอลิเมอร์มีผลให้เชื้อจุลินทรีย์ยึดเกาะกับพื้นผิวแบบผันกลับไม่ได้ ขั้นตอนที่ 3 การพัฒนาเริ่มสร้างโครงสร้างของไบโอฟิล์ม ขั้นตอนที่ 4 การพัฒนาของไบโอฟิล์มเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ ขั้นตอนที่ 5 การกะจายตัวของเซลล์ออกจากไบโอฟิล์ม (92)

2.7 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มเชื้อ *P. aeruginosa*

กระบวนการพัฒนาของไบโอฟิล์มแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน (ภาพที่ 2.2)

2.7.1 ระยะเริ่มต้นด้วยการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิว

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียนั้นจะเจริญเติบโตบนพื้นผิวมากกว่าอยู่ในสภาวะล่องลอยในของเหลว (planktonic cells) การยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิวแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรก เป็นระยะที่เกิดเพียงชั่วขณะและผันกลับ (reversible) ได้ โดยการเกิดปฏิสัมพันธ์ทางฟิสิกส์เคมี (physicochemical interaction) ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิว อาศัยแรงทางฟิสิกส์ที่นำเชื้อแบคทีเรียไปยังพื้นผิววัสดุ ได้แก่ การเคลื่อนที่แบบบราว์เนียน (Brownian motion), แรงโน้มถ่วง, แรงแวนเดอร์วาลส์และประจุของพื้นผิววัสดุ มีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์กับพื้นผิว (36) ส่วนปัจจัยทางเคมีที่นำเชื้อแบคทีเรียไปยังพื้นผิว เรียกว่า chemo-attractants เช่น กรดอะมิโนและน้ำตาล (93, 94) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ที่มีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์กับพื้นผิว ได้แก่ ความดัน, ความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณออกซิเจนและอุณหภูมิ (40, 95) มีรายงานจาก Kline และคณะ พบว่า

เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์ที่แตกต่างกัน เชื้อจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับพื้นผิวในระยะนี้อาจไม่เข้าสู่กระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม โดยอาจหลุดออกจากพื้นผิวกลับไปเป็น planktonic cells (96)

2.7.2 เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารพอลิเมอร์เกิดการยึดเกาะกับพื้นผิวแบบผันกลับไม่ได้

ในระยะที่สองนี้การยึดเกาะจะเกิดแบบจำเพาะมากขึ้นระหว่างโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียและพื้นผิวที่เชื้อยึดเกาะ โดยพบว่าในขั้นตอนนี้อาศัยโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียเองเพื่อให้เกิดการยึดเกาะที่แน่นขึ้น เช่น pili, flagella, capsule และ ซึ่ง mucous เหล่านี้จัดเป็นปัจจัยสำคัญในการยึดเกาะ หรือ adhesins ทำให้จับกับเนื้อเยื่อของโฮสต์ มีการศึกษาจาก Giltner และคณะ เกี่ยวกับกลไกแรกเกิดจากเซลล์ที่เกาะติดแบบกระจายตัว เชื้อจะเคลื่อนที่เข้าไกล้พื้นผิว โดยใช้ flagella และ pili (type IV pili) ทำให้แบคทีเรียเกาะติดกับพื้นผิวและเกาะติดซึ่งกันและกัน เป็นการส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์ม (97) นอกจากนี้แบคทีเรียจะยึดเกาะกับพื้นผิวได้แน่นขึ้นโดยการผลิตสาร Exopolymeric substances (EPS) ไปจับกับพื้นผิวส่งผลให้เชื้อยึดเกาะกับพื้นผิวแบบไม่ผันกลับได้ (irreversible) และเมื่อมีการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งๆบนพื้นผิวแล้ว สามารถส่งเสริมการยึดเกาะของเชื้อจุลชีพชนิดอื่นๆตามมา

2.7.3 ขบวนการเริ่มโครงสร้างไบโอฟิล์ม

ในกระบวนการพัฒนาไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียนั้น พบว่าเป็นกระบวนการปรับตัวและควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนแรกของกระบวนการพัฒนาไบโอฟิล์ม ได้แก่การยึดเกาะกับพื้นผิวและสร้าง microcolonies (98) มีรายงานการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนที่แสดงออกใน *P. aeruginosa* ณ ขณะที่เชื้อยึดเกาะกับพื้นผิว พบว่ามียีนมากกว่า 11 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป ในระหว่างขั้นตอนต่างๆของการยึดเกาะ (99, 100) ผลศึกษาการพัฒนาโครงสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า ในระยะเริ่มต้นการยึดเกาะกับพื้นผิวนั้น จะมีการเรียงตัวของเซลล์เป็นลักษณะ monolayer หรือเป็นชั้นเดียว จากนั้นเซลล์ที่เรียงตัวเป็นชั้นนี้จะเคลื่อนที่บนพื้นผิวเรียกว่า twitching motility ทำให้เซลล์ของเชื้อเข้ามาจับกลุ่มกันกลายเป็นลักษณะของ microcolonies การเคลื่อนที่ลักษณะนี้มีความเกี่ยวข้องกับ type IV pili ซึ่งสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวและสร้าง monolayer ได้ดี แต่หากเกิดความบกพร่องในการ

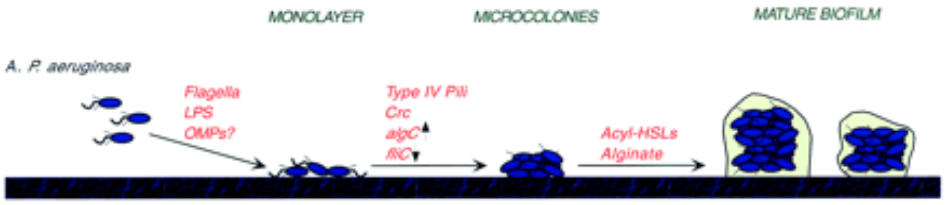
สังเคราะห์ type IV pili เชื้อจะไม่สามารถสร้าง microcolonies ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของการพัฒนาโครงสร้างของไบโอฟิล์มในระยะเริ่มต้น แต่ยังสามารถสร้าง monolayer ได้ดีพอกับสายพันธุ์เดิม (101, 102) จากรายงานการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ที่บกพร่องของการเคลื่อนไหวด้วย flagella จะไม่สามารถเกิดการยึดเกาะกับพื้นผิวต่างๆ ในระยะเริ่มต้นได้ (40, 103) และผลการศึกษาในระยะต่อมาพบว่ามีโปรตีน Crc ควบคุมยีน *pilA* และ *pilB* โดยยีน *pilA* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนในโครงสร้างหลักของ type IV pili ส่วนยีน *pilB* เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการประกอบเป็น pilus (104) นอกจากนี้ยังพบอีกว่ายังมีอีกหลายปัจจัยที่จำเป็นสำหรับการสร้างไบโอฟิล์มโครงสร้างของเชื้อ *P. aeruginosa* อีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าส่งผลโดยตรงต่อการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิว คือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) มีความสำคัญในการยึดเกาะกับพื้นผิวในระยะเริ่มต้น (105, 106) ผลการศึกษาของ Vasseur และคณะ พบว่ายีน *pel A-G* และ *pslA-O* เมื่อมีการแสดงออก จะทำให้รูปร่างของโคโลนี มีลักษณะย่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและการสังเคราะห์ PEL สามารถทำให้เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมีการสร้าง pellicle หรือไบโอฟิล์มที่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศได้ (107) จากการศึกษาในสภาวะนิ่งหรือ static attachment assay พบว่า *psl* มีความสำคัญในระยะแรกของการสร้างไบโอฟิล์ม ในขณะที่การสังเคราะห์ PEL นั้น จะมีความสำคัญในระยะต่อมาของการสร้างไบโอฟิล์ม (108) การสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ใน matrix ของไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ถูกควบคุมผ่านระดับของ cyclic diguanylate (c-di-GMP) ภายในเซลล์ของเชื้อ โดยพบว่าถ้ามี c-di-GMP ในระดับสูงจะกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีน *pel* และ *psl* เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม แต่ถ้ามี c-di-GMP ภายในเซลล์ในระดับที่ต่ำการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจะลดลง (109) เชื้อ *P. aeruginosa* มี EPS อีกชนิดหนึ่งคือ alginate (alg) ซึ่งมียีน *algC* ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ alginate และพบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน *algC* เพิ่มขึ้นใน 15 นาทีแรก หลังจากที่เซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิว ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการยึดเกาะนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *algC* เซลล์ที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของยีน *algC* นั้น มีความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน *algC* เพิ่มขึ้น (110-112)

Ferreira และคณะ ได้ทำการศึกษา Alginate ซึ่งเป็น Polysaccharide polymer ที่สร้างโดย *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานที่มีลักษณะเป็นเมือก (Wild type) มีบทบาทสำคัญในโครงสร้างของไบโอฟิล์มใน Microcolonies โดยเมื่อทำการตัดยีน *alg* ในสายพันธุ์มาตรฐานพบว่า ไบโอฟิล์มที่เกิดจาก Mucoid mutant strain มีลักษณะแตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐาน เนื่องจากมีความผิดพลาดระดับยีนในขั้นตอนการซ่อมแซมดีเอ็นเอส่งเสริมให้เกิดการกลายพันธุ์ที่สูงขึ้น เกิดผลกระทบต่อขั้นตอนการสร้างและการเจริญใน Microcolonies (113) แม้ว่าการแสดงออกของยีน *algC* นั้นจะไม่จำเป็นสำหรับการยึดเกาะในระยะเริ่มต้น แต่พบว่ามีความสำคัญต่อการทำให้เชื้อยึดเกาะแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) เนื่องจากการแสดงออกของยีน *algC* สูงขึ้นสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ alginate ซึ่งสามารถบอกได้ว่าการสังเคราะห์ alginate จะเริ่มต้นขึ้นหลังจากเชื้อยึดเกาะกับพื้นผิว (111) ผลการศึกษาได้เชื่อมโยงการสังเคราะห์ alginate ที่เพิ่มขึ้นซึ่งแปรผกผันกับการสังเคราะห์ flagella ที่ลดลง และเมื่อเมื่อเชื้อเปลี่ยนแปลงจาก planktonic cells ไปอยู่ในรูปของไบโอฟิล์มซึ่งไม่สามารถเคลื่อนที่ได้บนพื้นผิว เชื้อนั้นจะสูญเสีย flagella ไป (114, 115)

2.7.4 การพัฒนาไบโอฟิล์มเกิดเป็นโครงสร้างสมบูรณ์

การพัฒนาไบโอฟิล์มจนมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ (matoration of biofilm architecture) จากการศึกษาพบว่าไบโอฟิล์มที่ถูกพัฒนาให้สมบูรณ์แล้วในเชื้อ *P. aeruginosa* มีการแสดงออกในรูปแบบของโปรตีนที่แตกต่างจาก planktonic cells เกิดโปรตีนมากกว่า 800 ชนิด ที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างน้อยหกเท่าหรือมากกว่า โดยในโปรตีนที่พบนี้ มีมากกว่า 300 ชนิด ที่ถูกตรวจพบในไบโอฟิล์มที่พัฒนาได้สมบูรณ์แล้ว แต่ไม่สามารถพบได้ในเชื้อที่อยู่ในรูปแบบ planktonic cells มีการศึกษาในระดับยีนโดยใช้วิธี DNA microarrays พบว่ามียีนเพียง 73 ชนิดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างเชื้อที่อยู่ในรูปแบบ planktonic cells กับเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์ม (116) ในขั้นตอนการพัฒนาโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสามารถตรวจพบ สารสำคัญที่เกิดขึ้น คือ acylhomoserine lactone (acyl-HSLs) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าชุมชนของไบโอฟิล์มนั้น เชื้อภายในโครงสร้างสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ โดยใช้สัญญาณที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ (quorum-sensing molecules) (117) (118) ต่อมา

มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่หนาแน่นขึ้นเซลล์นี้ก็จะหลั่ง acyl-HSLs เพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณสารสื่อสัญญาณนี้มีจำนวนมากขึ้นก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ cell membranes และมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (119, 120) จากนั้นกระบวนการยึดเกาะก็จะเริ่มแข็งแรงขึ้นซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะเริ่มทำการแบ่งตัวและมีการสร้างสารเหนียวที่เรียกว่า Extracellular Polymeric Substances (EPS) ขึ้นมา เพื่อช่วยในการยึดเกาะและป้องกันตัวเอง เกิดการสะสมเป็นกลุ่มเซลล์หลายชั้น จนเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า Microcolonies โครงสร้างทางเคมีของ EPS ประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ กรดนิวคลิอิค และโปรตีน เมื่อมีการรวมตัวของเซลล์หลายจุดบนพื้นผิว แต่ละจุดของกลุ่มเซลล์นั้นจะมีช่องว่างทางน้ำ (channels) มีการรายงานจาก Priester และคณะ พบว่า ในแบคทีเรียที่ต่างสปีชีส์กัน ส่วนประกอบของ EPS จะมีความแตกต่าง มีความซับซ้อน และความหลากหลาย หรือแม้แต่แบคทีเรีย สปีชีส์เดียวกัน เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมรวมถึงแหล่งของสารอาหารที่ต่างกัน ส่วนประกอบของ EPS ก็จะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มยังมีอีกหลายปัจจัยร่วมที่เกี่ยวข้อง EPS จัดเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญของ Biofilm matrix โดยเป็นสารที่เข้าไปอยู่ในโครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์ (121) มีการรายงานจาก Fekete และคณะ เกี่ยวกับ EPS พบเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ (1-4)-β-linked glucose และ β-1,6-linked N-acetylglycosamine (GlcNAc) เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ Biofilm matrix สามารถพบในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่แตกต่างกัน และมีบทบาทความสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์มต่างกันด้วย (122) การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* มีความสัมพันธ์กับจำนวนประชากรเซลล์ในขั้นตอนการสร้างเป็นชุมชนของแบคทีเรียที่ล้อมรอบด้วย EPS จากการสร้างขึ้นของเชื้อ เมื่อโครงสร้างมีการพัฒนาเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียขึ้นจนมีขนาดที่ใหญ่ เรียกโครงสร้างนี้ว่า Macrocolony หรือ mature biofilm (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 การพัฒนาโครงสร้างของไบโอฟิล์มในเชื้อ *P.aeruginosa* แสดงส่วนประกอบที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนต่างๆของการสร้างไบโอฟิล์ม (123)

2.7.5 การกระจายตัวของเซลล์ออกจากไบโอฟิล์ม

เมื่อเซลล์ในไบโอฟิลม์เพิ่มจำนวนมากขึ้น จนทำให้เกิดการแตกของไบโอฟิล์มและมีการกระจายตัวของเซลล์ออกจากไบโอฟิล์มนั้น ได้มีการตั้งสมมุติฐานว่าอาจเกิดจากความอดอยากหรือข้อจำกัดของสารอาหารภายในไบโอฟิล์มซึ่งนำไปสู่การกระจายตัวของเชื้อ *P. aeruginosa* ออกจากไบโอฟิล์ม เพื่อหาที่อยู่ใหม่ที่มีสารอาหารที่ดีกว่า (124, 125) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาโปรตีนของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี two-dimensional-gel ในเชื้อที่หลุดออกจากไบโอฟิล์ม พบว่ามีความใกล้เคียงกับ planktonic cells มากกว่าเซลล์ที่อยู่ในไบโอฟิล์ม (126) การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่หลุดออกจากไบโอฟิล์มมีรูปแบบการเจริญเติบโตย้อนกลับไปเหมือนกับ planktonic cells ทำให้วงจรการพัฒนาไบโอฟิล์มครบวงจร นอกจากนี้ สัญญาณที่เกิดจากความหนาแน่นของเซลล์ในไบโอฟิล์มอาจกระตุ้นให้เกิดการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลาย matrix เมื่อความหนาแน่นของเซลล์มีมากถึงระดับหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียบางเซลล์ถูกปล่อยล่องลอยออกมา เรียกขบวนการนี้ว่า releasing จากนั้นเซลล์ที่ล่องลอยออกมาจะเริ่มขบวนการยึดเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์มขยายต่อไปเรื่อยๆ ซึ่งทำให้เกิดไบโอฟิล์มแพร่กระจายออกไป (127) ในบางสภาวะไบโอฟิล์มนั้นอาจหลุดจากผิวเซลล์เป็นแผ่นๆ ได้ อันเนื่องมาจากการชะล้างด้วยแรงดันน้ำ หรือหลุดจากการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น glutaraldehyde, sodium hypochlorite, povidine และ chlorine เป็นต้น

2.8 การรักษาโรคติดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* นี้ พบว่ารุนแรงและดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรค เชื้อ *P. aeruginosa* เปนปญหาสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ในจำนวนผู้ป่วยโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล 2,000 คนตอป พบวารอยละ 10 มีสาเหตุมาจาก *P. aeruginosa* และเปนสาเหตุอันดับสองในการทำใหเกิดโรคปอดบวมในโรงพยาบาล (nosocomial pneumonia) (128) นอกจากนี้ยังจัดวาเปนเชื้อแบคทีเรียกอโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) ติดเชื้อในผูที่มีระบบภูมิคุมกันบกพรอง (immunocompromised host) เชื้อนี้มีความสามารถกอโรคไดในเกือบทุกอวัยวะ ที่สำคัญคือการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะกรณีของผู ปวยโรคทางพันธุกรรม cystic fibrosis (CF) มีรายงานการศึกษาจากหลายทีมวิจัยที่พบว่า ระบบ QS มีผลตอการแพรกระจายของเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่รุนแรงในผู้ป่วยที่ถูกไฟไหม้อย่างรุนแรง เนื่องจากพบการผลิตปัจจัยความรุนแรงสูงขึ้น ซึ่งถูกควบคุมโดยระบบการสื่อสารของเซลล์ หรือ QS ที่แสดงให้เห็นว่ามีการผลิต pro-inflammatory และ hematopoietic cytokines ในระหว่างการติดเชื้อของแผล cytokines เหล่านี้ ส่วนใหญไม่ได้ผลิตในระหว่างการได้รับบาดเจ็บจากความร้อนหรือการติดเชื้อ *P. aeruginosa* (129) ทำให้ผู้ป่วยแผลไฟไหม (burned skin) รอยละ 10 มีการติดเชื้อ *P. aeruginosa* และร้อยละ 80 ของผูติดเชื้อนั้น มีโอกาสเสียชีวิตเนื่องจากภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) (130) จากการศึกษาของ Friaks-Lima และคณะ แสดงให้เห็นว่าไบโอฟิล์มสามารถป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและเป็นอันตราย เช่น ยาปฏิชีวนะต่างๆ และยังเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการรักษาสมดุลของเชื้อในไบโอฟิล์ม (77) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาจาก Joo และคณะ ที่กล่าวถึงประโยชน์ของการสร้างไบโอฟิล์มเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ล่องลอยอย่างอิสระ เช่น การป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมโดย EPS สามารถป้องกันแบคทีเรียภายในไบโอฟิล์มจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (131) นอกจากนี้ ไบโอฟิล์มที่พบในกรณีผูปวย CF มีส่วนชวยใหเชื้อสามารถรวมกลุมกัน (colonization) ในรางกาย โดยเฉพาะการรวมตัวกันที่เนื้อเยื่อปอดของผูปวยไดเปน เวลานาน มีการศึกษาพบวา LasI/LasR มีบทบาทสำคัญในการสรางไบโอฟิล์มของเชื้อ โดยเชื้อที่กลายพันธุไมสามารถสราง 3-oxo-C12-HSL ได ทำให้โครงสร้างไบโอฟิล์มมีลักษณะผิดปกติ และสามารถถูกทำลายไดงายดวยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งผลการทดลองนี้ไดรับการพิสูจนดวยการเติมสาร 3-oxo-C12-HSL เขาไปในขณะที่เลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่กลายพันธุ พบวาการสรางไบโอฟิล์มเกิดขึ้นอยางเป็นปกติ (132) มี

การศึกษาในหนูทดลองโดยเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ถูกทำลายระบบ QS บนแผนซิลิโคน จากนั้นนำไปปลูกถ่ายลงในช่องท้องหนู พบว่าเชื้อที่ถูกกลายพันธุ์ของระบบ QS นั้นจะถูกกำจัดอย่างรวดเร็วโดยระบบภูมิคุ้มกันของหนู ในขณะที่สายพันธุ์ปกติ สามารถสร้างไบโอฟิล์มและทนทานต่อการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า (133) มีผลการศึกษาจากหลายทีมวิจัยเกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะต่อเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ พบว่าเกิดจากกลไกการดื้อยารวมถึงการสร้างไบโอฟิล์ม ที่ส่งเสริมกันทำให้เชื้อนั้นมีความทนทานและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อที่ยังไม่สร้างไบโอฟิล์มในเชื้อชนิดเดียวกัน (134, 135) อีกทั้งการลดการดูดซึมยาปฏิชีวนะนั้นเกิดเนื่องมาจากอัตราการเจริญของเชื้อที่ลดลง หรือไม่มีการแบ่งตัวของเชื้อจุลชีพที่อาศัยอยู่ภายในโครงสร้างไบโอฟิล์ม จากสภาวะที่ขาดแคลนอาหารหรือปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง ร่วมกับพลาสมิดที่มียีนควบคุมการดื้อยาและการกลายพันธุ์ ทำให้ผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจนทำให้ยาบางชนิดไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ รวมถึงการสร้างเอนไซม์ทำลายสารต้านจุลชีพ ทำให้เชื้อดื้อต่อยา ในการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจึงต้องทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะก่อนใช้ ในการทดสอบความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion นั้นคงไม่เพียงพอต่อการเลือกยาชนิดนั้นเพื่อรักษา ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น การรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* จึงนิยมให้ยาปฏิชีวนะสองตัวร่วมกันเพื่อช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ซึ่งในการรักษาการติดเชื้อบางครั้งจำเป็นต้องตัดเนื้อเยื่อส่วนที่ติดเชื้อและถูกทำลายออกไป โดยเฉพาะในรายที่มีการติดเชื้อที่สมอง ที่พบการติดเชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูง โดยเฉพาะการติดเชื้อในกระแสเลือด และการติดเชื้อที่ปอด

จากปัญหาในการกำจัดเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มนั้น องค์ประกอบสำคัญของไบโอฟิล์มจากเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นสารจำพวก polymers, glycocalyx และ slime (เมือก) ที่กลุ่มแบคทีเรียสร้างขึ้นมาและใช้เป็นที่อยู่อาศัย เพื่อเป็นแหล่งให้เชื้อรวมกลุ่มกันเจริญเติบโต ในผู้ป่วยที่ต้องได้รับสารน้ำเป็นเวลานาน เชื้อ *P. aeruginosa* จะอาศัยในไบโอฟิล์ม ซึ่งจะพบได้มากบริเวณตำแหน่งของเข็มให้น้ำเกลือ ไบโอฟิล์มช่วยให้เชื้อเจริญและหลบหลีกการเข้าถึงของยาต้านจุลชีพและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ ดังนั้น Quorum sensing จึงเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการพัฒนายาต้านจุลชีพ ความสามารถของแบคทีเรียที่ก่อโรคมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปัจจัยก่อโรคโดยผ่านการควบคุมด้วยยีน แต่อย่างไรก็ตาม กลับไม่พบว่าปัจจัยก่อโรคนี้มีผลต่อการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์และไม่สามารถแสดงออกของปัจจัยก่อโรค ยังคงสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและ

รวมกลุมกันภายในเซลล์เจาบานไดอย่างเปนปกติ เพียงแตไมกอใหเกิดโรค จากข้อมูลดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นปัจจัยก่อโรคหลายชนิดนั้นถูกควบคุมดวยระบบ QS รวมทั้งในกรณีของเชื้อ *P. aeruginosa* ดวย ดังนั้นนักวิจัยจำนวนมากจึงมีแนวความคิดใหมในการพัฒนายาตานจุลชีพ ดวยแนวคิดการยับยั้งไมใหเชื้อแบคทีเรียนั้นกอโรคไดในรางกายของเซลล์เจาบาน โดยยับยั้งการทำงานของระบบ QS เปาหมายใหมนี้มีความแตกตางไปจากยาตานจุลชีพแบบเดิมที่มุงทำลายหรือยับยั้งการแบงตัวของแบคทีเรีย ซึ่งจะสงผลให้เชื้อแบคทีเรียพยายามปรับตัวและเกิดการดื้อตอยาตานจุลชีพนั้น ในขณะที่แนวทางใหมโดยการยับยั้งระบบ QS จะไมทำใหเชื้อแบคทีเรียเกิดการพัฒนาและดื้อตอยา เพราะไมไดมีเปาหมายในการฆาเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ปจจุบันเริ่มมีการวิจัยเพื่อหาสารเคมีทั้งที่เปนสารสังเคราะหและสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดนำมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งระบบ QS สารดังกลาวเรียกรวม ๆ วา quorum quenching หรือ quorum sensing inhibitor (QSI) เปาหมายหลักสำหรับการยับยั้งระบบ QS คือการยับยั้งหรือทำลาย autoinducer และโปรตีนตัวรับของ autoinducer ซึ่งหากสัญญาณดังกลาวถูกทำลายหรือยับยั้งแลว แบคทีเรียก็จะไมสามารถสื่อสารและสงสัญญาณเพื่อไปกระตุนการทำงานของยีนที่ควบคุมปจจัยกอโรคได กรณีของเชื้อ *P. aeruginosa* ก็มีการศึกษาเพื่อหาสารเคมีที่เปน QSI จำนวนมาก เชนสารประกอบจำพวก halogenated furanone ซึ่งเปน secondary metabolites จากสาหรายทะเล *Delisea pulchra* พบวาสามารถรบกวนการทำงานของ AHL ของเชื้อ *P. aeruginasa* ได โดยเกี่ยวของกับระบบ LasI/LasR นอกจากนี้พบวาสารกลุม halogenated furanone ทำใหการสรางไบโอฟิล์มผิดปกติไป แบคทีเรียจะหลุดออกมาจากพื้นผิวที่เกาะไดงาย (136)

จากองค์ความรู้ที่มีในปัจจุบันทำให้ทราบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* นี้มีกลไกการพัฒนาให้อยู่รอดหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นกลไกการดื้อยา การลดการดูดซึมยา เปลี่ยนแปลงโครโมโซม การส่งสัญญานสื่อสารต่างๆ ระหว่างเซลล์ รวมถึงการสร้างเกราะที่เรียกว่าไบโอฟิล์มมาเพื่อป้องกันการถูกทำลาย เนื่องจากไบโอฟิล์มมีความต้านทานสูงต่อแอนติบอดี ยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลินทรีย์ต่างๆ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยมากมายที่พยายามค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ ยาปฏิชีวนะขนานใหม่ขึ้นมา และรวมถึงการพยายามนำเอาสารสกัดสมุนไพรต่างๆ มาเพื่อทำการรักษาเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์ม อุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นได้รับความสนใจจากกลุ่มงานเภสัชกรรมและวิทยาศาสตร์ ที่มีต่อการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพที่มีศักยภาพของสารจากพืช สารสกัดธรรมชาติที่ใช้ในการแพทย์แบบดั้งเดิมในประเทศต่างๆ ที่สำคัญที่สุดของสารต้านจุลชีพธรรมชาติที่ได้จากพืช เป็นกลยุทธ์ทางเลือกในการควบคุมโรคติดเชื้อ ที่

ใช้งานโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่มีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะที่สูง มีตัวอย่างรายงานเกี่ยวกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการกำจัดเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า สารสกัดจากพืช *Piper regnellii* จากประเทศบราซิล มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับปานกลาง (137) มีการศึกษาประสิทธิภาพของกระเทียม ที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของระบบ QS ใน เชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง (138) มีการศึกษาสารสกัดจำนวน 6 ชนิด คือ protocatechuic acid, gallic acid, ellagic acid, rutin, berberine และ myricetin ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่า myricetin สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร protocatechuic acid และ gallic acid สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สาร ellagic acid, rutin และ berberine สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (139) ผลการศึกษาการนำเอาสารสกัดจาก *Rhus coriaria*, *Sacropoterium spinosum* และ *Rosa damascene* มาเสริมฤทธิ์ทางเภสัชกรรมกับยาชนิดต่างๆ ดังนี้ oxytetracycline, penicillin G, cephalexin, sulfadimethoxine และ enrofloxacin เพื่อทดสอบกับ multidrug-resistant *P. aeruginosa* พบการเสริมฤทธิ์กับยาชนิดต่างๆ กับสารสกัดจาก *R. coriaria* ที่สามารถยับยั้งในกลไล efflux pumps ได้ (140) ข้อมูลจากการศึกษาส่วนมากเน้นที่สารต้านจุลชีพ แต่จากปัญหาที่กล่าวข้างต้น พบว่าการก่อโรคของเชื้อนี้มีปัญหาที่ทำให้เชื้อสามารถคงอยู่ได้มาจากการสร้างไบโอฟิล์มเป็นสำคัญ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเริ่มมีการศึกษาค้นคว้าหาสารที่ออกฤทธิ์และมีผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ สาร catechins ที่พบมากในชาเขียว ก็มีประสิทธิภาพในการรบกวนการทำงานของ AI-2 และสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ (141) การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบหม่อนและลูกหม่อน (Morus nigra) ในเมทานอลและน้ำ เมื่อทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์รวม 77 สายพันธุ์ ที่สำคัญทางคลินิก รวม 5 สายพันธุ์ (*Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus*) ด้วยวิธี disc-diffusion และ วิธี minimal inhibitory concentration (MIC) ได้รับการพิสูจน์ว่า ในแบคทีเรียจาก 4 ใน 5 สายพันธุ์ ที่ผ่านการทดสอบในการศึกษานี้ สารสกัดใบหม่อนด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุดต่อเชื้อ *S. aureus* โซนยับยั้งเท่ากับ 18 มิลลิเมตร และ มีค่า MIC ที่ 0.156 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เชื้อ *P. aeruginosa* พบโซนยับยั้งเท่ากับ 10 มิลลิเมตร และ มีค่า MIC ที่ 0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีศักยภาพที่ดีต่อต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *E. coli* และ *E. aerogenes* สารสกัดทั้งจากใบหม่อนและลูกหม่อนไม่มีฤทธิ์ต้านต่อ *P. mirabilis*

(142) นอกจากยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ยังมีสารสกัดจากพืชที่มีความสำคัญมากต่อการรักษาโรคติดเชื้อ อาทิเช่น โปรตีนในพืชที่ละลายน้ำได้ เฉพาะใบหม่อนมีโปรตีน 18-28.8 % น้ำหนักแห้ง จากพืชหม่อนจำพวก Morus ในวงศ์ Moraceae ที่ใช้สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวม 3 ชนิด ที่มีความเสถียรหรือทนต่อความร้อน สายพันธุ์หม่อนนี้ได้แก่ M5, Morus alba และ S13 พบฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อ *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะ chloremphenicol พบว่าการเสริมฤทธิ์กันในเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบทั้งหมด และหม่อนทุกสายพันธุ์มีฤทธิ์มีความสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *P. aeruginosa* (143)

2.9 หม่อน (Mulberry)

หม่อน มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Mulberry และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus sp.* หม่อนเป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้น แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ หม่อนที่ปลูกรับประทานผล (Black Mulberry, Morus nigra) มีผลโตเป็นช่อ เวลาผลสุกแล้วมีสีดำอมเปรี้ยวอมหวาน ใช้รับประทานและทำแยมได้ อีกชนิดหนึ่งก็คือ หม่อนที่ใช้ปลูกเพื่อเลี้ยงไหม (White Mulberry, Morus alba Linn.) หม่อนชนิดนี้มีผลเป็นช่อเล็ก เมื่อสุกแล้วมีรสเปรี้ยวไม่ค่อยมีผู้รับประทานกัน แต่มีใบโตและมีใบมากใช้เป็นอาหารของไหมได้ดี จากข้อมูล ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ พบว่า หม่อนเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในประเทศจีนและญี่ปุ่นและทางตอนเหนือของประเทศไทยก็มีหม่อนที่ขึ้นตามธรรมชาติ หม่อนจัดได้ว่าเป็นพืชกึ่งเมืองร้อน (Sub-Tropical) แต่สามารถขึ้นในแถบโซนร้อนทั่ว ๆ ไปได้ ฉะนั้นหม่อนจึงขึ้นได้ดีทั่วไปในประเทศไทย (144)

ใบหม่อนมีสาร flonoid phytoestrogen, triterpene , ceramide, mulberroside และน้ำมันหอมระเหย โดยผลการศึกษาพบสาร flavonol glycosides 3 ชนิด คือ quercetin 3-(6-malonyglucoside), rutin (quercetin 3- rutinoside) และ isoquercetin (quercetin 3- glucoside) เป็นองค์ประกอบหลักของสาร LDL antioxidant โดยพบ quercetin 3-(6-malonyglucoside) และ rutin เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในใบหม่อน (145) และใบหม่อนสามารถนำไปทำเป็นชาสำหรับชงน้ำร้อนดื่มโดยจะทำในรูปชาเขียว ชาจีน และชาฝรั่ง หรือรับประทานใบและยอดอ่อนโดยตรงโดยการใส่ในต้ม หรือแกงก็ได้

สารสำคัญในใบหม่อนกลุ่มของสารประกอบ อัลคาลอยล์ ได้แก่ สารดีเอนเจ (1-deoxynojirimycin; DNJ) และอนุพันธ์ ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการย่อยแป้งในทางเดินอาหาร ส่งผลให้การดูดซึมของแป้งลดลง และสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (146) มีผลการวิจัยของนักวิทยาศาสตร์จากหลายทีม พบว่า ใบหม่อนมี DNJ (1-deoxynojirimycin) มีสรรพคุณลดระดับน้ำตาลในเลือด มีสารกาบา (gamma amino-butyric acid) ลดความดันโลหิต (147-149) ใบหม่อนมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบทุกชนิด มีแคลเซียมสูงมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญหลายชนิด เช่น เควอซิติน (quercetin) แคมเฟอรอล (kaempferol) และ รูติน (rutin) มีสารกลุ่มไฟโตสเตอโรล (Phytosterol) ที่ลดไขมันในเลือด อีกทั้งไม่พบผลข้างเคียง จึงปลอดภัยต่อผู้บริโภค (147-149) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ร่วมมือกับคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศึกษาวิจัยพบสารสกัดใบหม่อนมีฤทธิ์ต่อสมรรถภาพทางกายและจิตใจ ทำให้กล้ามเนื้อต้นขามีความแข็งแรง การเรียนรู้ และการจดจำดีขึ้นได้ (151) จากผลการศึกษาวิจัยพบว่า ใบหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำที่เกิดจากความบกพร่องของระบบประสาทโคลิเนอร์จิก (cholinergic) ที่จำลองภาวะความจำบกพร่องในภาวะสูงอายุ และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (152) การทดสอบสารสกัดสำคัญที่ได้จากใบหม่อน นั้น โดยมากแล้วจะพบว่า เมื่อนำมาใช้แล้ว จะทำให้อาการของผู้ป่วยดีขึ้นดังที่ได้กล่าวมา รวมถึงในผู้ป่วยที่มีการอักเสบต่างๆ เช่นกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ป่วย HIV รวมถึงเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ หรือในคนปกติเองก็สามารถช่วยให้มีสุขภาพร่างกายที่ดีขึ้นอีกด้วย (153)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาค้นคว้าสารสกัดจากใบหม่อน เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาเชื้อที่เจริญในโครงสร้างไบโอฟิล์ม ทั้งในศาสตร์นี้ยังมีสนใจค้นคว้าในวงจำกัด จึงมีผลการศึกษาถึงสารสกัดสมุนไพรต่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มได้เป็นจำนวนน้อย เพื่อเป็นการพัฒนาจากองค์ความรู้ที่มี และเป็นแนวทางการพัฒนาวิธีการทดสอบที่จะนำไปสู่การค้นพบสารสกัดสำคัญจากพืชและสมุนไพรต่างๆ ที่มีคุณสมบัติช่วยยับยั้งหรือลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ รวมถึงการขจัดหรือทำลายเชื้อได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ เป็นพืชที่สามารถหาได้ง่าย เจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภาคในประเทศ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
1. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น G-560E	Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
2. เครื่อง Refrigerated Centrifuge รุ่น Universal 320R	Hettich, เยอรมนี
3. ตู้อบ (Forma Orbital Shaker	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น Evolution 300	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
5. ตู้อบ (Incubator) รุ่น INE 300	Memmert, เยอรมนี
6. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Top Open Chest Freezer)	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
7. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
8. เครื่องวัดความขุ่น รุ่น Densimat	BioMérieux, ฝรั่งเศส
9. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Carbinets type A2) Purifier Logic 34408 Series	Labconco, สหรัฐอเมริการุ่น
10. ชุดถ่ายภาพเจล (Molecular Imager Chemidoc XRS)	Bio Rad, สหรัฐอเมริกา
11. ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ electrophoresis (Mupid-exu Electrophoresis System)	Advance, ญี่ปุ่น
12. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น CP2245	Sartorius, เยอรมนี
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler) รุ่น MJ Mini PTC-1148	Bio Rad, สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) NanoDrop รุ่น 1000	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

15. เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น Hiclave HVA-85	Hirayama, ญี่ปุ่น
16. เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-315	Tomy Tech, สหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	**บริษัทและประเทศผู้ผลิต**
1. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร) และ PCR tube (ขนาด 0.2 มิลลิลิตร)	Axygen , สหรัฐอเมริกา
2. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes)	Bibby Sterilin, อังกฤษ
3. Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Continental Lab Products, สหรัฐอเมริกา
4. Pipette tips (ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร)	Axygen,สหรัฐอเมริกา
Autopipette (ขนาด 0.1-2, 2-20 และ 20-200 ไมโครลิตร)	Bio Rad, สหรัฐอเมริกา
5. Pre-sterilized Serological pipette (ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร)	Jet Bio-Filtration Products, แคนาดา
6. Autopipette (ขนาด 0.2-2, 1-10, 20-100 และ 1000 ไมโครลิตร)	Gilson, ฝรั่งเศส
7. Disposable Cuvettes	Plastibrand, เยอรมนี
ไม้พันสำลี	United Medical Instrument, ไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar	OXOID, อังกฤษ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth	OXOID, อังกฤษ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase Soya Agar	OXOID, อังกฤษ
4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypicase Soya Broth	OXOID, อังกฤษ
5. Tryptone	Merck, อังกฤษ
6. Tryptose	Merck, เยอรมนี
7. Agar Bacteriological (Agar No.1)	OXOID, อังกฤษ
8. 2,3,5 – Triphenyltetrazolium chloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
9. Yeast extract	OXOID, อังกฤษ
10. แผ่นยา Amikacin (AK) 30 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
11. แผ่นยา Ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
12. แผ่นยา Ciprofloxacin (CFX) 5 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
13. แผ่นยา Colistin (CL) 10 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
14. แผ่นยา Cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
15. แผ่นยา Gentamicin (GM) 10 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
16. แผ่นยา Imipenem (IPM) 10 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
17. แผ่นยา Levofloxacin (LVX) 5 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
18. แผ่นยา Meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
19. แผ่นยา Cefoperazone/sulbactam (SCFP) 105 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
20. แผ่นยา Piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 ไมโครกรัม	OXOID, อังกฤษ
21. Ethidium bromide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
22. Absolute ethanol	Merck, เยอรมนี
23. Sodium chloride	Ajax Finechem, นิวซีแลนด์
24. Sodium acetate	Merck, เยอรมนี
25. Trizma base, minimum 99.9% titration	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

26. Boric acid, for electrophoresis	SigmaAldrich,สหรัฐอเมริกา
27. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, 99+%	SigmaAldrich, สหรัฐอเมริกา
28. N-Lauroylsarcosine sodium salt, for molecular biology, >=94%	Sigma Aldrich,สหรัฐอเมริก
29. Phenol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริก
30. Chloroform, >=99%, amylenes as stabilizer	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
31. Isoamyalcohol	Ajax Finechem, นิวซีแลนด์
32. Certified Molecular Biology Agarose	Bio Rad, สหรัฐอเมริกา
33. ชุดน้ำยา Taq DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas, แคนาดา
34. dNTP set, molecular biology grade	Fermentas, แคนาดา
35. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, แคนาดา
36.GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, แคนาดา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 ศึกษาแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility test) ของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะทำได้หลายวิธี และวิธีที่นิยมมากที่สุด คือวิธี disc agar diffusion method เนื่องจากสะดวก ประหยัด ใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น และยังเป็นวิธีที่มีมาตรฐานรับรอง โดยการทดลองนี้ได้ปฏิบัติตามมาตรฐานของ The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ปี ค.ศ. 2009 ซึ่งเป็นองค์กรที่กำหนดเกณฑ์มาตรฐานการแปลผลและทดสอบยากับเชื้อจุลชีพก่อโรค (154) ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโดยมีหลักการทดสอบใช้การแพร่ของยา (diffusion) จากแผ่นกระดาษกรองชุบยาต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibiotic disc) ชนิดต่างๆ เมื่อกระดาษกรองติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการลงเชื้ออย่างสม่ำเสมอทั้งผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว เข้าสู่อาหารเพาะเชื้อ ยาในกระดาษกรองจะแพร่กระจายออกไปสู่เนื้อวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นรัศมีโดยรอบแผ่นกระดาษกรองทั้งนี้บริเวณใดที่อยู่ใกล้แผ่นกระดาษจะมีความเข้มข้นของยาสูง และลดลงตามลำดับในบริเวณที่อยู่ห่างออกไป เมื่อทำการอบเชื้อ จะเห็นการเจริญของเชื้อบนผิวของ อาหารวุ้นแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยปริมาณของสารต้านจุลชีพที่บริเวณใด ก็จะไม่มีแบคทีเรียขึ้นที่บริเวณนั้น เกิดเป็นวงว่าง (clear zone) เรียกบริเวณนั้นว่า zone of inhibition (155) เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Trypticase soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เขี่ยเชื้อที่เจริญแบบเดี่ยวๆ ประมาณ 3 โคโลนี เทียบเชื้อที่ต้องการจะทดสอบให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mc Farland Standard เทียบเท่ากับจำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (156) ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้บิดพอหมาด และป้ายให้ทั่วทั้งผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมุนทำมุม 60 องศา และทำซ้ำเช่นเดิม 3 ระนาบ รอจนผิวหน้าแห้ง โดยไม่ควรเกิน 15 นาที แล้วจึงวางแผ่นกระดาษกรอง ซึ่งชุบยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ในความเข้มข้นที่แน่นอน ลงบนผิวอาหารที่เพาะเชื้อไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการวัดการทดสอบโดย ถ้าเชื้อนั้นถูกทำลาย หรือถูกยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะชนิดใดๆ ก็จะเห็นบริเวณใส ๆ หรือ clear zone ไม่มีเชื้อเจริญขึ้นรอบ ๆ กระดาษกรองชุบยาปฏิชีวนะนั้น เรียกบริเวณใส ๆ นี้ว่า inhibition zone โดยยาที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ ciprofloxacin (CFX) 5 ไมโครกรัม, levofloxacin (LVX) 5 ไมโครกรัม, ceptazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม, Amikacin (AK) 30 ไมโครกรัม, gentamicin (GM) 10 ไมโครกรัม, cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม, imipenem (IPM) 10 ไมโครกรัม, meropenem (MEM) 10 ไมโครกรัม, cefoperazone/sulbactam (SCFP) 75/30 ไมโครกรัม, piperacillin/tazobactam (TZP) 100/10 ไมโครกรัม และcolistin (CL) 10 ไมโครกรัม

3.2.2 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa*

ศึกษาหาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อตัวอย่าง 136 สายพันธุ์ ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เขี่ยเชื้อที่เจริญแบบเดี่ยวๆ ประมาณ 3 โคโลนี เทียบเชื้อที่ต้องการจะทดสอบให้มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ใน Trypticase soy broth (TSB) นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วใส่ลง 96 microwell plate sterile หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำการทดสอบเชื้อสายพันธุ์ละ 3 หลุม จากนั้นปิดฝา 96 microwell plate อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำ microwell plate ที่บ่มนานข้ามคืน ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแต่ละสายพันธุ์ โดยดูน้ำเลี้ยงเชื้อออก และล้างด้วยส่วนของ planktonic cell ที่หลงเหลืออยู่ ด้วยน้ำ ทำซ้ำ 2 ครั้งๆ ละ 5 วินาที หากเชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้จะเกาะติดกับผิวของ microwell plate เติม 95% Ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมทดสอบ เพื่อช่วยทำให้เชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มติดแน่นกับผนัง microtiter plate นาน 15 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำ ทำซ้ำ 2 ครั้งๆ ละ 5 วินาที นำ microplate มาย้อมสี 0.1% w/v crystal violet (CV) เพื่อดูความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม โดยย้อมนาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาดจนสีที่เป็นส่วนเกินหลุดออกหมด (ประมาณ 5 ครั้ง) ชะสี Crystal violet ที่ย้อมติดกับไบโอฟิล์มที่เกาะติดกับผนัง microtiter plate ด้วย 95% Ethanol ซึ่งปริมาณสีย้อมติดนั้นจะแปรตามปริมาณของไบโอฟิล์มที่เชื้อสามารถสร้างได้ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ orbital shaker นาน 30 นาที ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณค่าปริมาณการสร้างไบโอฟิล์ม (SBF index) (157)

