



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ติดต่อทางผิวหนังของ
น้ำมันหอมระเหยและสารในกลุ่มเทอร์ปีน

โดย ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง และคณะ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ติดต่อयाปฏชีวนะของ
น้ำมันหอมระเหยและสารในกลุ่มเทอร์ปีน

โดย ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง และคณะ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
Executive Summary	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญรูปภาพ	v
สารบัญตาราง	vii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ทบทวนวรรณกรรม	3
1.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.3.2 สมุนไพรที่นำมาศึกษาฤทธิ์ต่อแบคทีเรียดีด้อยา	6
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	
2.1 การเก็บรวบรวมเชื้อทดสอบ <i>P. aeruginosa</i> ที่ติดต่อยาต่างๆ ในประเทศไทย	18
2.2 การทดสอบเอกลักษณ์ทางด้านจุลชีววิทยาชีวเคมีและการทดสอบ/ การดีด้อยา	18
2.3 การทดสอบความไวของเชื้อต่อน้ำมันหอมระเหย	19
2.3.1 น้ำมันหอมระเหย	19
2.3.2 แบคทีเรียและสภาวะเลี้ยงเชื้อ	19
2.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี broth microdilution (Antibacterial susceptibility test)	19
2.4.1 การทดลองหาค่า Minimum Inhibitory Concentration	

(MIC)	20
2.4.2 การทดลองหาค่า Minimun Bactericidal Concentration (MBC)	20
2.5 การหาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Bioautography	21
2.5.1 การทำ TLC	22
2.5.2 การเตรียม Agar base และ Agar seed	22
2.5.3 การทดลอง Bioautography	22
2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี Gaseous contact	23
2.7 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย สารในกลุ่ม/terpenes และยาด้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	23
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและการทดสอบการดื้อยาของ เชื้อตัวอย่าง	25
3.2 การจำแนกสายพันธุ์ของ multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i> ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์	30
3.3 กลไกการดื้อยาของ multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i> ที่ดื้อต่อยา ในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์	33
3.3.1 การลดการนำเข้าเซลล์ของยาโดยโปรตีน OprD	33
3.3.2 การเปลี่ยนแปลงที่ efflux pump	39
3.3.3 การสร้างเอนไซม์ metallo β -lactamase	46
3.3.4 การสร้างเอนไซม์ AmpC cephalosporinase	48
3.4 การทดสอบความไวของ <i>P. aeruginosa</i> ต่อน้ำมันหอมระเหย	53
3.5 การทดลองหาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี bioautography	57
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี Gaseous contact	59
3.7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต <i>P. aeruginosa</i> ของ	

cinnamon bark oil และ cinnamaldehyde	62
3.8 การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพกับ cinnamon bark oil/	
Cinnamaldehyde	64
สรุปผลการทดลอง	65
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	68

บทคัดย่อ

P. aeruginosa จัดเป็นหนึ่งในสาเหตุอันดับต้นๆ ของการติดเชื้อจากโรงพยาบาลที่มีอัตราการเสียชีวิตสูง เชื่อมั่นยังจัดว่าเป็นเชื้อที่รักษาได้ยาก เนื่องจากความสามารถในการดื้อยาทั้งที่มีมาแต่กำเนิดและได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ปัญหาการดื้อยาหลายขนานของ *P. aeruginosa* จึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลก นอกจากนี้การระบาดของ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานรวมทั้งยากลุ่มคาร์บาพีเนมส์ยังทำให้การรักษาด้วยยามีจำกัด ในการศึกษา *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานได้ถูกเก็บรวบรวมจากโรงพยาบาลระดับตติยภูมิทั่วประเทศไทย 9 แห่งตั้งแต่ปีค.ศ. 2007-2009 โดยจากทั้งหมด 329 สายพันธุ์พบเป็น *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานรวมทั้งยากลุ่มคาร์บาพีเนมส์ร้อยละ 72.95 ผลการทดลองพบการดื้อต่อยา ceftazidime ในอัตราที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์พบการดื้อยา meropenem มากที่สุดกว่าร้อยละ 50 ในทุกโรงพยาบาลยกเว้นเพียงหนึ่งโรงพยาบาล ผลจากวิธี PFGE พบว่ามี 130 สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันถึงร้อยละ 95 สำหรับกลไกการดื้อยาที่พบในเชื้อเหล่านี้ในอัตราที่สูงที่สุด คือ การลดการสร้าง *oprD* mRNA (ร้อยละ 92.86) ตามมาด้วยการเพิ่มการสร้าง *mexAB-oprM* mRNA (ร้อยละ 92.06) และ *mexXY* mRNA (ร้อยละ 63.49) กลไกการดื้อยาที่พบน้อยที่สุด คือ การสร้าง AmpC β -lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่ม serine β -lactamases พบเพียงร้อยละ 3.97 จากนั้น *P. aeruginosa* ได้ถูกคัดเลือกมา 20 สายพันธุ์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหย ผลการทดลองพบว่า น้ำมันเปลือกอบเชย น้ำมันตะไคร้ น้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีโดยมีค่า MIC ที่ร้อยละ 0.225, 1.8 and 1.8 โดยปริมาตร ตามลำดับ และมีค่า MBC ของน้ำมันเปลือกอบเชย ร้อยละ 0.225 โดยปริมาตร ในขณะที่น้ำมันอีกสองชนิดมีค่า MBC มากกว่าร้อยละ 1.8 โดยปริมาตร จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของน้ำมันเปลือกอบเชยที่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานได้ดีโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงร้อยละ 0.0562-0.225 และค่า MBC ในช่วงร้อยละ 0.1125-1.8 ส่วนน้ำมันตะไคร้ซึ่งมีประสิทธิภาพรองลงมามีค่า MIC อยู่ในช่วงร้อยละ 0.45-1.8 และค่า MBC ในช่วงร้อยละ 0.9 ถึงมากกว่า 1.8 นอกจากนี้ ผลจากวิธี bioautography พบว่า สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของน้ำมันเปลือกอบเชย คือ ซินนามาลดีไฮด์ และยูจินอล ในการทดลองให้ยาร่วมกันระหว่างน้ำมันเปลือกอบเชยหรือ ซินนามาลดีไฮด์กับยาต้านจุลชีพทั้ง 7 ชนิดที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* พบการเสริมฤทธิ์กันของ colistin กับน้ำมันเปลือกอบเชยหรือซินนามาลดีไฮด์ ดังนั้น น้ำมันเปลือกอบเชยหรือซินนามาลดีไฮด์น่าจะเป็นสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีและอาจนำไปใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานด้วย

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading causes of nosocomial infections with a high mortality rate. *P. aeruginosa* has always been considered as a difficult target for antimicrobial chemotherapy because of many intrinsic resistance mechanisms and remarkable capability to develop new resistance mechanisms. Increased infection caused by multidrug resistant (MDR) *P. aeruginosa* has raised awareness of the resistance situation worldwide. Carbapenems resistance among MDR (CR-MDR) *P. aeruginosa* became a serious life-threatening problem due to the limited therapeutic options. In this study, MDR *P. aeruginosa* from nine tertiary hospitals across Thailand were collected from 2007-2009. The total of 329 isolates were identified as MDR *P. aeruginosa* and approximately 72.95% were CR-MDR *P. aeruginosa*. The result showed that an antibiotic, which was found to give the highest resistance rate, was ceftazidime. Among carbapenems, meropenem showed the highest resistance rate, reaching more than 50% in every hospital, except one. The fingerprinting map by PFGE identified 130 CR-MDR *P. aeruginosa* clones with at least 95% similarity. The major mechanism in CR-MDR *P. aeruginosa* was downregulation of *oprD* mRNA (92.86%), followed by overproduction of *mexAB-oprM* mRNA (92.06%) and overproduction of *mexXY* mRNA (63.49%). The lowest prevalence rate of resistance mechanism was hyperproduction of AmpC β -lactamase, which were serine β -lactamases, was found at 3.97%. The total of 20 isolates with various resistance mechanisms were tested with 17 essential oils for antimicrobial activity. The results showed that cinnamon bark oil, lemongrass oil, and clove oil were highly effective against *P. aeruginosa* with MIC of 0.225, 1.8 and 1.8%v/v. The MBC of cinnamon bark oil was 0.225%v/v while the others two oils were more than 1.8%v/v. Cinnamon bark oil showed the strongest antimicrobial activity against all drug resistant *P. aeruginosa* strains with MIC of 0.0562-0.225%v/v and MBC of 0.1125-1.8%v/v. Lemongrass oil was ranked in the second with MIC of 0.45-1.8%v/v and MBC varied from 0.9 upto higher than 1.8%v/v. The bioautographic results demonstrated that the active compounds of cinnamon bark oil could be cinnamaldehyde and eugenol. Combination between cinnamon oil or cinnamaldehyde with 7 antibiotics currently used to treat *P. aeruginosa* infection exhibited synergistic interaction of colistin with cinnamon bark oil and cinnamaldehyde. Therefore, these results indicated that cinnamon bark oil and cinnamaldehyde may be interesting compounds which have the potential to be applied in combination treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infected diseases.

Executive Summary

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวโน้มการดื้อยาระดับโมเลกุลของ *Pseudomonas aeruginosa* ในประเทศไทย รวมถึงการคัดกรองหาน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา ซึ่งจากการเก็บรวบรวม *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานจาก 9 โรงพยาบาลระดับตติยภูมิทั่วประเทศตั้งแต่ปีค.ศ. 2007-2009 โดยจากทั้งหมด 329 สายพันธุ์พบเป็น *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานรวมทั้งยากลุ่มคาร์บาพีเนมส์ร้อยละ 72.95 ผลการทดลองพบการดื้อต่อยา ceftazidime ในอัตราที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์พบการดื้อยา meropenem มากที่สุดกว่าร้อยละ 50 ในทุกโรงพยาบาลยกเว้นเพียงหนึ่งโรงพยาบาล ผลจากวิธี PFGE พบว่ามี 130 สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันถึงร้อยละ 95 สำหรับกลไกการดื้อยาที่พบในเชื้อเหล่านี้ในอัตราที่สูงที่สุด คือ การลดการสร้าง *oprD* mRNA (ร้อยละ 92.86) ตามมาด้วยการเพิ่มการสร้าง *mexAB-oprM* mRNA (ร้อยละ 92.06) และ *mexXY* mRNA (ร้อยละ 63.49) กลไกการดื้อยาที่พบน้อยที่สุด คือ การสร้าง AmpC β -lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่ม serine β -lactamases พบเพียงร้อยละ 3.97

นอกจากนี้ ในการคัดกรองหาน้ำมันหอมระเหย และสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาหลายขนาน การศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย 17 ชนิด ได้แก่ กะเพรา กระชาย กานพลู (ดอกตูมและใบ) ขมิ้น ข่า ตะไคร้ ตะไคร้หอม ใบฝรั่ง พลู พลู ไซโล มะกรูด (ผลและใบ) มะนาว แมงลัก โหระพา และเปลือกอบเชย ที่มีผลต่อการเจริญของ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี broth microdilution พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ตะไคร้ และกานพลู (ดอกตูม) มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานดีที่สุดเป็นสามลำดับแรก โดยมีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 0.225, 1.8 และ 1.8 โดยปริมาตร ตามลำดับ และค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยเท่ากับร้อยละ 0.225 โดยปริมาตร ส่วนค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และกานพลู (ดอกตูม) นั้นมากกว่าร้อยละ 1.8 โดยปริมาตร ผลการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดข้างต้นต่อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา 20 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยมีฤทธิ์ต้านเชื้อดีที่สุด โดยมีค่า MIC ระหว่างร้อยละ 0.0562-0.225 โดยปริมาตร และค่า MBC ระหว่างร้อยละ 0.1125-1.8 โดยปริมาตร รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีค่า MIC อยู่ระหว่างร้อยละ 0.45-1.8 โดยปริมาตร และค่า MBC ระหว่างร้อยละ 0.9 หรือมากกว่า 1.8 โดยปริมาตร ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (ดอกตูม) มีค่า MIC ระหว่างร้อยละ 0.9 หรือมากกว่า 1.8 โดยปริมาตร และค่า MBC กว่าร้อยละ 1.8 โดยปริมาตร จากนั้นทำการทดสอบสารออกฤทธิ์โดยแยกสารซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น toluene : ethyl acetate (93:7) แล้วทดสอบหาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี bioautography คาดว่าสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย คือ ซินนามาลดีไฮด์ และยูจีนอล เมื่อทำการทดสอบในสภาวะระเหยในระบบปิด พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยให้ค่า MID ที่ 2-1mg/L ส่วนสารออกฤทธิ์ คือ ซินนามาลดีไฮด์ ให้ค่า MID ดีที่สุดที่ 1-0.5mg/L กับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานและ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา 20 สายพันธุ์ ในการทดลองให้ยาร่วมกันระหว่างน้ำมันเปลือกอบเชยหรือซินนามาลดีไฮด์กับยาต้านจุลชีพทั้ง 7 ชนิดที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* พบการเสริมฤทธิ์กันของ colistin กับน้ำมันเปลือกอบเชยหรือซินนามาลดีไฮด์ ดังนั้น น้ำมันเปลือกอบเชยหรือซินนามาลดีไฮด์น่าจะเป็นสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีและอาจนำไปใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการเป็นไปตามเป้าหมายได้ด้วยความช่วยเหลือจากที่ปรึกษาโครงการ ศ.ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำที่มีประโยชน์ทุกด้านตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ขอขอบคุณนางสาวปิยทิพย์ ชันตยาภรณ์ นางสาวอิสริยาภรณ์ อัจฉริยเกียรติ นายกานต์ วงศาริยะ นางสาวบุษนันท์ สุขฤทัยวรกุล นางสาวสุทธิดา พุกสุริย์วงศ์ ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลอง และขอขอบคุณบุคลากรจากโรงพยาบาลต่างๆ ที่ให้ความร่วมมือในการจัดเก็บเชื้อที่นำมาใช้เพื่อการวิจัยในโครงการนี้ ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบคุณบุคคลทั้งหลายซึ่งไม่สามารถกล่าวถึงทั้งหมดไว้ ณ ที่นี้ที่ช่วยเหลือให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ในระบบสาธารณสุขแก่ประเทศเราในอนาคต

มัลลิกา (ไตรเดช) ชมนาวัง

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ตัวอย่างพีชที่นำมาทดสอบโดยใช้น้ำมันหอมระเหย	11
รูปที่ 2 96-well plate สำหรับหาค่า MIC	20
รูปที่ 3 การเตรียม TSA plate สำหรับหาค่า MBC	21
รูปที่ 4 ผล fingerprint ของวิธี Pulsed-field gel electrophoresis ของเชื้อ multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i> ที่ดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์	31
รูปที่ 5 ผลของ RT-PCR เมื่อทดสอบกับ <i>oprD</i> primers: <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (A) และ <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>oprD</i> (B)	34
รูปที่ 6 กราฟการวิเคราะห์ผล RT-PCR products ของ <i>rpsL</i> (A) and <i>oprD</i> (B) จากเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> PAO1 และ <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>oprD</i> ที่แสดงตำแหน่งลูกศรคือ <i>oprD</i> จาก <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>oprD</i>	35
รูปที่ 7 กราฟการวิเคราะห์ผล RT-PCR products ของ <i>rpsL</i> (A) and <i>oprD</i> (B) จากเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>P. aeruginosa</i> clinical isolates และ <i>P. aeruginosa</i> Δ <i>oprD</i> ที่แสดงตำแหน่งลูกศร คือ <i>oprD</i>	36
รูปที่ 8 ปริมาณ mRNA ของ <i>P. aeruginosa</i> PAO1 และสายพันธุ์อื่นๆ	40
รูปที่ 9 mRNA จาก RT-PCR ของ <i>P. aeruginosa</i> PAO1 และสายพันธุ์อื่นๆ	41
รูปที่ 10 Dissociation curves ของ RT-PCR products จาก <i>mexAB-oprM</i> (A), <i>mexXY</i> (B), and <i>rpsL</i> (C)	42
รูปที่ 11 ผล RT-PCR ของ <i>P. aeruginosa</i>	43
รูปที่ 12 Dissociation curves ของ RT-PCR products จาก <i>rpsL</i> (A) and <i>mexCD-oprJ</i> (B)	44
รูปที่ 13 Scattered plot of relative quantitative ของ <i>mexAB-oprM</i> and <i>mexMY</i>	45

รูปที่ 14 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo β -lactamases ของเชื้อด้วยวิธี double disc synergy	47
รูปที่ 15 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ AmpC cephalosporinase ด้วยวิธี disc diffusion	49
รูปที่ 16 TLC chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น	57
รูปที่ 17 ตำแหน่ง clear zone (Rf 0.412-0.576) ของน้ำมันหอมระเหยจาก เปลือกอบเชยที่ได้จากการ ทดลอง bioautography เทียบกับแผ่น TLC ซึ่งเป็น Reference	58
รูปที่ 18 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต <i>P. aeruginosa</i> ของ cinnamon bark oil และ cinnamaldehyde ด้วยวิธี Time-Killing assay ต่อ PAO1 (A) และ MDR-PA KK 16 (B) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	63

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 โรคติดเชื้อสำคัญที่มี <i>P.aeruginosa</i> เป็นสาเหตุในการก่อโรค	5
ตารางที่ 2 Zone of inhibition โดยใช้เกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009	19
ตารางที่ 3 การเตรียมสารและความเข้มข้นสุดท้ายสำหรับการทดสอบความไวของเชื้อ	21
ตารางที่ 4 การทดสอบการออกฤทธิ์ของสาร 2 ชนิดแบบ Checkerboard Assay	24
ตารางที่ 5 แบคทีเรียทั้งหมดที่เก็บรวบรวมได้จากโรงพยาบาลต่างๆ ที่จัดเป็น multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i>	25
ตารางที่ 6 อัตราการดื้อต่อยาชนิดต่างๆ ของ MDR <i>P. aeruginosa</i> ที่เก็บรวบรวมได้	27
ตารางที่ 7 อัตราการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ของ MDR <i>P. aeruginosa</i> ที่เก็บรวบรวมได้	28
ตารางที่ 8 อัตราการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์แบบเดี่ยวและแบบร่วมของ MDR <i>P. aeruginosa</i> ที่เก็บรวบรวมได้	29
ตารางที่ 9 การแพร่กระจายตัวของสายพันธุ์ระหว่างโรงพยาบาลจากการวิเคราะห์ผล PFGE	32
ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> แบ่งตามการแสดงออกของยีนดื้อยาและความไวต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์	37
ตารางที่ 11 จำนวนเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> แบ่งตามการแสดงออกของยีนดื้อยาและการเกิด cross resistance ของยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์	38
ตารางที่ 12 สรุปผลการทดสอบกลไกดื้อยาของ <i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ต่างๆ	50
ตารางที่ 13 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหย 17 ชนิดต่อ <i>P. aeruginosa</i> PAO1	53

ตารางที่ 14 ค่า MIC และ MBC ของสารสำคัญกลุ่มเทอร์ปีนจากมันหอมระเหยต่อ	
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	54
ตารางที่ 15 ค่า MIC และ MBC (%v/v) ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย	
ตะไคร้และกานพลู (ดอกตูม) ต่อ <i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ดีอียา 20	
สายพันธุ์	55
ตารางที่ 16 ค่า MID ของน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์	60
ตารางที่ 17 ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพ 7 ชนิดกับ cinnamon	
Bark oil/cinnamaldehyde ต่อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ดีต่อยา 30	
สายพันธุ์	64

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่ก่อปัญหาสำคัญในผู้ป่วยโรคมะเร็งและผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง และเป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคในระบบต่างๆ เช่น ทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ ตา หู กระจกและข้อ ผิวหนัง และอาจลุกลามทำให้เกิดการติดเชื้อในเลือด (bacteremia) ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะระบบหายใจล้มเหลวและเสียชีวิต นอกจากนี้ *P. aeruginosa* จัดเป็นเชื้อหนึ่งที่เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดการติดเชื้อระหว่างการรักษาในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหน่วยรักษาพยาบาลผู้ป่วยขั้นวิกฤติ (ICU) เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ซึ่งมีอาการหนักอยู่แล้วจะเสียชีวิตจากปอดบวมที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อนี้ จากสถิติของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ พบว่า *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียอันดับต้นๆ ที่พบในเสมหะของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลทั่วประเทศ ปัจจุบันอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลยังมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมักพบเชื้อนี้อยู่ตามอุปกรณ์การแพทย์ เช่น ท่อออกซิเจนและสายสวนปัสสาวะอีกด้วย ตัวอย่างการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็นกรณีศึกษาและได้รับความสนใจไปทั่วโลก คือ รายงานข่าวของสำนักข่าวต่างประเทศถึงนางงามบราซิลวัย 20 ปี ที่ติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาล คือ *P. aeruginosa* ที่กระเพาะปัสสาวะภายหลังเข้ารับการรักษาผ่าตัดนิ้วในไตที่โรงพยาบาลในประเทศบราซิลเมื่อวันที่ 30 ธันวาคม พ.ศ. 2551 และคณะแพทย์ต้องตัดมือและเท้าทั้งสองข้างออกเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่กระแสเลือด และได้เสียชีวิตลงอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา และที่สำคัญที่สุด คือ *P. aeruginosa* ยังเป็นที่รู้จักในแง่ของความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะแบบหลายขนาน (multidrug resistance) อันเป็นปัญหาที่สำคัญและมีผลกระทบไปทั่วโลก ซึ่งนอกจากจะทำให้การรักษาไม่สัมฤทธิ์ผล ยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจจากการปรับเปลี่ยนชนิดของยาอีกด้วย

