



ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการเป็นสารลดการดื้อยา Novobiocin ต่อเชื้อ
Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*
**Effects of Thai Medicinal Plant Extracts as Resistant Modifying Agents of
Novobiocin for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii***

ปิ่นอนงค์ ณ พัทลุง

Pinanong Na-Phatthalung

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University**

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการเป็นสารลดการดื้อยา
Novobiocin ต่อเชื้อ Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*
ผู้เขียน นางสาวปิ่นอนงค์ ณ พัทลุง
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภยงค์ วรวิมลคุณชัย)

(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภยงค์ วรวิมลคุณชัย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ กิตตินิยม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์คารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการเป็นสารลดการดื้อยา Novobiocin ต่อเชื้อ Multidrug-Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>
ผู้เขียน	นางสาวปิ่นอนงค์ ณ พัทลุง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii ดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูง เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล ที่ถูกระบุว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด มีการทดลองใช้สารสกัด 51 สารสกัดจากพืช 44 ชนิดเป็นสารลดการดื้อยา (resistant modifying agents; RMAs) novobiocin ในการยับยั้ง *A. baumannii* ATCC 19606 โดยวิธี growth inhibition assay ในขั้นตอนแรกของการคัดเลือกสารพบว่า ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml สารสกัดจากโมกหลวง (*Holarrhena antidysenterica*) ทับทิม (*Punica granatum*) เล็บมือนาง (*Quisqualis indica*) สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*) สมอไทย (*Terminalia chebula*) และสมอเทศ (*Terminalia* sp.) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ novobiocin (1/8MIC) ในการต่อต้านเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19606 ในจำนวนพืชทั้งหมดที่คัดเลือกมาโมกหลวงซึ่งมี alkaloid, condensed tannin และ triterpenoid เป็นองค์ประกอบทางพลุเคมี ทำหน้าที่เป็นสารลดการดื้อยาได้ดีที่สุด โดยพบว่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่างร้อยละ 72 ถึงร้อยละ 96 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 7.8 ถึง 250 µg/ml ในการต่อต้านเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19606 นอกจากนั้นยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ novobiocin (1/4MIC) ในการต่อต้านเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วย การศึกษาความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาของสารสกัดจากโมกหลวงต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยใช้สารสี fluorescence dye 1-N-phenylnaphthylamine (NPN) การศึกษาความสามารถในการเป็น efflux pump inhibition ของสารสกัดโดยการวัดการสะสมสี ethidium bromide (EtBr) พบว่าสารสกัดจากโมกหลวงสามารถเพิ่มการนำเข้า NPN หลังจากเติมสารสกัดซึ่งทำหน้าที่เป็นสารลดการดื้อยา แต่ไม่สามารถเพิ่มการสะสม EtBr ภายในเซลล์หลังจากเติมสารสกัดที่ทำหน้าที่เป็นสารลดการดื้อยา การใช้สารสกัดจากโมกหลวงร่วมกับ novobiocin อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

Thesis Title Effects of Thai Medicinal Plant Extracts as Resistant Modifying Agents of Novobiocin for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

Author Miss Pinanong Na-Phatthalung

Major Programme Microbiology

Academic Year 2010

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii resistance to a wide range of antimicrobial agents has been reported. This nosocomial pathogen has been considered to be the paradigm of multidrug-resistant (MDR) bacteria. Fifty-one ethanolic extracts obtained from 44 different selected medicinal plant species were tested for resistance modifying agents (RMAs) of novobiocin against a reference strain, *A. baumannii* ATCC 19606 using growth inhibition assay. In primary screening process, *Holarrhena antidysenterica*, *Punica granatum*, *Quisqualis indica*, *Terminalia bellirica*, *Terminalia chebula*, and *Terminalia* sp. at 250 µg/ml enhanced the activity of novobiocin (1/8MIC) against *A. baumannii* ATCC 19606. Among the medicinal plants selected, *Holarrhena antidysenterica* extract that contains the alkaloid, condensed tannin, and triterpenoid constituents showed the highest RMAs ability with the percentage of bacterial growth inhibition ranging between 72 and 96 at 7.81 to 250 µg/ml of the extract against the organism. In addition, the plant extract was enhanced the activity of novobiocin (1/4MIC) against clinical isolates of MDR *A. baumannii*. The effect of the RMAs ability on bacterial outer membrane function was examined by using the fluorescence dye 1-N-phenyl-naphthylamine (NPN). The efflux pump inhibition was measured by the intracellular accumulation of ethidium bromide (EtBr). There was an increase in the uptake of NPN after strains were treated with these RMA but, the intracellular accumulation of EtBr by the treated cells was not increased. The use of *Holarrhena antidysenterica* extract in combination with novobiocin might provide an effective alternative treatment for MDR *A. baumannii* infections.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภยงค์ วรวิมลคุณชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลักที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ ให้ความไว้วางใจและเอาใจใส่เป็นอย่างดีในเรื่อง
การศึกษา ค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ประธานกรรมการสอบ
วิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ เรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย การเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กนกวรรณ กิตตินิยม กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย
ผู้ทรงวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยที่ให้ความกรุณาในการแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
ให้ถูกต้องเสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร.ศศิธร ชูศรี สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือที่ติดต่อระยะเวลา
ศึกษา ทำวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ สำหรับคำแนะนำในเรื่อง
การศึกษา และการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนเรื่อง
การศึกษาตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อนและน้องร่วมรุ่น พี่และน้องในห้องปฏิบัติการทุกคนที่ให้ความ
ช่วยเหลือ กำลังใจ และคำปรึกษาที่ดี ขอขอบคุณ คุณเครือวัลย์ ห้วนกิ่ง นักวิทยาศาสตร์สุขภาพ
ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ
ในการใช้เครื่องมือในการศึกษาสารลดการคั่งยา ขอขอบคุณ คุณสุกัลญา หลีแจ้ สำหรับคำแนะนำ
ปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน
รวมถึงท่านอื่น ๆ ที่ไม่ได้เอ่ยนามที่ให้ความช่วยเหลือที่ดีมาตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง
ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปิ่นอนงค์ ณ พัทลุง

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	29
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	30
วัสดุ	30
อุปกรณ์	31
วิธีการทดลอง	32
3. ผลการวิจัย	39
4. วิจัย	59
5. สรุป	63
รายการเอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก	88
ประวัติผู้เขียน	96

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. Efflux pumps described in <i>Acinetobacter baumannii</i> and their activity in front of several antimicrobial agents	13
2. Clinical specimens of <i>Acinetobacter baumannii</i> isolated from Songklanagarind hospital (n=49)	40
3. Antimicrobial susceptibility patterns of clinical isolates of <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=45) from Songklanagarind hospital	41
4. Minimum inhibitory concentration (MIC) of novobiocin against clinical isolates of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=49) and <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	42
5. Thai medicinal plant species and their phytochemical constituents and antibacterial activity of novobiocin (1 µg/ml) in combination with ethanolic extracts (250 µg/ml) against <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	44
7. Growth inhibition of ethanolic extract of <i>Holarrhena antidysenterica</i> and novobiocin (1/8MIC) against clinical isolates of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=43)	55
8. Growth inhibition of ethanolic extract of <i>Holarrhena antidysenterica</i> and novobiocin (1/4MIC) against clinical isolates of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=43)	55

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 growing on MacConkey agar (a) and tryptic soy agar (b)	3
2.	<i>Acinetobacter baumannii</i> necrotizing infection of necrotic muscle tissue of patient X the day after the initial debridement	5
3.	Potential Mechanisms of Antimicrobial Resistance in <i>Acinetobacter</i>	12
4.	Schematic diagram of a tripartite RND system, AcrAB-TolC of <i>E. coli</i>	15
5.	Plant secondary metabolites as modifiers of multidrug resistance mechanisms	22
6.	The aminocoumarin antibiotics novobiocin, clorobiocin and coumermycin A1 and their wild-type producer strains	26
7.	Speculative model for positive supercoiling of DNA by reverse gyrase	27
8.	Adjuvant activity of ethanolic extracts of <i>Holarrhena antidysenterica</i> with novobiocin on <i>A. baumannii</i> ATCC 19606	52
9.	Percentage of growth inhibition of <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 in the presence of novobiocin at 1 µg/ml (white bar), ethanolic extract at different concentrations (black bar) and novobiocin in combination with the plant extract (gray bar). The selected plant extracts were <i>Holarrhena antidysenterica</i> (a), <i>Punica granatum</i> (b), <i>Quisqualis indica</i> (c), <i>Terminalia bellirica</i> (d), <i>Terminalia chebula</i> (e), and <i>Terminalia</i> sp. (f)	53
10.	Effect of resistant modifying agents on bacterial outer membranes as measured by relative fluorescence units (RFU). Uptake of NPN by <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 (a) and <i>A. baumannii</i> NPRC AB026 (b) suspension treated with EDTA and ethanolic extract of <i>Holarrhena antidysenterica</i>	57
11.	<i>A. buamannii</i> ATCC 19606 (a) and <i>A. buamannii</i> NPRC AB026 (b) cells were loaded with EtBr in the presence of CCCP and ethanolic extract of <i>Holarrhena antidysenterica</i> . Changes of EtBr fluorescence were monitored as a function of time to determine in effect of the test compound on EtBr efflux	58

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ATCC	=	American Type Culture Collection
cfu	=	colony forming unit
°C	=	degree celsius
μg	=	microgram
μl	=	microliter
mg	=	milligram
nm	=	nanometer
mM	=	millimolar
OD	=	optical density
μM	=	micromolar
%	=	percent
RFU	=	relative fluorescence unit
rpm	=	round per minute

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสำคัญทางการแพทย์เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ในชุมชนและโดยเฉพาะในเขตโรงพยาบาล พบการติดเชื้อได้บ่อยในปอด ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบไหลเวียนเลือด และติดเชื้อจากการคัดยกรรม (Fournier *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีกลไกการดื้อยาหลายระบบ (multidrug-resistant pathogens) เช่น ผลิตเอนไซม์ออกมาทำลายยา ขับยาออกโดย efflux pump และมี permeability ต่ำ ทำให้เชื้อคือต่อยาปฏิชีวนะหลากหลายชนิดโดยเฉพาะ ยากลุ่ม β -lactams, aminoglycosides, และ fluoroquinolones (Bratu *et al.*, 2008) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลานานในที่แห้ง (Jawad *et al.*, 1998) ทำให้เกิดการปนเปื้อนบนอุปกรณ์ทางการแพทย์ สามารถแพร่เชื้อผ่านบุคลากรทางการแพทย์โดยการสัมผัสทำให้เกิดการแพร่เชื้อไปสู่ผู้ป่วยได้ง่าย ความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดทำให้แพทย์มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ยาในการรักษามากขึ้น นักวิจัยจำเป็นต้องคิดค้นยาปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มทางเลือกในการรักษา แต่การศึกษาเพื่อหาชนิดใหม่พัฒนาไปค่อนข้างช้า โดยเฉพาะยาที่ใช้ในการรักษาแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Souli *et al.*, 2008) การใช้ยาร่วมกันในการรักษาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการพัฒนาไม่นาน เป็นการนำยาปฏิชีวนะที่เชื้อคือยาแล้วกลับมาใช้ประโยชน์ได้ (Song *et al.*, 2009) เช่นการพัฒนา amoxicillin ร่วมกับ clavulanic acid ซึ่งเป็นสารช่วยลดการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam ทำให้สามารถนำ amoxicillin มาใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ β -lactamase ได้ (Martinelli *et al.*, 1981; Wallace *et al.*, 1985)

ปัจจุบันมีการคิดค้นหาวิธีการรักษาโดยใช้ยาทางเลือกมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคเนื่องจากมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อย และมีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของเชื้อได้ดี แต่มีพืชเพียงบางชนิดเท่านั้นที่มีสารสำคัญสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี ดังนั้นจึงมีการนำความรู้ทางด้านสมุนไพรมาพัฒนาเพื่อใช้ในการเสริมฤทธิ์ยา

ปฏิชีวนะแทนการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโดยตรง มีการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสารจากสมุนไพรพบว่า ellagic acid ที่พบในสมุนไพรไทยหลายชนิด ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแต่มีความสามารถในการเป็นสารช่วยลดการดื้อยา (Resistant modifying agents; RMAs) ของ multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* (Chusri *et al.*, 2009) การใช้สารลดการดื้อยาทำให้ยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ได้กว้างขึ้น สามารถใช้ในการรักษาโรคได้นานขึ้น และลดปัญหาในการเกิดแบคทีเรียดื้อยา (Marquez *et al.*, 2005) มีรายงานพบว่าสารจากพืชทำหน้าที่เป็นสารช่วยลดการดื้อยาด้วยการยับยั้งกลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย เช่น reserpine (Garvey and Piddock, 2008) สามารถออกฤทธิ์เป็นสารช่วยลดการดื้อยาได้โดยมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้ง efflux pump ของแบคทีเรียแกรมลบ แต่การศึกษาเพื่อหาสารช่วยลดการดื้อยาจากพืชสมุนไพรเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียแกรมลบยังมีไม่มากนัก การศึกษาสารสกัดหายากจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นสารช่วยลดการดื้อยาจึงเป็นข้อมูลสำคัญที่จะพัฒนาไปสู่การแก้ปัญหาการดื้อยาในแบคทีเรียแกรมลบ และพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ที่สามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีสมุนไพรหลากหลายชนิด ประชาชนในท้องถิ่นบางแห่งยังนิยมใช้สมุนไพรในการรักษาโรคโดยใช้ความรู้ที่สืบทอดกันมา การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการส่งเสริมการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศอย่างเหมาะสม และเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาไปสู่การลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อร่างกาย

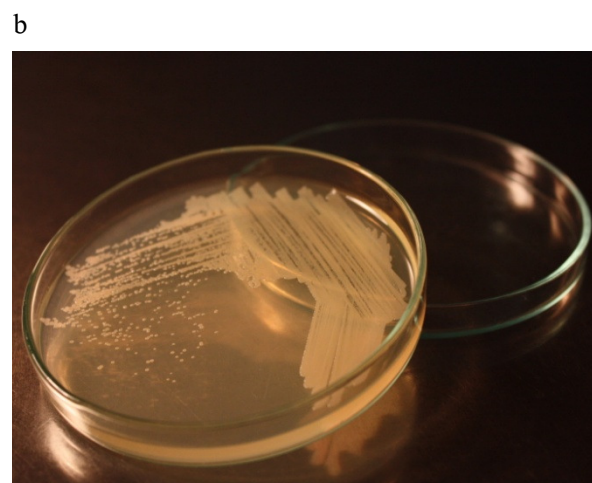
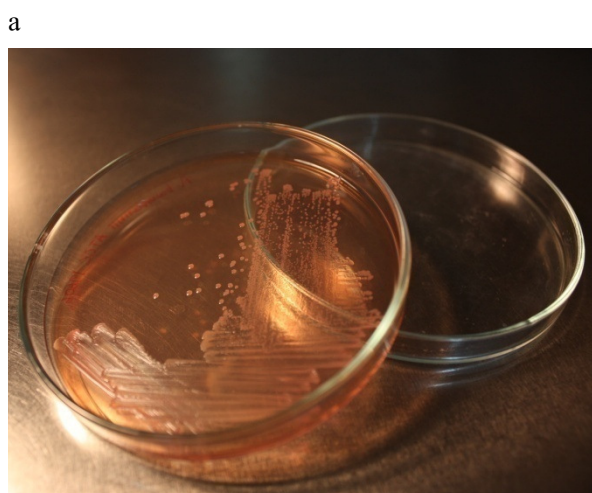
การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการศึกษากิจกรรมของสมุนไพรไทยเพื่อนำมาใช้เป็นสารช่วยลดการดื้อยาของเชื้อ MDR *A. baumannii* โดยทดลองใช้ novobiocin เป็นต้นแบบในการศึกษา และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อกลไกการดื้อยา

การตรวจเอกสาร

1. *Acinetobacter baumannii*

1.1 ลักษณะทั่วไป

A. baumannii เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Family Moraxellaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง coccobacilli อาจมีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต โดยมีลักษณะเป็น rod-shaped ในช่วง growth phase และมีลักษณะเป็น coccobacilli ในช่วง stationary phase ทำให้จำแนกเชื้อชนิดนี้ออกจากเชื้ออื่น ๆ ที่ก่อโรค เช่น *Neisseria* และ *Pseudomonas* ในสิ่งส่งตรวจได้ยาก (Konman *et al.*, 1997; Mandell *et al.*, 2005) บางครั้งอาจติดสีคล้ายแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-variable) เมื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อมีการจัดเรียงตัวแบบกระจัดกระจาย ไม่เคลื่อนที่ เชื้ออาศัยออกซิเจนในการเจริญเท่านั้นและเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C ไม่สามารถหมักน้ำตาล lactose ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาเอนไซม์ catalase ให้ผลลบกับปฏิกิริยาเอนไซม์ oxidase ลักษณะโคโลนิบนอาหาร MacConkey agar ให้โคโลนีใสไม่มีสี กลมมน ขอบเรียบ (รูปที่ 1a) ลักษณะโคโลนิบนอาหาร tryptic soy agar ให้โคโลนีสีขาวขุ่น กลมมน รอบเรียบ (รูปที่ 1b) โดยปกติจะพบเชื้อชนิดนี้ได้ตามธรรมชาติ เช่น ในดินและน้ำ และยังสามารถแยกได้จากอาหาร และแมลง (arthropods) ในสิ่งแวดล้อม (Fournier and Richet, 2006) ส่วนในมนุษย์สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยการแยกจากผิวหนังและบาดแผล ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tracts) (Getchell-White *et al.*, 1989; Schreckenberger *et al.*, 2007)



รูปที่ 1 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 growing on MacConkey agar (a) and tryptic soy agar (b)

1.2 ความสำคัญทางการแพทย์

โดยปกติ *A. baumannii* ที่พบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติมักไม่ก่อโรคนิมนุญย์ แต่ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาเกิดการระบาดของ *A. baumannii* เกิดขึ้นทั่วโลก (Gould, 2008) จนกลายเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในโรงพยาบาล มีการวิเคราะห์ถึงปัจจัยที่ส่งผลให้เชื้อเกิดความรุนแรงในการก่อโรคนิมนุญย์ พบว่าประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มหลัก ความสามารถในการมีชีวิตรอดได้นานในที่แห้งและความสามารถในการทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ (Peleg *et al.*, 2008) ปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อและการระบาดในโรงพยาบาลโดยเฉพาะในหอผู้ป่วยภาวะวิกฤต (intensive care units: ICUs) มักพบการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ติดเชื้อในกระแสเลือด และในผู้ป่วยที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องช่วยหายใจ (Fournier and Richet, 2006) มีรายงานว่า *A. baumannii* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในโรงพยาบาลตั้งแต่ช่วงปี 1970 แต่ไม่พบการระบาดในวงกว้างมากเนื่องจากไม่ก่อโรคในคนสุขภาพดีแต่จะก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และยังมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะน้อย

ในเวลาต่อมา *A. baumannii* กลายเป็นเชื้อแบคทีเรียที่รู้จักกันทั่วไปจากการระบาดในหมู่ทหารอเมริกันที่กลับมาจากการรบในประเทศอิรักและอัฟกานิสถาน (Jones *et al.*, 2006a; Hawley *et al.*, 2007) มีการตรวจพบเชื้อในบาดแผลที่ได้รับในระหว่างสงครามจนกลายเป็นข้อถกเถียงกันถึงการระบาดของเชื้อในแถบประเทศยุโรปและอเมริกาในเวลาต่อมา ปัจจุบันพบว่า *A. baumannii* เป็นเชื้อก่อโรคลำดับต้น ๆ ที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาล เป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน ผู้ป่วยหลังการผ่าตัด ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Schreckenberger *et al.*, 2007)

กรณีศึกษาในผู้ป่วยหญิงอายุ 47 ปี ที่ป่วยด้วยโรค necrotizing fasciitis จาก University of Chicago Medical Center ในประเทศสหรัฐอเมริกา ผู้ป่วยเพศหญิงดังกล่าวมีประวัติการติดเชื้อ HIV และเป็นโรคไตระยะสุดท้าย เข้ารับการผ่าตัดรังไข่และเลาะเนื้อเยื่อส่วนเกินบริเวณที่ผ่าตัด หลังจากนั้นเพียง 1 วันผู้ป่วยดังกล่าวกลับเข้ารับการรักษาอีกครั้งด้วยอาการแผลอักเสบจากการผ่าตัด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากแผลพบเชื้อ coagulase-negative staphylococci แพทย์จึงทำการรักษาโดยการให้ยา amoxicillin-clavulunate (β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination drug) ผลการทดสอบความไวของเชื้อ (susceptibility test) พบว่าเชื้อดื้อต่อ methicillin และผู้ป่วยแพ้ยา กลุ่ม β -lactam inhibitor หนึ่งสัปดาห์ต่อมาผู้ป่วยพัฒนาการติดเชื้อไปที่บริเวณอุ้งเชิงกราน มีการทดลองให้ piperacillin-tazobactam, vancomycin, และ clindamycin ซึ่งเป็นยาที่ครอบคลุมเชื้อทั้งกลุ่ม aerobic และ anaerobic pathogens และมีการทดลองให้ยา aminoglycoside และ amikacin ซึ่งเป็นยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจาก MDR Gram-negative bacteria แต่การรักษายังคงไม่เป็นผล

หลังจากการผ่าตัดครั้งที่สองเพื่อเอาฝีหนองออก กลับพบผิวหนังพุพองขึ้นบริเวณต้นขาขวา ผลการเพาะเชื้อจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากหนังแท้และชั้นเนื้อใต้เนื้อเยื่อไขมันที่เกิดการอักเสบระบุว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อนำตัวอย่างเลือดไปเพาะเลี้ยงพบเป็นเชื้อ Gram-negative bacilli สายพันธุ์ *A. baumannii* ที่ไวต่อ ampicillin-sulbactam เท่านั้น หลังจากพบการติดเชื้อ *A. baumannii* บริเวณบาดแผลของผู้ป่วยเกิดการสลายของเนื้อเยื่อและชิ้นเนื้อขึ้นบนผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน การติดเชื้อ *A. baumannii* ทำให้เกิดการอักเสบและมีการตายของเนื้อเยื่อลุกลามขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นลักษณะอาการปรากฏของโรค necrotizing fasciitis (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 *Acinetobacter baumannii* necrotizing infection of necrotic muscle tissue of patient the day after the initial debridement (Acknowledgement: Charnot-Katsikas A. Department of Pathology, The University of Chicago Medical Center. Charnot-Katsikas@uchospitals.edu)

A. baumannii เป็นเชื้อชนิดเดียวที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด หลังเกิดการตายของเนื้อเยื่อไม่นาน พบ *A. baumannii* ทั้งจากแผลผ่าตัดและน้ำจากช่องท้อง เมื่อนำเชื้อมาทดสอบพบว่า เชื้อดื้อต่อยาทุกชนิดรวมทั้ง ampicillin-sulbactam แต่อย่างไรก็ตามก็ยังคงมีการให้ยา colistin ตามหลักของการรักษา ไม่กี่สัปดาห์ต่อมาผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยอาการภาวะช็อคจากการติดเชื้อ (septic shock) หลังจากการปรากฏขึ้นครั้งแรกของอาการผิวหนังพุพอง (Charnot-Katsikas *et al.*, 2009)

1.3 การวินิจฉัยเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ในกรณีผู้ป่วยเป็นโรค necrotizing fasciitis ที่อาจเกิดจากการติดเชื้อจากเครื่องมือทางการแพทย์ จากการตรวจพบ Gram-negative coccobacilli หรือ pleomorphic Gram-negative bacilli มักรายงานผล เป็น *A. baumannii* ซึ่งแพทย์ไม่จำเป็นต้องรอผลการทดสอบความไว แต่ควรทำการกำจัดเศษซากของเชื้อโรคหรือเนื้อเยื่อที่ตายแล้วออกไปและทำการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะตามประสบการณ์ (Charnot-Katsikas *et al.*, 2009) จากการรายงานทางห้องปฏิบัติการ *A. baumannii* มักมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Acinetobacter* spp. อื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตาม การรายงานผลดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับลักษณะที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะของเชื้อในอาหารเหลวและอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะ (antibiotic-impregnated agar) ซึ่งลักษณะของเชื้อที่ปรากฏต้องเป็น Gram-negative rods อีกทางเลือกหนึ่งคือการเพาะเลี้ยงโดยตรงจากตัวอย่างเลือดในขวด (blood culture bottles) หรือเพาะเลี้ยงจากอาหาร non-selective media ซึ่งจะพบเชื้อลักษณะ coccobacilli (Schreckenberger *et al.*, 2007)

ทำการทดสอบสิ่งส่งตรวจจากเนื้อเยื่อ บาดแผล หรือปัสสาวะโดยการเพาะเชื้อในภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) บนอาหาร Schaedler Blood Agar (SBA), Colistin Nalidixic Acid Agar (CNA), MacConkey (MAC) agar หรือ eosin-methylene-blue (EMB) agar ที่เจริญได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียกรัมลบและกรัมบวก ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบน Chocolate agar (CA) จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ได้จากบริเวณที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (sterile sites) ซึ่งเป็นบริเวณที่อาจพบเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อย สำหรับตัวอย่างที่ได้จากบาดแผลและเนื้อเยื่อทั้งหมดนำมาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* spp. จะเป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนอาจจะใช้ brucella blood agar (BBA), และ selective agars เช่น brucella agar with gentamicin (BG), kanamycin-vancomycin-laked blood agar (KV-laked SBA) และใช้ Anaerobic PEA (Phenylethyl Alcohol Blood Agar) บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C ส่วนอาหารเหลวที่ใช้สำหรับแบคทีเรียกรัมลบ โดยปกติแล้วควรใช้ GN (Gram-negative) broth, Selectine หรือ Thioglycollate ในการแยกเชื้อ

การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* spp. อาจเตรียมเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลการทดลองทางชีวเคมีที่ได้ประกอบด้วย cytochrome-oxidase negative, catalase positive, glucose oxidation positive หรือ negative, motility negative ส่วนปฏิกิริยา oxidation ของ carbohydrates อื่น ๆ และการเจริญเติบโตในอาหารเหลวจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์

การวินิจฉัยอื่นทำได้โดยใช้ commercial kit หรือ automated system ไม่นานมานี้มีการใช้วิธีทางโมเลกุลในการจำแนก *Acinetobacter* spp. ได้เป็น 17 biotypes และการหาลำดับเบสของ 16S RNA ส่วนการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะทำได้ใช้โดยวิธี disc diffusion, agar dilution, หรือ broth dilution ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008)

1.4 การระบาด

A. baumannii สามารถแพร่จากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้โดยการสัมผัสของเหลวภายในร่างกาย เช่น เลือด ปัสสาวะ หรืออุปกรณ์ที่ใช้กับผู้ป่วยติดเชื้อ เช่น หูฟัง stethoscope เครื่องวัดความดัน และอุปกรณ์อื่น ๆ หากผู้ป่วยมีเชื้ออยู่ในปอด ผู้ป่วยสามารถแพร่เชื้อได้โดยการไอ จาม หรือการคายเสมหะ แต่สามารถขจัดเชื้อออกไปได้โดยการชำระล้างทำความสะอาด (CDC, 2005)

1.4.1 การระบาดในประเทศแถบยุโรปและอเมริกา

A. baumannii เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่ถูกลูกขนานนามว่า “ESCAPE” ที่ประกอบไปด้วย *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* และ *Enterobacter* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สมาคมโรคติดเชื้อแห่งสหรัฐอเมริกา (Diseases Society of America) ให้ความสนใจเนื่องจากความสำคัญในการก่อโรค และเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาล รวมทั้งความสามารถในการหลบหลีกยาปฏิชีวนะจึงได้ชื่อว่า “escaping” นอกจากนี้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังมีความสามารถในการดื้อยาได้หลายชนิด (Boucher *et al.*, 2009) ที่เป็นปัญหาในแถบประเทศยุโรปและอเมริกา โดยเฉพาะสายพันธุ์ *A. baumannii* ในปี 2008 Souli และคณะ (2008) รายงานว่าอัตราการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากกระแสเลือดของผู้ป่วยจากหน่วย ICU มีสูงถึง 85% ในประเทศกรีซและพบถึง 45% ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจากประเทศสเปนและตุรกี ปัญหาการระบาดในโรงพยาบาลเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดอัตราการตายสูง โดยเฉพาะการระบาดของสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มหลัก

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) รายงานว่าในโรงพยาบาลมากกว่า 300 แห่งในประเทศสหรัฐอเมริกามีอัตราการเพิ่มขึ้นของ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อ carbapenem (carbapenem-resistant *A. baumannii*) จาก 9% ในปี 1995 เป็น 40% ในปี 2004 (Carey *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของ carbapenem-resistant *A. baumannii* เกิดขึ้นทั่วโลก (Livermore *et al.* 2010; Morgan *et al.*, 2009) carbapenem เป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อกว้างมีประสิทธิภาพในการใช้รักษาโรคติดเชื้อที่รุนแรง (Pournaras *et al.*, 2006) การดื้อต่อยากลุ่มนี้ทำให้แพทย์มีข้อจำกัดในการใช้ยาในการรักษา และในหลายกรณีแพทย์ต้องกลับไปใช้ยาในกลุ่มอื่น เช่น

polymyxins ซึ่งเป็นยาที่เป็นพิษต่อระบบประสาท (nerotoxic) และเป็นพิษต่อไต (nephrotoxic) (Falagas and Kasiakou, 2005)

1.4.2 การระบาดในประเทศแถบเอเชีย

มีการรายงานการระบาดของ *A. baumannii* ในประเทศแถบเอเชียอย่างต่อเนื่อง หลายโรงพยาบาลมีการจัดการและป้องกันที่ดีในการยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรีย แต่ก็ยังคงมีการระบาดของสายพันธุ์ MDR non-fermenting bacteria โดยเฉพาะ MDR *A. baumannii* มีการศึกษาแนวโน้มการดื้อยาจากฐานข้อมูลของโรงพยาบาลในฮ่องกง ในระยะเวลา 12 ปี ระหว่างปี 1997-2008 โดยแยกลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งคือเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem สองคือเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มหลักตั้งแต่สามกลุ่ม ได้แก่ aminoglycosides, antipseudomonal penicillins, carbapenems, cephalosporins และ fluoroquinolones กลุ่มที่สามคือเชื้อที่ดื้อต่อยาทั้งหมดยกเว้น amikacin พบว่า *A. baumannii* ในกลุ่มที่หนึ่งมีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นจาก 2.6% เป็น 29.4% และกลุ่มที่สองมีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นจาก 24.9% เป็น 37.5% ในขณะที่กลุ่มที่สามมีอัตราการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Ho *et al.* 2010) มีการศึกษาการระบาดของเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มที่สองเป็นส่วนใหญ่ และไม่ได้ให้ความสำคัญกับการระบาดของสายพันธุ์ MDR *A. baumannii* กลุ่มอื่น เมื่อไม่นานมานี้เกิดสายพันธุ์ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อ carbapenems และยากลุ่ม β -lactams ชนิดต่าง ๆ เนื่องมาจากเกิดการระบาดของสายพันธุ์ที่ผลิต OXA-type enzyme แต่เอนไซม์ชนิดนี้ไม่ได้เป็นสาเหตุของการเกิด cross-resistance ในยากลุ่ม aminoglycoside และ fluoroquinolones แต่อย่างไรก็ตาม carbapenems ก็ยังคงเป็นยาตัวเลือกที่สามารถใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก *A. baumannii* ที่ยังไวต่อยาชนิดนี้ (Maragakis and Perl, 2008)

ในปี 2010 พบการระบาดครั้งใหญ่ในโรงพยาบาล Teikyo University Hospital ในกรุงโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น มีผู้ติดเชื้อ MDR *A. baumannii* จำนวน 53 รายและในจำนวนนี้ 9 ราย เสียชีวิต สื่อมวลชนในประเทศกล่าวโทษเจ้าหน้าที่ในโรงพยาบาล โดยกล่าวว่าพวกเขาควรมีการป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาลและควรรายงานการติดเชื้อไปยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง (CID, 2011) ในระยะเวลา 2 ปี พบ MDR *A. baumannii* จำนวน 98 isolates และในกรุงโตเกียวมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากอาการติดเชื้อในกระแสเลือด (hematological diseases) (Anon, 2010)

1.4.3 การระบาดในประเทศไทย

การระบาดของ *A. baumannii* เกิดขึ้นทั่วไปในโรงพยาบาลในประเทศไทย และเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่มักก่อโรคในโรงพยาบาลเป็นลำดับต้น ๆ มีอัตราการดื้อยาสูง และดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิด โดยถูกระบุเป็นสายพันธุ์ MDR *A. baumannii* ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ชนิดที่ประกอบด้วย third-generation cephalosporins,

aminoglycosides และ fluoroquinolones และถูกระบุเป็นสายพันธุ์ pandrug-resistant *A. baumannii* (PDR *A. baumannii*) ในกรณีที่เกี่ยวข้องคือต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดยกเว้น colistin สายพันธุ์ทั้งสองเป็นสายพันธุ์ที่ส่งผลให้เกิดอัตราการตายสูงโดยเฉพาะในสายพันธุ์ PDR *A. baumannii* พบว่าทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีอัตราการตายสูงถึง 80% เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่เป็น drug-sensitive *A. baumannii* ที่มีอัตราการตายเพียง 14% (Apisarnthanarak and Mundy, 2009)

ในระหว่างปี 1998-2002 เกิดอุบัติการณ์ระบาดของ PDR *A. baumannii* ขึ้นในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และพบว่า 95% ของ *Acinetobacter* spp. ที่พบทั่วไปในโรงพยาบาลเป็นสายพันธุ์ *A. baumannii* และจากการตรวจสอบสิ่งส่งตรวจในผู้ป่วยติดเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 322 ตัวอย่างในระหว่าง เดือนมีนาคม-มิถุนายน ปี 2003 พบว่าตัวอย่างที่เก็บ 51% ได้จากหอผู้ป่วยเวชกรรม และ 40% ได้จากหอผู้ป่วยศัลยกรรม ซึ่งตัวอย่างจำนวน 45% จากทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ PDR *A. baumannii* ในโรงพยาบาลเดียวกัน (Chaiwarith *et al.*, 2005)

Surasarang และคณะ (2007) ทำการศึกษาปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อคือยา *A. baumannii* ในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างวันที่ 1 มกราคม-31 ธันวาคม 2005 จากผู้ป่วย 155 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อในโรงพยาบาลจำนวน 310 คน พบว่าระยะเวลาการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล การใส่อุปกรณ์ทางการแพทย์เข้าสู่ร่างกายมากกว่า 1 สัปดาห์ เช่น การใส่สายสวนปัสสาวะ การใช้เครื่องช่วยหายใจ การใส่สายสวนเข้าหลอดเลือด การใส่สายยางให้อาหารทางจมูก สูทกระเพาะอาหาร และการให้ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น third-generation cephalosporins, fourth-generation cephalosporins, metronidazole และ piperacillin/tazobactam เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาล โดยพบว่าตำแหน่งของการติดเชื้อที่พบมากที่สุดคือการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนล่าง คิดเป็น 74.8% ของผู้ป่วยตัวอย่างที่ติดเชื้อทั้งหมด

ปี 2008 Rodsathien (Rodsathien, 2008) ทำการศึกษาอุบัติการณ์และความชุกของเชื้อ *A. baumannii* ที่พบในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลลพบุรีในช่วงเดือนมกราคม-กันยายน พบว่า 5 อันดับแรกในจำนวนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ *A. baumannii* (40.82%), *E. coli* (10.04%), *K. pneumoniae* (6.61%), *P. aeruginosa* (3.57%) และ *A. lwoffii* (3.57%) และพบว่า *A. baumannii* ส่วนใหญ่ที่พบเป็นสายพันธุ์ MDR *A. baumannii* ซึ่งแยกได้จำนวน 309 สายพันธุ์ โดยพบเชื้อในหอผู้ป่วยอายุรกรรมมากที่สุด (59.8%) รองลงมาคือหอผู้ป่วยศัลยกรรม (39.1%) แต่ไม่พบจากหอผู้ป่วยสูติกรรมและผู้ป่วยนอก ชนิดของสิ่งส่งตรวจที่ตรวจพบมากที่สุด ได้แก่ เสมหะ (68.6%) รองลงมาได้แก่ swab จากแผลและหนอง (23.6%), ปัสสาวะ (6.4%), และเลือด (1.2%) ตามลำดับ ส่วนรูปแบบการคือยา พบว่าเชื้อ *A. baumannii* คือยาเกือบทุกชนิด ยกเว้น

colistin จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า MDR *A. baumannii* เป็นสาเหตุหนึ่งของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและเป็นอันดับหนึ่งของเชื้อที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

จากการสำรวจของภาคพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ระหว่างเดือน มกราคม-มิถุนายน 2009 พบว่า *A. baumannii* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบมากที่สุด รองจาก *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *K. pneumoniae* จากสิ่งส่งตรวจ และพบมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เช่น *S. aureus*

1.5 การก่อโรค

กลไกการก่อโรคของ *A. baumannii* นั้นยังไม่มี ความชัดเจน เนื่องจากยังไม่พบการผลิต สารพิษ (toxins) หรือสารที่ทำให้เซลล์เสียหาย (cytolysins) และมีปัจจัยบ่งชี้สิ่ง ที่ส่งผลให้เกิดโรคน้อย (Gordon and Wareham, 2010) แต่อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ก็ยังคงพบปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งเสริมให้เชื้อก่อโรคและสร้างความเสียหายแก่เซลล์และอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย ดังนี้

1.5.1 Adhesions

A. baumannii มีความสามารถในการเกาะติดได้อย่างรวดเร็วทั้งบริเวณที่เป็น biological surfaces และ abiotic surfaces จากการสร้าง biofilm (Lee *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ทำให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนบนอุปกรณ์ทางการแพทย์ การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และการหลบหนีกระบวนภูมิคุ้มกันของร่างกาย การสร้าง biofilm นั้นมีความเกี่ยวข้องกับหลายกลไกที่ถูกควบคุมด้วยระบบ quorum sensing และจำนวนของ two-component regulatory systems (Gaddy and Actis, 2009) กระบวนการเกาะติดนั้นเริ่มจากการทำงานของ pili และ fimbriae ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในขั้นแรกของการเกาะติด จากนั้นจะมีการผลิต exopolysaccharide ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของ biofilm ที่สมบูรณ์ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของ neutrophils และส่งเสริมการดื้อยา (Gordon and Wareham, 2010) จากการศึกษาพบว่า *A. baumannii* มีความสามารถในการเกาะติด bronchial epithelial cells ได้อย่างรวดเร็วส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในปอด (de Breij *et al.*, 2009)

1.5.2 Outer membrane proteins (OMPs)

เมื่อ *A. baumannii* เกิดการเกาะติด eukaryotic cells ขึ้นเชื้อจะสามารถบุกรุกและส่งเสริมให้เกิด apoptosis ที่เป็นผลมาจากการทำงานของ outer membrane protein A (OmpA) ในการกระตุ้น Th1-mediated immune response และชักนำ nitric oxide synthase (iNOS) ผ่านทาง Toll-like receptor (TLR)-2-mediated pathway ทำให้เกิดการหลั่ง cytokine ชนิดต่าง ๆ ที่ไปกระตุ้นทำให้เซลล์เกิดการอักเสบ (Siroy *et al.*, 2006)

1.5.3 Iron acquisition

ธาตุเหล็กนั้นมีบทบาทสำคัญและมีความจำเป็นในระบบชีวภาพ เช่น ขนส่งอิเล็กตรอน เป็นองค์ประกอบของเลือด เป็นต้น *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ใน host และในสิ่งแวดล้อม โดยหลั่งสารหลากหลายชนิดในการละลายธาตุเหล็ก และนำมาใช้ในการเจริญเติบโต ประกอบด้วย siderophore acinetobactin และยังสามารถผลิตได้จาก hemin utilization system (Zimblar *et al.*, 2009) การหลั่งสารดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลง iron-binding proteins ที่มักพบใน serum ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดจาก *A. baumannii* (Smith and Alpar, 1991) เนื่องจากสารประกอบ iron-binding proteins เช่น lactoferrin มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Sanchez *et al.*, 1992) แต่จากการทดลองใน *in vivo* การแสดงออกนี้ยังไม่ชัดเจนเนื่องจากพบ siderophore น้อยในกระบวนการที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ (Gordon and Wareham, 2010)

1.5.4 Lipopolysaccharide (LPS)

โมเลกุล LPS ของ *A. baumannii* มีความสามารถในการชักนำให้เกิด pro-inflammatory cytokine ใน monocytes ของมนุษย์ผ่านการกระตุ้นของ TLR-2 และ TLR-4 (Erridge *et al.*, 2007)

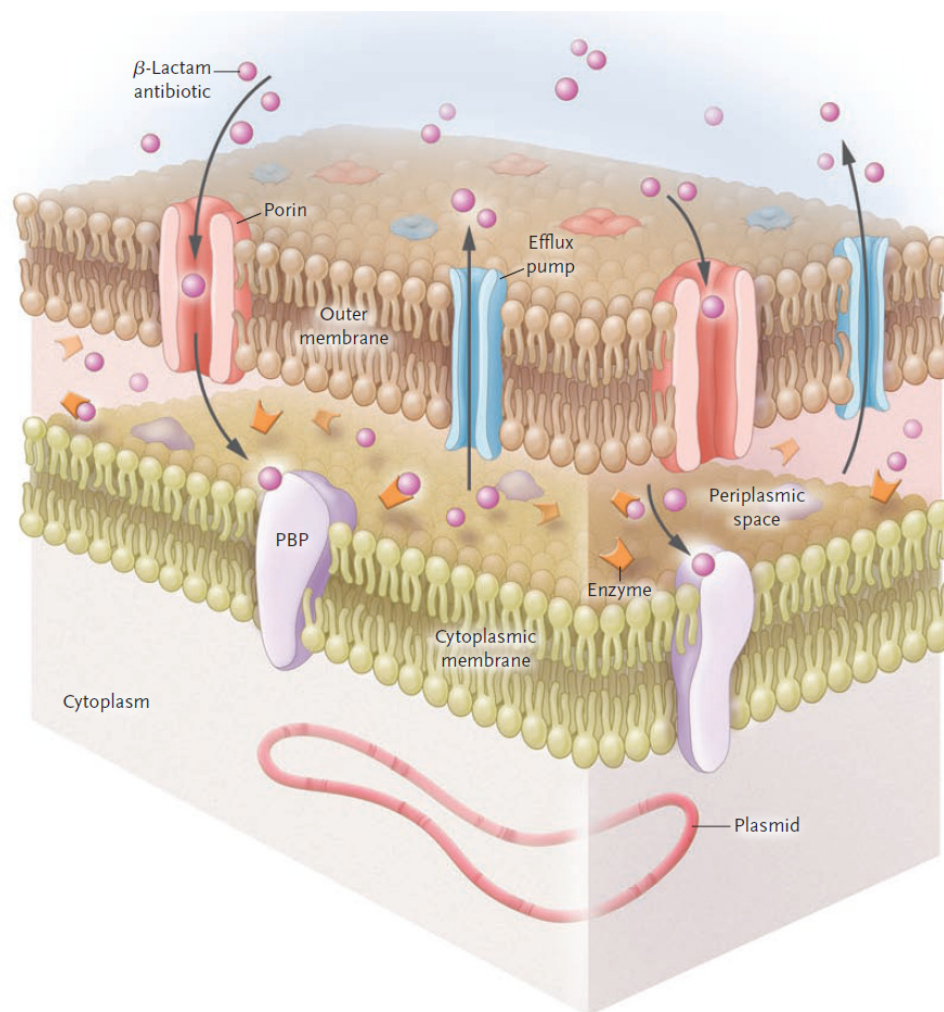
1.6 กลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สำคัญ

กลไกการดื้อยาของ *A. baumannii* ประกอบด้วยกลไกหลักใหญ่ ๆ 3 ชนิด ได้แก่ การใช้เอนไซม์ยับยั้งการทำงานของยา การลดเป้าหมายยา และการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา (รูปที่ 3) (Rice, 2006) กลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สำคัญมีดังนี้

1.6.1 Efflux pump

Efflux pump มีหน้าที่ในการขับสารที่เป็นอันตรายและสารที่เป็นสิ่งแปลกปลอมออกจากเซลล์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Pages *et al.*, 2005) ในแบคทีเรีย efflux pump มีหน้าที่ในการขับยาปฏิชีวนะออกผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์และลดการสะสมสารพิษชนิดต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น antimicrobial peptide โลหะ และน้ำยาฆ่าเชื้อ โดยการขับออกนี้อาศัยการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เป็นพลังงานหรืออาศัยการแลกเปลี่ยนประจุ (ion antiport mechanism) ในการขับเคลื่อนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 3) กลไกการดื้อยานี้สามารถยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะโดยไม่จำเพาะกับยาชนิดใดชนิดหนึ่งและยังเป็นกลไกที่พบบ่อยซึ่งทำงานร่วมกับการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยาโดยการกลายพันธุ์ การลด membrane permeability และการเปลี่ยนแปลงยา (Eswaran *et al.*, 2004; Li and Nikaido, 2004; Poole, 2004) การทำงานของ efflux system สามารถเพิ่มค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อได้ 4-64 เท่า (Poole, 2002; Li and Nikaido, 2004; Poole, 2004) ทำให้เชื้อที่มีการแสดงออกของ efflux system ดื้อยามากกว่าปกติ efflux pump ถูกจัดจำแนกออกได้เป็น 6 families ประกอบด้วย ATP binding cassette (ABC) family, major

facilitator superfamily (MFS), resistance-nodulation-division (RND) family, small multidrug resistance (SMR) family, Multidrug and toxic compound extrusion (MATE), และ drug/metabolite transporter (DMT) superfamily



รูปที่ 3 Potential Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* (Munoz-Price and Weinstein, 2008)

การแสดงออกของ efflux pump แต่ละชนิดจะแตกต่างกันในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยจะพบการแสดงออกของ efflux pump ชนิด MFS และ RND เป็นส่วนใหญ่ MFS pumps จะพบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีลักษณะเป็น relative narrow spectrum ปกติจะจดจำชนิดของยาปฏิชีวนะได้น้อย สำหรับ RND pumps พบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นเป็น extremely wide spectrum ของ substrate หลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะ antimicrobial agent, dyes และ disinfectant (Levy, 2002; Li and Nikaido, 2004; Lomovskaya and Totrov, 2005; Piddock, 2006)

MFS และ RND family มักเป็น efflux pump ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาใน *A. baumannii* (Vila *et al.*, 2007) จากการเปรียบเทียบทางพันธุกรรมพบ gene ดื้อยาใน MDR *A. baumannii* สายพันธุ์ AYE ที่ระบาดในฝรั่งเศสซึ่งพบว่า gene ดื้อยาส่วนใหญ่ได้รับมาจากแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Pseudomonas*, *Salmonella* และ *E. coli* นอกจากนั้น gene นี้ยังเป็นกลุ่ม gene ที่อยู่ในบริเวณ 86 kb หรือบริเวณ island ซึ่งบริเวณ resistant island (AbaR1) ที่มีการทำนายว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ โลหะและน้ำยาฆ่าเชื้อ ภายใน island ส่วน 46 open reading frames (ORFs) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา และบริเวณ 32 ORFs มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ RND family, MFS 7 ชนิด, MATE family 2 ชนิดและ SMR family 1 ชนิด (Fournier *et al.*, 2006) สำหรับ efflux pump ที่พบใน *A. baumannii* แสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1

Efflux pumps described in *Acinetobacter baumannii* and their activity in front of several antimicrobial agents (Vila *et al.*, 2007)

Efflux pump	Family	Antibiotics	NCBI accession number(s)
Tet(A)	MFS	tetracycline	AAO38186
Tet(B)	MFS	tetracycline, minocycline	
CmlA	MFS	chloramphenicol	CAJ77032
AdeABC	RND	aminoglycosides, β -lactams, chloramphenicol, erythromycin, tetracyclines and ethidium bromide; reduced susceptibility to fluoroquinolones	AAL14439, AAL14440, AAL14441
AbeM	MATE	norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI), triclosan, acriflavine, Hoechst 33342, daunorubicin, doxorubicin, rhodamine 6G and ethidium bromide	BAD89844

MFS, major facilitator superfamily; RND, resistance-nodulation-division; MATE, multidrug and toxic compound extrusion.

