2. Executive summary

2.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* นั้นเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม non-fermentative gram-negative bacilli ซึ่งกำลังทวีความสำคัญทางคลินิกขึ้นเรื่อยๆ เชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลตั้งแต่ โรคปอดบวม การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในบาดแผล ไปจนถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอผู้ป่วยวิกฤต (ICU) ซึ่งมักพบ *A. baumannii* เป็นเชื้อซ้ำเติมในผู้ป่วยที่ต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ ปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งยวดในปัจจุบันของการติดเชื้อ *A. buamannii* คือการที่เชื้อนี้ดื้อยาปฏิชีวนะจำนวนมาก โดยมีรายงานแล้วว่า *A. buamannii* เป็นเชื้อที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะทุกขนานที่มีใช้รักษาผู้ป่วยในปัจจุบัน ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงมีการนำ colsitin กลับมาใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* colisitn นั้นเป็นยาปฏิชีวนะที่เคยมีใช้แพร่หลายในอดีต แต่เนื่องจากตัวยามีพิษต่อไตและระบบประสาท ประกอบกับการที่มียาใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าและมีความปลอดภัยมากกว่า จึงทำให้มีการใช้ colistin น้อยลงจนไม่เป็นที่นิยมอีกต่อไป แต่ต่อมาเมื่อมีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในโรงพยาบาลที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนานทยอยกันอุบัติขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *A. baumannii* แต่ก็ยังพบว่าเชื้อไวต่อ colistin อยู่ จึงมีการนำ colistin กลับมาใช้ใหม่ในเวชปฏิบัติสำหรับการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา แต่สถานการณ์ในปัจจุบันพบว่าเริ่มมีเชื้อ *A. baumannii* ที่เริ่มดื้อยา colistin แล้ว ซึ่งถ้าเชื้อสามารถดื้อ colistin ได้ก็หมายถึงไม่มียาปฏิชีวนะใดที่สามารถนำมาใช้รักษาเชื้อสายพันธุ์นี้ได้อีก ข้อเท็จจริงดังกล่าวเป็นสิ่งที่ชี้ให้เห็นว่าโลกกำลังเผชิญกับภาวะวิกฤติของการรักษาโรคติดเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ ซึ่งถ้าไม่มีมาตรการหยุดยั้งอัตราการดื้อยาของเชื้อเหล่านี้ สุดท้ายการสาธารณสุขในยุคปัจจุบันอาจจะกลับไปสู่ยุคก่อนใช้ยาปฏิชีวนะ (pre-antibiotic era) ซึ่งโรคติดเชื้อจะมีอัตราตายสูงถึงแม้ว่าจะเป็นโรคที่ดูเหมือนจะไม่รุนแรงก็ตาม สัญญาณอันตรายอย่างหนึ่งก็คือการที่พบสัดส่วนของเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อ colistin มากขึ้นทุกปี ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกในการดื้อยาของเชื้อและ ธรรมชาติของการดื้อยาจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการวางมาตรการในใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเหมาะสมในการป้องกันการดื้อยา รวมไปถึงการคิดค้นยาปฏิชีวนะใหม่ๆในอนาคต

Colistin เป็นยาในกลุ่ม antimicrobial peptide มีโครงสร้างเป็นสายเปปไทด์สายสั้นๆออกฤทธิ์โดยการใช้ประจุบวกจับกับโมเลกุลของ lipopolysaccharide ที่มีประจุลบบนผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ และแทรกตัวเองผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ไปออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูรั่วเกิดขึ้น กลไกในการดื้อยาที่เคยมีการรายงานมาได้แก่การทีเชื้อมีการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A ซึ่งเป็นส่วนของ lipolysaccharide ที่เป็นเป้าหมายในการจับของยา จึงมีผลทำให้ยาไม่สามารถจับกับเป้าหมายและออกฤทธิ์ไม่ได้ในที่สุด กลไกหลักในการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุล lipid A ของเชื้อก็คือการลดประจุลบของโมเลกุล lipid A โดยการเติมโมเลกุลของ aminoarabinose, phosphoethanolamine หรือน้ำตาลอื่นๆเข้ากับโมเลกุล lipid A ที่ตำแหน่งของ phosphate ซึ่งเดิมมีประจุลบ ในแบคทีเรียหลายสปีชีส์กลไกดังกล่าวเป็นกลไกในการปรับตัวตามปกติของเชื้อต่อสิ่งเร้าภายนอก เช่น การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ หรือ pH ในเชื้อ *Salmonella* นั้นพบว่าตัวโมเลกุลของ antimicrobial peptide เองนั้นเป็นตัวกระตุ้นการดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A เอง การกระตุ้นดังกล่าวนั้นเกิดขึ้นผ่านทางระบบ two-component regulatory-sensor ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็น sensor ที่ผิวเซลล์ และ regulator ซึ่งทำงานผ่านสัญญาณที่ส่งผ่านมาจาก sensor ไปเพิ่มการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการดัดแปลง lipid A ระบบ two-component

