บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปค็อกโคบาซิลไล อยู่ในวงศ์ *Moraxellaceae* จัดอยู่ในกลุ่ม nonfermentative gram-negative bacilli เป็นเชื้อที่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโต ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ในบรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจน

ความสำคัญทางการแพทย์

A. baumannii เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสองรองจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบชนิด ventilator-associated pneumonia พบบ่อยที่สุดในหอผู้ป่วยภาวะวิกฤติ (intensive care unit) ของโรงพยาบาลรามาธิบดีในปี พ.ศ. 2542 (ศิริลักษณ์ อภิวาณิชย์, วาทินี คัชมาตย์ และ บรรณจง วรรณยิ่ง. 2543 : 33-41) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเชื้อนี้มากขึ้นทั่วโลกโดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล

ความสำคัญอีกประการหนึ่งของเชื้อ *A. baumannii* คือ เชื้อมักจะดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug-resistant *A. baumannii*; MDR-*AB*) (Rungruanghiranya, Somboonwit and Kanchanapoom. 2005 : 77-92) ผลการศึกษาในประเทศไทยตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2539-2540 พบอุบัติการณ์ MDR-*AB* สูงถึงร้อยละ 57.6 ของเชื้อ *A. baumannii* ทั้งหมดและมีรายงานการติดเชื้อ MDR-*AB* เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน นอกจากนี้ผลการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลศิริราช ปี พ.ศ. 2545 พบว่าร้อยละ 57 ของเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกขนานที่มีในประเทศไทย (pandrug-resistant *A. baumannii*; PDR-*AB*) และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* มีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 54.7 (Keerasuntonpong et al. 2002 : 951-954) โดยเชื้อ PDR-*AB* มีอุบัติการณ์ดื้อต่อยา cotrimoxazole, gentamicin, amikacin, piperacillin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefoperazone/sulbactam, cefpirome และ ciprofloxacin ซึ่งในจำนวนผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2546 พบเชื้อ PDR-*AB* และ MDR-*AB* ร้อยละ 46 และ 23 ตามลำดับ (Chaiwarith et al. 2005 : 1-8)

ในปัจจุบันเชื้อ MDR-*AB* มีแนวโน้มดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems สูงขึ้นอย่างมาก จากข้อมูลโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาในปี พ.ศ. 2546-2550 พบว่าเชื้อดื้อต่อยา imipenem/cilastatin และ meropenem ร้อยละ 77 และ 78 ในปี พ.ศ. 2546 และเพิ่มเป็นร้อยละ 92 และ 92 ในปี พ.ศ. 2550 ตามลำดับ (จารุกรณ์ วิศาลสวัสดิ์. 2551) และจากการติดตามเฝ้าระวังสถานการณ์การดื้อยา

ของเชื้อแบคทีเรีย มานานกว่า 10 ปี ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในโรงพยาบาล มีการระบาดของเชื้อนี้ที่ดื้อยาทุกชนิด โดยเฉพาะดื้อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อได้มากชนิดที่สุด เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.1 ในปี พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 63 ในปี พ.ศ. 2553 และดื้อยา cefoperazone/sulbactam จากร้อยละ 3 เพิ่มเป็นร้อยละ 44 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สำนักงานสารนิเทศและประชาสัมพันธ์. กระทรวงสาธารณสุข. 2554)

กลไกการดื้อยากลุ่ม β-lactams

กลไกสำคัญในการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. คือการสร้างเอนไซม์ β-lactamases มาย่อยสลายยากลุ่ม β-lactams โดยเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้หลากหลาย เช่น TEM-1 และ TEM-2 ซึ่งจัดอยู่ใน Ambler class A β-lactamases และ AmpC β-lactamases (Ambler class C) ตลอดจนเอนไซม์อื่นๆ ซึ่งความชุกของเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละรายงานก็จะแตกต่างกัน (กำธร มาลาธรรม. 2545 : 139-166) บางรายงานพบว่าเชื้อส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ที่มี pI ประมาณ 5.4 ซึ่งเป็นลักษณะของ TEM-1 บางรายงานพบเอนไซม์ที่มี pI มากกว่า 8 เป็นส่วนใหญ่ ลักษณะเช่นนี้เป็นลักษณะของ cephalosporinase ซึ่งอาจพบในเชื้อนี้ได้สูงถึงร้อยละ 98 ของสิ่งส่งตรวจทางคลินิก นอกจากนี้เชื้ออาจมีกลไกการดื้อยาอื่น เช่น การลดจำนวน porin ที่เยื่อบุภายนอกเซลล์ หรือ การเพิ่มจำนวน efflux pumps ที่ช่วยลดความเข้มข้นของยาที่เข้าไปใน periplasmic space และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding protein ซึ่งอาจมีส่วนเสริมให้เชื้อที่สร้างเอนไซม์เหล่านี้ดื้อต่อยา β-lactams มากขึ้น (Poirel and Nordmann. 2006 : 826-836)