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการศึกษาหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ดื้อยาจากสมุนไพรในธรรมชาติ โดยจะมุ่งเน้นศึกษาน้ำมันหอมระเหย (essential oil) และองค์ประกอบหลัก คือ สารในกลุ่ม terpenes จากพืชอาหาร ซึ่งเป็นสมุนไพรหาง่าย ราคาถูกและปลอดภัย อีกทั้งด้วยคุณสมบัติของการเป็นสาร hydrophobic จึงช่วยให้ซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดี และมีรายงานว่าสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านของยาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น จึงอาจช่วยลดขนาดของยาปฏิชีวนะในกรณีการให้ยาร่วม ซึ่งอาจลดค่าใช้จ่ายในการรักษาและชะลออัตราการดื้อยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย นอกจากนี้ จากอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *P. aeruginosa* แทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจในโรงพยาบาลที่เพิ่มสูงขึ้น หากทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ในเชิงลึกแล้ว ก็อาจนำไปสู่การพัฒนาสารดังกล่าวสำหรับ inhalation (respiratory) therapy โดยอาจพัฒนาในรูปแบบยาพ่น หรือในรูปแบบ nabilizer ที่เข้าสู่ระบบทางเดินหายใจได้โดยตรง เพื่อลดการสร้าง biofilm ที่สร้างจากเชื้อนี้ในปอด ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน หรืออาจนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบยาทาเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *P. aeruginosa* แทรกซ้อนในผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้ซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงที่สำคัญหนึ่งของการติดเชื้อนี้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคัดเลือก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ติดต่อจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ติดต่อของน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์
3. เพื่อศึกษาผลของการให้น้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa*
4. เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ของน้ำมันหอมระเหย
5. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ติดต่อจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย
6. เพื่อศึกษาโอกาสในการพัฒนาน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์เป็นยาต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ติดต่อยาปฏิชีวนะแบบหลายขนาน

1.3 ทบทวนวรรณกรรม

1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

หากกล่าวถึงโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย อาจแบ่งได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* หรือ *Streptococcus pneumoniae* และแบคทีเรียแกรมลบ อาทิเช่น *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* หรือ *Acinetobacter baumannii* ส่วน *Pseudomonas aeruginosa* อาจเป็นเชื้อลำดับท้ายๆที่หลายคนนึกถึง แต่ในความเป็นจริงแล้วการติดเชื้อชนิดนี้อาจรวดเร็วและรุนแรงเกินคาด ตัวอย่างการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็นกรณีศึกษาและได้รับความสนใจไปทั่วโลก คือ รายงานข่าวของสำนักข่าวต่างประเทศถึงนางงามชาวบราซิลวัย 20 ปีที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่กระเพาะปัสสาวะภายหลังเข้ารับการรักษาผ่าตัดนิ้วในไตที่โรงพยาบาลในประเทศบราซิล และคณะแพทย์ต้องตัดมือและเท้าทั้ง 2 ข้างออกเพื่อช่วยชีวิตเนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวแทรกซึมเข้าสู่กระแสเลือด และได้เสียชีวิตลงอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา ซึ่งเหตุการณ์ทั้งหมดเกิดขึ้นในเวลาอันรวดเร็วเพียงเดือนเศษเท่านั้น หรือในประเทศไทยเองก็มีข่าวการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยหลายรายที่เข้ารับการรักษาผ่าตัดกระเจตนาในโรงพยาบาล และส่งผลให้ผู้ป่วยหลายรายตาบอด

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตอยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae อาจพบอยู่เดี่ยวๆ อยู่คู่ หรืออยู่เป็นสายสั้นๆ ได้ มีแฟลกเจลลา 1-3 เส้น เชื้อไม่สร้างสปอร์หรือแคปซูลสามารถสร้าง pigment เช่น pyocyanin ซึ่งมีสีเขียวฟ้า pyoverdine ซึ่งมีสีเขียวเหลือง และ pyorubin ซึ่งมีสีน้ำตาลแดง มักเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่ชื้นแฉะ เชื้อชนิดนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้าง biofilm ซึ่งเป็น mucoïd exopolysaccharide เชื้อจะใช้ biofilm ในการยึดเกาะตัวเชื่อมกับสิ่งแวดล้อม และสามารถปกป้องตัวเชื้อจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

การติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) หมายถึง การติดเชื้อที่เป็นผลมาจากที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาในโรงพยาบาลหรือหน่วยบริการสาธารณสุข เกณฑ์พิจารณาว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยนับจากมีการติดเชื้อ 48 ชั่วโมงตั้งแต่รับการรักษาในโรงพยาบาล หรือ 30 วันหลังจากเลิกการรักษาในโรงพยาบาล โดยการติดเชื้อแบบนี้จัดอยู่ในประเภท hospital-acquired infection หรือ healthcare-associated infection โดยเชื้อก่อโรคที่มักพบในโรงพยาบาล คือ *Klebsiella* spp. ร้อยละ 25 *Escherichia coli* ร้อยละ 9 ส่วน *P. aeruginosa* พบร้อยละ 6.8 สำหรับบริเวณที่มักพบการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ คือ แผลผ่าตัด ทางเดินหายใจส่วนล่าง และทางระบบเลือด มีรายงานว่า *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับ 7 ของ central line-associated bloodstream infection เป็นสาเหตุอันดับ 4 ของการติดเชื้อจากสายสวนปัสสาวะ เป็นสาเหตุอันดับ 2 ของ ventilator associated pneumonia และเป็นสาเหตุอันดับ 5 ของการติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด

P. aeruginosa จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสสำคัญที่พบได้ในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาล อาทิเช่น เครื่องช่วยหายใจ สายสวนปัสสาวะ อุปกรณ์ต่างๆ มักพบใน ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำซึ่งรวมไปถึงผู้ป่วยที่อยู่ในชั้นวิกฤติ ผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานานๆ รวมถึงผู้ป่วยที่อยู่ระหว่างการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างหรือผู้ป่วยที่อยู่ระหว่างการได้รับเคมีบำบัด โดยก่อให้เกิดโรคปอดอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial pneumonia) โรคติดเชื้อของช่องท้องที่ซับซ้อน (complicated intra-abdominal infection) ภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (septicemia) โรคติดเชื้อของผิวหนังที่

ซับซ้อน (complicated skin infection) โรคติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะที่ซับซ้อน (complicated urinary tract infection)

จะเห็นได้ว่า *P. aeruginosa* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้หลายระบบทั่วทั้งร่างกาย ซึ่งหากพิจารณาถึงตัวเชื้อเอง ก็จัดว่าเป็นเชื้อที่มีอาวุธประจำกายหรือ virulence factors ที่หลากหลาย ซึ่งอาจจัดแบ่งออกได้เป็นดังนี้

1. การเข้าเกาะติดและการเพิ่มจำนวน ได้แก่ pili, flagella, lipopolysaccharide, alginate, neuraminidase และ chitin-binding protein
2. การเข้าบุกรุกทำลายเซลล์ ได้แก่ rhamnolipid, lipolytic enzyme และ cytotoxin
3. เอนไซม์และท็อกซิน ได้แก่ exoenzyme S, elastase A และ B, exotoxin A, alkaline protease และ protease IV

ในปัจจุบันนี้การติดเชื้อ *P. aeruginosa* นับว่ามีความสำคัญเพราะถึงแม้จะไม่ก่อโรคในคนที่มีสุขภาพดี แต่การติดเชื้อชนิดนี้มักเป็นการติดเชื้อที่รุนแรงและจัดเป็นเชื้ออันดับต้นๆ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลคิดเป็นร้อยละ 10-15 ของการติดเชื้อทั่วโลก อีกทั้งยังส่งผลให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูง หรือใช้ระยะเวลาพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ยังมีอยู่เพียงไม่กี่กลุ่ม ได้แก่

1. ยากลุ่มเบต้าแลคแทม (piperacillin, piperacillin และ tazobactam, ceftazidime, cefipime, ticarcillin, ticarcillin และ clavulanate)
2. ยากลุ่มคาร์บาเพนิมส์ (imipenem, meropenem, doripenem)
3. ยากลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ (gentamicin, tobramycin, amikacin)
4. ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (ciprofloxacin, levofloxacin)
5. รวมทั้งยากลุ่มอื่นๆ ได้แก่ colistin

ตารางที่ 1 โรคติดเชื้อสำคัญที่มี *P.aeruginosa* เป็นสาเหตุในการก่อโรค

ตำแหน่งที่เกิดการติดเชื้อ	โรคติดเชื้อที่เกิดขึ้น	ความถี่ (กลุ่มที่มีความเสี่ยง)
ทางเดินหายใจ	Acute pneumonia Chronic lower respiratory tract infections	พบบ่อย (ผู้ป่วยในโรงพยาบาลและ ICU) (cystic fibrosis)
เลือด	Bacteremia and septicemia	พบบ่อย
ทางเดินปัสสาวะ	Acute infection Chronic infection	พบบ่อยข้างมาก
หู	Otitis externa Otitis media	พบบ่อย
ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน	Dermatitis Wound infections Burn wound sepsis Ecthyma gangrenosa Pyoderma Folliculitis Unmanageable forms of acne vulgaris	พบบ่อยข้างมาก (trauma) (Neutropenic patients)
ตา	Keratitis (corneal ulcer) Endophthalmitis Neonatal ophthalmia	พบน้อย (secondary to trauma)
ระบบประสาทส่วนกลาง	Meningitis Brain abscess	พบน้อย (secondary to neurosurgery or trauma)
หัวใจ	Endocarditis	พบน้อย (ผู้ติดยาเสพติด)
กระดูกและข้อต่อ	Stenoarticular pyoarthrosis Vertebral osteomyelitis Symphysis pubis infection Osteochondritis of the foot	พบน้อย
ทางเดินอาหาร	Necrotising enterocolitis Peri-rectal infections	พบน้อย

นอกจากยาปฏิชีวนะที่สามารถออกฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* จะมีอยู่อย่างจำกัดแล้ว เชื้อนี้ยังมีความสามารถในการดื้อยาสูง และเชื้อบางสายพันธุ์สามารถดื้อยาได้ตั้งแต่สามกลุ่มขึ้นไป เรียกว่า เชื้อดื้อยาหลายขนานหรือที่รู้จักกันว่า Multi-Drug Resistance (MDR) จากข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติที่ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลความไวของ *P. aeruginosa* ต่อยากลุ่มต่างๆ จากโรงพยาบาลทั่วประเทศไทยพบว่า *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมในช่วงปี ค .ศ. 1998-2007

ประมาณร้อยละ 11-29 ส่วนกลุ่มควิโนโลน คือ ciprofloxacin มีอัตราการดื้อยาประมาณร้อยละ 24-30 และในส่วนของยาในกลุ่มเบต้าแลคแทม คือ ceftazidime ซึ่งมีอัตราการดื้อยาประมาณร้อยละ 23-30 และยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ คือ gentamicin มีอัตราการดื้อยาประมาณร้อยละ 27-37 ทวีวงศ์และคณะทำการเปรียบเทียบการติดเชื้อในช่วงปีพ.ศ. 2543-2545 และ 2546-2548 เชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 และ 4 และยาในกลุ่ม aminoglycosides ลดลง แต่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบยังคงมีความไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems ยกเว้น *P. aeruginosa* ซึ่งมีความไวต่อยาในกลุ่มนี้ลดลง ซึ่งแนวโน้มการดื้อยาของ *P. aeruginosa* นี้ไม่เพียงเป็นปัญหาในประเทศไทยเท่านั้น Raja และคณะทำการศึกษาในประเทศมาเลเซีย พบว่า multidrug-resistant *P. aeruginosa* มีการดื้อยา meropenem ร้อยละ 36.8 cefoperazone/sulbactam ร้อยละ และยา 40.3 cefepime ร้อยละ 38.9 นอกจากนี้เป็นปัญหาในแถบเอเชียแล้ว Hanberger และคณะ ศึกษาในกลุ่มประเทศสวีดิช พบอัตราการดื้อยาต่ำในเชื้อกลุ่ม Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli*, Cefotaxime resistance *Klebsiella* spp. ยกเว้นเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีอัตราการดื้อยาสูงคือ ดื้อต่อ imipenem ร้อยละ และดื้อต่อ 33-22 Ciprofloxacin ร้อยละ และการดื้อยา 21-5 ของเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่มีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลา

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในปัจจุบันมีข้อมูลทางด้านความชุกของ MDR *P. aeruginosa* ไม่มากนัก แต่จากการรวบรวมพบว่าในประเทศกลุ่มยุโรป ระหว่างปีค.ศ.1997 ถึง 2002 สัดส่วนของ MDR *P. aeruginosa* เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5.1 เป็น 11.5 ส่วนในประเทศแถบละตินอเมริกาเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 12.0 เป็น 18.7 และเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.5 เป็น 3.0 ในสหรัฐอเมริกา ในประเทศญี่ปุ่นการศึกษาของ Tsuji และคณะพบ MDR *P. aeruginosa* ร้อยละ 2.8 (n = 3233)

เป็นที่ทราบกันดีว่า *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิดมาแต่กำเนิด (Intrinsic resistance) และยังสามารถปรับตัวหรือรับกลไกการดื้อยาอื่นๆ จากสิ่งแวดล้อม (Acquired resistance) ได้อีกด้วย โดยการดื้อยาของ *P. aeruginosa* มักประกอบด้วยกลไกหลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ การดื้อยาที่ออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ gyrase, topoisomerase และ การเปลี่ยนแปลงที่ ribosomal protein จะคือโดยการเปลี่ยนแปลงที่เอนไซม์อื่นๆ ทำให้ดื้อต่อยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์และฟลูออโรควิโนโลน หรือการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ทำให้ดื้อต่อยาในกลุ่มเบต้าแลคแทม หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน OprD ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการนำเข้ายาทำให้ยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์เข้าเซลล์ได้ลดลง นอกจากนี้ยังมีกลไกการขับยาออกจากเซลล์ (efflux pump) ซึ่งกลไกนี้มีผลต่อยาหลายชนิด

ดังนั้น หากสรุปในภาพรวมถึงความสำคัญและปัญหาที่เกิดจาก *P. aeruginosa* นั้น มีสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงที่สำคัญ คือ การป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มเสี่ยง ปัญหาการดื้อยาอย่างรวดเร็วของเชื้อนี้ รวมทั้งความต้องการยาต้านจุลชีพรุ่นใหม่เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งยังคงเป็นโจทย์สำคัญที่ยังต้องการการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้ผลกับเชื้อที่มีการปรับตัวดื้อยาอย่างรวดเร็ว

1.3.2 สมุนไพรที่นำมาศึกษาฤทธิ์ต่อแบคทีเรียดื้อยา

สมุนไพรแต่ละชนิดนั้นมีส่วนต่างๆของพืชที่น่าสนใจนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ไม่ว่าจะเป็นใบ ดอก แก่น ราก หรือส่วนอื่นๆ เป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำมันหอมระเหยมีบทบาทสำคัญในการปกป้องพืชจากแมลงและจุลินทรีย์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา ไวรัส นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดยังมี

กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ในปัจจุบันจึงมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยา อาหารและด้านการเกษตรเป็นอย่างมาก ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จะมุ่งเน้นการศึกษาผลต่อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากสมุนไพรร

น้ำมันหอมระเหยหรือ essential oil นั้นพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก กลีบเลี้ยง เมล็ด เปลือก แก่น รากหรือผล เป็นต้น มักใสและมีกลิ่นเฉพาะตัว กระบวนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชนั้นทำได้หลายวิธี แต่ที่นิยม คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ นอกจากนี้ยังทำได้โดยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลว การใช้ไมโครเวฟ ซึ่งวิธีการสกัดนี้จะมีผลต่อปริมาณและคุณภาพขององค์ประกอบแต่ละชนิดของน้ำมันที่สกัดได้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ควรคำนึงถึง เช่น ภูมิอากาศบริเวณแหล่งปลูก อายุพืชที่เก็บเกี่ยว และองค์ประกอบของดิน

น้ำมันหอมระเหยประกอบไปด้วยองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่ซับซ้อนและมีส่วนประกอบได้กว่า 20-70 ชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยมักพบองค์ประกอบหลักที่มีปริมาณสูงประมาณร้อยละ 20-60 และองค์ประกอบหลักเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นๆ ซึ่งอาจแบ่งออกเป็นหลักๆ ได้ 2-3 กลุ่ม คือ เทอร์ปีน (terpenes) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoides) และสารกลุ่มอื่นๆ (aromatic and aliphatic compounds) โดยกว่าร้อยละ 90 มักเป็นสารประเภทโมโนเทอร์ปีน

น้ำมันหอมระเหยที่จะนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้แก่

1. มะกรูด

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus hystrix* DC.

ชื่อสามัญ Kaffir lime

วงศ์ Rutaceae

มะกรูดเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กมีความสูงประมาณ 2-8 เมตรใบเป็นใบประกอบที่มีใบย่อยใบเดี่ยว มีสีเขียว รูปร่างค่อนข้างยาว มีลักษณะคอดกึ่งที่กลาง ใบเป็นตอนๆ มีก้านแผ่ออกใหญ่เท่ากับแผ่นใบ ทำให้ใบมี 2 ตอนใบเขียวแก่ค่อนข้างหนา ขนาดยาว 2.5-5 เซนติเมตร กว้าง 3-8 เซนติเมตร ผลมีรูปร่างค่อนข้างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-7 เซนติเมตร มีสีเขียวเข้ม ผิวขรุขระเป็นลูกคลื่น มีรสเปรี้ยวและขมเล็กน้อย

องค์ประกอบหลักที่ได้จากใบมะกรูดมี citronellal เป็นองค์ประกอบอยู่ถึงร้อยละ 80 และนอกจากนี้ยังพบสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากใบมะกรูดอีกหลายชนิด คือ citronellol (10%), nerol, α -pinene, β -pinene, terpinene-4-ol, citronelly acetate, geraniol, geranial acetate, δ -cadinene, sabinene, caryophyllene, neral และ linalool

สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่พบที่ผิวมะกรูดประกอบด้วย β -pinene (39.3%) and limonene (14.2%) และองค์ประกอบอื่นๆ ประกอบด้วย caryophyllene, sabinene, citronellal, 1,8-cineol, linalool, mycene, α -pinene, α -terpineol, citronellol, geraniol, elemol, β -cubenene, cineolo, cyclohexanol, narigin, rutin, hesperidine, quercetin และ kaempferol

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากใบมะกรูด พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากใบมะกรูดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* และนอกจากนี้ยัง

พบว่า สารสกัดจากใบมะกรูดที่สกัดด้วยเอทานอลมีผลในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* โดยจากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ได้จากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 89.6 mm ลดลงเหลือ 41.6 mm สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่า สารสกัดจากผิวมะกรูดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella enterica* และนอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis*

2. ขมิ้น

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma longa* Linn.

ชื่อสามัญ Turmeric

วงศ์ Zingiberaceae

ขมิ้นเป็นพืชล้มลุกมีเหงาอยู่ใต้ดินมีส่วนสูงประมาณ 30-90 เซนติเมตรเจริญเติบโตได้ดีในทุกฤดูกาล เนื้อในของขมิ้นมีสีเหลืองเข้มจนถึงสีแดงมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบเรียวยาว ปลายแหลมใบคล้ายรูปหอก ก้านใบแคบๆมีร่องเล็กๆสีเขียวอมน้ำตาลใบขนาดกว้างประมาณ 12-15 เซนติเมตรยาวประมาณ 30-40 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อขนาดใหญ่ มีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรงแทรกขึ้นระหว่างก้านใบ กลีบดอกมีสีเหลืองอ่อน ปลายช่อสีชมพูอ่อน เมล็ดมีลักษณะเป็นทรงกลม

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นพบว่ามีองค์ประกอบสำคัญ 2 ชนิดคือ น้ำมันหอมระเหยและสารพวงสีเหลือง (curcuminoids) น้ำมันหอมระเหยมีประมาณร้อยละ 1.5-6.0 ซึ่งประกอบด้วยสารประเภท sesquiterpenes หลายชนิด คือ germacrone, turmerone, bisabolene, curcumene, zingiberene, sesquiphellandene, diascurone, curcumenone, dehydrocurdione, procurcumadiol, bis-acumol, curcumenol, isoprocurcumenol, epiprocurcumenal, procurcumenol, zedoaronediol, curlone, turmeronol A และ turmeronol B

จากการศึกษาความสามารถในการต้านจุลชีพของสารสกัดจากขมิ้นด้วย ethyl acetate เปรียบเทียบกับการสกัดด้วย methanol และน้ำ พบว่าสารสกัดขมิ้นที่สกัดด้วย ethyl acetate ให้ผลที่ดีที่สุดในการต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin และนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดขมิ้นที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl acetate เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้าน Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ampicillin และ oxacillin ด้วยวิธี checkerboard method ผลจากการทดลองพบว่าสารสกัดขมิ้นที่สกัดด้วย ethyl acetate มีผลทำให้ค่า MIC ที่มีต่อเชื้อ MRSA ของยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดลดลงซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นอยู่ในช่วง 0.125-2 มก./มล.

3. ตะไคร้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf.

ชื่อสามัญ Lemongrass

วงศ์ Poaceae

ตะไคร้เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปเจริญเติบโตทุกฤดูกาล ตะไคร้เป็นพืชล้มลุกมีลักษณะลำต้นขึ้นเป็นกอรูปทรงกระบอก แข็ง เกลี้ยง สูงประมาณ 75-120 เซนติเมตร ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า มีกลิ่นเฉพาะตัว มีสีขาวนวลหรือขาวปนม่วง ใบรูปขอบขนานแคบแผ่นใบสากและคม มีสีเขียวแกมเทา ปลายใบค่อนข้างแหลม ตามขอบมีขนเล็กน้อยกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 70-100 เซนติเมตร ใบเมื่อขยี้จะมีกลิ่นฉุนเนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย ดอกขนาดเล็กเป็นช่อกระจาย

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากตะไคร้มี citral เป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 75-80 ซึ่งพบว่า citral ที่เป็นการผสมกันระหว่าง 2 stereoisomeric monoterpene aldehyde คือ citral A (geranial) และ citral B (neral) ซึ่งพบว่า trans isomer geranial จะมีปริมาณมากกว่า cis isomer neral ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ geranoil, myrcene, citronellal, linalool, nerol, geranyl acetate, 1,8-cineol, citronellol, linalyl acetate, α -terpineol, α -pinene, limonene, caryophyllene, ocimene, terpendene, methyl heptanone และ β -caryophyllene

มีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดตะไคร้พบว่า มีการพัฒนาครีมที่ใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราที่มีส่วนของน้ำมันตะไคร้ร้อยละ 2.5 โดยทดสอบกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum gypseum* จำนวน 35 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย ซึ่งผลการทดลองพบว่าครีมที่มีส่วนผสมของน้ำมันตะไคร้ให้ผลดีในการต้านเชื้อรา

สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันตะไคร้พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ที่ในสถานะที่มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 4.0 และเมื่อทำการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองโดยทำการทดสอบในหนู ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับน้ำมันตะไคร้จะมีปริมาณของ *H. pylori* น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูก่อนควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันตะไคร้

4. โหระพา

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum basilicum* Linn.