regulatory-sensor ที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการดัดแปลง lipid A ได้แก่ PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB และ ParR/ParS จากการศึกษาจีโนมของ *A. baumannii* พบว่าในเชื้อนี้มีเพียงระบบเดียวได้แก่ PmrA/PmrB โดยที่ยีน *pmrAB* นั้นอยู่ใน operon ที่ประกอบไปด้วยยีน 3 ยีนได้แก่ *pmrCAB* Pmr B นั้นทำหน้าที่เป็น sensor ซึ่งรับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกแล้วส่งสัญญาณให้ PmrA ไปเพิ่มการสร้าง PmrC ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเติมโมเลกุลของ phosphoethanolamide เข้ากับ lipid A ยังผลให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม antimicrobial peptide เช่น colistin ได้ ในต่างประเทศพบว่าเชื้อ *A. buamannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยานั้นมีการกลายพันธุ์ในยีน *pmrCAB* ทำให้มีการเติม phosphoethanolamide มากเกินปกติ ยังผลให้เกิดการดื้อยา colistin ได้

ในโรงพยาบาลศิริราชนั้นโรคติดเชื้อจาก *A. buamannii* นั้นเป็นปัญหาสำคัญ และมีการแยกเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา colistin ได้จากผู้ป่วยเป็นระยะๆ ซึ่งบางสายพันธุ์พบการดื้อยาในระดับสูง การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการประเมินว่าเชื้อ *A. buamannii* ในโรงพยาบาลศิริราชนั้น ดื้อยา colistin ด้วยกลไกในการดัดแปลงโมเลกุลของ lipid A หรือไม่ รวมทั้งทดสอบว่ายา colistin สามารถกระตุ้นให้เชื้อเกิดการดัดแปลง lipid A และดื้อยาโดยไม่เกิดการกลายพันธุ์ได้หรือไม่

2.2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *A. buamannii* ที่ดื้อยา colistin
2. เพื่อระบุ (identify) และวิเคราะห์ (analyze) โครงสร้างของ lipid A จากเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา colistin ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เพื่อระบุโครงสร้างที่จำเพาะในการดื้อยา
3. เพื่อระบุและจำแนกการกลายพันธุ์ในยีน *pmrCAB* ของเชื้อ A. buamannii ที่ดื้อต่อ colistin
4. เพื่อทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา (inducible resistance) ของเชื้อ *A. buamannii* โดย colistin

2.3. ระเบียบวิธีวิจัย

ลำดับการวิจัย

1. เก็บรวบรวมเชื้อ *A. baumanni* จากสิ่งส่งตรวจ
2. จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี random amplification of polymorphic DNA (RAPD)
3. ทำการทำสอบการดื้อยาของเชื้อโดยการหาค่า minimal inhibitory conentration (MIC) ต่อ colistin
4. สกัด lipid A จากเชื้อเหล่านี้ด้วยวิธี Carloff microextraction
5. วิเคราะห์โครงสร้างของ lipid A ที่สกัดได้โดย MALDI-TOF mass spectrometry
6. เพิ่มจำนวนยีน *pmrCAB* ด้วย PCR และหาลำดับเบสของยีน
7. เลี้ยงเชื้อที่ไวต่อยา colistin ในความเข้มข้นของยาที่ต่ำกว่าค่า MIC ของเชื้อ แล้วทำการทดสอบการดื้อยาและวิเคราะห์โครงสร้างของ lipid A และลำดับเบสของยีนตามขั้นตอน 3-6

รายละเอียดในขั้นตอนต่างๆมีดังนี้

สายพันธุ์และสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *A. baumannii* ที่จะใช้การทดลองนั้นจะได้จากการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจต่างๆจำนวน 200 สายพันธุ์จาก เลือด เสมหะ ปัสสาวะ และอื่นๆ ที่นำส่งห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล หลังจากแยกเชื้อได้แล้วควรนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เร็วที่สุด เพื่อให้โครงสร้างของ lipid A นั้นยัง คงสภาพนั้นอยู่ เชื้อที่ได้นั้นจะนำมาเลี้ยงใน Luria-Bertani broth เป็นเวลาหนึ่งคืนก่อนที่จะนำมาสกัด lipid A เชื้อจำนวนหนึ่งจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาต้านจุลชีพเพื่อทดสอบหาสภาวะที่ สามารถกระตุ้นให้เชื้อดัดแปลงโครงสร้างของ lipid A ได้

การสกัด lipid A (Lipid A extraction)

การสกัด lipid A จากเชื้อนั้นจะทำโดยวิธี micro-extraction โดย Carloff ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัด ใช้สารเคมีน้อย สามารถทำได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้วิเคราะห์โครงสร้างของ lipid A

Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

Lipid A ที่เตรียมด้วยวิธี micro-extration จะถูกส่งไปยัง University of Maryland, Baltimore ประเทศสหรัฐอเมริกาเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry โดย Dr. Rober K. Ernst ซึ่งเป็นหนึ่งในผู้ร่วม คณะวิจัย mass spectrum ที่ได้จะนำมาใช้คำนวณหาชนิดของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบของ lipid A และประมวลหาโครงสร้างของ lipid A ทั้งหมดที่เป็นไปได้