การดื้อยากลุ่ม β-lactams ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นปัญหามากที่สุดในปัจจุบันและพบได้ทั่วโลก ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) ซึ่งพบบ่อยในเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella* spp. อย่างไรก็ตามจะพบได้ไม่บ่อยนักในเชื้อ *Acinetobacter* spp. (Vahabogul, H. et al. 1997 : 2265–2269 ; กำธร มาลาธรรม. 2545 : 139-166)

ข้อมูลในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem) ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและพบได้ทั่วโลก และจากการศึกษากลไกการดื้อยากลุ่ม carbapenems ใน *A. baumannii* พบว่าเชื้อใช้กลไกหลายรูปแบบ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ β-lactamases ไปทำลายยา การเปลี่ยนแปลง outer membrane proteins (OMPs) เพื่อเพิ่มกระบวนการขับยาออกหรือลดการแพร่ผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเป้าหมาย (target) การออกฤทธิ์ของยา โดยที่เชื้ออาจใช้หลายกลไกพร้อมกัน อย่างไรก็ตามกลไกการดื้อยาใน

เชื้อ *A. baumannii* ที่พบได้บ่อยเกิดจากเชื้อสร้างเอนไซม์ที่สำคัญคือ carbapenem-hydrolysing β-lactamases หรือ carbapenemase ที่สามารถย่อยสลายยาในกลุ่ม β-lactams เกือบทุกชนิด รวมทั้งย่อยสลายยากลุ่ม carbapenems ได้ carbapenem-hydrolysing β-lactamases จัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ metallo-β-lactamases (MBLs) หรือ class B β-lactamases และ carbapenem-hydrolysing class D β-lactamases (CHDLs) หรือ oxacillinases (Poirel and Nordmann. 2006 : 826-836) โดยเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มจะไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanate และ tazobactam จากการศึกษาพบว่ายีนที่ควบคุมการสร้าง MBLs ในเชื้อ *A. baumannii* ส่วนใหญ่มักพบบน class 1 integron ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ transponson ที่อยู่ได้ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด ขณะที่ยีนที่ควบคุมการสร้าง CHDLs มักพบเป็นชุดยีน (gene cassettes) ซึ่งมีรายงานว่าพบได้ทั้งบนโครโมโซม (chromosomal-mediated genes) และพลาสมิด (plasmid-mediated genes) (ตารางที่ 2.1) อาจส่งผลให้การดื้อยาแพร่กระจายได้โดยง่าย ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อ carbapenem-resistant *A. baumannii* (CR-*AB*) เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขทั่วโลกที่ต้องเฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้ออย่างเร่งด่วน (Perez et al. 2007 : 3471-3484 ; Giamarellou, Antoniadou and Kanellakopoulou, 2008 : 106-199 ; Zarrilli et al. 2009 : 335-341)

ตารางที่ 2.1 กลไกการดื้อยากลุ่ม carbapenems ในเชื้อ *A. baumannii* (Zarrilli et al. 2009 : 335)

Mechanism or responsible structure	Note
β-lactam hydrolysis	
IMP-1, -2, -4, -5, -6, -11 VIM-2, SIM-1	Class B metallo beta-lactamases. Class 1 integron-associated genes.
OXA-23 cluster	Class D beta-lactamases. Chromosomal or plasmid genes flanked by IS elements.
OXA-24/40 cluster	Class D beta-lactamases. Chromosomal or plasmid genes.
OXA-58 cluster	Class D beta-lactamases. Plasmid or chromosomal genes flanked by IS elements.
OXA-51cluster	Chromosomal class D beta-lactamase intrinsic to *A. baumannii*. Confers carbapenem resistances if IS elements are inserted upstream of the gene
Changes in outer-membrane proteins (OMPs)	
CarO 33 to 36-kDa OMP OprD-like OMP	26 kDa OMP implicated in drug influx Other OMPs associated with carbapenem resistance
Target alteration	
Altered penicillin-binding proteins	Reduced PBP-2 expression

