# โครงการ
# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จากสารสกัดที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

**ชื่อนิสิต** นางสาว ชาญินี โกมลวิทยคุณ รหัสประจำตัว 5932310023

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จากสารสกัดที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

ชื่อนิสิต นางสาว ชาญินี โกมลวิทยคุณ รหัสประจำตัวนิสิต 5932310023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|---|---|
| หัวข้อโครงงาน | การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จากสารสกัดที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ |
| โดย | นางสาว ชาญินี โกมลวิทยคุณ เลขประจำตัวนิสิต 5932310023 |
| อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน | รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี |
| ปีการศึกษา | 2562 |

---

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกล)

**โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์**

**ชื่อโครงการ**

การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ

Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จากสารสกัดที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

**อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ**

รองศาสตราจารย์.ดร.ชุลี ยมภักดี

**นิสิตในโครงการ**

นางสาว ชาญินี โกมลวิทยคุณ

รหัสประจำตัวนิสิต 5932310023

**โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต**

**ประจำปีการศึกษา 2562**

**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**ชื่อโครงการ** การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จากสารแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

**ชื่อนิสิต** นางสาว ชาญินี โกมลวิทยคุณ รหัสประจำตัวนิสิต 5932310023

**อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ** รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี

**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562**

---

## บทคัดย่อ

ปัญหาเชื้อดื้อยา นับเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญของสาธารณะสุขโลก จากข้อมูลของ CDC พบว่าปัจจุบันมีเชื้อดื้อยาหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Carbapenem-resistant *Acinetobacter* , Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* , Erythromycin-resistant group A , *Mycoplasma genitalium* เป็นต้น โดยปัญหาเชื้อดื้อยาดังกล่าวเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย หนึ่งในสาเหตุหลักที่สำคัญคือ การใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสม เชื้อ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ) เป็นหนึ่งในเชื้อดื้อยาที่สำคัญของกลุ่ม *S. aureus* ที่มีรายงานการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ซึ่งสามารถทำให้เกิดอาการได้หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ก่อให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงบริเวณบาดแผล ก่อให้เกิดการอักเสบในอวัยวะภายในหลายชนิด เช่น กล้ามเนื้อหัวใจกระดูก หากในการติดเชื้อที่รุนแรง เช่นในกระแสเลือด อาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้ จึงเป็นเรื่องจำเป็นในการหายาที่มีประสิทธิภาพเพื่อกำจัดเชื้อดื้อยา ในปัจจุบันมีการนำยาปฏิชีวนะที่มีอยู่เดิมมาใช้ร่วมกันเพื่อเสริมการออกฤทธิ์ของยาดังกล่าว สารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติ นับเป็นหนึ่งในทางเลือกที่นำมาแก้ไขปัญหานี้เช่นเดียวกัน จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้ เพื่อ ค้นหาสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA ในงานวิจัยนี้ได้นำสารออกฤทธิ์ธรรมชาติจำนวน 19 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ MRSA จำนวน 4 สายพันธุ์และเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ โดยวิธี Resazurin Microtiter plate Assay ( REMA ) พบสารที่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยาดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 7 สารจากจำนวนทั้งหมด 19 สาร ต่อจากนี้จะได้นำสารทดสอบที่ให้ผลบวกทั้ง 7 สาร มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (MIC) และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบดื้อยา MRSA (MBC) เพื่อนำผล MIC ของสารที่ให้ผลบวกไปทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะ clindamycin เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันต่อไป

**Project title** Screening of natural compounds against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

**Investigator** Miss Chayinee Komonvittayakun 5932310023

**Advisor** Assoc.Prof.Chulee Yompakdee, Ph.D.

**Department of microbiology, faculty of science, Chulalongkorn University, 2019**

---

## Abstract

The problem of drug resistance is considered as one of the major problems of the global public health. According to CDC, there are wide varieties of resistant drugs, for example Carbapenem-resistant Acinetobacter, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, Erythromycin-resistant group A, *Mycoplasma genitalium*, etc. This problem is caused by many factors. One of the main reasons is improper use of antibiotics. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major resistance of *S. aureus* group which are resistance to many types of antibiotics. MRSA can cause a variety of symptoms, including severe infection at wound, inflammation in many internal organs such as the heart muscle, bones. In severe infections of MRSA such as septicemia that may lead to death. Therefore it is necessary to search for a effective drugs against MRSA. Currently, existing antibiotics are used in combination to enhance the action of the drugs. Natural active compound also are considered as one of the alternative to solve this problem. This study aimed to search for bioactive compounds from natural resources that having anti-MRSA activity. In this study 19 pure compounds were tested against 4 strains of MRSA and 1 sensitive strain of *S. aureus* using Resazurin Microtiter plate Assay (REMA). The result showed that 7 compounds inhibited the growth of the drug resistant strains. Next, the minimal inhibitory concentration (MIC) as well as the minimal bactericidal concentration (MBC) of the candidates will be examined. Then, the combination effect between clindamycin and the selected candidates will be evaluated against MRSA.

**กิตติกรรมประกาศ**

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่เสนอแนวคิดริเริ่มงานวิจัยนี้ รวมทั้งได้กรุณาให้ความรู้ แนวคิด และให้ความห่วงใย ทำให้งานวิจัยสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้สารธรรมชาติจำนวน 19 ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณทุนอุดหนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ของภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562 ที่ส่งเสริมให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอบคุณพี่ๆห้องปฏิบัติการ 2017 คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ให้ความช่วยเหลือแนะนำสิ่งต่าง ๆ ที่จะเสริมศักยภาพในการปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนเพื่อนๆทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และ ให้กำลังใจในงานวิจัยให้สำเร็จไปด้วยดี

นางสาว ชาญินี โกมลวิทยคุณ

**สารบัญ**


| | |
|---|---|
| บทคัดย่อ | i |
| Abstract | ii |
| กิตติกรรมประกาศ | iii |
| สารบัญ | iv |
| สารบัญรูป | v |
| สารบัญตาราง | vi |
| บทที่ 1: บทนำ | 1 |
| บทที่ 2: วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย | 19 |
| บทที่ 3: ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง | 26 |
| บทที่ 4: สรุปผลการทดลอง | 33 |
| เอกสารอ้างอิง | 35 |
| ภาคผนวก ก | 39 |
| ภาคผนวก ข | 40 |

**สารบัญรูป**


รูปที่ 1-1 แสดงกลไกของกลุ่มยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ต่อแบคทีเรีย 3

รูปที่ 1-2 แสดงกลไกของยากลุ่ม ยากลุ่ม β-lactams 4

รูปที่ 1-3 แสดงตำแหน่งของการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน 5

รูปที่ 1-4 แสดงเอนไซม์ DNA gyrase 7

รูปที่ 1-5 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย 8

รูปที่ 1-6 แสดงแบคทีเรียที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะและแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ 10

รูปที 1-7 การกลายพันธุ์ทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ 11

รูปที่ 1-8 การส่งต่อยีนดื้อยาปฏิชีวนะ 11

รูปที่ 1-9 กลไกการดื้อยาของ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 14

รูปที่ 1-10 โครงสร้างของสาร Resazurin เกิดปฏิกิริยากับสารในเซลล์สิ่งมีชีวิตและเปลี่ยนเป็นสาร Resorufin 17

รูปที่ 3-1 ตัวอย่างผล การคัดกรองสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา โดยวิธี Resazurin microtiter plate assay 26

รูปที่ 3-2 ตัวอย่างผล MIC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี Resazurin microtiter plate assay 29

**สารบัญตาราง**

ตารางที่ 1-1 ตัวอย่างกลุ่มยาปฏิชีวนะ และกลไกของเชื้อที่ดื้อยา 9

ตารางที่ 2-1 รายชื่อสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 21

ตารางที่ 2-2 รายชื่อสารธรรมชาติที่ใช้ในการทดลอง 22

ตารางที่ 3-1 ตารางแสดงผลของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่นำมาทดสอบ 28

ตารางที่ 3-2 ตารางแสดงผลค่า MIC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA 30

ตารางที่ 3-3 ตารางแสดงผลค่า MBC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA 31

ตารางที่ 3-4 ตารางแสดงผลค่า MIC ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่อแบคทีเรียดื้อยา MRSA 32

# บทที่ 1

# บทนำ

จุลินทรีย์ ( Microorganism ) หมายถึง สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ขยายขนาดเพื่อให้สามารถมองเห็นได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ เป็นต้น สามารถพบจุลินทรีย์ได้ในทุกสภาพแวดล้อม ได้แก่ ในอากาศ ในน้ำ ในดิน จุลินทรีย์บางชนิดจัดเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ประโยชน์ เช่น สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ จุลินทรีย์บางชนิดก่อให้เกิดโรคกับสิ่งมีชีวิตอื่นทั้งในพืชในสัตว์รวมถึงในมนุษย์

ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial drugs) หมายถึงยาที่มีฤทธิ์ทำลาย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพอันได้แก่ไวรัส แบคทีเรีย ริกเกตเซีย เชื้อรา เชื้อปรสิต และโปรโตซัว มีทั้งสารสังเคราะห์และสารที่ได้มาจากธรรมชาติ ยาใดที่ได้มาจากสาร ที่ผลิตโดยจุลชีพ (ได้แก่ เชื้อรา และแบคทีเรีย) มีฤทธิ์ฆ่า หรือ ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพชนิดอื่น มีชื่อเรียกเฉพาะว่า ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) ซึ่งรวมทั้งสารที่เกิดจากการกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic drug) ที่มีลักษณะคล้ายสารจากธรรมชาติด้วย ตัวอย่างเช่น Penicillins, Tetracyclines, Macrolides เป็นต้น ยาปฏิชีวนะ จึงเป็นยาต้านจุลชีพชนิดหนึ่ง ซึ่งมีประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อ แบคทีเรีย ริกเกตเซีย และเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ดังนั้นยาต้านจุลชีพจึงมีความหมายรวมถึงยาปฏิชีวนะด้วย (พนาวรรณ , 2011)

ผลิตภัณฑ์ยาที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ (ภาณุพงศ์ , 2561)

1. ต้องมีความบริสุทธิ์ปราศจากสิ่งแปลกปลอม
2. ต้องมีความสม่ำเสมอของตัวยาหรือปริมาณตัวยาเท่ากัน
3. ต้องมีความคงตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของยา
4. ต้องมีความปลอดภัยไม่เป็นพิษสามารถใช้ป้องกันและรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ
5. ต้องมีความสะดวกใช้ง่าย

ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถแบ่งประเภทได้ดังนี้

1.จำแนกตามฤทธิ์ต่อเชื้อจุลชีพ (antibacterial action) (Pankey GA , 2004)

1.1 ยาที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic) เป็นยาที่สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในระยะ stationary phase โดยสามารฆ่าแบคทีเรียบางส่วนภายใน 18 ถึง 24 ชั่วโมงหลังการทดสอบ ตัวอย่างเช่น ยากลุ่ม Tetracyclines, Chloramphenicol, Erythromycin, Lincomycin, Clindamycin และ Tiamulin เป็นต้น

1.2 ยาที่มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) เป็นยาที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ โดยจะฆ่าภายใน 18 ถึง 24 ชั่วโมงหลังจากการทดสอบ สามารถกำจัดเชื้อได้มากกว่า 99.9 % ตัวอย่างเช่น ยากลุ่ม Cephalosporins, Aminoglycosides, Colistin, Vancomycin, Bacitracin และ Polymyxin B เป็นต้น

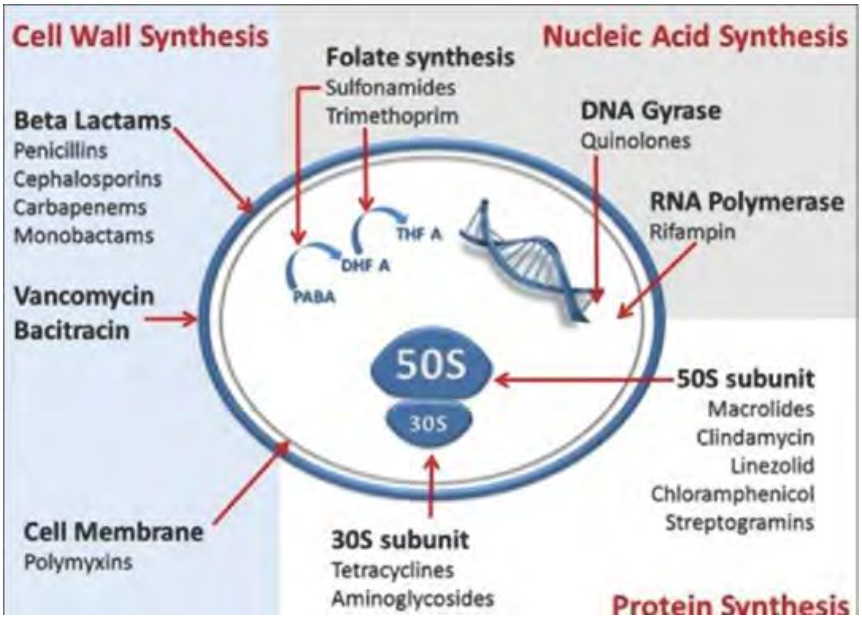
2. จำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์ (spectrum of action) (Michigan State, 2011)