สูตรการคำนวณ

$$\text{SBF index} = (AB - CW) / (G)$$

กำหนดให้

AB คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของไบโอฟิล์ม

CW คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของตัวควบคุมไม่มีเชื้อ

G คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อที่เจริญหลังจากบ่มข้ามคืน

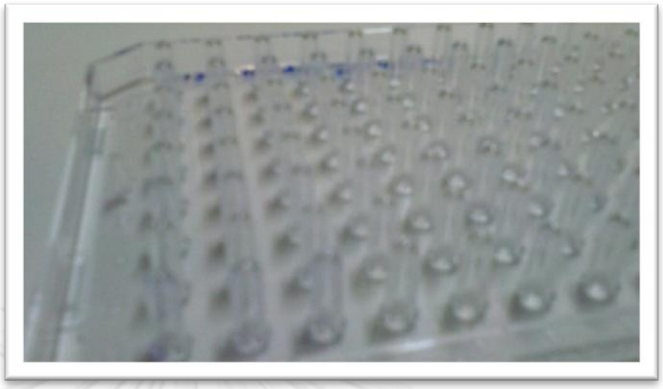
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.3 ทดสอบผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มจากสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์

สารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์นี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 10 % dimethylsulfoxide (DMSO) จากนั้นได้ทำการทดสอบเบื้องต้นในเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 10 สายพันธุ์ (กลุ่มสร้างไบโอฟิล์ม 5 สายพันธุ์ ไม่สร้างไบโอฟิล์ม 5 สายพันธุ์) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ จึงได้ศึกษา ผลกระทบของสารสกัดต่อการสร้างไบโอฟิล์มด้วยการย้อมสี 0.1% crystal violet (CV) ที่คัดเลือกเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน จากกลุ่มตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบถึงความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเบื้องต้นแล้วนั้น จำนวน 24 สายพันธุ์ จากจำนวนเชื้อ 136 สายพันธุ์ ดังนี้ ระดับ negative 6 สายพันธุ์ สายพันธุ์ weak 6 สายพันธุ์ moderate 6 สายพันธุ์ และ strong 6 สายพันธุ์

ศึกษาหาความสัมพันธ์ของการสร้างไบโอฟิล์ม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ เพื่อให้ทราบถึงผลกระทบของสารสำคัญที่ได้จากใบหม่อนเมื่อสกัดด้วยอีเทอร์ ว่าส่งผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไร โดยเลี้ยงเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ใน TSA ที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วใส่ลง 96 well plate sterile หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทั้งนี้ต้องมีการทำการควบคุมการทดสอบด้วย negative control (อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB อย่างเดียว) positive control (เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ไม่มีสารสกัดทดสอบร่วมด้วย) และตัวทดสอบ (เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารสกัดทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ) ทุกการทดสอบจะทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นปิดฝา plate (ที่มีลักษณะพิเศษเป็นง่ามยื่นออกมาจากฝา plate หรือเรียกว่า prong โดยฝา plate ขนาด 96 microwell plate จะมี prong จำนวน 96 อันสำหรับใส่พอดีในแต่ละหลุม) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (เชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างไบโอฟิล์มได้นั้น จะเกาะติดบริเวณพื้นผิว ทั้งรอบๆ prong และหลุมทดสอบ เช่นเดียวกัน) จากนั้นนำฝา plate ชนิดที่มี prong ติดนั้นมาล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) ที่ปราศจากเชื้อ (pH 7.0) ล้างส่วนของ planktonic cell ที่หลงเหลืออยู่ จำนวน 2 ครั้งๆละ 5 วินาที นำฝา plate ชนิดที่มี prong ที่ล้างแล้ว มาวางบน microwell ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำฝา plate ชนิดที่มี prong ทดสอบแล้วนั้นมาล้างด้วย PBS ปราศจากเชื้อ (pH 7.0) เพื่อล้างสารสกัดจากสมุนไพรที่หลงเหลืออยู่ จำนวน 2 ครั้งๆละ 5 วินาที จากนั้นนำฝา plate ชนิดที่มี prong มาทดสอบถึงผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มด้วยการย้อมสี 0.1% crystal violet (CV), ทดสอบถึงผลกระทบต่อการเจริญโดยติดตามจาก 0.005% TTC (2,3,5-

triphenyltetrazolium chloride) และ เปรียบเทียบจำนวนเชื้อเชิงปริมาณ (Quantitative) ด้วยวิธี Spread plate โดยมีรายละเอียดแต่ละวิธีดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.1 : แสดงลักษณะของ 96 microwell plate (prong)

วิธีที่ 3.2.3.1 ทดสอบผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มด้วยการย้อมสี 0.1% crystal violet (CV)

ฝา plate ชนิดที่มี prong เมื่อทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดตามวิธีข้างต้น มาจุ่มลงใน 95% Ethanol เพื่อให้ไบโอฟิล์มเกาะติดกับ prong นาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS ที่ปราศจากเชื้อ (pH 7.0) ทำซ้ำ 2 ครั้งๆละ 5 วินาที จากนั้นย้อมสี Crystal violet (0.1%) เพื่อดูปริมาณการสร้างไบโอฟิล์ม ย้อมสีนาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นจนสีที่เป็นส่วนเกินหลุดออกหมด ชะสี Crystal violet (0.1%) ที่ย้อมติดกับไบโอฟิล์มและเชื้อที่เกาะติดกับ prong ด้วย 95% Ethanol แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ orbital shaker นาน 30 นาที ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader และทดสอบทางสถิติ Wilcoxon signed ranks test เพื่อหาความแตกต่างของปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อที่ได้รับผลกระทบจากสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์

วิธีที่ 3.2.3.2 ทดสอบผลกระทบต่อการเจริญโดย 0.005% TTC (2,3,5-triphenyltetrazo lium chloride)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ผสมกับ 0.005% TTC ในแต่ละหลุมของ 96 microwell plate ที่ปราศจากเชื้อ หลุมละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำฝา plate ชนิดที่มี prong ที่ได้ทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดตามวิธีข้างต้น มาครอบลงบน microwell ที่ได้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำ 96 microwell plate มาวัดค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ผสมกับ 0.005% TTC เป็นตัวควบคุม (blank) และทดสอบทางสถิติ Wilcoxon signed ranks test เพื่อหาความแตกต่างของการเจริญของเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มที่ได้รับผลกระทบจากสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์

<u>วิธีที่ 3.2.3.3</u> เปรียบเทียบจำนวนเชื้อเชิงปริมาณ (Quantitative) ด้วยวิธี Spread plate

ฝา plate ชนิดที่มี prong เมื่อทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดตามวิธีข้างต้น เพื่อทดสอบหาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตอยู่หลังจากทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัด โดยใช้คีมคีบที่ปราศจากเชื้อ (จุ่มลง 95 %Alcohol แล้วนำไปเผาไฟ รอให้เย็น) หัก prong ออกจากฝา plate นำ prong ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้เครื่อง Sonication ทำให้เซลล์ที่เกาะอยู่กับ prong หลุดออก เป็นเวลา 5 นาที ที่ความแรง 40 +/- 2 kHz , 0.22+/- 0.04 W/cm^2 (158) จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ผ่านการ Sonication นี้ไปทำการเจือจางเป็นลำดับ (1:10) นำเชื้อที่เจือจางแล้วในลำดับที่ 10^{-5} – 10^{-8} colony forming units/milliliter (CFU/ml.) มาทดสอบเพื่อหาจำนวนของเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate ใช้ autopipett ดูดเชื้อที่ถูกเจือจางแต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร ลงบน TSB เกลี่ยเชื้อให้ทั่วด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง ทำการทดสอบสามซ้ำต่อความเข้มข้น นำไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นับจำนวนเชื้อที่เจริญในช่วง 30-300 โคโลนีต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ คำนวนจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง และทดสอบทางสถิติ Wilcoxon signed ranks test เพื่อหาความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในสภาวะไบโอฟิล์มของเชื้อที่ได้รับผลกระทบจากสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์

สูตรการคำนวน

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย} = \frac{(n_{x1} + n_{x2} + n_{y1} + n_{y2}) \times \text{Dilution factor}}{\{(\text{ml ของ } n_x \times 2) + \{\text{ml ของ } n_y \times 2/10)\}}$$

กำหนดให้

n_x คือ จำนวนเชื้อที่เจริญในช่วง 30-300 โคโลนีที่ความเจือจางต่ำ

n_y คือ จำนวนเชื้อที่เจริญในช่วง 30-300 โคโลนีที่ความเจือจางสูง

Dilution factor คือ 1/ Dilution

3.2.4 ศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับจีโนไทป์

3.2.4.1 สกัด Chomosomal DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* นำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template)

นำเชื้อจาก Motility medium เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เขี่ยเชื้อที่เจริญเดี่ยวๆ ลงใน TSB 3 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นของเชื้อใน 3 มิลลิลิตร ประมาณ 2 Mcfarland Standard ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microtube นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ มาย่อยผนังเซลล์ด้วยวีธีต้มที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปั่นแยก Chromosomal DNA จากตะกอนเศษเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อปั่นเสร็จให้ดูดน้ำใสส่วนบนซึ่งมี Chromosomal DNA อยู่ ใส่ใน microtube หลอดใหม่ จำนวน 500 ไมโครลิตรตกตะกอน Chromosomal DNA โดยเติม Absolute Ethanol จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีปั่นแยกตะกอน Chromosomal DNA ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น ล้างตะกอน Chromosomal DNA ให้บริสุทธิ์ ด้วย 70 % ethanol ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นปล่อยให้ DNA แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เติม 1X TE solution ลงไป 200 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นของ Chromosomal DNA ที่ได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nano Drop) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นเจือจาง Chromosomal DNA ด้วย 1X TE solution ให้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 30-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.2.4.2 ตรวจสอบหายีน Pellicle (*PelA*), Pseudomonas Quinolone signal (*PqsA*) และ Polysaccharide synthesis licus (*PslA, PslD, PslH*) ในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยใช้ ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส Polymerase chain reaction : PCR

ในการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับโมเลกุล โดยตรวจสอบยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 : แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการ สร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa*

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)	แหล่งอ้างอิง
PelA	PelA-F	5'- CCTTCAGCCATCCGTTCTTCT-3'	118	(159)
	PelA-R	5'- TCGCGTACGAAGTCGACCTT-3'		
PqsA	pqsA-F	5'- CCCGATACCGCCGTTTATCA -3'	448	ในการศึกษานี้
	pqsA-R	5'AACCCGAGGTGTATTGCAGG -3'		
PslA	PslA-F	5'- TGGGTCTTCAAGTTCCGCTC -3'	119	ในการศึกษานี้
	PslA-R	5'- ATGCTGGTCTTGCGGATGAA -3'		
PslD	PslD-F	5'- CTCATGAAACGCACCCTCCT -3'	295	ในการศึกษานี้
	PslD-R	5'- TGCGACCGATGAACGGATAG -3'		
PslH	PslH-F	5'- CAGATGCTGGTCTGGGAGTG -3'	719	ในการศึกษานี้
	PslH-R	5'- GGAACGAAGCCTTGCCATTC -3'		

ทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ชุดน้ำยา Taq DNA Polymerase (Fermentus) และไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ผสมดีเอ็นเอต้นแบบ จำนวน 0.5 ไมโครลิตรกับ 24.5 ไมโครลิตร ของน้ำยาในการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ที่ประกอบด้วย 1x buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.8, 50 mM KCL), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP Mix, 1µM forward และ Reverse primer, 0.625 U Tag DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา คือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ; 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; 52 องศาเซลเซียส 40 วินาที; 72 องศา

เซลเซียส 50 วินาที ;36 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.2.4.3 ตรวจสอบปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที บนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 % ผสมกับ 1X gel red (Invitrogen) จากนั้นนำไปส่องด้วยแสงเหนือม่วงเพื่อวิเคราะห์ภาพเจลจากเครื่อง Gel Documentation System (BIO-RAD)

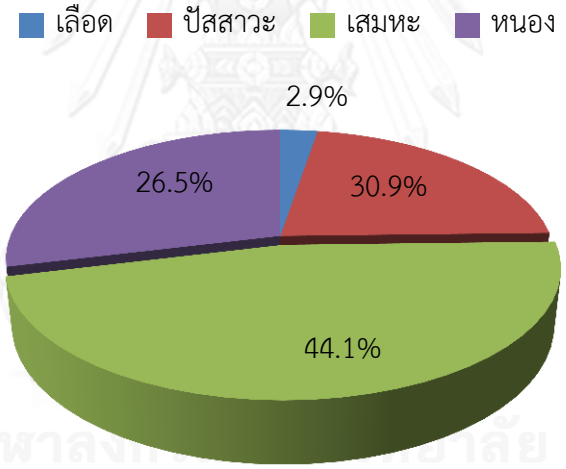
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility test) ของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion

เชื้อ *P. aeruginosa* ที่รวบรวมได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือนเมษายน ปีพุทธศักราช 2552 มีทั้งสิ้น 136 สายพันธุ์ มาจากสิ่งส่งตรวจ 4 ประเภท ได้แก่ เลือด 4/136 (ร้อยละ 2.9), หนอง 40/136 (ร้อยละ 26.5), ปัสสาวะ 35/136 (ร้อยละ 30.9) และ เสมหะ 57/136 (ร้อยละ 44.1) ดังแสดงในรูปที่ 4.1



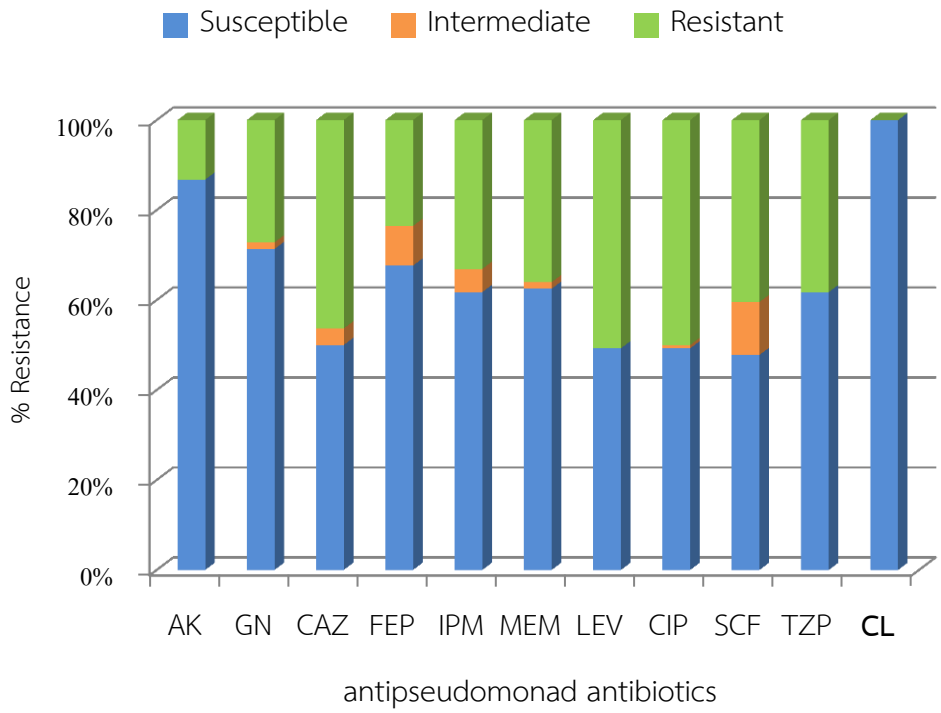
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.1 : แสดงปริมาณ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่รวบรวมได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม-เดือนเมษายน ปีพุทธศักราช 2552 จำนวน 136 สายพันธุ์ โดยจำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ

ผลการศึกษากลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 136 สายพันธุ์ ในแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* (antipseudomonal drugs) 11 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ให้ผลการทดสอบดังนี้

1. กลุ่ม quinolones ประกอบไปด้วย levofloxacin และ ciprofloxacin ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 50.7 และ ร้อยละ 50.0 ตามลำดับ
2. กลุ่ม third generation cephalosporins ซึ่งมี ceftazidime เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างร้อยละ 46.3 ดื้อต่อยาดังกล่าว
3. กลุ่ม β-lactam/inhibitor ซึ่งมี cefoperazone/sulbactam และ piperacillin/tazobactam เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 40.4 และ 38.2 ตามลำดับ
4. กลุ่ม carbapenems ประกอบไปด้วย meropenem และ imipenem ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 36.0 และ ร้อยละ 33.1 ตามลำดับ
5. กลุ่ม fourth generation cephalosporins ซึ่งมี cefepime เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อต่อยาดังกล่าวร้อยละ 23.5
6. กลุ่ม aminoglycoside ประกอบไปด้วยยา gentamicin และ amikacin ผลการทดสอบพบว่า เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยาร้อยละ 27.2 และ 13.2 ตามลำดับ
7. กลุ่ม polymyxin ซึ่งมียา colistin เป็นตัวแทนยาในกลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อทุกตัวมีความไวต่อยาชนิดนี้ (รูปที่ 4.2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.2 : กราฟแสดงร้อยละแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 11 ชนิด amikacin (AK), gentamicin (GN), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), levofloxacin (LEV), ciprofloxacin (CIP), cefoperazone/sulbactam (SCF), piperacillin/tazobactam (TZP) และ colistin (CL) ของกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 136 สายพันธุ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa*

ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ทั้ง 136 สายพันธุ์ โดยการย้อมด้วย 0.1% crystal violet ซึ่งสีที่ย้อมติดนั้นจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นจากเชื้อทดสอบ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะให้ผลที่สอดคล้องกับปริมาณของไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้น ผลการทดสอบที่ได้ยังมีความแม่นยำไม่เพียงพอ สามารถตรวจวัดได้ในเชิง semi-quantitative เท่านั้น (160) แต่เนื่องด้วยวิธีนี้ง่ายและสะดวกสามารถทำซ้ำได้ จึงนิยมใช้ในการทำ screening test และในกรณีที่มีตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก ทั้งนี้สามารถพิจารณาจากค่า SBF Index (161) ซึ่งบ่งชี้ปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* ออกเป็น 4 ระดับ ตามค่า SBF index ดังนี้

ค่า SBF index ในระดับ strong activity (มีค่า SBF index > 1.1)

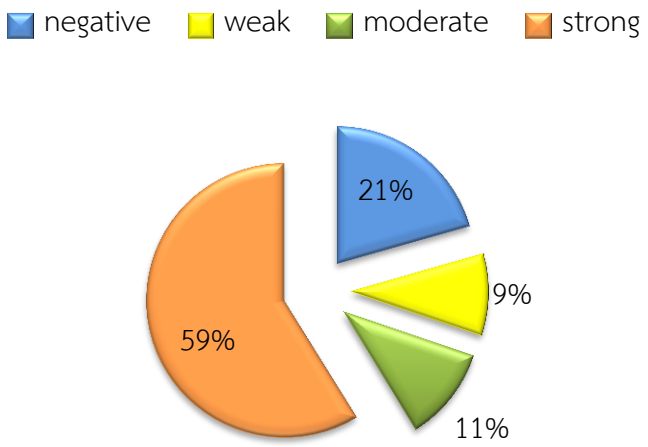
ค่า SBF index ในระดับ moderate activity (มีค่า SBF index ตั้งแต่ 0.7 ถึง 1.1)

ค่า SBF index ในระดับ weak activity (มีค่า SBF index ตั้งแต่ 0.35 ถึง 0.7)

ค่า SBF index ในระดับ negative activity (มีค่า SBF index < 0.35)

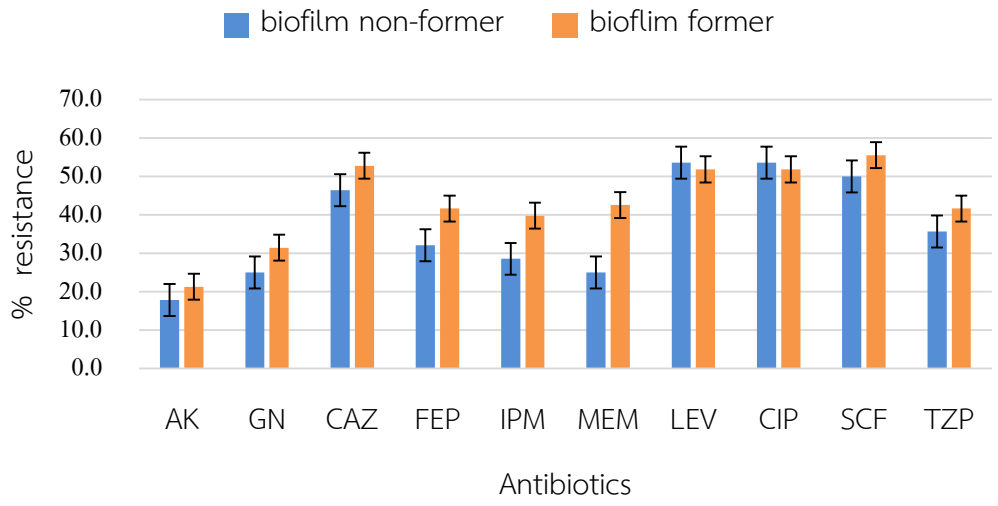
จากผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทั้ง 4 ชนิด จำนวน 136 สายพันธุ์ พบว่ามีคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มปริมาณแตกต่างกัน (รูปที่ 4.3) โดยระดับ strong มีมากที่สุดถึงร้อยละ 59 (80/136) ส่วนในระดับ weak และ moderate มีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน คือร้อยละ 9.6 (13/136) และร้อยละ 11.0 (15/136) ตามลำดับ เชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยมากและจัดอยู่ในกลุ่ม negative มีจำนวนร้อยละ 21 (28/136) ผลการทดสอบนี้ทำให้ทราบถึงความหลากหลายในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



