# ผลของยา Ceftazidime และ Meropenem ต่อ Biofilm ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากผู้ป่วย

# Effects of Ceftazidime and Meropenem on the Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates

สัณห์สิรี เมืองมาลย์* จิราภรณ์ เกตุดี กัญญนันทน์ กฤษศิริวุฒินันท์ และ นิภาพร เทวาวงศ์

Sunsiree Muangman Jiraporm Gatedee Kanyanan Kritsiriwuthinan and Nipaporn Tewawong

*คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต*

*Faculty of Medical Technology, Rangsit University*

**Corresponding author, E mail: Sunsiree.m@rsu.ac.th*

**บทคัดย่อ**

*Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาส ซึ่งมักเกิดขึ้นขณะผู้ป่วยได้รับการรักษาในโรงพยาบาล หนึ่งในปัจจัยก่อโรคและการดื้อยาเกิดจากการที่เชื้อสร้างไบโอฟิล์ม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ ceftazidime และ meropenem ต่อการสร้างและทำลายไบโอฟิล์ม ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 23 ไอโซเลท ด้วยวิธี colorimetric microtiter plate method ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *P. aeruginosa* ส่วนใหญ่ (ร้อยละ74) สามารถสร้างไบโอฟิล์มในระดับปานกลางที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นเวลานานขึ้นที่ 48, 72 ชั่วโมง และ 7 วัน เชื้อทุกไอโซเลทสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้รุนแรงมากขึ้นตามลำดับ ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 90 (MIC90) โดยวิธี microtiter broth dilution method พบว่า ค่าMIC90 ของ ceftazidime ต่อ *P. aeruginosa* 15 ไอโซเลทอยู่ในช่วง 0.3-10.0 µg/mL 4 ไอโซเลทอยู่ในช่วง 11-30 µg/mL และมี 3ไอโซเลทได้ค่า MIC90 > 40 µg/mL สำหรับค่า MIC90 ของ meropenem พบว่ามี 20 ไอโซเลท อยู่ในช่วง 0.15-2.0 µg/mL และ 3 ไอโซเลทได้ค่า > 20 µg/mL ยา ceftazidime และ meropenem สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells ได้ และยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อทำการทดสอบยา ceftazidime และ meropenem ต่อการทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างไว้แล้ว พบว่า ยา ceftazidime และ meropenem ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างไว้แล้วให้ลดลงได้ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างไบโอฟิล์มทำให้การวิวัฒนาการของเชื้อเกิดการดื้อยาได้มากขึ้นและทำให้ยากต่อการรักษา

***คำสำคัญ:*** *Pseudomonas aeruginosa, ไบโอฟิล์ม, เซฟตาซิดิม, เมอโรเพนเนม*

มหาวิทยาลัยรังสิต

**Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing nosocomial infections. Bacterial biofilm is one of bacterial virulences contributing to antibiotics resistance. The aim of this study was to explore the ability of *P. aeruginosa* clinical isolates in biofilm formation (n=23), obtained from Thammasart University Hospital, using the colorimetric microtiter plate method, and to investigate the efficiency of antibiotics ceftacidime and meropenem against bacterial biofilms. The result showed that 74% of *P. aeruginosa* clinical isolates, obtained from Thammasart University Hospital, moderately formed biofilms at 24 hours after inoculation. All of these isolate (n=23) eventually formed increasingly stronger biofilms after 48, 72, and 168 hours (7 days). Minimum inhibition concentrations (MIC) of ceftazidime and meropenem against *P. aeruginosa* were determined using the microtiter broth dilution method. The ceftazidime MIC90 values against 15 isolates, 4 isolates, and 3 isolates were 0.3-10.0 µg/mL, 11-30 µg/mL, and > 40 µg/mL, respectively. The meropenem MIC90 values against 20 isolates and 3 isolates were 0.15-2.0 µg/mL > 20 µg/mL. Ceftazidime and meropenem significantly inhibited the growth of planktonic *P. aeruginosa* cells as well as biofilm formation ($p<0.05$). However, both antibiotics could not disperse the 24-hour preformed biofilms. This study suggested that the ability of bacteria to form biofilm could contribute to antibiotic resistance and cause difficulty in medical treatment.