ชื่อสามัญ Sweet basil

วงศ์ Lamiaceae

โหระพาเป็นพืชตระกูลล้มลุกขนาดเล็ก ทุกส่วนมีกลิ่นหอม ลำต้นเป็นสี่เหลี่ยม กิ่งอ่อนมีสีเขียวแกมม่วงใบเป็นใบเดี่ยว ออกเป็นคู่ตรงข้าม รูปวงรีกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยห่างๆ มีขนอ่อนปกคลุมใบและต้น ดอกต้นเป็นชั้นคล้ายฉัตร ดอกสีขาว แดงอ่อน กลีบเลี้ยงสีเขียว แยกเป็น 2 ปาก ปากล่างมีแถบสีม่วงแดงคาดตามยาว ปากบนขนาดใหญ่กว่า ปลายแยกเป็น 4 กลีบมีใบประดับสีเขียวแกมม่วง ผลรูปวงรีหรือขอบขนานแกมวงรี ยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้ 4 อัน ผลขนาดเล็กเปลือกแข็ง

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากโหระพาที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าจะมีสีเหลืองอ่อน ในใบโหระพามีน้ำมันหอมระเหยอยู่ประมาณร้อยละ 0.1-1.0 โดยองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี gas chromatography พบว่าในน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วย terpenoid, linalool และ 1,8 cineol มากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด นอกจากนี้พบว่ายังประกอบด้วย methyl chavicol, eugenol, caffeic acid และ rosmarinic acid

สำหรับฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย มีการศึกษากับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ได้แก่ *Staphylococcus*, *Enterococcus* และ *Pseudomonas* โดยเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นเป็นเชื้อที่มีความสามารถในดื้อยาได้หลายขนานที่เรียกกันว่า multidrug resistance ซึ่งจากการทดลองพบว่าน้ำมันโหระพามีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อในกลุ่มดังกล่าวข้างต้น และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยน้ำต่อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเน่าเสียของอาหาร โดยทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันโหระพาสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้ยกเว้น *Flavomonas*, *Oryzihabitans* และ *Pseudomonas* และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า linalool ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันโหระพาพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* และ *Mucor* spp. ในระบบปิด



มะกรูด



กะเพรา



โหระพา



พลู



มะนาว



ตะไคร้



แมงลัก



ตะไคร้หอม



ฝรั่ง

รูปที่ 1 ตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบโดยใช้น้ำมันหอมระเหย

5. กะเพรา

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum tenuiflorum* Linn.

ชื่อสามัญ Holy basil

วงศ์ Lamiaceae

กะเพราเป็นไม้พุ่ม โคนต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง ปลายกิ่งเป็นไม้เนื้ออ่อน ทุกส่วนมีขนโดยเฉพาะส่วนที่ยังอ่อนอยู่จะมีขนปกคลุมมากกว่าส่วนแก่ กะเพรา มี 3 สายพันธุ์คือ กะเพราแดง กะเพราขาว และกะเพราลูกผสม กะเพรา มีลักษณะทั่วไปคล้ายกับ *O. basilicum* หรือโหระพา ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว ขนและสีของใบขึ้นอยู่กับพันธุ์ กะเพราแดงจะมีแผ่นใบเป็นสีม่วง กะเพราขาวใบออกสีเขียว กะเพราลูกผสมจะมีใบออกสีม่วงแดงอมเขียว ออกดอกเป็นช่อ กลีบดอกสีขาว

ในใบกะเพรามีน้ำมันหอมระเหยอยู่ร้อยละ 0.35 น้ำมันมีสีเหลืองอ่อนโดยพบว่ามีองค์ประกอบของน้ำมันกะเพรา มี eugenol เป็นหลักซึ่งมีอยู่ถึงร้อยละ 70 และนอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารหลายชนิดคือ camphor, cineol, methyl eugenol, caryophyllene, pinenes, sabinene, terpineol, ocimol, linalool, ursolic acid, rosmarinic acid และ flavonoid และนอกจากนี้พบว่าในเมล็ดของกะเพราประกอบด้วย fixed oil ซึ่งมีองค์ประกอบคือ กรดไขมัน 5 ชนิด ซึ่งพบว่าประกอบด้วย linolenic acid ประมาณร้อยละ 17 และ linoleic acid มากกว่าร้อยละ 50

มีรายงานพบว่าสารสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ที่ได้จากกะเพรา มีความสามารถในการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ ผลจากการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยน้ำของกะเพราที่มีความเข้มข้น 30 มก./มล. มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Proteus* และ *Staphylococcus aureus* ในขณะที่สารสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 60 mg/ml มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio cholerae*

6. พลู

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper betle* Linn.

ชื่อสามัญ Betel vine

วงศ์ Piperaceae

พลูเป็นไม้เถาเลื้อย เนื้อแข็ง ลำต้นเกลี้ยง เลื้อยพันต้นไม้ต้นอื่น อาศัยรากที่เกาะติดตามข้อ ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว ออกสลับกัน รูปหัวใจหรือรูปกลมค่อนไปทางรูปรีกว้าง 8-12 เซนติเมตร ยาว 12-16 เซนติเมตร ปลายใบแหลมหรือเรียวแหลม เนื้อใบค่อนข้างเป็นมัน สดเขียว มีกลิ่นหอมเฉพาะรสเผ็ดร้อน เส้นใบนูนเด่นทางด้านล่าง ก้านใบยาว ดอกสีขาวออกเป็นช่อแน่นบนแกนยาว เป็นช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมีย มีใบประดับเล็กรูปรี รูปไข่กลับหรือกลม ผลกลมเล็กเบียดอยู่บนแกนใน หนึ่งผลจะมีเพียงเมล็ดเดียวและเมล็ดค่อนข้างกลม

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพลู โดยพบว่าน้ำมันพลูที่ได้จากกลั่นด้วยไอน้ำจะมีน้ำมันพลูอยู่ร้อยละ 0.2 (wt/wt) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพลูด้วย GC และ GC-MS พบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด 64 ชนิดซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นน้ำมันหอมระเหยถึงร้อยละ 99 โดยองค์ประกอบที่พบคือ acetyl eugenol (31.768%), tran-isoeugenol (28.322%), 4-allylphenyl acetate (8.053%), β -caryophyllene (3.063%), germacrene-D (2.91%), α -amorphone (2.520%), α -cadinol (2.446%) and chavicol (1.994%)

จากการศึกษาผลต้านเชื้อแบคทีเรียของพลู ผลการทดลองพบว่าใบพลูมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียในช่องปาก เช่น *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus mutans* และนอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากพลูมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* และ *Klebsiella aerogenes* ผลจากการทดลองที่ผ่านมามีพบว่าน้ำมันพลูมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ นอกเหนือจากนั้นน้ำมันพลูยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดการบูดเสียของอาหาร อาทิเช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus planrurum*, *Bacillus stearothermophilus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium rubrum*, *Candida utilis* และ *Saccharomyces cerevisiae*

7. ไพล

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zingiber purpureum* Rosc. (*Z. cassumunar* Roxb.)

ชื่อสามัญ Phlai

วงศ์ Zingiberaceae

เป็นไม้ล้มลุกสูง 0.7-1.5 เมตร มีเหง้าใต้ดิน เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองแกมเขียว มีกลิ่นเฉพาะ แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกัน ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 3.5-5.5 เซนติเมตร ยาว 18-35 เซนติเมตร ดอกช่อแทงจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีนวลใบประดับสีม่วง ผลเป็นผลแห้งรูปกลม

องค์ประกอบน้ำมันที่นำเหง้าใต้ดินมากลั่นด้วยไอน้ำ มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเย็น พบว่าส่วนประกอบที่สำคัญคือ sabinene (25-45%), γ -terpinene (5-10)%, α -terpinene (2-5%), terinene-4-ol (25-45%) และ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl), butadiene (DMPBD) (1-10%) และนอกจากนี้ยังพบสารสำคัญในเหง้าไพล คือ cassumunar A, B และ C ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย curcumin และมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ไพลมีฤทธิ์ในการต้านการศึกษาค้นคว้าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไพลพบว่าการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Fusarium oxysporum* และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเจลฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีน้ำมันไพลเป็นส่วนประกอบ พบว่าเจลฆ่าเชื้อที่มีน้ำมันไพลเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 5 มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังที่อยู่ในกลุ่มของ *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ในกลุ่ม *C. albicans* และ *C. neoformans* โดยมีค่า MFC อยู่ในช่วง 13.8-39.5 มก./มล. แต่เมื่อนำไปทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในกลุ่มของ *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* และ *P. vulgaris* พบว่าครีมดังกล่าวข้างต้นให้ฤทธิ์ไม่ดีเท่าที่ควรในการต้านการเจริญของเชื้อ

8. แมงลัก

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum americanum* Linn.

ชื่อสามัญ Hairy basil

วงศ์ Lamiaceae

แมงลักเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรง แตกกิ่งก้านมาก มีกลิ่นหอม สูงประมาณ 0.3-1 เมตรลำต้นและกิ่งก้านเป็นเหลี่ยม สีเขียวแกมเหลือง เมื่อยังอ่อนมีขนสีขาวหนาแน่น รูปใบหอกถึงรูปวงรี โคนใบเป็นรูปลิ้นปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ มีต่อมน้ำมันทั่วไป ดอกออกเป็นช่อตามบริเวณปลายกิ่งหรือยอด ดอกมีลักษณะเป็นกลีบสีขาว ผลมีสีน้ำตาลเข้ม มีขนาดเล็ก

น้ำมันจากใบและดอกของแมงลักที่สกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำ มีสารประกอบ monoterpene และ sesquiterpene ซึ่งมีสารประกอบที่สำคัญได้แก่ limonene, 1,8-cineol, δ -cadinene, α -pinene และ α -terpineol เมล็ดแมงลักประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่และสารประกอบอื่นๆ เช่น camphene, mucilage, myrcene oil, D-glucose เป็นต้น

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของน้ำมันแมงลักพบว่า น้ำมันแมงลักมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *P. vulgaris* และ *S. epidermis* ฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *R. oryzae*, *Candida albicans* และ *Collectotrichum musae*

9. ฝรั่ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Psidium guajava* L.

ชื่อสามัญ Guava

วงศ์ Myrtaceae

ฝรั่งเป็นไม้ยืนต้นสูง 3-10 เมตร ต้นเกลี้ยงมัน เปลือกต้นเรียบ ใบเดี่ยว กิ่งอ่อนเป็นสี่เหลี่ยม ยอดอ่อนมีขนสั้นๆ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปวงรีแกมขอบขนาน ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือช่อ 2-3 ดอกออกที่ซอกใบ ผลบริโภคได้ทั้งดิบและสุก

ใบฝรั่งมีน้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบ α -pinene, β -pinene, limonene, menthol, terpenyl acetate, isopropyl alcohol, longicyclene, caryophyllene, β -bisabolene, cineol, caryophyllene oxide, β -copanene, farnesene, humulene, selinene, cardinene และ curcumene

มีการใช้ใบฝรั่งสำหรับแก้ท้องเสีย ท้องเดิน ปวดท้องกันมาแต่โบราณ และมีรายงานฤทธิ์ฆ่าเชื้อและฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่า สารสกัดน้ำและแอลกอฮอล์ของใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Proteus* spp., *Shigella* spp. และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินอาหารได้ โดยสารสำคัญที่พบ คือ อนุพันธ์ของ quercetin นอกจากนี้สารสกัดใบฝรั่งยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ได้อีกด้วย

10. มะนาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus aurantifolia*, Sevingle

ชื่อสามัญ Lime

วงศ์ Rutaceae

มะนาวเป็นไม้ในตระกูลส้ม เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นทรงพุ่ม มีความสูงเฉลี่ย 10-20 ฟุต ใบของมะนาวมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว มีขนาดเล็กกว้างประมาณ 3-6 ซม. ยาวประมาณ 6-12 ซม. รูปร่างเป็นแบบรีหรือทรงไข่ ฐานใบมีลักษณะกลม ปลายใบมีรูปแหลม ป้าน ดอกมะนาวอาจเกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือช่อก็ได้ ผลมะนาวมีรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ มีทั้งรูปร่างยาวรี รูปไข่ และรูปร่างกลม น้ำมะนาวนิยมใช้รักษาอาการไอ ขับเสมหะ ทำให้ชุ่มคอ ช่วยย่อยอาหาร ส่วนเปลือกผลมีฤทธิ์ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ

มะนาวมีน้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบของ limonene เป็นหลักถึงร้อยละ 85.5 นอกจากนี้ยังพบ telinene, myrcene, sabinene และ pinene มีรายงานว่าสารสกัดเมทานอลของมะนาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดีมาก นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากผิวของผลมะนาวยังยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ดีอีกด้วย

11. ตะไคร้หอม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle

ชื่อสามัญ Citronella grass

วงศ์ Gramineae

ตะไคร้หอมเป็นไม้ล้มลุกที่เกิดจากหัวหรือเหง้าที่อยู่ใต้ดิน ลำต้นจะตั้งตรง แต่จะแตกออกมาเป็นกอที่โคนจะเป็นกาบชั้นๆ เหมือนกับตะไคร้บ้าน แต่ใบจะยาวกว่าตะไคร้บ้าน แต่ลำต้นจะเป็นสีแดง สูงประมาณ 2 เมตร

น้ำมันตะไคร้หอมประกอบไปด้วย monoterpenes หลากหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบ citronellyl acetate, β -bourbonene, geranyl acetate, elemol, l-borneol, และ nerol อีกด้วย มีรายงานว่าน้ำมันตะไคร้หอมมีฤทธิ์ต้าน *P. acnes* ได้ดี โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 0.005–0.3 และ 0.6–1.2 มคล./มล. นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วย

12. กระชาย

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

ชื่อสามัญ Finger root

ชื่อวงศ์ Zingiberaceae

กระชายเป็นไม้ล้มลุกไม่มีลำต้นบนดิน มีเหง้าใต้ดินซึ่งแตกรากออกไปเป็นกระจุก อวบน้ำ ใบเดี่ยวเรียงสลับเป็นระนาบเดียวกัน รูปขอบขนานแกมรูปไข่ ตรงกลางด้านในของก้านใบมีร่องลึก ดอก ช่อ ออกแทรกอยู่ระหว่างกาบใบที่โคนต้น กลีบดอกสีขาวหรือชมพูอ่อน ส่วนเหง้านิยมใช้แก้ โรคในปาก เช่น ปากเปื่อย ปากเป็นแผล ปากแห้ง

น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วย trans- β -Ocimene 26.81%, camphor 23.71%, 1,8-cineole 16.92%, camphene 8.1%, geraniol 10.91%, cis-ocimene 3.12%, methyl-cis-cinnamate

3.11%, limonene 2.23%, linalool 1.77%, α -pinene 0.91%, β -terpineol 0.75%, β -myrcene 0.55%, β -farnesene 0.34%, trans- β -Bergamotene 0.33%, neryl acetate 0.26% และ β -bisabolene 0.17%

13. กานพลู

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry

ชื่อสามัญ Clove

ชื่อวงศ์ Myrtaceae

กานพลูเป็นไม้ยืนต้น ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามรูปวงรีหรือรูปใบหอก ขอบเป็นคลื่น ใบอ่อนสีแดงหรือน้ำตาลแดง เนื้อใบบางค่อนข้างเหนียว ผิวมัน ดอกช่อออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีขาว ดอกตูมแห้งนิยมใช้แก้ปวดฟัน แก้ท้องเสีย ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อ ดับกลิ่นปาก

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำมีฤทธิ์ยับยั้ง *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Salmonella enteritidis* DMST 17368, *Escherichia coli* TISTR 292, *Clostridium perfringens* DMST 15191, *Campylobacter jejuni* DMST 15190 และน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, และ *Escherichia coli* โดยมี ค่า MIC >6.4, >3.2, >6.4, >3.2, >1.6, >1.6 mg/mL ตามลำดับ

องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยในดอกตูมประกอบด้วย eugenol 96.24% และ caryophyllene 1.06% ส่วนในใบประกอบด้วย eugenol 76.8%, β -caryophyllene 17.4%, α -humulene 2.1% และ eugenol acetate 1.2%

14. อบเชย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cinnamomum zeylanicum* (อบเชยเทศ)

Cinnamomum cassia (อบเชยจีน)

Cinnamomum loureirii (อบเชยญวน)

Cinnamomum burmannii (อบเชยชวา)

Cinnamomum bejolghotha (อบเชยไทย)

ชื่อสามัญ Cinnamon

ชื่อวงศ์ Lauraceae

อบเชยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ไม้ผลัดใบ เปลือกหนาใบรูปหอกปลายและโคนแหลม เส้นใบตามยาว 3 เส้น ใบค่อนข้างหนาและผิวเรียบมันสีชมพูอมแดงและจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มเมื่อแก่ ดอกเล็กเป็นช่อตามปลายกิ่งมีสีเหลืองอ่อน ผลมีสีดำรูปไข่ ผิวเปลือกเรียบบาง อบเชยเทศมีการปลูกมากในศรีลังกาจัดเป็นอบเชยที่มีคุณภาพดีที่สุด อบเชยชอบอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิเฉลี่ย 20 องศาเซลเซียส หลังจากปลูกไปแล้ว 2 - 3 ปี จะสามารถเก็บเกี่ยวได้ กิ่งหรือต้นที่เหมาะสมสำหรับตัดคือ ต้นที่มีขนาดเท่านี้่มือ ยาวประมาณ 6-8 ฟุต ตัดให้เหลือโคนต้นสูงจากพื้นดิน 10 - 15 เซนติเมตร เพื่อให้แตกยอดใหม่ ซึ่งจะสามารถตัดได้ทุก 2 - 3 ปี และควรตัดในฤดูฝนซึ่งจะสามารถลอกเปลือกได้ง่าย วิธีลอกเปลือกโดยการใช้มีดกรีดตาม

ความยาวกิ่ง 2 ด้าน ตรงกันข้ามกัน เพื่อแบ่งออกเป็น 2 ส่วน แซะเปลือกออกจากกัน นำไปผึ่งไว้เมื่อเปลือกเริ่มแห้งจะหดตัว ม้วนงอ นำเปลือกม้วนเรียงต่อกัน จนเป็นท่อนยาวแน่น นำไปตากแดด 3 วัน และผึ่งในที่ร่มอีก 3 วัน ผลผลิตอบเชยแห้ง 8 - 10 กิโลกรัมต่อไร่ และผลผลิตจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น

ในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้เปลือกเป็นเครื่องเทศ เครื่องหอม และทำยาตำรับแผนโบราณ เช่น ใช้ในการแก้จุกเสียด แน่นท้อง หรือใช้ในการทำยานัตถุ์ใช้สูดดมเพื่อความสะดวกขึ้น ลดอาการอ่อนเพลีย แก้โรคท้องร่วงเพราะมีส่วนช่วยต้านแบคทีเรียในกระเพาะอาหาร ขับปัสสาวะ ช่วยในการย่อยอาหารและสลายไขมัน

องค์ประกอบหลักที่พบในช่อบเชย ประกอบด้วยเทอร์ปีนไฮโดรคาร์บอน (terpene hydrocarbons) ร้อยละ 78 ออกซิเจนเทอร์พีนอยด์ (oxygenated terpenoids) ร้อยละ 9 ซึ่งสารประกอบหลัก ได้แก่ α -Bergamotene ร้อยละ 27.38 และ α -copaene ร้อยละ 23.05

องค์ประกอบที่พบในเปลือกอบเชย คือ α -Pinene ร้อยละ 1.64 Benzaldehyde ร้อยละ 9.94 1,8-Cineole ร้อยละ 1.55 Limonene ร้อยละ 4.42 Linalool ร้อยละ 1.38 trans-Cinnamaldehyde ร้อยละ 68.95 Eugenol ร้อยละ 2.77 trans-Cinnamyl acetate ร้อยละ 7.44 และ trans-Cinnamic acid ร้อยละ 1.15

มีการศึกษาพบว่าน้ำมันซินนามอนเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยค่าที่ต่ำซึ่งน้อยกว่า 20 มก./มล. สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งเชื้อรา ด้วยค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ดังนี้ *Staphylococcus aureus* 0.56 มก./มล. *Streptococcus pneumoniae* น้อยกว่า 0.04 มก./มล. *Enterobacter aerogenes* 0.56 มก./มล. *Escherichia coli* 1.12 มก./มล. *Klebsiella pneumoniae* 0.14 มก./มล. *Pseudomonas aeruginosa* 0.28 มก./มล. *Salmonella typhimurium* 0.14 มก./มล. *Clostridium perfringens* 0.14 มก./มล. *Listeria monocytogenes* 0.56 มก./มล. และ *Candida albicans* 0.07 มก./มล.