1.6.1.1 Major facilitator superfamily (MFS)

โดยปกติแล้ว MFS efflux pumps มีความจำเพาะในการส่งออกยาเพียงบางชนิด Tet efflux pump เป็นกลไกในดื้อต่อ tetracycline ในแบคทีเรียกลุ่ม *tet* efflux gene สามารถแสดงออกใน transposons แทรกอยู่ใน plasmid ซึ่งมาจากแบคทีเรียหลายกลุ่มที่ไม่สามารถเข้ากันได้ ส่วนใหญ่เกิดจากการผสมกัน (conjugative) (Vila *et al.*, 2007) efflux pump ชนิดนี้อยู่ใน MFS family ทำงานโดยการแลกเปลี่ยน proton ของ tetracycline-cation complex (Chopra and Roberts, 2001) ใน *A. baumannii* Tet (A) และ Tet (B) เป็น efflux pump หลักชนิดหนึ่ง จากการศึกษ Tet (A) พบว่า

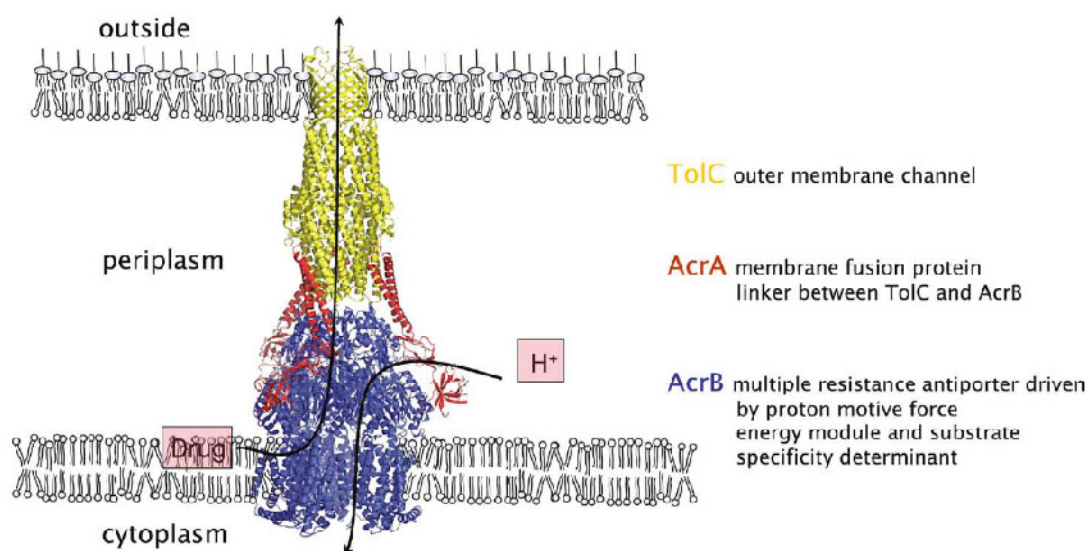
ทำให้ดื้อต่อยา tetracycline และ Tet (B) ทำให้ดื้อต่อ tetracycline และ minocycline แต่ efflux pump เหล่านี้ไม่มีผลกับยา tetracycline ชนิดใหม่ เช่น glycylcyclines Marti และคณะ (2006a) ทำการวิเคราะห์ gene ใน tetracycline-resistant *A. baumannii* ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับภาระขนาดจำนวน 79 สายพันธุ์ พบว่า 66% มี *tet* (B) gene และ 13.6% มี *tet* (A) gene ไม่มีสายพันธุ์ใดที่มีการปรากฏทั้งสอง gene (Guardabassi *et al.*, 2000)

CmlA และ MdfA efflux pump เป็นอีกกลุ่มที่อยู่ใน MFS family ที่พบใน chloramphenicol resistance gene ของ *A. baumannii* สำหรับ CmlA efflux pump ทำให้เชื้อดื้อต่อ chloramphenicol และ MdfA พบว่าทำหน้าที่ขนส่งสารในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae หลายสายพันธุ์ มีการศึกษาลำดับเบสของ MdfA พบ MdfA orthologue ใน *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วย มีการปรากฏของ MdfA efflux pump ทำให้เชื้อดื้อยาหลากหลายชนิดและในจำนวนนั้นคือ ciprofloxacin และ chloramphenicol (Vila *et al.*, 2007)

1.6.1.2 Resistance-nodulation-division (RND) family

RND efflux pump พบได้ในแบคทีเรีย Archaea และ Eukaryotes บางชนิด ในแบคทีเรียแกรมลบ RND แทรกอยู่ในส่วนของ inner membrane และมีการทำงานร่วมกันของโปรตีนสองชนิดคือ outer membrane channel protein และ periplasmic adaptor protein ที่อยู่ในส่วนของ outer membrane และ periplasm (รูปที่ 4) (Blair and Piddock, 2009) RND system ในแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้เชื้อดื้อยาแบบ innate resistant ถ้าไม่มีการแสดงออกของ efflux pump ชนิดนี้แบคทีเรียจะไวต่อยามากขึ้น เช่น การแสดงออกของ AcrB (รูปที่ 4) ใน *E. coli* ที่ทำให้กลายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการกลายเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Baucheron *et al.*, 2004; Eaves *et al.*, 2004; Nishino *et al.*, 2006) นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถสร้าง efflux system ได้มากกว่าหนึ่งระบบ เช่น *P. aeruginosa* จำนวน 450 สายพันธุ์มี 28% ที่มีการแสดงออก MexAB-OprM และ MexXY สูงเนื่องจากผลจากการทำงานของ efflux pump ทำให้เกิดอุบัติการณ์ดื้อยาชนิดใหม่ เช่น tigecycline ใน *E. coli* และ *Enterobacter cloacae* ที่มีการแสดงออกของ AcrAB สูง (Keeney *et al.*, 2008) RND เป็น efflux pump ที่อาศัย proton motive force ในการขับสารออก (Poole, 2002) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น aminoglycosides, β -lactam, chloramphenicol, erythromycin, tetracyclines และรวมถึงสารสี เช่น EtBr ด้วย ใน *A. baumannii* AdeABC เป็น efflux pump ที่ประกอบไปด้วยโปรตีนสามส่วน ประกอบด้วย AdeA ทำหน้าที่เป็น membrane fusion protein (MFP), AdeB ทำหน้าที่เป็น multidrug transporter และ AdeC ทำหน้าที่เป็น OMPs (Magnet *et al.*, 2001) สำหรับ AdeB จะเกี่ยวข้องกับการลดการสะสมของ fluoroquinolones (Higgins *et al.*, 2004b) ส่วนใหญ่การดื้อยาใน family นี้มักเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของ MFP และ OMPs จาก

ความสัมพันธ์นี้ทำให้แบคทีเรียสามารถนำยาต้านจุลินทรีย์ผ่านออกจาก inner และ outer membrane ได้โดยไม่ให้สะสมภายใน periplasm (Vila *et al.*, 2007)



รูปที่ 4 Schematic diagram of a tripartite RND system, AcrAB-TolC of *E. coli*. In Gram-negative bacteria RND pumps (e.g. AcrB) are situated in the inner membrane and function in a complex with two other proteins, an outer membrane channel (e.g. TolC) and a periplasmic adaptor protein (e.g. AcrA) (Pos, 2009)

Efflux pump ชนิดนี้ถูกควบคุมโดย two-component regulatory system (AdeRS) โดย AdeS เป็น sensor kinase และ AdeR เป็น response regulator (Marchand *et al.*, 2004) สำหรับ gene ที่ code โปรตีนสองชนิดนี้ตั้งอยู่ด้านหน้า *adeABC* gene และถูกถ่ายทอดไปยังทิศทางตรงกันข้าม (Vila *et al.*, 2007)

มีการศึกษา efflux pump inhibitor (EPI) ในการยับยั้งการทำงานของ RND system พบว่า phenyl-arginine- β -naphthylamide (PA β N) เป็นสารชนิดแรกที่มีคุณสมบัติเป็น EPI มีกลไกในการออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum EPI) สามารถยับยั้ง MexB ใน *P. aeruginosa* (Lomovskaya *et al.*, 2001) ใน *A. baumannii* PA β N ที่ความเข้มข้น 25 μ g/ml สามารถลดค่า MIC ของ rifampicin และ clarithromycin ได้ 4 เท่า (Pannek *et al.*, 2006)

1.6.1.3 Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)

Efflux pump AbeM เป็น efflux pump ที่จัดอยู่ใน MATE family มีลักษณะคล้ายกับ NorM ที่พบในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Erwinia amylovora* และ PmpM ใน *P. aeruginosa*, Vcm ใน *Vibrio parahaemolyticus*, YdhE ใน *E. coli*, และ HmrH ใน *Haemophilus influenzae* การแสดงออกของ efflux pump ชนิดนี้ทำให้เพิ่มค่า MIC ขึ้น 4 เท่าใน norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI), triclosan, acriflavine, Hoechst 33342, daunorubicin, doxorubicin, rhodamine 6G, และ EtBr นอกจากนี้ยังเพิ่มค่า MIC ขึ้น 2 เท่าใน kanamycin, erythromycin, chloramphenicol, tetraphenylphosphonium chloride (TPPCI) และ trimethoprim (Su *et al.*, 2005) efflux pump ใน family นี้ได้รับแหล่งพลังงานสองแหล่งคือ proton motive force และ sodium ion gradient (Piddock, 2006)

AbeM ใช้ประโยชน์จาก proton motive force ในการขับยาต้านจุลินทรีย์ออกจากเซลล์ (Su *et al.*, 2005) การศึกษาการแสดงออกใน *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยอาศัย efflux pump inhibitors เช่น reserpine และ MC 207,110 (Ribera *et al.*, 2002; Vila *et al.*, 2002) ด้วยยั้งเหล่านี้ไม่ได้มีความจำเพาะและอาจไม่เหมาะสมกับ efflux pump ทั้งหมด แต่ก็ยังคงมีการศึกษาดังกล่าวกับ efflux pump ใน *A. baumannii* และพบว่า MIC ของ nalidixic acid ลดลง 8 เท่าเมื่อใช้ร่วมกับ MC 207,110 นอกจากนั้น MIC ของยาเมื่อใช้ร่วมกับ reserpine พบว่าค่า MIC ของ ciprofloxacin ลดลง 4 เท่าใน *A. baumannii* จำนวน 33% ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Vila *et al.*, 2002)

1.6.2 Outer membrane proteins (OMPs)

porins เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นช่อง (รูปที่ 3) สำหรับขนส่งโมเลกุลผ่าน lipid bilayer membranes เป็น permeability สำหรับโมเลกุลที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic solutes) เป็นบริเวณที่สามารถเกาะติดกับเซลล์ชนิดอื่นและจับกับ bactericidal compounds ในบริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ กลไกการคือยาหลาย ๆ กลไกรวมทั้งการควบคุมการแสดงออกของ porin เป็นการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นสิ่งที่แบคทีเรียหลายชนิดพัฒนาขึ้นเพื่อหลบหลีกการยับยั้งเชื้อ porin จึงมีหน้าที่สำคัญต่อความสามารถในการต่อต้านยาปฏิชีวนะ (Vila *et al.*, 2007) แต่ข้อมูล OMPs ของ *A. baumannii* เกี่ยวกับคุณสมบัติในการซึมผ่านและกลไกการทำงานยังมีการรายงานน้อยทำให้ข้อมูลยังไม่ชัดเจน (Marti *et al.*, 2006b) แต่มีการศึกษาจำนวนและขนาดของ porins ที่พบใน *A. baumannii* พบว่ามีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ (Obara and Nakae, 1991) และมีรายงานว่า outer membrane ของ *A. baumannii* มีความสามารถในการซึมผ่านของยาปฏิชีวนะน้อยกว่า *E. coli* การศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของ cephalosporins ที่ความเข้มข้นระหว่าง 2-7 เท่า พบว่า *P. aeruginosa* มีการซึมผ่านของยามากกว่า *Acinetobacter* spp. (Sato and

Nakae, 1991) แต่อย่างไรก็ตามยังมีกลไกอื่น ๆ ที่ส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา ซึ่งรวมถึงการทำงานของ efflux system ชนิดต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลซึ่งกันและกันระหว่างการซึมผ่านต่ำและขับออกโดย efflux pump (Vila *et al.*, 2007)

การแสดงออกของ OMPs ใน *A. baumannii* นั้นมี heat-modifiable protein-A. *baumannii* (HMP-AB) เป็น OMPs หลัก จากการเปรียบเทียบลำดับ amino acids พบว่า HMP-AB (Gribun *et al.*, 2003) มีลักษณะคล้ายกับ OMP A (OmpA) ของ Enterobacteriaceae และ OMP F (OmpF) ของ *P. aeruginosa* การวิเคราะห์ secondary structure analysis พบว่าโปรตีนส่วน HMP-AB มีขนาด 172-amino acid ในส่วน N-terminal domain อยู่บริเวณ outer membrane โดยอาศัย amphiphilic β strands 8 อันและส่วน C-terminal จะอยู่ในส่วนของชั้น peptidoglycan layer การวิเคราะห์ลำดับของ amino acid จะใช้ในการพิจารณาโครงสร้างของ porins ในแบคทีเรียแกรมลบทำให้ทราบลักษณะทางชีวภาพต่าง ๆ ของโปรตีน เช่น highly negative hydrophathy index, ความเป็น hydrophobic, slightly negative total charge, low instability index, high glycine content และการเกิด cysteine residues โปรตีน HMP-AB จัดเป็น porin ที่อยู่ใน OmpA family (Vila *et al.*, 2007) ซึ่ง porin ใน family นี้เป็น slow porins ที่ยอมให้ β -lactam ซึมผ่าน (Nitzan *et al.*, 1999; Gribun *et al.*, 2003)

OMP's อีกสามชนิดที่มีรายงานการพบใน imipenem-resistant *A. baumannii* คือ โปรตีนขนาด 33-36 kDa และ 29 kDa ซึ่งถูกระบุเป็น CarO (Mussi *et al.*, 2005; Siroy *et al.*, 2005) สำหรับ OMPs ตัวที่สามคือ โปรตีนขนาด 43 kDa ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ OprD ของ *P. aeruginosa* (Dupont *et al.*, 2005) การศึกษา CarO โดย mass spectrometry ตรวจพบโปรตีนอีกส่วนหนึ่งมีขนาด 25 kDa จึงเรียกว่า Omp25 ทั้ง 25 และ 29 kDa ถูกใช้เป็น typical β -barrel conformation แต่อย่างไรก็ตามมีโปรตีน CarO เพียงหนึ่งชนิดที่ทำหน้าที่เป็นช่องสำหรับขนส่งสารที่ไม่จับกับ imipenem แสดงให้เห็นว่ามีการทำงานของ unspecific monomeric channel แทนที่จะเป็นทำงานแบบจำเพาะ (Siroy *et al.*, 2005) และสิ่งสำคัญคือ OprD ของ *P. aeruginosa* มีความสามารถในการนำสารเข้าสู่เซลล์พวก basic amino acids, small peptide รวมถึง imipenem และ meropenem ด้วย (Nikaido, 2003) ดังนั้น CarO อาจทำหน้าที่เป็น carbapenem-unspecific channel และ OprD-like protein อาจทำหน้าที่เป็น carbapenem-specific channel (Vila *et al.*, 2007)

OMP's อื่น ๆ ที่พบใน *A. baumannii* คือ OmpW มีลักษณะคล้ายกับ OmpW ที่พบใน *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่การทำงานของ OMPs ชนิดนี้ยังไม่มียานการศึกษาที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าจะมีการแสดงออกของ OmpW ลดลงใน colistin-resistant *A. baumannii* สายพันธุ์กลายพันธุ์จากการทดลองใน *in vitro* (Hong *et al.*, 2006)

1.7 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา

1.7.1 Carbapenems

Carbapenems เป็นยาในกลุ่ม β -lactam ออกฤทธิ์กว้างยับยั้งเชื้อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบและมีบทบาทสำคัญในการใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่มีการดื้อยาหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบคือยา (MDR Gram negative bacilli: GNB) มีกลไกออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้าง cell wall ของแบคทีเรียโดยจับกับ Penicillin-binding proteins (PBPs) ทำให้เกิดการยับยั้ง cross linking step (transpeptidation reaction) ส่งผลให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกจาก osmotic pressure (Nicolau, 2008; Shah, 2008)

อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ยามากขึ้น ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการ การทดลองในสัตว์ และจากการสำรวจ พบว่า carbapenems ยังคงเป็นยาตัวเลือกที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก *A. baumannii* ที่ยังไวต่อยา มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ meropenem และ imipenem จาก Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) surveillance program พบว่านิยมใช้ imipenem มากกว่าการใช้ meropenem เนื่องจากมีฤทธิ์ดีกว่าสำหรับใช้ในการยับยั้งเชื้อ MDR *Acinetobacter* (Jones *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2006b) จากรายงานผลการทดลองในประเทศกรีซ พบว่า efflux pump อาจมีผลต่อฤทธิ์ของ meropenem ในขณะที่ β -lactamases hydrolyze มีผลต่อ imipenem มากกว่า (Ikonomidis *et al.*, 2006) ดังนั้นการทำให้ susceptibility test ของ imipenem จึงไม่ได้เกี่ยวข้องกับการทำนายความไวของ meropenem (Jones *et al.*, 2006b) แต่ปัจจุบันมีรายงานการเพิ่มขึ้นของ carbapenem-resistant *Acinetobacter* เกิดขึ้นทั่วโลก (Maragakis and Perl, 2008)

1.7.2 β -lactamase inhibitors

β -lactamase inhibitors โดยเฉพาะ sulbactam มีฤทธิ์ในการต่อต้าน *Acinetobacter* หลายสายพันธุ์จากการใช้ β -lactam เช่น ampicillin ในการยับยั้งเชื้อร่วมกับ β -lactamase inhibitors พบว่า β -lactam ไม่ได้มีผลในการเสริมฤทธิ์ของยา (Higgins *et al.*, 2004a; Brauers *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับ sulbactam ในการยับยั้งการติดเชื้อ *Acinetobacter* (Maragakis and Perl, 2008) มีรายงานความสำเร็จเกี่ยวกับการใช้ sulbactam ในการรักษาผู้ป่วย 14 รายที่ติดเชื้อ MDR *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia พบว่าผลการรักษาไม่มีความแตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยที่ได้รับ sulbactam และผู้ป่วย 63 รายที่ได้รับ imipenem แต่อีกการรายงานพบว่า 67% ของผู้ป่วยติดเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter* ที่ได้รับการรักษาด้วย ampicillin-sulbactam ให้ผลการรักษาที่ดี ความรุนแรงของโรคลดลง (Wood *et al.*, 2002)

1.7.3 Tigecycline

Tigecycline เป็นยาในกลุ่ม glycoacyclines ออกฤทธิ์กว้างยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียโดยจับกับ 30S subunit ribosome และ mRNA ป้องกันไม่ให้ aminoacyl-tRNA จับกับ mRNA ribosome complex (พวงค์ เทพอักษร, 2547) tigecycline มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic activity) ของเชื้อ MDR *Acinetobacter* มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ดื้อต่อยาชนิดนี้สูง เชื้อสามารถหลบหลีกโดยอาศัย efflux pump ที่เกิดจากการแสดงออกของโครโมโซมที่ไม่สามารถควบคุมได้ (Pachon-Ibanez *et al.*, 2004; Seifert *et al.*, 2006)

1.7.4 Aminoglycosides

Aminoglycosides เป็นยาที่ออกฤทธิ์ค่อนข้างกว้าง มีฤทธิ์ขัดขวางการจับกันของ ribosomes 50S และ 30S subunits เพื่อเป็น 70s initiation complex ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ เป็นยาที่ออกฤทธิ์ได้เร็ว (พวงค์ เทพอักษร, 2547) Aminoglycosides เช่น tobramycin และ amikacin เป็นยาตัวเลือกที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก MDR *Acinetobacter* ที่ยังคงไวต่อยา โดยปกติแล้วจะใช้ยาเหล่านี้ร่วมกับยาต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพชนิดอื่น ๆ MDR *Acinetobacter* หลายสายพันธุ์ยังคงไวต่อ amikacin หรือ tobramycin การดื้อยาในกลุ่มนี้เกี่ยวกับการผลิต aminoglycoside-modifying enzyme และ efflux pump mechanisms (Maragakis and Perl, 2008)

1.7.5 Polymyxin

ข้อจำกัดในการรักษา *A. baumannii* ทำให้แพทย์ต้องกลับมาใช้ polymyxin B หรือ polymyxin E (colistin) ยากลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก (cationic) จึงมีกลไกออกฤทธิ์โดยจะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียส่วนที่เป็น phosphatidylethanolamine แล้วทำลายคุณสมบัติ osmotic และ transport mechanism ของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ยากลุ่มนี้เป็นยาที่มีพิษต่อร่างกายสูง โดยเฉพาะพิษต่อไตเพราะทั้งในมนุษย์และแบคทีเรียต่างมีเยื่อหุ้มเซลล์ (พวงค์ เทพอักษร, 2547)

Colistin มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (bactericidal) *Acinetobacter* spp. โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้น (Li *et al.*, 2006) การดื้อต่อ polymyxins มีรายงานถึงความเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลง outer membrane และ efflux pump mechanisms (Urban *et al.*, 2001; Falagas and Kasiakou, 2005; Gales *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006) จากการสำรวจพบว่าระดับและการพัฒนาการดื้อยา colistin เพิ่มขึ้นถึง 57-77% จากผู้ป่วยติดเชื้อ MDR *Acinetobacter* ได้แก่ผู้ป่วยที่เป็นปอดอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด ภาวะอวัยวะร่วมกับการติดเชื้อ ติดเชื้อในช่องท้อง และติดเชื้อในระบบประสาท ถึงแม้ว่า colistin จะมีข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของยาที่มีผลต่อปอด และผู้ติดเชื้อในระบบประสาท (CNS infection) (Levin *et al.*, 1999; Garnacho-Montero *et al.*, 2005; Holloway *et al.*, 2006; Kallel

et al., 2006) จากรายงานอื่น ๆ พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MDR *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia ที่ได้รับ colistin มีผลการตอบสนองทางการรักษาที่ดีขึ้น 56-61% แต่อาการเป็นพิษจากการใช้ยาในกลุ่มนี้ต่อระบบประสาทถูกรายงานขึ้นก่อนปี 1970 และอาการที่พบมากที่สุดคือเยื่อหุ้มสมองเกิดการระคายเคือง (meningeal irritation) ซึ่งเห็นได้ชัดเมื่อใช้ปริมาณยาน้อยลง โดยภาพรวมแล้วการรักษาที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทยังไม่มีหลักฐานเพียงพอเกี่ยวกับความปลอดภัยในการใช้ ถึงแม้ว่าจะเป็นยาตัวเลือกที่สำคัญในการรักษา (Garnacho-Montero *et al.*, 2003; Markou *et al.*, 2003; Kasiakou *et al.*, 2005; Linden and Paterson, 2006)

1.7.6 การเสริมฤทธิ์และการรักษาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกัน

การขาดการควบคุมการวิจัยทางคลินิก (clinical trials) ทำให้ยากต่อการศึกษาการเสริมฤทธิ์และการใช้ยาร่วมกันในการรักษาโรคติดเชื้อจาก *Acinetobacter* ซึ่งส่วนใหญ่ยังไม่มีความชัดเจน (Maragakis and Perl, 2008)

จากการศึกษาการใช้ยาร่วมกัน Montero และคณะ (2004) ได้ทำการทดลองในหนูที่เป็นโรคปอดอักเสบจากการติดเชื้อ MDR *Acinetobacter* พบว่าการใช้ยาร่วมกันระหว่าง rifampin กับ imipenem, tobramycin, หรือ colistin มีประสิทธิภาพดีที่สุด สำหรับการศึกษาค้นคว้าเพื่อติดตามผลทางคลินิกควรระวังการใช้งาน rifampin ร่วมกับ imipenem ในการยับยั้งเชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter* (Montero *et al.*, 2004) เนื่องจากมีรายงานความล้มเหลวสูงและเกิดอุบัติการณ์คือยา rifampin ขึ้นถึง 70% ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา จากการศึกษานี้ในหนูตะเภาโดยการใช้ยาร่วมกันระหว่าง imipenem และ amikacin พบว่าให้ผลเสียมากกว่าการใช้ imipenem เพียงอย่างเดียวในการรักษา imipenem-resistant pneumonia ถึงแม้ว่าจากการทดสอบใน *in vitro* ย่าจะมีความสามารถในการเสริมฤทธิ์กันก็ตาม (Saballs *et al.*, 2006)

2. การเสริมฤทธิ์ระหว่างสารสกัดจากสมุนไพรและยาปฏิชีวนะในยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

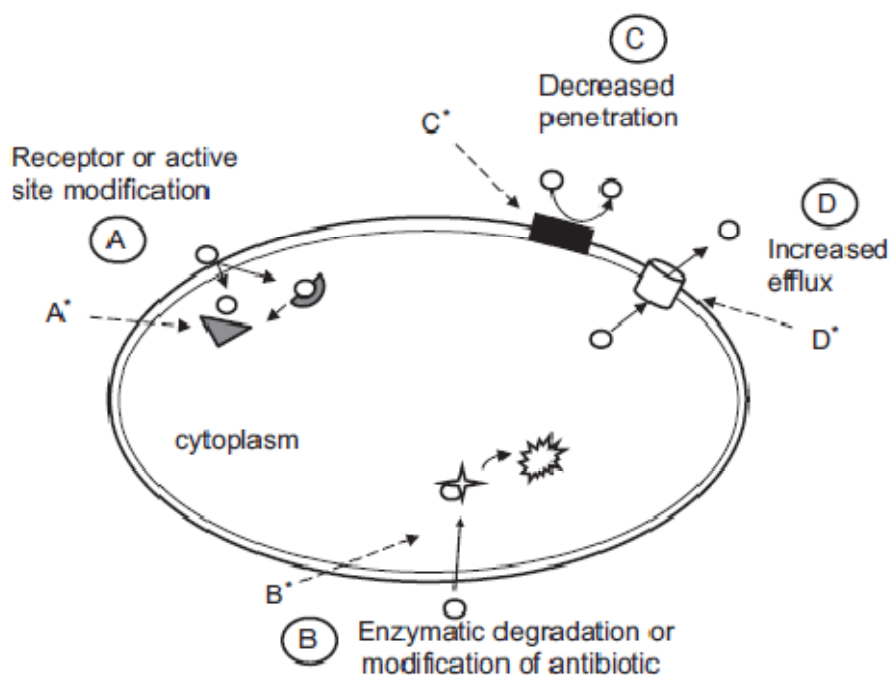
ยาปฏิชีวนะมีความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การดื้อต่อยาเหล่านี้ทำให้เกิดการอุบัติใหม่และการกลับมาอุบัติใหม่ของโรคติดเชื้อ สารต้านเชื้อแบคทีเรียจากพืชเป็นแหล่งของยารักษาโรคชนิดใหม่ ๆ มีการทำการศึกษาเพื่อหาวิธีทางในการนำสารจากธรรมชาติมาใช้แทนยาปฏิชีวนะ ในธรรมชาติพืชมีการติดเชื้อน้อยมากซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ได้ดีถึงกลไกการพัฒนากำป้องกันตัวของพืช เป็นที่รู้กันดีว่าพืชสามารถผลิตสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กในการต้านเชื้อโรค phytoalexins เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่พืชผลิตขึ้น ประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น terpenoids, glycoesters, flavonoids และ polyphenols แต่ส่วนใหญ่สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก

เหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ถึงแม้ว่าสารจากพืชจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อน้อยแต่ปรากฏว่าสารเหล่านี้สามารถพัฒนาไปเป็นสารที่ทำหน้าที่เสริมฤทธิ์ (synergy) เพื่อยับยั้งการติดเชื้อ (Hemaiswarya *et al.*, 2008) จากการศึกษาหนึ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานร่วมกัน (combination action) ของ berberine และ 5'-methoxyhydrnocarpin ซึ่งสารทั้งสองชนิดผลิตจากต้นเบอร์เบอร์รี่ (berberry plants) berberine นั้นเป็นสาร hydrophobic alkaloid ที่สามารถแทรกกระหว่าง DNA แต่ไม่มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากสารดังกล่าวถูกขับออกโดย multidrug resistance pumps แต่ 5'-methoxyhydrnocarpin สามารถยับยั้ง MDR pump (Stermitz *et al.*, 2000) การทำงานร่วมกันของสารทั้งสองชนิดส่งผลให้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Lewis and Ausubel, 2006) ผลการการทำงานร่วมกันได้มีการทดลองโดยใช้ berberine เชื่อมกับ INF₅₅ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด พบว่าสารทั้งสองสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีจากการเพิ่มการสะสมสารภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว (Ball *et al.*, 2006) เป็นที่รู้กันดีว่าการยับยั้ง β -lactamses ทำได้โดยการใช้ยาร่วมกัน (co-drug) ส่วนใหญ่จะมีประสิทธิภาพในการใช้กับสายพันธุ์ที่ดื้อยาโดยการสร้าง penicillinase โดยใช้ยา clavulanic acid ร่วมกับ sulbactam และ tazobactam (Lee *et al.*, 2003) แต่การใช้ clavulanate บ่อยครั้งทำให้เกิดสายพันธุ์ดื้อยาขึ้น (Enright *et al.*, 2002) การปรากฏขึ้นของ extended-spectrum β -lactamse และสายพันธุ์ดื้อยา IMP-1 (a new β -lactam) เช่น cephalosporins และ carbapenems ทำให้ต้องมีการพัฒนา β -lactamase inhibitors (Chaibi *et al.*, 1999) สารชีวเคมี (secondary metabolites) จากพืชเป็นแหล่งของสารที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษาการติดเชื้อแบบที่ใช้ร่วมกัน (combination therapy) สารชีวเคมีจากพืชเป็นแหล่งของฟลูโชนอยด์ (phytochemicals) หลายชนิดที่มีความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาโดยมีผลกับกลไกต่าง ๆ ที่ทำให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ (Hemaiswarya *et al.*, 2008) ดังนี้ (รูปที่ 5)

2.1 การเปลี่ยนแปลงตัวรับ (Receptor modification) หรือบริเวณเกิดปฏิกิริยา (active site modification)

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างยาปฏิชีวนะและเป้าหมาย (target site) มีบทบาทสำคัญให้เกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณเป้าหมายซึ่งนำไปสู่เชื้อดื้อยา เช่นการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยาโดยการกลายพันธุ์ของ RNA polymerase และ DNA gyrase เป็นผลให้เชื้อดื้อต่อ rifamycins และ quinolones (Willmott and Maxwell, 1993) และเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBPs ที่พัฒนาขึ้นเพื่อดื้อต่อ penicillin เพราะฉะนั้นวิธีการที่จะลดการดื้อยาได้คือหาสารยับยั้ง PBPs สารที่มีรายงานการเสริมฤทธิ์ยา β -lactam antibiotics (BLA) ในการยับยั้งเชื้อดื้อยา ได้แก่ catechins (*Camellia sinensis*) (Takahashi *et al.*, 1995), EGCG (*Epigallocatechin gallate*) จากชาเขียว (Suresh

et al., 1997), tellimagrandin I และ rugosin B จาก rose red (*Rosa canina*) (Shiota *et al.*, 2004), baicalin จาก *Scutellaria amoena* (Liu *et al.*, 2000) และ corilagin จาก *Arctostaphylos uva-ursi* (Shimizu *et al.*, 2001) ซึ่งพบว่า corilagin เป็นสาร polyphenol ที่สามารถลดค่า MIC ของเชื้อ MRSA (Hemaiswarya *et al.*, 2008)



รูปที่ 5 Plant secondary metabolites as modifiers of multidrug resistance mechanisms.

○ – antibiotic drug, ◐ receptor, ▽ modified receptor, ☪ efflux pump, ✨ – enzyme, ☼ -degradation of the drug. (A*) Corilagin, tellimagrandin I, diterpene 416 and compound P inhibits PBP 2a, a modified receptor; (B*) EGCg inhibits the β -lactamase; (C*) thymol, carvacrol, gallic acid increases the outer membrane permeability; and (D*) EGCg, 5'-methoxyhydrnocarpin, reserpine, carnosic acid and isopimarane derivatives inhibit the efflux pumps (Hemaiswarya *et al.*, 2008)

Shimizu และคณะ (2001) รายงานว่ากลไกที่มีความเป็นไปได้ในการทำงานของ corilagin มีสองกลไกคือ ยับยั้งการทำงานของ PBPs หรือยับยั้งผลผลิตของมันเอง และพบว่า PBPs ของเซลล์ meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่เติม corilagin จะจับกับ BOCILLINFL ซึ่งเป็น fluorescent-labeled benzylpenicillin ได้น้อย (Shiota *et al.*, 2004) และการศึกษา reverse transcription-PCR และ semiquantitative PBP2a latex agglutination assays พบว่า

epigallocatechingallate (EGCg) ไม่มีผลในการยับยั้ง mRNA ที่มีผลต่อการแสดงออกของ PBP2a และผลิตภัณฑ์จาก PBP2a แต่การเสริมฤทธิ์กันระหว่าง EGCg และ BLA มีผลกับ peptidoglycan บน cell wall ของแบคทีเรีย (Yam *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า EGCg สามารถเสริมฤทธิ์ให้กับ carbapenems ในการต่อต้าน MRSA แต่กลไกการทำงานของ EGCg นั้นยังไม่มีการศึกษา (Hu *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ยังมีพืชเคมีอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต่อต้านและเป้าหมายที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อเช่น glycosylated flavones มีผลต่อการทำงานของ topoisomerase IV (Bernard *et al.*, 1997) myricetin ยับยั้ง DnaB helicase (Griep *et al.*, 2007) allicin ยับยั้ง RNA synthesis (Feldberg *et al.*, 1988) และสารจาก *Polygonum cuspidatum* ยับยั้ง bacterial DNA primase (Hegde *et al.*, 2004)

2.2 Enzymatic degradation และการเปลี่ยนแปลงยา

การผลิตเอนไซม์และการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงยาเป็นอีกหนทางหนึ่งทำให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ โดยการ hydrolysis, group transfer, หรือ redox mechanisms (Wright, 2005) β -lactamases เป็นหนึ่งใน family ของเอนไซม์ที่สามารถจับกับ β -lactam ของ cephalosporins และ penicillins ผ่านทาง serine residue บริเวณ active site ของเอนไซม์หรือผ่านทางการทำปฏิกิริยาของ Zn^{2+} (Bush, 1998; Bush, 2002) ในอดีตการใช้ ampicillin ร่วมกับ sulbactam เพื่อยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ทำให้ยาออกฤทธิ์กว้างขึ้น ถึงแม้ว่าการใช้ร่วมกันจะมีประสิทธิภาพ แต่ก็ไม่มีผลกับ MRSA และสายพันธุ์ที่ผลิต β -lactamase แต่ Zhao และคณะ (2002) ยืนยันว่า EGCg สามารถยับยั้งการผลิต penicillinase จาก *S. aureus* ซึ่งส่งเสริมการทำงานของ penicillin โดยพบว่า EGCg มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ 50% ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม β -lactam พบว่า MIC_{90} มีค่าเท่ากับ 4 $\mu\text{g/ml}$ จากเริ่มต้น 16 $\mu\text{g/ml}$ (Hu *et al.*, 2001)

2.3 ลดการสะสมยาปฏิชีวนะภายในเซลล์โดยลดการซึมผ่าน

การลดการสะสมยาภายในเซลล์อาจเกิดได้จากกลไกการดื้อยาสองกลไกคือการลดการซึมผ่านของยา (permeability) ผ่าน outer membrane ของเซลล์ และการลดการสะสมโดยการขับยาออก (efflux pump)

เซลล์แบคทีเรียกลมลบล้อมรอบไปด้วย outer membrane มีลักษณะพื้นผิวเป็น hydrophilic และเป็น permeability barrier สำหรับต่อต้านสารพวก hydrophobic เช่น detergents, hydrophobic dyes และยาปฏิชีวนะ (Vaara, 1992) กลไกการป้องกันนี้เกิดจากโมเลกุลของ LPS ที่อยู่บริเวณ outer leaflet (Nikaido, 2003) มากกว่า 75% ของพื้นผิวบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมดและรูปแบบที่มีความจำเพาะจะเชื่อมโยงกับ Omp เช่น porins (Alexander and Rietschel, 2001; Bos and Tommassen, 2004) bacterial lipoproteins anchor บริเวณ outer membrane จะเชื่อมต่อไปยัง

periplasmic peptidoglycan layer (Brade et al., 1999) divalent cations ที่เชื่อมโยง anionic membrane-proximal regions ของ LPS เป็นตัวที่ทำให้โครงสร้างของ outer membrane แข็งแรง (Vaara, 1992) bivalent cations มีส่วนทำให้ outer membrane มีความเสถียรโดยสร้าง electrostatic interaction ระหว่าง LPS และ outer membrane (Leive, 1965; Vaara, 1981) EDTA เป็น chelator ที่สามารถแยก ion เหล่านี้ได้โดยการลดสัดส่วนที่มีใน LPS ปลดปล่อย phospholipids และสร้าง hydrophobic pathway (Leive, 1965) ยังมีรายงานอีกว่า EDTA สามารถย่อยสลายผนังเซลล์คล้ายสาร lysozyme, nisin, และ biocides (Leive, 1965; Vaara, 1981; Walsh et al., 2003) นอกจากนั้นยังเป็น permeabilizers (ตัวช่วยการซึมผ่าน) ของสารต่าง ๆ เช่น polycationic polymyxin B nonapeptide, และรบกวน anionic บริเวณ LPS ทำให้เชื้อไวต่อ hydrophobic antibiotics (Vaara and Vaara, 1983)

essential oils เช่น thymol และ carvacrol เป็น permeabilizer ชนิดหนึ่ง (Helander et al., 1998) (รูปที่ 5) magnesium chloride ($MgCl_2$) มีความสามารถในการรบกวนการทำงานของ EDTA และ polyethylenimine แต่ไม่มีผลกับกิจกรรมของ carvacrol หรือ thymol แสดงให้เห็นว่า essential oils ไม่ได้เป็นทั้ง chelate และ intercalate ของ LPS โดยการแทนที่ divalent cation ซึ่งเกี่ยวข้องกับ ความคงตัวของ outer membrane (Vaara, 1992)

2.4 ลดการสะสมยาปฏิชีวนะภายในเซลล์โดยการขับออก

Secondary metabolites จากพืชมีผลในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่มีผลต่อแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane ที่มีผลในการป้องกันสาร amphiphatic compounds (Lewis and Komovskaya, 2001) ในกลุ่มของ multidrug resistance pumps (MDRs) มีหน้าที่ขับ amphiphatic toxins ออกจาก outer membrane (Lewis, 2001) Tegos และคณะ (2002) แสดงให้เห็นว่า MDR inhibitors $MC_{207,110}$ และ INF_{271} สามารถเพิ่มประสิทธิภาพให้กับสารต้านแบคทีเรียจากพืช 11 ชนิด เช่น rhein, reveratrol, gossypol, berberine และพืชบางชนิดสามารถลด MDR ได้ เช่น carnosic acid จาก *Rosmarinus officinalis* (Oluwatuyi et al., 2004) และสารทดแทน pyridine จาก *Jatropha elliptica* (Marquez et al., 2005) มีฤทธิ์ต่อ NorA efflux pump และทำให้ระดับความเข้มข้นของยาภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 2 isopimarane diterpenes จาก *Lycopus europaeus* เพิ่มประสิทธิภาพให้กับ tetracycline และ erythromycin ในการยับยั้ง *S. aureus* สองสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ multidrug efflux pump ชนิด Tet (K) และ Msr (A) (Gibbons et al., 2003b) EGCg เพิ่มการสะสม tetracycline ใน *S. aureus* โดยการยับยั้ง efflux pump ชนิด Tet (K) และ Tet (B) (Sudano Roccaro et al., 2004) และยังเพิ่มความสามารถของ norfloxacin ในต่อต้าน NorA harboring ของ *S. aureus* (Gibbons et al., 2003a) isoflavones ที่แยกได้จาก *Lupinus argenteus* มีผล

ในการเสริมฤทธิ์ norfloxacin ในการต่อต้านเชื้อ *S. aureus* โดยการยับยั้ง MDR pump และ reserpine ซึ่งเป็นสารประกอบ alkaloid ที่มีฤทธิ์ต่อ fluoroquinolones (Schmitz *et al.*, 1998) และ tetracycline ในการช่วยต่อต้าน MDR *S. aureus* (Gibbons and Udo, 2000) นอกจากนี้ reserpine ยังมีความสามารถในการยับยั้ง LmrA เป็น efflux pump จัดอยู่ใน ABC family ของ *Lactococcus lactis* (Marquez *et al.*, 2005) แต่เชื้อคือต่อสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติตัวนี้

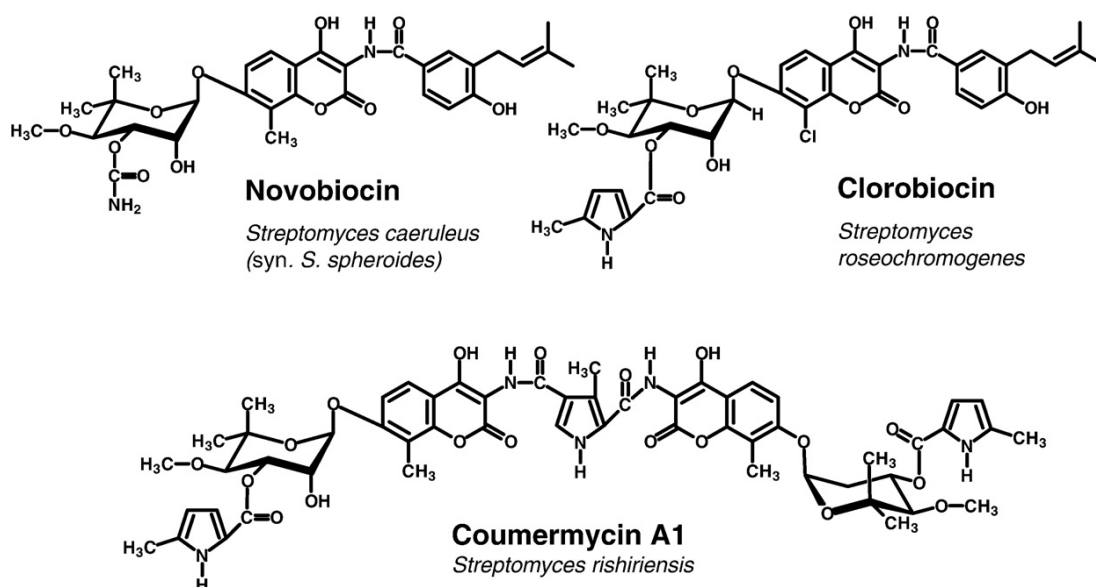
ดังนั้น EPI ที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นแหล่งของสารที่สามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพให้กับยา ลดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อที่ดื้อยาแล้วกลับมาไวต่อยาและลดการอุบัติใหม่ของสายพันธุ์ดื้อยาได้ (Marquez *et al.*, 2005)

3. Novobiocin (Albamycin)

Novobiocin เป็นอนุพันธ์หนึ่งในยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminocoumarin antibiotic ประกอบด้วยอนุพันธ์ยา 3 ชนิดคือ novobiocin, clorobiocin, และ coumermycin A₁ (รูปที่ 6) ซึ่งทั้งหมดผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่แตกต่างกันออกไป novobiocin ผลิตจากเชื้อ *S. spheroides* และยังสามารถผลิตได้จากเชื้อ *S. niveus* นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้โดยกระบวนการทางเคมี (Hoeksema and Smith, 1961; Heide, 2009) มีรายงานครั้งแรกในช่วงกลางปี 1950 เป็นยาชนิดใหม่ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในมนุษย์ มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เรียกว่าแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *S. aureus* รวมถึงสายพันธุ์ MRSA และเชื้อสายพันธุ์ staphylococci อื่น ๆ สำหรับเชื้อแกรมลบจะคือต่อยาชนิดนี้ โดยเฉพาะกลุ่ม Enterobacteriaceae ส่วนใหญ่คือต่อยาชนิดนี้มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ไว เช่น *H. influenzae* และ *Neisseria* sp. รวมถึง *Proteus* novobiocin ออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่อาจออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ (bactericidal) เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงกับเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยาชนิดนี้ ปัจจุบัน novobiocin เป็นยาในกลุ่ม aminocoumarin เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ได้รับสิทธิบัตรให้ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ในช่วงปี 1960 โดยมีการอนุญาตให้ใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกาในชื่อของ albamycin เพื่อยับยั้งโรคติดเชื้อจาก MRSA (Arathoon *et al.*, 1990)

3.1 กลไกการออกฤทธิ์

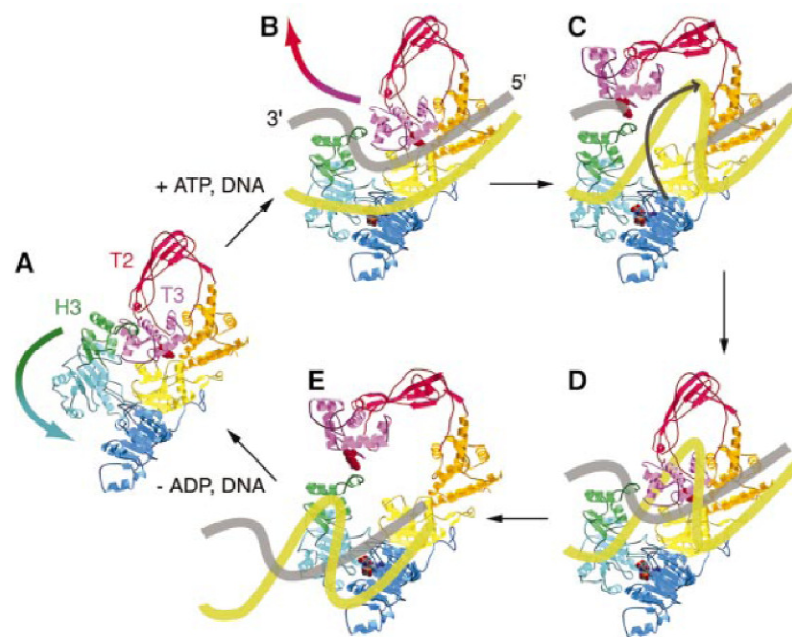
Novobiocin ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเนื่องจากไปยับยั้งการสังเคราะห์ nucleic acid ในแบคทีเรีย โดยยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase (Maxwell, 1993) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูป heterotetramer form ประกอบด้วย GyrA และ GyrB (Maxwell, 1997) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ มีหน้าที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการคลายเกลียว DNA supercoils ให้อยู่ในภาวะ relax (Corbett *et al.*, 2004) ซึ่งจะคลายออกเป็นวงในระหว่างการจำลองตัวเองของ DNA



รูปที่ 6 The aminocoumarin antibiotics novobiocin, clorobiocin and coumermycin A1 and their wild-type producer strains (Heide, 2009)

ขั้นตอนการคลายเกลียวของ DNA โดยการทำงานของ DNA gyrase ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (รูปที่ 7) คือ DNA gyrase จับกับ double-stranded DNA (A) หลังจากนั้นทำการตัดสาย DNA สายหนึ่งแล้วแยกออกจากกัน DNA gyrase และ DNA จะอยู่ในลักษณะ cleavage complex (B) สาย DNA ที่ไม่ถูกตัดจะเคลื่อนที่ไปจับยังบริเวณ active site tyrosine ผ่านทาง phosphoester (C) สาย DNA ที่ถูกตัดแยกออกจะเชื่อมต่อกัน (D) และสาย DNA ที่ไม่ถูกตัดจะถูกเคลื่อนย้ายออกจาก gap หลังจากนั้น DNA จะอยู่ในภาวะคลายเกลียวออก (E) (Rodriguez and Stock, 2002) ขั้นตอนการคลายเกลียวของ DNA ที่ประกอบไปด้วย การจับ การตัดสาย และการเคลื่อนย้าย DNA ต้อง

อาศัย ATP ในการให้พลังงาน (Berger and Wang, 1996; Wang, 1998) novobiocin จะออกฤทธิ์โดยจะเข้าแย่งจับกับ ATP บริเวณ ATP-binding site ของ DNA gyrase ซึ่งเป็นการยับยั้ง gyrase-catalysed DNA supercoiling หรือยับยั้งตัวเร่งปฏิกิริยา ATPase ทำให้ DNA gyrase ไม่สามารถสลาย ATP และให้พลังงานออกมา DNA จึงไม่สามารถคลายเกลียวและจำลองตัวเองได้ (Maxwell, 1993)



รูปที่ 7 Speculative model for positive supercoiling of DNA by reverse gyrase (Rodriguez and Stock, 2002)

ยาในกลุ่ม fluoroquinolone เป็นยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อคล้ายกับยาในกลุ่ม aminocoumarine antibiotics โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง DNA gyrase โดยการจับกับบริเวณ GyrA subunits ในขณะที่ novobiocin ออกฤทธิ์โดยจับบริเวณ GyrB subunits ดังนั้น novobiocin จึงมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อสายพันธุ์ fluoroquinolone-resistant pathogen ด้วย (Heide, 2009) Ouabdesselam และคณะ (1995) พบว่าจากการศึกษาในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วย การกลายพันธุ์ของ *gyrA* gene พบได้บ่อยกว่า *gyrB* gene นอกจากนั้นยังมีการศึกษาการกลายพันธุ์ของ gene ที่ code สำหรับ GyrA และ GyrB subunits ในโครโมโซมของเชื้อ *E. coli* พบว่า *gyrA* gene มีการกลายพันธุ์ที่ระยะเวลา 48 นาที ส่วน *gyrB* gene นั้นมีการกลายพันธุ์ที่ระยะเวลา 83

นาที (Ouabdesselam *et al.*, 1995) แสดงให้เห็นว่าบริเวณ GyrA subunits มีแนวโน้มในการกลายพันธุ์มากกว่าบริเวณ GyrB subunits และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อมีอัตราการดื้อยาสูงกว่า

ถึงแม้ว่า novobiocin จะมีประสิทธิภาพดีในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย แต่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย (Kirby *et al.*, 1956; Perronne *et al.*, 1987) เนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม hydrophobic antibiotic ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลมาจากประจุลบที่สูงระหว่างโมเลกุลของ LPS ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบมีผลไปขัดขวางสารที่เป็น hydrophobic compounds (Khalil *et al.*, 2008) และนอกจากนั้นยาปฏิชีวนะชนิดนี้ยังละลายน้ำได้น้อยทำให้ดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร (oral absorption) ในร่างกายมนุษย์ได้น้อย (Kirby *et al.*, 1956; Perronne *et al.*, 1987)

3.2 ขอบ่งชี้

Novobiocin หรือในชื่อทางการค้า albamycin ใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อจาก *S. aureus* ในกรณีที่ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าไม่สามารถใช้รักษาได้ เช่น penicillins, cephalosporins, vancomycin, lincomycin, erythromycin, และ tetracyclines มีการผลิต albamycin (novobiocin sodium) ในรูปของ capsule 250 mg โดยบริษัท Pfizer, Inc. และได้รับอนุญาตในวันที่ 4 กันยายน 1964 การใช้ novobiocin ไม่แพร่หลายมากนักเนื่องจากมีรายงานถึงผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อร่างกาย วันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2009 องค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ถอดถอน novobiocin ออกจากตลาด โดยให้เหตุผลถึงประสิทธิภาพของยาและความปลอดภัยของผู้บริโภคที่เป็นผลมาจากการรายงานถึงผลข้างเคียงของยาหลาย ๆ ชนิด เช่น ผื่นแพ้ (relatively common skin reactions) ตัวเหลือง (jaundice) ตับล้มเหลว (hepatic failure) และเม็ดเลือดบกพร่อง (blood dyscrasias) ที่ส่งผลให้เกิดภาวะ neutropil ต่ำ (neutropenia) โลหิตจาง (anemia) และเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) (Dorsey, 2011)

3.3 การใช้ novobiocin ร่วมกับสารสกัดจากพืชในการลดการดื้อยาปฏิชีวนะ

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติร่วมกับ novobiocin อาจเป็นอีกทางเลือกที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิด เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติมีความสามารถในการลดกลไกการดื้อยา เช่นการรบกวน outer membrane ทำให้ novobiocin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม hydrophobic drug สามารถละลายผ่าน outer membrane ที่มีลักษณะเป็น hydrophilic ของแบคทีเรียแกรมลบเข้าไปยังบริเวณเป้าหมายได้ และเนื่องจาก novobiocin เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูง บริเวณเป้าหมายของยามีการกลายพันธุ์น้อย เพราะฉะนั้นการใช้ novobiocin ร่วมกับสารสกัดจากพืชจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ใช้ในการรักษาแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายชนิด

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยต่อการลดการดื้อยา novobiocin ของเชื้อ multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*
2. ศึกษากลไกการทำงานของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการลดการดื้อยาโดยการเพิ่ม permeability และยับยั้ง efflux pump ของ multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1.1 Multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล สงขลานครินทร์ เชื้อทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วย จุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะ แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา จำนวน 49 สายพันธุ์