Minimal inhibitory concentration (MIC)

บางส่วนของเชื้อที่โครงสร้างของ lipid A บ่งว่าอาจจะมีความต้านทานยาในกลุ่ม cationic antimicrobial peptide เพิ่มขึ้น จะนำมาทดสอบหา susceptibility ต่อ colistin ด้วยวิธี broth microdilution ตาม guidedline ของ CLSI 2011

2.4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

การทดลอง	ช่วงเวลา	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
เก็บรวบรวมเชื้อ	เดือนที่ 1-6	ได้เชื้อครบ 200 สายพันธุ์
ทำสอบการดื้อยาในกลุ่ม cationic antimicrobial peptide ด้วยวิธี broth microdilution	เดือนที่ 1-6	ทราบผล MIC ของเชื้อทั้ง 200 สายพันธุ์
ทยอยสกัด lipid A ด้วยวิธี Carloff	เดือนที่ 1-6	ได้ lipid A บริสุทธิครบ 200 ตัวอย่าง
ทยอยส่งตัวอย่าง lipid A ไปยังประเทศสหรัฐอเมริกาเพื่อทำ MALDI-TOF mass spectrometry	เดือนที่ 7-12	ได้รับผล mass spectrum ของ lipid A ทั้ง 200 ตัวอย่าง
ทยอยวิเคราะห์ผล mass spectrum ของ lipid A ที่ได้	เดือนที่ 7-12	ทราบและจำแนกประเภทของ lipid A ที่พบ
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน	เดือนที่ 13-18	ทราบลำดับเบสของยีน

การทดลอง	ช่วงเวลา	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
pmrCAB		*pmrCAB*
ทดสอบการแสดงออกของยีน *pmrCAB*	เดือนที่ 19-26	ได้ผลการแสดงออกของยีน *pmrCAB*
รวบรวมข้อมูลและประมวลผล	เดือนที่ 26-30	ประมวลผลการทดลองทั้งหมด และเตรียมต้นฉบับตีพิมพ์

2.5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1: ชื่อหัวเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: -

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: -

ปีที่ 2: ชื่อหัวเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Lipid A structure profiles of the colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in Siriraj Hospital

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Microbial Drug Resistance (impact factor: 2.364)

2.6. งบประมาณโครงการ

1. หมวดค่าตอบแทน

ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ (10,000 บาท/เดือน เป็นเวลา 24 เดือน)	240,000	บาท

2. หมวดค่าวัสดุ

		จำนวน		
				บาท
2.1	LB broth and agar	1 kg	30,000	บาท
2.2	Petri Dish	1,000	7,000	บาท
2.3	Ethanol	1 L	3,000	บาท
2.4	Methanol	1 L	1,100	บาท
2.5	Isobutyric acid	500 ml	2,400	บาท
2.6	NH_4OH	500 ml	1,100	บาท
2.7	Chloroform	500 ml	2,200	บาท
2.8	5-chloro-2-mercaptobenzothiazole (CMBT)	25 gm	8,500	บาท
2.9	KCl	500 gm	1,400	บาท
2.10	$(NH_4)_2SO_4$	500 gm	1,300	บาท
2.11	K_2SO_4	500 gm	2,000	บาท
2.12	KH_2PO_4	500 gm	2,000	บาท
2.13	Trizma Base	1 kg	3,500	บาท
2.14	Casamino acid	100 gm	1,700	บาท
2.15	Glycerol	500 ml	2,400	บาท
2.16	$MgCl_2$	100 gm	1,000	บาท
2.17	Colistin sulphate salt	1 gm	3,000	บาท
2.18	Polymyxin B sulfate	1 unit	1,600	บาท
2.19	Ampicillin	25 gm	5,900	บาท
2.20	Dimethyl sulfoxide	100 ml	1,700	บาท
2.21	Glucose	500 gm	850	บาท

2.22	Sucrose	1 kg	2,250	บาท
2.23	NaOH pellets	250 gm	1,800	บาท
2.24	HCl	500 ml	1,500	บาท
2.25	NaCl	500 gm	2,100	บาท
2.26	Dry Block Heater	1	29,000	บาท
2.27	Vortex Mixer	1	12,500	บาท
2.28	Magnetic Stirrer	1	10,200	บาท
2.29	Micropipette tips	N/A	10,000	บาท
2.30	Pipettes (5-25 ml)	N/A	10,000	บาท
2.31	Microcentrifuge tubes	N/A	12,000	บาท
2.32	เครื่องแก้ว	N/A	25,000	บาท
2.33	คอมพิวเตอร์	1	20,000	บาท
2.34	พรินเตอร์	1	5,000	บาท
	รวม		225,000	บาท
3. หมวดค่าใช้สอย				
	ค่าส่งตัวอย่าง lipid A ไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา		15,000	บาท
4. หมวดค่าจ้าง			-	บาท
	รวมทั้งหมด		480,000	บาท