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเก็บรวบรวมเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาต่างๆ ในประเทศไทย

ทำการติดต่อและเก็บรวบรวม *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาจากโรงพยาบาลต่างๆ จากทั่วประเทศ ไทย ดังต่อไปนี้

ภาคกลาง – โรงพยาบาลศิริราช
โรงพยาบาลรามาริบัติ
ภาคเหนือ – โรงพยาบาลมหาธาชนครเชียงใหม่
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ – โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ขอนแก่น
โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี
ภาคใต้ – โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี
โรงพยาบาลสงขลานครินทร์
ภาคตะวันออก – โรงพยาบาลชลบุรี
โรงพยาบาลศูนย์ระยอง

2.2 การทดสอบเอกลักษณ์ทางด้านจุลชีววิทยา/ชีวเคมีและการทดสอบการดื้อต่อยา

นำเชื้อ *P. aeruginosa* มาทดสอบเอกลักษณ์ แล้วคัดแยกโดยวิธี disk diffusion และคัดเลือกเชื้อที่จัดเป็น multidrug resistant *P. aeruginosa* โดยยาที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ ประกอบด้วย gentamicin imipenem/meropenem, ciprofloxacin, ceftazidime, piperacillin โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่จัดเป็น MDR จะตัดสินตาม zone of inhibition โดยใช้เกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009 ดังตารางที่ 2

การคำนวณทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0 โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดข้อมูล ด้วยวิธี chi square test

ตารางที่ 2 Zone of inhibition โดยใช้เกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009

Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm		
		R	I	S
Ceftazidime	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Imipenem	10 µg	≤ 13	14 - 15	≥ 16
Meropenem	10 µg	≤ 13	14 - 15	≥ 16
Gentamicin	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Ciprofloxacin	5 µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Piperacillin	100 µg	≤ 17	-	≥ 18

2.3 การทดสอบความไวของเชื้อต่อน้ำมันหอมระเหย

2.3.1 น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยซื้อจาก Thai-China flavors & fragrances industry Co., Ltd. ได้แก่ betel vine oil, cinnamon bark oil, citronella oil, clove oil, clove leaf oil, galanga oil, guava leaf oil, hairy basil oil, holy basil oil, kaffir lime oil, kaffir lime leaf oil, lemon oil, lemongrass oil, lesser galangal oil, plai oil, sweet basil oil, and turmeric oil

2.3.2 แบคทีเรียและสภาวะเลี้ยงเชื้อ

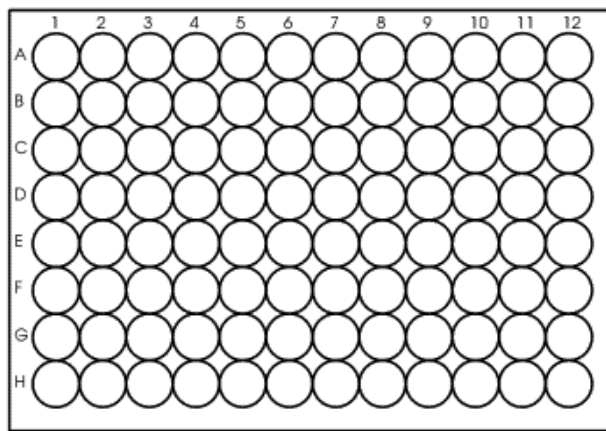
นำเชื้อ *P. aeruginosa* จาก stock มา subculture ลงใน Tryptic Soy Broth (TSB) แล้วนำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-16 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อที่ได้ ปริมาตร 0.5 ml ลงใน TSB 49.5 ml แล้วนำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C, 200 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี broth microdilution (Antibacterial susceptibility test)

เริ่มจากการทดสอบน้ำมันหอมระเหย 17 ชนิดกับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐาน จากนั้นจึงคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดี 2-3 ชนิดจากทั้งหมด เพื่อทดสอบกับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาที่แยกได้จากผู้ป่วย 20 สายพันธุ์

2.4.1 การทดลองหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

- เตรียมน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2 v/v โดยใช้ essential oil: tween 80: 95% ethanol: TSB ในอัตราส่วน 2: 4: 6: 88
- นำเชื้อที่เลี้ยงใน TSB อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง มาปรับความขุ่น (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ absorbance เท่ากับ 0.1
- ปิเปต TSB ปริมาตร 90 μl ใส่ใน 96-well plate (รูปที่ 2) ทุกหลุมยกเว้นแถว A
- ปิเปตน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการทดสอบปริมาตร 90 μl ใส่ลงทุกหลุมของแถว A และ B โดยน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดทำ 3 ซ้ำ



รูปที่ 2 96-well plate สำหรับหาค่า MIC

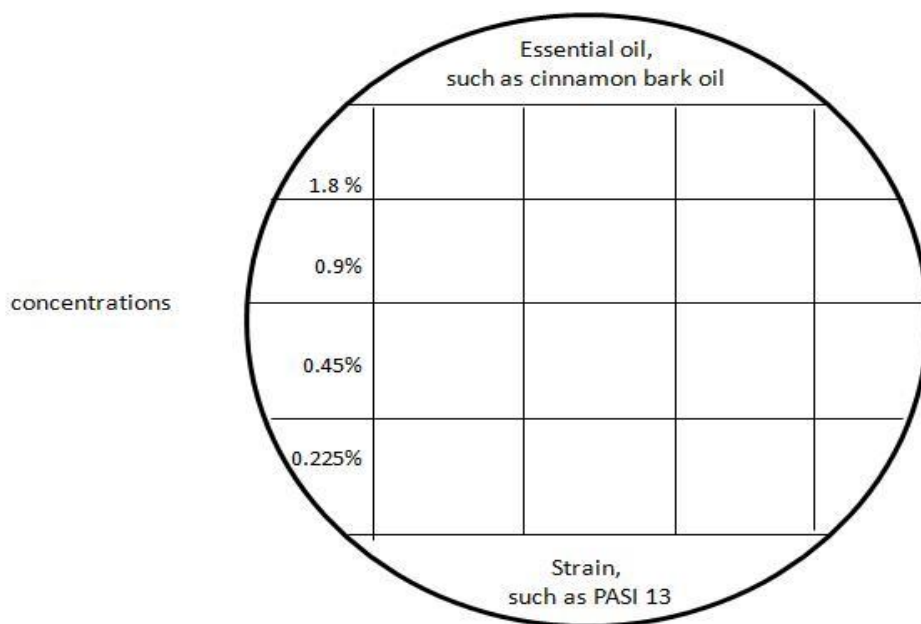
- เจือจางสารจากแถว B จนถึงแถว H ด้วยวิธี two-fold serial dilution
- เติมเชื้อที่ปรับความขุ่น (OD) แล้วปริมาตร 10 μl ลงในทุกหลุม ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ 2
- นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- บันทึกและแปลผล โดยค่า MIC คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ได้จากหลุมที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุดที่สารละลายในหลุมยังใสอยู่

2.4.2 การทดลองหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

- สารจากทุกหลุมที่ใส ปริมาตร 10 μl หยดลงบน TSA plate ที่เตรียมไว้ (รูปที่ 3)
- นำ TSA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- บันทึกและแปลผล โดยค่า MBC คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อได้ โดยดูจากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่น้อยที่สุดที่ทำให้ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3 การเตรียมสารและความเข้มข้นสุดท้ายสำหรับการทดสอบความไวของเชื้อ

แถว	TSB (μ l)	Essential oil	ปริมาณเชื้อ (μ l)	Final concentration	
				μ l/ml	%v/v
A	-	90 μ l of stock solution	10	18.00	1.8000
B	90	90 μ l of stock solution	10	9.00	0.9000
C	90	90 μ l from B	10	4.50	0.4500
D	90	90 μ l from C	10	2.25	0.2250
E	90	90 μ l from D	10	1.12	0.1125
F	90	90 μ l from E	10	0.56	0.0562
G	90	90 μ l from F	10	0.28	0.0281
H	90	90 μ l from G	10	0.14	0.0141



รูปที่ 3 การเตรียม TSA plate สำหรับหาค่า MBC

2.5 การหาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Bioautography

คัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาทั้ง 20 สายพันธุ์

2.5.1 การทำ TLC

- เตรียม system ซึ่งประกอบด้วย toluene : ethyl acetate (93:7) แล้วทิ้งให้อิ่มตัว ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที
- เตรียมสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักของน้ำมันหอมระเหย ให้ได้ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2 v/v เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการแปลผล โดยใช้ eugenol และ cinnamaldehyde สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยเตรียมร้อยละ 5 v/v
- spot สารมาตรฐานและน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้บนแผ่น TLC aluminium silica gel GF254 โดยทาไว้เหมือนกัน 2 แผ่น ดังนี้
 - spot ที่ 1 คือ สารละลายน้ำมันเปลือกอบเชย
 - spot ที่ 2 คือ สารละลายมาตรฐาน eugenol
 - spot ที่ 3 คือ สารละลายมาตรฐาน cinnamaldehyde
- นำแผ่น TLC ไป develop ใน system ที่เตรียมไว้ เมื่อถึงระยะที่กำหนดจึงนำขึ้นมา และทิ้งให้ solvent ระเหยออกไปจนหมด
- นำ TLC แผ่นที่หนึ่งไปถ่ายภาพภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นพ่นด้วย anisaldehyde-sulphuric acid แล้วให้ความร้อน 110°C นาน 5 นาที
- จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสงขาว เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการแปลผล ส่วน TLC แผ่นที่สองนำไปใช้ในการทดสอบด้วย bioautography

2.5.2 การเตรียม Agar base และ Agar seed

- เตรียม agar base โดยใช้อัตราส่วน TSB 30 กรัม และ agar 15 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันใน erlenmeyer flask
- เตรียม agar seed โดยใช้อัตราส่วน TSB 30 กรัม และ agar 11 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่ใน test tube หลอดละ 13.5 ml
- นำ agar base และ agar seed เข้า autoclave อุณหภูมิ 121°C 15 นาที
- เท agar base ลงใน Petri dish ที่ sterile แล้ว ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

2.5.3 การทดลอง Bioautography

- นำเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานที่เลี้ยงใน TSB อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง มาปรับความขุ่น (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ absorbance เท่ากับ 0.1 (จำนวนเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml)
- จากนั้นเจือจางด้วย 0.9% NSS ด้วยวิธี two-fold serial dilution จนได้จำนวนเชื้อ ประมาณ 10^6 cfu/ml
- นำแผ่น TLC ที่ develop แล้ววางบน agar base ที่แข็งแล้ว โดยหงายด้าน silica gel ขึ้น
- ปิเปิดเชื้อที่เตรียมไว้ 1.5 ml ลงใน agar seed ที่อุณหภูมิประมาณ $40-45^{\circ}\text{C}$ แล้วเทลง

- บน agar base ที่มีแผ่น TLC วางอยู่ รอจนแข็งตัว
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- บันทึกและแปลผล จากตำแหน่งที่เกิด clear zone เทียบกับแผ่น TLC ที่พ่นด้วย anisaldehyde-sulphuric acid

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี Gaseous contact

ในการทดลองนี้ จะทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหยและสารในกลุ่ม terpenes ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำมาหยดบนฝาจานเพาะเลี้ยง แล้วนำส่วนฐานที่ได้เติมเชื้อ *P. aeruginosa* ไว้มานาน 48 ชั่วโมงในสภาวะปิด บ่มเพาะที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นอ่านค่า minimal inhibitory dose (MID) โดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อใน plate ได้ ดังนี้

- เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ 37°C ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 16-18 ชม.
- นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้มาปรับความเข้มข้นกับ 0.5 McFarland เพื่อจะได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/ml ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรีย 1000 เท่า
- นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมา Spread plate บนอาหารแข็ง TSA
- หยดสารที่ต้องการทดสอบลงบนกระดาษซึ่งวางบน aluminum foil ปริมาตร 200 μ l ซึ่งถูกเจือจางด้วย DMSO อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 1:4 ตามลำดับ โดยในชุดควบคุมจะใส่แค่ DMSO ไม่ใส่น้ำมันหอมระเหย
- บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระบบปิด เป็นเวลา 24 ชม.
- บันทึกผลการทดลองเพื่อหาค่า MID

2.7 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย/สารในกลุ่ม terpenes และยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa*

ในการทดลองนี้จะทำการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อระหว่างสาร 2 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบและยาในระดับต่างๆกัน เพื่อตรวจสอบการออกฤทธิ์ว่าให้ผลเสริมฤทธิ์ หักล้าง หรือไม่มีผลใดต่อกัน โดยกำหนดความเข้มข้นการสารทดสอบดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทดสอบการออกฤทธิ์ของสาร 2 ชนิดแบบ Checkerboard Assay

สาร A							
2 MIC _A	2 MIC _A	2 MIC _A	2 MIC _A	2 MIC _A	2 MIC _A	2 MIC _A	
	0	0.125MIC _B	0.25 MIC _B	0.5 MIC _B	MIC _B	2MIC _B	
MIC _A	MIC _A	MIC _A	MIC _A	MIC _A	MIC _A	MIC _A	
	0	0.125MIC _B	0.25 MIC _B	0.5 MIC _B	MIC _B	2MIC _B	
0.5 MIC _A	0.5 MIC _A	0.5 MIC _A	0.5 MIC _A	0.5 MIC _A	0.5 MIC _A	0.5 MIC _A	
	0	0.125MIC _B	0.25 MIC _B	0.5 MIC _B	MIC _B	2MIC _B	
0.25 MIC _A	0.25 MIC _A	0.25 MIC _A	0.25 MIC _A	0.25 MIC _A	0.25 MIC _A	0.25 MIC _A	
	0	0.125MIC _B	0.25 MIC _B	0.5 MIC _B	MIC _B	2MIC _B	
0.125 MIC _A	0.125 MIC _A	0.125 MIC _A	0.125 MIC _A	0.125 MIC _A	0.125 MIC _A	0.125 MIC _A	
	0	0.125MIC _B	0.25 MIC _B	0.5 MIC _B	MIC _B	2MIC _B	
0	0	0	0	0	0	0	
	0	0.125MIC _B	0.25 MIC _B	0.5 MIC _B	MIC _B	2MIC _B	
	0	0.125MIC _B	0.25 MIC _B	0.5 MIC _B	MIC _B	2MIC _B	สาร B

แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่า FIC_{index} ตามสูตรต่อไปนี้

$$FIC_{index} = (A/MIC_A) + (B/MIC_B)$$

โดย A คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร A ที่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ เมื่อมีสาร B อยู่ด้วย

B คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร B ที่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ เมื่อมีสาร A อยู่ด้วย

MIC_A คือ MIC ของสาร A เมื่อมีสาร A เท่านั้น

MIC_B คือ MIC ของสาร B เมื่อมีสาร B เท่านั้น

ถ้า FIC index น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 แสดงว่าเมื่อให้สารทั้งคู่ร่วมกันจะมีการเสริมฤทธิ์กัน
FIC index อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 4.0 แสดงว่าเมื่อให้สารทั้งคู่ร่วมกันจะไม่มีผลของฤทธิ์ต่อกัน

FIC index มากกว่า 4.0 แสดงว่าเมื่อให้สารทั้งคู่ร่วมกันจะมีฤทธิ์ต่อต้านกัน

น้ำมันหอมระเหยและสารสำคัญที่คัดเลือก จะถูกนำมาทดสอบกับยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* 7 ชนิด คือ ceftazidime (CAZ), piperacilin (PIP), colistin sulfate (COL), meropenem (MEM), doripenem (DOR), imipenem (IMI) and ciprofloxacin (CIP)

บทที่ 3 ผลการวิจัย

3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและการทดสอบการดื้อยาของเชื้อตัวอย่าง

เมื่อนำแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้จากโรงพยาบาลในภูมิภาคต่างๆ มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีเพื่อยืนยันลักษณะจำเพาะของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า เชื้อที่ได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจน และเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ cetrimide ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และให้ผล alkaline/no change ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI พบว่า เชื้อทั้งหมด 553 เชื้อเป็น *P. aeruginosa* และในจำนวนนี้ 329 เชื้อจัดเป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa* ซึ่งสามารถจัดแบ่งออกตามขนาดและลักษณะของโรงพยาบาล และภูมิภาคได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แบคทีเรียทั้งหมดที่เก็บรวบรวมได้จากโรงพยาบาลต่างๆ ที่จัดเป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa*

Type of Hospital	Region of Thailand	Hospital (Province)	Number of MDR <i>P. aeruginosa</i>
University Hospital	Central	Ramathibodi Hospital (Bangkok)	33
	Central	Siriraj Hospital (Bangkok)	27
	Northeast	Srinagarind Hospital (KhonKaen)	49
	North	MaharajNakorn Chiang Mai Hospital (Chiangmai)	55
	South	Songklanagarind Hospital (Songkhla)	21
Regional Hospital	Northeast	Sappasithiprasong Hospital (Ubonratchathani)	50
	South	SuratThani Hospital (Suratthani)	27
	East	Chonburi Hospital (Chonburi)	31
	East	Rayong Hospital (Rayong)	36
Total			329

นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการดื้อยาด้วยวิธี disc diffusion ตาม Clinical and Laboratory Standards Institute Guideline โดยเลือกใช้ยา imipenem, meropenem, doripenem, ceftazidime, piperacillin, ciprofloxacin และ gentamicin พบว่า โดยเฉลี่ยนั้นเชื้อทั้งหมด 329 เชื้อส่วนใหญ่มีอัตราการดื้อยาสูงกว่าร้อยละ 50 สำหรับยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ทั้งสามชนิด คือ

imipenem, meropenem และ doripenem พบอัตราการดื้อต่อยากลุ่มนี้ต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างเด่นชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา doripenem ซึ่งเป็นยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ตัวใหม่ที่น่าสนใจในประเทศไทยที่พบอัตราการดื้อต่อยาน้อยกว่าร้อยละ 40 (ตารางที่ 6) เป็นที่น่าสังเกตว่า เชื้อสายพันธุ์ที่ได้รับจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย มีอัตราการดื้อต่อยาสูงกว่าโรงพยาบาลศูนย์ในภูมิภาคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนสำหรับยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยมักได้รับการโอนย้ายผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อที่ซับซ้อนรักษาได้ยากจากโรงพยาบาลอื่นๆ จึงมีอัตราการดื้อยาในกลุ่มนี้สูง เมื่อพิจารณาถึงอัตราการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ในเชื้อ multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่คัดเลือกมา พบถึง 240 เชื้อใน 329 เชื้อคิดเป็นร้อยละ 72.95 (ตารางที่ 7)

เมื่อศึกษาเพิ่มเติมการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ในเชื้อ multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่คัดเลือกมา ไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา doripenem เพียงชนิดเดียวเลย แต่พบลักษณะการดื้อยาแบบ co-resistance ต่อยา doripenem และ imipenem เพียง 1 สายพันธุ์และ co-resistance ต่อยา doripenem และ meropenem 25 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 6 อัตราการดื้อต่อยาชนิดต่างๆ ของ MDR *P. aeruginosa* ที่เก็บรวบรวมได้

Type of Hospital	Region of Thailand	Hospital	IMP	MEM	DOR	PIP	CTZ	CIP	GM
University Hospital	Central	Ramathibodi Hospital	90.91	84.85	48.48	93.94	90.91	87.88	69.70
	Central	Siriraj Hospital	51.85	74.07	22.22	88.89	88.89	88.89	88.89
	Northeast	Srinagarind Hospital	59.18	77.55	61.22	67.35	100.00	97.96	71.43
	North	Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital	54.55	78.18	58.18	38.18	100.00	100.00	96.36
	South	Songklanagarind Hospital	47.62	61.90	42.86	61.90	100.00	100.00	90.48
Tertiary Hospital	Northeast	Sappasithiprasong Hospital	48.00	50.00	32.00	80.00	100.00	90.00	94.00
	South	Suratthani Hospital	37.04	48.15	18.52	85.19	96.30	92.59	85.19
	East	Chonburi Hospital	22.58	54.84	0.00	100.00	80.65	74.19	77.42
	East	Rayong Hospital	25.00	52.78	27.78	77.78	97.22	100.00	94.44
Average			49.54	65.65	37.69	74.16	95.74	93.01	85.71

IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; PIP, piperacillin; CTZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; GM, gentamicin

ตารางที่ 7 อัตราการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ของ MDR *P. aeruginosa* ที่เก็บรวบรวมได้

Type of Hospital	Region of Thailand	Hospital	MDR (N)	CR-MDR (N)	CR-MDR Ratio
University Hospital	Central	Ramathibodi Hospital	33	31	93.94
	Central	Siriraj Hospital	27	22	81.48
	Northeast	Srinagarind Hospital	49	41	83.67
	North	Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital	55	44	80.00
	South	Songklanagarind Hospital	21	15	71.43
Tertiary Hospital	Northeast	Sappasithiprasong Hospital	50	32	64.00
	South	Suratthani Hospital	27	16	59.26
	East	Chonburi Hospital	31	20	64.52
	East	Rayong Hospital	36	19	52.78
Total / Average			329	240	72.95

ตารางที่ 8 อัตราการดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์แบบเดี่ยวและแบบร่วมของ MDR *P. aeruginosa* ที่เก็บรวบรวมได้

Type of Hospital	Region of Thailand	Hospital	Number of strains to carbapenems						All
			Mono-resistance			Bi-resistance			
			IMP	MEM	DOR	IMP+MEM	IMP+DOR	MEM+DOR	
University Hospital	Central	Ramathibodi Hospital	3	1	0	11	0	0	16
	Central	Siriraj Hospital	2	8	0	6	0	0	6
	Northeast	Srinagarind Hospital	3	3	0	5	0	9	21
	North	Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital	0	4	0	7	1	10	21
	South	Songklanagarind Hospital	2	4	0	0	0	1	8
Tertiary Hospital	Northeast	Sappasit Prasong Hospital	7	5	0	4	0	3	13
	South	Surat Thani Hospital	3	6	0	2	0	0	5
	East	Chonburi Hospital	3	13	0	4	0	0	0
	East	Rayong Hospital	0	8	0	1	0	2	8