MBLs เป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เชื้อดื้อยากลุ่ม carbapenems แต่ค่า MICs ของยาอาจต่ำมากจนสูงอย่างเห็นได้ชัด ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ และปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดของเชื้อ และการดื้อยาโดยมีกลไกอื่นร่วมด้วย เป็นต้น ส่งผลให้เชื้อที่สร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ดื้อต่อยามากน้อยต่างกัน MBLs ที่พบในปัจจุบันมี 5 ชนิด คือ IMP-type, VIM-type, SIM-1, SPM-1 และ GIM-1 (Poirel and Nordmann. 2006 : 826-836) ที่มีรายงานว่าพบได้บ่อยในเชื้อ *A. baumannii* ได้แก่ IMP-1 ในอิตาลี (Cornaglia et al. 1999 : 899-900) ญี่ปุ่น (Shibata et al. 2003 : 5407-5413) และเกาหลี (Lee et al. 2003 : 868-871) IMP-2 ในอิตาลี (Riccio et al. 2000 : 1229-1235) และญี่ปุ่น (Shibata et al. 2003 : 5407-5413) IMP-4 ในฮ่องกง (Chu et al. 2001 : 710–714) สิงคโปร์ (Lee et al. 2007 : 633-639) และออสเตรเลีย (Peleg et al. 2006 : 399-400) IMP-5 ในโปรตุเกส (Da Silva et al. 2002 : 33-39) IMP-6 ในบราซิล (Gales et al. 2003 : 77–79) VIM-1 และ VIM-2 ในเกาหลี (Lee et al. 2003 : 868-871) กรีซ (Ikonomidis et al. 2008 : 346-349 ; Pournaras et al. 2006 : 557-561) และโปแลนด์ (Fiett et al. 2006 : 880-886) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ SIM-1 เป็นครั้งแรกในเกาหลี (Lee et al. 2005 : 4485-4491)

CHDLs มีหลายชนิด แต่ชนิดที่สามารถย่อยสลายยาในกลุ่ม carbapenems และพบได้ในเชื้อ *A. baumannii* ได้แก่ OXA-23-like (OXA-23, 27, 49), OXA-24-like (OXA-24, 25, 26, 40, 72) และ OXA-58-like โดยพบอุบัติการณ์ของเอนไซม์เหล่านี้ในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศเกาหลี (Jeong et al. 2006 : 4423-431 ; Lee et al. 2007 : 633-639 ; Sung et al. 2008 : 16-23) จีน (Wang et al. 2007 : 4022-4028) ไต้หวัน (Chen et al. 2009 : 394-397 ; Lee et al. 2009 : 580-584) และสิงคโปร์ (Koh et al. 2007 : 627-632 ; Lee et al. 2007 : 633-639) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CHDLs ชนิด OXA-51-like (OXA-51, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71) ในเชื้อ *A. baumannii* (Lee et al. 2009 : 580-584) ซึ่งยีนชนิดนี้จัดเป็น chromosomal intrinsic resistance gene จะแสดงออกและส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems เมื่อพบ insertion sequence (IS) element ชนิด IS*Aba1* ที่ปลายด้าน 5’ ของยีนเท่านั้น (Sunenshine et al. 2007 : 97-103)

ประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ CHDLs ชนิด OXA-72 เป็นครั้งแรกปี พ.ศ. 2547 (GenBank accession no. AY739646) และมีรายงานการพบเชื้อ carbapenem-resistant *A. baumannii* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ OXA-23 และ IMP-type โดยแยกเชื้อได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ในปี พ.ศ. 2549 (Niumsup et al. 2009 : 152-154) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันประเทศไทยยังมีรายงานเกี่ยวกับอุบัติการณ์การพบเชื้อ *A. baumannii*

สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์กลุ่ม carbapenem-hydrolysing β-lactamases หรือ carbapenemase ชนิดต่างๆ น้อยมาก

การตรวจหา MBLs และ CHDLs

การตรวจหา MBLs และ CHDLs มี 2 วิธีคือ การตรวจทางฟีโนทัยป์ (phenotypic detection) เป็นวิธีที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลทั่วไป และทางจีโนทัยป์ (genotypic detection) เป็นการตรวจระดับโมเลกุลที่มีความจำเพาะสูง ส่วนใหญ่ใช้ในการตรวจยืนยัน (confirmation test) เหมาะสำหรับงานวิจัย ไม่เหมาะที่จะใช้ในงานประจำ

การตรวจหา MBLs และ CHDLs ทางฟีโนทัยป์

1. Modified Hodge test

Modified Hodge test เป็นวิธีทดสอบที่ Lee และคณะ (Lee et al. 2003 : 4623-4629) ดัดแปลงมาจาก Hodge test (Hodge, Ciak and Tramont. 1978 : 102-103) เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรอง *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. ที่สร้างเอนไซม์ metallo-β-lactamases (MBLs) โดยทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และใช้แผ่นยา imipenem 10 μg ผลบวกจะเกิดลักษณะวงใสที่มีการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 เกิดขึ้นตามรอย streak ของเชื้อทดสอบที่สร้างเอนไซม์ได้ เรียกว่า cloverleaf shape ซึ่งพบว่าวิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. ที่สร้างเอนไซม์ MBLs ได้ทุกสายพันธุ์ และมีรายงานการนำ imipenem มาใช้ในการตรวจคัดกรอง *A. baumannii* ที่มี carbapenemase activity (Jesudson, Kandathil and Balaji 2005 : 780-783 ; Jeong et al. 2006 : 423-431 ; Lee et al. 2007 : 633-639 ; Sung et al. 2008 : 16-23 ; Park et al. 2010 : 430-435)