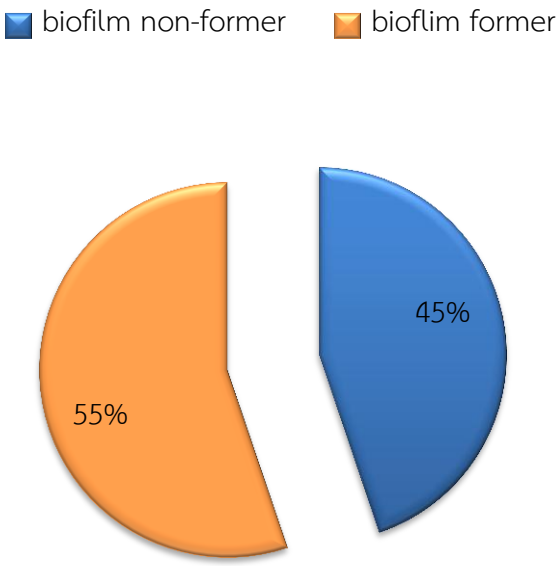
รูปที่ 4.3 แสดงจำนวนร้อยละของ *P. aeruginosa* ตามคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์ม โดยพิจารณาจากค่า SBF Index บ่งชี้ปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* เป็น 4 ระดับ negative (SBF index < 0.35), weak (SBF index ในช่วง 0.35 ถึง 0.7), moderate (SBF index ในช่วง 0.7 ถึง 1.1), และ strong (SBF index > 1.1)

เมื่อทำการเปรียบเทียบเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการรักการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 11 ชนิด นี้พบว่ากลุ่มของเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มแสดงผลดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่ากลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม ดังนี้ amikacin (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 17.9, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 21.3) , gentamicin (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 25.0, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 31.5), ceftazidime (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 46.4, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 52.8), cefepime (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 32.1, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 41.7), imipenem (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 28.6, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 39.8), meropenem (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 25.0, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 42.6), cefoperazone/ sulbactam (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 50.0, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 55.6.3), piperacillin/tazobactam (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 35.7, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 41.7), และ colistin (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 17.9, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 21.3) ยกเว้นยาในกลุ่ม quinolones ทั้งสองชนิด ได้แก่ levofloxacin (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 53.6, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 51.9) และ ciprofloxacin (กลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 53.6, กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มร้อยละ 51.9) (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 : กราฟแสดงร้อยละโดยจำแนกเป็นกลุ่มที่สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm former, biofilm non-former) ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ10 ชนิด amikacin (AK), gentamicin (GN), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), levofloxacin (LEV), ciprofloxacin (CIP), cefoperazone/sulbactam (SCF) และ piperacillin/tazobactam (TZP)

จากผลการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นพบว่ามีเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งจัดว่าเชื้อกลุ่มนี้เป็นชนิด multidrug resistant *P. aeruginosa* (162) จำนวน 69 สายพันธุ์จาก 136 สายพันธุ์ และเมื่อนำเฉพาะกลุ่ม MDR *P. aeruginosa* มาพิจารณาร่วมกับการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้นั้น มีจำนวนร้อยละ 55 ซึ่งมากกว่าเชื้อที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม ที่มีจำนวนร้อยละ 45 ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 : แสดงสัดส่วนร้อยละของเชื้อ multidrug resistant *P. aeruginosa* (MDR *P. aeruginosa*) จำแนกเป็นกลุ่มที่สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm former, biofilm non-former)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

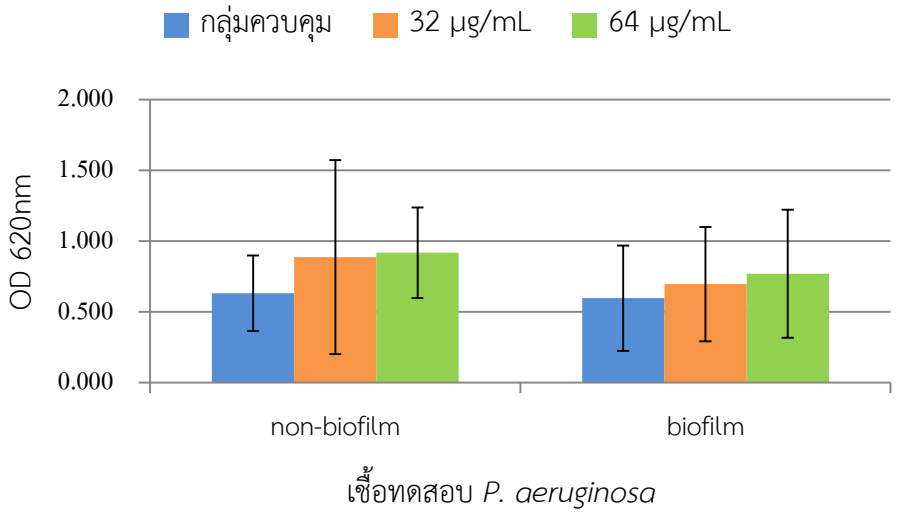
4.3 ทดสอบผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มจากสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์

คัดเลือกเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกันจากกลุ่มตัวอย่างได้ทำการทดสอบถึงความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเบื้องต้นแล้วนั้น จำนวน 24 สายพันธุ์ จากจำนวนเชื้อ 136 สายพันธุ์ ดังนี้ ระดับ negative 6 สายพันธุ์ สายพันธุ์ weak 6 สายพันธุ์ moderate 6 สายพันธุ์ และ strong 6 สายพันธุ์

4.3.1 ผลกระทบของสารสกัดต่อการสร้างไบโอฟิล์มด้วยการย้อมสี 0.1% crystal violet (CV)

ผลการทดสอบย้อมสีปริมาณไบโอฟิล์ม ที่เกาะติดกับ prong โดยเปรียบเทียบกลุ่มทดสอบ (เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับตัวควบคุม (เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ) เมื่อเปรียบเทียบจากค่า OD_{620nm} ผลการทดสอบนี้พบว่าสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์นั้นไม่สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อที่ได้สร้างขึ้นมาแล้วลงได้ และยังทำให้เกิดการกระตุ้นให้เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้เพิ่มมากขึ้น แตกต่างกันตามสายพันธุ์ โดยเฉพาะในเชื้อกลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์มนั้น พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้นกว่ากลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์ม เมื่อทดสอบทางสถิติ (Wilcoxon Signed Ranks test) ไม่พบความแตกต่างของปริมาณไบโอฟิล์มเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณของไบโอฟิล์มกลับเพิ่มมากขึ้นโดยมีนัยสำคัญ (p-value <0.000) เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.6)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

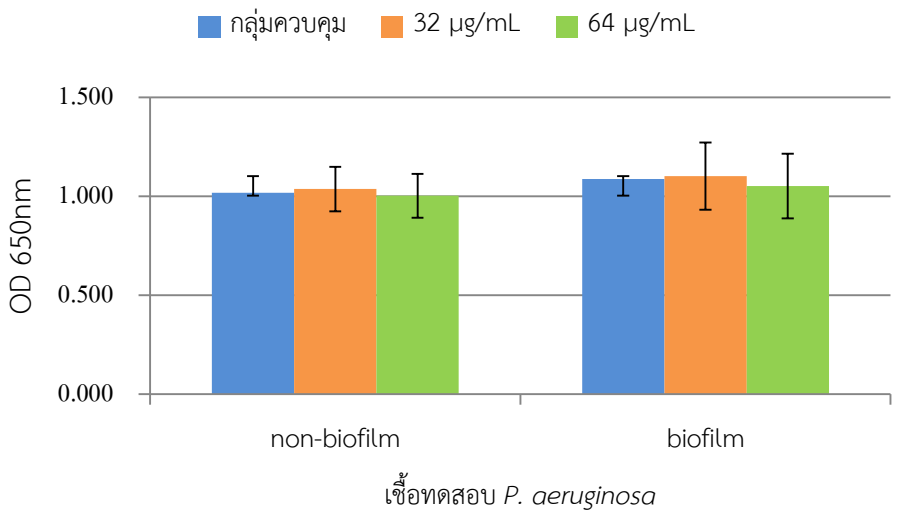


รูปที่ 4.6 แสดงค่า OD_{620nm} บ่งชี้ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 24 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm, non-biofilm) ทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง)

4.3.2 ผลกระทบของสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ต่อการเจริญโดยตรวจสอบจาก 0.005% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 24 สายพันธุ์ โดยนำฝาปิดชนิดมี prong ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มและเกาะติดกับ prong นั้นแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชะล้างเชื้อที่ไม่ได้เกาะติดเป็นไบโอฟิล์ม (planktonic cells) ออก ทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSB) ใหม่ที่ผสมกับ 0.005% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) เพื่อติดตามการเจริญใน 96 well microplate ที่ปราศจากเชื้อ อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน24 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยเครื่อง ELISA Reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร ผลการทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะไบโอฟิล์มในสารสกัดทั้งสองความเข้มข้นนั้นพบการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งกลุ่มเชื้อสายพันธุ์สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม การทดสอบทางสถิติ (Wilcoxon Signed Ranks test) ก็ไม่พบความ

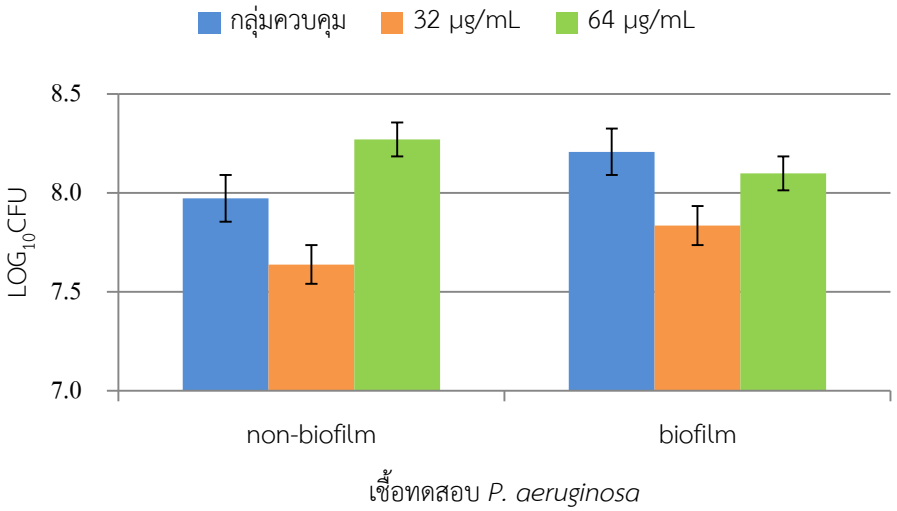
แตกต่างของปริมาณไบโอฟิล์มเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ (p-value > 0.05) (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 แสดงค่า OD_{650nm} บ่งชี้การเจริญโดยมี 0.005% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) เป็นตัวชี้วัดค่า metabolic activity ของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 24 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm, non-biofilm) ทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง)

4.3.3 ผลเปรียบเทียบจำนวนเชื้อเชิงปริมาณ (Quantitative) ด้วยวิธี Spread plate หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารทดสอบที่มีสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำส่วนฝา plate ที่มี prong ติดนั้นมาล้าง และหักแยก prong แต่ละอันออกด้วยคีมที่ทำให้ปราศจากเชื้อ ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตและเกาะติดกับผิวของ prong โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) เป็นเวลา 5 นาที ที่ความแรง 40 +/-2kHz , 0.22+/- 0.04 W/cm^2 ความถี่ที่เลือกใช้นี้ไม่มีผลกระทบหรือทำลายเชื้อที่มีชีวิต (163) นำ TSB มาเจืองจางในสัดส่วน (1:10) เป็นลำดับ เพื่อนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate ซึ่งการทดสอบนี้ได้ทำ 3 ซ้ำ เมื่ออบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จึงนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (CFU/mL) จากผลการทดสอบพบว่า ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดจำนวนเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มลงได้อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดสอบทางสถิติ

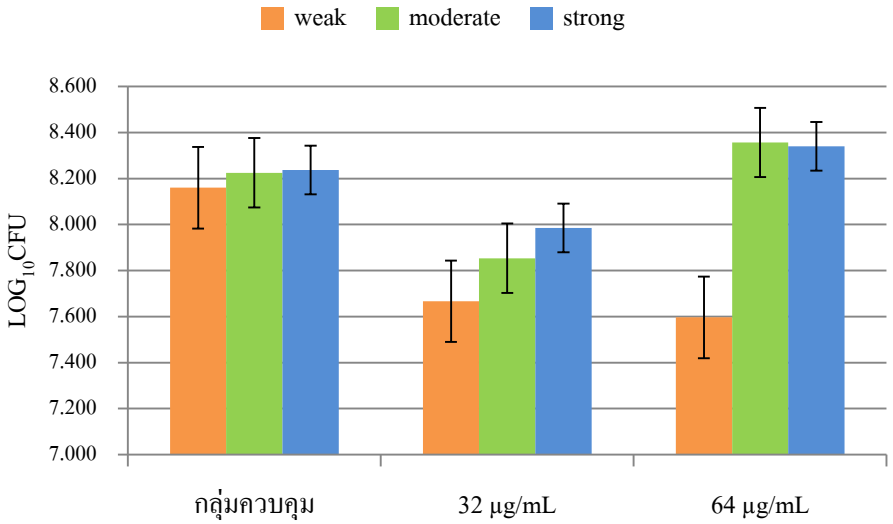
(Wilcoxon Signed Ranks test) แสดงค่า p-value =0.001 แต่สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลแตกต่างกันระหว่างเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มกับไม่สร้างไบโอฟิล์ม พบว่าเชื้อที่ไม่สร้างไบโอฟิล์มนั้นมีจำนวนเชื้อเพิ่มมากขึ้นในขณะที่เชื้อกลุ่มสร้างไบโอฟิล์มกลับให้ผลลดลง แต่เมื่อทดสอบทางสถิติ (Wilcoxon Signed Ranks test) ไม่ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 แสดงจำนวนของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 24 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm, non-biofilm) ทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง)

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบในเฉพาะกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มโดยจำแนกตามระดับความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มพบว่าเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มทั้งสามระดับนั้นจะมีจำนวนลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเชื้อทั้งที่สร้างไบโอฟิล์มทั้งสามจะตอบสนองต่อสารสกัด ณ ความเข้มข้นนี้แตกต่างกัน (รูปที่4.9) ดังนี้กลุ่มตัวอย่างที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำ (weak) นั้นจะมีจำนวนลดลงมากที่สุด พบจำนวนเชื้อสูงขึ้นในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง (moderate) และพบว่าในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strong) นั้นมีจำนวนเชื้อลดลงน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นเป็น 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กลับพบเพียงเชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำเท่านั้นที่ยังคงได้รับผลกระทบต่อสารสกัด พบจำนวนเชื้อที่มีชีวิตลดลงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพียง

เล็กน้อย ในขณะที่กลุ่มเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับปานกลางถึงมากนั้นกลับพบเชื้อจำนวนมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม

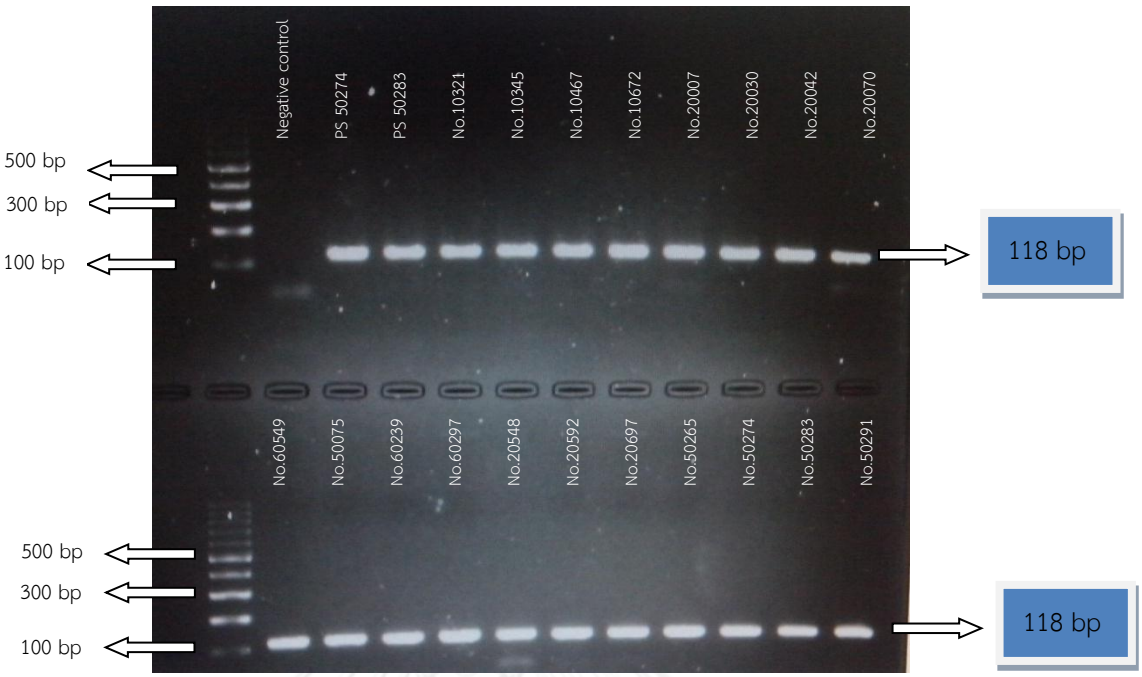


รูปที่ 4.9 แสดงจำนวนของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 18 สายพันธุ์ โดยแบ่งตามระดับการสร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำ (weak), ปานกลาง (moderate) และสูง (strong) เมื่อทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยมีกลุ่มควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อตัวอย่าง)

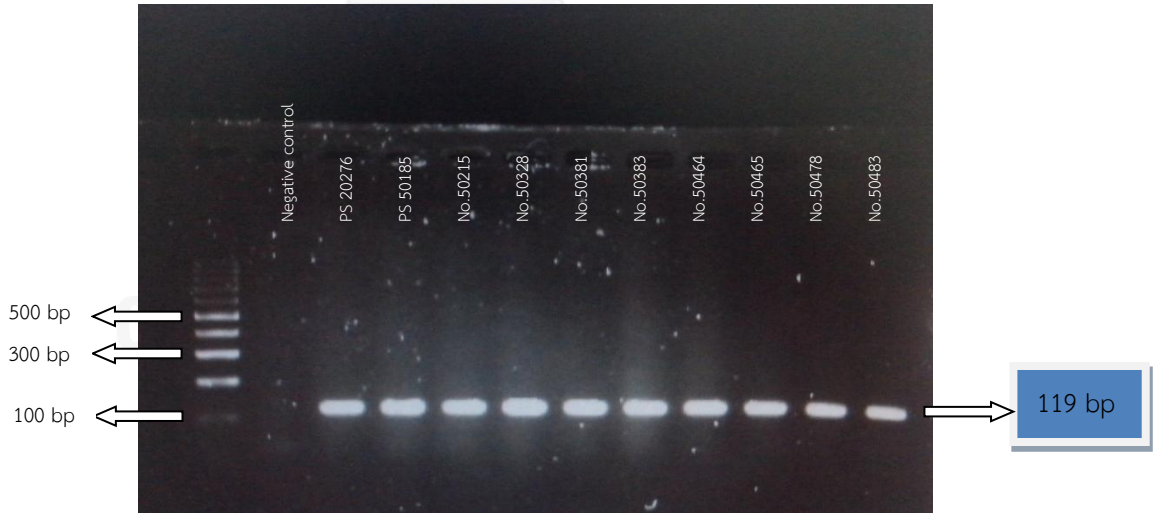
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4 ศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ในระดับจีโนไทป์

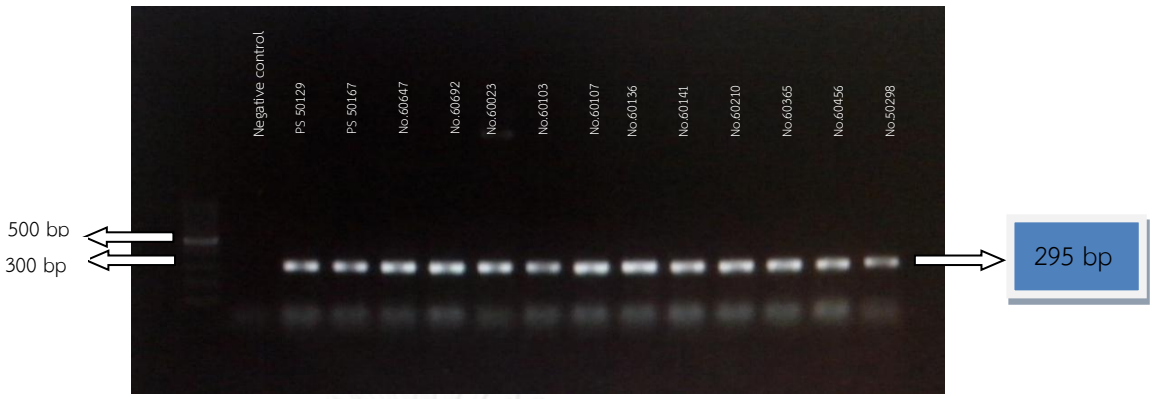
ผลการตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยในการศึกษานี้ได้เลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มดังนี้ ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกาะติดและเกี่ยวข้องในการสร้าง EPS คือ Polysaccharide synthesis licus (*psl* gene) ที่ภายในโอเปอร์รอน (operon) ประกอบด้วยยีน 15 ชนิด คือ ยีน *PslA – PslO* (PA 2231-2245) ยีน *PslA* (PA 2231) มีความสำคัญในกระบวนการ initiation และ attachment ยีน *PslD* (PA 2234) มีความสำคัญโดยหลั่งโปรตีนเพื่อช่วยในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม ยีน *PslH* (PA 2238) มีความสำคัญในกระบวนการ attachment พบว่า ยีนทั้งสามชนิดนี้สามารถตรวจพบได้ในเชื้อ P. aeruginosa ทั้งสายพันธ์ที่สามารถสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (164, 165), เมื่อพัฒนาโครงสร้างไบโอฟิล์มจนเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องคือ ยีน Pellicle (*Pel* gene) ที่ภายในโอเปอร์รอน (operon) ประกอบด้วยยีน 7 ชนิด คือ ยีน *PelA – PelG* (PA 3064-3058) ที่พบว่า ยีน *PelA* (PA 3064) มีส่วนที่เกี่ยวข้องในการทำงานของโครงสร้าง คือ ผนังเซลล์ ไลโพโพลีแซคคาไลน์ และการสร้างแคปซูลของเชื้อ ยีนนี้มีส่วนสำคัญ คือ บริเวณของโปรตีนที่ได้รับการอนุรักษ์ (conserved protein) ที่ช่วยในการสังเคราะห์โปรตีนที่หลั่งออกจากเซลล์ ยีนนี้ยังเกี่ยวข้องกับการสร้าง EPS ในกระบวนการสร้างและพัฒนาไบโอฟิล์มรวมถึงควบคุมการแสดงออกทาง phenotype (166, 167) และยีน Pseudomonas Quinolone signal (*Pqs* gene) ที่ภายในโอเปอร์รอน (operon) ประกอบด้วยยีน 5 ชนิด คือ ยีน *PslA – PslE* (PA 0996-0100) ที่พบว่า ยีน *pqsA* (PA 0996) มีส่วนสำคัญในการส่งสัญญาณสื่อสารกันของเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มและเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค (168-170) ผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและตรวจสอบด้วยไพรเมอร์มีดังนี้ ตรวจสอบยีน *pelA* ด้วยไพรเมอร์ pelA-F และ pelA-R ที่มีขนาด 118 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่4.10, ตรวจสอบยีน *pslA* ด้วยไพรเมอร์ pslA-F และ pslA-R ที่มีขนาด 119 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่4.11, ตรวจสอบยีน *pslD* ด้วยไพรเมอร์ pslD-F และ pslD-R ที่มีขนาด 295 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่4.12, ตรวจสอบยีน *pslH* ด้วยไพรเมอร์ pslH-F และ pslH-R ที่มีขนาด 172 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่4.13 และตรวจสอบยีน *pqsA* ด้วยไพรเมอร์ pqsA-F และ pqsA-R ที่มีขนาด 448 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่าจากเชื้อตัวอย่าง 136 สายพันธุ์ ส่วนมากพบยีนที่เกี่ยวข้อง *pelA* (ร้อยละ 97.8), *pslA* (ร้อยละ 94.9), *pslD* (ร้อยละ 97.1) และ *pslH* (ร้อยละ 97.1) ต่างจากยีน *pqsA* ที่พบเพียงร้อยละ 43.4 จากตัวอย่างเชื้อทั้งหมด (รูปที่ 4.15)