1.2 *A. baumannii* ATCC 19606 แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานเป็นเชื้อควบคุมคุณภาพของ การทดสอบ จำนวน 1 สายพันธุ์

2. ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ novobiocin (Calbiochem-EMD4 Biosciences)

3. สารเคมี

3.1 Acetone (Merck)

3.2 Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) (Sigma-Aldrich)

3.3 Dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich)

3.4 Ethidium bromide (EtBr) (Sigma-Aldrich)

3.5 95% ethanol (Merck)

3.6 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (J.T.Baker)

3.7 N-Phenyl-1-naphthylamine (NPN) (Sigma-Aldrich)

3.8 Phosphate buffer (PBS) (Merck)

3.9 Pyronin Y (Sigma-Aldrich)

3.10 Sodium chloride (NaCl) (Merck)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.1 MacConkey agar (MCA) (Difco)
- 4.2 Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco)
- 4.3 Mueller-Hinton broth (MHB) (Difco)
- 4.4 Tryptic soy agar (TSA) (Merck)
- 4.5 Tryptic soy broth (TSB) (Merck)

อุปกรณ์

1. Autoclave (Tomy, ES 315)
2. Beaker (Pyrex)
3. Centrifuge (Biofugo pico)
4. Duran bottle (Duran)
5. Hot air oven (Binder, T410340)
6. Incubator (Heraeus, B 5100E)
7. Laminar air flow cabinet (Gelman, HB 143AS)
8. Light microscope (Olympus, CX31RBSFA)
9. Micropipette ขนาด 20-200 μ l และ 100-1000 μ l (Eppendorf)
10. Microtube ขนาด 1.5 ml (Axygen, INC.)
11. Microtiter plate แบบ 96 well (NuncTM)
12. Microtiter plate แบบ Fluoro-/Luminunc 96 well plate white (NuncTM)
13. Multichannel micropipette ขนาด 20-200 μ l (Finnpipette)
14. Petri dish (Anumbra)
15. Pipet tip ขนาด 250 μ l และ 1000 μ l
16. Test tube (Pyrex)
17. Vortex mixer (Vortex Genie 2, G 560E)
18. Water bath (Julabo, TW 20)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจำนวน 49 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในปี 2009 ซึ่งแยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ จากผู้ป่วย เช่น เสมหะ ปัสสาวะจากสายสวน น้ำปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง เลือด หนอง เนื้อเยื่อ และบาดแผล ที่ได้รับการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแล้วด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมีและรูปแบบการคือต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion method โดยหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาใน TSB ที่มี 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C

2. การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

นำสมุนไพรอบที่อุณหภูมิ 50°C นาน 4-5 วัน บดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักก่อนการสกัดด้วย 95% ethanol ในอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:2 เขย่าเบา ๆ ทิ้งไว้ 7 วัน ระบายเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45°C นำสารสกัดที่ได้ชั่งน้ำหนัก และเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4°C คำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้ ตามสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ได้จากการสกัด} \times 100}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด}}$$

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสมุนไพร (Houghton and Raman, 1998; Ahmad and Beg, 2001; Woo, 2001)

องค์ประกอบทางเคมีที่ทำการศึกษาประกอบด้วย alkaloids, condensed tannins, flavonoids, hydrolysable tannins, steroids และ triterpenoids ทำการทดลองโดยละลายสารสกัดจากสมุนไพรด้วย 95% ethanol หยดสารละลายที่ได้ลงในภาตหลุมเซรามิกประมาณ 2 หยดต่อหนึ่งหลุม ใส่ป้ายยาทดสอบชนิดต่าง ๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนสี นำยาทดสอบที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

1) Wagner's reagent หยดแล้วสังเกตการเปลี่ยนสีทันที เป็นการทดสอบเพื่อหาสารกลุ่ม alkaloids

2) 5% ferric chloride หยดแล้วสังเกตการเปลี่ยนสีทันที เป็นการทดสอบเพื่อหาสารกลุ่ม condensed tannins และ hydrolysable tannins

3) Magmesium ribbon ใส่แล้ววางทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด แล้วสังเกตการเปลี่ยนสี เป็นการทดสอบเพื่อหาสารกลุ่ม flavonoids

4) Acetic anhydride หยดและค่อย ๆ เติม conc. H₂SO₄ บริเวณขอบภาชนะรามิกแล้วสังเกตการเปลี่ยนสีทันที เป็นการทดสอบเพื่อหาสารกลุ่ม triterpenoids และ steroids

การอ่านผล

อ่านผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารในภาชนะรามิกหลังจากเติมน้ำยาทดสอบชนิดต่าง ๆ ลงไป โดยเปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่มีการเติมน้ำยาทดสอบ ผลลบบจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสี ผลบวกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีต่าง ๆ ดังนี้

alkaloids	ตะกอนสีน้ำตาล
condensed tannins	สีเขียว
flavonoids	สีชมพู
hydrolysable tannins	สีน้ำเงิน
triterpenoids	สีชมพูม่วง
steroids	สีเขียว

4. การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธี broth microdilution (CLSI, 2006)

4.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) ด้วย 0.85% NaCl เจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย MHB

4.2 การเตรียมยาปฏิชีวนะ

เตรียมยา novobiocin ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (64 µg/ml) ด้วย MHB

4.3 การทดสอบหาค่า MIC

ทำการเจือจาง novobiocin จากข้อ 4.2 แบบลำดับสอง (2-fold dilution) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 64-1 µg/ml ใน microtiter plate แบบ 96 หลุม ให้มีปริมาตรหลุมละ 20 µl หลังจากนั้นดูด MHB ใส่ลงไปในหลุมละ 80 µl ดูดเชื้อจากข้อ 4.1 ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 100 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง

4.4 การอ่านผล

อ่านผลจากการเจริญของเชื้อหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เชื้อไม่เจริญเป็นค่า MIC โดยการวัดความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ใช้หลุมที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุมบวก (positive control) และหลุมที่มีเชื้ออย่างเดียวนั้นเป็นชุดควบคุมลบ (negative control)

5. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี growth inhibition assays (Chusri *et al.*, 2009)

5.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชือบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl เจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย MHB

5.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

เจือจางสารสกัดจากสมุนไพรให้มีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการด้วย MHB (250 µg/ml)

5.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในอาหารเหลว

ดูดสารสกัดจากสมุนไพรจากข้อ 5.2 ปริมาตร 50 µl ใส่ลงใน microtiter plate ที่มีอาหาร MHB 50 µl ดูดเชื้อจากข้อ 5.1 ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 100 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง

5.4 การอ่านผล

อ่านผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา %Growth inhibition จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ Growth inhibition} = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

$\text{OD}_{\text{control}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงจากความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวของชุดควบคุมบวก

OD_{test} คือค่าการดูดกลืนแสงจากความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวของชุดทดสอบ

6. ทดสอบความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยา (resistant modifying agents; RMAs) ของสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้ novobiocin เป็นต้นแบบในการศึกษาโดยวิธี growth inhibition assays (Chusri *et al.*, 2009)

6.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบคทีเรียซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl เจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย MHB

6.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

เจือจางสารสกัดจากสมุนไพรให้มีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการด้วย MHB

6.3 การเตรียมยาปฏิชีวนะ

เตรียมยา novobiocin ให้มีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการด้วย MHB

6.4 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ยาปฏิชีวนะของสารสกัดจากสมุนไพรในอาหารเหลว

ดูดสารสกัดจากสมุนไพรจากข้อ 6.2 ตามความเข้มข้นที่ต้องการปริมาตร 50 μ l ลงไปใน microtiter plate ดูดยา novobiocin จากข้อ 6.3 ตามความเข้มข้นที่ต้องการใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 50 μ l และดูดเชื้อจากข้อ 6.1 ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 100 μ l ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง

6.5 การอ่านผล

อ่านผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา % Growth inhibition

7. ศึกษาผลของสารลดการต้อยาจากฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรรต่อการเปลี่ยนแปลงของ outer membrane permeability ของ MDR *A. baumannii* โดยวิธี NPN uptake assays (ดัดแปลงจาก Helander and Mattila-Sandholm, 2000)

7.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ สารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl เจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย MHB

7.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรร

เจือจางสารสกัดจากสมุนไพรรที่เป็นสารลดการต้อยาให้มีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการด้วย MHB

7.3 การทดสอบผลการสารสกัดจากสมุนไพรรต่อ outer membrane permeability ของเชื้อแบคทีเรียโดยการสะสมของสี NPN ภายในเซลล์

ดูดสารสกัดจากสมุนไพรรจากข้อ 7.2 ตามความเข้มข้นที่ต้องการปริมาตร 500 μ l ลงไปในหลอดทดลอง ที่มีอาหาร MHB 500 μ l ดูดเชื้อจากข้อ 7.1 ใส่ลงในหลอดทดลอง 1,000 μ l ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างและละลายเซลล์ด้วย PBS buffer (pH 7.4) นำไปปรับความขุ่นให้ได้ OD เท่ากับ 1 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 nm ดูดเซลล์ที่ได้ใส่ลงใน white microtiter plate แบบทึบ ปริมาตร 100 μ l ที่มีอาหาร PBS buffer 50 μ l หลังจากนั้นใส่สี NPN ความเข้มข้นสุดท้าย 40 μ M ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เข้ากัน ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องตามระยะเวลาที่กำหนดแล้วนำไปวัดค่าการเรืองแสง

7.4 การอ่านผล

อ่านค่าจากการวัดค่าการเรืองแสงด้วย microplate reader วัดด้วย fluorescence detector โดยวัดการเพิ่มของสี NPN ที่เกิดการสะสมภายในเซลล์ที่ความยาวคลื่นแสงในช่วงกระตุ้น (excitation) 350 nm และความยาวคลื่นแสงในช่วงคายพลังงาน (emission) 420 nm โดยมีชุดควบคุมดังนี้

- | | |
|--------------|---|
| ชุดควบคุมบวก | 1) เซลล์แบคทีเรีย 100 μ l ที่เติม EDTA ซึ่งทำหน้าที่เป็น permeabilizer, PBS buffer 50 μ l, และ NPN 50 μ l |
| ชุดควบคุมลบ | 1) PBS buffer 200 μ l |
| | 2) PBS buffer 150 μ l และ NPN 50 μ l |

3) PBS buffer 50 μ l, NPN 50 μ l, และเซลล์แบคทีเรีย 100 μ l ที่ไม่เติม สารสกัดจากสมุนไพรร หรือ EDTA

8. ศึกษาผลของสารลดการดื้อยาจากฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรรต่อการเปลี่ยนแปลงของ efflux pump ของ MDR *A. baumannii* โดยวิธี fluorescent dye whole cell accumulation assays (ดัดแปลงจาก Kern *et al.*, 2006; Pannek *et al.*, 2006)

8.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชืบบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ สารละลายเบรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl เจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ให้ มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย MHB

8.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรร

เจือจางสารสกัดจากสมุนไพรรที่เป็นสารลดการดื้อยาให้มีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของ ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการด้วย MHB

8.3 การทดสอบผลการสารสกัดจากสมุนไพรรต่อ efflux pump ของเชื้อแบคทีเรียโดยการ สะสมของสี EtBr ภายในเซลล์

ดูดสารสกัดจากสมุนไพรรจากข้อ 8.2 ตามความเข้มข้นที่ต้องการปริมาตร 500 μ l ลงไปใน หลอดทดลอง ที่มีอาหาร MHB 500 μ l ดูดเชื้อจากข้อ 8.1 ใส่ลงในหลอดทดลอง 1,000 μ l ผสมให้ เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างและละลายเซลล์ด้วย PBS buffer (pH 7.4) นำไปปรับความขุ่นให้ได้ OD เท่ากับ 1 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 nm ดูดเซลล์ที่ได้ใส่ลงไปใน white microtiter plate แบบที่บีบ ปริมาตร 100 μ l ที่มีอาหาร PBS buffer 50 μ l หลังจากนั้นใส่สี EtBr ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 μ g/ml ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เข้ากัน ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 μ l บ่มที่ อุณหภูมิห้องตามระยะเวลาที่กำหนดแล้วนำไปวัดค่าการเรืองแสง

8.4 การอ่านผล

อ่านค่าจากการวัดค่าการเรืองแสงด้วย microplate reader วัดด้วย fluorescence detector โดย วัดการเพิ่มของสี EtBr ที่เกิดการสะสมภายในเซลล์ที่ความยาวคลื่นแสงในช่วงกระตุ้น 518 nm และ ความยาวคลื่นแสงในช่วงคายพลังงาน 605 nm

โดยมีชุดควบคุมดังนี้

- ชุดควบคุมบวก
- 1) เซลล์แบคทีเรีย 100 μ l ที่เติม CCCP ซึ่งทำหน้าที่เป็น efflux pump inhibitor, PBS buffer 50 μ l, และ NPN 50 μ l
- ชุดควบคุมลบ
- 1) PBS buffer 200 μ l
 - 2) PBS buffer 150 μ l และ EtBr 50 μ l หรือ pyronin Y 50 μ l
 - 3) PBS buffer 50 μ l, EtBr 50 μ l หรือ pyronin Y 50 μ l, และเซลล์แบคทีเรีย 100 μ l ที่ไม่เติมสารสกัดจากสมุนไพร หรือ CCCP

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในผู้ป่วย เช่น เสมหะ ปัสสาวะจากสายสวน ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง เลือด หนอง เนื้อเยื่อ และบาดแผล จำนวนทั้งหมด 49 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) ได้รับการบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาศึกษาพื้นฐานวิทยาของเชื้อโดยการย้อมสีกรัมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการหมักน้ำตาล lactose บนอาหาร MaConkey agar และทดสอบ catalase test พบว่าลักษณะของเชื้อเมื่อย้อมสีกรัม ดิสสีแดงของ safranin มีรูปร่างกลมรีเล็กน้อย เรียงตัวแบบเดี่ยว อยู่แบบกระจาย กระจายเป็นคู่ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MaConkey agar พบว่าเชื้อเป็นแบคทีเรียกลุ่ม non-lactose fermentation ให้โคโลนีใสไม่มีสี มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ และเชื้อให้ผลบวกกับการทดสอบ catalase test

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion method พบว่า เชื้อมีความสามารถในการดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant) โดยพบว่ามีการดื้อต่อ ampicillin และ cephalothin มากที่สุด และมีการดื้อยาทั้งสองชนิดทุกสายพันธุ์คิดเป็น 100% รองลงมาคือ cefoxitin มีจำนวน 98% ส่วนยาปฏิชีวนะที่ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อคือ colistin ซึ่งเชื้อยังคงไวต่อยา มีจำนวน 98% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2

Clinical specimens of *Acinetobacter baumannii* isolated from Songklanagarind hospital (n=49)

Specimens	Sample of number	Sex	
		Male	Female
Body fluid	8	1	7
Blood	5	2	3
Bile: BFI	1	- ^a	1
Bronchial	1	1	-
CSF	2	2	-
Urine (catheter)	7	2	5
Urine (MSU)	4	2	2
Pus	1	1	-
Tissue	3	1	2
Sputum	15	9	6

^a Not found

ตารางที่ 3

Antimicrobial susceptibility patterns of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* (n=49) from Songklanagarind hospital by standard disc diffusion method

Antibiotics (disc content; µg/disc)	Susceptibility (%)		
	Resistant	Intermediate	Suseptible
Amikacin (30)	64	0	36
Ampicillin (10)	100	0	0
Cefotaxime (30)	77	21	2
Cefoxitin (30)	98	0	2
Ceftazidime (30)	77	2	21
Ceftriaxone (30)	78	22	0
Cefuroxime (30)	89	7	4
Cephalothin (30)	100	0	0
Ciprofloxacin (5)	82	0	18
Colistin (10)	2	0	98
Ertapenem (10)	82	5	13
Gentamicin (10)	69	0	31
Imipenem (10)	74	0	26
Meropenem (10)	73	3	24
Sulperazone (30)	24	27	49
Tazocin (5)	76	4	20

2. ผลการทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของ novobiocin โดยวิธี broth microdilution

ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของ novobiocin ต่อเชื้อ MDR *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 49 สายพันธุ์ และ *A. baumannii* ATCC 19609 สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 1 สายพันธุ์แสดงใน ตารางที่ 4 พบว่าเชื้อ MDR *A. baumannii* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีค่า MIC₅₀ และ ค่า MIC₉₀ เท่ากับ 8 และ 16 µg/ml ตามลำดับ มีค่า MIC range อยู่ในช่วงน้อยกว่า 2 ถึง มากกว่า 64 µg/ml เชื้อจำนวน 1, 14, 21, 8, 2 และ 3 สายพันธุ์ มีค่า MIC เท่ากับ 64, 16, 8, 4, 2 และ <2 µg/ml ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *A. baumannii* ATCC 19606 พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 8 µg/ml เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานนี้จะใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาต่อ novobiocin ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย โดยใช้ความเข้มข้นของ novobiocin ที่ 1/8MIC

ตารางที่ 4

Minimum inhibitory concentration (MIC) of novobiocin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (n=49) and *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

Strains	MIC value (µg/ml)			
	MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range
MDR <i>A. baumannii</i> (n=49)	-	8	16	<2->64
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 (n=1)	8	-	-	-

2. ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสมุนไพร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสมุนไพรไทยทั้ง 51 สารสกัด จากพืช 44 ชนิด ซึ่งเป็นการศึกษาในเชิงคุณภาพ ดังแสดงใน ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีที่ทำการทดสอบ ได้แก่ alkaloids, condensed tannins, flavonoids, hydrolysable tannins, steroids และ triterpenoids พบว่าสมุนไพรที่นำมาทดลองมีองค์ประกอบทางเคมีเป็น alkaloids เป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นจำนวน 78% ของสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด รองลงมาคือ steroids และ condensed tannins มีจำนวน 62% และ 61% ตามลำดับ สำหรับองค์ประกอบทางเคมีที่พบน้อยที่สุดคือ hydrolysable tannins พบเพียง 8%

ตารางที่ 5

Thai medicinal plant species and their phytochemical constituents and antibacterial activity of novobiocin (NOV) (1 µg/ml) in combination with ethanolic extracts (250 µg/ml) against *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

Botanical name	Thai name	Plant part	Phytochemical constituents ^a						% Growth inhibition in the presence of <i>A. baumannii</i> ATCC 19606±SD	
			Alkaloid	Condensed tannin	Flavonoid	Hydrolysable tannin	Steroid	Triterpenoid	Plant extracts	Plant extracts+ NOV
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.	มะตูม	Fruit	+	+	+	-	+	-	22.10±0.68	27.10±1.38
<i>Ardisia colorata</i> Roxb.	พิลังกาสง	Fruit	+	+	-	-	+	-	30.17±2.56	39.00±6.09
<i>Asclepias curassavica</i> L.	ไฟเดือนห้า	Wood	+	+	-	-	-	-	40.81±0.28	43.59±1.78
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	บัวบก	Whole plant	+	-	-	-	+	-	19.09±1.06	23.93±2.87
<i>Cinnamomum bejolghota</i> (Buch.-Ham.) Sweet	สมุลแว้ง	Wood Bark	+	+	-	-	+	-	58.84±1.37 55.62±4.98	59.92±1.78 62.44±2.91
<i>Cinnamomum porrectum</i> (Roxb.) Kosterm.	จวง	Wood Bark	-	-	-	-	+	-	29.72±6.54 56.88±2.14	26.06±5.21 63.31±4.87
<i>Curcuma longa</i> L.	ขมิ้นชัน	Rhizome	+	+	+	-	+	-	86.91±2.64	88.78±2.08

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Botanical name	Thai name	Plant part	Phytochemical constituents ^a						% Growth inhibition in the presence of <i>A. baumannii</i> ATCC 19606±SD	
			Alkaloid	Condensed tannin	Flavonoid	Hydrolysable tannin	Steroid	Triterpenoid	Plant extracts	Plant extracts+NOV
<i>Curcuma zedoaria</i> (Christm.) Roscoe	ขมิ้นอ้อย	Rhizome	+	+	+	-	-	+	77.73±0.48	79.59±2.62
<i>Derris scandens</i> Roxb.Benth.	เถาวัลย์เปรียง	Stem	-	+	-	-	+	-	49.01±2.37	47.31±3.84
<i>Dracaena loureoiri</i> L.	จันทน์แดง	Wood	-	-	-	-	-	+	30.08±0.99	29.49±3.19
<i>Dryopteris syrmatica</i> O.Kze.	เนระพูสี	Stem	+	+	-	-	+	-	17.59±0.41	26.66±5.32
<i>Eleutherine americana</i> Merr.	ว่านหอมแดง	Bulb	+	+	-	-	-	-	17.87±1.89	22.26±3.12
<i>Euphorbia thymifolia</i> L.	น้ำนมราชสีเสือก	Whole plant	-	+	-	-	+	-	53.64±0.90	73.99±0.88
<i>Garcinia mangostana</i> L.	มังคุด	Pericarp	-	-	-	-	-	-	93.25±3.65	90.48±3.37
<i>Gymnopetalum cochinchinensis</i> (Lour.) Kurz	กระดอม	Fruit	-	-	-	-	+	-	26.17±0.59	32.45±4.39

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Botanical name	Thai name	Plant part	Phytochemical constituents ^a						% Growth inhibition in the presence of <i>A. baumannii</i> ATCC 19606±SD	
			Alkaloid	Condensed tannin	Flavonoid	Hydrolysable tannin	Steroid	Triterpenoid	Plant extracts	Plant extracts+NOV
<i>Holarrhena antidysenterica</i> (L.) Wall. ex A. DC.	โมกหลวง	Bark	+	+	-	-	-	+	65.88±0.11	94.04±0.59
<i>Impatiens balsamina</i> L.	เทียนบ้าน	Stem	-	+	-	-	+	-	9.77±0.30	12.40±1.56
<i>Manilkara achras</i> (Mill.) Fosberg	ละมุด	Fruit	+	-	+	-	-	+	56.59±1.02	63.06±2.97
<i>Millingtonia hortensis</i> L.f.	ปีบ	Flower	+	+	+	-	-	-	28.97±4.30	54.08±0.83
<i>Mitragyna speciosa</i> Korth	กระท่อม	Leaf	+	+	-	-	+	-	43.33±2.40	66.15±0.26
<i>Momordica charantia</i> L.	มะระ	Vine	+	-	-	-	+	-	22.26±0.85	25.79±3.10
<i>Morinda citrifolia</i> L.	ขอ	Fruit	+	-	+	-	+	-	16.96±0.63	25.86±1.22
<i>Murdannia loriformis</i> (Hassk.) R.S. Rao & Kammathy	หญ้าปักกิ่ง	Whole plant	+	-	-	-	+	-	16.42±1.51	22.04±1.67

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Botanical name	Thai name	Plant part	Phytochemical constituents ^a						% Growth inhibition in the presence of <i>A. baumannii</i> ATCC 19606±SD	
			Alkaloid	Condensed tannin	Flavonoid	Hydrolysable tannin	Steroid	Triterpenoid	Plant extracts	Plant extracts+NOV
<i>Oroxylum indicum</i> (L.) Jack	เพกา	Leaf	+	+	-	-	+	-	67.18±1.59	71.30±5.28
<i>Peltophorum pterocarpum</i> (DC.) Backer ex. K. Heyne	นนทรี	Flower	+	-	-	-	-	-	42.80±0.43	47.83±4.49
		Bark	+	+	-	-	-	+	78.26±0.60	88.75±6.10
<i>Piper betle</i> L.	พลู	Leaf	-	+	-	-	+	-	42.72±0.13	39.92±3.43
<i>Piper nigrum</i> L.	พริกไทย	Fruit	+	-	-	-	+	-	38.07±1.96	42.24±2.60
		Seed	+	-	-	-	+	-	29.07±0.75	31.47±3.27
<i>Piper retrofractum</i> Vahl	ดีปลี	Fruit	-	-	-	-	+	-	44.02±1.08	49.80±4.19
<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	ชะพลู	Leaf	+	-	-	-	+	-	20.70±0.88	25.02±0.62
<i>Pluchea indica</i> (L.) Less.	ขลุ่	Leaf	+	+	-	-	+	-	26.64±0.97	53.59±3.60
<i>Psidium guajava</i> L.	ฝรั่ง	Leaf	+	+	-	-	+	-	71.24±2.00	81.19±1.50
<i>Punica granatum</i> L.	ทับทิม	Pericarp	+	+	+	-	-	+	72.58±1.20	99.29±0.63

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Botanical name	Thai name	Plant part	Phytochemical constituents ^a						% Growth inhibition in the presence of <i>A. baumannii</i> ATCC 19606±SD	
			Alkaloid	Condensed tannin	Flavonoid	Hydrolysable tannin	Steroid	Triterpenoid	Plant extracts	Plant extracts+Nov
<i>Quercus infectoria</i> G.Olivier	เบญจกานี	Gall	+	-	-	+	-	-	89.09±0.15	88.77±1.00
<i>Quisqualis indica</i> L.	เล็บมือนาง	Flower	+	-	+	+	+	-	79.22±0.28	94.63±2.62
<i>Rhizophora mucronata</i> Lam.	โกงกาง	Fruit	+	+	-	-	-	+	44.64±0.59	53.35±2.56
		Bark	-	+	-	-	-	+	42.68±8.20	53.03±4.95
<i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (Aiton) Hassk	กระทู	Stem	+	+	-	-	-	+	77.01±1.28	81.81±4.01
<i>Sandoricum indicum</i> Cav.	กระท้อน	Root	+	-	-	-	+	-	65.24±1.32	66.94±2.13
<i>Tamarindus indica</i> L.	มะขาม	Leaf	+	+	+	-	+	-	19.76±1.55	25.03±3.45
<i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb.	สมอพิเภก	Fruit	+	-	-	-	+	-	74.79±0.53	95.68±1.14
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	สมอไทย	Fruit	+	+	-	-	-	+	61.25±0.42	94.33±1.95