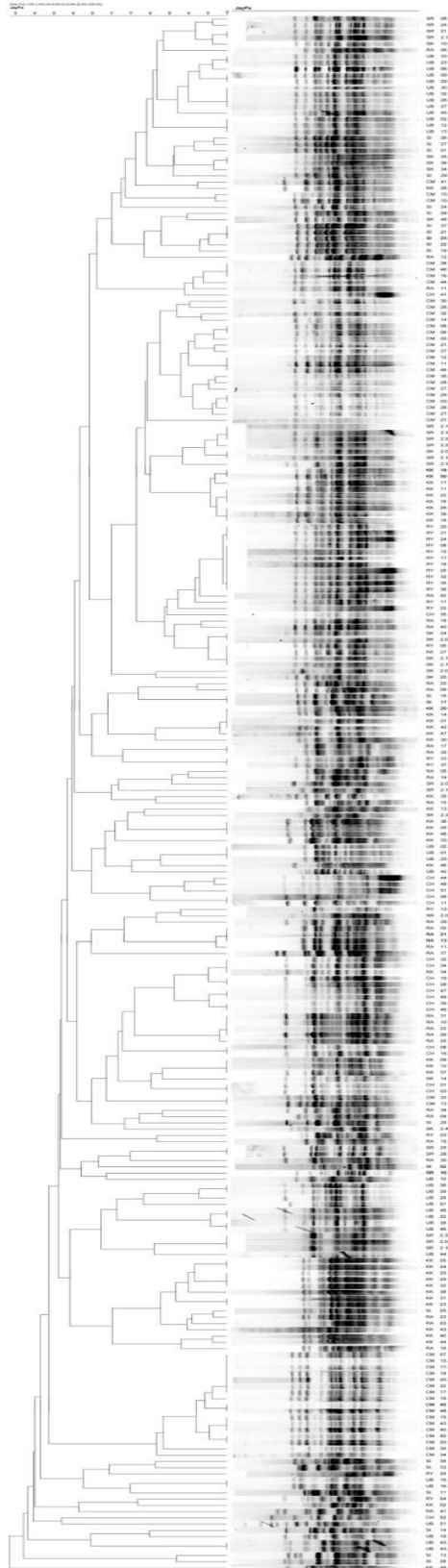
IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem

3.2 การจำแนกสายพันธุ์ของ multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์

เมื่อนำแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ที่เป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่คัดเลือกมาจาก 240 เชื้อในทั้งหมด 329 เชื้อมาจำแนกสายพันธุ์ตามความเหมือนและความแตกต่างทาง genotypic ด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis พบว่า มี 130 สายพันธุ์ที่มีความเหมือนกันถึงร้อยละ 95 (รูปที่ 4) และมีเพียง 5 สายพันธุ์ที่พบการกระจายตัวในโรงพยาบาลมากกว่า 1 แห่ง ในจำนวนนี้มี 3 สายพันธุ์ที่พบระหว่างโรงพยาบาลในภูมิภาคเดียวกัน อีก 1 สายพันธุ์พบได้ในโรงพยาบาลในต่างภูมิภาคและอีกสายพันธุ์พบใน 3 โรงพยาบาลจาก 3 ภูมิภาค (ตารางที่ 9)

จากผลการทดลองนี้ที่พบความแตกต่างถึง 130 สายพันธุ์จาก 240 เชื้อ แสดงถึงการกระจายตัว (clonal diversity) ของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ที่เป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa* ในประเทศไทยที่ค่อนข้างสูง และมีการระบาดของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันระหว่างภูมิภาคค่อนข้างต่ำเพียง 5 ใน 130 สายพันธุ์

รูปที่ 4 ผล fingerprint ของวิธี Pulsed-field gel electrophoresis ของเชื้อ multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่ติดต่อภายในกลุ่มคาร์บาพีแนมส์



ตารางที่ 9 การแพร่กระจายตัวของสายพันธุ์ระหว่างโรงพยาบาลจากการวิเคราะห์ผล PFGE

Type of Hospital	Hospital	CR-MDR (N)	Selected clone (N)	Clonal dissemination	PFGE clone number (amount of existing clones)
University Hospital	Ramathibodi Hospital	22	17	1.29	19(4), 9(2), 52(2), 10, 12, 16, 17, 20, 87, 93, <u>107</u> , 116, 117, 120, 125, 128, 129
	Siriraj Hospital	31	24	1.29	79(5), 75(3), 55(2), 3, 21, 24, 40, 44, 45, 50, 51, 57, 58, 62, 74, 76, 85, 86, 90, 92, <u>107</u> , 108, 111, 122
	Srinagarind Hospital	41	20	2.05	38(9), 53(5), 65(3), 81(3), 104(3), 103(2), 106(2), 110(2), 14, <u>47</u> , 54, 61, 63, 66, 68, <u>77</u> , 105, 109, 121, 130
	Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital	44	18	2.44	112(8), 114(5), 33(4), 22(3), 29(3), 31(3), 32(3), 15(2), 30(2), 84(2), 113(2), 13, 23, 26, 27, 28, 34, 115
	Songklanagarind Hospital	15	11	1.36	11(3), 46(2), <u>47</u> (2), <u>2</u> , 18, <u>36</u> , 48, 49, 64, 82, 88
Tertiary Hospital	Sappasithiprasong Hospital	32	18	1.78	6(4), 4(3), 8(3), 5(2), 67(2), 96(2), 99(2), 100(2), 119 (2), 127(2) 7, 69, 95, 97, 98, 102, 124, 126
	Suratthani Hospital	16	10	1.60	35(3), 101(3), 1(2), <u>2</u> (2), <u>36</u> , 37, 59, 60, 91, 94
	Chonburi Hospital	20	10	2.00	<u>77</u> (4), 78(4), 70(2), 72(2), 80(2), 83(2), 25, 43, 71, 123
	Rayong Hospital	19	8	2.38	39 (11), 56(2), 41, 42, <u>47</u> , 73, 89, 118

*underline indicated the selected clones which were found in more than one hospital.

3.3 กลไกการดื้อยาของ multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์

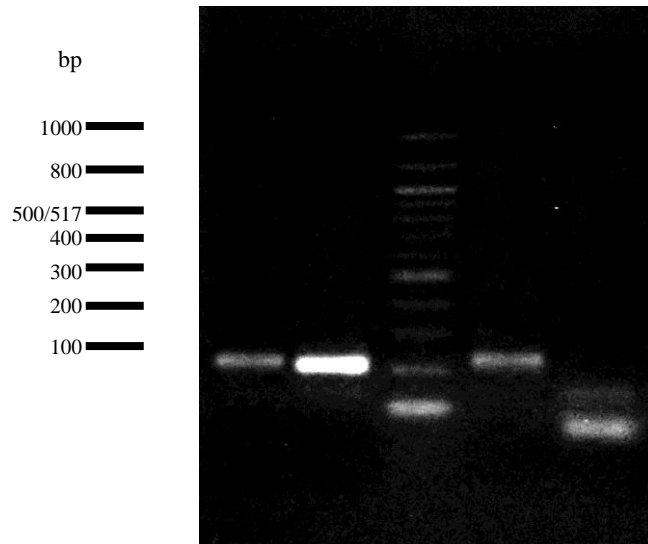
การดื้อยาของ *P. aeruginosa* นั้นประกอบไปด้วยกลไกการดื้อยาหลายแบบ ดังนั้น แบคทีเรียที่ดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ที่เป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่คัดเลือกมาทั้งหมด 130 สายพันธุ์จะถูกนำมาศึกษากลไกการดื้อยาหลักที่สำคัญ ได้แก่ การลดการนำเข้าเซลล์ของยาโดยโปรตีน OprD การเปลี่ยนแปลงที่ efflux pump และการสร้างเอนไซม์ β -lactamases โดยสำหรับโปรตีน OprD และ efflux pump ทำการศึกษาที่ transcription level ด้วยวิธี Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ยีน *rpsL* ซึ่งเป็นโปรตีนหนึ่งในส่วนประกอบของไรโบโซม ทำหน้าที่เป็น housekeeping gene ในการทดลองนี้

3.3.1 การลดการนำเข้าเซลล์ของยาโดยโปรตีน OprD

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาในระดับ Transcription โดยจะประเมินปริมาณของ *oprD* mRNA ของแบคทีเรียที่ดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ที่เป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่คัดเลือกมาด้วยวิธี RT-PCR เทียบกับ *P. aeruginosa* PAO1 และใช้ *P. aeruginosa* Δ *oprD* เป็น negative control (รูปที่ 5) เกณฑ์ตัดสินผลบวกเมื่อระดับของ *oprD* mRNA ต่ำกว่า 0.5 เท่าเมื่อเทียบกับ *P. aeruginosa* PAO1 (รูปที่ 6)

จากผลการทดลองพบว่าร้อยละ 92.86 ของแบคทีเรียที่ดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ที่เป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่นำมาทดสอบพบการลดลงของ *oprD* mRNA ในขณะที่เชื้อที่เหลือมีปริมาณ *oprD* mRNA ในระดับใกล้เคียงกับ wild-type strain (รูปที่ 7) ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นการยืนยันสมมติฐานที่แสดงให้เห็นว่า การลดลงของปริมาณ *oprD* ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียดื้อยานั้นเป็นกลไกที่พบได้มากที่สุดซึ่งมีผลต่อการดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ นอกจากนี้ ยังพบว่า ปริมาณของ *oprD* ที่ลดลงมีผลต่อความไวต่อยา imipenem เป็นอย่างยิ่ง ดังจะเห็นได้จากการลดลงของปริมาณ *oprD* mRNA ใน imipenem resistant strains เมื่อเทียบกับ imipenem susceptible strains ที่มีปริมาณ *oprD* mRNA ใกล้เคียงกับ wild type PAO1 (ตารางที่ 10)

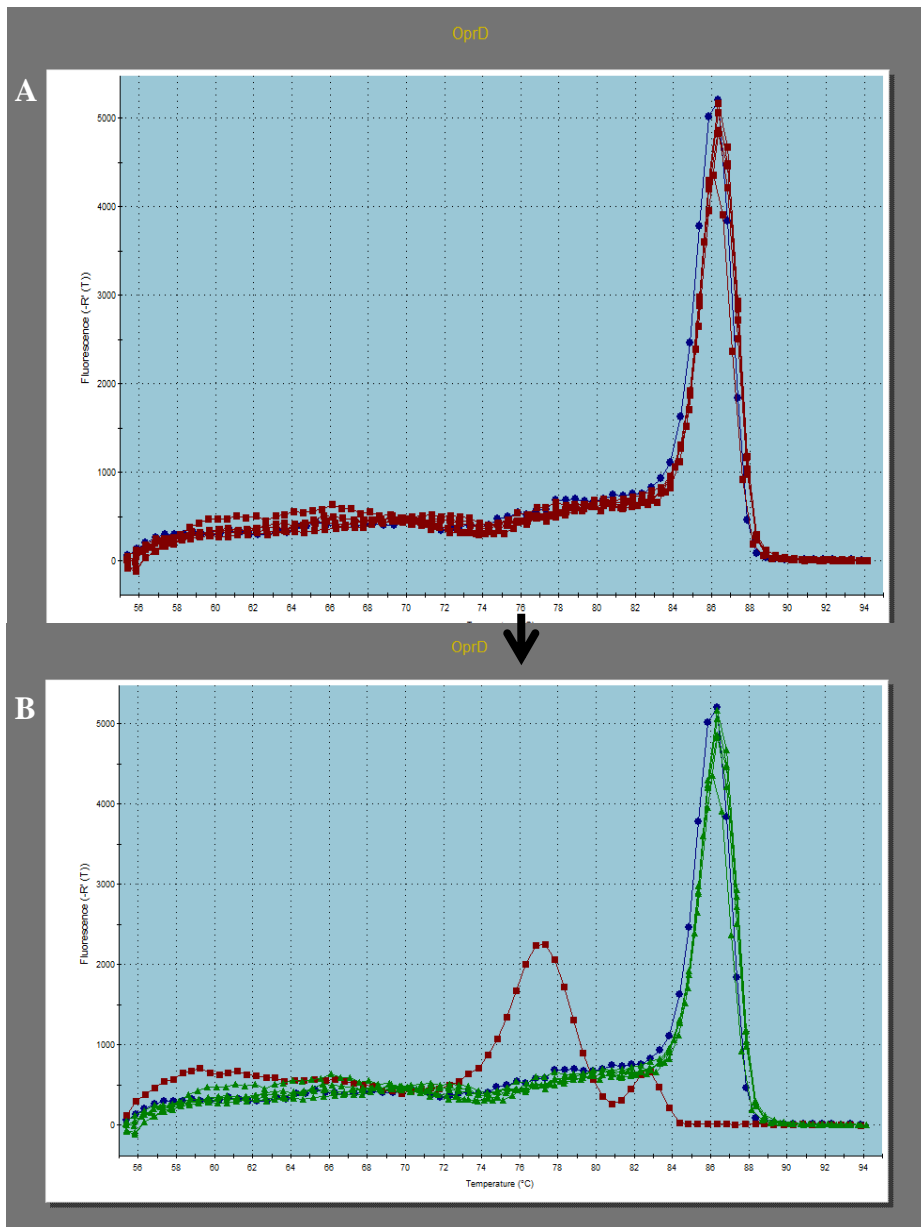
นอกจากนี้ยังพบการเกิด cross resistance ใน 6 สายพันธุ์ที่เป็น imipenem-sensitive, meropenem and doripenem-resistant clones โดยเชื้อ 1 สายพันธุ์พบว่าดื้อต่อ piperacillin และมีปริมาณ *oprD* mRNA ใกล้เคียงกับ wild type PAO1 ในขณะที่อีก 5 สายพันธุ์ไวต่อ piperacillin และมีการลดลงของปริมาณ *oprD* mRNA (ตารางที่ 11)



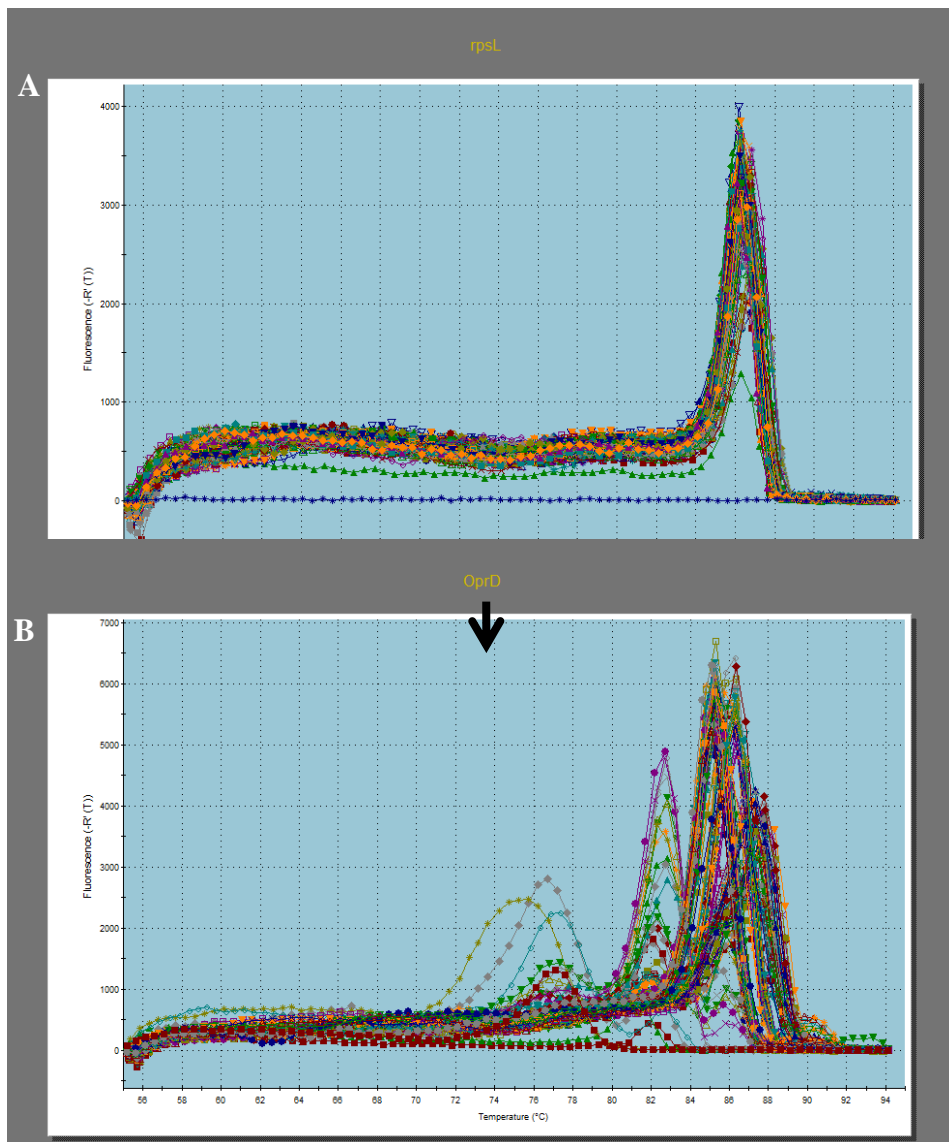
รูปที่ 5 ผลของ RT-PCR เมื่อทดสอบกับ oprD primers:

P. aeruginosa PAO1 (A) และ *P. aeruginosa* Δ oprD (B)

- Lane 1 : RT-PCR product of (A) with primers of *rpsL*
- Lane 2 : RT-PCR product of (A) with primers of *oprD*
- Lane M : 100 bp DNA Ladder
- Lane 3 : RT-PCR product of (B) with primers of *rpsL*
- Lane 4 : RT-PCR product of (B) with primers of *oprD*



รูปที่ 6 กราฟการวิเคราะห์ผล RT-PCR products ของ *rpsL* (A) และ *oprD* (B) จากเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 และ *P. aeruginosa* $\Delta oprD$ ที่แสดงตำแหน่งลูกศร คือ *oprD* จาก *P. aeruginosa* $\Delta oprD$



รูปที่ 7 กราฟการวิเคราะห์ผล RT-PCR products ของ *rpsL* (A) and *oprD* (B) จากเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* clinical isolates และ *P. aeruginosa* Δ *oprD* ที่แสดงตำแหน่งลูกศร คือ *oprD*

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อ *P. aeruginosa* แบ่งตามการแสดงออกของยีนดื้อยาและความไวต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์

		Transcription level of gene					
		<i>oprD</i>		<i>mexXY</i>		<i>mexAB-oprM</i>	
		-- / -	+	- / B	+	- / B	+
Imipenem	non-susceptible	94	6	29	71	6	94
Imipenem	susceptible	23	3	9	17	4	22
Meropenem	non-susceptible	102	9	32	79	9	102
Meropenem	susceptible	15	0	6	9	1	14
Doripenem	non-susceptible	62	5	19	48	5	62
Doripenem	susceptible	55	4	19	40	5	54

--, (*oprD*) expression ratio <0.1 fold.

-, (*oprD*) expression ratio between 0.1-0.5 fold,

(*mexXY*) expression ration <5 fold, and

(*mexAB-oprM*) expression ratio <2 fold

B, Baseline expression:

(*mexXY*) expression ratio between 5-10 fold, and

(*mexAB-oprM*) expression ratio between 2-3 fold.

+, (*oprD*) expression ratio >0.5,

Overexpression:

(*mexXY*) expression ration >10 fold, and

(*mexAB-oprM*) expression ratio >3 fold

ตารางที่ 11 จำนวนเชื้อ *P. aeruginosa* แบ่งตามการแสดงออกของยีนดื้อยาและการเกิด cross resistance ของยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์

	Transcription level of gene					
	<i>oprD</i>		<i>mexXY</i>		<i>mexAB-oprM</i>	
	-- / -	+	- / B	+	- / B	+
Imipenem non-susceptible while meropenem and doripenem susceptible	15	0	6	9	1	14
Meropenem non-susceptible while imipenem and doripenem susceptible	18	2	6	14	3	17
Imipenem and meropenem non-susceptible while doripenem susceptible	22	2	7	17	1	23
Meropenem and doripenem non-susceptible while imipenem susceptible	5	1	3	3	1	5
All carbapenems non-susceptible	61	4	16	49	4	61

--, (*oprD*) expression ratio <0.1 fold.

-, (*oprD*) expression ratio between 0.1-0.5 fold,

(*mexXY*) expression ration <5 fold, and

(*mexAB-oprM*) expression ratio <2 fold

B, Baseline expression:

(*mexXY*) expression ratio between 5-10 fold, and

(*mexAB-oprM*) expression ratio between 2-3 fold.