***Keywords:*** *Pseudomonas aeruginosa, biofilm, Ceftazidime, Meropenem*

## 1. บทนำ

*Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาส และมักก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เกิดการติดเชื้อได้หลายระบบในร่างกาย ได้แก่ ระบบประสาทส่วนกลาง หัวใจและหลอดเลือด ทางเดินปัสสาวะ ตาและหู ปอด ผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน โดยจะมีการติดเชื้อกับผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรือผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน (Mulcahy, Isabella, & Lewis, 2014) โรคติดเชื้อจาก *P. aeruginosa* สามารถแพร่กระจายภายในโรงพยาบาลโดยผ่านทางบุคลากร การสัมผัส อุปกรณ์การแพทย์ น้ำยาฆ่าเชื้อ และอาหาร ปัญหาที่สำคัญคือ เชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ทำให้ยากต่อการรักษา และ ทำให้มีอัตราเสียชีวิตได้สูง โดยเฉพาะจากการติดเชื้อในกระแสเลือด และการติดเชื้อที่ปอด มีหลายปัจจัยที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ *P.aeruginosa* เช่น เชื้อสร้างโปรตีนที่มาทำลายเนื้อเยื่อ ความสามารถในการเกาะยึดติดกับเยื่อบุผิว เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm)

ไบโอฟิล์มเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันโดยมีการสร้างสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) และเส้นใย amyloid ช่วยป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเป็นกรด-เบส ภาวะขาดน้ำ การถูกจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytosis) และการซึมผ่านของยาปฏิชีวนะ ไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* มีบทบาทสำคัญต่อการรักษาโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เป็นแผลเรื้อรัง ผู้ป่วยโรค cystic fibrosis ผู้ป่วยที่มีการใช้สายยาง (Catheter)

ใส่เข้าไปในร่างกายเป็นระยะเวลานานทำให้เชื้อมีโอกาสสร้างไบโอฟิล์มได้ ดังนั้น การให้ยาฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวจึงอาจไม่เพียงพอต่อการรักษาถ้าไม่มีการทำลายไบโอฟิล์มร่วมด้วย (Lebeaux, Ghigo, & Beloin, 2014)

ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วย เพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการสร้างการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* และศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ ceftazidime และ meropenem ต่อการสร้างและทำลายไบโอฟิล์ม ซึ่งในอนาคตสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการรักษา และศึกษากลไกของการสร้างไบโอฟิล์มต่อไป

**2. วัตถุประสงค์**

เพื่อศึกษาการสร้าง biofilm ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และศึกษาผลของยาต้านจุลชีพ คือ ceftazidime และ meropenem ต่อการสร้างและทำลายไบโอฟิล์ม

**3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย**

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ใช้ทดสอบแยกได้จากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 23 ไอโซเลท ยาปฏิชีวนะ Ceftazidime (Siam Bheasach Co. Ltd., Thailand) และ Meropenem (Biopharm Co, Ltd., Thailand)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี colorimetric microtiter plate method (Ghanbarzadeh Corehtash, Khorshidi, Firoozeh, Akbari, & Mahmoudi Aznaveh, 2015; Knezevic & Petrovic, 2008) โดยย่อดังนี้ ทำการเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ใน trypticase soy broth (TSB) แล้วนำไป incubate ที่ 37 $^{o}$C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อดูการสร้างไบโอฟิล์มที่ 24, 48, 72 ชั่วโมง และ 7 วันตามลำดับ จากนั้นนำไปย้อมไบโอฟิล์มด้วย 0.1% crystal violet แล้วละลายด้วย 95% ethanol วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm โดย microplate reader เปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิล์มกับ non-culture control โดยแบ่งระดับการสร้างไบฟิล์มออกเป็น 4 ระดับ ดังการศึกษาของ ดังนี้คือ Strong biofilm formation ($4xODc < ODi$), Moderate biofilm formation ($2xODc < ODi \leq 4xODc$), Weak biofilm formation ($ODc < ODi \leq 2xODc$), Non-producer biofilm ($ODi < ODc$), โดย ODc คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ uninoculated medium, ODi คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ *P. aeruginosa inoculated* (Ghanbarzadeh Corehtash et al., 2015)

ทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration: MIC) ของ ceftazidime และ meropenem ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 23 isolates โดยวิธี microtiter broth dilution method ตามวิธีการของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน 96-well microtiter plate ที่มียา ceftazidime หรือ meropenem ตั้งแต่ 0-40 μg/mL หรือ 0-20 μg/mL ตามลำดับ เมื่อครบเวลาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm นำมาหาค่าความเข้มข้น

มหาวิทยาลัยรังสิต

ต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ร้อยละ90 (MIC90)ในหลุมที่มียาเทียบกับกับหลุมที่ไม่มียา (antibiotic-free control) ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ MIC ใช้ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นสายพันธุ์ควบคุม

ทำการศึกษาผลของยา ceftazidime และ meropenem ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็น planktonic cells (growth inhibition assay) โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของยาให้มากกว่า ค่า MIC 2-4 เท่า นำยามาบ่มกับเชื้อ *P. aeruginosa* ($10^8$ CFU/mL) จำนวน 100 □Lใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm นำค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่มียามาหาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อเทียบกับหลุมที่ไม่มียา จากนั้นดูดเชื้อออกแล้วล้าง microtiter plate 3 ครั้งด้วย phosphate buffer saline (PBS) แล้วย้อมด้วย 0.1 % crystal violet เพื่อศึกษาการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm inhibition assay)

ทำการศึกษาผลของยา ceftazidime และ meropenem ต่อการกำจัด biofilm ที่มีการสร้างไว้แล้ว 24 ชั่วโมง (biofilm dispersal assay) โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ($10^8$ CFU/mL) จำนวน 100 □Lใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อทำการสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นดูดเชื้อออก แล้วเติม TSB ที่มียา ceftazidime หรือ meropenem ในปริมาณต่างๆ บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดการทำลายไบโอฟิล์มด้วยการย้อม 0.1% crystal vilolet ดังวิธีข้างต้น ทุกการทดสอบทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มในรูปของร้อยละ ทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างของยา ceftazidime และ meropenem ในการการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มโดยใช้ paired t-test

**4. ผลการวิจัย**

การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* clinical isolate ทั้งหมด 23 ไอโซเลท พบว่า *P. aeruginosa* ทุกไอโซเลท สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้แต่อยู่ในระดับที่ต่างกัน ส่วนใหญ่ร้อยละ 74 (17/23 isolates) สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในระดับปานกลาง แต่เมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นเวลานานขึ้นที่ 48, 72 ชั่วโมง เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้น และพบว่ายังมีเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยจำนวน 6 ไอโซเลท (ร้อยละ 26) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ผลการสร้าง Biofilm ของเชื้อ *P. aeruginosa* clinical isolates