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Botanical name	Thai name	Plant part	Phytochemical constituents ^a						% Growth inhibition in the presence of <i>A. baumannii</i> ATCC 19606±SD	
			Alkaloid	Condensed tannin	Flavonoid	Hydrolysable tannin	Steroid	Triterpenoid	Plant extracts	Plant extracts+NOV
<i>Terminalia</i> sp.	สมอเทศ	Fruit	+	-	-	+	-	-	79.53±0.24	95.92±1.10
<i>Theobroma cacao</i> L.	โกโก้	Pericarp	+	+	-	-	+	-	17.35±0.74	22.81±0.68
		Seed	-	+	+	-	-	+	19.25±1.08	29.61±4.13
<i>Vitex trifolia</i> L.	คนทีสอ	Leaf	+	+	-	-	+	-	22.12±0.68	28.65±3.57
<i>Xylocarpus granatum</i> J. Koeg.	ตะบูน	Pericarp	+	+	-	-	+	-	52.39±3.48	53.27±1.91
		Fruit	+	+	+	-	-	+	44.27±5.13	54.55±3.66

^a The tests was qualitatively expressed as negative (-) or positive (+)

4. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 44 ชนิด จำนวน 51 สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ความเข้มข้น 250 µg/ml ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19606 สายพันธุ์มาตรฐาน โดยวิธี growth inhibition assay พบว่า สารสกัดจากสมุนไพร 30 สารสกัดมีค่า % growth inhibition น้อยกว่า 50% โดยพบว่าสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19606 คิดเป็นค่า % growth inhibition ในช่วง 0%-25%, >25%-50%, >50%-75%, >75%-90% และ >90% มีจำนวน 13, 17, 13, 7 และ 1 สารสกัด ตามลำดับ สารสกัดที่ยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด ได้แก่ มังคุด (*Garcinia mangostana*) มีค่า % growth inhibition เท่ากับ 93% รองลงมาคือ เบญจกานี (*Quercus infectoria*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เล็บมือนาง (*Quisqualis indica*) และ สมอเทศ (*Terminalia* sp.) มีค่า % growth inhibition เท่ากับ 89, 87, 79 และ 79% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดหยาบจากสมุนไพรส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. baumannii* ATCC 19606 ได้น้อย

5. ผลการศึกษาความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยา (resistant modifying agents; RMAs) ของสารสกัดจากสมุนไพร

ผลการศึกษาสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 44 ชนิด จำนวน 51 สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ความเข้มข้น 250 µg/ml เป็นสารลดการดื้อยาโดยใช้ novobiocin ความเข้มข้น 1 µg/ml (1/8MIC) เป็นต้นแบบในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19606 สายพันธุ์มาตรฐาน โดยวิธี growth inhibition assays แสดงใน ตารางที่ 5

จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19606 คิดเป็นค่า % growth inhibition ในช่วง 0%-25%, >25%-50%, >50%-75%, >75%-90% และ >90% มีจำนวน 4, 21, 13, 6 และ 7 สารสกัด ตามลำดับ

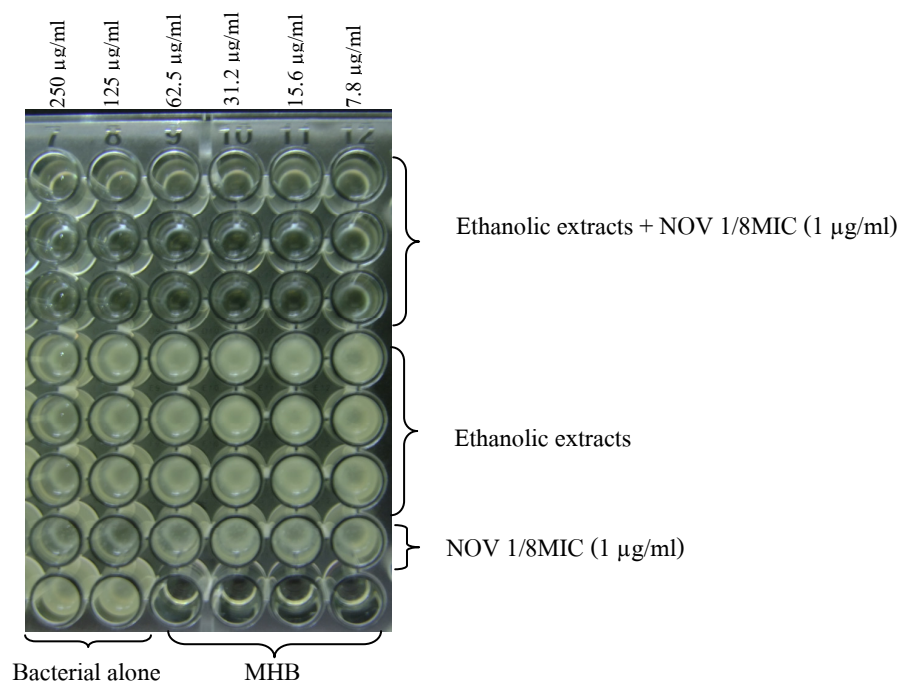
ทำการคัดเลือกสารสกัดจากสมุนไพรที่มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์โดยมีค่า % growth inhibition มากกว่า 90% เมื่อใช้ร่วมกับยา เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อ ได้สารสกัดจากสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ โมกหลวง ทับทิม เล็บมือนาง สมอพิเภก สมอไทย และสมอเทศ โดยมีค่า % growth inhibition เท่ากับ 94, 99, 95, 96, 94 และ 96% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

6. ผลการทดสอบความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาของสารสกัดจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ

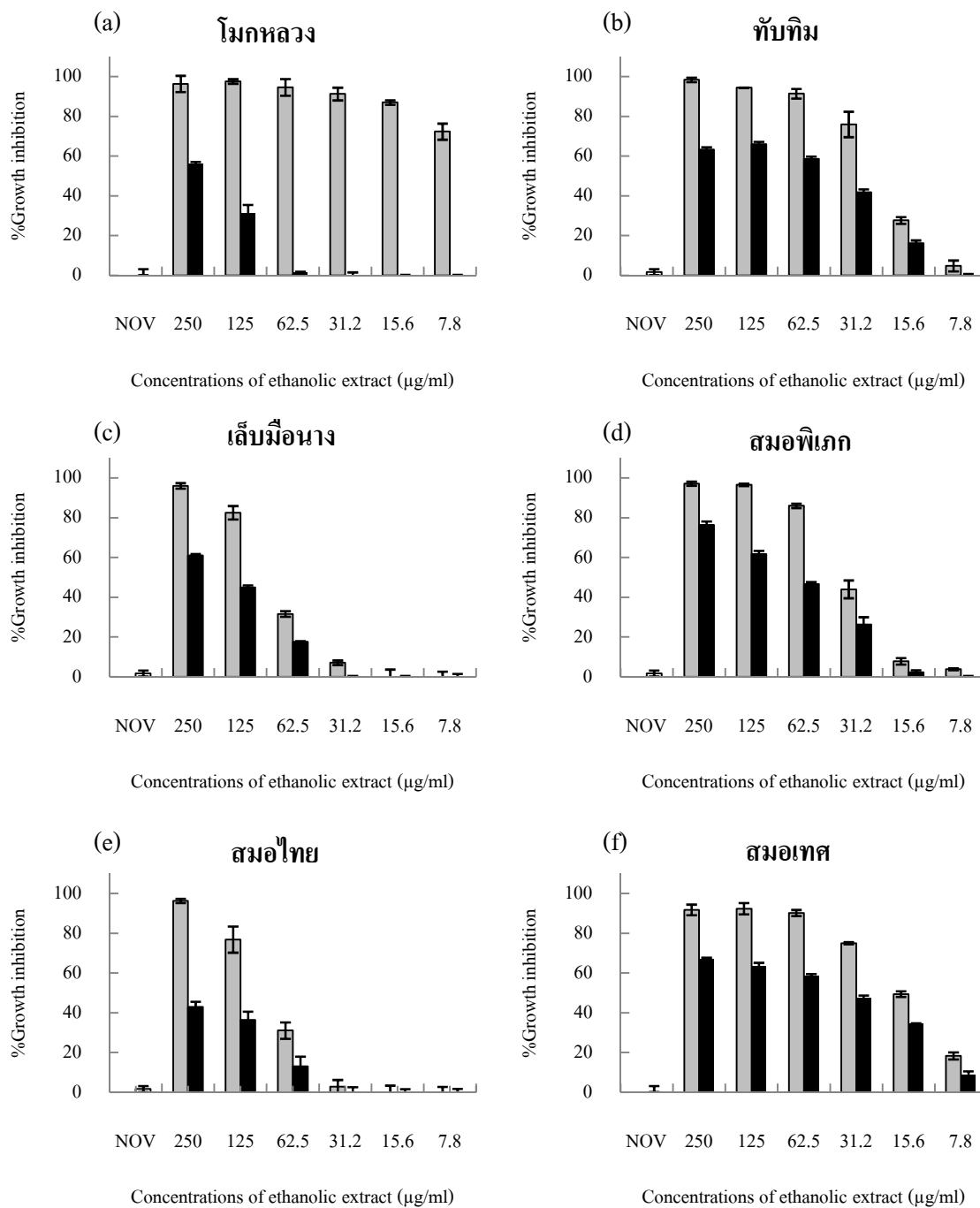
นำสารสกัดที่คัดเลือก 6 ชนิด ได้แก่ โหมกหลวง ทับทิม เล็บมือนาง สมอพิเภก สมอไทย และสมอเทศ มาทำการทดสอบความสามารถในการเป็น RMA's ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 และ 7.8 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ novobiocin 1 $\mu\text{g/ml}$ ในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ATCC 19606 โดยวิธี growth inhibition assays เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการเป็นสารลดการดื้อยา novobiocin (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดมีความสามารถในการเป็น RMA's และพบว่าความสามารถในการเป็น RMA's จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีความสามารถในการเสริมฤทธิ์แตกต่างกัน (รูปที่ 9) โดยพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรความเข้มข้น 250, 125 และ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ ที่มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ novobiocin ที่ค่า % growth inhibition มากกว่า 90% ได้แก่ โหมกหลวง (รูปที่ 9a) ทับทิม (รูปที่ 9b) และสมอเทศ (รูปที่ 9f) สมอพิเภก (รูปที่ 9d) มีค่า % growth inhibition มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 250 และ 125 $\mu\text{g/ml}$ เล็บมือนาง (รูปที่ 9e) และสมอไทย (รูปที่ 9c) มีค่า % growth inhibition มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 250 เท่านั้น

จากการทดสอบพบว่า โหมกหลวงเป็นสารสกัดชนิดเดียวที่มีค่า % growth inhibition มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 31.2 $\mu\text{g/ml}$ และความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจากการทดสอบความสามารถในการเป็น RMA's ของสารสกัดที่ทำการคัดเลือกมา 6 ชนิด พบว่าสารสกัดจากโหมกหลวงมีประสิทธิภาพในการเป็นสารช่วยลดการดื้อยา novobiocin ของ *A. baumannii* ATCC 19606 ได้ดีที่สุด (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 Resistant modifying agents of ethanolic extracts of *Holarrhena antidysenterica* with novobiocin (NOV) on *A. baumannii* ATCC 19606



รูปที่ 9 Percentage of growth inhibition of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 in the presence of novobiocin at 1 µg/ml (white bar), different concentrations of ethanolic extracts (black bar) and novobiocin in combination with the plant extract (gray bar). The plant extracts were *Holarrhena antidysenterica* (a), *Punica granatum* (b), *Quisqualis indica* (c), *Terminalia bellirica* (d), *Terminalia chebula* (e), and *Terminalia* sp. (f)

7. ผลการทดสอบความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาของสารสกัดจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย

การศึกษาความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาของสารสกัดหยาบจากโมกหลวงที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 และ 7.8 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อลดการดื้อยา novobiocin ที่ความเข้มข้น 1/8MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้นกับเชื้อ *A. buamannii* ATCC 19606 และที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1/4MIC ของเชื้อ MDR *A. buamannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 43 สายพันธุ์ที่มีค่า MIC เท่ากับ 4, 8 และ 16 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี growth inhibition assays (ตารางที่ 6, 7)

การใช้สารสกัดจากโมกหลวง ร่วมกับ novobiocin ที่ความเข้มข้น 1/8MIC มีค่า % growth inhibition แตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์ สารสกัดจากโมกหลวงทุกความเข้มข้นมีความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาต่อเชื้อที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่ (ตารางที่ 6) แต่ความสามารถในการเสริมฤทธิ์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง โดยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อคิดเป็นค่าเฉลี่ย % growth inhibition ที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 และ 7.8 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ novobiocin ที่ความเข้มข้น 1/8MIC มีค่าเท่ากับ 70, 45, 34, 27, 25 และ 20% ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากโมกหลวงเพียงอย่างเดียวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 47, 28, 20, 16, 14 และ 9% ตามลำดับ และฤทธิ์ของ novobiocin ที่ 1/8MIC มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9%

การใช้สารสกัดจากโมกหลวง ร่วมกับ novobiocin ที่ความเข้มข้น 1/4 สารสกัดจากโมกหลวงทุกความเข้มข้นมีความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาต่อเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ (ตารางที่ 7) โดยมีค่าเฉลี่ย % growth inhibition ที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 และ 7.8 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ novobiocin ที่ความเข้มข้น 1/4MIC มีค่าเท่ากับ 93, 85, 81, 73, 64 และ 58% ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากโมกหลวงเพียงอย่างเดียวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 47, 28, 20, 16, 14 และ 9% ตามลำดับ และฤทธิ์ของ novobiocin ที่ 1/4MIC มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 27%

จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากหยาบจากโมกหลวงมีความสามารถในการเป็น RMA's เมื่อใช้ร่วมกับ novobiocin ที่ความเข้มข้น 1/4MIC ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 1/8MIC โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ค่ามากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 และ 7.8 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 33, 29, 23, 18, 14 และ 14 สายพันธุ์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6

Growth inhibition of ethaolic extract of *Holarrhena antidysenterica* and novobiocin (1/8MIC) against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (n=43)

% Growth inhibition	Number of clinical isolate						Novbiocin
	Concentrations of ethanolic extract (µg/ml)						
	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	
0-25	0 ^a /2 ^b	2/12	16/39	30/41	32/41	35/42	40
>25-50	8/25	32/30	22/3	8/0	1/0	2/1	1
>50-75	16/14	3/0	0/1	1/1	½	2/0	1
>75-90	11/2	3/1	3/1	3/1	1/0	1/0	1
>90	8/0	3/0	2/0	1/0	1/0	0/0	0

^a The effect of ethanolic extract and 1/8MIC of novobiocin

^b The effect of ethanolic extract

ตารางที่ 7

Growth inhibition of ethaolic extract of *Holarrhena antidysenterica* and novobiocin (1/4MIC) against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (n=43)

% Growth inhibition	Number of clinical isolate						Novbiocin
	Concentrations of ethanolic extract (µg/ml)						
	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	
0-25	0 ^a /2 ^b	0/12	0/39	4/41	6/41	11/42	28
>25-50	0/25	6/30	9/3	5/0	12/0	9/1	5
>50-75	4/14	4/0	3/1	9/1	6/2	6/0	5
>75-90	6/2	4/1	8/1	7/1	5/0	2/0	5
>90	34/0	29/0	23/0	18/0	14/0	15/0	0

^a The effect of ethanolic extract and 1/4MIC of novobiocin

^b The effect of ethanolic extract

8. ผลการทดสอบการลดการดื้อยาจากฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงของ outer membrane permeability

การศึกษาผลของการลดการดื้อยาจากฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากโสมหลวงต่อการเปลี่ยนแปลง outer membrane permeability ของ MDR *A. baumannii* ATCC 19606 และ MDR *A. baumannii* NPRC AB026 ที่ได้จากการสุ่มเลือกจากเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอัตราการดื้อต่อ novobiocin สูง (MIC = 16 µg/ml) โดยวิธี NPN uptake assays (รูปที่ 10)

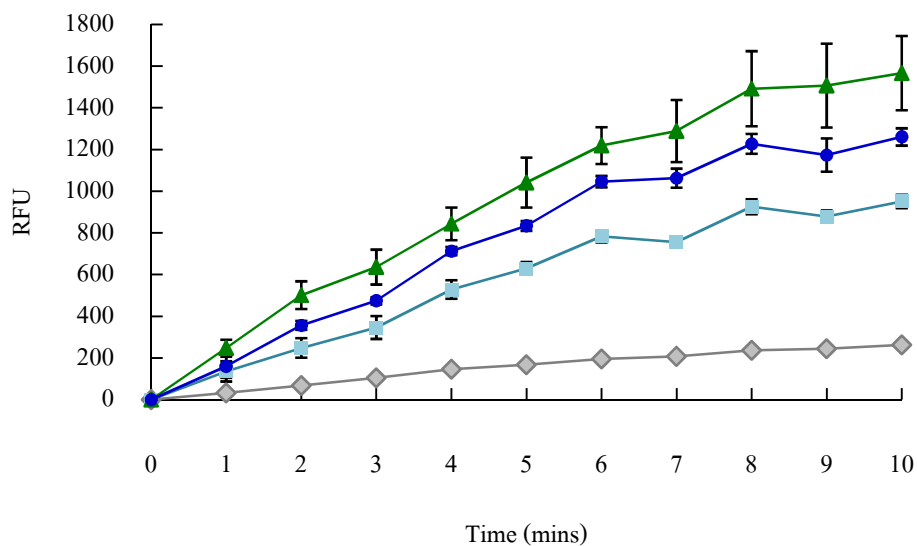
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากโสมหลวงที่ความเข้มข้น 15.6 µg/ml สามารถเพิ่มการสะสมสี NPN บริเวณ outer membrane ได้ดีกว่าชุดควบคุม และชุดทดสอบที่เติมสาร EDTA ซึ่งทำหน้าที่เป็น permeabilizer ความเข้มข้น 20 µM ใน *A. baumannii* ATCC 19606 และที่ความเข้มข้น 50 µM ใน *A. baumannii* NPRC AB026 ภายในระยะเวลา 10 นาที สารสกัดจากโสมหลวงสามารถเพิ่มการสะสมสีภายในเซลล์ได้มากกว่า EDTA โดยพบว่าสารสกัดจากโสมหลวงสามารถเพิ่มการสะสมสี NPN ภายในเซลล์ *A. baumannii* ATCC 19606 มากกว่าชุดควบคุมประมาณสองเท่า (รูปที่ 10a) และสามารถเพิ่มการสะสมสีภายในเซลล์ *A. baumannii* NPRC AB026 ได้มากกว่าสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารลดการดื้อยา (รูปที่ 10b)

9. ผลการทดสอบการลดการดื้อยาจากฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงของ efflux pump

การศึกษาผลของการลดการดื้อยาจากฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากโสมหลวงต่อการเปลี่ยนแปลง efflux pump ของ MDR *A. baumannii* ATCC 19606 และ MDR *A. baumannii* NPRC AB026 โดยวิธี whole cell accumulation assays ด้วยสี EtBr (รูปที่ 11)

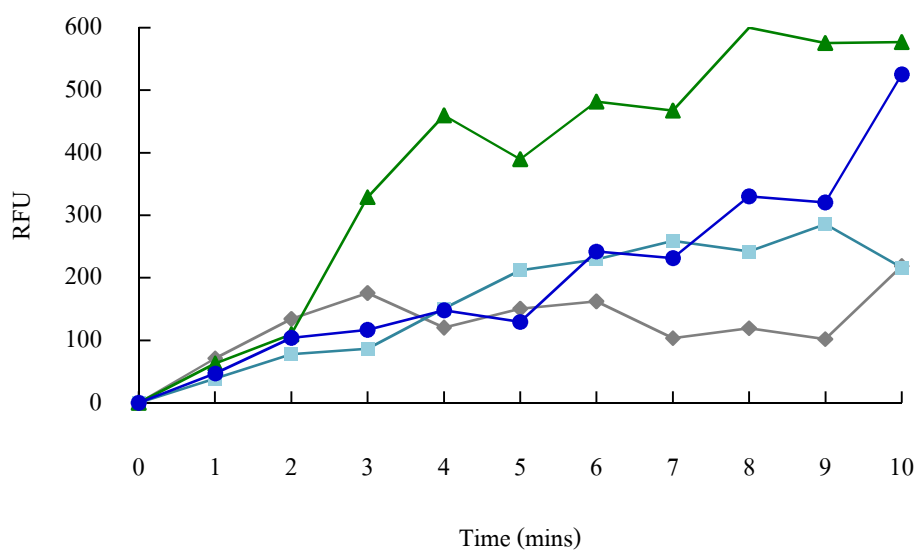
จากการทดสอบสารสกัดจากโสมหลวงที่ความเข้มข้น 15.6 µg/ml ต่อการเพิ่มการสะสมสี EtBr ภายในเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และชุดทดสอบที่เติมสาร CCCP ซึ่งทำหน้าที่เป็น EPI ความเข้มข้น 20 µM ใน *A. baumannii* ATCC 19606 และที่ความเข้มข้น 50 µM ใน *A. baumannii* NPRC AB026 ภายในระยะเวลา 10 นาที พบว่าสารสกัดจากโสมหลวงไม่มีความสามารถในการเพิ่มการสะสมสีภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่เติม EPI ทั้งสองสายพันธุ์ (รูปที่ 11a, b) เนื่องจากค่า relative fluorescence units (RFU) ของการทดสอบด้วยสารสกัดจากโสมหลวงมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสาร EPI

(a)



—◆— PBS —■— Cells —▲— Cells + ethanolic extract —●— Cells + EDTA (20 µM)

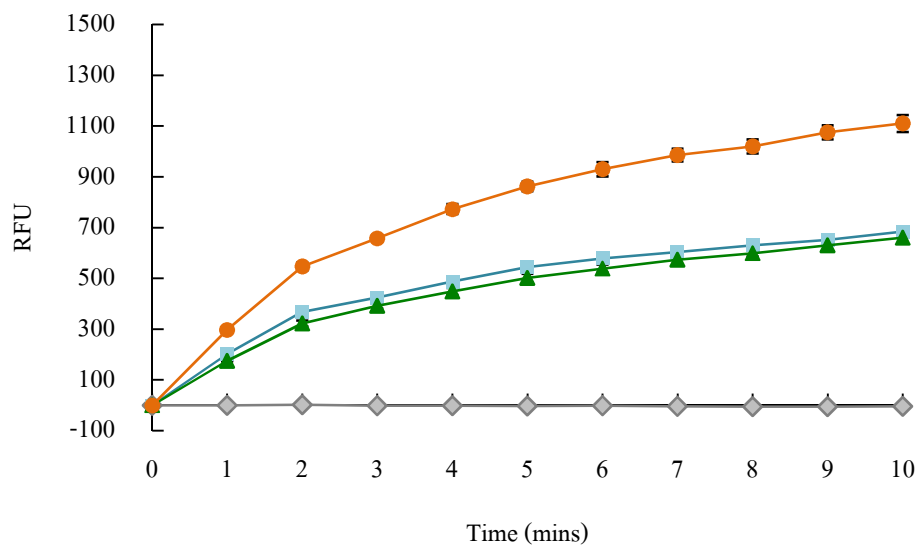
(b)



—◆— PBS —■— Cells —▲— Cells + ethanolic extract —●— Cells + EDTA (50 µM)

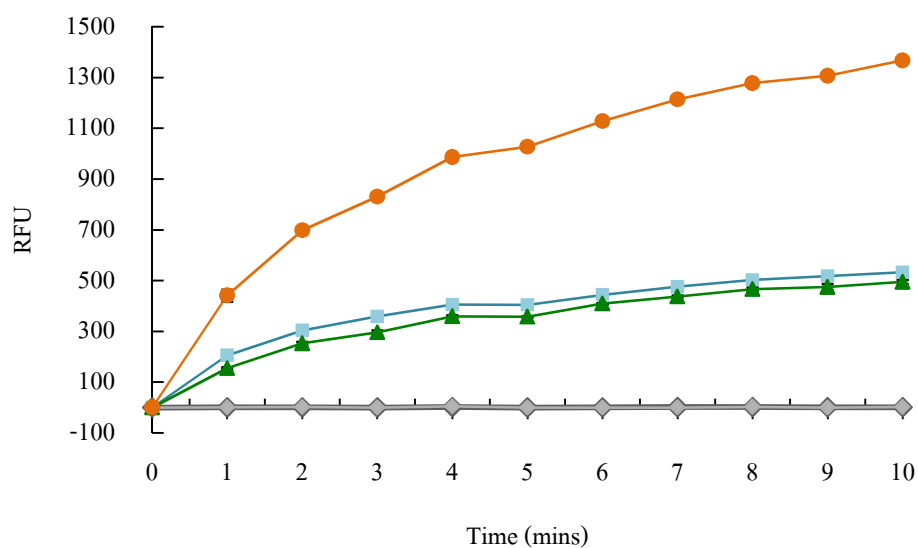
Figure 10 Effect of resistant modifying agents on bacterial outer membranes as measured by relative fluorescence units (RFU). Uptake of NPN by *A. baumannii* ATCC 19606 (a) and *A. baumannii* NPRC AB026 (b) after treated with EDTA and ethanolic extract of *Holarrhena antidysenterica* (15.6 µg/ml)