2. Double disk synergy test

Double disk synergy test เป็นวิธีทดสอบทางฟีโนทัยป์ที่ใช้หลักการ disk diffusion (CLSI. 2010) ซึ่ง นำมาใช้ในการตรวจคัดกรองแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างเอนไซม์ MBLs โดยใช้แผ่นยา imipenem 1 disk และสาร chelating agent ได้แก่ EDTA เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยจับกับ zinc ซึ่งเป็น cofactor อีก 1 disk อ่านผลบวกโดยดูการเสริมฤทธิ์ของยา (synergistic effect) (Lee et al. 2003 : 4623-4629) จากนั้นมีการดัดแปลงวิธีนี้โดยใช้แผ่นยาชนิดอื่น ได้แก่ ceftazidime และ chelating agent กลุ่ม thiol compound ได้แก่ mercaptopropionic acid, mercaptoethanol, mercaptoacetic acid และ phenanthroline (Arakawa et al. 2000 : 40-3 ; Lee et al. 2003 : 4623-29 ; Franklin, Liolios and Peleg. 2006 : 3194-3144 ; Picao et al. 2008 : 2028-2037) ซึ่งผลที่ได้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่ทดสอบ และชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิด อย่างไรก็ตามมีรายงานการตรวจคัดกรอง *A. baumannii* ที่สร้างเอนไซม์

MBLs โดยใช้ EDTA เป็น chelating agent (Ikonomidis et al. 2008 : 346-349 ; Andriamanantena et al. 2010 : 17-22)

3. Combined disk test

Combined disk test เป็นวิธีทดสอบทางฟีโนทัยป์ที่ใช้หลักการ disk diffusion (CLSI. 2010) ในการตรวจคัดกรองแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างเอนไซม์ MBLs โดยใช้แผ่นยา imipenem 1 disk และแผ่นยา imipenem ที่เติมสาร chelating agent ได้แก่ EDTA อีก 1 disk อ่านผลบวกโดยดูความแตกต่างของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่แผ่นยา imipenem + EDTA เทียบกับแผ่นยา imipenem มากกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตร (Yong et al. 2002 : 3798-3801) ในปัจจุบันมีการดัดแปลงวิธีนี้โดยใช้แผ่นยาชนิดอื่น ได้แก่ ceftazidime และ chelating agent กลุ่ม thiol compound ได้แก่ mercaptopropionic acid, mercaptoethanol, mercaptoacetic acid และ phenanthroline (Franklin et al. 2006 : 3194-3144 ; Andrade et al. 2007 : 2058-2060 ; Picao et al. 2008 : 2028-2037) ซึ่งผลที่ได้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่ทดสอบ และชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิด

4. MBL Etest

MBL Etest เป็นวิธีทดสอบทางฟีโนทัยป์ที่ใช้หลักการ agar gradient diffusion โดยใช้ Etest double-end strip (AB Biodisk, Solna, Sweden) ที่ด้านหนึ่งเป็นยา imipenem อีกด้านหนึ่งเป็น imipenem รวมกับ EDTA อ่านผลบวกโดยการเปรียบเทียบค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ratio ระหว่าง imipenem และ imipenem รวมกับ EDTA ≥ 8 หรือ ≥ 3 log dilution

การตรวจหา MBLs และ CHDLs ทางจีโนทัยป์

การตรวจหา MBLs และ CHDLs ทางจีโนทัยป์เป็นวิธีที่ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ยีน $bla_{\text{IMP-type}}$, $bla_{\text{VIM-type}}$, $bla_{\text{SIM-1}}$, $bla_{\text{SPM-1}}$, $bla_{\text{GIM-1}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR), multiplex PCR, การตรวจโดยเทคนิค southern blot hybridization ด้วย specific probe และการทำ DNA sequencing เป็นต้น ซึ่งบางวิธีสามารถตรวจพบเอนไซม์ใหม่ๆ ได้ (Afzal-Shah, Woodford and Livermore. 2001 : 583–588 ; Lee et al. 2005 : 4485-4491 ; Lee et al. 2007 : 633-639 ; Wang et al. 2007 : 4022-4028 ; Lin et al. 2010 : 439-443) อย่างไรก็ตามวิธีต่างๆ เหล่านี้ยังมีข้อจำกัดที่ต้องเตรียม specific probe หรือ specific primer สำหรับแต่ละยีนที่ต้องการตรวจหา จึงเหมาะสำหรับงานวิจัยหรือใช้ในการตรวจยืนยันเท่านั้น ไม่เหมาะที่จะใช้ในงานประจำ