+, (*oprD*) expression ratio >0.5,

Overexpression:

(*mexXY*) expression ration >10 fold, and

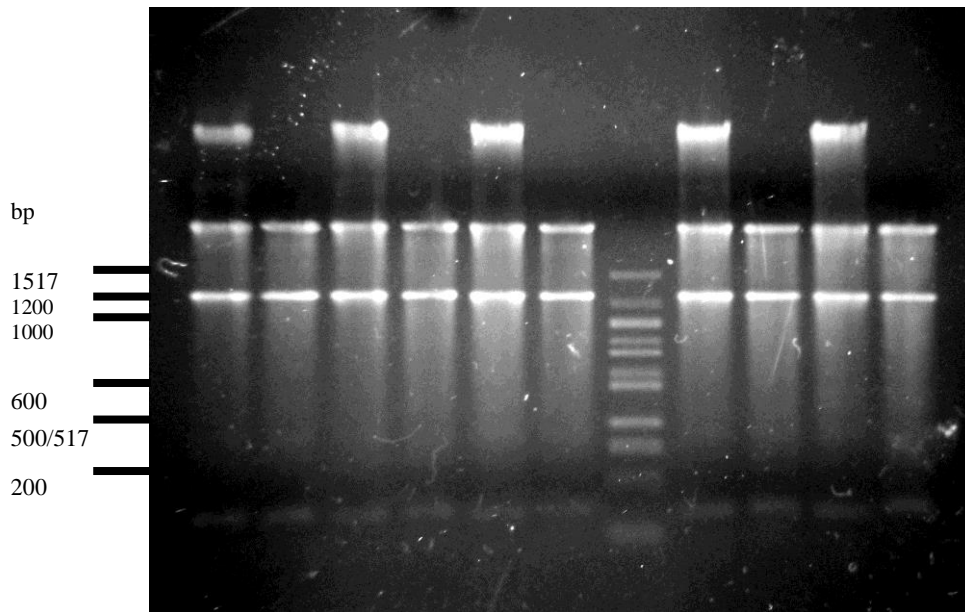
(*mexAB-oprM*) expression ratio >3 fold

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงที่ efflux pump

การขับยาออกโดยอาศัย efflux pump สำหรับ *P. aeruginosa* ก็เป็นอีกกลไกหนึ่งที่มีผลต่อความไวของเชื้อต่อยาที่ใช้การรักษา *P. aeruginosa* มีปั๊มขับยาออกหลายชนิด แต่ที่พบได้บ่อยและมีผลต่อการรักษามาก คือ MexAB-oprM, MexXY และ MexCD-oprJ ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษายีน *mexAB-oprM* and *mexXY* และ *mexCD-oprJ* โดยวัดปริมาณ mRNA เทียบกับ *P. aeruginosa* PAO1 และใช้ *P. aeruginosa* Δ *mexAB-oprM*, *P. aeruginosa* Δ *mexAB-oprM*- Δ *mexXY*, and *P. aeruginosa* Δ *mexCD-oprJ* เป็น negative control ด้วยวิธี real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction PCR products จาก primers จำเพาะต่อยีน *mexAB-oprM* and *mexXY* และยีน *mexCD-oprJ* แสดงดังรูปที่ 8-9 โดยใช้ยีน *rpsL* ซึ่งเป็นโปรตีนหนึ่งในส่วนประกอบของไรโบโซม ทำหน้าที่เป็น housekeeping gene และทำการประเมินผลด้วย MxPro-Mx3000P software เกณฑ์การตัดสินผลบวกสำหรับ *mexAB-oprM* mRNA เมื่อปริมาณ mRNA เพิ่มขึ้น 3 เท่า เกณฑ์การตัดสินผลลบเมื่อปริมาณ mRNA ลดลง 2 เท่าเมื่อเทียบกับ *P. aeruginosa* PAO1 และเกณฑ์การตัดสินผลบวกสำหรับ *mexXY* mRNA เมื่อปริมาณ mRNA เพิ่มขึ้น 10 เท่า เกณฑ์การตัดสินผลลบเมื่อปริมาณ mRNA ลดลง 5 เท่าเมื่อเทียบกับ *P. aeruginosa* PAO1

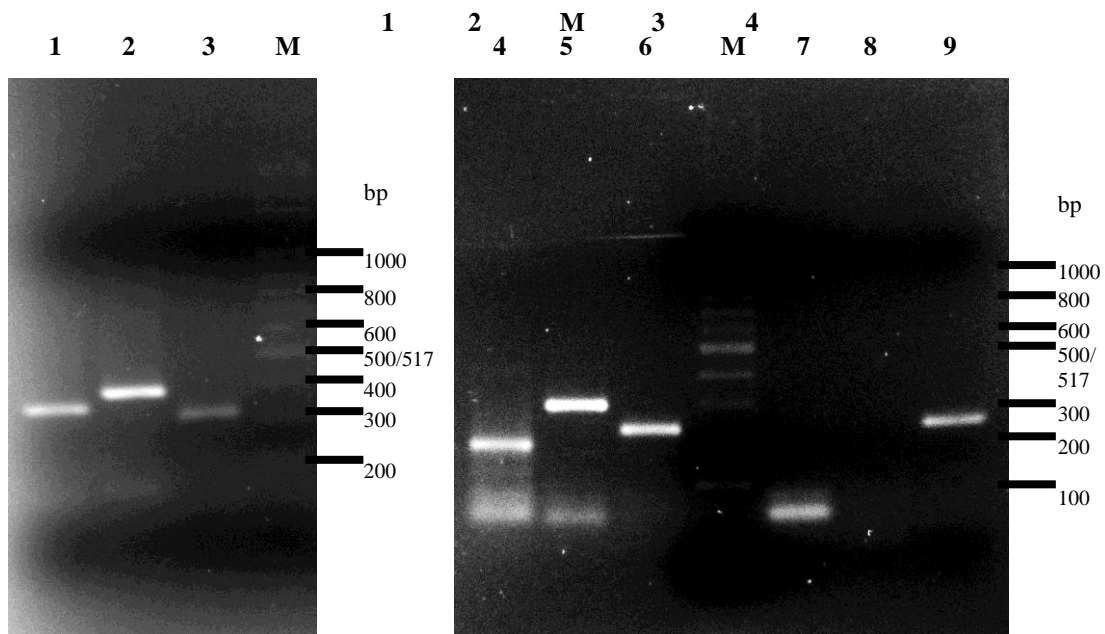
จากผลการทดลองพบว่า 116 สายพันธุ์ของเชื้อที่ทำมาทดสอบให้ผลเป็นบวกต่อการสร้าง *mexAB-oprM* mRNA 6 สายพันธุ์พบการสร้างในช่วง borderline และอีก 4 สายพันธุ์มีระดับการสร้างยีนนี้ใกล้เคียงกับ *P. aeruginosa* PAO1 จะเห็นได้ว่าเชื้อส่วนใหญ่มีกลไกการดื้อยาด้วยการสร้างปั๊ม *mexAB-oprM* mRNA ถึงร้อยละ 92.06 แต่ก็ยังพบได้น้อยกว่ากลไกการดื้อยาโดยลดการสร้าง *oprD* ส่วนการขับยาออกด้วยปั๊ม MexXY นั้น พบได้ในเชื้อทั้งหมด 88 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 69.84 และพบ 18 สายพันธุ์จัดอยู่ในช่วง borderline 22 สายพันธุ์ให้ผลเป็นลบ

มีรายงานว่า การสร้าง MexCD-OprJ ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับความไวของเชื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactams รวมทั้ง imipenem ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาปริมาณ *mexCD-oprJ* ใน 23 สายพันธุ์ที่ไวต่อ imipenem ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของ *oprD* mRNA แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ mRNA ของ *mexCD-oprJ* ในเชื้อทั้งหมด (รูปที่ 10-13)



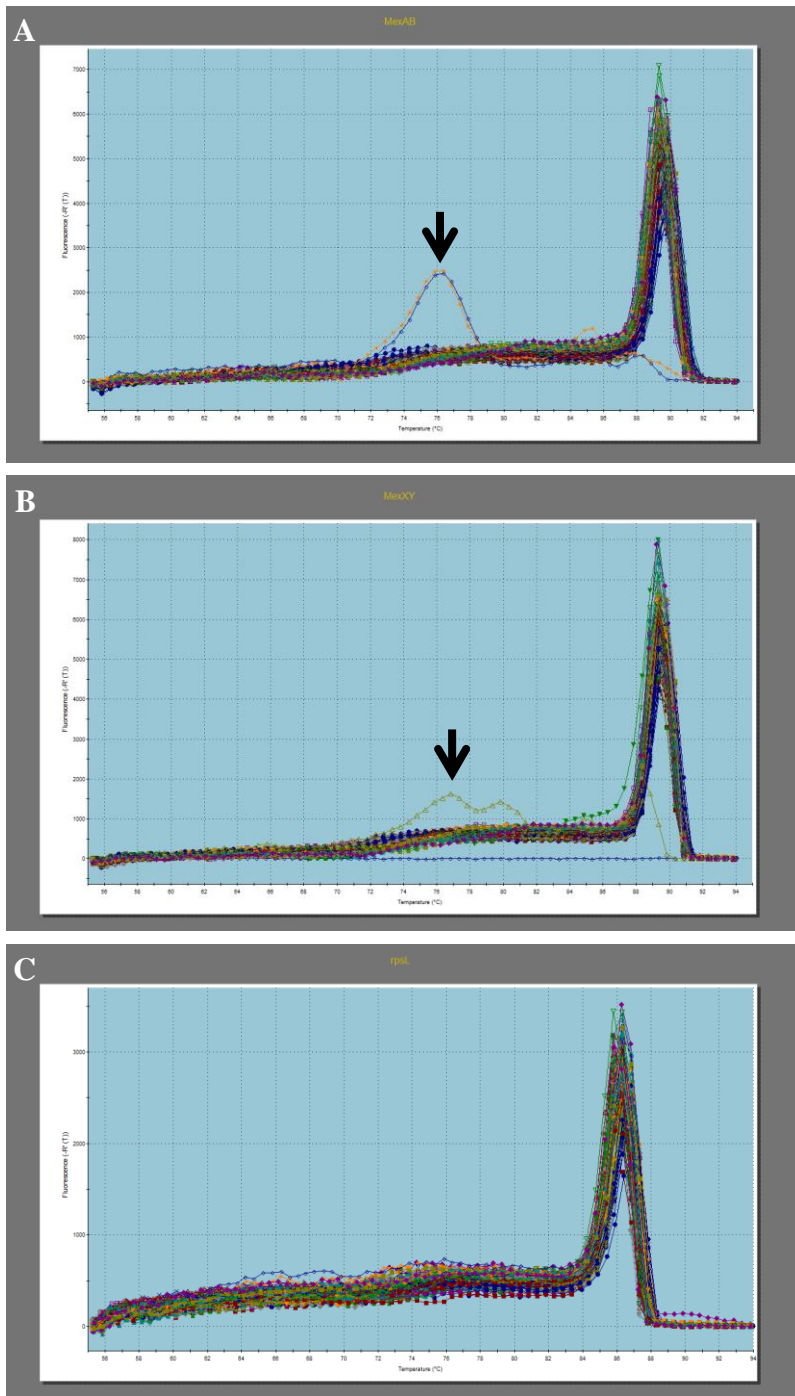
รูปที่ 8 ปริมาณ mRNA ของ *P. aeruginosa* PAO1 และสายพันธุ์อื่นๆ

- Lane 1 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* before treated with DNase
- Lane 2 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* treated with DNase
- Lane 3 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* Δ *mexAB-oprM* before treated with DNase
- Lane 4 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* Δ *mexAB-oprM* treated with DNase
- Lane 5 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* Δ *mexAB-oprM*- Δ *mexXY* before treated with DNase
- Lane 6 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* Δ *mexAB-oprM*- Δ *mexXY* treated with DNase
- Lane 7 : 100 bp DNA Ladder
- Lane 8, 10 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* clinical isolated before treated with DNase
- Lane 9, 11 : Total RNA extraction of *P. aeruginosa* clinical isolated treated with DNase

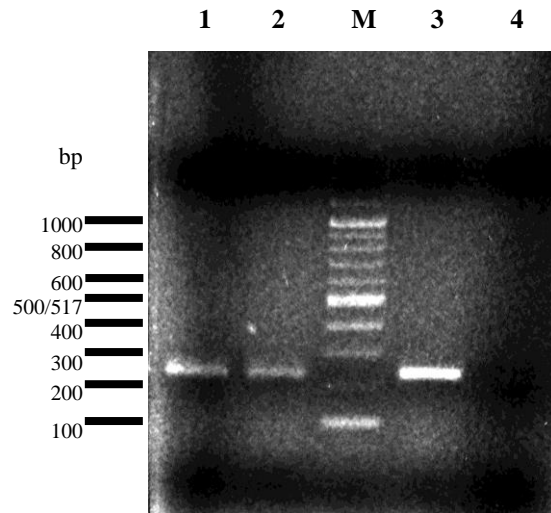


รูปที่ 9 mRNA จาก RT-PCR ของ *P. aeruginosa* PAO1 และสายพันธุ์อื่นๆ

- Lane 1 : RT-PCR product of (A) with primers of *mexB*
- Lane 2 : RT-PCR product of (A) with primers of *mexY*
- Lane 3 : RT-PCR product of (A) with primers of *rpsL*
- Lane 4 : RT-PCR product of (B) with primers of *mexB*
- Lane 5 : RT-PCR product of (B) with primers of *mexY*
- Lane 6 : RT-PCR product of (B) with primers of *rpsL*
- Lane 7 : RT-PCR product of (C) with primers of *mexB*
- Lane 8 : RT-PCR product of (C) with primers of *mexY*
- Lane 9 : RT-PCR product of (C) with primers of *rpsL*
- Lane M : 100 bp DNA Ladder

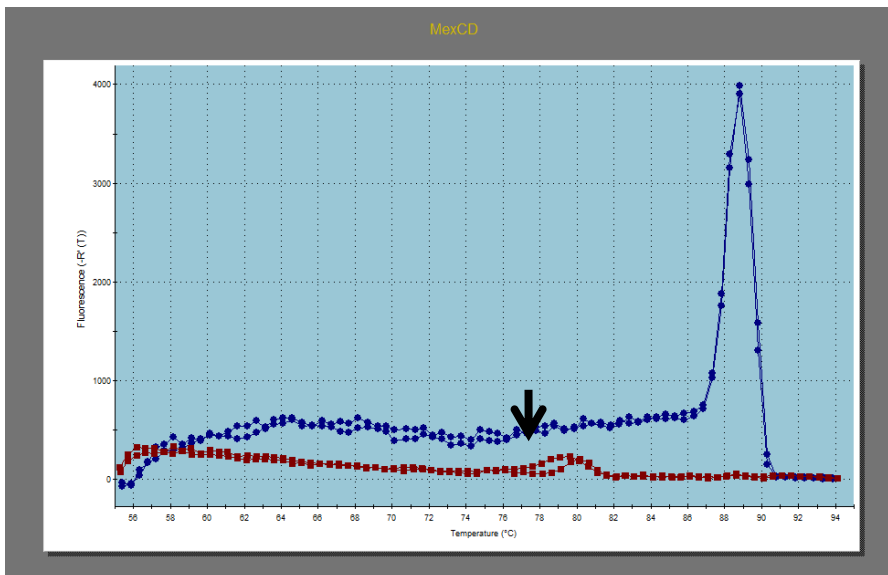
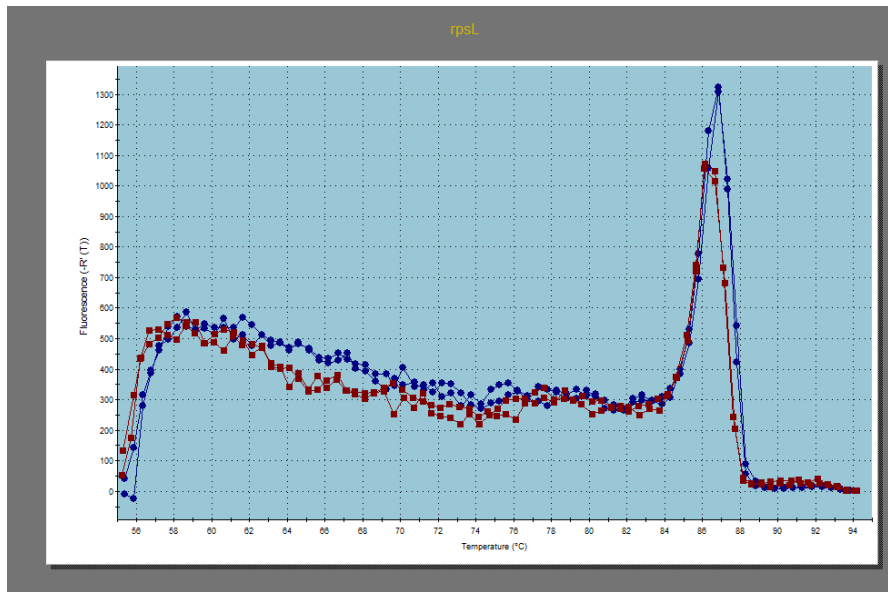


รูปที่ 10 Dissociation curves ของ RT-PCR products จาก *mexAB-oprM* (A), *mexXY* (B), and *rpsL* (C)

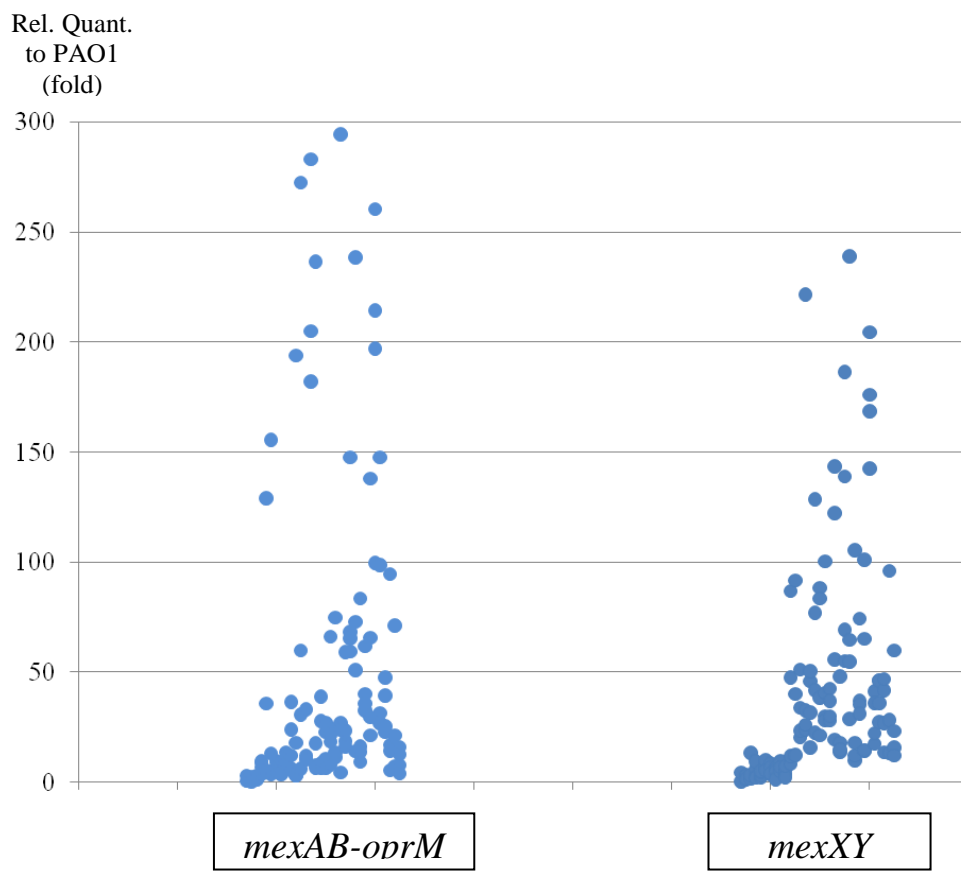


รูปที่ 11 ผล RT-PCR ของ *P. aeruginosa*

- Lane 1 : RT-PCR product of (A) with primers of *rpsL*
- Lane 2 : RT-PCR product of (A) with primers of *mexD*
- Lane M : 100 bp DNA Ladder
- Lane 3 : RT-PCR product of (B) with primers of *rpsL*
- Lane 4 : RT-PCR product of (B) with primers of *mexD*



รูปที่ 12 Dissociation curves ของ RT-PCR products จาก *rpsL* (A) and *mexCD-oprJ* (B)



รูปที่ 13 Scattered plot of relative quantitative ของ *mexAB-oprM* and *mexMY*

3.3.3 การสร้างเอนไซม์ metallo β -lactamases

ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo β -lactamases ของเชื้อซึ่งไม่มีวิธีมาตรฐานในการศึกษา แต่วิธี double disc synergy เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย วิธีนี้อาศัยการพิจารณาความแตกต่างของการตอบสนองของเชื้อต่อยากลุ่ม β -lactams และ metallo β -lactamases inhibitors โดยยาที่ใช้ได้แก่ ceftazidime หรือ imipenem กับ EDTA หรือ thiol compounds เช่น 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) ในการศึกษาครั้งนี้ PFGE selected *P. aeruginosa* clones จะถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี double disc synergy (รูปที่ 14) และตรวจสอบการปรากฏของยีน metallo β -lactamases ด้วยวิธี PCR

ผลการทดลองพบว่า 36 สายพันธุ์ให้ผลบวก โดยสามารถจัดแบ่งตามลักษณะ inhibition zone ที่เกิดขึ้นเป็น 2 กลุ่ม คือ

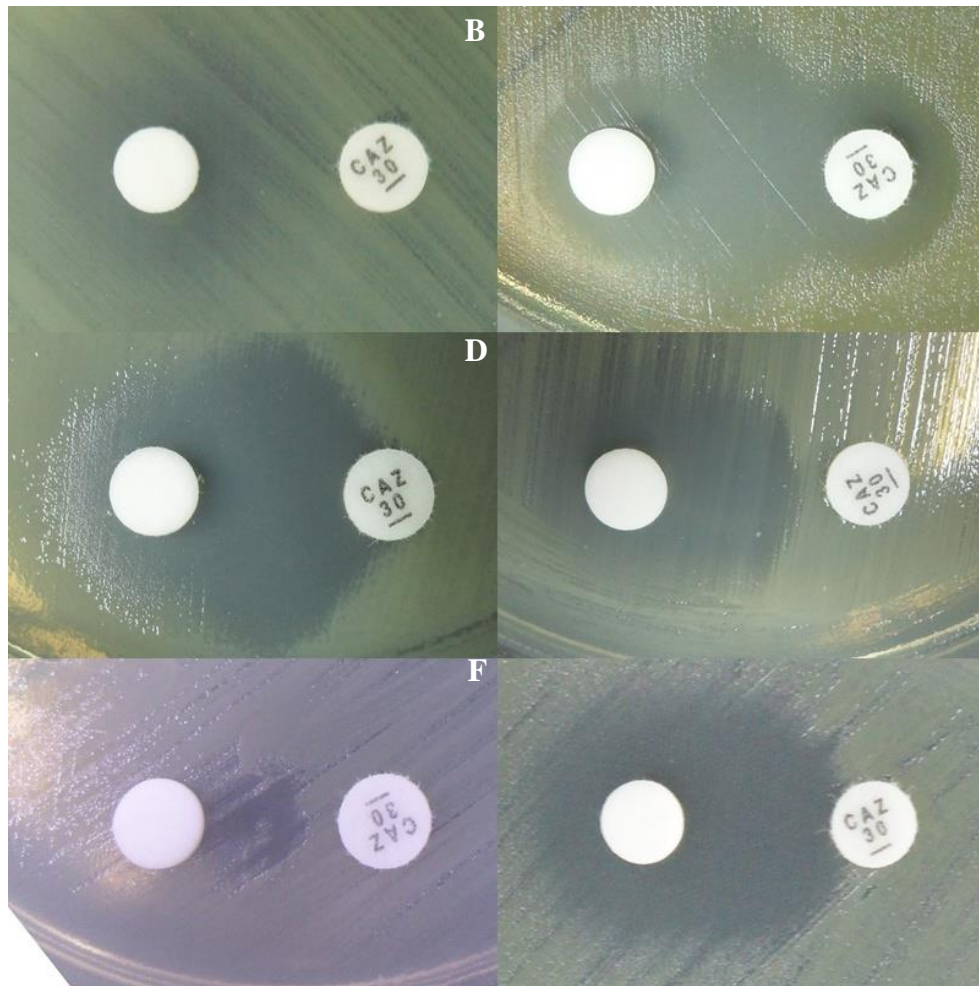
1. clearly positive:

oval shape, corkscrew shape, or bended inhibition zone พบ 24 สายพันธุ์

2. weakly positive:

small difference of zone enhancement พบ 12 สายพันธุ์

ซึ่งสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกได้นำมาตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR อีกครั้ง และสรุปได้ว่าพบแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ที่เป็น multidrug-resistant *P. aeruginosa* ที่สร้างเอนไซม์ metallo β -lactamases ทั้งหมดร้อยละ 27.69