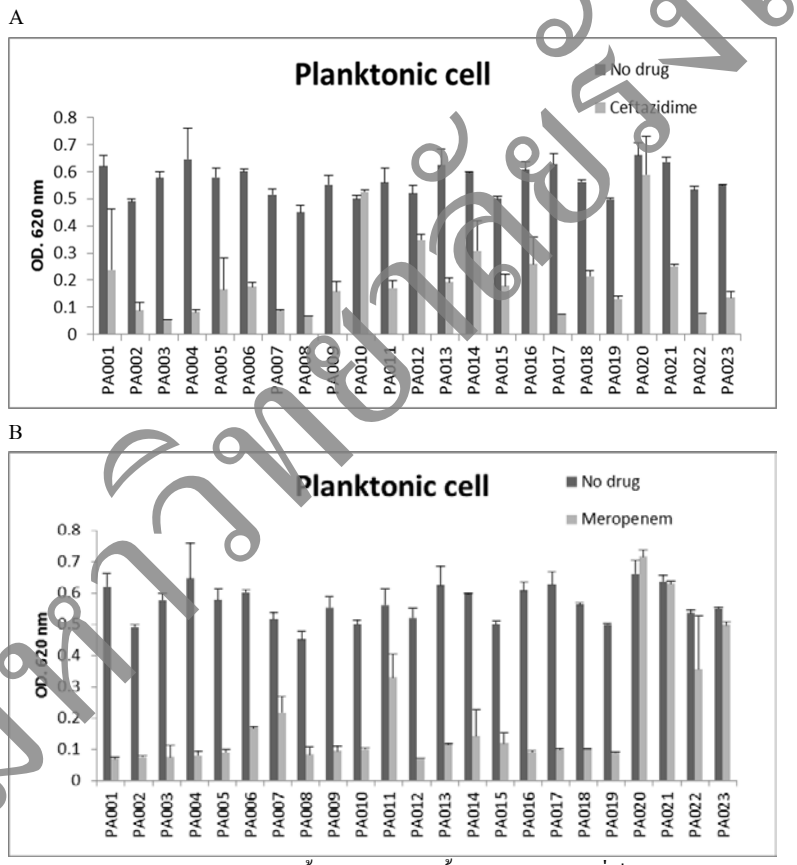
| Biofilm formation | จำนวนไอโซเลทของ *P. aeruginosa* (n=23) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **24 hrs** | **48 hrs** | **72 hrs** | **7 days** |
| Strong | 0 | 16 | 21 | 23 |
| Moderate | 17 | 4 | 2 | 0 |
| Weak | 6 | 3 | 0 | 0 |
| Non-producer | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Total** | **23** | **23** | **23** | **23** |

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นของยา ceftazidime และ meropenem ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 23 isolates โดยวิธี microtiter broth dilution method ช่วงค่าความเข้มข้นของยา ceftazidime และ meropenem ที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ 0-40 μg/mL และ 0-20 μg/mL ตามลำดับ พบว่าค่า MIC90 ของ

มหาวิทยาลัยรังสิต

ceftacidime ต่อเชื้อ*P. aeruginosa* ในช่วง 0.3-10.0 µg/mL (sensitivity) มีจำนวน 15 ไอโซเลท ในช่วง 11-30 µg/mL (intermediate) มีจำนวน 4 ไอโซเลท และ > 40 µg/mL (resistant) มีจำนวน 3 ไอโซเลท ค่า MIC90 ของ meropenem ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ในช่วง 0.15-2.0 µg/mL (sensitivity) มีจำนวน 20 ไอโซเลท มี 3 ไอโซเลท ที่มีค่า MIC90 > 20 µg/mL (resistant)

ผลของยา ceftacidime และ meropenem ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells พบว่า ยา ceftazidime สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % เป็นจำนวน 19 ไอโซเลท และยับยั้งการเจริญได้น้อยกว่า 50 % เป็นจำนวน 4 ไอโซเลท ยา meropenem สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % เป็นจำนวน 18 ไอโซเลท และยับยั้งการเจริญได้น้อยกว่า 50 % มีจำนวน 5 ไอโซเลท