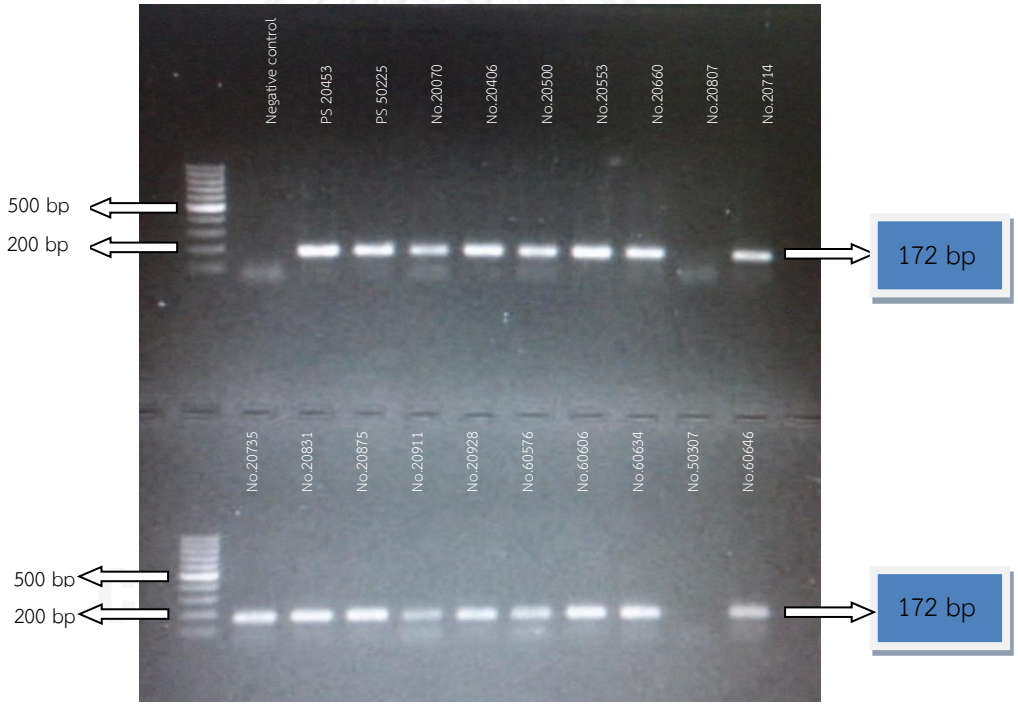
รูปที่ 4.10 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pelA-F และ pelA-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ซึ่งมีเชื้อ *P. Aeruginosa* pelA No.50283 และ No. 50274 เป็นเชื้อควบคุม



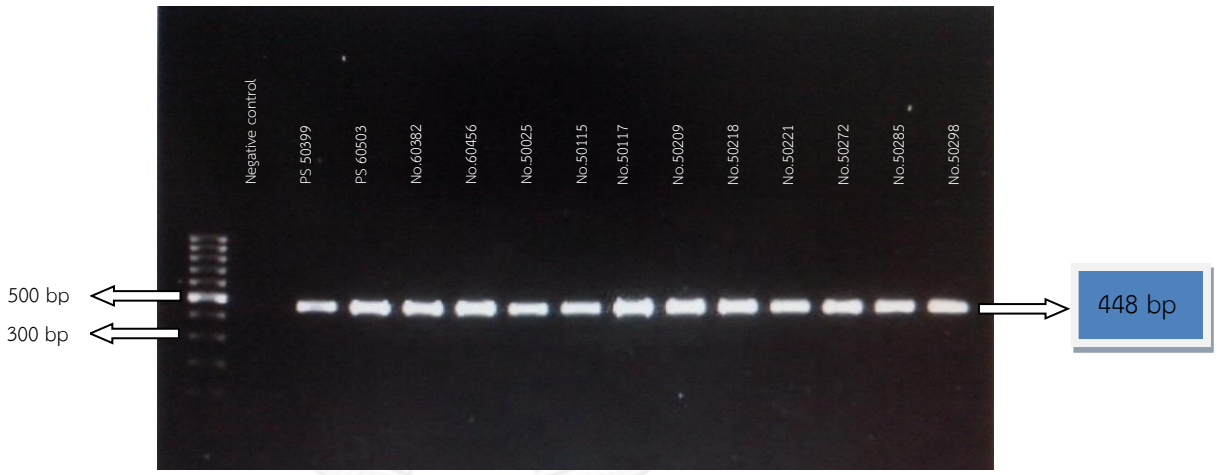
รูปที่ 4.11 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pslA-F และ pslA-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa* pslA No.20276 และ No. 50185 เป็นเชื้อควบคุม



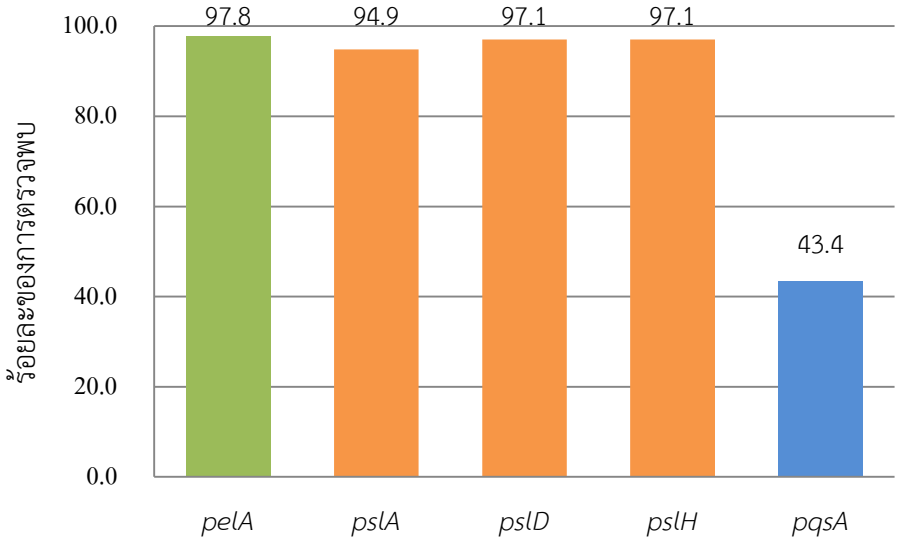
รูปที่ 4.12 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pslD-F และ pslD-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa* pslD No.50129 และ No. 50167 เป็นเชื้อควบคุม



รูปที่ 4.13 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pslH-F และ pslH-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa* pslH No.20453 และ No. 50225 เป็นเชื้อควบคุม

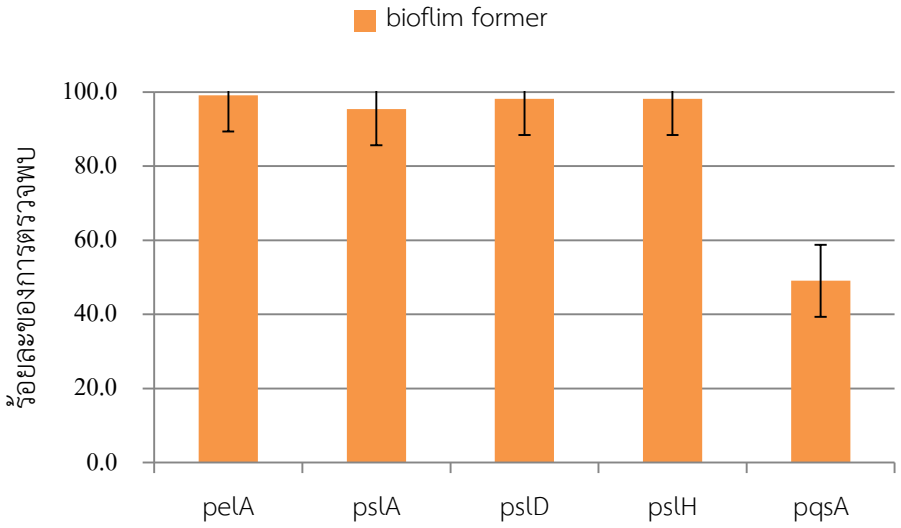


รูปที่ 4.14 แสดงผลจากการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ ไพรเมอร์ pqsA-F และ pqsA-R ทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่มตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ซึ่งมีเชื้อ *P. aeruginosa* pqsA No.50399 และ No. 60503 เป็นเชื้อควบคุม



รูปที่ 4.15 แสดงร้อยละของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ โดยตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD, pslH* และ *pqsA*

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิดนี้(รูปที่ 4.16) พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 136 สายพันธุ์ ที่ตรวจพบยีน *pelA, pslA, pslD* และ *pslH* เป็นจำนวนมาก และเมื่อพิจารณาร่วมกับจำนวนเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm former) จำนวน 108 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้นั้นเกือบทุกสายพันธุ์จะตรวจพบยีนเกี่ยวข้อง *pelA* (ร้อยละ 99.1), *pslA* (ร้อยละ 95.4), *pslD* (ร้อยละ 98.1) และ *pslH* (ร้อยละ 98.1) นี้ แต่ผลทดสอบทางสถิติ (Fisher's Exact Test)ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value > 0.05) สำหรับยีน *pqsA* ตรวจพบในเชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มเพียงร้อยละ 49.1 และเป็นที่น่าสนใจที่ยีนนี้ให้ผลทดสอบพบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติ (p-value =0.009) ระหว่างการสร้างไบโอฟิล์มและการตรวจพบยีนนี้ ดังแสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.16 แสดงร้อยละของเชื้อตัวอย่าง *P. aeruginosa* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (biofilm former) โดยจำแนกตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD, pslH* และ *pqsA*

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ทั้งหมด จำนวน 136 สายพันธุ์ โดยจำแนกเป็นกลุ่มเชื้อที่สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm former, biofilm non-former) ตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD*, *pslH* และ *pqsA*

ยีนที่เกี่ยวข้อง	No (%) of *P. aeruginosa* isolates (136)		p-value
	Biofilm former (n=108)	Biofilm non-former (n=28)	
pelA	107 (99.1%)	26 (92.9%)	0.108
pslA	103 (95.4%)	26 (92.9%)	0.663
pslD	106 (98.1%)	26 (92.9%)	0.188
pslH	106 (98.1%)	26 (92.9%)	0.188
pqsA	53 (49.1%)	6.0 (21.4%)	0.009*

*มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fisher's Exact test)

จากผลทดสอบที่บ่งชี้ว่าเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้นั้นจะตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องดังที่กล่าวข้างต้น ทางผู้วิจัยจึงพิจารณาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบเชื้อที่มีความสามารถสร้างไบโอฟิล์มในระดับที่แตกต่างกันทั้งสามระดับดังนี้ ระดับต่ำ (weak), ปานกลาง (moderate) และสูง (strong) พบว่ายีน *pelA, pslA, pslD* และ *pslH* พบในเชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำและปานกลาง ทั้งนี้ในสองกลุ่มนี้มีจำนวนตัวอย่างเพียง 13 และ 15 สายพันธุ์ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับสูงมีจำนวนมากถึง 80 สายพันธุ์ ทำให้มีผลที่แตกต่างไปบางสายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามยังสามารถตรวจพบยีนทั้งสี่ชนิดนี้มากกว่า 90% ของกลุ่มตัวอย่างนี้ สำหรับยีน *pqsA* ที่ตรวจพบ 59 สายพันธุ์ นั้นพบการกระจายตัวไปตามเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับที่แตกต่างกัน โดยพบมากที่สุดในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มระดับต่ำ (69.2%) ระดับปานกลาง (53.3%) และพบสัดส่วนน้อยที่สุดในกลุ่มเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับสูง (45.0%) ดังรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนและร้อยละของเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ทั้งหมด จำนวน 136 สายพันธุ์ โดยจำแนกเป็นกลุ่มเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์ม 108 สายพันธุ์ ดังนี้ ระดับต่ำ (weak) 13 สายพันธุ์ ปานกลาง (moderate) 15 สายพันธุ์ และสูง (strong) 80 สายพันธุ์ ตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD*, *pslH* และ *pqsA*

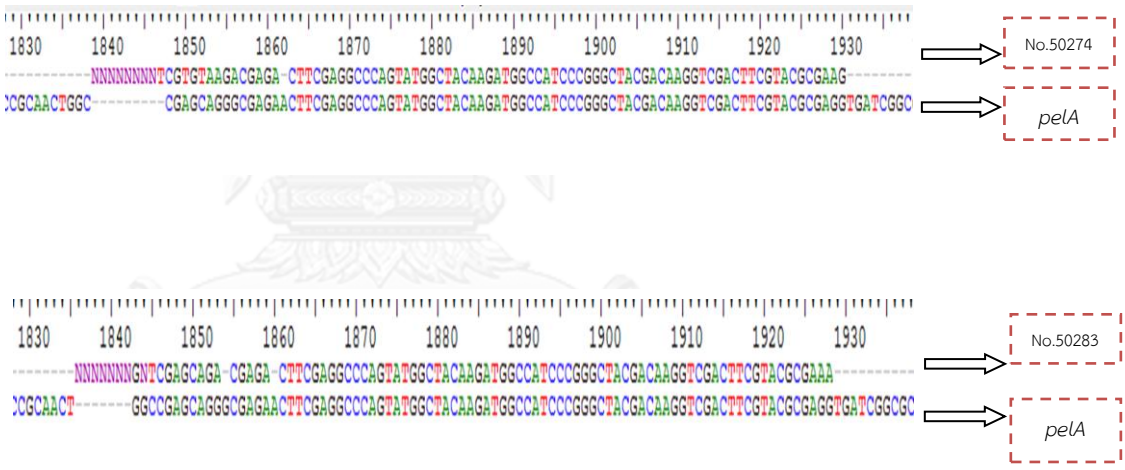
ยีนที่เกี่ยวข้อง	จำนวนเชื้อ 136สายพันธุ์	จำนวนเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์ม 108สายพันธุ์	ระดับการสร้างไบโอฟิล์ม		
			Weak 13 สายพันธุ์	Moderate 15 สายพันธุ์	Strong 80 สายพันธุ์
pelA	133/136 (97.8%)	107/108 (99.1%)	13/13 (100%)	15/15 (100%)	79/80 (98.8%)
pslA	129/136 (94.9%)	103/108 (95.4%)	13/13 (100%)	15/15 (100%)	75/80 (93.8%)
pslD	132/136 (97.1%)	106/108 (98.1%)	13/13 (100%)	15/15 (100%)	78/80 (97.5%)
pslH	132/136 (97.1%)	106/108 (98.1%)	13/13 (100%)	15/15 (100%)	78/80 (97.5%)
pqsA	59/136 (43.4%)	53/108 (49.1%)	9/14 (69.2%)	8/15 (53.3%)	36/80 (45.0%)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *P. aeruginosa*

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยในการศึกษานี้ได้เลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ *pelA*, *pslA*, *pslD*, *pslH* และ *pqsA*

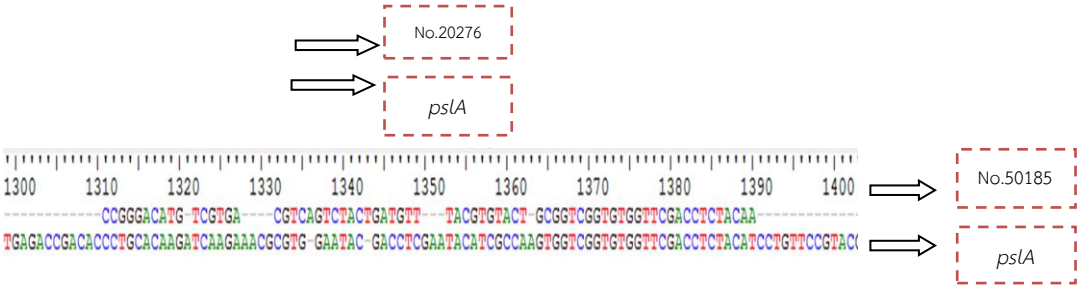
4.5.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pelA* มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อตัวอย่าง No.50274 และ No.50283 มียีน *pelA* (gi|110645304) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งอยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 3433891-3431045 ดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 : แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.50274 และ No.50283 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pelA* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304)

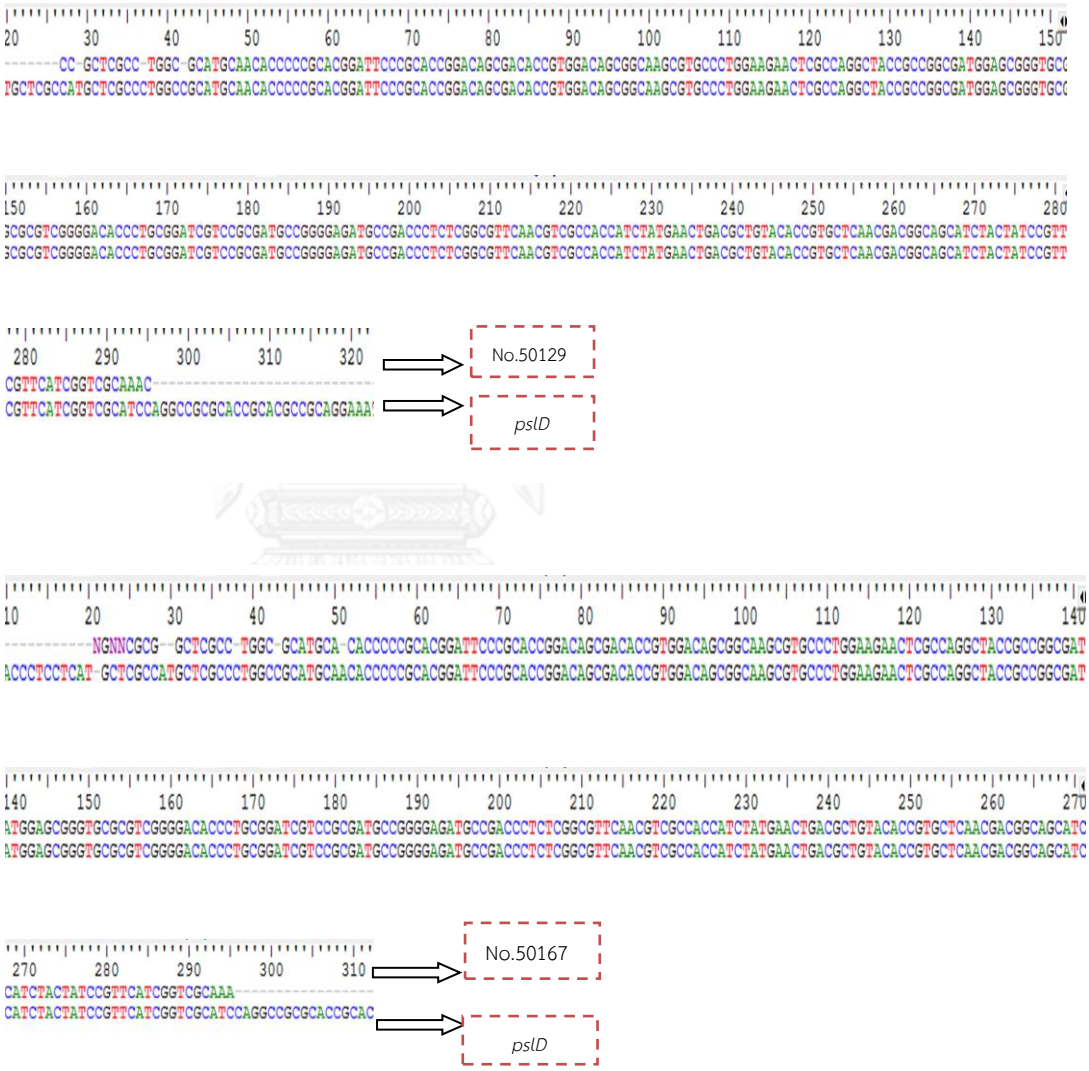
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.5.2 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pslA* มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อตัวอย่าง No.20276 และ No.50185 มียีน *pslA* (gi|110645304) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งอยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 2453667-2455103 ดังแสดงในภาพที่ 4.18



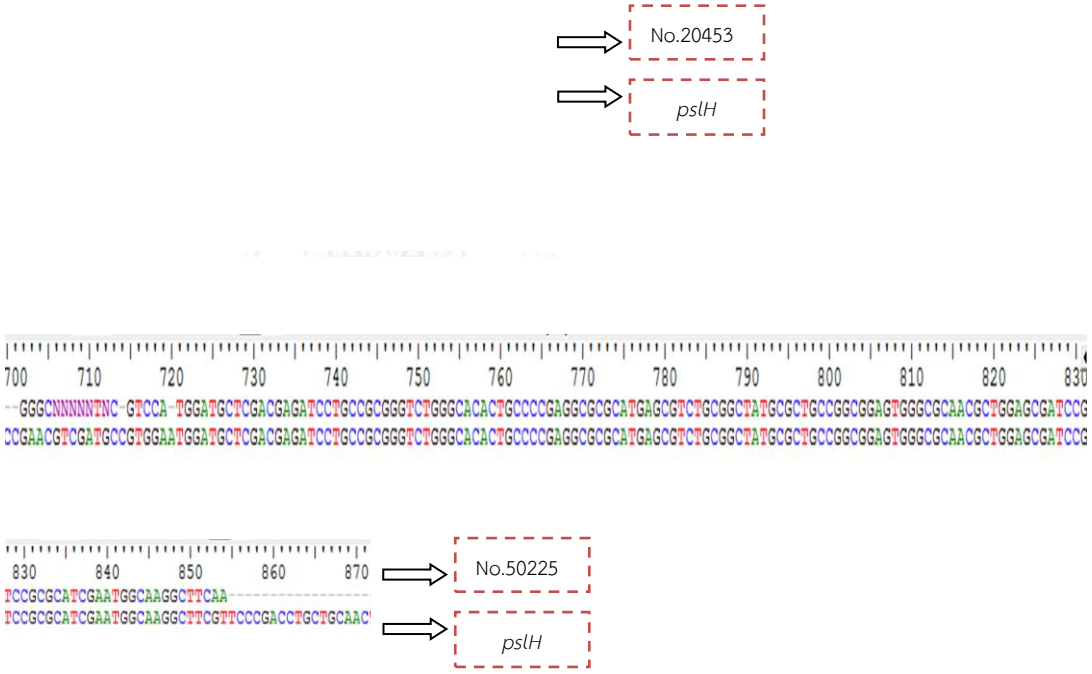
รูปที่ 4.18 : แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.20276 และ No.50185 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pslA* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304)