รูปที่ 14 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ metallo β -lactamases ของเชื้อด้วยวิธี double disc synergy

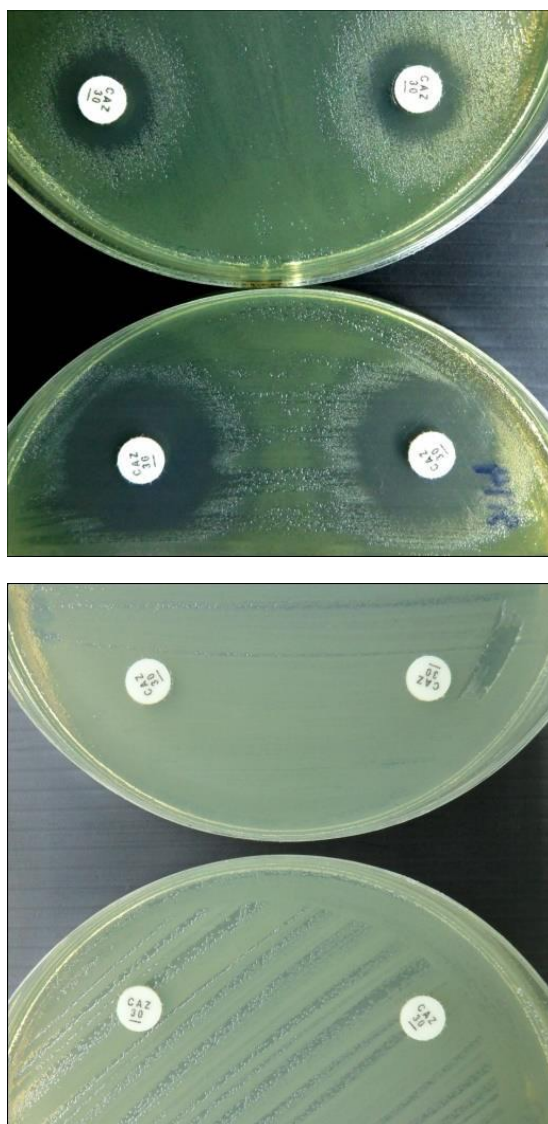
- A : Double disc synergy test of *P. aeruginosa* PAO1 (control)
- B - F : Double disc synergy test of PFGE selected *P. aeruginosa* clinical isolates which gave the positive result

3.3.4 การสร้างเอนไซม์ AmpC cephalosporinase

AmpC cephalosporinase เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยยีน *ampC* ที่อยู่บนโครโมโซมของ *P. aeruginosa* การสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณที่มากกว่าปกติมีผลต่อความไวของเชื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ของเอนไซม์นี้กับยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ยังไม่ทราบแน่ชัด มีรายงานว่า *P. aeruginosa* ที่ไม่สามารถสร้าง AmpC cephalosporinase ได้มีความไวต่อยา imipenem และ doripenem เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลกับยา meropenem

ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ AmpC cephalosporinase ของ PFGE selected *P. aeruginosa* clones ด้วยวิธี disc diffusion โดยเกณฑ์ตัดสินผลบวกจะพิจารณาจาก inhibition zone ที่เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 10 มม. เมื่อมีการเติม cloxacillin เทียบกับการใช้แผ่นยา ceftazidime ชนิดเดียว

จากผลการทดลองพบว่า มี *P. aeruginosa* clinical isolates เพียง 5 สายพันธุ์ที่แยกได้ให้ผลบวกจากการเพิ่มการสร้างเอนไซม์ AmpC cephalosporinase ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 3.96 โดยทั้ง 5 สายพันธุ์ล้วนแต่ดื้อต่อ ceftazidime มีเพียงสายพันธุ์เดียวที่ไวต่อยา imipenem และ piperacillin (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ AmpC cephalosporinase ด้วยวิธี disc diffusion

- A : Enlargement of inhibition zone affect from cloxacillin was found in *P. aeruginosa* clone
- B : Cloxacillin was found uneffect to ceftazidime resistance. Double disc synergy test of PFGE selected *P. aeruginosa* clone

ตารางที่ 12 สรุปผลการทดสอบกลไกดื้อยาของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ต่างๆ

Group	Clone No.	<i>mexAB</i> - <i>oprM</i>	<i>mexXY</i>	<i>oprD</i>	<i>mexCD</i> - <i>oprJ</i>	AmpC	Antibiotic susceptibility						
							IMI	MEM	DOR	PIP	CTZ	CIP	GEN
A	2	+	+	--			R	R	R	S	R	R	R
	3	+	+	--			R	I	I	R	I	S	S
	5	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	11	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	17	+	+	--			R	R	S	R	R	R	R
	21	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	22	+	+	--			R	I	S	R	R	R	R
	23	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	24	+	+	--			R	R	R	R	S	R	R
	28	+	+	--			R	R	R	S	R	R	R
	30	+	+	--			R	R	R	S	R	R	R
	31	+	+	--			R	R	S	S	R	R	R
	32	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	35	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	36	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	37	+	+	--			R	R	S	R	R	R	R
	39	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	41	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	42	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	44	+	+	--			I	R	R	R	R	R	R
	46	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	47	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	48	+	+	--			R	S	S	R	R	R	R
	51	+	+	-			R	I	S	R	R	I	R
	52	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	53	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	54	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	57	+	+	--			R	I	S	R	R	R	R
	58	+	+	--			R	I	I	R	R	S	S
	59	+	+	--			I	S	S	R	R	I	S
	61	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	62	+	+	--			R	I	S	R	R	R	R
	63	+	+	--			I	S	S	S	R	R	R
	64	+	+	--			R	S	S	R	R	S	R
	69	+	+	--			I	R	R	R	R	R	R
	70	+	+	--			R	I	S	R	R	S	R
	73	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	81	+	+	-			R	I	I	R	R	R	R
	82	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	84	+	+	-			R	R	S	R	R	R	R
	86	+	+	--			R	R	S	S	R	R	R
	87	+	+	--			R	R	S	R	R	S	R
	88	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	89	+	+	--			R	I	S	R	R	R	R
	90	+	+	-			R	R	I	R	R	S	S
	96	+	+	--			R	S	S	R	R	R	R
	97	+	+	--			R	S	S	R	R	R	R
	101	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
A	103	+	+	--			R	R	R	R	R	R	S
(cont.)	104	+	+	--			R	R	R	R	R	R	S
	105	+	+	--			R	R	R	R	R	R	S
	106	+	+	--			R	R	R	R	R	R	S

Group	Clone No.	<i>mexAB</i> <i>-oprM</i>	<i>mexXY</i>	<i>oprD</i>	<i>mexCD</i> - <i>oprJ</i>	AmpC	Antibiotic susceptibility						
							IMI	MEM	DOR	PIP	CTZ	CIP	GEN
	107	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	108	+	+	--			R	R	R	S	R	R	S
	109	+	+	--			R	R	R	R	R	R	S
	110	+	+	--			R	R	R	R	R	R	S
	114	+	+	--			R	R	R	R	R	R	R
	115	+	+	--			R	R	R	S	R	R	R
	119	+	+	--			R	I	S	R	R	R	R
	128	+	+	--			R	R	S	R	S	I	S
	120	+	+	-			R	S	S	R	R	S	R
	129	+	+	--			R	S	S	R	S	S	S
	130	+	+	-			I	R	R	R	R	R	R
	1	+	+	--	0.120		S	R	S	R	R	R	R
	7	+	+	--	0.009		S	R	S	R	R	R	R
	9	+	+	--	0.032		S	R	S	R	R	R	R
	10	+	+	--	0.053		S	R	S	R	R	R	R
	13	+	+	--	0.132		S	I	S	S	R	R	R
	14	+	+	--	0.094		S	I	I	S	R	R	R
	15	+	+	--	0.176		S	I	S	S	R	R	R
	16	+	+	--	0.028		S	R	S	S	S	I	R
	20	+	+	--	0.036		S	R	S	R	R	R	R
	25	+	+	--	0.121		S	I	S	R	R	R	R
	27	+	+	--	0.148		S	R	S	S	R	R	R
	29	+	+	--	0.021		S	R	R	S	R	R	R
	56	+	+	--	0.205		S	R	S	S	R	R	R
	121	+	+	--	0.059		S	R	S	S	R	R	R
	75	+	+	--		+	R	R	R	R	R	R	S
	91	+	+	--		+	R	S	S	R	R	S	S
	125	+	+	--		+	R	R	S	R	I	I	S
B	4	+	B	--			R	R	R	R	R	R	R
	6	+	-	--			R	R	R	R	R	R	R
	19	+	B	--			I	R	S	R	R	R	R
	26	+	B	--			I	R	S	R	R	R	R
	55	+	B	--			R	I	S	R	R	R	R
	60	+	-	--			R	R	I	R	R	R	R
	67	+	B	--			R	R	R	R	R	R	R
	71	+	-	--			R	S	S	R	R	S	R
	72	+	-	--			R	R	S	R	R	S	R
	76	+	B	--			R	S	S	R	S	R	R
	79	+	B	-			R	R	R	R	R	R	R
	85	+	B	--			R	S	S	R	I	S	S
	94	+	B	--			R	R	R	R	S	R	S
	95	+	B	--			I	S	S	R	R	R	R
	111	+	B	-			R	R	I	R	R	R	I
	112	+	-	--			R	R	R	R	R	R	R
	113	+	B	--			R	R	R	R	R	R	R
	116	+	-	--			R	R	R	R	R	R	R
	117	+	B	--			R	R	R	S	R	R	R
	122	+	-	--			R	R	S	R	S	R	R
	126	+	-	--			R	R	S	R	R	R	R
B (cont.)	127	+	B	--			R	S	S	R	R	R	S
	18	+	B	--	0.045		S	R	S	S	R	R	R
	34	+	B	--	0.125		S	R	R	S	R	R	R
	38	+	B	--	0.028		S	R	R	S	R	R	R
	43	+	-	--	0.337		S	I	S	R	R	R	R
	40	+	-	--	0.017		S	R	S	R	R	R	R
	49	+	-	--	0.013		S	R	S	S	R	R	R

Group	Clone No.	<i>mexAB</i> - <i>oprM</i>	<i>mexXY</i>	<i>oprD</i>	<i>mexCD</i> - <i>oprJ</i>	AmpC	Antibiotic susceptibility						
							IMI	MEM	DOR	PIP	CTZ	CIP	GEN
C	8	B	-	-			I	R	R	R	R	R	R
	45	B	-	--			R	R	R	R	R	R	R
	50	B	-	--			R	R	R	R	R	R	R
	83	-	-	--			R	I	S	R	R	R	R
	98	-	-	--			I	S	S	R	R	R	R
	102	B	-	--			R	R	I	R	R	R	R
	123	-	-	-			S	R	S	R	R	R	R
	12	B	-	--	0.002		S	R	S	S	R	R	R
	33	-	-	--	0.146	+	S	R	R	S	R	R	R
D	65	+	+	+			R	R	R	R	R	R	R
	66	+	+	+		+	R	I	S	R	R	S	S
	74	+	+	+			R	R	R	R	R	R	R
	77	+	+	+			R	R	I	R	I	R	S
	78	+	+	+			S	R	S	R	S	R	S
	92	+	+	+			R	R	S	R	R	R	R
	99	+	+	+			S	R	R	R	R	R	R
E	80	B	+	+			S	R	S	R	R	R	R
F	100	+	B	+			I	R	R	R	R	R	R
Other	68						R	R	R	R	R	R	R
	93						R	R	R	R	R	R	R
	118						I	R	I	R	R	R	S
	124						R	R	R	S	R	R	R

3.4 การทดสอบความไวของ *P. aeruginosa* ต่อน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบความไวของ *P. aeruginosa* PAO1 ต่อน้ำมันหอมระเหยทั้ง 17 ชนิด พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ตะไคร้ และ กานพลู (ดอกตูม) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* ได้ดี โดยมีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 0.225, 1.8 และ 1.8 (v/v) ตามลำดับ ส่วนค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยมีค่าร้อยละ 0.225 v/v ซึ่งเท่ากับค่า MIC แสดงถึงฤทธิ์ bactericidal ที่ดีมาก ส่วนค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และกานพลู (ดอกตูม) นั้นมากกว่าร้อยละ 1.8 v/v สำหรับน้ำมันหอมระเหยอีก 14 ชนิดมีค่า MIC และ MBC มากกว่าร้อยละ 1.8 v/v (ตารางที่ 13)

นอกจากนี้ยังทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 ของสารสำคัญกลุ่มเทอร์ปีนจากน้ำมันหอมระเหยที่มีจำหน่ายทางการค้า พบว่า (19)-(-)-D-pinene และ eugenol ให้ค่า MIC ที่ดีที่สุด คือ ร้อยละ 0.45 และ 0.9 v/v ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหย 17 ชนิดต่อ *P. aeruginosa* PAO1

น้ำมันหอมระเหย	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
พลู betel vine oil	> 1.8	> 1.8
เปลือกอบเชย cinnamon bark oil	0.225	0.225
ตะไคร้หอม citronella oil	> 1.8	> 1.8
กานพลู-ดอกตูม clove oil	1.8	>1.8
กานพลู-ใบ clove leaf oil	> 1.8	> 1.8
ข่า galanga oil	> 1.8	> 1.8
ใบฝรั่ง guava leaf oil	> 1.8	> 1.8
แมงลัก hairy basil oil	> 1.8	> 1.8
กะเพรา holy basil oil	> 1.8	> 1.8
ผิวมะกรูด kaffir lime oil	> 1.8	> 1.8
ใบมะกรูด kaffir lime leaf oil	> 1.8	> 1.8
มะนาว lemon oil	> 1.8	> 1.8
ตะไคร้ lemongrass oil	1.8	>1.8
กระชาย finger root oil	> 1.8	> 1.8
ไพล plai oil	> 1.8	> 1.8
โหระพา sweet basil oil	> 1.8	> 1.8
ขมิ้น turmeric oil	> 1.8	> 1.8

ตารางที่ 14 ค่า MIC และ MBC ของสารสำคัญกลุ่มเทอร์ปีนจากน้ำมันหอมระเหย ต่อ *P. aeruginosa* PAO1

Active compounds	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
γ -terpinene	> 0.9	> 0.9
citronellal	> 0.9	> 0.9
\pm linalool	> 0.9	> 0.9
D-limonene	> 0.9	> 0.9
(19)-(-)-D-pinene	0.45	> 0.9
eugenol	0.9	> 0.9
α -terpinene	> 0.9	> 0.9
(-)-trans-caryophyllene	> 0.9	> 0.9
citral	> 0.9	> 0.9
methyl chavicol	> 0.9	> 0.9
methyl eugenol	> 0.9	> 0.9

จากผลการทดลองข้างต้น จึงคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ตะไคร้ และกานพลู (ดอกตูม) มาทดสอบความไวของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาที่คัดเลือกมาจากกลไกการดื้อยาต่างๆ 20 สายพันธุ์ พบว่า น้ำมันเปลือกอบเชยมีฤทธิ์ต้านเชื้อดีที่สุด โดยมีค่า MIC ระหว่างร้อยละ 0.0562-0.225 v/v และค่า MBC ระหว่างร้อยละ 0.1125-1.8 v/v รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีค่า MIC ระหว่างร้อยละ 0.45-1.8 v/v และค่า MBC ระหว่างร้อยละ 0.9 หรือมากกว่า 1.8 v/v ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (ดอกตูม) มีค่า MIC ระหว่างร้อยละ 0.9 หรือมากกว่า 1.8 v/v และค่า MBC ตั้งแต่ร้อยละ 1.8 v/v (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ค่า MIC และ MBC (%v/v) ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ตะไคร้ และกานพลู (ดอกตูม) ต่อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา 20 สายพันธุ์

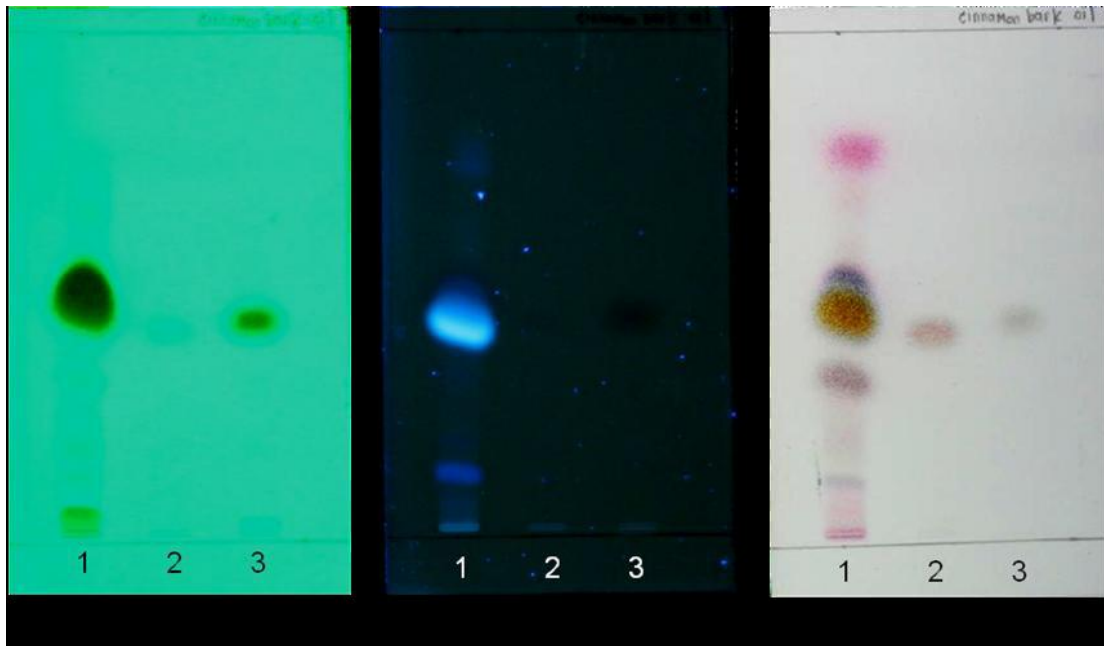
Clinical PA Strains	cinnamon bark oil		clove oil		lemongrass oil	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
PA CM08	0.1125	0.225	>1.8	>1.8	0.9	0.9
PA CM14	0.225	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
PA CM30	0.1125	0.225	>1.8	>1.8	1.8	1.8
PA CM45	0.225	0.225	1.8	>1.8	1.8	1.8
PA KK09	0.1125	0.225	1.8	>1.8	0.9	1.8
PA KK16	0.225	0.225	>1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA UB12	0.1125	0.225	1.8	>1.8	0.9	1.8
PA UB28	0.1125	0.1125	1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA CH08	0.1125	0.225	1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA CH32	0.1125	0.225	1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA RY04	0.1125	0.1125	0.9	>1.8	0.45	1.8
PA RY05	0.1125	0.225	>1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA RA12	0.1125	0.225	1.8	>1.8	0.9	>1.8
PA RA15	0.1125	0.225	1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA SI13	0.1125	0.1125	1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA SI33	0.1125	0.225	1.8	>1.8	0.9	>1.8
PA SK20	0.225	0.225	1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA SK35	0.225	0.225	1.8	>1.8	1.8	>1.8
PA SR21.8	0.1125	0.225	1.8	>1.8	0.9	>1.8
PA SR28	0.0562	0.225	1.8	>1.8	1.8	>1.8

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา 20 สายพันธุ์ต่อน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ตะไคร้ และกานพลู (ดอกตูม) ในการศึกษาที่กับการศึกษาของ Mayaud L และคณะ (2008) ซึ่งระบุค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดข้างต้นต่อ *P. aeruginosa* ATCC และ ESBL strains ดังนี้ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยมีค่า MIC ที่ร้อยละ 0.24 ± 0.08 v/v พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกัน ขณะที่ผลการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และกานพลู (ดอกตูม) มีค่า MIC มากกว่าร้อยละ 10 v/v นั้นมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการทดสอบ ซึ่งการศึกษานี้ใช้วิธี broth microdilution ส่วนการศึกษาของ Mayaud L และคณะ (2008) ใช้วิธี agar dilution และอีกปัจจัยหนึ่งน่าจะเกิดจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่ต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ เนื่องจากแหล่งวัตถุดิบและกระบวนการในการสกัดที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาของ Mayaud L และคณะ (2008) ระบุถึงสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ คือ *E*-citral และ *Z*-citral เป็นร้อยละ 40.04 และ 28.87 ตามลำดับ ส่วนสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (ดอกตูม) คือ eugenol และ eugenol acetate เป็นร้อยละ 75.52 และ 12.25 ตามลำดับ สำหรับการศึกษาที่ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มี *E*-citral และ *Z*-citral ร้อยละ 52.88 และ 38.13ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (ดอกตูม) มีเฉพาะ eugenol ร้อยละ 96.24 จึงมีความเป็นไปได้ที่ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่มากกว่า จะทำให้ค่า MIC ในการศึกษาที่น้อยกว่า