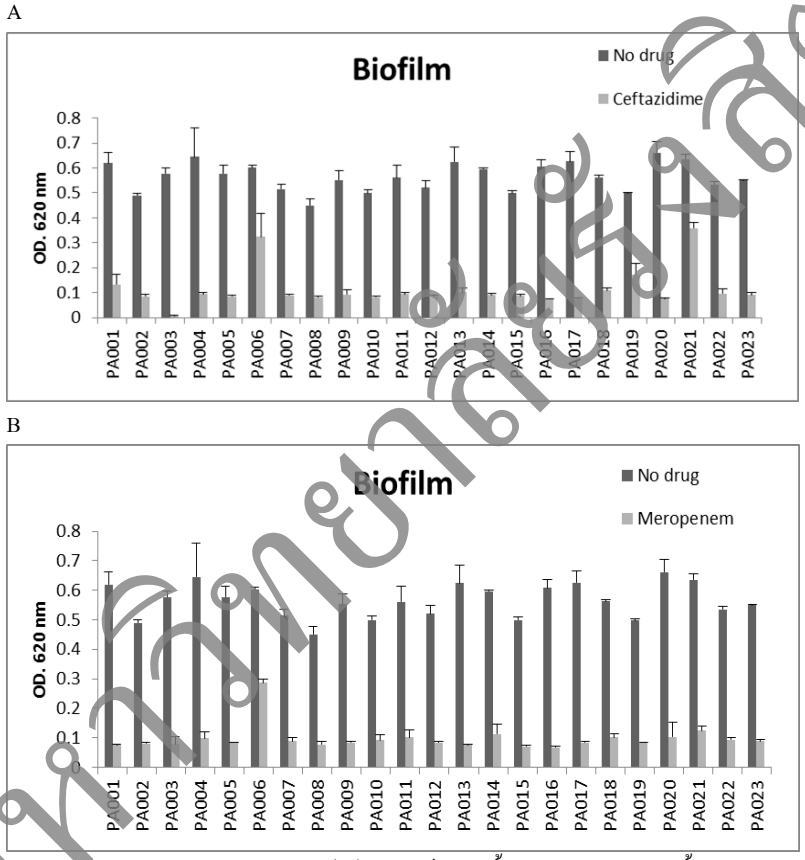

**รูปที่ 1** ผลของยา ceftazidime และ meropenem ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells เชื้อ *P. aeruginosa* ที่วัด OD620 ได้ 0.1 นำมาผสมกับยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 8 µg/mL(A) หรือนำมาผสมกับยา meropenem ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL (B) แล้ว incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ววัดค่า OD ที่ 620 nm กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย OD620 และ error bar แทนค่า SD จากการทดสอบแบบซ้ำสามครั้ง

ผลการทดสอบยา ceftazidime และ meropenem ต่อการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยบ่มกับยาที่ความเข้มข้น 8 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลแสดงดังรูปที่ 3.2 พบว่า ยา ceftazidime ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ

มหาวิทยาลัยรังสิต

*P. aeruginosa* ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % มีจำนวน 21 ไอโซเลท และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่า 50 % มีจำนวน 2 ไอโซเลท

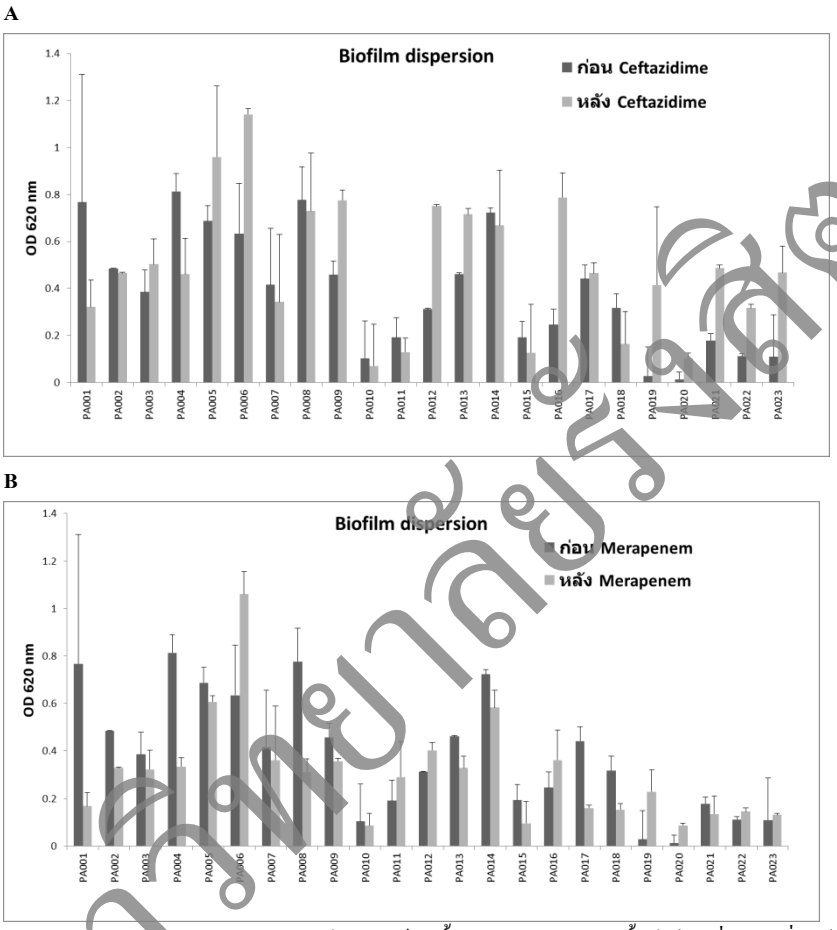
ยา meropenem ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % (จำนวน 22 ไอโซเลท) และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่า 50 % มีจำนวน 1 ไอโซเลท จากการเปรียบเทียบผลของการสร้างไบโอฟิล์มกับพบว่า ยา ceftacidime และ meropenem สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)