4.5.3 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pslD* มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อตัวอย่าง No.50129 และ No.50167 มียีน *pslD* (gi|110645304) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งอยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 2457510-2458280 ดังแสดงในภาพที่ 4.19



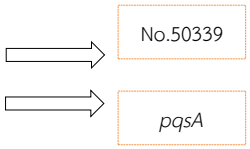
รูปที่ 4.19 : แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.50129 และ No.50167 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pslD* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304)

4.5.4 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pslH* มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อตัวอย่าง No.20453 และ No.50225 มียีน *pslH* (gi|110645304) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งอยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 2462797-2464005 ดังแสดงในภาพที่ 4.20

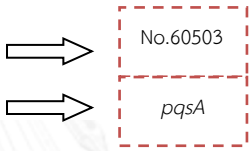


รูปที่ 4.20 : แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.20453 และ No.50225 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pslD* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304)

4.5.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pqsA* มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อตัวอย่าง No.50399 และ No.60503 มียีน *pqsA* (gi|110645304) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งอยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 1078462-1080015 ดังแสดงในภาพที่ 4.21



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.21 : แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *P. aeruginosa* No.50399 และ No.60503 เมื่อเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน *pqsA* ในฐานข้อมูล NCBI (gi|110645304)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมีนาคม - เดือนเมษายน ปีพุทธศักราช 2552 รวม 136 สายพันธุ์ มาจากสิ่งส่งตรวจ 4 ประเภท ได้แก่ เลือด 4/136 (ร้อยละ 2.9), หนอง 40/136 (ร้อยละ 26.5), ปัสสาวะ 35/136 (ร้อยละ 30.9) และ เสมหะ 57/136 (ร้อยละ 44.1) พบแบบแผนความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* โดยเชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อยากลุ่ม quinolones สูงที่สุดคือ levofloxacin ร้อยละ 50.7 และ ciprofloxacin ร้อยละ 50.0 รองลงมาคือกลุ่ม third generation cephalosporins ได้แก่ ceftazidime ร้อยละ 46.3 แต่เป็นที่น่าสนใจในกลุ่ม fourth generation cephalosporins ซึ่งมี cefepime เชื้อกลุ่มตัวอย่างมีอัตราการดื้อต่อยาที่ต่ำคือร้อยละ 23.5 ยากลุ่ม aminoglycoside ได้แก่ amikacin พบว่ามีอัตราการดื้อยาเพียงร้อยละ 13.2 และยาในกลุ่ม polymyxin คือ colistin ที่เชื้อทุกตัวมีความไวต่อยาชนิดนี้ การสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 136 สายพันธุ์ จากสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน เมื่อย้อมด้วย 0.1% crystal violet และพิจารณาจำแนกโดยใช้เกณฑ์จากค่า SBF Index พบว่ามีคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์ม ระดับ strong มีมากที่สุดถึงร้อยละ 59 (80/136) ในระดับ weak และ moderate มีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน คือร้อยละ 9.6 (13/136) และร้อยละ 11.0 (15/136) เชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยมากและจัดอยู่ในกลุ่ม negative มีจำนวนร้อยละ 21 (28/136) ทั้งนี้พบว่าเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้จะมีแนวโน้มของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่ากลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม โดยเฉพาะเมื่อทดสอบกับยากลุ่ม carbapenems ได้แก่ imipenem พบว่ากลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์มดื้อต่อยาร้อยละ 28.6 ในขณะที่กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มได้พบดื้อต่อยา imipenem ร้อยละ 39.8 และในส่วนของยา meropenem พบว่ากลุ่มไม่สร้างไบโอฟิล์ม ดื้อต่อยาเพียงร้อยละ 25.0 แต่กลุ่มสร้างไบโอฟิล์มได้มีอัตราการดื้อต่อยา meropenem ถึงร้อยละ 42.6 จึงเป็นที่บ่งชี้ได้ว่าเชื้อกลุ่มที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้นั้นจะมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าเชื้อที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม อย่างไรก็ตามความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มนั้นกลับไม่สอดคล้องกับการดื้อยาในกลุ่ม quinolones ที่พบการดื้อในสัดส่วนสูงที่สุดของกลุ่มตัวอย่างนี้ ร้อยละของเชื้อกลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์มและกลุ่มที่สร้างไบโอ

ฟิล์มของทั้ง levofloxacin และ ciprofloxacin เป็นร้อยละ 53.6 และร้อยละ 51.9 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาในกลุ่มเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 กลุ่มขึ้นไป หรือเรียกว่า multidrug resistant *P. aeruginosa* จากกลุ่มตัวอย่างทดสอบเชื้อ *P. aeruginosa* พบจำนวนถึง 69 สายพันธุ์ จาก 136 สายพันธุ์ ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม MDR *P. aeruginosa* และเมื่อนำเฉพาะกลุ่ม MDR *P. aeruginosa* มาพิจารณาร่วมกับการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้นั้น มีจำนวนร้อยละ 55 ซึ่งมากกว่าเชื้อที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม ที่มีจำนวนร้อยละ 45

ผลกระทบของสารสกัดใบหม่อนต่อไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นด้วยการย้อมสี crystal violet (CV) ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มแตกต่างกัน พบว่าความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่มีสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อที่ได้สร้างขึ้นมาแล้วลงได้ และยังทำให้เกิดการกระตุ้นให้เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในเชื้อกลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม ผลการทดสอบทางสถิติ (Wilcoxon Signed Ranks test) ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบความแตกต่างของปริมาณไบโอฟิล์มเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดใบหม่อนด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ และความเข้มข้น 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณของไบโอฟิล์มกลับเพิ่มมากขึ้นโดยมีนัยสำคัญ (p-value <0.000) และในทำนองเดียวกับผลทดสอบต่อการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 24 สายพันธุ์ ในสภาวะไบโอฟิล์มร่วมกับสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยตรวจสอบจาก 0.005% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) เชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม ต่อสารสกัดทั้งสองความเข้มข้นนั้น พบการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งกลุ่มเชื้อสายพันธุ์สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม การทดสอบทางสถิติ ไม่พบความแตกต่างของปริมาณไบโอฟิล์ม อย่างมีนัยสำคัญ (p-value > 0.05) อย่างไรก็ตาม จากผลเปรียบเทียบจำนวนเชื้อเชิงปริมาณ (Quantitative) ด้วยวิธี Spread plate หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารทดสอบที่มีสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 32 และ64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดจำนวนเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มลงได้อย่างมีนัยสำคัญ (p-value =0.001) เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่แตกต่างกันสามระดับ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำ (weak) นั้นมีจำนวนเชื้อลดลงมากที่สุด ส่วนกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง (moderate) กลับพบจำนวนเชื้อสูงขึ้นและกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strong) นั้นมีจำนวนเชื้อลดลงน้อยที่สุด เมื่อ

เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นเป็น 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำเท่านั้นที่ได้รับผลกระทบ

ผลการตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ในการศึกษานี้ได้เลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม จากตัวอย่าง 136 สายพันธุ์ โดยยีนที่เกี่ยวข้องและพบได้ในกลุ่มตัวอย่างเกือบทุกสายพันธุ์ ได้แก่ *pelA* (ร้อยละ 97.8), *pslA* (ร้อยละ 94.9), *pslD* (ร้อยละ 97.1) และ *pslH* (ร้อยละ 97.1) ยกเว้นยีน *pqsA* ที่พบเพียงร้อยละ 43.4 เมื่อเปรียบเทียบยีนที่เกี่ยวข้องนี้กับเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ จำนวน 108 สายพันธุ์ พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มียีนที่เกี่ยวข้องทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ *pelA* (ร้อยละ 99.1), *pslA* (ร้อยละ 95.4), *pslD* (ร้อยละ 98.1) และ *pslH* (ร้อยละ 98.1) และมีเพียงยีน *pqsA* ที่พบเพียงร้อยละ 49.1 ส่วนในกลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์มตรวจพบยีน *pqsA* นี้เพียงร้อยละ 21.4 ในขณะที่ยีนอีก 4 ชนิดสามารถตรวจพบได้เกือบทุกสายพันธุ์ ($\geq$ ร้อยละ 95) ดังนั้นยีน *pqsA* จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสามารถใช้บ่งชี้ได้ถึงความสามารถของการสร้างไบโอฟิล์ม มีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 78.57 โดยผลทดสอบทางสถิติ (Wilcoxon Signed Ranks test) พบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติ (p-value =0.009) เมื่อพิจารณาแยกตามความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเป็นสามระดับพบว่า เชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับสูงมีจำนวนมากถึง 80 สายพันธุ์ เชื้อกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับต่ำและปานกลางนี้มีจำนวน 13 และ 15 สายพันธุ์ตามลำดับ พบเชื้อที่มียีน *pqsA* กระจายตัวไปตามเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับที่แตกต่างกัน โดยพบมากที่สุดในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มระดับต่ำ (ร้อยละ 69.2) ระดับปานกลาง (ร้อยละ 53.3) และพบสัดส่วนน้อยที่สุดในกลุ่มเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มในระดับสูง (ร้อยละ 45.0) ดังนั้นความสัมพันธ์ของการสร้างไบโอฟิล์มและการตรวจพบยีน *pqsA* นี้ อาจเป็นแนวทางที่ช่วยในการพิจารณาในการรักษาเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.2 อภิปรายผล

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาที่ใหญ่และซับซ้อนมากขึ้นทุกขณะส่งผลกระทบต่อทั้งสุขภาพและเศรษฐกิจ การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียนั้นเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ โดยการดื้อยาอาจเกิดขึ้นเอง ตามธรรมชาติของเชื้อนั้นๆ เกิดภายใต้ความกดดันของยาปฏิชีวนะ หรือการที่เชื้อได้รับ resistant gene มาจาก antibiotic producing organism เนื่องจากอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อมากขึ้นแต่การดื้อยาปฏิชีวนะก็เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการพัฒนายาใหม่ๆขึ้นมาได้ไม่ทันการดื้อยา และการแพร่กระจายไปทุกส่วนของโลก ความสำคัญของการดื้อยาปฏิชีวนะ ปัจจุบันพบการดื้อยาชนิด multidrug resistant มากขึ้น แบคทีเรียบางชนิดทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้ ซึ่งจะเพิ่มทั้งอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตาย ดังจะเห็นได้จากการรายงานผลการศึกษาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยารวมถึงการรวบรวมข้อมูลในโรงพยาบาลจากเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งจากต่างประเทศและในประเทศ (171-173) ยากลุ่ม quinolones อาทิเช่น levofloxacin และ ciprofloxacin ที่มีการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase และ Topoisomerase II ทำให้ไม่เกิด DNA replication แต่เมื่อเกิดการพัฒนากลไกของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทำให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะนี้โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายที่ยาเข้าไปจับและกระบวนการ active efflux pump ที่ขับยาออกทางช่อง porin ของเชื้อ *P. aeruginosa* (174) ทำให้เชื้อมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สูงมาก ในกลุ่มตัวอย่างการศึกษาครั้งนี้ พบอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะถึงร้อยละ 50 และยาปฏิชีวนะในกลุ่ม third generation cephalosporins ที่ทดสอบด้วยยา ceftazidime โดยแสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มตัวอย่างดื้อต่อยาที่ร้อยละ 46.3 ซึ่งจำนวนของการแสดงออกนี้ เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาในหลายการศึกษาที่พบว่า อัตราการดื้อต่อยากลุ่ม quinolones ที่สูงขึ้นถึงร้อยละ 42.3 ในปี ค.ศ. 2005 จากที่พบว่า มีอัตราการดื้อต่อยาที่ต่ำกว่าร้อยละ 20 ในปี ค.ศ. 2003 ถึงปี ค.ศ. 2004 จากนั้นในปี ค.ศ. 2007 จึงมีอัตราการดื้อต่อยา quinolones ที่ลดลงเพียงเล็กน้อยคือ ร้อยละ 40.7 (171) มีรายงานการศึกษาจากประเทศอินเดีย ที่ทดสอบยา ceftazidime กับเชื้อ *P. aeruginosa* รวม 91 สายพันธุ์พบว่า 64 (ร้อยละ 70) สายพันธุ์ดื้อต่อยา ceftazidime เป็นสิ่งที่สนับสนุนได้ว่าเชื้อแบคทีเรียนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สูงขึ้นมากทีเดียว (175) นอกจากนี้กลุ่มยา fourth generation cephalosporins ที่ออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์คือยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจับกับ penicillin-binding protein (PBP) แล้วยับยั้ง transpeptidase ใน PBP ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการ cross-link สาย peptidoglycan เพื่อสร้างผนังเซลล์และกระตุ้นเอนไซม์ autolysin ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายตัวเองมากขึ้น (176) ในการศึกษานี้พบว่า cefepime มีอัตราการดื้อต่อยาที่ไม่สูงมาก คือ ร้อยละ 23.5 จึงมีการพิจารณาใช้สำหรับกรณีผู้ป่วยหนักที่เกิดจากแผลไฟไหม้ มีการประเมินแผลเผาไหม้ถึงร้อยละ 45.5 ของพื้นที่ผิวร่างกาย

ทั้งหมด ซึ่งประกอบไปด้วยร้อยละ 30.5 การเผาไหม้ผิวหนังทั่วร่างกายและแผลไหม้ลึกร้อยละ 15 พบมีการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในกระแสเลือด แนวทางในการรักษาจะเลือกชนิดยาปฏิชีวนะ ขนาด และระยะเวลาเป็นสำคัญ อาทิเช่น กรณีแผลไฟไหม้นี้ได้รับ cefepime โดยใช้ค่า MIC ที่ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทุกๆ 6 ชม. ซึ่งสามารถกำจัดเชื้อนี้ได้ (177) ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต้านเชื้อครอบคลุมทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycoside หรือกลุ่ม third generation cephalosporins ทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ได้ดี และยังสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้อย่างรวดเร็ว (178) เนื่องจากยากลุ่มนี้ถูกนำมาใช้ไม่นาน และราคาที่สูงนั้น ทำให้อัตราการดื้อต่อยากลุ่มนี้ไม่สูงมากนัก กลุ่มยาที่ได้รับความสนใจมากอีกกลุ่มคือ กลุ่ม carbapenems ประกอบด้วยยา imipenem และยา meropenem สามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ดี เนื่องจากทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ได้หลายชนิด ดังนั้นยากลุ่มนี้ จึงเป็นยาทางเลือกลำดับแรก (drug of choices) ในการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงจากแบคทีเรียแกรมลบ (177) ในการศึกษานี้มีการดื้อต่อยา imipenem และยา meropenem นี้ ร้อยละ 33.1 และ ร้อยละ 36 ตามลำดับ พบว่าปริมาณการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอยู่ในระดับที่สูง เมื่อเทียบกับการศึกษาการดื้อยาในประเทศที่มีระบบการใช้ยาอย่างเคร่งครัด (179) เนื่องจากเชื้อนี้มักจะดื้อยาหลายกลุ่ม ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อดื้อยานี้มีอัตราการตายที่สูงตามมา ในประเทศไทยโดยสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข มีการศึกษาผลกระทบจากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาลรวม 1,023 แห่งทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2553 พบว่า 1 ใน 4 ของเชื้อจุลชีพที่พบบ่อยในโรงพยาบาลคือ *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบต่างๆ ของร่างกาย การติดเชื้อเหล่านี้ทำให้ผู้ป่วยต้องนอนรักษาในโรงพยาบาลนานขึ้นและเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตเกือบสี่หมื่นราย (1) ข้อมูลในต่างประเทศนั้นเชื้อ *P. aeruginosa* ถูกจัดว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอัตราการสูญเสียชีวิตที่สูงขึ้น เนื่องจากการดื้อยาหลายขนาน พบรายงานถึงผู้ป่วยที่เกี่ยวข้องการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ประมาณ 51,000 รายในแต่ละปี เฉพาะสหรัฐอเมริกาพบว่า กว่า 6,000 (ร้อยละ 13) ราย ของการติดเชื้อนี้จะดื้อยาในรูปแบบ MDR และเสียชีวิตประมาณ 400 รายต่อปี (45)

อย่างไรก็ตามยังมียาในกลุ่ม polymyxin คือ colistin ที่ให้ผลไวต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ทุกสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาจากหลายทีมวิจัยที่พบว่ายากลุ่มนี้เริ่มแสดงว่ามีการดื้อยาเกิดขึ้น Johasen และคณะได้พบการระบาดครั้งแรกที่เริ่มต้นในปีค.ศ. 1995 ที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วย CF จำนวน 27 ราย ที่ได้สูดดม colistin วันละสองครั้ง การระบาดครั้งที่สองเริ่มต้นในปีค.ศ. 2004 ที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วย 40 รายซึ่งพบว่า17 รายนั้นเป็นเช่นเดียวกับการระบาดในครั้งแรก (180) อีกทั้งยังเกิดการดื้อต่อเชื้อได้อีกหลายชนิดเช่น *K. pneumoniae* ในการศึกษาพบว่าดื้อต่อยา colistin ร้อยละ 24 และสูงขึ้นถึงร้อยละ 47 ในเชื้อ *Enterobacter spp.* (181) มีรายงานในปากีสถานถึงสถานการณ์ดื้อยาชนิด MDR

P. aeruginosa จาก 52 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อชนิด MDR *P. aeruginosa* จากปัสสาวะ (ร้อยละ 36) ระบบทางเดินหายใจ (ร้อยละ 18) และฝี หนอง (ร้อยละ 20) ทั้งนี้ผลทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า colistin ยังเป็นยาที่สามารถเลือกใช้ได้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อชนิด MDR *P. aeruginosa* เนื่องจากให้ผลไวต่อยาร้อยละ 69 ในขณะที่ยาชนิดอื่น เช่น piperacillin-tazobactam และ cefoperazone-sulbactam ให้ผลความไวน้อยกว่า การรายงานผลที่ไวต่อยา colistin ลดลงนั้นมีพบประปรายในเฉพาะบางประเทศ ทั้งนี้เนื่องมาจากการดื้อยานั้นขึ้นกับปัจจัยภายนอกที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการดื้อยามากขึ้น เช่น นโยบายการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะ การนำเข้ายาปฏิชีวนะจากต่างประเทศ เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังสามารถพบอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในสัดส่วนที่ต่ำได้ในหลายประเทศ เช่น มาเลเซียมีรายงานถึงอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม quinolone (ciprofloxacin, ร้อยละ 16.5) และยากลุ่ม third generation cephalosporins (ceftazidime, ร้อยละ 19.6) ในระดับที่ต่ำ กลุ่ม MDR *P. aeruginosa* พบว่ามีเพียงร้อยละ 19.6 (182) การดื้อต่อยาปฏิชีวนะนี้จึงเป็นประเด็นสำคัญที่ต้องศึกษาและติดตาม เพื่อป้องกันและควบคุมไม่ให้เชื้อรุดหน้ากว่าการพัฒนายาปฏิชีวนะที่ใช้ควบคุมได้ จึงควรมีการติดตามอัตราความไวและการดื้อต่อยาปฏิชีวนะรวมถึงกลไกต่างๆ ซึ่งสามารถส่งผ่าน และถูกกระตุ้นให้เกิดการดื้อยาได้โดยตรง หรือดื้อยาร่วมกันหลายชนิดด้วย ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการกำหนดควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะที่ยังคงออกฤทธิ์ให้ยาวนานต่อไป

ด้วยคุณสมบัติของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ จึงได้ทำการคัดกรองความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มโดยการย้อมสี 0.1% crystal violet และจำแนกระดับจากค่า SBF index (157) เนื่องจากวิธีการนี้เป็นการตรวจวัดเชิง semi-quantitative สามารถแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ ซึ่งเหมาะสมสำหรับการทดสอบเชื้อตัวอย่างที่มีจำนวนมาก โดยการศึกษานี้มีจำนวนเชื้อถึง 136 สายพันธุ์ วิธีการนี้จึงจัดเป็นวิธีการคัดกรอง (screening test) ที่สะดวกและสามารถทำซ้ำได้ ตามคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มในกลุ่มตัวอย่างนี้พบว่า เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุดในระดับ strong คือที่ร้อยละ 59 (80/136 สายพันธุ์) จากงานวิจัยที่กล่าวถึงความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมทำให้เชื้อดื้อต่อยาในระดับที่สูงขึ้น เมื่อพิจารณาตามความสามารถของคุณสมบัติสร้างและไม่สร้าง ไบโอฟิล์มในกลุ่มตัวอย่างนี้ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยพบว่า *P. aeruginosa* ที่มีการสร้างไบโอฟิล์มมีการแสดงออกการดื้อยาปฏิชีวนะที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์มเกือบทุกกลุ่มยา อาทิเช่น กลุ่ม third generation cephalosporins, กลุ่ม β-lactam/inhibitor, กลุ่ม carbapenem, กลุ่ม fourth generation cephalosporins กลุ่ม aminoglycoside และกลุ่ม polymyxin โดยเฉพาะกลุ่ม carbapenem ที่มียา imipenem และ meropenem เป็นตัวแทนยากลุ่มนี้ ในยา meropenem ที่พบว่ามีความต่าง