เมื่อเปรียบเทียบผล MIC และ MBC ของเชื้อทั้ง 20 สายพันธุ์ ซึ่งมีรูปแบบการดื้อยาที่ต่างกันทั้งหมด พบว่าค่า MIC และ MBC ใกล้เคียงกัน อาจเกิดมาจากการมีกลไกการดื้อยาบางอย่างที่เหมือนกัน จึงทำให้มีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยใกล้เคียงกัน

3.5 การทดลองหาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี bioautography

การแยกสารเคมีซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยด้วยวิธี TLC เทียบกับสารมาตรฐานคือ ซินนามาลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) และยูจีนอล (eugenol) จากนั้นคำนวณค่า Rf ได้ดังนี้ สารมาตรฐานซินนามาลดีไฮด์ Rf 0.464 และสารมาตรฐานยูจีนอล Rf 0.416 (รูปที่ 16) การทดลองหาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยด้วยวิธี bioautography พบวงใส (clear zone) ที่ตำแหน่ง Rf ระหว่าง 0.412-0.576 (รูปที่ 17) ดังนั้นผลการทดลองคาดว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย คือ ซินนามาลดีไฮด์ และยูจีนอล

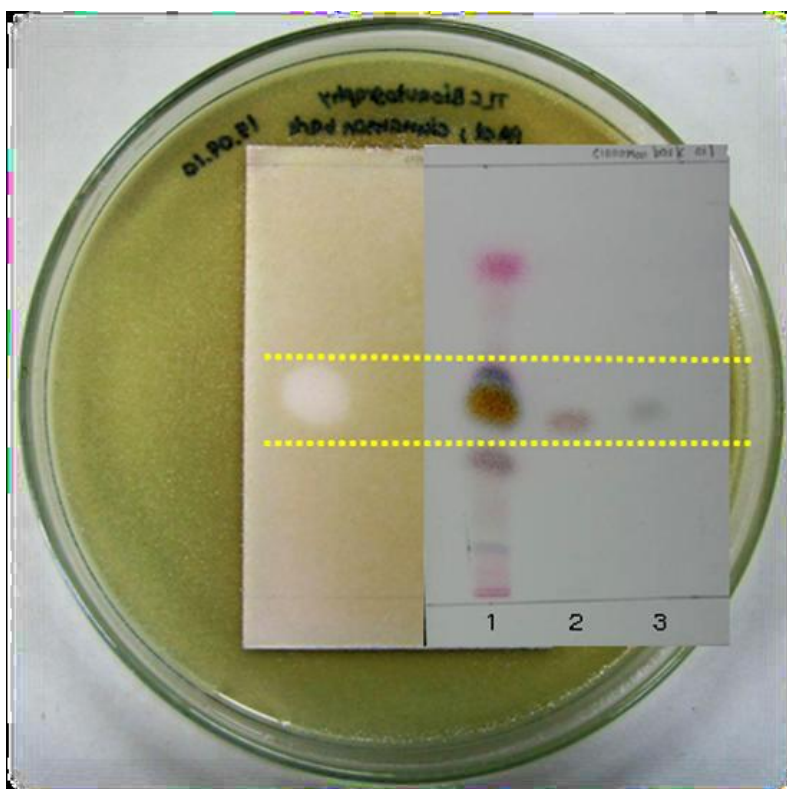


รูปที่ 16 TLC chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และแสงขาว

- 1 = สารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย
- 2 = สารละลายมาตรฐาน eugenol
- 3 = สารละลายมาตรฐาน cinnamaldehyde

รูปที่ 17 ตำแหน่ง clear zone (Rf 0.412-0.576) ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยที่ได้จากการทดลอง bioautography เทียบกับแผ่น TLC ซึ่งเป็น Reference

- 1 = cinnamon bark oil
- 2 = eugenol; Rf 0.416
- 3 = cinnamaldehyde; Rf 0.464)



ซินนามาลดีไฮด์เป็นสารกลุ่ม aromatic aldehyde พบได้ประมาณร้อยละ 60-70 ในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดี เนื่องจากเป็นสารที่มีอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity) สูง ทำให้มีผลต่อกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และทำปฏิกิริยากับสารประกอบไนโตรเจนที่สำคัญเช่น โปรตีนและสารพันธุกรรมของเชื้อ จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ นอกจากนี้ในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยยังพบยูจีนอลได้ประมาณร้อยละ 5-7 ยูจีนอลเป็นสารในกลุ่ม phenol จากการศึกษาพบว่าสารในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของ นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาซึ่งแสดงว่ายูจีนอลมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ดังนั้นสารเคมีซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดในน้ำมันหอมระเหย อาจออกฤทธิ์ร่วมกันในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยรวมแล้วน้ำมันหอมระเหยออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยทำให้เกิดการรวมตัวกันของสารต่างๆในไฮโดรพลาสซึม และทำลายเซลล์เมมเบรนของเชื้อ ทำให้เกิดการรั่วของสารภายในเซลล์ออกมาภายนอกและเซลล์ตายในที่สุด

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี Gaseous contact

ด้วยคุณสมบัติการระเหยง่ายของน้ำมันหอมระเหย จึงอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการลดการเจริญของ *P. aeruginosa* ในรูปยาพ่น หรือในรูป nablizer ที่เข้าสู่ระบบทางเดินหายใจโดยตรง ดังนั้น การทดลองนี้จึงมุ่งเน้นฤทธิ์ต้านเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์คือยา 20 สายพันธุ์ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยให้ค่า MID ที่ 1-2 mg/L ส่วนสารออกฤทธิ์ คือ ซินนามาลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) นั้นให้ค่า MID ที่ 0.5-1 mg/L และยูจีนอล (eugenol) ให้ค่า MID มากกว่า 2 mg/L จะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์ในสภาวะระเหยที่ดีที่สุดคือ ซินนามาลดีไฮด์ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ค่า MID ของน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์

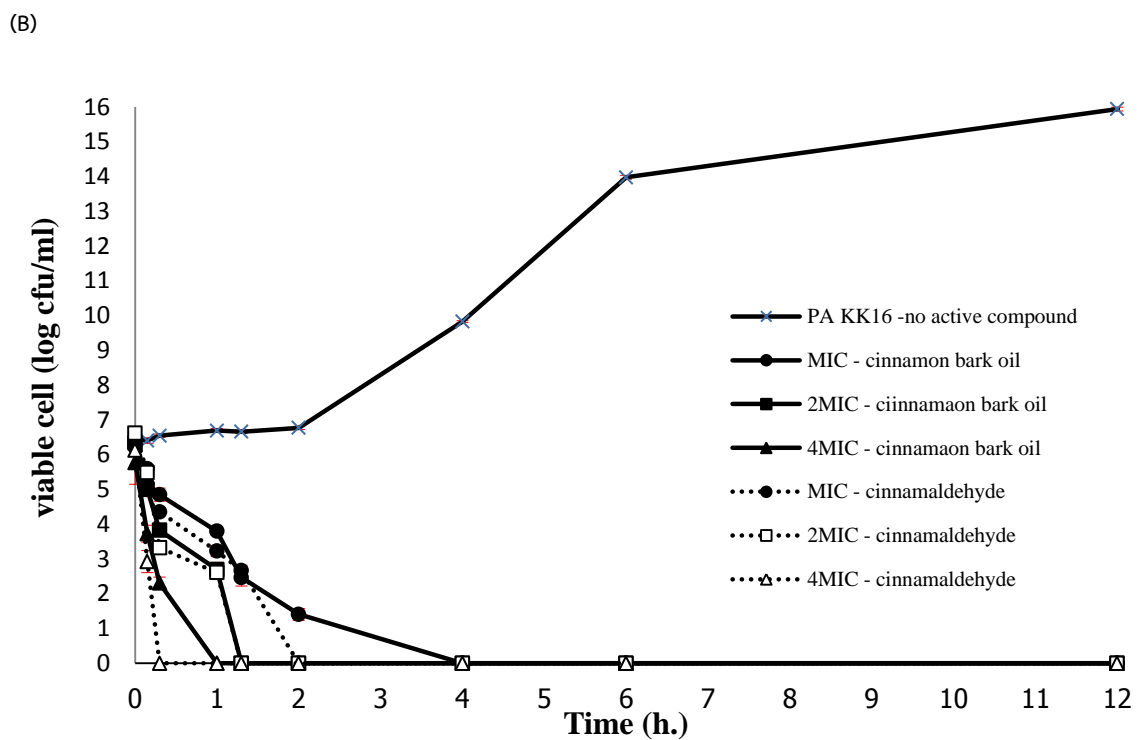
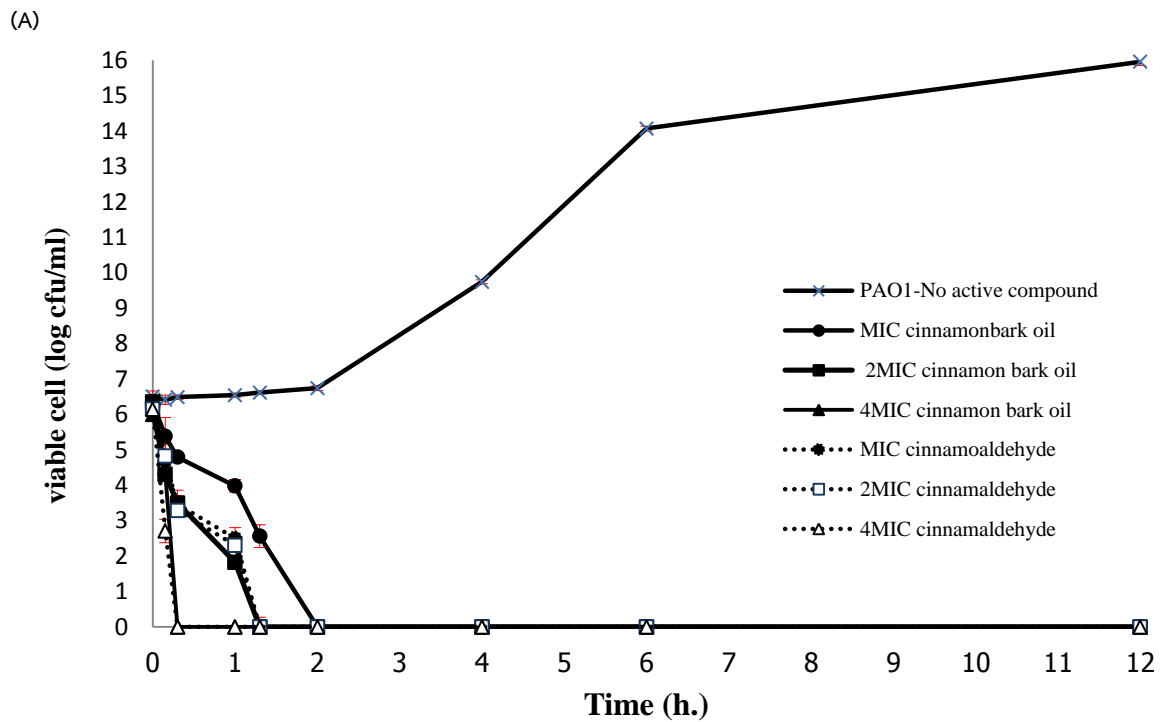
Strains	Cinnamon bark oil (mg/L)			Cinnamaldehyde (mg/L)			Eugenol (mg/L)			Lemongrass oil (mg/L)			Clove oil (mg/L)		
	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5
PAO 1	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UB 07	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UB 21	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UB 40	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UB 48	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
KK 04	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
KK 08	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RY 02	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RY 14	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RA 30	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CH 08	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Si 04	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Si 14	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CM 15.2	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CM 25	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(ต่อ)

Strains	Cinnamon bark oil (mg/L)			Cinnamaldehyde (mg/L)			Eugenol (mg/L)			Lemongrass oil (mg/L)			Clove oil (mg/L)		
	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5
CM 27.2	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CM 28.2	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SR 27	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RA 37	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RY 12	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

3.7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต *P. aeruginosa* ของ cinnamon bark oil และ cinnamaldehyde

การศึกษาศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* ที่ระยะเวลาต่างๆ ของ cinnamon bark oil และ cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC, 2 และ 4 เท่าของ MIC โดยใช้วิธี time killing assay และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ดื้อยามาทำการทดสอบ จากผลการทดลองพบว่า cinnamon bark oil สามารถลดปริมาณและทำลาย *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานได้ภายในเวลา 2 ชม. ที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC ส่วน cinnamaldehyde ใช้เวลาเพียง 1.3 ชม. (รูปที่ 18) ในขณะที่ผลของสารทั้งสองชนิดต่อเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาเป็นไปในทางที่สอดคล้องกันแต่ใช้เวลาในการทำลายเชือนานขึ้น คือ cinnamon bark oil ใช้เวลา 4 ชม. ส่วน cinnamaldehyde ใช้เวลาเพียง 2 ชม. ที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารทั้งสองสามารถทำลายเชื้อลงได้ถึง 10^6 cfu/ml ซึ่งฤทธิ์ในการทำลายเชื้อดังกล่าวแปรผันตามความเข้มข้นของสารทดสอบที่เพิ่มมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากที่ 4 เท่าของ MIC สารทั้งสองสามารถทำลายเชื้อได้ภายในเวลา 1 ชม.



รูปที่ 18 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต *P. aeruginosa* ของ cinnamon bark oil และ cinnamaldehyde ด้วยวิธี Time-Killing assay ต่อ PAO1 (A) และ MDR-PA KK 16 (B) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.8 การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพกับ cinnamon bark oil/cinnamaldehyde

การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* แบบเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพกับ cinnamon bark oil หรือ cinnamaldehyde โดยทำการทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ดื้อยา จากผลการทดลอง พบว่า colistin ให้ผลเสริมฤทธิ์กับ cinnamon bark oil ที่ร้อยละ 16.7 และเสริมฤทธิ์กับ cinnamaldehyde ที่ร้อยละ 10 นอกจากนี้ยังพบการเสริมฤทธิ์กันของ meropenem และ cinnamon bark oil ที่ร้อยละ 3.3 แต่ไม่พบการต้านฤทธิ์กันของ cinnamon bark oil หรือ cinnamaldehyde กับยาทั้ง 7 ชนิดที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* เลย (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพ 7 ชนิดกับ cinnamon bark oil/cinnamaldehyde ต่อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา 30 สายพันธุ์

Combinations	Interaction activity			
	SYN	ADD	ANT	ND
COL +CIN	16.7(5)	83.3(25)	-	-
COL +CMD	10(3)	90(27)	-	-
MER +CIN	3.3(1)	96.7(29)	-	-
MER +CMD	-	100(30)	-	-
IMI +CIN	-	100(30)	-	-
IMI + CMD	-	100(30)	-	-
DOR +CIN	-	100(30)	-	-
DOR + CMD	-	100(30)	-	-
CIP +CIN	-	100(30)	-	-
CIP + CMD	-	100(30)	-	-
PIP +CIN	-	100(30)	-	-
PIP+ CMD	-	100(30)	-	-
CEF +CIN	-	46.7(14)	-	53.3(16)
CEF+ CMD	-	46.7(14)	-	53.3(16)

SYN : synergy, ADD : additivity, ANT : antagonist and ND : not detected, FICI could not calculated due to MIC of the drug more than 2048 µg/ml

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวโน้มการดื้อยาระดับโมเลกุลของ *Pseudomonas aeruginosa* ในประเทศไทย รวมถึงการคัดกรองหาน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า

จากการเก็บรวบรวม *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานจาก 9 โรงพยาบาลระดับตติยภูมิทั่วประเทศไทยตั้งแต่ปีค.ศ. 2007-2009 โดยจากทั้งหมด 329 สายพันธุ์พบเป็น *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายขนานรวมทั้งยากลุ่มคาร์บาพีเนมส์ร้อยละ 72.95 ผลการทดลองพบการดื้อต่อยา ceftazidime ในอัตราที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มคาร์บาพีเนมส์พบการดื้อยา meropenem มากที่สุดกว่าร้อยละ 50 ในทุกโรงพยาบาลยกเว้นเพียงหนึ่งโรงพยาบาล ผลจากวิธี PFGE พบว่ามี 130 สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันถึงร้อยละ 95 สำหรับกลไกการดื้อยาที่พบในเชื้อเหล่านี้ในอัตราที่สูงที่สุด คือ การลดการสร้าง *oprD* mRNA (ร้อยละ 92.86) ตามมาด้วยการเพิ่มการสร้าง *mexAB-oprM* mRNA (ร้อยละ 92.06) และ *mexXY* mRNA (ร้อยละ 63.49) กลไกการดื้อยาที่พบน้อยที่สุด คือ การสร้าง AmpC β -lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่ม serine β -lactamases พบเพียงร้อยละ 3.97

จากนั้นทำการคัดกรองหาน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา โดยศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย 17 ชนิด ได้แก่ กะเพรา กระชาย กานพลู (ดอกตูมและใบ) ขมิ้น ข่า ตะไคร้ ตะไคร้หอม ใบฝรั่ง พลู โพล มะกรูด (ผลและใบ) มะนาว แมงลัก โหระพา และเปลือกอบเชยกับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐาน จากนั้นจึงคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดี 2-3 ชนิด นำมาทดสอบกับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา 20 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยเพื่อหาน้ำมันหอมระเหยที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด จากนั้นจึงทดสอบสารออกฤทธิ์โดยแยกสารซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC โดยใช้ system เป็น toluene : ethyl acetate (93:7) แล้วทดสอบสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี bioautography ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ตะไคร้ และกานพลู (ดอกตูม) มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานดีที่สุดเป็นสามลำดับแรก และน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยมีฤทธิ์ดีที่สุดในการต้าน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาทั้ง 20 สายพันธุ์ โดยมีค่า MIC ระหว่างร้อยละ 0.0562-0.225v/v และค่า MBC ระหว่างร้อยละ 0.1125-1.8v/v จากการทดลองคาดว่าสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย คือ ซินนามาลดีไฮด์ และยูจินอล นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบในสภาวะระเหยในระบบปิด พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยให้ค่า MID ที่ 1-2 mg/L ส่วนสารออกฤทธิ์ คือ ซินนามาลดีไฮด์ ให้ค่า MID ดีที่สุดที่ 0.5-1 mg/L กับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานและ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา 20 สายพันธุ์

นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* แบบเสริมฤทธิ์กันของยาด้านจุลชีพกับ cinnamon bark oil หรือ cinnamaldehyde โดยทำการทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ดื้อยา พบว่า colintin ให้ผลเสริมฤทธิ์กับ cinnamon bark oil ได้ดีที่สุดคิดเป็นร้อยละ 16.7 และยังพบการเสริมฤทธิ์กับ cinnamaldehyde คิดเป็นร้อยละ 10 แต่ไม่พบการต้านฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยและยาด้านจุลชีพที่ทดสอบทั้ง 7 ชนิดเลย

เอกสารอ้างอิง

1. Cunha BA. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. Semin Respir Infect. 2002; 17: 231-239.
2. อนุชา อภิสารธนรักษ์, ภูริทัต เมืองบุญ. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection in community hospital). หมอชาวบ้าน. 2550 ธันวาคม; 276: 1.
3. Karlowsky J A, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 1681-8.
4. McGowan JE. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. Am J Med 2006; 119: s 26-31.
5. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(6): 560 – 78.
6. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. Crit Care Med. 2009; 37(5):1777-86.
7. Wang S, Kwok M, McNamara JK, Cunha BA. Colistin for multi-drug resistant (MDR) gram-negative bacillary infections. Antibiotics for Clinicians. 2007;11:389-396.
8. Tantracheewathorn T, Vititpatarapak N, and Phumisantiphong U. Epidemiologic study of nosocomial bacterial infection of pediatric patients at BMA Medical College and Vajira Hospital. J Med Assoc Thai. 2007; 90(2): 258-65.
9. Raja, N.S. and Singh, N.N. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. J Microbiol Immunol Infect. 2007; 40(1): 45-9.
10. Hanberger, H., et al., Low antibiotic resistance rates in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp but not in *Enterobacter* spp and *Pseudomonas aeruginosa*: a prospective observational study in 14 Swedish ICUs over a 5-year period. Acta Anaesthesiol Scand. 2007; 51(7): 937-41.
11. Tsuji A, Kobayashi I, Oguri T, Inoue M, Yabuuchi E, Goto S. An epidemiological study of susceptibility and frequency of multipliedrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated at medical institutes nationwide in Japan. Journal of Infection and Chemotherapy 2005; 11: 64–70.
12. Linda SM, Ooi YL, Kam SL, Wang H, Elaine YL. Wong and Vincent EC. Ooi, Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese

medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. The American Journal of Chinese Medicine 2006;34(3): 511–522.

13. Mehmet Unlu, Emel Ergene, Gulhan Vardar Unlu, Hulya Sivas Zeytinoglu, Nilufer Vural. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food and chemical toxicology 2010; 48:3274–3280.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ

1. Khuntayaporn P, Montakantikul P, Mootsikapun P, Thamlikitkul V, **Chomnawang MT**. Prevalence and genotypic relatedness of carbapenem resistance among multidrug-resistant *P. aeruginosa* in tertiary hospitals across Thailand. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012 Sep 13;11:25. doi: 10.1186/1476-0711-11-25.
2. Khuntayaporn P, Montakantikul P, Santanirand P, Kiratisin P, **Chomnawang MT**. Molecular investigation of carbapenem resistance among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated clinically in Thailand. *Microbiol Immunol*. 2013 Mar;57(3):170-8. doi: 10.1111/1348-0421.12021.
3. Utcharyakiata I, Khuntayaporn P, Jaturanpinyo M, **Chomnawang MT**. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde as anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. (submitted)