**รูปที่ 2** ผลของยา ceftazidime และ meropenem ต่อการการสร้างไบโอฟิล์ม นำเชื้อ *P. aeruginosa* มาเลี้ยงผสมกับยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 8 µg/mL (A) หรือยา meropenem ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL (B) แล้ว incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย 0.1% crystal violet วัดค่า OD ที่ 620 nm กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย OD620 และ error bar แทนค่า SD จากการทดสอบแบบซ้ำสามครั้ง

จากการทดสอบผลของยา ceftacidime และ meropenem ต่อการกำจัด biofilm ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีการสร้างไว้แล้ว 24 ชั่วโมง โดยใช้ยาที่ความเข้มข้นเป็น 8 µg/mL ผลแสดงดังรูปที่ 3.3 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในหลุมให้ยาเทียบกับ antibiotic-free control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า ยา ceftazidime และ meropenem ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างไว้แล้วให้ลดลงได้

มหาวิทยาลัยรังสิต




**รูปที่ 3** ผลของยา ceftazidime และ meropenem ต่อการทำลายไบโอฟิล์ม เชื้อ *P. aeruginosa* ถูกเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นนำมาผสมกับยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 8 µg/mL (A) หรือยา meropenem ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL (B) แล้ว incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย 0.1% crystal violet วัดค่า OD ที่ 620 nm กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย OD620 และ error bar แทนค่า SD จากการทดสอบแบบซ้ำสามครั้ง

## 5. การอภิปรายผล

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วย เพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการสร้างการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* และผลของยาปฏิชีวนะสองชนิด คือ ceftazidime และ meropenem ต่อการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อเหล่านั้น พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ทุกไอโซเลทสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ แต่อยู่ในระดับที่ต่างกัน แต่เมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นเวลานานขึ้น เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้นและสร้างได้ทุกไอโซเลท Corehtash และคณะ (Ghanbarzadeh Corehtash et al., 2015) ได้ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นแผลไฟไหม้พบว่า เชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้แบบ strong ส่วนใหญ่เป็นเชื้อกลุ่ม multidrug resistance *P. aeruginosa* (MDRPA) Sanchez และคณะ (Sanchez et al., 2013) ได้ศึกษาการ

สร้างไบโอฟิล์มของเชื้อหลายชนิดที่แยกได้จากผู้ป่วย เช่น *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*, *E. coli* รวมทั้ง *P. aeruginosa* พบว่า เชื้อเหล่านี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับ clonal type ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และพบว่าเชื้อสายพันธ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้นั้นส่วนใหญ่แยกมาจาก non-fluid tissues เช่น กระดูก หรือเนื้อเยื่ออ่อน มักมาจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อเรื้อรัง และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาภาพรวมความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละไอโซเลทเท่านั้น การวิเคราะห์แหล่งที่มาของเชื้อรวมทั้งรูปแบบในการดื้อยา และระยะเวลาในการติดเชื้อจะทำให้ทราบถึงความสามารถของเชื้อและปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการสร้างไบโอฟิล์มมากขึ้น