ของการดื้อต่อยาที่สูงมากคือเชื้อกลุ่มที่ไม่สร้างไบโอฟิล์มสามารถดื้อยานี้ร้อยละ 25 แต่ในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มได้นั้น สามารถดื้อต่อยาได้ถึงร้อยละ 42.6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้นั้นดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สูงกว่าเชื้อที่ไม่สร้างหรือสร้างได้น้อยมาก (183) มีหลายงานวิจัยที่สนับสนุนว่าเชื้อที่อยู่ในรูปของ planktonic cells นั้นมีความไวต่อยาปฏิชีวนะเช่น floxacin, gentamicin, ampicillin, oxytetracycline และ trimethoprim/sulfodoxime แต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะนี้ทั้งหมดเมื่อเชื้อนี้อยู่ในรูปแบบไบโอฟิล์ม (184) ยกเว้น กลุ่ม quinolones เช่น levofloxacin และ ciprofloxacin ที่มีอัตราส่วนในการดื้อยาที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ร้อยละของการดื้อยาปฏิชีวนะนั้นก็นับได้ว่าสูงมากอยู่แล้ว ซึ่งยาทั้งสองชนิดนี้มีอัตราการดื้อยาที่เท่ากันคือ ร้อยละ 53.6 ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม และร้อยละ 51.9 ในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์ม ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มตัวอย่างนี้มีอีกหลายกลไกที่ใช้ในการขจัดยาปฏิชีวนะ มีรายงานการศึกษาที่พบว่า ยา levofloxacin นั้นสามารถกำจัดเชื้อได้ทั้งในสองรูปแบบคือ planktonic cells และ biofilm forming (185) การสร้างไบโอฟิล์มซึ่งจัดว่าเป็นองค์ประกอบภายนอกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อปกป้องเซลล์ภายในโครงสร้างนี้ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นมีความเชื่อมโยงต่อการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างชัดเจน จึงทำให้มีการศึกษาถึงแนวทางในการรักษาเชื้อดื้อยาที่มีคุณสมบัติสร้างไบโอฟิล์มได้ โดยการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ และหรือทำลายโครงสร้างไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นในร่างกายผู้ป่วยภาวะเรื้อรังได้

ผลกระทบของสารสกัดใบหม่อนในตัวทำละลายอีเทอร์ต่อไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นมาแล้วนั้น จากกลุ่มตัวอย่างที่ได้คัดเลือกจำนวน 24 สายพันธุ์ ไม่พบว่าสารสกัดจะทำให้ปริมาณไบโอฟิล์มลดลงได้ อีกทั้งยังเป็นการกระตุ้นให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ความเข้มข้นที่ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผลการศึกษาในงานวิจัยส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในหลอดทดลองที่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรต่างๆ หรือสารต้านเชื้อไปพร้อมกับเชื้อทดสอบ ซึ่งเป็นสภาวะ planktonic นั้นเป็นการทดสอบยับยั้งเชื้อตั้งแต่ต้นเหตุ (186, 187) ที่จะให้ผลแตกต่างจากเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม หากพิจารณาถึงกลไกการก่อพยาธิสภาพของเชื้อในร่างกาย ในขณะเดียวกันเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ จะเริ่มขบวนการเกาะติดบนผิวเซลล์ สร้าง microcolony จนกระทั่งเกิดรูปแบบโครงสร้างไบโอฟิล์มสมบูรณ์แบบได้นั้น ใช้เวลาเพียงสองถึงสามชั่วโมงเท่านั้น (188) และส่วนนี้เองเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การรักษาโดยการให้ยาในขนาดปกติไม่สามารถกำจัดเชื้อให้หมดไป การสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อนั้นยิ่งเพิ่มโอกาสการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น เมื่อไบโอฟิล์มเจริญเติบโตเต็มที่ (mature) และจะมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงสุด รวมขั้นตอนทั้งหมดในการสร้างไบโอฟิล์มที่ทำการทดสอบในหลอดทดลองนี้ใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน (189) เมื่อไบโอฟิล์มอยู่ในสภาวะที่เจริญเติบโตเต็มที่และคงที่แล้ว นอกจากนี้เหตุที่ไบโอฟิล์มดื้อต่อยาปฏิชีวนะ อาจเนื่องจากยามีการแพร่เข้าไปในไบโอฟิล์มช้าหรือไม่สมบูรณ์ สารอาหารและของเสียในไบโอฟิล์มสามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนสภาวะแวดล้อม

ซึ่งอาจทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เต็มที่ รวมทั้งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในโบโอฟิล์มลดลง ส่งผลให้การออกฤทธิ์ของยาที่มีกลไกเกี่ยวเนื่องกับการเจริญของเชื้อลดลงด้วย (190) ดังนั้นการทดสอบการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยตรวจสอบจาก 0.005% TTC (191) จึงไม่พบความแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อจำกัดการเจริญ (192) ดังนั้นการทดสอบหาจำนวนเชื้อที่คงเหลืออยู่ในโครงสร้างไบโอฟิล์ม หลังจากที่ไบโอฟิล์มนั้นถูกทดสอบด้วยฤทธิ์จากสารสกัดสมุนไพรแล้วนั้น พบว่าที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่ามีจำนวนของเชื้อที่คงเหลืออยู่ในไบโอฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้นที่สูงกว่าคือที่ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงปริมาณและความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของทั้งโครงสร้างไบโอฟิล์มและเชื้อที่อยู่ภายในโครงสร้างนี้ด้วย ดังที่จะเห็นได้จากสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง (64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ทำให้เกิดผลกระทบต่อโครงสร้างโดยกระตุ้นให้มีการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มมากขึ้น และไม่สามารถลดจำนวนเชื้อที่อยู่ภายในโครงสร้างนี้ได้ แต่ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในโครงสร้างไบโอฟิล์มลงได้ แต่ไม่ให้ผลต่อโครงสร้างไบโอฟิล์มแต่อย่างใด จึงเป็นที่น่าสังเกตถึงสารออกฤทธิ์สำคัญที่สามารถแทรกผ่านโครงสร้างไบโอฟิล์มนี้ ทำให้เกิดผลกระทบและลดจำนวนต่อเชื้อที่อยู่ภายในได้

ในปัจจุบันมีอัตราการการติดเชื้อ *P. aeruginosa* เพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งเชื้อนี้จัดเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้ในหลายระบบ และสามารถคงทนอยู่ในสภาพแวดล้อมได้เป็นระยะเวลานาน ปัญหารุนแรงเกิดจากการที่เชื้อมีกลไกการดื้อยาหลายชนิด และยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนในการเลือกยาต้านจุลชีพสำหรับรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุล หรือ อณูชีววิทยา (Molecular biology) เป็นการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม DNA โดยเทคนิค Conventional PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว และมีความจำเพาะสูง ใช้ในการตรวจวินิจฉัย จากการศึกษาพบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มหลายชนิด ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบยีนที่สำคัญในแต่ละขบวนการสร้างไบโอฟิล์ม โดย *psl* จะมีความสำคัญในระยะแรกของการสร้างไบโอฟิล์ม ในขณะที่การสังเคราะห์ *pel* นั้น จะมีความสำคัญในระยะต่อมาของการสร้างไบโอฟิล์ม (193) ในขณะที่ *pqs* มีความเกี่ยวข้องกับระบบ autoinducer ทำหน้าที่เปรียบเสมือนสื่อกลางในการสื่อสาร (90) ในกลุ่มตัวอย่างทดสอบจำนวน 136 สายพันธุ์ สามารถตรวจพบ *pqsA* ร้อยละ 43.4 โดยพบว่าแตกต่างจากยีนอีก 4 ชนิด ดังนี้ *pelA, pslA, pslD* และ *pslH* ที่สามารถตรวจพบได้ทั้งเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์ ($\geq$ ร้อยละ 95) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกลุ่มที่สร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์มพบว่า มีเพียง *pqsA* ที่จำแนกเชื้อกลุ่มสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์มได้ โดยพบยีนนี้ร้อยละ 49.1 ในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์ม และกลุ่มไม่สร้างไบ

โอฟิล์มตรวจพบยีน *pqsA* นี้เพียงร้อยละ 21.4 ในขณะที่ยีนอีก 4 ชนิดไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มนี้ได้ *pqsA* มีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 78.57 จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสามารถใช้บ่งชี้ได้ถึงความสามารถของการสร้างไบโอฟิล์ม โดยผลทดสอบทางสถิติ (Wilcoxon Signed Ranks test) พบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติ (p-value =0.009) ดังนั้นตรวจหายีนนี้น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและมีผลกระทบต่อเนื่องถึงการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะได้ อีกทั้งวิธีการตรวจนี้ให้ผลการตรวจที่แม่นยำและรวดเร็ว ทำให้ช่วยในการวิเคราะห์โรคและหาแนวทางการรักษาให้มีประสิทธิภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าจะศึกษาทั้งในระดับฟีโนไทป์และจีโนไทป์ควบคู่กันแล้ว แต่เนื่องจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มนั้นมีความซับซ้อนยังพบว่ามีปัจจัยต่างๆ รวมถึงกลุ่มยีนอีกหลากหลายชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ผลการศึกษาครั้งนี้ช่วยเพิ่มเติมข้อมูลและอาจเป็นแนวทางในการพิจารณาการรักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะสำหรับเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้
2. การศึกษาหาสารสกัดเพื่อลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อนี้ ก็สามารถใช้เป็นแนวทางในการรักษาเนื่องจากสารสกัดนั้นสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มและลดปริมาณของเชื้อได้ แต่เนื่องจากเป็นการทดสอบในหลอดทดลองดังนั้นควรมีการนำสารสกัดจากใบหม่อนนี้ไปทำการศึกษาอย่างจริงจังต่อไปเพื่อเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ในอนาคต
3. เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม จึงควรศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบหม่อนต่อเชื้อก่อโรคชนิดอื่นร่วมด้วย
4. เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนสำหรับสนับสนุนการนำสารสกัดสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกควรมีการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียนำไปสู่การสกัดสารบริสุทธิ์เพื่อการพัฒนายาใหม่สำหรับทดแทนยาปฏิชีวนะที่มีปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอัตราเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

(1). http://narst.dmsc.moph.go.th/.

(2). 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 Sep;11(5):402-406.

(3). Cirioni O, Wu G, Li L, Orlando F, Silvestri C, Ghiselli R, et al. S-thanatin in vitro prevents colistin resistance and improves its efficacy in an animal model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. Peptides. 2011 Apr;32(4):697-701.

(4). Kiddee A, Henghiranyawong K, Yimsabai J, Tiloklurs M, Niumsup PR. Nosocomial spread of class 1 integron-carrying extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Thai hospital. International Journal of Antimicrobial Agents. 2013 Oct;42(4):301-306.

(5). Fraimow HS, Tsigrelis C. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: Mechanisms, Epidemiology, and Management of Specific Resistant Pathogens. Critical Care Clinics. 2011 Jan;27(1):163-205.

(6). Pérez-Moreno MO, Picó-Plana E, de Toro M, Grande-Armas J, Quiles-Fortuny V, Pons MJ, et al. β-Lactamases, transferable quinolone resistance determinants, and class 1 integron-mediated antimicrobial resistance in human clinical Salmonella enterica isolates of non-Typhimurium serotypes. International Journal of Medical Microbiology. 2013;303(1):25-31.

(7). Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. International Journal of Antimicrobial Agents. 2012;40(3):196-203.

(8). Gómez MI, Prince A. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. Current Opinion in Pharmacology. 2007;7(3):244-251.

(9). Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 2008 Aug;21(4):595-599.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(10). Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. 2001 Jan;9(1):34-39.

(11). Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. Biologicals. 2014 Jan;42(1):1-7.

(12). Avato P, Tursi F, Vitali C, Miccolis V, Candido V. Allylsulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. Phytomedicine. 2000 Jun;7(3):239-243.

(13). Borges A, Simões LC, Saavedra MJ, Simões M. The action of selected isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control. International Biodeterioration & Biodegradation. 2013;10:25-33.

(14). Bansal P, Paul P, Kunwar A, Jayakumar S, Nayak PG, Priyadarsini KI, et al. Radioprotection by quercetin-3-O-rutinoside, a flavonoid glycoside – A cellular and mechanistic approach. Journal of Functional Foods. 2012 Oct;4(4):924-932.

(15). Silberberg M, Morand C, Manach C, Scalbert A, Remesy C. Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. Life Sciences. 2005 Nov;77(25):3156-3167.

(16). Wang X, Yao X, Zhu Za, Tang T, Dai K, Sadovskaya I, et al. Effect of berberine on Staphylococcus epidermidis biofilm formation. International Journal of Antimicrobial Agents. 2009 Jul;34(1):60-66.

(17). Caillet S, Lorenzo G, Côté J, Doyon G, Sylvain JF, Lacroix M. Cancer chemopreventive effect of fractions from cranberry products. Food Research International. 2012 Jan;45(1):320-330.

(18). Nowack R, Schmitt W. Cranberry juice for prophylaxis of urinary tract infections – Conclusions from clinical experience and research. Phytomedicine. 2008 Mar;15(9):653-667.

(19). Tabart J, Franck T, Kevers C, Pincemail J, Serteyn D, Defraigne J-O, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Ribes nigrum extracts. Food Chemistry. 2012 Apr;131(4):1116-1122.

(20). Scalzo J, Stevenson D, Hedderley D. Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: Fruit and anthocyanins. Food Chemistry. 2013 Aug;139(1–4):44-50.

(21). Demet Y, Ahmet M, Mehmet A. Antibacterial activity of black mulberry (Morus nigra) fruits and leaves. 2009 Mar;223-232.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(22). Su T-Y, Ye J, Jr., Hsu P-C, Wu H-F, Chia J-H, Lee M-H. Clinical characteristics and risk factors for mortality in cefepime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2009 Sep:10.

(23). Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents. 2007 May;29(10):S33-S41.

(24). Warayupa T. and Yuttana S. Characterization and Antibiotic Susceptibility Profile of Nosocomial Pathogens Isolated from Cancer Patients. Thai cancer journal. 2009 Oct; 29(4): 176-183.

(25). EWK. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Medical. 2006:319.

(26). Bennik MHJ. *Pseudomonas* | *Pseudomonas aeruginosa*. Encyclopedia of Food Microbiology. 1999:1867-1871.

(27). Sharp D, Gladstone P, Smith RB, Forsythe S, Davis J. Approaching intelligent infection diagnostics: Carbon fibre sensor for electrochemical pyocyanin detection. Bioelectrochemistry. 2010 Feb;77(2):114-119.

(28). Reis RS, da Rocha SLG, Chapeaurouge DA, Domont GB, Santa Anna LMM, Freire DMG, et al. Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production. Process Biochemistry. 2010 Seb;45(9):1504-1510.

(29). Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye J, Peng H, Qin H, et al. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. Process Biochemistry. 2009 Mar;44(3):302-308.

(30). Andonova M, Urumova V. Immune surveillance mechanisms of the skin against the stealth infection strategy of *Pseudomonas aeruginosa*—Review. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2013 Sep;36(5):433-448.

(31). Yamaguchi S, Suzuki T, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, et al. Genotypic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infection. Journal of Infection and Chemotherapy. 2009 Apr;10:1-382.

(32). Okuda J, Okamoto M, Hayashi N, Sawada S, Minagawa S, Gotoh N. Complementation of the exoS gene in the pvdE pyoverdine synthesis gene-deficient

mutant of *Pseudomonas aeruginosa* results in recovery of the pvdE gene-mediated penetration through the intestinal epithelial cell barrier but not the pvdE-mediated virulence in silkworms. Journal of Infection and Chemotherapy. 2012;18(3):332-340.

(33). Wretlind B, Björklind A, Pavlovskis OR. Role of exotoxin A and elastase in the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO experimental mouse burn infection. Microbial Pathogenesis. 1987 Jun;2(6):397-404.

(34). Tielen P, Narten M, Rosin N, Biegler I, Haddad I, Hogardt M, et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. International Journal of Medical Microbiology. 2011 May;301(4):282-292.

(35). Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* – a review. Gene. 1997 Nov;192(1):99-108.

(36). Conrad C, Gibiansky L, Jin F, Gordon D, Motto A, Mathewson A, et al. Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in *P. aeruginosa*. Biophysical Journal. 2011 Apr;100(7):1608-1616.

(37). Strathmann M, Wingender J, Flemming H-C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Microbiological Methods. 2002 Aug;50(3):237-248.

(38). Werner Z, P. Daniel L, and Francis A. W. Pathogenesis of Foreign Body Infection Evidence for a Local Granulocyte Defect. J. Clin. Invest. 1984 Apr;73: 1191-1200.

(39). J. J. BOELENS, S. A. J. ZAAT, J. L. MURK J. J. WEENING, T. VAN DER POLL AND J. DANKERT. Enhanced Susceptibility to Subcutaneous Abscess Formation and Persistent Infection around Catheters Is Associated with Sustained Interleukin-1b Levels. American Society for Microbiology. 2000 Mar; 68(3): 1692-1695.

(40). Wang H, Sodagari M, Ju L-K, Zhang Newby B-m. Effects of shear on initial bacterial attachment in slow flowing systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013 Sep;109(0):32-39.

(41). Desai NP, Hossainy SFA, Hubbell JA. Surface-immobilized polyethylene oxide for bacterial repellence. Biomaterials. 1992;13(7):417-420.

(42). Arutchelvi J, Joseph C, Doble M. Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by Pseudomonas aeruginosa CPCL on polypropylene. Biochemical Engineering Journal. 2011 Sep;56(1–2):37-45.

(43). Martìnez-Martìnez L, Pascual A, Perea EJ. Effect of three plastic catheters on survival and growth of Pseudomonas aeruginosa. Journal of Hospital Infection. 1990 Nov;16(4):311-318.

(44). Richard P. Wenzel and Michael B. Edmond. The Impact of Hospital-Acquired Bloodstream Infections. Emerging Infectious Diseases. 2001 March–April; 7(2): 174-177

(45). http://www.cdc.gov/.

(46). Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annual review of microbiology. 2003;57:677-701.

(47). Thomas M, Lemonnier L, Gulmans V, Naehrlich L, Vermeulen F, Cuppens H, et al. Is there evidence for correct diagnosis in cystic fibrosis registries? Journal of Cystic Fibrosis. 2014 May;13(3):275-280.

(48). Sarah K. Wassil, PharmD, Kristie M. Fox, PharmD, and James W. White, PharmD. Once Daily Dosing of Aminoglycosides in Pediatric Cystic Fibrosis Patients: A Review of the Literature. J Pediatr Pharmacol Ther. 2008;13:68-75

(49). Ryall B, Carrara M, Zlosnik JE, Behrends V, Lee X, Wong Z, et al. The Mucoid Switch in *Pseudomonas aeruginosa* Represses Quorum Sensing Systems and Leads to Complex Changes to Stationary Phase Virulence Factor Regulation. PloS one. 2014;9(5):e96166.

(50). Davey ME and O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol . 2000 Dec;64(6:847-867)

(51). Elayarajah, R. Rajendran, Venkatrajah, Sweda Sreekumar, Asa Sudhakar, Janiga and Streekumar. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2011;14(5):336-343.

(52). Flamm RK, M. K. Weaver, C. Thornsberry, M. E. Jones, J. A. Karlowsky, and D. F. Sahm. Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:2431-2436.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(53). Harrison JJ, Ceri H, Stremick C, Turner RJ. Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloid oxyanions. FEMS Microbiology Letters. 2004 Jun;235(2):357-362.

(54). Colom K, A. Fdz-Aranguiz, E. Suinaga, and R. Cisterna. Emergence of resistance to beta-lactam agents in Pseudomonas aeruginosa with group 1 beta-lactamases in Spain. Clinical Microbiology Infectous Disease. 1995:14:964-971.

(55). Hancock REW, and F. S. Brinkman. . Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. Microbiology. 2002.;56:17-38.

(56). Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. Enhancement of the mexAB-oprM Efflux Pump Expression by a Quorum-Sensing Autoinducer and Its Cancellation by a Regulator, MexT, of the mexEF-oprN Efflux Pump Operon in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004;48(4):1320-1328.

(57). Giamarellou H PG. Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections: What are the treatment Options? Drugs. 2009; 69 (14):1879-1901.

(58). V. T. Colistin : Antimicrobials for Treatment of Drug Resistant Gram-Negative Infections. Siriraj Medical Journal 2008:1(3): 152-158.

(59). Pornpan K, Pattarachai K, Visanu T. 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(5): 402-406.

(60). DM Sabuda, K Laupland and J Pitout. Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis Med Microbiol 2008;19(6):413-418.

(61). http://emedicine.medscape.com.

(62). Klemm P1 VR, Hancock V. Prevention of bacterial adhesion. Microbiol Biotechnol. 2010 Sep;88(2):451-459.

(63). Neu, H. C. The crisis in antibiotic resistance. Science. 1992;257,1064–1073.

(64). Okabe T, Yamazaki Y, Shiotani M, Suzuki T, Shiohara M, Kasuga E, et al. An amino acid substitution in PBP-3 in Haemophilus influenzae associate with the

invasion to bronchial epithelial cells. Microbiological Research. 2010 Jan;165(1):11-20.

(65). Ohsaki Y, Tachibana M, Awaya T, Kuroki M, Itoh Y. Recovery of susceptibility to penicillin G in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* despite increased accumulation of pbp gene alterations. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008 Nov;32(5):427-431.

(66). Glauner B, Keck W, Schwarz U. Analysis of penicillin-binding sites with a micro method-The binding site of PBP 5 from Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters. 1984 Jul;23(2–3):151-155.

(67). Sainsbury S, Bird L, Rao V, Shepherd SM, Stuart DI, Hunter WN, et al. Crystal Structures of Penicillin-Binding Protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Native and Antibiotic-Bound Forms. Journal of Molecular Biology. 2011 Jan;405(1):173-184.

(68). de León SR, Daniels K, Clarke AJ. Production and purification of the penicillin-binding protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Expression and Purification. 2010 Oct;73(2):177-183.

(69). Chohan ZH, Shad HA, Youssoufi MH, Ben Hadda T. Some new biologically active metal-based sulfonamide. European Journal of Medicinal Chemistry. 2010 Jul;45(7):2893-2901.

(70). Yoshihara E, Gotoh N, Nishino T, Nakae T. Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the protease activity. FEBS Letters. 1996 Sep;394(2):179-182.

(71). Ishii J, Nakae T. Specific interaction of the protein-D2 porin of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotics. FEMS Microbiology Letters. 1996 Feb;136(1):85-90.

(72). Kubesch P, Wehsling M, Tümmler B. Membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* to 4-quinolones. Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology. 1987 Jun;265(1–2):197-202.

(73). Rotimi VO, Jamal W, Pal T, Sonnevend A, Dimitrov TS, Albert MJ. Emergence of multidrug-resistant Salmonella spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2008 Jan;60(1):71-77.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

(74). Hassing R-J, Menezes GA, van Pelt W, Petit PL, van Genderen PJ, Goessens WHF. Analysis of mechanisms involved in reduced susceptibility to ciprofloxacin in Salmonella enterica serotypes Typhi and Paratyphi A isolates from travellers to Southeast Asia. International Journal of Antimicrobial Agents. 2011 Mar;37(3):240-243.