(a)



—◆— PBS —■— Cells —▲— Cells + ethanolic extract —●— Cells + CCCP (20 µM)

(b)



—◆— PBS —■— Cells —▲— Cells + ethanolic extract —●— Cells + CCCP (50 µM)

รูปที่ 11 *A. buamannii* ATCC 19606 (a) and *A. buamannii* NPRC AB026 (b) cells were loaded with EtBr in the presence of CCCP and ethanolic extract of *Holarrhena antidysenterica* (15.6 µg/ml). Changes of EtBr fluorescence were monitored as a function of time to determine in effect of the test compound on EtBr efflux

บทที่ 4

วิจารณ์

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียกลุ่ม non-lactose-fermenting Gram-negative pathogens เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital-acquired infection) (Gaynes and Edwards, 2005) มีรายงานว่าพบอัตราการตายของผู้ป่วยจากการติดเชื้อ *A. baumannii* ในกระแสเลือด 52% และโรคปอดอักเสบ 23-73% (Jain and Danziger, 2004) จากการศึกษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ในกระแสเลือด ในประเทศอังกฤษพบว่ามักเกิดการติดเชื้อในผู้ใหญ่อายุระหว่าง 45- >65 ปี มากกว่าติดเชื้อในเด็กที่อายุต่ำกว่า 15 ปี โดยพบการติดเชื้อในผู้ป่วยอายุมากกว่า 65 ปี มากที่สุด ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อ ได้แก่ การใช้อุปกรณ์สายสวนเข้าสู่ร่างกาย เช่น ventilator และ cannula การใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างและการเข้าพักรักษาตัวในหน่วย ICU เช่น neonatal ICUs (Cisneros and Rodriguez-Bano, 2002) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมีอายุระหว่าง 30-75 ปี พบการติดเชื้อในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ตรวจพบเชื้อในสิ่งส่งตรวจหลายชนิด เช่น เสมหะ ปัสสาวะ ปัสสาวะจากสายสวน เลือด น้ำไขสันหลัง และเนื้อเยื่อ โดยพบในเสมหะมากที่สุด รองลงมาคือในปัสสาวะที่เก็บจากสายสวน (ตารางที่ 2)

เชื้อที่พบทุกสายพันธุ์เป็น MDR *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด colistin เป็นยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวที่ยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อส่วนใหญ่ (98%) (ตารางที่ 3) แต่เนื่องจาก colistin เป็นพิษต่อไต (Neonakis *et al.* 2011) ทำให้กลายเป็นยาตัวเลือกสุดท้ายที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาเมื่อยาที่เป็นพิษน้อยกว่าไม่สามารถใช้รักษาได้ ถึงแม้ว่า colistin จะมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* แต่ยังพบรายงานเกี่ยวกับการดื้อต่อ colistin กลไกการดื้อยาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับ outer layer ของเชื้อแบคทีเรีย เช่น มี lipopolysaccharides และโปรตีนจำเพาะบริเวณ outer membrane ลดลง การลดลงของไขมัน และการลดลงของ Mg^{+2} และ Ca^{+2} บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Young *et al.*, 1992; Maviglia *et al.*, 2009; Mortensen *et al.*, 2009) มีรายงานการพบ polymyxin B-resistant *A. baumannii* 2.7% และ 1.7% ทางตอนเหนือของยุโรปและประเทศแถบละตินอเมริกา (Gales *et al.*, 2006) และพบรายงานการดื้อยา colistin 3% จากหน่วย ICU ประเทศกรีซ (Souli *et al.*, 2006) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบการดื้อต่อ colistin 2% ของตัวอย่างทดสอบ (ตารางที่ 3) ในโรงพยาบาล 2 แห่งทางตอนใต้ของประเทศเกาหลี พบการ

คือต่อ colistin สูงถึง 27.9% จาก *A. baumannii* 214 สายพันธุ์ (Ko *et al.*, 2007) ดังนั้นในอนาคตเชื่อว่าจะมีการพัฒนาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น และยากลุ่ม polymyxin รวมถึงยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นอาจไม่สามารถใช้ในการยับยั้ง *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาได้ทั้งหมด

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากให้ความสนใจและทำการทดลองเกี่ยวกับการใช้สารจากพืชในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ รายงานการวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าสารจากพืชมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Nikaido, 1999; Zgurskaya and Nikaido, 1999) จากผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัด 51 สารสกัดที่นำมาทดสอบกับ *A. baumannii* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบว่ามีสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโดยตรงน้อย มีสารสกัดจากมังคุดเพียงชนิดเดียวที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. baumannii* ATCC 19606 ได้มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ได้นั้นจึงมีค่ามากกว่า 250 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้สารสกัดที่ทำการศึกษานี้ไม่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อเป็นสารฆ่าเชื้อโดยตรงได้

เมื่อแบคทีเรียมีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นนักวิจัยจำนวนมากเริ่มให้ความสนใจและทำการศึกษา secondary metabolites จากพืชในการเป็นสารลดการดื้อยา มีงานวิจัยที่น่าสนใจซึ่งเกี่ยวข้องกับสารลดการดื้อยา ได้แก่ การใช้ berberine ซึ่งเป็นสาร alkaloid จากพืชกลุ่ม berberry มีความสามารถในการรบกวนการทำงานของ DNA แต่เนื่องจากสารดังกล่าวไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่เมื่อใช้ร่วมกับ 5'-methoxyhydronecarpin ที่แยกได้จากพืชชนิดเดียวกันและมีความสามารถเป็นสารยับยั้ง efflux pump เมื่อนำมาใช้ร่วมกับ berberine ทำให้สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Stermitz *et al.*, 2000) ดังนั้นนักวิจัยจึงให้ความสนใจในการใช้สารเหล่านี้เป็นสารลดการดื้อยาแทนการออกฤทธิ์โดยตรงจากการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารในการยับยั้งเชื้อ มีรายงานต่อมาอีกหลายชิ้นเกี่ยวกับการใช้สารจากพืชสมุนไพรในการเป็นสารลดการดื้อยาหลายงานวิจัย เช่นการใช้สาร catechin จากชาพร้อมกับ oxacillin ยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Takahashi *et al.*, 1995) การใช้ epigallocatechin gallate ร่วมกับ ampicillin/sulbactam ยับยั้งเชื้อ methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) โดยการเข้าจับกับเอนไซม์ β -lactamase (Hu *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถในการเป็นสารช่วยลดการดื้อยาในสารสกัดหยาบ (crude extract) จากพืช เช่นการใช้สารสกัดจากชาเขียวร่วมกับ levofloxacin ยับยั้ง *E. coli* 0157 (Isogai *et al.*, 2001) การใช้ aqueous crude khat extract ร่วมกับ tetracycline ยับยั้ง *Streptococcus sanguis* และ *Fusobacterium nucleatum* (Al-hebshi *et al.*, 2006) งานวิจัยส่วนใหญ่จะทำการศึกษารสสกัดจากพืชทั้งสารบริสุทธิ์และสารสกัดหยาบในการเสริมฤทธิ์ให้แก่ยา

ปฏิชีวนะในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แต่ยังมีการศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรในการเป็นสารลดการดื้อยาในแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

Novobicin เป็น hydrophobic drug ที่ไม่สามารถใช้ในการรักษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นผลมาจาก outer membrane ซึ่งมีสถานะเป็น hydrophilic ทำให้ยาไม่สามารถแทรกผ่านไปได้ (Khalil *et al.*, 2008) การศึกษาครั้งนี้จึงนำสารสกัดหยาบจากพืชจำนวน 44 ชนิด 51 สารสกัด จากส่วนต่าง ๆ ของพืชมาทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยา novobiocin ของเชื้อ *A. baumannii* และพบว่าค่า MIC ของ novobiocin ต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 49 สายพันธุ์ มีค่า MIC อยู่ระหว่าง <2 ถึง >64 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อจำนวน 21, 14, และ 1 สายพันธุ์มีค่า MIC เท่ากับ 8, 16, และ >64 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC breakpoint ของเชื้อ staphylococci ซึ่งมีความไวต่อยาอยู่ที่ความเข้มข้น <4 $\mu\text{g/ml}$ และคือต่อยาที่ความเข้มข้น >8 $\mu\text{g/ml}$ (Thornsberry *et al.*, 1997) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่ทำการทดสอบส่วนใหญ่คือต่อยา novobiocin มีการศึกษาการใช้สารจากธรรมชาติชนิดต่าง ๆ ร่วมกับ novobiocin ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดย Palaniappan และ Holley (2010) ได้ทำการศึกษาสารจากธรรมชาติได้แก่ eugenol, thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, และ allyl isothiocyanate ในลดการดื้อยา novobiocin ต่อเชื้อ *Salmonella Typhimurium* SGI 1 และ *E. coli* N00 666 ที่มีค่า MIC เท่ากับ 256 $\mu\text{g/ml}$ และ 64 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดจากธรรมชาติทั้งหมดสามารถลดค่า MIC ได้ 4-8 เท่าของค่า MIC ปกติ ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ เป็นสารลดการดื้อยา novobiocin สารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิดมาสามารถลดการดื้อยา novobiocin ได้ 8 เท่าของค่า MIC ปกติ สารสกัดจากโมกหลวง ทับทิม เล็บมือนาง สมอพิเภก สมอไทย และสมอเทศ เป็นสมุนไพรที่สามารถลดการดื้อยา novobiocin ได้ดีที่สุดจากสารสกัดจากสมุนไพรทั้งหมด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ATCC 19606 ได้มากกว่า 90% ในขณะที่ Deepak และคณะ (2010) ทำการศึกษาสารสกัดจากสมอไทย (*Terminalia chebula*) ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ในการลดการดื้อยา cefotaxime ต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วย พบว่าสารสกัดจากสมอไทยสามารถลดการดื้อยาได้ 8 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 14 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถลดค่า MIC ได้ระหว่าง 2-4 เท่า

เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดต่อการเสริมฤทธิ์ novobiocin ที่ความเข้มข้น 1/8MIC ในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ATCC 19606 พบว่า โมกหลวงเป็นสารสกัดเพียงชนิดเดียวที่ยังคงมีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ novobiocin ได้ดีโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. baumannii* ATCC 19606 ได้มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 31.2

$\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ฤทธิ์จาก novobiocin หรือจากสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวเพียงชนิดเดียวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารลดการดื้อยา novobiocin ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $1/8\text{MIC}$ กับ MDR *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยกับสารสกัดจากโมกหลวงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสารสกัดยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแต่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้น้อย และมีฤทธิ์น้อยลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดน้อยลง ในบางสายพันธุ์ที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสารสกัดไม่มีฤทธิ์ในการเป็นสารลดการดื้อยา หลังจากนั้นเมื่อทำการทดสอบอีกครั้งที่ความเข้มข้นของ novobiocin เท่ากับ $1/4\text{MIC}$ สารสกัดจากโมกหลวงสามารถลดการดื้อยา novobiocin ใน MDR *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยได้สูงเกือบทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อที่นำมาทดสอบเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด มีกลไกการดื้อยาหลายกลไกซึ่งทำงานร่วมกัน เช่น การลดลงของ permeability และการขับยาออกโดย efflux pump โดยเฉพาะ efflux pump ชนิด MFS, RND, และ MATE family ที่มีการแสดงออกใน *A. baumannii* (Vila *et al.*, 2007) นอกจากนี้ novobiocin ยังเป็น substrate ของ efflux pump ชนิด MFS ในแบคทีเรียกรัมลบ (Piddock, 2006b) และ RND efflux pump ชนิด AdeIJK ใน *A. baumannii* (Damier-Piolle *et al.*, 2008) ทำให้ที่ความเข้มข้นของยาต่ำ เชื้อจึงสามารถขับยาปฏิชีวนะออกและลดความเสียหายต่อเซลล์

จากการทดลองผลของสารสกัดจากโมกหลวงต่อกลไกการดื้อยาเกี่ยวกับ permeability และ efflux pump ของ *A. baumannii* ATCC 19606 และ *A. baumannii* NPRC AB026 พบว่า สารสกัดจากโมกหลวงที่ความเข้มข้น $15.6\ \mu\text{g/ml}$ สามารถเพิ่มการสะสมสี NPN บริเวณ outer membrane เช่นเดียวกับ EDTA ซึ่งทำหน้าที่เป็น permeabilizer ในขณะที่เชื้อไม่สามารถเพิ่มการสะสมสี EtBr ภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับ CCCP ซึ่งทำหน้าที่เป็น EPI ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เนื่องจาก *A. baumannii* สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ efflux pump ชนิด AdeABC เมื่อเติมสาร CCCP ที่ทำหน้าที่เป็น EPI ร่วมกับ meropenem สามารถลดค่า MIC ส่วนใหญ่ได้ 4-16 เท่าของ MIC ของ meropenem (Huang *et al.*, 2008) นอกจากนี้ EtBr ยังเป็น substrate ของ efflux pump ใน RND family (Vila *et al.*, 2007) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากโมกหลวงไม่ได้ทำหน้าที่เป็น EPI ในการลดการดื้อยาของ *A. baumannii* แต่อาจทำหน้าที่เป็น permeabilizer ในการยับยั้งการนำเข้าของยาปฏิชีวนะ จากการทดสอบทางพิษเคมีเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากโมกหลวงมี alkaloids, condensed tannins และ triterpenoid เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารประกอบ tannin มีคุณสมบัติคล้ายกับ EDTA โดยการรบกวนประจุบริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรีย (Kell, 2009)

บทที่ 5

สรุป

1. สารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 30 สารสกัดจากสมุนไพรทั้งหมด 51 สารสกัด มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 ได้น้อยกว่า 50%

2. สารสกัดหยาบจากโมกหลวง (*Holarrhena antidysenterica*) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 250-7.8 $\mu\text{g/ml}$ มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ยา novobiocin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 1/8MIC ได้ดีที่สุดที่สุดจากสมุนไพรทั้งหมด 51 สารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

3. สารสกัดหยาบจากโมกหลวงที่ความเข้มข้นระหว่าง 250-7.8 $\mu\text{g/ml}$ มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ยา novobiocin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 1/4MIC ได้ดีในการยับยั้ง multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 43 สายพันธุ์

4. สารสกัดหยาบจากโมกหลวงมีกลไกในการเสริมฤทธิ์ยาโดยทำหน้าที่คล้ายกับสาร EDTA ที่มีคุณสมบัติในการเป็น permeabilizer ในการเพิ่มการสะสมสี NPN บริเวณ outer membrane แต่ไม่สามารถเพิ่มการสะสมสี EtBr ภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับสาร CCCP ที่มีคุณสมบัติเป็น EPI

5. จากการทดสอบทางพิษเคมีเบื้องต้น สารสกัดหยาบจากโมกหลวงมีสารกลุ่ม alkaloids, condensed tannins และ triterpenoids เป็นองค์ประกอบ

รายการเอกสารอ้างอิง

- พยงค์ เทพอักษร. 2547. เกษัชวิทยา 2 (Pharmacology 2). พิมพ์ครั้งที่ 2. ประชุมช่าง: กรุงเทพฯ
- Alexander, C., Rietschel, E. T. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 7: 167-202.
- Al-hebshi, N., Al-haroni, M., Skaug, N. 2006. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 51: 183-8.
- Ahmad, I., Beg, A. Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol.* 74: 113-23.
- Anon. 2010. Prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Japan. *Infect Agents Surveill Rep.* 31:201-02. <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/31/365/dj3657.html> (accessed 10 September 2010).
- Apisarnthanarak, A., Mundy, L. M. 2009. Mortality associated with Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in Thailand. *Am J Infect Control.* 37: 519-20.
- Arathoon, E. G., Hamilton, J. R., Hench, C. E., Stevens, D. A. 1990. Efficacy of short courses of oral novobiocin-rifampin in eradicating carrier state of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and in vitro killing studies of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 1655-9.
- Ball, A. R., Casadei, G., Samosorn, S., Bremner, J. B., Ausubel, F. M., Moy, T. I., Lewis, K. 2006. Conjugating berberine to a multidrug efflux pump inhibitor creates an effective antimicrobial. *ACS Chem Biol.* 1: 594-600.

- Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chaslus-Dancla, E., Cloeckaert, A. 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 3729-35.
- Berger, J. M., Wang, J. C. 1996. Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* 6: 84-90.
- Bernard, F. X., Sable, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J. F., Crouzet, J., Blanche, F. 1997. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 992-8.
- Blair, J. M., Piddock, L. J. 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol.* 12: 512-9.
- Bos, M. P., Tommassen, J. 2004. Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol.* 7: 610-6.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 48: 1-12.
- Brade, H., Opal, S.M., Vogel, S.N., Membrane, D.C., 1999. In: Morrison (Ed.), *Endotoxin in Health and Disease*. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. pp. 31–38.
- Bratu, S., Landman, D., Martin, D. A., Georgescu, C., Quale, J. 2008. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2999-3005.

- Brauers, J., Frank, U., Kresken, M., Rodloff, A. C., Seifert, H. 2005. Activities of various beta-lactams and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clin Microbiol Infect.* 11: 24-30.
- Bush, K. 1998. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis.* 27 Suppl 1: S48-53.
- Bush, K. 2002. The impact of beta-lactamases on the development of novel antimicrobial agents. *Curr Opin Investig Drugs.* 3: 1284-90.
- Carey, R.B., Banerjee, S.N., Srinivasan, A. 2006. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections, 1995-2004. Presented at the 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, September 27–30.
- Chaibi, E. B., Sirot, D., Paul, G., Labia, R. 1999. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother.* 43: 447-58.
- Charnot-Katsikas, A., Dorafshar, A. H., Aycock, J. K., David, M. Z., Weber, S. G., Frank, K. M. 2009. Two cases of necrotizing fasciitis due to *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 47: 258-63.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. *Acinetobacter baumannii*. CDC, No. 954-0041 (Rev. 06/06) MS
- Chaiwarith, R., Mahatthanphak, S., Boonchoo, M., Supparatpinyo, K., Sirisanthana, T. 2005. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at Maharai Nakorn Chiang Mai Hospital. *J Infect Dis Antimicrob Agent.* 22: 1-8

- Chopra, I., Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65: 232-60 ; second page, table of contents.
- Chusri, S., Villanueva, I., Voravuthikunchai, S. P., Davies, J. 2009. Enhancing antibiotic activity: a strategy to control *Acinetobacter* infections. *J Antimicrob Chemother.* 64: 1203-11.
- Clinical Infectious Diseases (CID). 2011. Police investigation into multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in Japan. Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. 52(3): 422
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S18-S19.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, Ninth edition, CLSI Document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Cisneros, J. M., Rodriguez-Bano, J. 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect.* 8: 687-93.
- Corbett, K. D., Shultzaberger, R. K., Berger, J. M. 2004. The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 7293-8.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Bremont, S., Lambert, T., Courvalin, P. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 557-62.

- de Breij, A., Gaddy, J., van der Meer, J., Koning, R., Koster, A., van den Broek, P., Actis, L., Nibbering, P., Dijkshoorn, L. 2009. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol.* 160: 213-8.
- Deepak, S., Kamat, S.D., Kamat, D.V. 2010. Effect of aqueous extract of *Terminalia chebula* on metallobeta lactamase. *Int J Pharm Pharm Sci.* Vol2, Suppl 4, 2010. ISSN-0975-1491.
- Dorsey, D. 2011. Determination that albamycin (novobiocin sodium) capsule, 250 milligrams, was withdraw from sale for reasons of safety or effectiveness. Acting Deputy Commissioner for Policy. Vol. 76, No. 12/Wednesday, January 19, 2011/Notices
- Dupont, M., Pages, J. M., Lafitte, D., Siroy, A., Bollet, C. 2005. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 4: 2386-90.
- Eaves, D. J., Ricci, V., Piddock, L. J. 2004. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 1145-50.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., Spratt, B. G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 7687-92.
- Erridge, C., Moncayo-Nieto, O. L., Morgan, R., Young, M., Poxton, I. R. 2007. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol.* 56: 165-71.
- Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M. K., Hughes, C., Koronakis, V. 2004. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol.* 14: 741-7.

- Falagas, M. E., Kasiakou, S. K. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 40: 1333-41.
- Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C., Thompson, N. H. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 1763-8.
- Fournier, P. E., Richet, H. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis.* 42: 692-9.
- Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J. M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2: e7.
- Gaddy, J. A., Actis, L. A. 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* 4: 273-8.
- Gales, A. C., Jones, R. N., Sader, H. S. 2006. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect.* 12: 315-21.
- Garnacho-Montero, J., Ortiz-Leyba, C., Fernandez-Hinojosa, E., Aldabo-Pallas, T., Cayuela, A., Marquez-Vacaro, J. A., Garcia-Curiel, A., Jimenez-Jimenez, F. J. 2005. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med.* 31: 649-55.

- Garnacho-Montero, J., Ortiz-Leyba, C., Jimenez-Jimenez, F. J., Barrero-Almodovar, A. E., Garcia-Garmendia, J. L., Bernabeu-Wittel, I. M., Gallego-Lara, S. L., Madrazo-Osuna, J. 2003. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis.* 36: 1111-8.
- Garvey, M. I., Piddock, L. J. 2008. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 1677-85.
- Gaynes, R., Edwards, J. R. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 41: 848-54.
- Getchell-White, S.I., Donowitz, L.G., Groschel, D.H. 1989. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 10:402-7.
- Gibbons, S., Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W. 2003a. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 51: 13-7.
- Gibbons, S., Oluwatuyi, M., Veitch, N. C., Gray, A. I. 2003b. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Phytochemistry.* 62: 83-7.
- Gibbons, S., Udo, E. E. 2000. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. *Phytother Res.* 14: 139-40.
- Gordon, N. C., Wareham, D. W. 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 35: 219-26.

- Gould, I. M. 2008. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 32 Suppl 1: S2-9.
- Gribun, A., Nitzan, Y., Pechatnikov, I., Hershkovits, G., Katcoff, D. J. 2003. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol*. 47: 434-43.
- Griep, M. A., Blood, S., Larson, M. A., Koepsell, S. A., Hinrichs, S. H. 2007. Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. *Bioorg Med Chem*. 15: 7203-8.
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J. M., Olsen, J. E., Dalsgaard, A. 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol*. 49: 929-36.
- Hawley, J. S., Murray, C. K., Griffith, M. E., McElmeel, M. L., Fulcher, L. C., Hospenthal, D. R., Jorgensen, J. H. 2007. Susceptibility of acinetobacter strains isolated from deployed U.S. military personnel. *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 376-8.
- Hegde, V. R., Pu, H., Patel, M., Black, T., Soriano, A., Zhao, W., Gullo, V. P., Chan, T. M. 2004. Two new bacterial DNA primase inhibitors from the plant *Polygonum cuspidatum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 14: 2275-7.
- Heide, L. 2009. Genetic engineering of antibiotic biosynthesis for the generation of new aminocoumarins. *Biotechnol Adv*. 27: 1006-14.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem*. 46: 3590–3595.

- Helander, I. M., Mattila-Sandholm, T. 2000. Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. *J Appl Microbiol.* 88: 213-9.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., Doble, M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* 15: 639-52.
- Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., Seifert, H. 2004a. In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 1586-92.
- Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., Seifert, H. 2004b. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 54: 821-3.
- Ho, P. L., Ho, A. Y., Chow, K. H., Cheng, V. C. 2010. Surveillance for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a lesson on definitions. *Int J Antimicrob Agents.* 36: 469-71.
- Hoeksema, H., Smith, C. G. 1961. Novobiocin. *Prog Ind Microbiol.* 3: 91-139.
- Houghton, P.J. and Raman, A. 1998. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. London: Chapman and Hall
- Holloway, K. P., Roupael, N. G., Wells, J. B., King, M. D., Blumberg, H. M. 2006. Polymyxin B and doxycycline use in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the intensive care unit. *Ann Pharmacother.* 40: 1939-45.
- Hong, H., Patel, D. R., Tamm, L. K., van den Berg, B. 2006. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J Biol Chem.* 281: 7568-77.

- Hu, Z. Q., Zhao, W. H., Asano, N., Yoda, Y., Hara, Y., Shimamura, T. 2002. Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 558-60.
- Hu, Z. Q., Zhao, W. H., Hara, Y., Shimamura, T. 2001. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 48: 361-4.
- Huang, L., Sun, L., Xu, G., Xia, T. 2008. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 62: 326-32.
- Ikonomidis, A., Pournaras, S., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., Tsakris, A. 2006. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 28: 376-7.
- Isogai, E., Isogai, H., Hirose, K., Hayashi, S., Oguma, K. 2001. In vivo synergy between green tea extract and levofloxacin against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. *Curr Microbiol.* 42: 248-51.
- Jain, R., Danziger, L. H. 2004. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann Pharmacother.* 38: 1449-59.
- Jawad, A., Snelling, A. M., Heritage, J., Hawkey, P. M. 1998. Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. *J Hosp Infect.* 39: 235-40.
- Jones, A., Morgan, D., Walsh, A., Turton, J., Livermore, D., Pitt, T., Green, A., Gill, M., Mortiboy, D. 2006a. Importation of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp infections with casualties from Iraq. *Lancet Infect Dis.* 6: 317-8.

