

กิตติกรรมประกาศ

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

มิถุนายน 2556

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

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

Name of Investigators Rungtip Chuanchuen
 Chanwit Tripuddharat

Year June 2013

Abstract

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

สารบัญ

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

รายการตารางประกอบ

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

รายการภาพประกอบ

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

รายการสัญลักษณ์

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

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