ทดสอบค่า MIC90 ของยาต้านจุลชีพ ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่ามี 3 ไอโซเลท ที่มีการดื้อยา ceftazidime (MIC90 > 40 μg/mL) และมี 3 ไอโซเลท ที่ดื้อยา meropenem (MIC90 > 40 μg/mL) เมื่อเทียบกับระดับยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ต่ำกว่าในงานวิจัยของ Kuti และคณะ (Kuti JL, *et al*.,2015) ที่ศึกษา multidrug resistant *P. aeruginosa* ที่แยกจากผู้ป่วย cystic fibrosis ทั้งนี้ เนื่องจากสภาวะของผู้ป่วย cystic fibrosis เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้มากกว่า นอกจากนั้นความแตกต่างของ virulence factor อื่นๆ แต่ละสายพันธุ์อาจส่งผลให้รูปแบบในการดื้อยามีความแตกต่างกัน

การทดสอบผลของยา ceftazidime และ meropenem ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells โดยใช้ยาที่ความเข้มข้นสูงกว่า MIC 10 เท่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ยา ceftazidime และ meropenem สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells ได้ และยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการทดสอบผลของยา ceftazidime และ meropenem ต่อการทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างไว้แล้ว พบว่า ยา ceftazidime และ meropenem ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างไว้แล้วให้ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาการสร้างไบฟิล์มและการทนต่อยาปฏิชีวนะ tobramycin ของ *P. aeruginosa* MPAO1 โดย Amini และคณะ (Amini S, *et al*.,2011) โดยใช้วิธี genome-wide functional profiling พบว่า การเกิด mutation ที่ตำแหน่งต่างกัน ส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อที่อยู่ในรูป planktonic และ biofilm ได้ต่างกัน ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างไบโอฟิล์มทำให้การวิวัฒนาการทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้มากขึ้นและทำให้ยากต่อการรักษา การศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกของการสร้างไบโอฟิล์ม รวมถึงส่วนประกอบต่างๆของไบโอฟิล์ม และกลไกการดื้อยาในระดับโมเลกุลจะช่วยให้มีการพัฒนาวิธีการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P. aeruginosa* ได้ดีขึ้น

**6. บทสรุป**

เชื้อ *P. aeruginosa* clinical isolate สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ทุกไอโซเลท แต่อยู่ในระดับที่ต่างกัน และผลการทดสอบยา ceftazidime และ meropenem สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็น planktonic cells ได้ และยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างไว้แล้วให้ลดลงได้ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างไบโอฟิล์มทำให้การวิวัฒนาการของเชื้อเกิดการดื้อยาได้มากขึ้นและทำให้ยากต่อการรักษา

มหาวิทยาลัยรังสิต

**7. กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณนักศึกษา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต สำหรับความร่วมมือในการทำวิจัย

**8. เอกสารอ้างอิง**

Amini S, Hottes AK, Smith LE, Tavazoie S. (2011). Fitness landscape of antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *PLoS pathogens.7*(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1002298

Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement ; M100 - S23*. Wayne, PA: CLSI.

Ghanbarzadeh Corehtash, Z., Khorshidi, A., Firoozeh, F., Akbari, H., & Mahmoudi Aznaveh, A. (2015). Biofilm Formation and Virulence Factors Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients. *Jundishapur Journal of Microbiology, 8*(10), e22345.

Knezevic, P., & Petrovic, O. (2008). A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Microbiological Methods, 74*(2–3), 114–118. doi:10.1016/j.mimet.2008.03.005

Kuti, J. L., Pettit, R. S., Neu, N., Cies, J. J., Lapin, C., Muhlebach, M. S., … Nicolau, D. P. (2015). Microbiological activity of ceftolozane/ tazobactam, ceftazidime, meropenem, and piperacillin/ tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 83*(1), 53–55. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.012

Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78*(3), 510–543. doi:10.1128/MMBR.00013-14

Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology, 68*(1), 1–12. doi: 10.1007/s00248-013-0297-x

Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke, J. C., & Murray, C. K. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases, 13*(1). doi: 10.1186/1471-2334-13-47

มหาวิทยาลัยรังสิต