2.1 กลุ่มยาที่มีการออกฤทธิ์กว้าง (Broad spectrum antibacterials) เป็นกลุ่มยาที่สามารถออกฤทธิ์กับแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียได้หลากหลายกลุ่ม ตัวอย่างเช่น Tetracyclines, Phenicols, Fluoroquinolones, กลุ่มยารุ่นที่ 3 และ 4 ของยากลุ่ม Cephalosporins เป็นต้น

2.2 กลุ่มยาที่มีการออกฤทธิ์แคบ (Narrow spectrum antibacterials) เป็นกลุ่มยาที่สามารถออกฤทธิ์ได้จำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์บางกลุ่ม ตัวอย่างเช่น ออกฤทธิ์ต่อ glycopeptides และ bacitracin ซึ่งจะทำให้ยาชนิดนั้นมีผลเฉพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก หรือ ยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต่อ polymyxins ซึ่งส่งผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ตัวอย่างกลุ่มยากลุ่มนี้ ได้แก่ Aminoglycosides , sulfonamides , nitroimidazoles เป็นต้น

3. จำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ (mechanism of action) (Bozdogan B , 2004)

ยาในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ต่อส่วนประกอบต่างในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแสดงตัวอย่างในรูปที่ 1-1




**รูปที่ 1-1 แสดงกลไกของกลุ่มยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ต่อแบคทีเรีย**

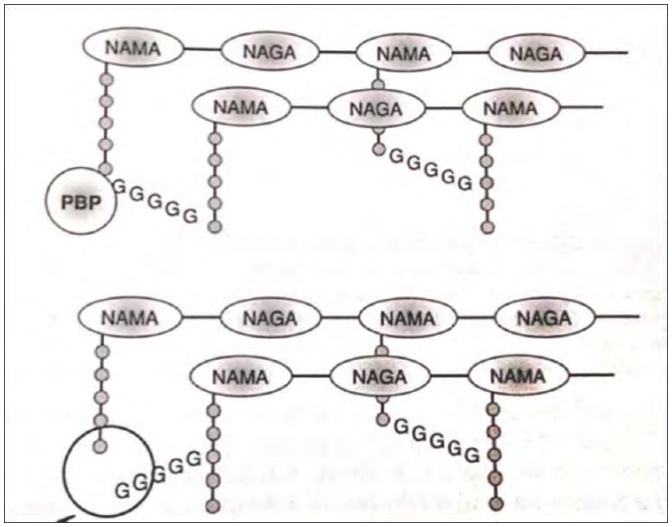
**(ที่มา : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5672523/)**

3.1 ยาที่มีกลไกในการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

เซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนที่ล้อมรอบตัวเซลล์ โดยส่วนที่เรียกว่า ผนังเซลล์ (Cell wall) มีองค์ประกอบคือ Peptidoglycan ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลหลายหน่วยมาเชื่อมกัน ผ่านไกลแคนโดยกระบวนการของเอนไซม์ trans glycosidases อีกทั้งยังมีเปปไทด์ที่เชื่อมน้ำตาลไปยังสายพอลิเมอร์อื่นโดยเชื่อมกับเปปไทด์ ดังนี้ตำแหน่งของ D-alanyl-alanine จะเชื่อมกับตำแหน่ง glycine โดยอาศัยโปรตีน penicillin binding proteins (PBPs) การเชื่อมกันนี้ส่งผลทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น ซึ่งยากลุ่ม β-lactams สามารถขัดขวางกระบวนการการสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้

ยากลุ่ม β-lactams

เป้าหมายของยาในกลุ่มนี้คือ โปรตีน PBPs ซึ่งมีหลักการคือ วงของ β-lactam มีลักษณะคล้ายกับตำแหน่ง D-alanyl D-alanine ในสายเปปไทด์ ปกติถูกเชื่อมโดยโปรตีน PBP β-lactam ถูกนำไปเชื่อมแทนสายเปปไทด์ดังกล่าวทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ peptidoglycan ใหม่ เป็นผลให้เซลล์แบคทีเรียนั้นแตกออกได้จากการที่ไม่มีผนังเซลล์ ซึ่งแสดงกลไกในรูปที่ 1-2

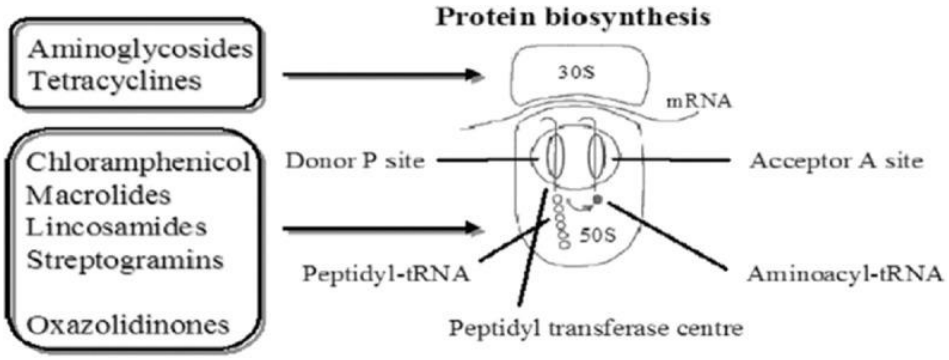



**รูปที่ 1-2 แสดงกลไกของยากลุ่ม ยากลุ่ม β-lactams**

**(ที่มา : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5672523/)**

3.2 กลไกการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

แบคทีเรียใช้ DNA เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สาย messenger RNA (m-RNA) จากนั้นสาย mRNA นี้จะถูกใช้ในกระบวนการถอดรหัส โดยมี Ribosome มาเริ่มกระบวนการการแปลรหัส (translation) ซึ่ง ไรโบโซม 70S ของแบคทีเรียจะประกอบไปด้วย ไรโบนิวคลีโอโปรตีน 2 หน่วยย่อย ได้แก่ 30S และ 50S กลุ่มยาต้านจุลินทรีย์บางกลุ่มมีกลไกในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยมีเป้าหมายคือ หน่วยย่อบของไรโบโซม คือ ไรโบนิวคลีโอโปรตีน หน่วยย่อย 30S หรือ 50S ซึ่งแสดงในรูปที่ 1-3




**รูปที่ 1-3 แสดงตำแหน่งของการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน**

**(ที่มา : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5672523/)**

3.2.1 ยาที่มีกลไกในการยับยั้งที่ตำแหน่งของหน่วยย่อยของ 30S ของไรโบโซม

Aminoglycosides

Aminoglycosides เป็นโมเลกุลที่มีประจุบวกจะจับกับ outer membrane ที่มีประจุลบ เป็นผลทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ยาปฏิชีวนะสามารถเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ เป้าหมายของยาชนิดนี้คือ ไรโบโซม ซึ่งการเข้าไปยังเป้าหมายดังกล่าวนี้จะต้องผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ อาศัยกลไกการขนส่งของแบคทีเรีย ซึ่งกลไกการขนส่งต้องใช้ออกซิเจนรวมไปถึง proton motive force ด้วยเหตุผลนี้ ยาในกลุ่มนี้จึงสามารถใช้ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และยาชนิดนี้จะมีผลต่อ 16S rRNA ของ หน่วยย่อย 30S บริเวณ A site ผ่านพันธะไฮโดรเจน โดยจะทำให้เกิดกระบวนการแปลรหัสผิด และ หยุดกระบวนการแปลรหัสก่อนกำหนดได้

Tetracyclines

ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracyclines ตัวอย่างเช่น tetracycline, chlortetracycline, doxycycline , minocycline เป็นกลุ่มยาที่มีผลต่อลำดับอนุรักษ์ของ 16S r-RNA ของหน่วยย่อย 30S ป้องกันการจับตัวของ t-RNA กับตำแหน่ง A site ทำให้ไม่สามารถเกิดกระบวนการแปลรหัสเกิดขึ้นได้

3.2.1 ยาที่มีกลไกในการยับยั้งที่ตำแหน่งของหน่วยย่อยของ 50S ของไรโบโซม

Chloramphenicol

ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol เป็นยาที่มีผลกับลำดับอนุรักษ์ของ peptidyl transferase cavity ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งใน 23S r-RNA ของหน่วยย่อย 50S ดังนั้น จึงเป็นการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยยับยั้งการจับกันของ t-RNA กับตำแหน่ง A site ของไรโบโซม

Macrolides

เป็นยาปฏิชีวนะที่ส่งผลต่อช่วงแรกในการสังเคราะห์โปรตีน โดยมีเป้าหมายคือตำแหน่งของลำดับที่มีการอนุรักษ์ของเอนไซม์ peptidyl transferase ของ 23S r-RNA ของ หน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม มีผลทำให้สายเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้เกิดการหลุดออกก่อนกระบวนการสังเคราะห์สายเปปไทด์จะเสร็จสมบูรณ์ ทำให้ได้สายเปปไทด์ที่ไม่สมบูรณ์

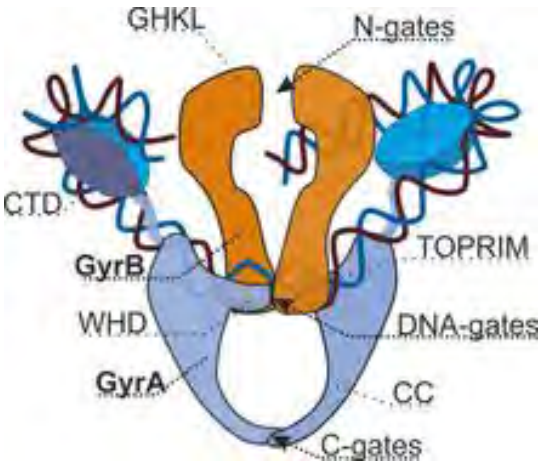
Oxazolidinones

เป็นยาที่มีผลกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน คือ การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยไปจับกับ 23S r-RNA ของหน่วยย่อย 50S และยังมีผลต่อการย้ายตำแหน่งของ peptidyl-t-RNA จาก A site ไปยัง P site ซึ่งเป็นการรบกวนกระบวนการดังกล่าว

3.3 ยาที่มีกลไกในการยับยั้งกระบวนการ DNA replication

Quinolones

เป็นกลุ่มยาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่คลายเกลียวของ DNA และป้องกันการเกิด supercoiling นำไปสู่กระบวนการจำลองตัวของ DNA ต่อไป โดยเอนไซม์ดังกล่าวนี้ ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยคือ A (GyrA) ทำหน้าที่คลายเกลียวซึ่งแสดงในรูปที่ 1-4 และหน่วยย่อย B (GyrB) ซึ่งแสดงในรูปที่ 1-4 ทำหน้าที่ป้องกันการเกิด supercoils ซึ่งยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะไปจับกับหน่วยย่อย A โดยในแบคทีเรียแกรมบวก เป้าหมายหลักของยาดังกล่าวคือ topoisomerase IV ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการแยกสาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาหลังจากเกิดกระบวนการจำลองตัวของ DNA ยาชนิดดังกล่าวนี้มีผลต่อ topoisomerase ในแบคทีเรียในขณะที่มีผลต่อ topoisomerase ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมน้อยมาก




**รูปที่ 1-4 แสดงเอนไซม์ DNA gyrase**

**(ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_gyrase)**

3.4 ยาที่มีกลไกในการยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมของกรดโฟลิก

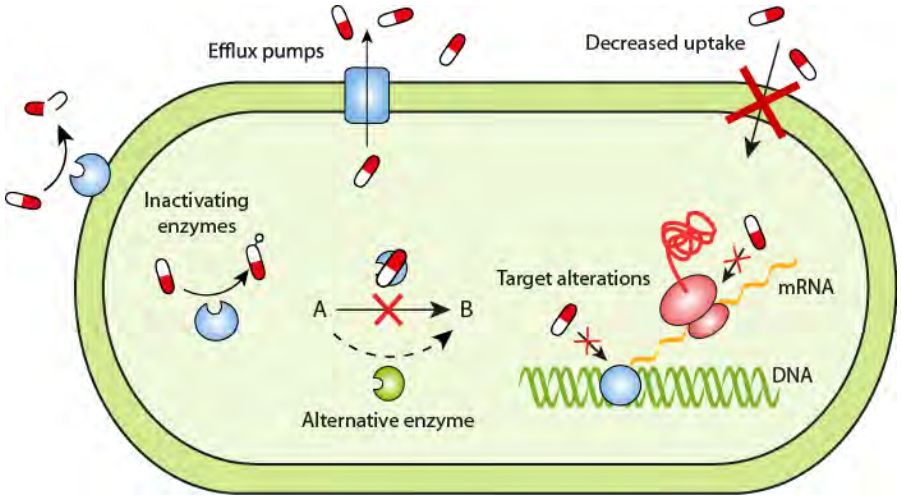
Sulfonamides และ trimethoprim (TMP/SMX)

ยาทั้ง 2 ชนิดนี้มีเป้าหมายในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์กรดโฟลิก การใช้ยาทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันจะเกิดการเสริมฤทธิ์ทำให้ลดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยยา Sulfonamides มีผลต่อเอนไซม์ dihydropteroate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการนำกรดพาราเบนโซอิก (para-aminobenzoic acid) หรือ PABA มารวมกับ dihydropteridine ยา Sulfonamides เป็นยาที่มีโครงสร้างคล้ายกับ PABA จะทำให้เกิดการแย่งจับกันของยากับสารดังกล่าว ซึ่งจะขัดขวางการสังเคราะห์กรดโฟลิก ทำให้ไม่มีกรดโฟลิกไปสร้างนิวคลีโอไทด์ และยา trimethoprim เป็นยาที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ซึ่งอยู่ในกระบวนการดังกล่าวเช่นเดียวกัน

เชื้อดื้อยา นับเป็นหนึ่งในปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญอีกปัญหาหนึ่ง โดยจากข้อมูลของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) พบว่า ในประเทศสหรัฐอเมริกามีจำนวนผู้ติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะมากกว่า 2.8 ล้านคนในแต่ละปี และมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ 35,000 คนต่อปี โดยภาวะเชื้อดื้อยา หมายถึง ภาวะที่เชื้อสามารถพัฒนาให้มีความสามารถในการป้องกันยาปฏิชีวนะ (CDC,2019) ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อดื้อยาได้ โดยการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมี 2 ประเภท ได้แก่

1.การดื้อยาของแบคทีเรียตั้งแต่กำเนิด (Intrinsic resistance) หมายถึง การดื้อยาของแบคทีเรียที่ไม่มีส่วนที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะตั้งแต่แรก ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Escherichia coli* กับยาปฏิชีวนะ Vancomycin พบว่ายาปฏิชีวนะ Vancomycin จะยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้ไม่สามารถใช้กับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ เป็นต้น

2.การดื้อยาของแบคทีเรียในภายหลัง (Acquired resistance) หมายถึง การดื้อยาที่เกิดจากแบคทีเรียไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นในอดีต แล้วเกิดการกลายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นในเวลาต่อมา ตัวอย่างเช่น *E. coli* ส่วนมากไวต่อยา Ceftriaxone ต่อมาพบว่าเชื้อ *E. coli* พัฒนาให้ดื้อต่อยา Ceftriaxone โดยการดื้อยาปฏิชีวนะประเภทนี้เกิดจากกลไกของแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียปรับเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ หรือ แบคทีเรียขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรียสร้างเอนไซม์มากำจัดยาปฏิชีวนะ ดังแสดงในรูปที่ 1-5 เป็นต้น




**รูปที่ 1-5 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย**

**(ที่มา : https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/)**

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่เกิดในภายหลังจำแนกเป็น 3 ชนิด ดังนี้

1.การดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาด (Multidrug-resistance , MDR) หมายถึง การดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ขนานในยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 กลุ่มที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น

2.การดื้อยาปฏิชีวนะแทบทุกขนาด (Extensively drug-resistance , XDR) หมายถึง การดื้อยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 1 ขนานในยาทุกกลุ่มที่ใช้รักษาการติดเชื้อ

3.การดื้อยาปฏิชีวนะทุกขนาด (Pandrug-resistance , PDR) หมายถึง การดื้อยาปฏิชีวนะทุกขนานในยาทุกกลุ่มที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น

**ตารางที่ 1-1 ตัวอย่างกลุ่มยาปฏิชีวนะ และกลไกของเชื้อที่ดื้อยายา**

| Antibiotics | mode of action | Mechanisms of Antibiotic Resistance |
|---|---|---|
| β-lactams | Inhibit cell wall synthesis, Cell division | β-lactamases, altered penicillin binding protein, altered GNB outer-membrane porins, active efflux |
| Glycopeptides | Inhibit cell wall division | Altered target site |
| Aminoglycosides | Inhibit protein synthesis (bind to30s ribosome) | Aminoglycoside-modifying enzyme, decreased membrane permeability, active efflux |
| Macrolides | Inhibit protein synthesis (bind to 50s ribosome) | Altered target, enzymatic inactivation, active efflux |
| Tetracycline | Inhibit protein synthesis (bind to 30s ribosome) | Efflux, altered target, enzymatic inactivation, decreased permeability |
| Chloramphenicol | Inhibit protein synthesis (bind to 50s ribosome) | Chloramphenicol acetyltransferase, active efflux |
| Quinolones | Inhibit DNA synthesis by inhibit DNA gyrase | Altered target, active efflux |

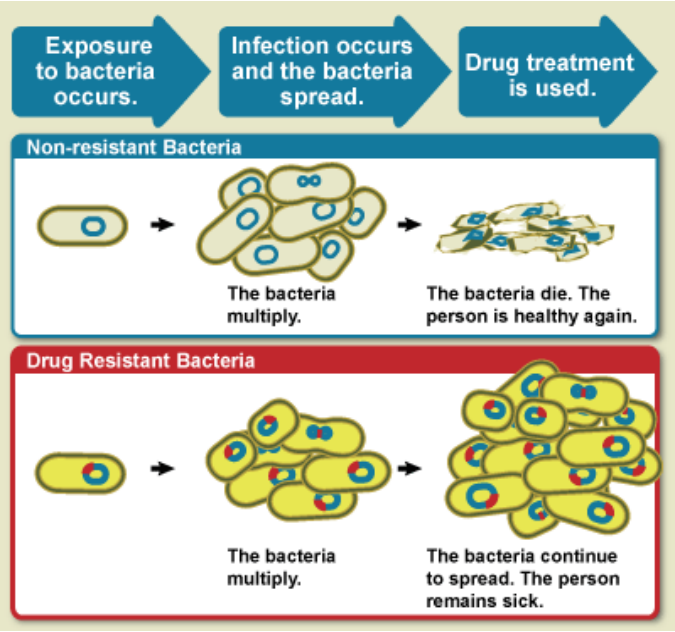
ที่มา : http://medinfo.psu.ac.th/smj2/smj24_5/pdf24_5/07veravan.pdf

สาเหตุการณ์เกิดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ (NIH , 2011)

จุลินทรีย์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการตลอดเวลา เพื่อให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม และทำให้สามารถอยู่รอดได้ โดยหากมีสิ่งที่ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น ยาปฏิชีวนะ จุลินทรีย์จะปรับตัวให้สามารถอยู่รอดได้ซึ่งมีหลายวิธีที่จุลินทรีย์เลือกใช้ โดยสาเหตุที่ทำให้จุลินทรีย์ดื้อยาปฏิชีวนะมีดังนี้

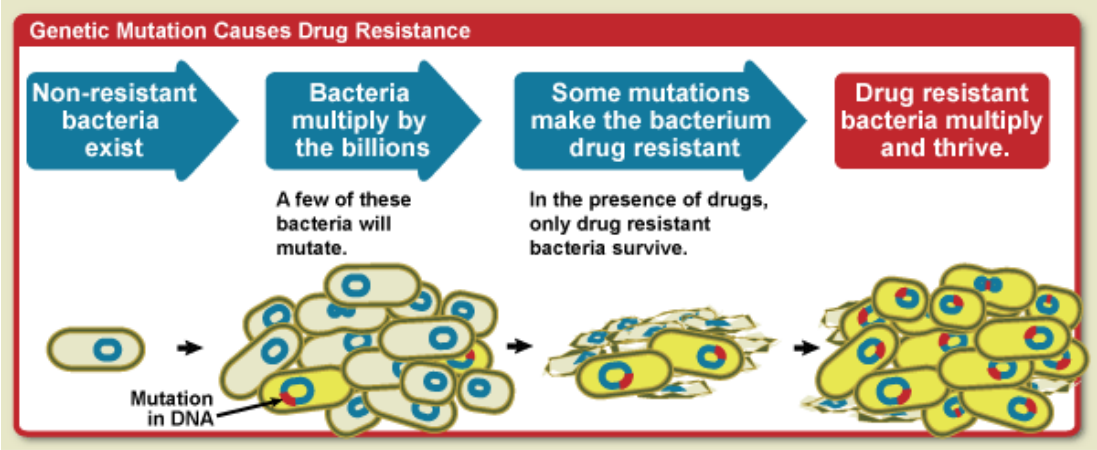
1.สาเหตุจากธรรมชาติ

โดยทั่วไปยาปฏิชีวนะสามารถใช้กำจัดจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์จึงต้องมีการสร้างยีนต้านยาปฏิชีวนะเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ (รูปที่ 1-6) ซึ่งยีนต้านยาปฏิชีวนะนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ (รูปที่ 1-7) และสามารถส่งต่อให้จุลินทรีย์รอบข้าง รวมถึงส่งต่อให้จุลินทรีย์รุ่นต่อไปเพื่อให้จุลินทรีย์เหล่านั้นสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะได้เช่นเดียวกัน โดยจุลินทรีย์ที่มียีนดังกล่าวจะจำลองยีนนั้นเพื่อส่งผ่านยีน (Gene transfer) ดังแสดงในรูปที่ 1-8 ให้จุลินทรีย์รอบข้าง หรือ ในกระบวนการจำลอง DNA ยีนต้านยาปฏิชีวนะนี้จะถูกจำลองด้วยเช่นเดียวกัน และส่งต่อให้จุลินทรีย์รุ่นถัดไป ทำให้จุลินทรีย์ที่ได้รับยีนดังกล่าวนี้สามารถอยู่ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะนั้นได้



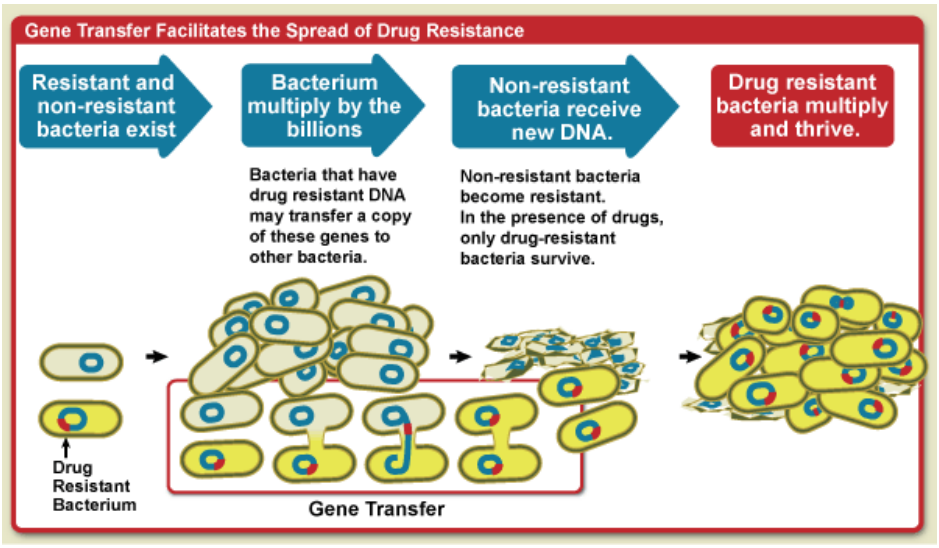

**รูปที่ 1-6 แบคทีเรียที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะและแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ**

**(ที่มา : niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes)**




**รูปที่ 1-7 การกลายพันธุ์ทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ**

**(ที่มา : niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes)**




**รูปที่ 1-8 การส่งต่อยีนต้านยาปฏิชีวนะ**

**(ที่มา : https://www.niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes)**

2.สาเหตุจากสภาวะแวดล้อม

การใช้ยาปฏิชีวนะในทุกครั้งเป็นการส่งเสริมทำให้จุลินทรีย์พัฒนาตัวเองเพื่อให้สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะได้ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดออกฤทธิ์กว้าง ไม่เจาะจงชนิดของจุลินทรีย์ การใช้ยาปฏิชีวนะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส หรือ การใช้ยาปฏิชีวนะในเกษตรกรรมที่อาจตกค้างมาถึงผู้บริโภคล้วนเป็นการกระตุ้นทำให้จุลินทรีย์มีการปรับตัว นำไปสู่การดื้อยาปฏิชีวนะในที่สุด

ตัวอย่างเชื้อก่อโรคที่มีปัญหาการดื้อยา (นฤมล , 2558)

*Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative Anaerobe Bacteria) โคโลนีสีขาวจนถึงสีทอง โดยแบคทีเรียดังกล่าวเป็นปรสิตที่ผิวหนังและเยื่อเมือกของคนและสัตว์ ทำให้พลาสมาเป็นลิ่ม เป็นสาเหตุทำให้เกิดฝี แผลพุพองและเกิดการติดเชื้อหลังผ่าตัด เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Coagulase ซึ่งเป็นเอนไซม์ ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับตัวกระตุ้นในเลือด ทำให้เลือดแข็งตัวโดยการเปลี่ยน Fibrinogen ให้เป็นไฟบริน และไฟบรินจะไปเคลือบตามผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่ถูกทำลายด้วยเม็ดเลือดขาวและยังทำให้เส้นเลือดอุดตัน นอกจากนั้น *S. aureus* ยังสร้าง deoxyribonuclease (DNases) ทำลายและย่อย DNA ได้

*S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษ ที่เชื้อสร้างขึ้นทำให้เกิดอาการ คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการปวดศีรษะ เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะ ๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติ ซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วย

โรคและอาการ ที่เกิดจาก *S. aureus*

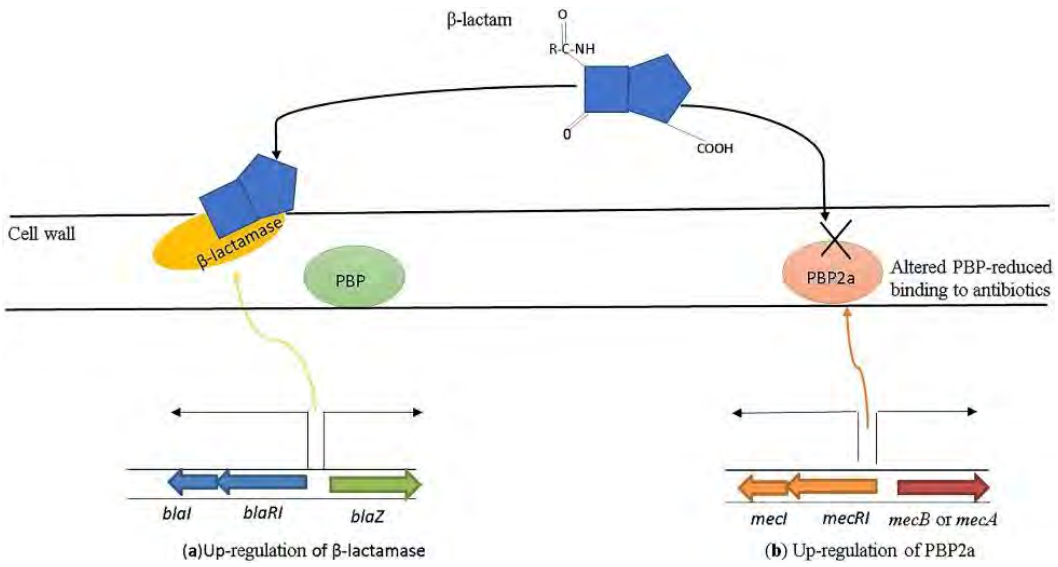
โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก*การ*ได้รับสารพิษของ *S. aureus* สารพิษนี้ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยสามารถผลิตสารพิษได้ 6 ชนิด ได้แก่ type A, B, C, $C_2$, D และ E แต่ละชนิดมีความเป็นพิษแตกต่างกัน อาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักเกิดจาก type A สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารพิษแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร ในอาหารประเภทแป้งและโปรตีนมักจะส่งเสริมให้ *S. aureus* สร้างสารพิษได้มากกว่าอาหารชนิดอื่น

หลังจากที่มียาปฏิชีวนะ Penicillin G ในปี 1941 ทำให้ลดการเสียชีวิตจากการติดเชื้อ Staphylococcal แต่ภายในระยะเวลา 5 ปีได้เริ่มมีรายงานพบเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ Penicillin โดยมีกลไกในการสร้างเอนไซม์ β-lactamase จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะ Vancomycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม Glycopeptide ได้นำมาใช้ปี 1956 และยาปฏิชีวนะ Methicillin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกที่ผ่านการสังเคราะห์จากยาปฏิชีวนะ

Penicillin มาใช้ในปี 1961 เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin แต่ต่อมาพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. aureus* ที่ต้านยาปฏิชีวนะ Methicillin ในประเทศสหราชอาณาจักร ในปี 1961 หลังจากนั้นได้เริ่มมีการแพร่ระบาดในทวีปยุโรปในปี 1970 และระบาดไปยังประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1980 (Chickering ,1991) ในปี 1990 พบอัตราการติดเชื้อ MRSA เพิ่มประมาณ 2 เท่าจากร้อยละ 30 ในปี 1990 เป็นร้อยละ 57 ในปี 2000 ส่งผลให้เริ่มมีการใช้ยาปฏิชีวนะ Vancomycin ในปี 1990 เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อดังกล่าว

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ของ *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยจะเรียกสายพันธุ์นี้ว่า Health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) ปัจจัยเสี่ยงที่สามารถติดเชื้อ MRSA ได้แก่ การผ่าตัด การรักษาตัวโรงพยาบาล หรือการใส่สายสวนเข้าในเส้นเลือด ตั้งแต่ปี ค.ศ.1980 เริ่มมีรายงานการติดเชื้อ MRSA ที่เป็นการติดเชื้อนอกโรงพยาบาล เรียกว่า Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) ซึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าในเด็กมีการติดเชื้อ CA-MRSA มากกว่าในผู้ใหญ่ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ CA-MRSA ส่วนใหญ่ มักพบการติดเชื้อที่ผิวหนัง และ เนื้อเยื่อ เช่น ฝี หรือผิวหนังอักเสบ บางรายมาด้วยการติดเชื้อที่รุนแรง ได้แก่ ปอดอักเสบ หรือ Necrotizing fasciitis นอกจากนี้อาจมาด้วยการติดเชื้อที่กระดูก และการติดเชื้อในกระแสเลือด ในระยะหลังมีการรายงาน CA-MRSA ในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกเพิ่มมากขึ้น มีรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อ CA-MRSA ที่รุนแรงและมีรายงานการเสียชีวิตด้วย

กลไกการดื้อยาเริ่มจากการผลิตเอนไซม์ Penicillinase (β-lactamase) ที่สามารถทำลายโครงสร้างยา Penicillin ในส่วนของวง β-lactam โดยเอนไซม์ดังกล่าวถูกสังเคราะห์จากยีน blaZ (แสดงในรูปที่ 1-9) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในพลาสมิด ต่อมามีการใช้ยาปฏิชีวนะ Methicillin ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ Penicillin พบว่ามีเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ Methicillin เนื่องจากมีการส่งผ่านยีน staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) (Hiramatsu., 2014) โดยมียีน mecA ที่เป็นยีนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ penicillin-binding proteins (PBPs) ที่เรียกว่า PBP2a (แสดงในรูปที่ 1-9) โดยโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่จำเป็นในการสังเคราะห์ peptidoglycan ในช่วงการแบ่งตัวของเซลล์แบคทีเรีย โดยการแสดงออกของยีน mecA ในการสร้าง PBP2a ที่ทำให้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams มีความสามารถในการจับกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์แบคทีเรียได้ลดลงทำให้ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มดังกล่าวในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้




**รูปที่ 1-9 กลไกการดื้อยาของ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

**(ที่มา : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X14002803?via%3Dihub)**

จากปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียดังกล่าว นักวิจัยจึงพยายามหาแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นร่วมกันเพื่อเสริมประสิทธิภาพของยา รวมไปถึงการค้นหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ โดยเฉพาะในกลุ่มของสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติ ได้แก่สมุนไพรต่าง ในอดีต ก่อนที่จะมีการใช้ยาที่เกิดจากวิธีการสังเคราะห์ได้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคชนิดต่าง ๆ มากมาย ซึ่งรวมไปถึงโรคติดเชื้อเช่นเดียวกัน รวมไปถึงโครงสร้างของสารทางธรรมชาติมีความหลากหลายสูง ส่งผลให้มีโอกาสการหาสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคได้มากกว่าแบคทีเรียน้อยกว่าการใช้ยาที่เกิดจากการสังเคราะห์ จึงได้มีการศึกษาสารกลุ่มนี้เพื่อมาใช้รวมกัน รวมไปถึงการนำมาปรับใช้กับยาปฏิชีวนะที่มีอยู่เดิมเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยา โดยมีผลของการเกิดปฏิกิริยาของสาร มาใช้เพื่อบอกชนิดของผลที่เกิดขึ้นของสารทั้ง 2 ชนิดนั้น (Manjunath , 2017) ดังนี้

ปฏิกิริยาต่อกันของสารเคมีแบบการออกฤทธิ์เสริมกัน (Synergistic effect) คือ สาร 2 ชนิดเป็นสารที่เมื่อใช้รวมกันแล้ว สามารถให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าการใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียวอย่างมาก เช่น วิตามิน C (ascorbic acid) วิตามิน E ($\alpha$-tocopherol) และ $\beta$-carotene สารทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นสารที่เสริมการต้านสารอนุมูลอิสระของไขมัน (Tripathy , 2017)

ปฏิกิริยาต่อกันของสารเคมีแบบการออกฤทธิ์ต้านกัน (Antagonist effect) เป็นผลของการใช้สาร 2 ชนิดร่วมกัน แล้วให้ผลการใช้ในลักษณะที่ต่ำกว่าหรือไม่ดีเท่าการใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว เช่น ผู้ป่วยที่รับประทานยาวาร์ฟาริน เป็น ยาต้านการแข็งตัวของเลือด จะต้องระมัดระวังการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มี Vitamin K สูง ซึ่ง Vitamin K เป็นตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดและกลไกการออกฤทธิ์ของยาวาร์ฟาริน ส่งผลให้ต้านการทำงานของยาวาร์ฟารินได้ (Tripathy , 2017)

ปฏิกิริยาต่อกันของสารเคมีแบบการออกฤทธิ์ในลักษณะเพิ่มฤทธิ์ (Additive effect) เป็นลักษณะการใช้สาร 2 ชนิดร่วมกันแล้วผลการใช้เท่ากับผลรวมของการใช้สารแต่ละชนิด เช่น การใช้ ยากลุ่ม NSAID เป็นยาแก้ปวด กับยา Phenprocoumon เป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือด ซึ่งยาทั้ง 2 ชนิดนี้มีผลทำให้เลือดออกเพิ่มมาขึ้น จึงไม่ควรใช้ยาทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกัน (Lehmann, 2013)

ซึ่งผลที่นักวิจัยต้องการในการใช้สาร 2 ชนิดเพื่อนำมาใช้เป็นสาร Antimicrobial agent คือผล Synergistic effect เพื่อที่จะสามารถนำผลของการรวมกันของสารดังกล่าวมาเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียได้มากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรียดื้อยา

โดยมีดัชนีการวัดประสิทธิ์ภาพของสาร 2 ชนิดร่วมกัน (Chung , 2011) เป็นค่า Fractional inhibitory concentration (FIC index) ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังนี้ คือ

$$FIC_s = FIC_a + FIC_b$$

ค่า FIC รวม ( $FIC_s$ ) คือค่า fractional inhibitory concentration (FIC) รวมของสารทั้ง 2 ชนิด

$$\text{ค่า FIC ของสาร a} = \frac{\text{minimum inhibitory concentration ( MIC ) ของการใช้สาร } a \text{ ร่วมกับสาร b}}{\text{minimum inhibitory concentration ( MIC ) ของสาร a}}$$

$$\text{ค่า FIC ของสาร b} = \frac{\text{minimum inhibitory concentration ( MIC ) ของการใช้สาร } b \text{ ร่วมกับสาร a}}{\text{minimum inhibitory concentration ( MIC ) ของสาร b}}$$

การทดสอบความไวของเชื้อตอสารต้านจุลชีพ (Susceptibility test) (Humphries,2018)

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ประเทศ สหรัฐอเมริกา ได้กำหนดวิธีการทดสอบความไวของเชื้อตอสารต้านจุลชีพเป็นวิธีมาตรฐานไว้ โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบ อุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่ม เพาะเชื้อ

ตลอดจนการอ่านและแปรผล ดังนั้นห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามแบบแผน จึงจะส่งผลให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ รวมไปถึงสามารถแปรผลได้อย่างถูกต้อง ซึ่งค่า minimal inhibitory concentration ; MIC เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อหน่วยที่ใช้ทั่วไป คือ ไมโครกรัม (µg) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC นี้ สามารถใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพหลายๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลายๆ ชนิดต่อยาชนิดหนึ่ง รวมทั้งประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวของกับยาหรือแปรผลของยาต่อเชื้อ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ควรเจือจางยาหรือสารประกอบให้มีความเข้มข้นของสารลดลงครั้งละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) ค่า minimal lethal concentration ; MLC เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าเชื้อ (หรือมีเชื้อเจริญไม่เกินกำหนด) หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย อาจเจาะจงกวา ค่า minimal bactericidal concentration ; MBC หากเป็นรา สามารถเจาะจงว่า minimal fungicidal concentration ; MFC ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ชนิดฆาทำลาย จะมีคา MIC และ MLC เหมือนหรือใกล้เคียง ( ไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น ; MLC/MIC ≤4) ซึ่งสามารถทดสอบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) โดยมีวิธีหลัก 2 วิธี ดังนี้

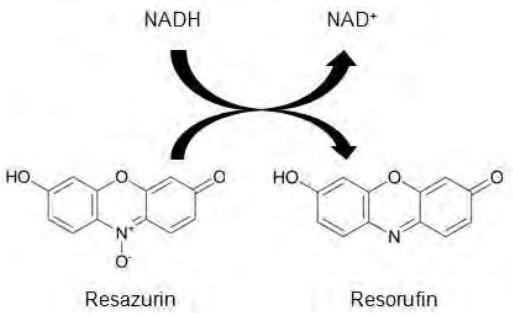
1. Agar diffusion method (Patrick , 2015) เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบเชิงคุณภาพ สามารถบอกถึงความไวของเชื้อทดสอบต่อสารทดสอบได้ แต่ไม่สามารถบอกค่า minimal inhibitory concentration (MIC) หรือค่า minimal lethal concentration (MLC) ที่ชัดเจนได้ วิธีนี้ไม่เหมาะกับการทดสอบกับเชื้อที่เจริญช้า รวมถึงเชื้อที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ โดยหลักการของวิธีนี้คือ ทำให้สารทดสอบที่มีในกระดาษกรอง (Disc diffusion method) หรือ ใส่สารทดสอบลงในหลุมที่เจาะของอาหารแข็ง (well diffusion method) โดยสารทดสอบจะซึมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการกระจายของเชื้อทดสอบในปริมาณที่เหมาะสม หลังจากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสม วิธีการอ่านผลสามารถทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) สังเกตจากวงใส ไม่มีโคโลนีเจริญรอบบริเวณที่ใส่สารทดสอบ โดยผลการทดสอบที่ได้สามารถบอกได้ว่าความเข้มข้นของสารทดสอบนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดบริเวณยับยั้งเท่านั้น

2.Broth dilution method (Horvath,2016) เป็นวิธีทดสอบความไวของเชื้อต่อสารทดสอบ โดยเจือจางสารที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีอนุกรมสองเท่า (2-fold serial dilution) สามารถทดสอบโดยใช้หลอดทดลอง (Broth macrodilution method) หรือ ทดสอบใน 96-well plate (Broth microdilution method) แล้วเติมเชื้อทดสอบปริมาตรคงที่ โดยเทียบความขุ่นมาตรฐานของ McFarland 0.5

(จะมีปริมาณเชื้อประมาณ $10^8$ CFU ต่อ มิลลิลิตร) หรืออาจวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดความขุ่น (Spectrophotometer) จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเชื้อที่เหมาะสม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิเหมาะสม แล้วอ่านค่า MIC ได้จากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้สามารถหาได้ทั้งค่า MIC และค่า MBC

สารละลาย Resazurin (Sittampalam GS , 2004)

สาร Resazurin เป็นสารที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์แล้วเกิดปฏิกิริยาภายในเซลล์ได้ สามารถใช้ติดตามจำนวนเซลล์ได้ คล้ายกับการใช้วิธีสารประกอบ tetrazolium ซึ่งสารละลาย Resazurin มีสีน้ำเงินเข้ม และเมื่อใส่ลงในเซลล์ทดสอบแล้วหากเซลล์นั้นมีชีวิตสารละลายดังกล่าวจะเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู ซึ่งเกิดจากกระบวนการรีดอกภายในเซลล์โดยภายในเซลล์ที่มีชีวิตจะมี NADH ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร Resazurin กลายเป็นสาร resorufin ซึ่งจะปรากฏเป็นสีชมพู โดยกลไกในการเปลี่ยนแสดงในรูปที่ 1-10 ประโยชน์การใช้สารดังกล่าวในการทดสอบเซลล์ที่มีชีวิตคือ ราคาถูก ปฏิกิริยามีความไว




**รูปที่ 1-10 โครงสร้างของสาร Resazurin เกิดปฏิกิริยากับสารในเซลล์สิ่งมีชีวิตและเปลี่ยนเป็นสาร Resorufin**

**(ที่มา : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F7/)**

**วัตถุประสงค์** เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) รวมถึงศึกษาผลของการใช้สารที่ได้ผลบวกร่วมกับยาปฏิชีวนะ Clindamycin ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยานั้น

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. สามารถคัดกรองหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA ได้
2. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ Clindamycin ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยาโดยนำสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Clindamycin
3. สามารถคิด วางแผนการทดลอง รวมไปถึงสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทดลองได้
4. สามารถศึกษาหาแหล่งข้อมูลเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทดลอง รวมไปถึงนำไปแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลองได้
5. สามารถเรียนรู้ พัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการทดลอง รวมไปถึงการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ ได้ถูกต้องและเหมาะสม
6. สามารถนำผลที่ได้จากการทดลองมาเป็นแนวทางในการต่อยอดการศึกษาที่เกี่ยวข้องในอนาคต

# บทที่ 2

# วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

| รายชื่ออุปกรณ์ | บริษัท |
|---|---|
| หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) | Tony , USA |
| ตู้อบฆ่าเชื้อชนิดความร้อนแห้ง (Hot air oven) | Memmert , Germany |
| ตู้อบแห้ง (Dryer) | Memmert , Germany |
| ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) | Lab Service , Thailand |
| ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส | Memmert , Germany |
| ตู้เย็น (Refrigerator) | Sunyo Electric. , Japan |
| เครื่องชั่งหยาบ | Mettler Toledo , Switzerland |
| เครื่องชั่งละเอียด | Mettler Toledo , Switzerland |
| อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (Sonicator bath) | Sonic materials , USA |
| ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10,20,200 และ 1000 ไมโครลิตร | Gilson , France |
| เครื่องปั่นผสม (Votex mixer) | Scientific Industries , USA |
| อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป | Pyrex , USA |

2.1.2 วัสดุ

| รายชื่อ | บริษัท |
|---|---|
| 96 well plate | Corning , USA |
| หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) | Corning , USA |
| Pipette tip ขนาด ขนาด 10,20,200 และ 1000 ไมโครลิตร | Corning , USA |
| Syringe filter ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร | Whatman , USA |
| กระบอกฉีดยา (Syringe) | Nipro , Japan |

2.1.3 สารเคมี

| รายชื่อ | บริษัท |
|---|---|
| Dimethyl sulfoxide (DMSO) | Merck , Germany |
| Resazurin | Sigma , USA |
| Vancomycin | CheiJedang Corporation , Korea |
| Clindamycin | Millimed , Thailand |
| Sodium chloride | Merck , Germany |
| Barium chloride | Merck , Germany |
| Sulfuric acid | Merck , Germany |
| Ethyl alcohol | Merck , Germany |
| Agar | Becton , France |

2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Muller Hinton Agar (MHA) Oxoid , UK

Muller Hinton Broth (MHB) Oxoid , UK

2.1.5 สายพันธุ์แบคทีเรีย

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* 2 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC 29213 เป็นชนิดที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ และ Methicillin resistance *S. aureus* (MRSA) เป็น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันโทหญิง สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

**ตารางที่ 2-1 รายชื่อสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง**

| **เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ** | **Strain** |
|---|---|
| Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] | PMK 50046-11-08 |
| Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] | PMK 50235-05-17 |
| Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] | PMK 10018-05-17 |
| Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] | ATCC 43300 |
| *Staphylococcus aureus* | ATCC 29213 |

2.1.6 สารธรรมชาติที่ใช้ทดสอบ

สารบริสุทธิ์จากธรรมชาติที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 19 ชนิด ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 2-2 รายชื่อสารธรรมชาติที่ใช้ในการทดลอง**

| ลำดับที่ | สารทดสอบ |
|---|---|
| 1 | Gallic acid |
| 2 | Baicalein |
| 3 | PP2001 ( Piperine ) |
| 4 | PP2002 ( Sesamin ) |
| 5 | PP2003 ( Lawsone ) |
| 6 | PP2004 ( Alpinetin ) |
| 7 | PP2005 ( Cardamomin ) |
| 8 | PP2006 ( Pinocembrin ) |
| 9 | PP2007 ( Pinostrobin ) |
| 10 | PP2008 ( Quercetin ) |
| 11 | PP2009 ( Aegeline ) |
| 12 | PP2010 ( Anisolactone ) |
| 13 | PP2011<br>( 2",3"- Epoxyanisolactone ) |
| 14 | PP2012 ( Lansioside C ) |
| 15 | PP2013 ( Lansionic acid ) |
| 16 | PP2014<br>( Capsugenin-25,20-O-β-diglucoside ) |
| 17 | PP2015 ( Andrographolide ) |
| 18 | PP2016 ( Alterporriol A ) |
| 19 | PP2017 ( Violacein ) |

2.2 ขั้นตอนการทดลอง

2.2.1 การเตรียมการทดสอบหาสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA

2.2.1.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้อทดสอบมาเลี้ยงในอาหาร Muller Hinton broth (MHB) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับความขุ่นมาตรฐานให้ได้ 0.5 McFarland (มีแบคทีเรียประมาณ $1x10^8$ CFU ต่อ มิลลิลิตร) (Cockerill, 2012) ด้วยสารละลาย Normal saline และนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย เท่ากับ $2.5x10^5$ CFU ต่อ มิลลิลิตร

2.2.1.2 การเตรียมสารธรรมชาติ

ละลายสารบริสุทธิ์จากธรรมชาติที่ใช้ในการทดสอบด้วย 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส หลีกเลี่ยงแสง

2.2.1.3 การเตรียม Resazurin

ละลายสี Resazurin (Sigma,USA) 1 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.1 กรัม ต่อ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส หลีกเลี่ยงแสง และควรใช้ให้หมดภายใน 7 วัน

2.2.2 การคัดกรองหาสารธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี Resazurin Microtiter plate Assay (REMA)

การคัดกรองหาสารธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี REMA ได้ดำเนินการทดลองตาม Todsapon, 2009

2.2.2.1 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารธรรมชาติ

เจือจางสารธรรมชาติที่ใช้ในการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB เพื่อให้ได้รับความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ที่ 1.5 % และความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบที่ 150 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบอนุกรมสองเท่า (2-fold dilution) ด้วยอาหารชนิดเดียวกันลงใน 96 well plate จากนั้นใส่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1.1 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Resazurin ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1.3 ความเข้มข้น 0.1 กรัม ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มให้หลุมควบคุมบวกเปลี่ยนเป็นสีชมพู โดยอ่านค่าความเข้มข้น ที่ต่ำที่สุดของหลุมที่ใส่สารทดสอบ Resazurin ไม่เปลี่ยนสีกล่าวคือยังคงเป็นสีน้ำเงิน เป็นค่า (MIC)

2.2.2.2 การหาค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารธรรมชาติ

ทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 2.2.2.1 แต่หลังจากที่ได้ค่า MIC ของสารแล้ว ปิเปตเซลล์แขวนลอยในแต่ละหลุม ที่มีความเข้มข้นของสารทดสอบตั้งแต่หลุมที่อ่านได้ค่า MIC ขึ้นไป ไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยเกลี่ยเซลล์แขวนลอยดังกล่าวปริมาตร 100 ไมโครลิตรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA)

2.2.3 การศึกษาผลการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับยาปฏิชีวนะในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา

2.2.3.1 การเตรียมยาปฏิชีวนะ (antibiotic) Clindamycin

ในการทดลองนี้ใช้ยา Clindamycin เจือจางในน้ำกลั่นให้ได้สารละลายเข้มข้น (Stock solution) ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร

2.2.3.2 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของยาปฏิชีวนะ Clindamycin

เจือจางยาปฏิชีวนะ Clindamycin จากสารละลายเข้มข้นที่เตรียมไว้ด้วยอาหารเหลว MHB ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น จากนั้นทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2.1

2.2.3.3 การศึกษาผลการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับยาปฏิชีวนะ Clindamycin ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA ด้วยวิธี Checkerboard dilution

ในการศึกษาผลการออกฤทธิ์เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสารธรรมชาติในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA จะดำเนินการโดยใช้วิธีที่ระบุใน Chang, 1995 โดยเจือจางยาปฏิชีวนะ Clindamycin จากสารละลายเข้มข้นที่เตรียมไว้ด้วยอาหารเหลว Muller Hinton broth (MHB) และเจือจางสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อดื้อยาด้วยอาหารเหลว MHB ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น จากนั้นนำยาปฏิชีวนะที่เตรียมไว้เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่าด้วยอาหารเหลวลงใน 96 well plate ในแต่ละแถว (ตามแนวแกน X) และสารธรรมชาติที่เจือจางแล้วนำมาทำในลักษณะเดียวกันแต่ทำลงใน 96 well plate ตามแนวคอลัมน์ (ตามแนวแกน Y) จากนั้นใส่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Resazurin ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1.3 ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม รอจนกว่าสีของหลุมชุดควบคุมบวกเปลี่ยนเป็นสีชมพู จากนั้นอ่านค่า MIC ที่ได้เมื่อใช้สาร 2 ชนิดร่วมกัน แล้วนำค่า MIC ของสารธรรมชาติ ยาปฏิชีวนะ และการใช้สารธรรมชาติร่วมกับยาปฏิชีวนะ ไปคำนวณค่า Fractional inhibitory concentration (FIC) และ Fractional inhibitory concentration index (FICI) ตามลำดับ

ในแต่ละชุดการทดสอบประกอบด้วยชุดควบคุมดังนี้

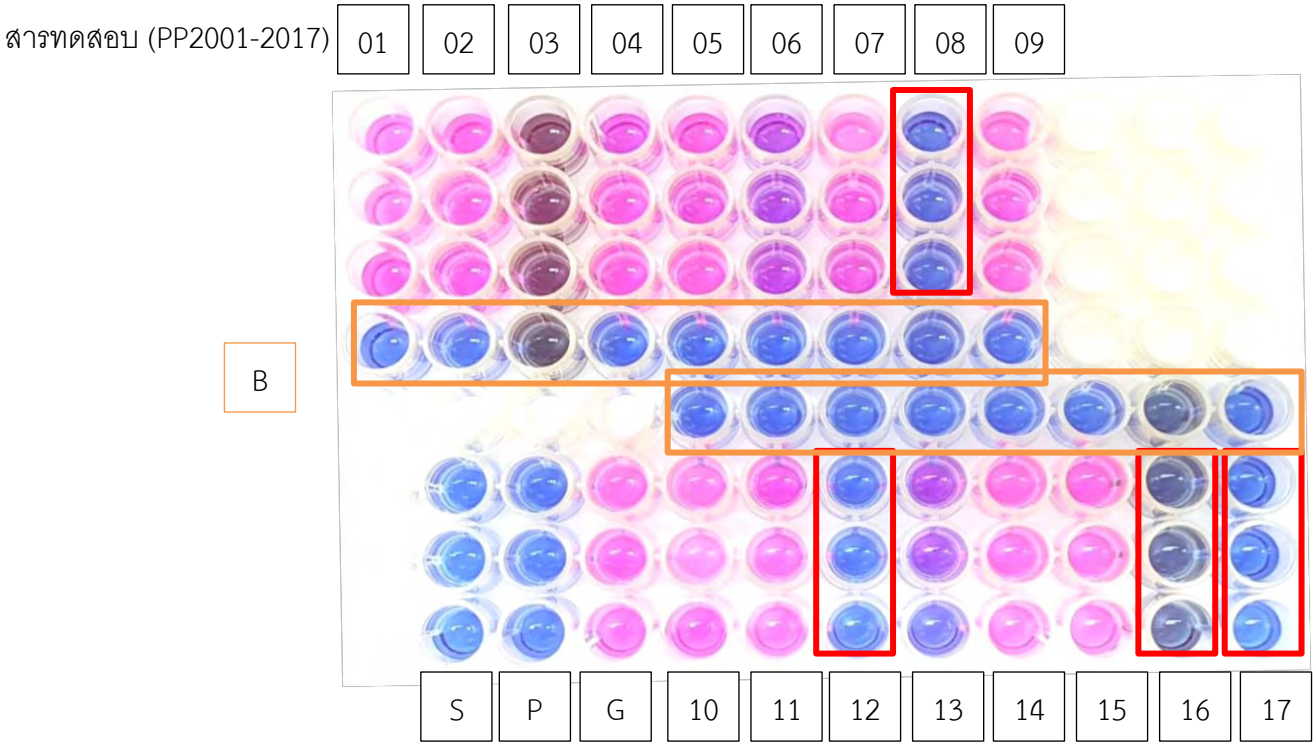
Sterile control หมายถึง ชุดควบคุมสภาพไร้เชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น
Growth control หมายถึง ชุดควบคุมการเจริญของเชื้อทดสอบ ประกอบด้วย เชื้อทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ
color control หมายถึง ชุดควบคุมสีของสารทดสอบ ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ
Blank หมายถึง ชุดควบคุมสีประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

# บทที่ 3

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1การคัดกรองหาสารธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี Resazurin Microtiter plater Assay

เพื่อที่จะทำการทดสอบหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบกับสารบริสุทธิ์จากแหล่งธรรมชาติทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ที่ได้รับมาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามวิธีที่อ้างอิงจากงานวิจัยของ Todsapon, 2009 โดยใช้เชื้อทดสอบเป็น *S .aureus* สายพันธุ์ *American Type Culture Collection* ( ATCC ) และ แบคทีเรียดื้อยา คือ MRSA สายพันธุ์ ATCC และ สายพันธุ์ PMK




**รูปที่ 3-1 ตัวอย่างผลการคัดกรองสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี Resazurin Microtiter plate Assay (REMA)**

S : Sterile control หมายถึง ชุดควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น

G : Growth control หมายถึง ชุดควบคุมการเจริญ ประกอบด้วย เชื้อทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

P : Positive control หมายถึง ชุดควบคุมเชิงบวก ประกอบไปด้วย เชื้อทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา Vancomycin ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

B : Blank หมายถึง ชุดควบคุมสีประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

เลี้ยงเซลล์แขวนลอยความเข้มข้น $2.5x10^5$ CFU ต่อ มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MHB ที่มีสารทดสอบ เชื้อทดสอบถูกบ่มกับสารทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 150 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 0.1 กรัม ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตยังคงมีกระบวนการรีดอกภายในเซลล์มี NADH ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร Resazurin (สีน้ำเงิน) กลายเป็นสาร Resorufin (สีชมพู) และเมื่อใส่ลงในเซลล์ทดสอบแล้วหากสารทดสอบไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา สารละลายดังกล่าวจะเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู

จากรูปที่ 3-1 แสดงผลการทดลอง 3 ซ้ำ จากผลการทดลองพบว่าหลังเติม Resazurin มีสารทดสอบหมายเลข PP2001 PP2002 PP2003 PP2004 PP2005 PP2006 PP2007 PP2009 PP2010 PP2011 PP2013 PP2014 PP2015 ที่เปลี่ยนสี Resazurin เป็นสีชมพูซึ่งสามารถแปลผลได้ว่าสารทดสอบดังกล่าวไม่สามารถต้านการเจริญแบคทีเรียดื้อยา MRSA ทดสอบได้ จากภาพคือการคัดกรองสารทดสอบกับเชื้อทดสอบ MRSA PMK 50046-11-08 ในขณะที่สารทดลอง PP2008 PP2012 PP2016 PP2017 ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของ Resazurin กล่าวคือยังคงเป็นสีน้ำเงินซึ่งสามารถแปลผลได้ว่าสารดังกล่าวสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยาทดสอบได้ โดยมีผลของสารซึ่งให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาดังแสดงในตารางที่ 3-1

**ตารางที่ 3-1 ตารางแสดงผลของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่นำมาทดสอบ**

| เชื้อทดสอบ | สารทดสอบที่ให้ผลบวก |
|---|---|
| *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 | Gallic acid , Baicalein , PP2006 , PP2012 , PP2016 , PP2017 |
| MRSA ATCC 43300 | Gallic acid , Baicalein , PP2012 , PP2017 |
| MRSA PMK 10018-05-17 | Gallic acid , Baicalein , PP2012 , PP2016 , PP2017 |
| MRSA PMK 50046-11-08 | Gallic acid , Baicalein , PP2008 , PP2012 , PP2016 , PP2017 |
| MRSA PMK 50235-05-17 | Gallic acid , Baicalein , PP2006 , PP2008 , PP2012 , PP2016 , PP2017 |

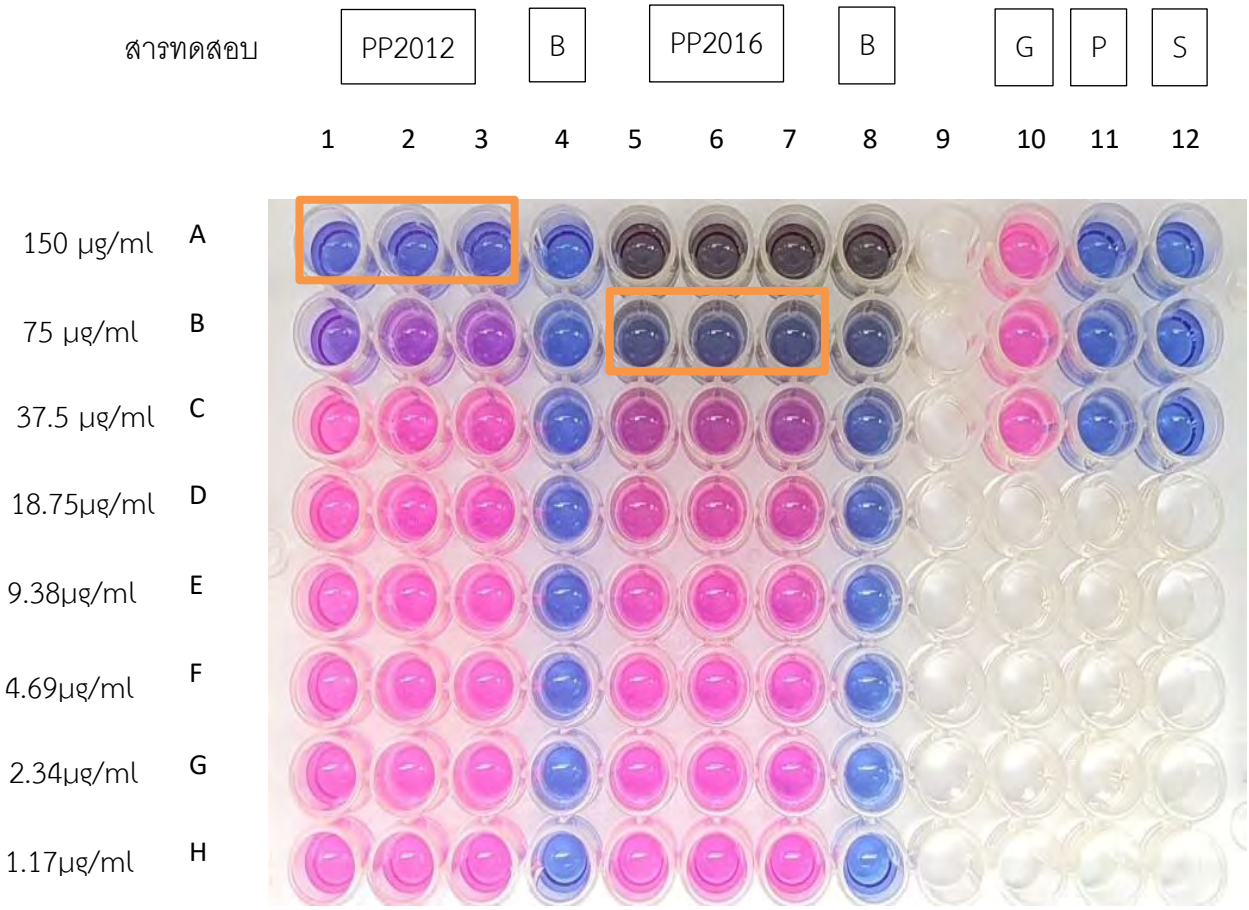
จากผลการคัดกรองหาสารจากแหล่งธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี Resazurin Microtiter plate Assay ได้รับสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA ดังตารางที่ 3-1 ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกนำมาทดสอบหาค่า MIC ต่อไป

3.2 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA

เพื่อที่จะหาค่า MIC ของสารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA ในการทดลองนี้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อทดสอบแขวนลอยความเข้มข้นสุดท้าย $2.5x10^5$ CFU ต่อ มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MHB ที่มีการผันแปรความเข้มข้นของสารทดสอบซึ่งเจือจางแบบอนุกรมสองเท่า (150 – 1 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Resazurin และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากรูปที่ 3-2 แสดงผลการทดลอง 3 ซ้ำ ของการหาค่า MIC ของสาร PP2012 และ PP2016 ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA PMK 50235-05-17 จากผลการทดลองพบว่าหลังเติม Resazurin สารทดสอบ PP2012 เซลล์แขวนลอยที่ได้รับการทดสอบที่ความเข้มข้นของสารทดสอบมีค่า 150 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ไม่มีการเปลี่ยนสีของ Resazurin และสารทดสอบ PP2016 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของ Resazurin ซึ่งแสดงได้ว่า สาร PP2012 และ PP2016 มีค่า MIC เท่ากับ 150 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร และ 75 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแสดงในรูปที่ 3-2 (แถวที่ A1 ถึง A3

และ B5 ถึง B8 ตามลำดับ) และแสดงค่า MIC ของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาดัง แสดงในตารางที่ 3-2




**รูปที่ 3-2 ตัวอย่างผล MIC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี Resazurin Microtiter plate Assay**

S : sterile control หมายถึง ชุดควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น

G : Growth control หมายถึง ชุดควบคุมการเจริญ ประกอบด้วย เชื้อทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

P : Positive control หมายถึง ชุดควบคุมเชิงบวก ประกอบไปด้วย เชื้อทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาVancomycin ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

B : Blank หมายถึง ชุดควบคุมสี ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

**ตารางที่ 3-2 ตารางแสดงผลค่า MIC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA**

| *Staphylococcus aureus* | Minimum inhibitory concentration ( MIC ) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PP2006 (Pinocembrin) | PP2008 (Quercetin) | PP2012 (Lansioside C) | PP2016 (Alterporriol A) | PP2017 (Violacein) | Gallic acid | Baicalein |
| ATCC 29213 | 586 µM | - | 128 µM | 243 µM | 109 µM | 500 µM | 250 µM |
| MRSA 43300 | - | - | 128 µM | - | 109 µM | 500 µM | 250 µM |
| MRSA PMK 10018-05-17 | - | - | 128 µM | 243 µM | * | 500 µM | 250 µM |
| MRSA PMK 50235-05-17 | 293 µM | 497 µM | 255 µM | 121 µM | * | 500 µM | 250 µM |
| MRSA PMK 50046-11-08 | - | 497 µM | 64 µM | 243 µM | * | 500 µM | 250 µM |

* แสดงถึง ยังไม่ได้ทำการทดลอง

\- แสดงถึง สารดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อทดสอบชนิดนั้น

3.3 การหาค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารที่ให้ผลบวก

เพื่อที่จะหาค่า MBC ของสารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA ในการทดลองนี้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อทดสอบแขวนลอยความเข้มข้นสุดท้าย $2.5x10^5$ CFU ต่อ มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MHB ที่มีการผันแปรความเข้มข้นของสารทดสอบซึ่งเจือจางแบบอนุกรมสองเท่า (150 – 1 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร) จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายในช่วงตั้งแต่ค่า MIC ขึ้นไปมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูว่าความเข้มข้นดังกล่าวว่าสามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้หรือไม่

จากการทดสอบหาค่า MBC ของสารทดสอบที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดื้อยา MRSA ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา (ค่า MBC) บนอาหารแข็ง MHA ค่า MBC ของสารทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรียแสดงในตารางที่ 3-3

**ตารางที่ 3-3 ตารางแสดงผลค่า MBC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA**

| *Staphylococcus aureus* | Minimum bactericidal concentration ( MBC ) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PP2006 (Pinocembrin) | PP2008 (Quercetin) | PP2012 (Lansioside C) | PP2016 (Alterporriol A) | PP2017 (Violacein) | Gallic acid | Baicalein |
| ATCC 29213 | 586 µM | - | 128 µM | 243 µM | * | 500 µM | 250 µM |
| MRSA 43300 | - | - | 128 µM | - | * | 500 µM | 250 µM |
| MRSA PMK 10018-05-17 | - | - | 255 µM | 243 µM | * | 500 µM | 250 µM |
| MRSA PMK 50235-05-17 | 293 µM | 497 µM | 255 µM | 121 µM | * | 500 µM | 250 µM |
| MRSA PMK 50046-11-08 | - | 497 µM | 64 µM | 243 µM | * | 500 µM | 250 µM |

* แสดงถึง ยังไม่ได้ทำการทดลอง

- แสดงถึง สารดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อทดสอบชนิดนั้น

3.4 การศึกษาผลการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารที่ให้ผลบวกร่วมกับยาปฏิชีวนะในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA

Clindamycin นับเป็นยาที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ซึ่งมี mode of action คือ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน หากนำสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยามาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะอาจเป็นการเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียดื้อยาได้ดีขึ้น

3.4.1 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของยาปฏิชีวนะ Clindamycin

เพื่อที่จะหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ โดยในการทดลองนี้ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2 โดยใช้ยา Clindamycin ในการทดสอบ และให้ความเข้มข้นของยาที่ความเข้มข้นสุดท้ายแสดงในตารางที่ 3-4

**ตารางที่ 3-4 ตารางแสดงผลค่า MIC ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่อแบคทีเรียดื้อยา MRSA**

| *Staphylococcus aureus* | MIC |
|---|---|
| | Clindamycin |
| ATCC 29213 | <0.5 µg/ml |
| MRSA 43300 | >62.5µg / ml |
| MRSA PMK 10018-05-17 | >62.5 µg / ml |
| MRSA PMK 50235-05-17 | >62.5 µg / ml |
| MRSA PMK 50046-11-08 | >62.5 µg / ml |

แผนงานที่จะทำต่อไปในอนาคต คือ หาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Clindamycin และ Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) ซึ่งมีการรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA และในปัจจุบันถูกใช้เพื่อเป็นยาที่รักษาโรคติดเชื้อดังกล่าว (Liu,2011) จากนั้นจะทดสอบการใช้สารที่ให้ผลบวกที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา MRSA ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Checkerboard dilution เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถใช้สารทั้ง 2 ชนิดต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา และจะนำมาประเมินประสิทธิภาพของการใช้สาร 2 ชนิดร่วมกันด้วยค่า fractional inhibitory concentration (FIC) เป็นค่าดัชนีการวัดประสิทธิ์ภาพของการใช้สารร่วมกัน 2 ชนิด คาดว่าการใช้สารทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันจะสามารถใช้สารออกฤทธิ์ที่มีความเข้มข้นลดลงและทำให้เสริมประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยาได้ ซึ่งอาจช่วยลดความเป็นพิษของยาที่ใช้ในปัจจุบันได้

# บทที่ 4

## สรุปผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้คัดกรองสารบริสุทธิ์จำนวนทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง โดยใช้ REMA เป็นวิธีการทดสอบแบคทีเรียทดสอบดื้อยา MRSA ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PMK 50046-11-08 PMK 50235-05-17 และ PMK 10018-05-17 เป็นสายพันธุ์ดื้อยาที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า และแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยา 1 สายพันธุ์ พบว่าจากตัวอย่างสารบริสุทธิ์ 19 ตัวอย่าง มีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ Gallic acid , Baicalein , PP2006 (Alpinetin) , PP2008 (Quercetin) , PP2012 (Lansioside C) , PP2016 (Alterporriol A) และ PP2017 (Violacein) ซึ่งพบว่ามีสารทดสอบเพียง 4 ชนิดเท่านั้น ซึ่งได้แก่ Gallic acid , Baicalein, Lansioside C และ Violacein ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทุกสายพันธุ์ โดยสาร Gallic acid (Lee , 2014) เป็นหนึ่งในกรดฟีนอลิกที่สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด Baicalein (Chan , 2011) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่สามารถพบได้ในรากของต้น *Scutellaria baicalensis* และ *S. lateriflora* Violacein (Aruldass , 2018) เป็นสารผลึกสีม่วงที่สามารถคัดแยกได้จากแบคทีเรีย *Chromobacterium violaceum* ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้มีรายงานว่าสามารถต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA ในขณะที่สาร Lansioside C (Yannai , 2004) เป็นสารที่มีโครงสร้างแบบ triterpene glycoside และสาร Alterporriol A (Debbab , 2009) เป็นสารกลุ่ม anthraquinone ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้ยังไม่มีรายงานในการต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา MRSA

เมื่อได้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาแล้ว จึงได้นำสารดังกล่าวมาหาค่า MIC และ MBC ของสารแต่ละชนิด (ดังแสดงในตาราง 3-2 และ ตาราง 3-3) โดยจะนำผลที่ได้ไปประกอบกับผลของยาปฏิชีวนะที่จะศึกษาในขั้นตอนต่อไปเพื่อจะนำไปประเมินผลการใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อดื้อยาร่วมกับยาปฏิชีวนะ Clindamycin ต่อไป

จากการทดลองหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีข้อมูลรายงานว่าใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA พบค่า MIC (ดังแสดงในตาราง 3-4) ซึ่งจะนำยาดังกล่าวไปใช้ทดสอบร่วมกับสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยาดังกล่าวต่อไปในอนาคตหลังจากที่ได้ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะที่คงที่แล้ว

ซึ่งแผนงานที่จะดำเนินงาน จะเป็นการหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพิ่มเติม คือ ยา Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) เนื่องจาก เป็นยาที่มีใช้ในการรักษาการติดเชื้อดื้อยา MRSA และเมื่อได้แล้วจะนำยาปฏิชีวนะมาใช้ร่วมกับสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ด้วยวิธี Checker board เพื่อที่จะประเมิณว่าสารดังกล่าวนี้มีฤทธิ์ Additive effect หรือ Synergistic effect หรือ Difference หรือ Antagonistic effect กับยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อดื้อยาดังกล่าวต่อไป โดยคาดว่าการใช้สารทั้ง 2 ชนิดนี้รวมกันจะสามารถใช้สารที่มีความเข้มข้นต่ำและทำให้เสริมประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยาได้

## เอกสารอ้างอิง


ทศพล คิดชอบ. 2552. การพัฒนาวิธีการคัดกรองที่ให้ผลสัมฤทธิ์สูงเพื่อหาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากสมุนไพรไทย. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นฤมล ตปนียะกุล, วาสนา คงสุข. (2558). *Staphylococcus aureus.* สืบค้นเมื่อ 21 เมษายน 2563 [ออนไลน์] http://rldc.anamai.moph.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=55:staphylococcus-aureus&catid=24&Itemid=587.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร , พิทัย กาญบุตร และ สาธร พรตระกูลพิพัฒน์ (2551). การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ การประชุมวิชาการสัตวแพทย์ศาสตร์ มข. ครั้งที่ 9 “สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้” ณ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 11-12 มิถุนายน 2551 หน้า 91-99 http://vet.kku.ac.th/semi9_2551/011-%BB%C3%D0%CA%D2%B7%BE%C3-%CB%B9%E9%D2%2091-101%20new.pdf

พนาวรรณ คุณติสุข. การใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic drugs) อย่างถูกต้องและเหมาะสม : Journal of Hematology and transfusion Medicine. 2011;21: 193-194.

ภาณุพงศ์ พุทธรักษ์. (2560). อันตรกริยาของสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกับยาแผนปัจจุบัน. สืบค้นเมื่อ 21 เมษายน 2563, [ออนไลน์] https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:x0Yx2mDSmloJ:https://ccpe.pharmacycouncil.org/showfile.php%3Ffile%3D400%253B+&cd=6&hl=en&ct=clnk&gl=th.

ภาณุพงศ์ มหาพรหม. (2561). *เภสัชวิทยา*. สืบค้นเมื่อ 21 เมษายน 2563, [ออนไลน์] http://www.as.mju.ac.th/E-Book/t_panupong/เภสัชวิทยา.pdf

วีรวรรณ ลุวีระ การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย : สงขลานครินทร์เวชสาร 2549;5: 454-458

อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์. (2561). *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA).* สืบค้นเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2563, [ออนไลน์] https://www.pidst.or.th/A189.html.

Aruldass CA, Masalamany SRL, Venil CK, Ahmad WA. *Antibacterial mode of action of violacein from Chromobacterium violaceum UTM5 against Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;25(6):5164-5180.

Borra RC, Lotufo MA, Gagioti SM, Barros Fde M, Andrade PM. *A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays*. *Braz Oral Res*. 2009;23(3):255-262.

Bozdogan B and Appelbaum PC. *Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance*. Int J Antimicrob Agents. February 2004;23(2): 113-9.

Centers for Disease Control and Prevention. *Antibiotic resistance threats in The United States 2019.* Retrieved May 23, 2020, [online] https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf

Chan BC, Ip M, Lau CB, et al. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(1):767-773.

Chickering HT, Park JH. *Staphylococccus pneumonia*. JAMA 1919;72:617-26.

Chung PY, Navaratnam P and Chung LY. *Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against Staphylococcus aureus strains*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 9 June 2011; 10:25.

Cockerill, Franklin R.; et al. (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI. p. 12.

Debbab A, Aly AH, Edrada-Ebel R, et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus Stemphylium globuliferum isolated from Mentha pulegium. *J Nat Prod*. 2009;72(4):626-631.

Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, et al. Multi-drug-resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy. *J Infect Chemother*. 2014;20(10):593-601.

Gy. Horvath T., Bencsik K. Acs, B. Kocsis. Sensitivity of ESBL-Producing gram-negative bacteria to essential oils, plantextracts, and their isolated compounds. Antibiotic resistance mechanisms and new antimicrobial approaches. 1st ; 2016. P.244

Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, et al. CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4)

Kapoor G, Saigal S and Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. Jul-Sep 2017;33(3): 300-305.

Lee DS, Eom SH, Kim YM, et al. Antibacterial and synergic effects of gallic acid-grafted-chitosan with β-lactams against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Can J Microbiol*. 2014;60(10):629-638.

Lehmann K. Drug interactions—principles, examples and clinical consequences. Additional important drug interactions. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(8):133.

Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children [published correction appears in Clin Infect Dis. 2011 Aug 1;53(3):319]. *Clin Infect Dis*. 2011;52(3)

Manjunath P. Pai, Mackenzie L. Cottrell, Angela D.M. Kashuba, Joseph S. and Bertino Jr. (2017). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-infective Agents. Retrieved 3 April 2020, [online] https://oncohemakey.com/pharmacokinetics-and-pharmacodynamics-of-anti-infective-agents.

Patrick R. The Clinician and the Microbiology Laboratory. Basic Principles in the Diagnosis and Management of Infectious Diseases. 8th; 2015. P.208

Michigan State. (2011). *Spectrum of Activity.* Retrieved Apr 21, 2020, [online] https://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/spectrum-of-activity.

Monochamus Sutor. (2018). *DNA gyrase.* Retrieved May 23, 2020, [online] https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_gyrase.

National institute of Allergy and Infectious Diseases.(2011) *Causes of Antimicrobial (Drug) Resistance.* Retrieved May 23, 2020, [online] https://www.niaid.nih.gov/ research/antimicrobial-resistance-causes.

Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clin Infect Dis. 15 March 2004;38(6): 864-70.

React. *Resistance mechanisms.* Retrieved May 25, 2020, [online] https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/

Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, et al. (2004). *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. [online] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196.

Stockley IH. 1996. Drug interactions: Source book of adverse interactions, their mechanism, clinical importance and management. 4th ed. London: The Pharmaceutical Press.

Tripathy S, Dhaduk J. J. and Kapadiya S. (2017). *Interrelationship of Micronutrients: Antagonism and Synergism.* Int. J. Pure App. Biosci. 5 (6): 208-214

Yannai Shmuel. (2004) Dictionary of food compounds with CD-ROM: Additives, flavors, and ingredients.

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

**Muller-Hinton Broth (MHB)**

| | | |
|---|---|---|
| Beef extract | 20 | กรัม |
| Acidicase Peptone | 17.5 | กรัม |
| Starch | 1.5 | กรัม |

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Muller-Hinton Agar (MHA)**

| | | |
|---|---|---|
| Beef extract | 20 | กรัม |
| Acidicase Peptone | 17.5 | กรัม |
| Starch | 1.5 | กรัม |
| Agar | 17.0 | กรัม |

ปรับ pH เป็น 7.4 ± 0.2

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี McFarland Turbidity Standard No.05

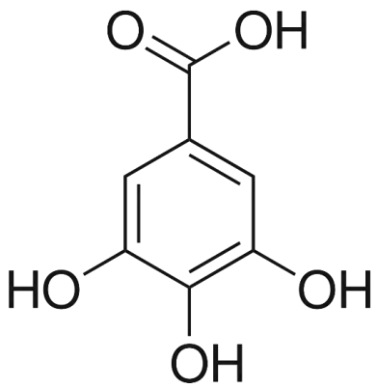
| | | |
|---|---|---|
| 1.0% Barium chloride | 0.05 | มิลลิลิตร |
| 1.0% Sulfuric acid | 9.95 | มิลลิลิตร |

เตรียมสารที่มีความเข้มข้นดังกล่าวในน้ำบริสุทธิ์ผสมให้เข้ากัน ควรเขย่าก่อนใช้ทุกครั้ง

**ภาคผนวก ข**

**รายละเอียดสารธรรมชาติที่น่าสนใจ**

Gallic acid

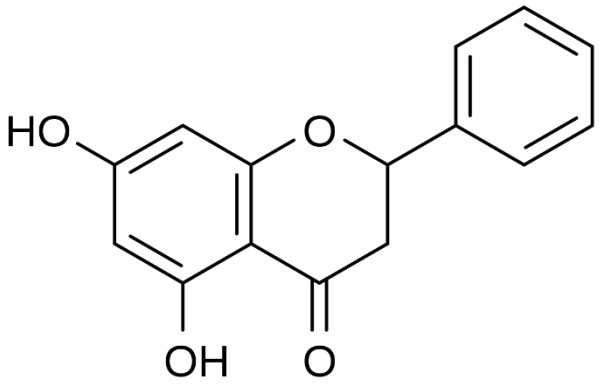



ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid

gallic acid หรือ 3,4,5-trihydroxybenzoic acid เป็นหนึ่งในกรดฟีนอลิกที่สามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Quercus* spp. *Punica* spp. เป็นต้นโดยเป็นสารประกอบผลึกสีขาวหรือมีสีเหลืองเล็กน้อย มีการนำมาใช้ในหลากหลายอุสาหกรรม เช่น อุสาหกรรมยา อุสาหกรรมอาหาร สารดังกล่าวนอกจากสกัดได้จากพืชแล้ว ยังสามารถสังเคราะห์ผ่านกระบวนการทางเคมี โดยการย่อยสลายกรดแทนนิก กรด gallic acid และอนุพันธ์ของกรดชนิดนี้ เช่น lauryl gallate, propyl gallate, octyl gallate, tetradecyl gallate, and hexadecyl gallate มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ตัวอย่างเช่น สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมไปถึงกลิ่นเหม็นหืนของน้ำมัน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงนำมาเป็นสาเติมแต่งในอุสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้สารกลุ่มดังกล่าวยังมีฤทธิ์ในด้าน antioxidant , antimicrobial , anti-inflammatory , anticancer อีกด้วย

ที่มา : Kahkeshani N, Farzaei F, Fotouhi M, Alavi SS, Bahramsoltani R, Naseri R, Momtaz S, Abbasabadi Z, Rahimi R, Farzaei MH, Bishayee A. *Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review*. Iran J Basic Med Sci. 2019 Mar;22(3):225-237.

Pinocembrin

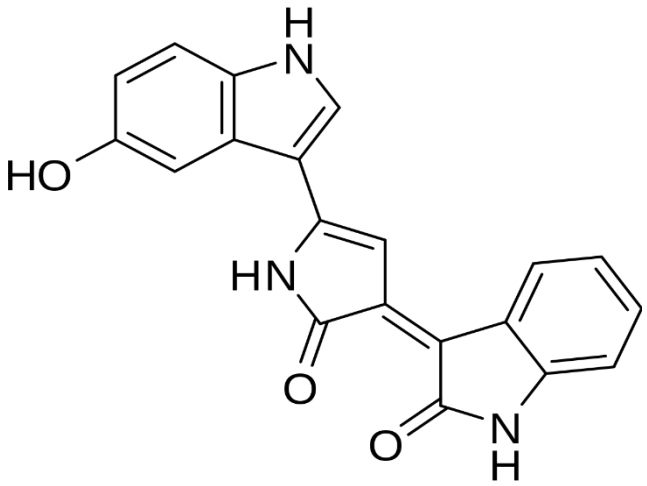



ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Pinocembrin

Pinocembrin ( 5,7-dihydroxyflavanone ) เป็นหนึ่งในสารกลุ่ม flavonoids ที่มาสารถสกัดได้จากพืชหลายชนิดโดยหลักแล้วจะเป็นพืชตระกูลสน ยูคาลิปตัส Populus, Euphorbia, and Sparattosperma leucanthum โดยเป็นสารที่มีฤทธิ์หลากหลายทางเภสัชวิทยา ซึ่งมีการศึกษาฤทธิ์ของสารดังกล่าวมากมาย ประกอบไปด้วย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง นอกจากนี้สารดังกล่าวยังใช้ในภาวะสมองขาดเลือด โดยฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์มีการศึกษาทั้งในยีสต์ รา แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ตัวอย่างเช่น *Escherichia coli , Candida albicans , Bacillus subtilis , Trichophyton mentagrophytes , Streptococcus mutans , Neisseria gonorrhoeae เป็นต้น โดยมีการศึกษาฤทธิ์ของสารดังกล่าวทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต*

ที่มา : Rasul A, Millimouno FM, Ali Eltayb W, Ali M, Li J, Li X. *Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities*. Biomed Res Int. 2013;2013:379850.

Violacein




ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Violacein

Violacein เป็น สารประกอบอนุพันธ์ของ indole มีสีม่วงเข้ม ได้จากการควบแน่นของทริปโตเฟน 2 โมเลกุล ควบคุมการสังเคราะห์ด้วยกลุ่มยีน vioABCDE เป็นสารที่เกิดจากการสังเคราะห์จากแบคทีเรีย เช่น *Pseudoalteromonas luteoviolacea* , *Alteromonas luteoviolacea* , *Chromobacterium Violaceum* , *Janthinobacterium lividum* โดยการผลิตสารดังกล่าวนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสารนี้มีการนำไปศึกษาคุณสมบัติ ได้รับการพิสูจน์ว่ามีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นไวรัส เชื้อรา แบคทีเรีย โปรโตซัว ต้านการเจริญของเนื้องอก ทั้งนี้สารดังกล่าวยังนำไปใช้เป็นสีธรรมชาติเพื่อใช้ในอุสาหกรรม เส้นใย หรือ สิ่งทอ

ที่มา : Kanelli M, Mandic M, Kalakona M, Vasilakos S, Kekos D, Nikodinovic-Runic J, Topakas E. Microbial *Production of Violacein and Process Optimization for Dyeing Polyamide Fabrics With Acquired Antimicrobial Properties*. Front Microbiol. 2018Jul 10;9:1495.