- Jones, R. N., Deshpande, L., Fritsche, T. R., Sader, H. S. 2004. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 49: 211-6.
- Jones, R. N., Sader, H. S., Fritsche, T. R., Rhomberg, P. R. 2006b. Carbapenem susceptibility discords among *Acinetobacter* isolates. *Clin Infect Dis.* 42: 158.
- Kallel, H., Bahloul, M., Hergafi, L., Akrouf, M., Ketata, W., Chelly, H., Hamida, C. B., Rekik, N., Hammami, A., Bouaziz, M. 2006. Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. *Int J Antimicrob Agents.* 28: 366-9.
- Kasiakou, S. K., Michalopoulos, A., Soteriades, E. S., Samonis, G., Sermaides, G. J., Falagas, M. E. 2005. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 3136-46.
- Keeney, D., Ruzin, A., McAleese, F., Murphy, E., Bradford, P. A. 2008. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 61: 46-53.
- Kell, D. B. 2009. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics.* 2: 2.
- Kern, W. V., Steinke, P., Schumacher, A., Schuster, S., von Baum, H., Bohnert, J. A. 2006. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 57: 339-43.

- Khalil, H., Chen, T., Riffon, R., Wang, R., Wang, Z. 2008. Synergy between polyethylenimine and different families of antibiotics against a resistant clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 1635-41.
- Kirby, W. M., Hudson, D. G., Noyes, W. D. 1956. Clinical and laboratory studies of novobiocin, a new antibiotic. *AMA Arch Intern Med.* 98: 1-7.
- Ko, K. S., Suh, J. Y., Kwon, K. T., Jung, S. I., Park, K. H., Kang, C. I., Chung, D. R., Peck, K. R., Song, J. H. 2007. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother.* 60: 1163-7.
- Koneman, E.W., Schreckenberger, P.C., Allen, S.D., Winn, W.C., Janda, W.M. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott. 253-309.
- Lee, H. W., Koh, Y. M., Kim, J., Lee, J. C., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* 14: 49-54.
- Lee, N., Yuen, K. Y., Kumana, C. R. 2003. Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs.* 63: 1511-24.
- Leive, L. 1965. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 21: 290-6.
- Levin, A. S., Barone, A. A., Penco, J., Santos, M. V., Marinho, I. S., Arruda, E. A., Manrique, E. I., Costa, S. F. 1999. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis.* 28: 1008-11.

- Levy, S. B. 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. Symp Ser Soc Appl Microbiol. 65S-71S.
- Lewis, K. 2001. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. J Mol Microbiol Biotechnol. 3: 247-54.
- Lewis, K., Ausubel, F. M. 2006. Prospects for plant-derived antibacterials. Nat Biotechnol. 24: 1504-7.
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., Paterson, D. L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. 6: 589-601.
- Li, X. Z., Nikaido, H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs. 64: 159-204.
- Linden, P. K., Paterson, D. L. 2006. Parenteral and inhaled colistin for treatment of ventilator-associated pneumonia. Clin Infect Dis. 43 Suppl 2: S89-94.
- Liu, I. X., Durham, D. G., Richards, R. M. 2000. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. J Pharm Pharmacol. 52: 361-6.
- Livermore, D. M., Hill, R. L., Thomson, H., Charlett, A., Turton, J. F., Pike, R., Patel, B. C., Manuel, R., Gillespie, S., Balakrishnan, I., Barrett, S. P., Cumberland, N., Twagira, M. 2010. Antimicrobial treatment and clinical outcome for infections with carbapenem- and multiply-resistant *Acinetobacter baumannii* around London. Int J Antimicrob Agents. 35: 19-24.
- Lomovskaya, O., Totrov, M. 2005. Vacuuming the periplasm. J Bacteriol. 187: 1879-83.

- Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., Lee, V. J. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 105-16.
- Magnet, S., Courvalin, P., Lambert, T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 3375-80.
- Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. 2005. Principles and practices of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2632-6.
- Maragakis, L. L., Perl, T. M. 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis.* 46: 1254-63.
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., Lambert, T. 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 3298-304.
- Markou, N., Apostolakis, H., Koumoudiou, C., Athanasiou, M., Koutsoukou, A., Alamanos, I., Gregorakos, L. 2003. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care.* 7: R78-83.
- Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N. J., Genet, J. P., dos Santos, A. F., Cano de Andrade, M. C., Sant'Ana, A. E. 2005. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochemistry.* 66: 1804-11.

- Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Ribera, A., Rodriguez-Bano, J., Bou, G., Miguel Cisneros, J., Pachon, J., Martinez-Martinez, L., Vila, J. 2006a. Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24: 77-80.
- Marti, S., Sanchez-Cespedes, J., Oliveira, E., Bellido, D., Giralt, E., Vila, J. 2006b. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics.* 6 Suppl 1: S82-7.
- Martinelli, R., Lopes, A. A., de Oliveira, M. M., Rocha, H. 1981. Amoxicillin-clavulanic acid in treatment of urinary tract infection due to gram-negative bacteria resistant to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 20: 800-2.
- Maviglia, R., Nestorini, R., Pennisi, M. 2009. Role of old antibiotics in multidrug resistant bacterial infections. *Curr Drug Targets.* 10: 895-905.
- Maxwell, A. 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol Microbiol.* 9: 681-6.
- Maxwell, A. 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* 5: 102-9.
- Montero, A., Ariza, J., Corbella, X., Domenech, A., Cabellos, C., Ayats, J., Tubau, F., Borraz, C., Gudiol, F. 2004. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother.* 54: 1085-91.
- Mortensen, N. P., Fowlkes, J. D., Sullivan, C. J., Allison, D. P., Larsen, N. B., Molin, S., Doktycz, M. J. 2009. Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Langmuir.* 25: 3728-33.

- Morgan, D. J., Weisenberg, S. A., Augenbraun, M. H., Calfee, D. P., Currie, B. P., Furuya, E. Y., Holzman, R., Montecalvo, M. C., Phillips, M., Polsky, B., Sepkowitz, K. A. 2009. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in New York City - 10 years into the epidemic. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 30: 196-7.
- Munoz-Price, L. S., Weinstein, R. A. 2008. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med.* 358: 1271-81.
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., Viale, A. M. 2005. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 1432-40.
- Neonakis, I. K., Spandidos, D. A., Petinaki, E. 2011. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int J Antimicrob Agents.* 37: 102-9.
- Nicolau, D. P. 2008. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.* 9: 23-37.
- Nikaido, H. 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J Bacteriol.* 181: 4-8.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 593-656.
- Nishino, K., Latifi, T., Groisman, E. A. 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 59: 126-41.
- Nitzan, Y., Pechatnikov, I., Bar-El, D., Wexler, H. 1999. Isolation and characterization of heat-modifiable proteins from the outer membrane of *Porphyromonas asaccharolytica* and *Acinetobacter baumannii*. *Anaerobe.* 5: 43-50.

- Obara, M., Nakae, T. 1991. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother. 28: 791-800.
- Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W., Gibbons, S. 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. Phytochemistry. 65: 3249-54.
- Ouabdesselam, S., Hooper, D. C., Tankovic, J., Soussy, C. J. 1995. Detection of gyrA and gyrB mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single gyrA mutations. Antimicrob Agents Chemother. 39: 1667-70.
- Pachon-Ibanez, M. E., Jimenez-Mejias, M. E., Pichardo, C., Llanos, A. C., Pachon, J. 2004. Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 48: 4479-81.
- Pages, J. M., Masi, M., Barbe, J. 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. Trends Mol Med. 11: 382-9.
- Palaniappan, K., Holley, R. A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. Int J Food Microbiol. 140: 164-8.
- Pannek, S., Higgins, P. G., Steinke, P., Jonas, D., Akova, M., Bohnert, J. A., Seifert, H., Kern, W. V. 2006. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. J Antimicrob Chemother. 57: 970-4.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 21: 538-82.

- Perronne, C. M., Malinverni, R., Glauser, M. P. 1987. Treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats with coumermycin A1 and ciprofloxacin, alone or in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* 31: 539-43.
- Piddock, L. J. 2006a. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 19: 382-402.
- Piddock, L. J. 2006b. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 4: 629-36.
- Poole, K. 2002. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* 3: 77-98.
- Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 10: 12-26.
- Pos, K. M. 2009. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta.* 1794: 782-93.
- Pournaras, S., Markogiannakis, A., Ikonomidis, A., Kondyli, L., Bethimouti, K., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., Tsakris, A. 2006. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 57: 557-61.
- Ribera, A., Ruiz, J., Jimenez de Anta, M. T., Vila, J. 2002. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 49: 697-8.

- Rice, L. B. 2006. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 43 Suppl 2: S100-5.
- Rodriguez, A. C., Stock, D. 2002. Crystal structure of reverse gyrase: insights into the positive supercoiling of DNA. EMBO J. 21: 418-26.
- Rodsathien, P. 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* at Lopburi Hospital. Khon Kaen Hospital Medical Journal. Vol. 32 Supplement 6 November 2008.
- Saballs, M., Pujol, M., Tubau, F., Pena, C., Montero, A., Dominguez, M. A., Gudiol, F., Ariza, J. 2006. Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. J Antimicrob Chemother. 58: 697-700.
- Sanchez, L., Calvo, M., Brock, J. H. 1992. Biological role of lactoferrin. Arch Dis Child. 67: 657-61.
- Sato, K., Nakae, T. 1991. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 28: 35-45.
- Schmitz, F. J., Fluit, A. C., Luckefahr, M., Engler, B., Hofmann, B., Verhoef, J., Heinz, H. P., Hadding, U., Jones, M. E. 1998. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 42: 807-10.
- Schreckenberger, P.C., Daneshvar, M.I., Weyant, R.S., Hollis, D.G. 2007. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gramnegative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press. 770-802.

- Seifert, H., Stefanik, D., Wisplinghoff, H. 2006. Comparative in vitro activities of tigecycline and 11 other antimicrobial agents against 215 epidemiologically defined multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 58: 1099-100.
- Shah, P. M. 2008. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect.* 14 Suppl 1: 175-80.
- Shimizu, M., Shiota, S., Mizushima, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Tsuchiya, T. 2001. Marked potentiation of activity of beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 3198-201.
- Shiota, S., Shimizu, M., Sugiyama, J., Morita, Y., Mizushima, T., Tsuchiya, T. 2004. Mechanisms of action of corilagin and tellimagrandin I that remarkably potentiate the activity of beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 48: 67-73.
- Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Van Dorsselaer, A., Boyer-Mariotte, S., Jouenne, T., De, E. 2006. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res.* 5: 3385-98.
- Siroy, A., Molle, V., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Pestel-Caron, M., Cozzone, A. J., Jouenne, T., De, E. 2005. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 4876-83.
- Smith, A. W., Alpar, K. E. 1991. Immune response to *Acinetobacter calcoaceticus* infection in man. *J Med Microbiol.* 34: 83-8.

- Song, J. Y., Cheong, H. J., Lee, J., Sung, A. K., Kim, W. J. 2009. Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. *Int J Antimicrob Agents*. 33: 33-9.
- Souli, M., Galani, I., Giamarellou, H. 2008. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*. 13:
- Souli, M., Kontopidou, F. V., Koratzanis, E., Antoniadou, A., Giannitsioti, E., Evangelopoulou, P., Kannavaki, S., Giamarellou, H. 2006. In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram-negative and gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 50: 3166-9.
- Su, X. Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. 2005. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 4362-4.
- Sudano Roccaro, A., Blanco, A. R., Giuliano, F., Rusciano, D., Enea, V. 2004. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 1968-73.
- Surasarang, K., Narksawat, K., Danchaivijitr, S., Siripanichgon, K., Sujirarat, D., Rongrungrueng, Y., Kiratisin, P. 2007. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infection. *J Med Assoc Thai*. 90: 1633-9.
- Suresh, B., Sriram, S., Dhanaraj, S. A., Elango, K., Chinnaswamy, K. 1997. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J Ethnopharmacol*. 55: 151-9.
- Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A., Lewis, K. 2000. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 1433-7.

- Takahashi, O., Cai, Z., Toda, M., Hara, Y., Shimamura, T. 1995. Appearance of antibacterial activity of oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the presence of catechin. *Kansenshogaku Zasshi*. 69: 1126-34.
- Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: 3133-41.
- Thornsberry, C., Burton, P. J., Yee, Y. C., Watts, J. L., Yancey, R. J., Jr. 1997. The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. *J Dairy Sci*. 80: 413-21.
- Urban, C., Mariano, N., Rahal, J. J., Tay, E., Ponio, C., Koprivnjak, T., Weiss, J. 2001. Polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate susceptible to recombinant BPI and cecropin P1. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 994-5.
- Vaara, M. 1981. Increased outer membrane resistance to ethylenediaminetetraacetate and cations in novel lipid A mutants. *J Bacteriol*. 148: 426-34.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*. 56: 395-411.
- Vaara, M., Vaara, T. 1983. Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 24: 114-22.
- Vila, J., Marti, S., Sanchez-Cespedes, J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 59: 1210-5.
- Vila, J., Ribera, A., Marco, F., Ruiz, J., Mensa, J., Chaves, J., Hernandez, G., Jimenez De Anta, M. T. 2002. Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 49: 471-7.

- Wallace, R. J., Jr., Steele, L. C., Brooks, D. L., Luman, J. I., Wilson, R. W., McLarty, J. W. 1985. Amoxicillin-clavulanic acid in the treatment of lower respiratory tract infections caused by beta-lactamase-positive *Haemophilus influenzae* and *Branhamella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 27: 912-5.
- Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., Bartolo, R. G. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 94: 240-7.
- Wang, J. C. 1998. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys.* 31: 107-44.
- Willmott, C. J., Maxwell, A. 1993. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 126-7.
- Wood, G. C., Hanes, S. D., Croce, M. A., Fabian, T. C., Boucher, B. A. 2002. Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of acinetobacter ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis.* 34: 1425-30.
- Woo, W.S. 2001. *Experimental methods for phytochemistry*. Seoul: Seoul National University Press.
- Wright, G. D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 57: 1451-70.
- Yam, T. S., Hamilton-Miller, J. M., Shah, S. 1998. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 42: 211-6.

- Young, M. L., Bains, M., Bell, A., Hancock, R. E. 1992. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 2566-8.
- Zgurskaya, H. I., Nikaido, H. 1999. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7190-5.
- Zhao, W. H., Hu, Z. Q., Hara, Y., Shimamura, T. 2002. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 2266-8.
- Zhao, W. H., Hu, Z. Q., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T. 2001. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 1737-42.
- Zimble, D. L., Penwell, W. F., Gaddy, J. A., Menke, S. M., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Actis, L. A. 2009. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals.* 22: 23-32.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 Clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Songklanagarind hospital

Code number	Specimens	Sex	Age
NPRC AB001	Body fluid	Female	65
NPRC AB002	Body fluid	Female	74
NPRC AB003	Sputum	Female	74
NPRC AB004	Urine (catheter)	Female	74
NPRC AB005	Urine (MSU)	Male	9
NPRC AB007	Sputum	Male	38
NPRC AB008	Urine (catheter)	Female	49
NPRC AB010	Blood	Female	81
NPRC AB011	Urine (catheter)	Female	90
NPRC AB013	Blood	Male	2
NPRC AB014	Urine (MSU)	Female	62
NPRC AB015	Urine (catheter)	Female	30
NPRC AB016	Urine (catheter)	Female	59
NPRC AB017	Body fluid	Female	65
NPRC AB018	Sputum	Female	65
NPRC AB019	Sputum	Male	84
NPRC AB020	Sputum	Female	62
NPRC AB021	Urine (catheter)	Male	53
NPRC AB022	Blood	Male	2
NPRC AB023	Bile: BFI	Female	63
NPRC AB024	CSF	Male	0.9
NPRC AB026	Sputum	Male	60
NPRC AB027	Blood	Female	62

Code number	Specimens	Sex	Age
NPRC AB028	Tissue	Male	51
NPRC AB029	Pus	Male	16
NPRC AB030	Sputum	Male	6
NPRC AB031	Body fluid	Female	61
NPRC AB032	Body fluid	Female	71
NPRC AB033	Body fluid	Female	0.4
NPRC AB034	Sputum	Male	4
NPRC AB035	Sputum	Male	22
NPRC AB036	Sputum	Female	35
NPRC AB037	Sputum	Male	44
NPRC AB038	Sputum	Male	82
NPRC AB039	Sputum	Female	1
NPRC AB040	Blood	Female	3
NPRC AB041	CSF	Male	0.9
NPRC AB042	Urine (catheter)	Male	51
NPRC AB043	Urine (MSU)	Female	78
NPRC AB044	Urine (MSU)	Male	89
NPRC AB045	Tissue	Female	35
NPRC AB046	Tissue	Female	68
NPRC AB047	Body fluid	Female	68
NPRC AB048	Sputum	Male	50
NPRC AB049	Bronchial	Male	77
NPRC AB050	Sputum	Female	0.1
NPRC AB051	Body fluid	Male	67
NPRC AB052	-	-	-

Code number	Specimens	Sex	Age
NPRC AB053	-	-	-

-= No data

ตารางที่ 2

Growth inhibition of ethanolic extract of *Holarrhena antidysenterica* and novobiocin (1/8MIC) against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (n=43)

Bacterial isolates	Percentage of bacterial growth inhibition						
	Concentrations of ethanolic extract (µg/ml)						Novobiocin
	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	
NPRC AB001	60 ^a /44 ^b	39/32	31/23	26/17	24/15	19/11	0
NPRC AB002	84/56	46/4	38/1	22/0	18/5	17/0	7
NPRC AB003	44/30	27/15	16/0	11/0	8/0	7/0	0
NPRC AB004	54/46	41/27	29/18	24/15	22/11	20/8	11
NPRC AB005	63/48	43/36	29/27	23/20	19/15	15/10	3
NPRC AB010	76/29	35/0	25/0	15/0	19/0	14/0	0
NPRC AB011	95/56	37/26	24/20	14/14	12/11	9/3	0
NPRC AB013	48/42	32/28	23/19	17/11	16/10	14/8	0
NPRC AB014	48/9	27/10	24/10	20/12	20/12	21/7	10
NPRC AB015	59/45	50/28	29/16	21/11	19/11	16/8	2
NPRC AB016	62/59	40/38	25/23	16/14	14/12	12/13	9
NPRC AB017	68/45	45/35	36/26	26/17	25/15	19/11	3
NPRC AB018	60/44	41/31	43/20	25/15	23/13	18/11	4
NPRC AB019	58/48	43/37	28/23	22/16	19/14	17/11	2
NPRC AB021	52/37	20/17	10/13	8/8	7/10	8/3	0
NPRC AB022	47/40	35/28	25/17	18/11	17/11	16/10	0
NPRC AB024	82/61	40/25	21/20	14/14	10/15	10/9	0
NPRC AB026	94/60	49/29	35/25	26/19	26/21	22/17	0
NPRC AB028	84/55	42/30	26/20	16/18	14/14	9/10	0
NPRC AB029	73/59	36/25	35/16	23/14	30/16	22/17	9
NPRC AB030	92/52	89/45	86/70	88/79	85/73	43/22	54
NPRC AB031	49/42	38/27	30/21	23/14	19/12	14/10	10
NPRC AB032	45/41	31/28	27/21	19/18	16/11	13/9	7

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Bacterial isolates	Percentage of bacterial growth inhibition						Novobiocin
	Concentrations of ethanolic extract ($\mu\text{g/ml}$)						
	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	
NPRC AB033	74/53	54/32	36/17	29/13	26/10	25/4	11
NPRC AB034	96/56	93/44	88/24	69/14	74/10	70/10	17
NPRC AB036	78/37	39/22	20/17	14/7	20/4	9/0	0
NPRC AB037	96/78	95/75	93/75	91/74	92/55	83/28	72
NPRC AB038	47/35	45/21	25/19	20/17	14/13	11/10	0
NPRC AB039	89/41	85/30	90/18	79/13	39/11	29/9	7
NPRC AB040	84/63	41/35	40/25	27/16	36/23	26/20	0
NPRC AB041	73/52	32/29	29/17	19/9	34/10	17/0	0
NPRC AB042	60/44	24/25	26/19	29/13	41/11	15/10	10
NPRC AB043	43/34	31/38	19/20	14/15	13/12	8/8	6
NPRC AB044	87/39	40/18	34/10	25/7	12/7	22/7	4
NPRC AB045	82/41	52/15	16/16	29/21	24/12	25/0	0
NPRC AB046	76/55	36/28	25/22	16/16	15/12	12/9	0
NPRC AB047	94/76	49/43	32/26	22/17	16/19	14/12	0
NPRC AB048	94/48	75/21	85/15	72/0	50/2	51/9	40
NPRC AB049	59/46	37/33	26/20	19/13	18/11	17/10	2
NPRC AB050	99/41	93/26	28/16	37/14	38/13	34/8	2
NPRC AB051	52/46	31/28	24/21	20/16	19/14	16/11	0
NPRC AB052	52/51	35/35	23/24	20/18	20/17	17/18	3
NPRC AB053	82/25	28/6	6/0	0/0	0/0	0/0	0

^a The effect of ethanolic extract and 1/8MIC of novobiocin

^b The effect of ethanolic extract

ตารางที่ 3

Growth inhibition of ethanolic extract of *Holarrhena antidysenterica* and novobiocin (1/4MIC) against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (n=43)

Bacterial isolates	Percentage of bacterial growth inhibition						
	Concentrations of ethanolic extract (µg/ml)						Novobiocin
	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	
NPRC AB001	100 ^a /44 ^b	96/32	97/23	63/17	44/15	26/11	6
NPRC AB002	100/56	100/4	100/1	100/0	100/5	96/0	59
NPRC AB003	91/30	36/15	27/0	18/0	13/0	10/0	1
NPRC AB004	96/46	94/27	97/18	78/15	75/11	95/8	26
NPRC AB005	74/48	52/36	43/27	30/20	24/15	18/10	5
NPRC AB010	100/29	100/0	100/0	100/0	98/0	99/0	50
NPRC AB011	100/56	99/26	98/20	99/14	80/11	81/3	23
NPRC AB013	82/42	46/28	50/19	38/11	27/10	18/8	3
NPRC AB014	96/9	80/10	89/10	95/12	97/12	94/7	33
NPRC AB015	100/45	96/28	100/16	96/11	99/11	98/8	21
NPRC AB016	62/59	42/38	25/23	17/14	14/12	12/13	4
NPRC AB017	100/45	98/35	95/26	97/17	89/15	33/11	10
NPRC AB018	100/45	100/31	99/20	96/15	99/13	96/11	25
NPRC AB019	94/48	85/37	47/23	56/16	73/14	39/11	8
NPRC AB021	100/37	67/17	49/13	54/8	32/10	20/3	16
NPRC AB022	89/40	66/28	67/17	28/11	25/11	16/10	4
NPRC AB024	100/61	100/25	93/20	84/14	47/15	28/9	3
NPRC AB026	100/60	99/29	91/25	80/19	55/21	50/17	16
NPRC AB028	100/55	98/30	83/20	67/18	47/14	23/10	5
NPRC AB029	100/59	100/25	98/16	98/20	88/16	90/17	39
NPRC AB030	100/52	98/45	99/70	97/79	96/73	99/22	76
NPRC AB031	87/42	94/27	88/21	84/14	87/12	75/10	54
NPRC AB032	55/41	43/28	35/21	23/18	18/11	20/9	21

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Bacterial isolates	Percentage of bacterial growth inhibition						Novobiocin
	Concentrations of ethanolic extract ($\mu\text{g/ml}$)						
	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	
NPRC AB033	100/53	97/32	98/17	96/13	97/10	96/4	39
NPRC AB034	96/56	97/44	96/24	100/14	100/10	99/10	84
NPRC AB036	100/37	100/22	96/17	97/7	64/4	45/0	9
NPRC AB037	100/78	100/75	100/75	100/74	100/55	100/28	84
NPRC AB038	98/35	75/21	73/19	56/17	20/13	22/10	3
NPRC AB039	100/41	100/30	100/18	98/13	100/11	100/9	66
NPRC AB040	100/63	94/35	89/25	79/16	38/23	34/20	12
NPRC AB041	97/52	92/29	88/17	68/9	39/10	41/0	0
NPRC AB042	78/44	49/25	36/19	33/13	31/11	55/10	17
NPRC AB043	74/34	80/38	51/20	34/15	70/12	70/8	57
NPRC AB044	96/39	95/18	96/10	93/7	99/7	100/7	83
NPRC AB045	100/41	97/15	92/16	93/21	91/12	87/0	18
NPRC AB046	100/55	95/28	97/22	87/16	47/12	51/9	0
NPRC AB047	99/76	94/43	86/26	57/17	45/19	43/12	4
NPRC AB048	99/48	100/21	85/15	99/0	89/2	99/9	78
NPRC AB049	93/46	92/33	86/20	56/13	28/11	30/10	4
NPRC AB050	100/41	100/26	100/16	100/14	100/13	100/8	18
NPRC AB051	87/46	44/28	27/21	22/16	18/14	14/11	2
NPRC AB052	83/51	89/35	89/24	67/18	57/17	54/18	48
NPRC AB053	93/25	92/6	91/0	88/0	75/0	21/0	9

^a The effect of ethanolic extract and 1/4MIC of novobiocin

^b The effect of ethanolic extract

ประวัติผู้เขียน

ชื่อสกุล นางสาวปิ่นอนงค์ ณ พัทลุง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210220042

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีสำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนสถานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Na-Phatthalung, P., Chusri, S., and Voravuthikunchai, S.P. 2010. Screening of Thai medicinal plants for anti-multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* activity. Abstract of 1st Current Drug Development International Conference (1st CDD). Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University. 6-8 May 2010. p. 69.

Chusri, S., Na-Phatthalung, P., and Voravuthikunchai, S.P. 2010. Resistance modifying agents from Thai medicinal plants. Abstract of 7th IMT-GT UNINET and the 3rd Joint International PSU-UNS Conferences. Prince of Songkla University, University of Novi Sad and Indonesia-Malaysia-Thailand Growth Triangle (IMT-GT). 7-8 October 2010. p. 263.