(75). Perez LRR, Barth AL. Biofilm production using distinct media and antimicrobial susceptibility profile of Pseudomonas aeruginosa. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2011 Jul;15(4):301-304.

(76). Hammond AA, Miller KG, Kruczek CJ, Dertien J, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, et al. An in vitro biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. Burns. 2011 Mar;37(2):312-321.

(77). Fricks-Lima J, Hendrickson CM, Allgaier M, Zhuo H, Wiener-Kronish JP, Lynch SV, et al. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. International Journal of Antimicrobial Agents. 2011 Apr;37(4):309-315.

(78). Borges A, Simões LC, Saavedra MJ, Simões M. The action of selected isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014 Jan;86, Part A(0):25-33.

(79). de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock REW. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Current Opinion in Microbiology. 2013 Oct;16(5):580-589.

(80). Seth AK, Geringer MR, Galiano RD, Leung KP, Mustoe TA, Hong SJ. Quantitative Comparison and Analysis of Species-Specific Wound Biofilm Virulence Using an In Vivo, Rabbit-Ear Model. Journal of the American College of Surgeons. 2012 Sep;215(3):388-399.

(81). Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. Chapter One - *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Mechanisms of Immune Evasion. In: Sima S, Geoffrey MG, editors. Advances in Applied Microbiology. 2014:1-40.

(82). Hiroko Ishida, Yoshihisa Ishida, Yuichi Kurosaka, Tsuyoshi Otani, Kenichi Sato and Hiroyuki Kobayashi. *Pseudomonas aeruginosa* against Biofilm-Producing In Vitro

and In Vivo Activities of Levofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 1998, 42(7):1641-1645.

(83). Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. Environmental microbiology. 2013 Oct;15(10):2865-2878.

(84). Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Hoiby N. Dynamics and Spatial Distribution of -Lactamase Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004;48(4):1168-1174.

(85). Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and -Lactamase and Alginate Production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004;48(4):1175-1187.

(86). Lewis K. Persister cells. Annual review of microbiology. 2010;64:357-372.

(87). Beaudoin T, Zhang L, Hinz AJ, Parr CJ, Mah TF. The biofilm-specific antibiotic resistance gene ndvB is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Journal of bacteriology. 2012 Jun;194(12):3128-3136.

(88). Winzer K, Hardie KR, Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now-gone to lunch! Current Opinion in Microbiology. 2002 Apr;5(2):216-222.

(89). Vikström E, Tafazoli F, Magnusson K-E. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-l-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. FEBS Letters. 2006 Dec;580(30):6921-6928.

(90). Genevois A, Chusseau AF, Belkhelfa H, Lajoie B, Haddioui L, Roques C. 170 *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing (QS) impact on host defences: QS-inhibitors and treatment of lung infections in cystic fibrosis (CF). Journal of Cystic Fibrosis. (2013) Jun;1(10):9-12.

(91). Wagner VE, Frelinger JG, Barth RK, Iglewski BH. Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. Trends in Microbiology. 2006 Feb;14(2):55-58.

(92). P. Stoodley KS, D. G. Davies & J. W. Costerton, Annual Reviews in Microbiology .2000;56:187-209.

(93). Zabel BA, Zuniga L, Ohyama T, Allen SJ, Cichy J, Handel TM, et al. Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. Experimental Hematology. 2006 Aug;34(8):1021-1032.

(94). Hazlett LD. Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. Progress in Retinal and Eye Research. 2004 Jan;23(1):1-30.

(95). Wang H, Sodagari M, Chen Y, He X, Newby B-mZ, Ju L-K. Initial bacterial attachment in slow flowing systems: Effects of cell and substrate surface properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2011 Oct;87(2):415-422.

(96). Kline T, Bowman J, Iglewski BH, de Kievit T, Kakai Y, Passador L. Novel synthetic analogs of the Pseudomonas autoinducer. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1999 Dec;9(24):3447-3452.

(97). Giltner CL, Habash M, Burrows LL. Pseudomonas aeruginosa Minor Pilins Are Incorporated into Type IV Pili. Journal of Molecular Biology. 2010 May;398(3):444-61.

(98). Tielen P, Strathmann M, Jaeger K-E, Flemming H-C, Wingender J. Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiological Research. 2005 Apr;160(2):165-176.

(99). Harimawan A, Rajasekar A, Ting Y-P. Bacteria attachment to surfaces – AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. Journal of Colloid and Interface Science. 2011 Dec;364(1):213-218.

(100). Dalton HM, March PE. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. Current Opinion in Biotechnology. 1998 Jun;9(3):252-255.

(101). Kurre R, Maier B. Oxygen Depletion Triggers Switching between Discrete Speed Modes of Gonococcal Type IV Pili. Biophysical Journal. 2012 Jun;102(11):2556-2563.

(102). Craig L, Li J. Type IV pili: paradoxes in form and function. Current Opinion in Structural Biology. 2008 Apr;18(2):267-277.

(103). Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. Trends in Microbiology.2014 Jun.

(104). Guzzo CR, Salinas RK, Andrade MO, Farah CS. PILZ Protein Structure and Interactions with PILB and the FIMX EAL Domain: Implications for Control of Type IV Pilus Biogenesis. Journal of Molecular Biology. 2009 Nov;393(4):848-866.

(105). Yokota S-i, Fujii N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2007 Mar;30(2):97-109.

(106). Lee N-G, Jung SB, Ahn B-Y, Kim YG, Lee Y, Jeon Y-J, et al. Protection of mice against *P. aeruginosa* infections by large-scale affinity-purified human IgG specific to *P. aeruginosa* outer membrane proteins. Vaccine. 1999 Nov;18(7–8):665-674.

(107). Vasseur P, Soscia C, Voulhoux R, Filloux A. PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. Biochimie. 2007 Aug;89(8):903-915.

(108). Zimmer KR, Macedo AJ, Nicastro GG, Baldini RL, Termignoni C. Egg wax from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Ticks and Tick-borne Diseases. 2013 Sep;4(5):366-376.

(109). Cynthia Ryder, Matthew Byrd, and Daniel J. Wozniak. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol. 2007 Dec;10(6): 644–648.

(110). Olvera C, Goldberg JB, Sánchez R, Soberón-Chávez G. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product parti cipates in rhamnolipid biosynthesis. FEMS Microbiology Letters. 1999 Oct;179(1):85-90.

(111). Kooistra O, Bedoux G, Brecker L, Lindner B, Carballo PS, Haras D, et al. Structure of a highly phosphorylated lipopolysaccharide core in the **Δ**algC mutants derived from *Pseudomonas aeruginosa* wild-type strains PAO1 (serogroup O5) and PAC1R (serogroup O3). Carbohydrate Research. 2003 Nov;338(23):2667-2677.

(112). Gaona G, Núñez C, Goldberg JB, Linford AS, Nájera R, Castañeda M, et al. Characterization of the Azotobacter vinelandii algC gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. FEMS Microbiology Letters. 2004 Sep;238(1):199-206.

(113). Ferreira FA, Souza RR, Bonelli RR, Américo MA, Fracalanzza SEL, Figueiredo AMS. Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent Staphylococcus aureus biofilms. Journal of Microbiological Methods. 2012 Mar;88(3):393-398.

(114). Vergidis P, Patel R. Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. Infectious Disease Clinics of North America. 2012 Mar;26(1):173-186.

(115). Bowler LL, Ball TB, Saward LL. A novel in vitro co-culture system allows the concurrent analysis of mature biofilm and planktonic bacteria with human lung epithelia. Journal of Microbiological Methods. 2014 Jun;101(0):49-55.

(116). Musk DJ, Jr., Hergenrother PJ. Chelated iron sources are inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and distribute efficiently in an in vitro model of drug delivery to the human lung. Journal of applied microbiology. 2008 Aug;105(2):380-388.

(117). Praneenararat T, Beary TMJ, Breitbach AS, Blackwell HE. Synthesis and application of an N-acylated l-homoserine lactone derivatized affinity matrix for the isolation of quorum sensing signal receptors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2011 Sep;21(17):5054-5057.

(118). Wang M-z, Zheng X, He H-z, Shen D-s, Feng H-j. Ecological roles and release patterns of acylated homoserine lactones in *Pseudomonas sp*. HF-1 and their implications in bacterial bioaugmentation. Bioresource Technology. 2012 Dec;125(0):119-126.

(119). Nasr RA, AbuShady HM, Hussein HS. Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2012;13(3):269-274.

(120). Rao J, DiGiandomenico A, Artamonov M, Leitinger N, Amin AR, Goldberg JB. Host derived inflammatory phospholipids regulate rahU (PA0122) Gene, Protein, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Cellular Immunology. 2011;270(2):95-102.

(121). Priester JH, Horst AM, Van De Werfhorst LC, Saleta JL, Mertes LAK, Holden PA. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. Journal of Microbiological Methods. 2007 Mar;68(3):577-587.

(122). Fekete A, Borbás A, Gyémánt G, Kandra L, Fazekas E, Ramasubbu N, et al. Synthesis of β-(1⟶6)-linked N-acetyl-d-glucosamine oligosaccharide substrates and their hydrolysis by Dispersin B. Carbohydrate Research. 2011 Sep;346(12):1445-1453.

(123). Davey ME, O'Toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000;64(4):847-867.

(124). Toutain CM, Caizza NC, Zegans ME, O'Toole GA. Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. Research in Microbiology. 2007 Jun;158(5):471-477.

(125). Anguige K, King JR, Ward JP. A multi-phase mathematical model of quorum sensing in a maturing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Mathematical Biosciences. 2006 Oct;203(2):240-276.

(126). http://www.biofilm.montana.edu/

(127). Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, Caldwell CC, Matu JO. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. Trends in Microbiology. 2009 Mar;17(3):130-138.

(128). Fujitani S, Sun H.Y., Yu V.L. and Weingarten J.A.. Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa* Part II: Antimicrobial Resistance, Pharmacodynamic Concepts, and Antibiotic Therapy. Advances in Chest Medicine.2010 Jan;139(5):1172-1185

(129). Rumbaugh KP, Hamood AN, Griswold JA. Cytokine induction by the *P. aeruginosa* quorum sensing system during thermal injury. Journal of Surgical Research. 2004 Jan;116(1):137-144.

(130). Richard P, Le Floch R., Chamoux C., Pannier M., Espaze EaR H. a Paoi, the buroai eomrs Journal.1994:377-383.

(131). Joo H-S, Otto M. Molecular Basis of In Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens. Chemistry & Biology. 2012 Dec;19(12):1503-1513.

(132). Davies DG, Parsek, M.R., Pearson, J.P. Iglewski, B.H. Costerton JWaG, E.P. in Tioc-t-cs biofilm.1998:295-298.

(133). Christensen L., Moser C., Jensen P., Rasmussen T.B., Christophersen, L., Kjelleberg, S., Kumar, N., Hoiby, N., Givskov, M. and Bjarnsholt, T. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model. Microbiology. 2007;153(7): 2312-2320.

(134). Mangalappalli-Illathu AK, Vidovic S, Korber DR. Differential adaptive response and survival of Salmonella enterica serovar enteritidis planktonic and biofilm cells

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

exposed to benzalkonium chloride. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Oct;52(10):3669-3680.

(135). Alexei B., Songhua L., KIM LEWIS. A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrobial agents and chemotherapy.2000 Mar; 44(3): 640–646.

(136). Hentzer M, Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A.,, Andersen JB, Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl,, L. M, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S. and, Givskov MIoq, biofilm siPa, furanone bbah, et al.

(137). Fabíola B, Greisiele L, Neviton R, Diógenes A, Celso V, Benedito P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases.2002 Oct 97(7): 1027-1031.

(138). Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M, Hentzer M, Haagensen JA, Hougen HP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. Microbiology. (2005) Feb;151(Pt 2):373-383.

(139). J. W. Costerton, Philip S. Stewart and E. P. Greenberg. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science. 1999 May;284(5418):1318-1322

(140). Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug–resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2010 Apr;3(4):266-269.

(141). Matsunaga T, Nakahara A, Minnatul KM, Noiri Y, Ebisu S, Kato A, et al. The Inhibitory Effects of Catechins on Biofilm Formation by the Periodontopathogenic Bacterium, Eikenella corrodens. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2014;74(12):2445-2450.

(142). Demet Yiğit, Nimet Yiğit. Antibacterial activity of blak mulberry (*Morus nigra*) fruits and leaves. Gelis Tarihi. 2009 Mar: 39-47

(143). Manjula A. C. and Shubha. Screening of antibacterial activity of total soluble protein of mulberry varieties. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2011 Oct;3(2):60-61

(144). http://qsds.go.th/

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(145). Park Y-S, Jung S-T, Kang S-G, Heo BG, Arancibia-Avila P, Toledo F, et al. Antioxidants and proteins in ethylene-treated kiwifruits. Food Chemistry. (2008);107(2):640-648.

(146). Yoshihiro K, Toshiyuki K, Kiyotaka N, Akira A, Keiji H, Shinichi O and Teruo M. Effects of mullberry leaf in Rich in 1-Deoxynojirimycin on Blood Lipid Profiles in Humans. J. Clin. Biochem. Nutr.2010 Sep; 47:155–161.

(147). Vichasilp C, Nakagawa K, Sookwong P, Higuchi O, Luemunkong S, Miyazawa T. Development of high 1-deoxynojirimycin (DNJ) content mulberry tea and use of response surface methodology to optimize tea-making conditions for highest DNJ extraction. LWT - Food Science and Technology. 2012 Mar;45(2):226-232.

(148). Nuengchamnong N, Ingkaninan K, Kaewruang W, Wongareonwanakij S, Hongthongdaeng B. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007 Aug;44(4):853-858.

(149). Li Y-G, Ji D-F, Zhong S, Lv Z-Q, Lin T-B, Chen S, et al. Hybrid of 1-deoxynojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice. Journal of Ethnopharmacology. 2011 Apr;134(3):961-970.

(150). http://www1a.biotec.or.th/.

(151). www.dmsc.moph.go.th.

(152). Shih P-H, Chan Y-C, Liao J-W, Wang M-F, Yen G-C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (Morus atropurpurea L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2010 Jul;21(7):598-605.

(153). Venkatesh Kumar R. and Seema Chauhan. Mulberry: Life enhancer. Journal of Medicinal Plants Research.2008 Oct; 2(10): 271-278,

(154). susceptibility CaLSIPsfa, testing : nineteenth informational supplement. Wayne PCaLSI. 2009;29:44-45.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(155). Ankita Sharma and Kanika Sharma. Should Solubility and Zone of Inhibition Be the Only Criteria for Selection of Solvent in Antimicrobial Assay?. Advances in Biological Research.2011; 5 (5): 241-247.

(156). Singh K, Kumar Y, Puri P, Sharma C, Aneja KR. Antimicrobial, spectral and thermal studies of divalent cobalt, nickel, copper and zinc complexes with triazole Schiff bases. Arabian Journal of Chemistry. 2013 Jul;10:104-114.

(157). Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of Escherichia coli is method-dependent. Journal of applied microbiology. 2008 Aug;105(2):585-590.

(158). Jost GF, Wasner M, Taub E, Walti L, Mariani L, Trampuz A. Sonication of catheter tips for improved detection of microorganisms on external ventricular drains and ventriculo-peritoneal shunts. Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia. 2014 Apr;21(4):578-582.

(159). Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GC, et al. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS pathogens. 2011 Jan;7(1):1-13.

(160). Carlos J Sanchez Jr1, Katrin Mende, Miriam L Beckius, Kevin S Akers, Desiree R Romano, Joseph C Wenke1 and Clinton K Murray. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infectious Diseases. 2013:2-12.

(161). Naves P, Prado Gd, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of Escherichia coli is method-dependent. Applied Microbiology. 2008;13-24.

(162). Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006 Jan;50(1):43-48.

(163). Monsen T, Lovgren E, Widerstrom M, Wallinder L. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. Journal of clinical microbiology. 2009 Aug;47(8):2496-2501.

(164). Overhage J, Schemionek M, Webb JS, Rehm BH. Expression of the psl operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms: PslA performs an essential function in

biofilm formation. Applied and environmental microbiology. 2005 Aug;71(8):4407-4413.

(165). Ma L, Lu H, Sprinkle A, Parsek MR, Wozniak DJ. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. Journal of bacteriology. 2007 Nov;189(22):8353-8356.

(166). Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S, Filloux A. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. Microbiology. 2005 Mar;151(3):985-997.

(167). Colvin KM, Alnabelseya N, Baker P, Whitney JC, Howell PL, Parsek MR. PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology. 2013 May;195(10):2329-2339.

(168). Zhang L, Gao Q, Chen W, Qin H, Wang H, Chen Y, et al. Regulation of pqs quorum sensing via catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology-Sgm. 2013 Sep;159:1931-1936.

(169). Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. Interspecies Interaction between Pseudomonas aeruginosa and Other Microorganisms. Microbes and Environments. 2013 Mar 12;28(1):13-24.

(170). Bala A, Gupta RK, Chhibber S, Harjai K. Detection and quantification of quinolone signalling molecule: A third quorum sensing molecule of Pseudomonas aeruginosa by high performance-thin layer chromatography. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2013 Jul 1;930:30-35.

(171). Lee Y-J, Liu H-Y, Lin Y-C, Sun K-L, Chun C-L, Hsueh P-R. Fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing nosocomial infection is correlated with levofloxacin but not ciprofloxacin use. International Journal of Antimicrobial Agents. 2010 Mar;35(3):261-264.

(172). Erdem I, Kaynar-Tascioglu J, Kaya B, Goktas P. The comparison of in the vitro effect of imipenem or meropenem combined with ciprofloxacin or levofloxacin against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains. International Journal of Antimicrobial Agents. 2002 11;20(5):384-386.

(173). David M. Livermore. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in

Pseudomonas aeruginosa: Our Worst Nightmare. the Infectious Diseases Society of America .2002 Jul; 35(5):634-640.

(174). David C. Hooper. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. Emerging Infectious Diseases. 2001 Mar;7(2):337-341.

(175). Sir. High prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care centre of north India. Are we under-reporting?. Indian J Med Res.2008 Sep;128:324-325.

(176). Endimiani A, Perez F, Bonomo RA. Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. Expert review of anti-infective therapy. 2008 Dec;6(6):805-824.

(177). Aoki Y, Urakami T, Magarifuchi H, Nagasawa Z, Nagata M, Fukuoka M. The importance of pharmacokinetic consultation of cefepime treatment for Pseudomonas aeruginosa bacteremia: a case report of severe thermal burn injury. Journal of Infection and Chemotherapy. 2011 ;17(3):407-411.

(178). Angelescu M, Apostol A. [Cefepime (maxipime), large spectrum 4th generation cephalosporin, resistant to beta-lactamases]. Chirurgia. 2001 Nov-Dec;96(6):547-552.

(179). Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Potency and spectrum trends for cefepime tested against clinical bacterial isolates collected in North American medical centers: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2003). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2005 Jul;52(3):265-273.

(180). Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid Pseudomonas aeruginosa among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. Journal of Cystic Fibrosis. 2008 Sep;7(5):391-397.

(181). Pena I, JJP, CR-A, IR-A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 isolates. International Journal of Antimicrobial Agents. 2014 May ;43(5): Pages 460-464.

(182). Siva Gowri PATHMANATHAN, Nor Azura SAMAT, Ramelah MOHAMED. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Malaysian Hospital. Journal of Medical Sciences. 2009 Apr;16(2): 28-33.

(183). Mah T-F, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature. 2003 Nov;426(6964):306-310.

(184). Merle E. Olson, Howard Ceri, Douglas W. Morck, Andre G. Buret and Ronald R. Read. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2002;66:86-92.

(185). Hiroko I., Yoshihisa I., Yuichi K., Tsuyoshi O., Kenichi S., Hiroyuki K.. In Vitro and In Vivo Activities of Levofloxacin against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrobial agents and chemotherapy. 1998 Jul;42(7:1641-1645.)

(186). Tirupathi RG, Suresh BK, Kumar JU, Sujana P, Rao AV, Sreedhar AS. Anti–microbial principles of selected remedial plants from Southern India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2011 Aug;1(4):298-305.

(187). Kuete V, Fozing DC, Kapche WFGD, Mbaveng AT, Kuiate JR, Ngadjui BT, et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from Morus mesozygia stem bark. Journal of Ethnopharmacology. 2009 Jul;124(3):551-555.

(188). C MK. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. ASM News. 1992;58:202-207.

(189). Høiby N1 BT, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents . 2010 Apr;(35(4)):322-332.

(190). Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lymar SV, Rowe JJ, Sun Yoon S, et al. Anaerobic metabolism and quorum sensing by Pseudomonas aeruginosa biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. Advanced Drug Delivery Reviews. 2002 May;54(11):1425-1443.

(191). Rahman M, Kuhn I, Rahman M, Olsson-Liljequist B, Mollby R. Evaluation of a Scanner-Assisted Colorimetric MIC Method for Susceptibility Testing of Gram-Negative Fermentative Bacteria. Applied and environmental microbiology. 2004;70(4):2398-2403.

(192). Holden PA, LaMontagne MG, Bruce AK, Miller WG, Lindow SE. Assessing the Role of *Pseudomonas aeruginosa* Surface-Active Gene Expression in Hexadecane

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Biodegradation in Sand. Applied and environmental microbiology. 2002;68(5):2509-2518.

(193). Zimmer KR, Macedo AJ, Nicastro GG, Baldini RL, Termignoni C. Egg wax from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Ticks and Tick-borne Diseases. 2013 Sep;4(5):366-376.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Tryptone Soya Agar ประกอบด้วย

Tryptone Soya Agar (Oxoid)	40	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และแบ่งใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพลาสติก จานละ 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.2 Tryptone Soya Broth ประกอบด้วย

Tryptone Soya Broth (Oxoid)	30	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.3 Mueller Hinton Agar ประกอบด้วย

Mueller Hinton Agar (Oxoid)	38	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และแบ่งใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพลาสติก จานละ 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.4 Motile ประกอบด้วย

Yryptone (Merck)	10	กรัม
NaCl (Merck)	5	กรัม
Agar (Oxoid)	3	กรัม
2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma Aldrich)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 10X (pH 7.4)

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na2HPO4 . 2H2 O	14.4	กรัม
KH2PO4	2.4	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 7.4 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 20% HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

2.2 การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X

PBS 10X	100	มิลลิลิตร
ddH2O	900	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียมสาร TE Buffer (1X)

1M Tris pH 8.0	10	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	2	มิลลิลิตร
dd H2O	1000	มิลลิลิตร

Tris (pH 8.0) (1X)

ละลายให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเตรียมสารTris-base

Tris-base (Sigma Aldrich)	121	มิลลิลิตร
Dd H_2O	1000	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิทยา ใหม่ตา

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY