ผลของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกต่อเชื้อ Nontyphoid Salmonella สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในคลินิก

นางสาวชมพูนุช ไทยบุญรอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *TERMINALIA BELERICA* ROXB. ALCOHOLIC EXTRACT ON NONTYPHOID SALMONELLA CLINICAL ISOLATES

Miss Chompoonuch Thaiboonrod

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกต่อเชื้อ Nontyphoid Salmonella สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในคลินิก
โดย	นางสาวชมพูนุช ไทยบุญรอด
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ศิริภรณ์ ฟุ้งวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ เพ็ญพรรณ แน่นหนา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.ม.ร.ว. กัลยา ติงศภัทิย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ศิริภรณ์ ฟุ้งวิทยา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ เพ็ญพรรณ แน่นหนา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รท. สพ.ญ. ดร. เนาวรัตน์ สุธัมนาถพงษ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชมพูนุช ไทยบุญรอด : ผลของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกต่อเชื้อ Nontyphoid Salmonella สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในคลินิก. (EFFECTS OF *TERMINALIA BELERICA* ROXB. ALCOHOLIC EXTRACT ON NONTYPHOID SALMONELLA CLINICAL ISOLATES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ศิริภรณ์ ฟุ้งวิทยา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.เพ็ญพรรณ แน่นหนา, 114 หน้า.

เชื้อกลุ่ม Nontyphoid Salmonella (NTS) มีอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกัน (multidrug resistance, MDR) เพิ่มสูงขึ้น โดยเป็นการดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่มนี้ในปัจจุบัน ซึ่งได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, streptomycin และ tetracycline ทำให้เกิดปัญหาในการเลือกยาต้านจุลชีพมาใช้ในการรักษา การใช้สมุนไพรมาช่วยเสริมฤทธิ์กับยาต้านจุลชีพจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจทางหนึ่ง ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin และร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท เมื่อหาค่า MIC $_{90}$ ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก, ampicillin และ tetracycline พบว่า มีค่าเท่ากับ 40 มก/มล., 256 มคก/มล. และ 128 มคก/มล. ตามลำดับ และพบว่า มีเชื้อ 9 ไอโซเลท (30%) ที่ดื้อต่อทั้ง ampicillin และ tetracycline และอีก 1 ไอโซเลท (3.33%) ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (ซึ่งได้แก่ ampicillin, amoxicillin, norfloxacin และ tetracycline) โดยเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท ตรวจพบ β-lactamase activity (เมื่อทดสอบโดยวิธี nitrocefin-based test) แต่ตรวจไม่พบยีน *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$ และ *bla*$_{CTX-M}$ ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactam อย่างไรก็ตาม ได้ตรวจพบยีน *integrase* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยาเฉพาะในเชื้อ Salmonella 14 เท่านั้น จากการประเมินฤทธิ์ร่วมของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกกับ ampicillin และ tetracycline (โดยวิธี checkerboard) พบว่า การใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ใน 30 ไอโซเลท ให้ผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) 22 ไอโซเลท (73.33%) และไม่มีผลต่อกัน (indifference) 8 ไอโซเลท (26.67%) ส่วนสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline เมื่อทดสอบกับเชื้อ NTS จำนวน 13 ไอโซเลท ซึ่งดื้อต่อ tetracycline พบว่า ไม่มีผลต่อกันในทุกไอโซเลท (100%) เมื่อเลือกเชื้อกลุ่ม NTS สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ ampicillin และให้ผลเพิ่มฤทธิ์ (จากวิธี checkerboard) ซึ่งมีจำนวน 7 ไอโซเลท มาทำการศึกษาต่อเพื่อประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Time kill พบว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC) เดี่ยวๆ สามารถฆ่าเชื้อได้ 99 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ไอโซเลท (57.14%) แต่ถ้าให้ร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC) จะเพิ่มเป็น 6 ไอโซเลท (85.71%) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่กลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) ส่วนการให้ ampicillin (1/2 MIC) เดี่ยวๆ พบว่า เชื้อที่ถูกฆ่าได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์มีเพียง 1 ไอโซเลท (14.29%) ภายในเวลา 4 ชั่วโมงแรกเท่านั้น หลังจากนั้นเชื้อทุกไอโซเลท (100%) จะกลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) สำหรับ Salmonella 14 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่นำมาทดสอบและตรวจพบยีน *integrase* จะถูกฆ่าได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะเมื่อให้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin เท่านั้น ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อของ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ ampicillin แล้วได้ และยังอาจช่วยลดอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อลงได้อีกด้วย เนื่องจากเชื้อไม่กลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth)

ภาควิชา เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....ชมพูนุช ไทยบุญรอด.....

สาขาวิชา เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4789074020 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORDS: Nontyphoid Salmonella / *TERMINALIA BELERICA* / AMPICILLIN

CHOMPOONUCH THAIBOONROD : EFFECTS OF *TERMINALIA BELERICA* ROXB. ALCOHOLIC EXTRACT ON NONTYPHOID SALMONELLA CLINICAL ISOLATES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN FUNGWITTHAYA, THESIS COADVISOR : LECTURER PENPHUN NAENNA , 114 pp.

The incidence of multidrug-resistant Nontyphoid Salmonella (NTS) are increasing especially to the common antimicrobial agents used in the treatment which are ampicillin, chloramphenicol, streptomycin and tetracycline. These cause the problem in the selection of antimicrobial agents. The use of an extract from Thai medicinal plant to increase the activity of available antimicrobial agents seem to be very interesting therapeutic alternative. The purpose of the present study is to determine the antibacterial activity of the combination of an alcoholic extract of *Terminalia belerica* plus ampicillin and plus tetracycline against 30 isolates of NTS. The MIC_{90} of the extract, ampicillin and tetracycline were 40 mg/ml, 256 μg/ml and 128 μg/ml, respectively. Nine isolates (30%) are resistant to both ampicillin and tetracycline. One isolate [Salmonella 14] is resistant to all tested antimicrobial agents including ampicillin, amoxicillin, norfloxacin and tetracycline. Ten isolates are β-lactamase producer (as tested by nitrocefin-based test) but the common gene involved in β-lactam resistance including bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{CTX-M} gene could not be detected. However *integrase* gene which involved in the spread of antibiotic resistance gene was detected in one isolate [Salmonella14]. The combination effect of an alcoholic extract of *Terminalia belerica* plus ampicillin and plus tetracycline was determined by checkerboard method. The additive effect was observed in 22 of 30 isolates (73.33%) and the indifference effect was observed in 8 isolates (26.67%). The indifference effect was observed when using an alcoholic extract of *Terminalia belerica* plus tetracycline against all 13 tetracycline-resistant isolates (100%). To determine of the antibacterial activity of the combination of an alcoholic extract of *Terminalia belerica* plus ampicilin against 7 isolates which is resistant to ampicillin and show additive effect (from checkerboard method) by time kill assay shown 99 percent of the number of bacteria was killed within 24 hours of growth was observed in 6 isolates (85.71%) and no regrowth. When testing with an alcoholic extract of *Terminalia belerica* alone was observed in only 4 isolates (57.14%) while ampicillin alone could killed 99 percent of only one isolate at 4 hours of growth and after 4 hours all tested strains regrew. For Salmonella 14 which was resistant to all tested antimicrobial agents and was *integrase* gene positive, 99 percent of this strain was killed by the combination of an alcoholic extract of *Terminalia belerica* plus ampicillin only. It could be concluded that the combination of alcoholic extract of *Terminalia belerica* plus ampicillin had additive effect against strain of ampicillin-resistant NTS and it could possibly decrease the emergence of resistance strain by inhibition of the regrowth of the pathogen.

Department of Pharmacology.....Student's signature..Chompoonuch Thaiboonrod

Field of study Pharmacology.....Advisor's signature..Siriporn Fungwitthaya

Academic year 2006.....Co-advisor's signature..Penphun Naenna

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ศิริภรณ์ ฟุ้งวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์เพ็ญพรรณ แน่นหนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความรู้ ตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัตนา อำนวยผล ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ เกี่ยวกับขั้นตอนของการสกัดพืชสมุนไพร

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พิณทิพย์ พงษ์เพชร ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และความช่วยเหลือต่างๆ เกี่ยวกับเทคนิคปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อทดสอบทุกไอโซเลทที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และกรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณ์มงคล ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ รท. สพ.ญ. ดร เนาวรัตน์ สุธัมนาถพงษ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ตลอดการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาต่างประเทศ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

สารบัญตาราง..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
- สมมติฐานการวิจัย..... 2
- วัตถุประสงค์ในการวิจัย..... 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

- เชื้อ *Salmonella* spp..... 4
- การรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ด้วยยาต้านจุลชีพ..... 6
- ปัญหาของการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS..... 11
- การดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams..... 12
- การแพร่กระจายของยีนดื้อยา..... 19
- บทบาทของ integron ต่อการดื้อต่อยาต้าจุลชีพหลายชนิดแบบข้ามกลุ่ม..... 20
- การตรวจยีนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)..... 25
- การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกัน (Antimicrobial Combination)..... 26
- การรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ด้วยสมุนไพร..... 27

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 34

- เชื้อแบคทีเรีย..... 34
- สมุนไพรและสารเคมี..... 34
- การเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก..... 34
- การตรวจหาสารพฤกษเคมีในสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก..... 35
- การตรวจความไวรับของเชื้อต่อสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก และยาต้านจุลชีพ..... 36

หน้า

- การหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้..... 38
- การตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase ที่เชื้อสร้างขึ้น (β-lactamase activity)..... 40
- การตรวจหายีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactamase และยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยา..... 41
- การประเมินฤทธิ์ร่วม (combination activity) ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด..... 44
- การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ (antibacterial activity) ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับ ampicillin..... 46
- การคำนวณค่าทางสถิติ..... 50

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 51
- ผลการตรวจสารพฤกษเคมีและผลการตรวจความไวรับของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก..... 51
- ผลการทดสอบความไวรับของยาต้านจุลชีพ..... 51
- ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุด (Minimal Inhibitory Concentrations, MICs) ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ..... 52
- ผลการตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase และผลการตรวจยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams และยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยา..... 53
- ผลการประเมินฤทธิ์ร่วม (combination activity) ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด โดยวิธี checkerboard..... 55
- ผลการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ (antibacterial activity) ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin โดยวิธี time kill..... 61

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 68

รายการอ้างอิง..... 71

ภาคผนวก..... 80

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 114

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
2-1	รูปร่างของเชื้อ *Salmonella* spp.....	4
2-2	โครงสร้างทางเคมีของ ampicillin.....	7
2-3	โครงสร้างทางเคมีของ amoxicillin.....	7
2-4	โครงสร้างทางเคมีของ tetracycline.....	10
2-5	โครงสร้างทางเคมีของ norfloxacin.....	11
2-6	การทำงานของเอนไซม์ β-lactamase.....	12
2-7	โครงสร้างทั่วไปของ integron.....	20
2-8	ขั้นตอนที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส.....	25
2-9	ลักษณะใบและผลสมอพิเภก.....	27
2-10	กลุ่มสาร tannin ที่เป็นองค์ประกอบหลักในต้นสมอพิเภก.....	32
4-1	การกระจายของจำนวนเชื้อกลุ่ม NTS ไอโซเลท ที่ดื้อยา.....	52
4-2	PCR product ของ *integrase* gene ที่พบในเชื้อ Salmonella 14 (Sal 14)	55
4-3	ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 22 ไอโซเลท ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive).....	59
4-4	กราฟ isobologram และค่า Σ FIC ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 22 ไอโซเลท ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์.....	59
4-5	ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 13 ไอโซเลท ที่ไม่มีผลต่อกัน (indifference).....	60
4-6	กราฟ isobologram และค่า Σ FIC ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 13 ไอโซเลท ที่ไม่มีผลต่อกัน.....	60
4-7	กราฟ time kill ของเชื้อกลุ่ม NTS แต่ละไอโซเลท (จำนวน 7 ไอโซเลท) เมื่อได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC), ampicillin (1/2 MIC) และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC : 1/2 MIC).....	61

ภาพประกอบ หน้า

4-8 กราฟ time kill ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin เมื่อได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC), ampicillin (1/2 MIC) และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC : 1/2 MIC)..... 66

ภ.1 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 28..... 96

ภ.2 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 2, 5, 12, 17,23, 26 และ 27..... 97

ภ.3 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 10, 11, 13, 15, 18, 22 และ 29 98

ภ.4 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 3, 9, 14, 16, 19, 25 และ 30..... 99

ภ.5 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 6 และ 7..... 100

ภ.6 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 1 และ 24..... 101

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ หน้า

ภ.7 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 4..... 102

ภ.8 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 8, 20 และ 21..... 103

ภ.9 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ tetracycline, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 3, 7 และ 17..... 104

ภ.10 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ tetracycline, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 8, 9, 19, 20, 21 และ 25..... 105

ภ.11 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ tetracycline, การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 2, 14 และ 26..... 106

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2-1	คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ละ species และ subspecies.....	5
2-2	ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ *tet* gene กับกลไกการดื้อต่อยากลุ่ม Tetracycline	9
2-3	เปรียบเทียบวิธีการหมวดหมู่ของเอนไซม์ β-lactamase ตามวิธีของ Ambler และ Bush.....	14
2-4	เอนไซม์ β-lactamase ชนิดต่างๆ ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ.....	18
2-5	เอนไซม์ β-lactamase ใน Class A ที่อยู่บน integron ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ.....	22
2-6	เอนไซม์ β-lactamase ใน Class B ที่อยู่บน integron ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ.....	23
2-7	เอนไซม์ β-lactamase ใน Class D ที่อยู่บน integron ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ.....	24
2-8	ฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของส่วนต่างๆ ของต้นสมอพิเภก.....	29
2-9	สารสำคัญ (active compound) ที่พบตามส่วนต่างๆ ของต้นสมอพิเภก.....	31
3-1	การแปลผลขนาดของ Inhibition zone ของเชื้อกลุ่ม NTS และเชื้อสายพันธุ์ควบคุม.....	38
3-2	การแปลผลค่า MIC ของเชื้อกลุ่ม NTS และเชื้อสายพันธุ์ควบคุม.....	40
3-3	ลำดับเบสของ primer ของยีนที่ต้องการศึกษา.....	43
4-1	ผลการตรวจความไวรับของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี disk diffusion.....	51
4-2	ผลการหาค่า MIC ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก และยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี agar dilution.....	53
4-3	ผลการตรวจยีนในเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 10 ไอโซเลท ที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase และค่า MIC ของเชื้อกลุ่ม NTS ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ	54

ตาราง หน้า

4-4 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin หรือร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท และ 30 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยวิธี checkerboard..... 56

4-5 จำนวนไอโซเลทที่ถูกฆ่า ณ.เวลาต่างๆ (0-24 ชั่วโมง) และจำนวนไอโซเลทที่กลับเจริญขึ้นอีกครั้งหลังเวลาผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง (regrowth) ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท เมื่อได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ร่วมกับ ampicillin โดยวิธี time kill..... 64

4-6 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป ณ. เวลาต่างๆ (0-24 ชั่วโมง), ค่า $AUBKC_{0-24}$ และค่า BA_{24} ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อampicillin..... 67

ภ.1 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท..... 81

ภ.2 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 3 ไอโซเลท..... 83

ภ.3 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 3 ไอโซเลท..... 83

ภ.4 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของพืช 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 5 ไอโซเลท..... 84

ภ.5 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของ 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท..... 85

ภ.6 ข้อมูลจริงของค่า MIC ของสารสกัดน้ำของพืช 2 ชนิด ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท..... 87

ภ.7 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 6 ไอโซเลท..... 89

ภ.8 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของพืช 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 6 ไอโซเลท..... 89

ภ.9 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ที่ความเข้มข้น 5 มก/มล ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท..... 90

ตาราง

หน้า

ภ.10 ข้อมูลจริงของการตรวจความไวรับของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ
ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท..... 91

ภ.11 ข้อมูลจริงของการหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆและสารสกัด
แอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท..... 93

ภ.12 ข้อมูลจริงของการตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase และผลการตรวจ
ยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactam และ
ยีนที่ถ่ายทอดการดื้อยาในเชื้อกลุ่ม NTS…….. 95

ภ.13 ข้อมูลจริงของการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์
ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อ 7 ไอโซเลท
ที่ดื้อต่อ ampicillin โดยวิธี time kill…… 107

ภ.14 ค่า viable log ที่เปลี่ยนแปลงไป ณ.เวลาต่างๆและค่าทางจลนศาสตร์
(kinetic parameter) ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่ดื้อต่อ ampicillin
โดยวิธี time kill……. 110

ภ.15 ค่า Log viable cell count ณ.เวลาต่างๆของเชื้อทดสอบ 7 ไอโซเลท
ที่ดื้อต่อ ampicillin จากการศึกษาโดยวิธี time kill…….…….. 113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม สัตว์ปีก และสัตว์เลื้อยคลาน โดยเชื้อจะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อ เมื่อเชื้อถูกขับออกจากร่างกายแล้วจะสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดินและในน้ำ ต่อไปได้อีกเป็นเวลานาน ดังนั้น การติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในคน จึงมักเกิดจากการดื่มน้ำหรือรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อนี้เข้าไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์ น้ำนม หรือไข่ ที่มาจากสัตว์ที่ติดเชื้อ

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. แบ่งตามสายพันธุ์ของเชื้อที่ก่อโรคและกลุ่มอาการทางคลินิกออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้ ประเภทที่หนึ่ง คือ โรคที่มีสาเหตุจาก *Salmonella enterica* Typhi และ *Salmonella enterica* Paratyphi A, B หรือ C ได้แก่ โรคไข้เอนเทอริก (enteric fever) และประเภทที่สอง คือ โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella* spp. สายพันธุ์อื่นๆ นอกเหนือจากประเภทที่หนึ่ง โดยเชื้อกลุ่มนี้เรียกรวมกันว่า “Nontyphoid Salmonella (NTS)” ซึ่งมักก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้กระเพาะอาหารและลำไส้เกิดการอักเสบขึ้น โดยผู้ป่วยจะมีอาการอุจจาระร่วง ถ่ายอุจจาระเหลวถึงเป็นน้ำ วันละหลายครั้ง ครั้งละปริมาณมากๆ และมักมีอาการไข้ หนาวสั่น คลื่นไส้ อาเจียนร่วมด้วย ในเวชปฏิบัติทั่วไป แพทย์มักให้ยาต้านจุลชีพแก่ผู้ป่วยที่มีอาการดังกล่าวข้างต้น เพื่อป้องกันการติดเชื้อในกระแสโลหิต หรือภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ เด็กทารก รวมถึงผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยเอดส์ ผู้ป่วยมะเร็ง ผู้ที่มีกรดในกระเพาะอาหารน้อย หรือผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันซึ่งทำให้เม็ดเลือดขาวทำงานลดลง สำหรับยาต้านจุลชีพที่เคยใช้รักษาโรคติดเชื้อ NTS ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol และ trimethoprim/sulfamethoxazole ซึ่งในปัจจุบันนี้มีรายงานว่า เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพดังกล่าวมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาลดลง และสำหรับในประเทศไทย จากรายงานอุบัติการณ์การดื้อต่อยาของเชื้อกลุ่ม NTS ระหว่างปี ค.ศ. 1998-2006 ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณะสุข (ที่มา : http://narst.dmsc.moph.go.th) แสดงให้เห็นว่า ช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1998-2005 เชื้อกลุ่มนี้มีความไวต่อ ampicillin เฉลี่ยประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ และในปี ค.ศ. 2006 ความไวได้ลดลงอย่างมาก เหลือเพียง 11.36 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากนี้ จะเห็นว่า เชื้อกลุ่มนี้ยังลดความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ เช่น co-trimoxazole และ chloramphenicol ลงได้อีกด้วย ส่งผลให้มีความยากลำบากในการเลือกยาต้านจุลชีพแผนปัจจุบันมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ดังนั้น จึงมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อนำพืชสมุนไพรบางชนิดมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาอีกทางหนึ่ง เช่น จากการศึกษาสารสกัดจากพืชพื้นเมืองของประเทศกัวเตมาลา ซึ่งได้แก่ ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*), ใบ *Targetes lucida*, ต้นกระเทียม

(*Allium sativum*), เปลือก *Byrsonima crassifolis*, ใบมะม่วง (*Mangifera indica*), ใบโหระพา (*Ocimum basilicum*), ใบผักกาดน้ำ (*Plantago major*), ใบ *Sabucus maxicana*, ราก *Smilax lundellii* และใบ *Spondias purpurea* พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella enterica* Enteritidis (Natarajan et al.,2005) และมีรายงานว่า สารสกัดจากพืชพื้นเมืองของประเทศออสเตรเลีย 5 ชนิด ได้แก่ *Backhousia citriodora*, *Antholea antista*, *Eucalyptus staigenara*, *Eucalyptus olida* และ *Prostanthera indica* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella enterica* Enteritidis และ *Salmonella enterica* Typhimurium (Stephania et al., 2005) นอกจากนี้ มีรายงานว่า ใบและรากของต้นโสมอินเดีย (*Withania somnifera*) เมื่อนำมาสกัดด้วย ethyl acetate / methanol / น้ำ จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella enterica* Typhimurium ได้ (Owais et al. ,2003) และจากการศึกษาสารสกัดน้ำ / แอลกอฮอล์ของ**ลูกสมอพิเภก** พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella enterica* Typhimurium ได้ (Iqbal, Zafar and Faiz, 1998) สำหรับในประเทศไทย ตามตำรับยาแผนโบราณระบุว่า **ลูกสมอพิเภก** 2-3 ลูก ต้มกับน้ำสะอาด 3 ถ้วย ใส่เกลือแกงเล็กน้อย เคี่ยวจนกระทั่งเหลือ 1 ถ้วย ดื่มเช้า-เย็น สามารถใช้รักษาอาการท้องเสีย และท้องเดินที่ไม่ใช่บิดหรืออหิวาตกโรคได้ (สุนทรี สิงหบุตรา, 2540) นอกจากนี้ ลูกสมอพิเภกยังเป็นหนึ่งในผลไม้สามชนิดในตำรับยา"ตรีผลา (Triphala)" ซึ่งเป็นตำรับยาแผนโบราณที่มีสรรพคุณในการแก้ไข้ แก้ลมจุกเสียด ขับเสมหะและขับลม (กัญจนา ดีวิเศษ และคณะ, 2537) ดังนั้น จากรายงานในต่างประเทศและตำรับยาแผนโบราณของประเทศไทย ทำให้ผู้วิจัยสนใจทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อกลุ่ม NTS ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพแผนปัจจุบันที่เชื้อดื้อต่อยานั้นๆ แล้ว

สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Nontyphoid Salmonella (NTS) ที่ดื้อต่อ ampicillin แล้วได้ และการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin จะเสริมฤทธิ์กัน

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความไวรับของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพที่เคยใช้ในการรักษา ได้แก่ ampicillin, norfloxacin, tetracycline และ amoxicillin/clavulanic acid ต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Nontyphoid Salmonella (NTS) สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในคลินิก โดยเชื้อที่นำมาทำการศึกษาจะต้องได้รับการทดสอบความสามารถในสร้างเอนไซม์ β-lactamase (β-lactamase activity) โดยวิธี nitrocefin-based test และทำการตรวจหายีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β-lactam ได้แก่ β-lactamase gene (*bla*) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยา ได้แก่ *integrase* gene โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2. เพื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับ ampicillin โดยวิธี checkerboard และ time kill

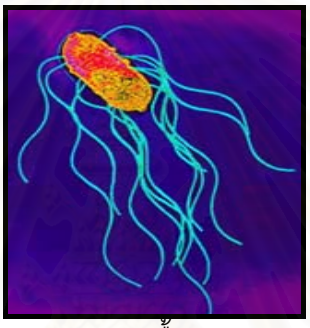
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ก. เชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (rod shape) ที่ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล เจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative bacteria) อยู่ในแฟมิลี Enterobacteriaceae ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว (peritrichrous flagella) ยกเว้น *Salmonella enterica* Pullorum และ *Salmonella enterica* Gallinarum (Stephen and Peter, 2005)



รูปที่ 2-1 รูปร่างของเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. แบ่งโดยใช้ผลการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) (ตารางที่ 2-1) และตามข้อตกลงของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ออกได้เป็น 2 species ได้แก่

1. *Salmonella enterica* ซึ่งประกอบด้วย 6 subspecies ได้แก่ Subspecies I (enterica), II (salamae), IIIa (arizonae), IIIb (diarizonae), IV (houtenae) และ VI (indica)

2. *Salmonella bongori* ซึ่งประกอบด้วย 1 subspecies คือ Subspecies V (Aroon Bangtrakulnonth, 2002)

เนื่องจากการแบ่งกลุ่มของเชื้อยังไม่ลงตัวนัก ดังนั้น ในการเรียกชื่อของเชื้อ *Salmonella* spp. จึงมักเรียกตามซีโรไทป์ (serotype) แทน species เช่น การเรียก *Salmonella enterica subspecies enterica serotype Enteritidis* PT4 มักจะเรียกว่า *Salmonella* Enteritidis (Old and Threlfall, 1998)

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ละ species และ subspecies

Species	*Salmonella enterica*						*Salmonella bongori*
Subspecies	enterica	salamae	arizonae	diarizonae	Houtenae	indica	
<u>คุณสมบัติ</u>							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 ชม.)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Culture with KCN	-	-	-	-	+	-	+
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-
Lysis by Phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals	Cold-blooded animals					

(+) = 90% หรือมากกว่า ให้ผลบวก

(-) = 90% หรือมากกว่า ให้ผลลบ

(d) = ปฏิกิริยาแตกต่างกันขึ้นกับซีโรไทป์ของเชื้อ

ที่มา: Aroon Bangtrakulnonth, 2002

โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella* spp. แบ่งตามอาการทางคลินิกออกได้เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ ไข้เอนเทอริก (enteric fever) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Paratyphi และโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้เกิดการอักเสบขึ้น มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในซีโรไทป์อื่นๆ ซึ่งเรียกรวมกันว่า "**Nontyphoid Salmonella (NTS)**" ซึ่งเชื้ออาจลุกลามเข้าสู่กระแสโลหิตและอวัยวะอื่นๆได้ โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ เด็กทารก หรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ทำให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงขึ้น (Hohmann, 2001; Vugia et al., 2004) ในการติดเชื้อกลุ่ม NTS ส่วนใหญ่มักมีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella enterica* เพราะว่า species นี้มีจำนวนมากกว่า 2,500 ซีโรไทป์ (Bopp et al., 2003)

ข. การรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ด้วยยาต้านจุลชีพ

ถ้าเป็นการติดเชื้อกลุ่ม NTS ในระบบทางเดินอาหาร (intestinal tract infection) อาการของโรคจะสามารถหายได้เอง (self limited) จึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษา (Jewes, 1987) แต่เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) หรือการติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหาร (extraintestinal tract infection) ซึ่งอาจทำให้เกิดการอักเสบรุนแรงขึ้นได้ เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบ ท่อปัสสาวะอักเสบ หรือกระดูกอักเสบ (Fierer and Swancutt, 2000) ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษา โดยกลุ่มของยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ได้แก่

1. ยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams
2. ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines
3. ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Fluoroquinolones

(Stephen and Peter, 2005)

ข.1 <u>ยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams</u>

ยาต้านจุลชีพกลุ่มนี้ทุกชนิดจะต้องมี β-lactam ring ในโครงสร้างหลักเสมอ ยาจะออกฤทธิ์โดยจับกับโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ ที่เรียกว่า Penicillin Binding Proteins (PBPs) ซึ่งก็คือ เอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ในขั้นตอนที่ 3 (transpeptidation) ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ transpeptidase, carboxypeptidase และ endopeptidase โดยเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายหลักของยาต้านจุลชีพกลุ่มนี้ คือ transpeptidase แล้วมีผลยับยั้งการเชื่อมไขว้ของสาย peptidoglycan 2 สายเข้าด้วยกัน ทำให้ผนังเซลล์ไม่มีความแข็งแรงและไม่ทนต่อแรงดันออสโมติก ผนังเซลล์จึงแตกง่าย ส่งผลให้เชื้อตายในที่สุด ดังนั้นยากลุ่มนี้จึงออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal activity) ยากลุ่มนี้แบ่งโดยพิจารณาจากความแตกต่างทางเคมีออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ดังนี้

1.1 ยากลุ่ม penicillins เช่น penicillin G, ampicillin และ amoxicillin

1.2 ยากลุ่ม cephalosporins เช่น ceftazidime และ ceftriazone

1.3 ยากลุ่ม monobactams เช่น aztreonam

1.4 ยากลุ่ม carbapenems เช่น imipenem

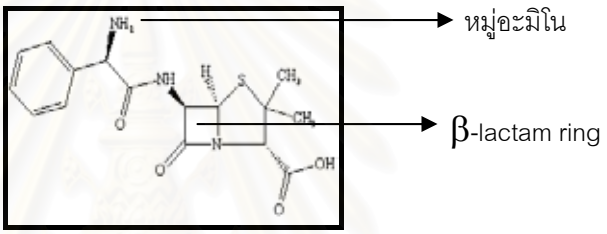
การดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams เกิดขึ้นได้ 3 รูปแบบ ดังนี้

1.1 การลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ โดยการลดขนาดของ porin channel ซึ่งเป็นทางผ่านเข้าออกของสารให้เล็กลงหรือเปลี่ยนชนิดไป หรือการขับยาออกจากเซลล์ (Gold and Moellering, 1996)

1.2 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของ PBPs ทำให้ความสามารถของยาในการจับกับ PBPs ลดลง (Danziger and Pendland, 1995)

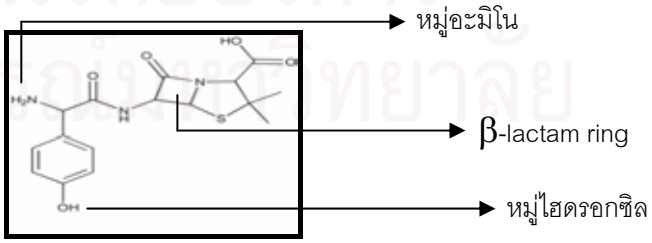
1.3 การสร้างเอนไซม์ β-lactamase ขึ้นมาทำลายฤทธิ์ของยา กลไกนี้เป็นกลไกหลักที่เชื้อหลายชนิดใช้ในการดื้อต่อยากลุ่มนี้ (Quintiliano et al., 1999)

- **Ampicillin** เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ โดยมี penicillin nucleus (6-aminopenicillanic acid, 6-APA) ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อราบางชนิด เป็นโครงสร้างหลัก แล้วมีการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง side chain ให้เป็นหมู่อะมิโน (NH_2) ทำให้ ampicillin จัดอยู่ในกลุ่ม aminopenicillin ซึ่งการมีหมู่อะมิโนทำให้โมเลกุลของยามี hydrophobicity สูงขึ้น จึงสามารถผ่าน outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบได้ จึงออกฤทธิ์ได้กว้างขึ้น (broad-spectrum) ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น



รูปที่ 2-2 โครงสร้างทางเคมีของ ampicillin

- **Amoxicillin** เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่ม aminopenicillin โดยมีโครงสร้างหลักเช่นเดียวกับ ampicillin แต่มีความแตกต่างที่ตำแหน่ง side chain เล็กน้อย เนื่องจาก amoxicillin มี functional group 2 หมู่ คือ หมู่อะมิโน (NH_2) และหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งการมีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้ยานี้ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่า ampicillin (อัตราการดูดซึมของ ampicillin และ amoxicillin เมื่อให้ในรูปยากิน เท่ากับ 30-60 และ 75-90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) amoxicillin จัดเป็นยาที่ออกฤทธิ์กว้างเช่นเดียวกับ ampicillin



รูปที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของ amoxicillin

ข.2 <u>ยาต้านจุลชีพกลุ่ม</u> Tetracyclines

ยาต้านจุลชีพกลุ่มนี้ทุกชนิดจะต้องมี hydronaphthacene ring (คือ benzene ring 4 ring เชื่อมติดกัน) ในโครงสร้างหลักเสมอ ยาจะออกฤทธิ์โดยจับที่ตำแหน่ง acceptor site (A-site) บนหน่วยย่อย 30s ของไรโบโซม (30s ribosomal subunit) แล้วทำให้ tRNA ไม่สามารถนำกรดอะมิโนตัวใหม่มาต่อบน

ไรโบโซมได้ ดังนั้น จึงไม่เกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างกรดอะมิโนตัวใหม่กับสายเปปไทด์ที่ต่ออยู่ก่อนแล้ว ทำให้กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นไม่ได้ เชื้อจึงไม่มีวัตถุดิบสำหรับการเจริญและการเพิ่มจำนวน ดังนั้น ยากลุ่มนี้จึงออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic activity) ยากลุ่มนี้แบ่งโดยพิจารณาจากระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยา ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

2.1 กลุ่ม short-acting เป็นยากลุ่มที่มีค่าครึ่งชีวิตสั้นที่สุด (ประมาณ 6-9 ชั่วโมง) ตัวอย่างเช่น tetracycline และ oxytetracycline

2.2 กลุ่ม intermediate-acting เป็นยากลุ่มที่มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 12-14 ชั่วโมง ตัวอย่างเช่น methacycline

2.3 กลุ่ม long-acting เป็นยากลุ่มที่มีค่าครึ่งชีวิตยาวที่สุด (ประมาณ 16-18 ชั่วโมง) ตัวอย่างเช่น doxycycline

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines เกิดขึ้นได้ 3 รูปแบบ ดังนี้

2.1 การขับยาออกจากเซลล์ โดยระบบขนส่งสาร (drug efflux pump) กลไกการดื้อยาในรูปแบบนี้พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่พบได้บ่อยกว่าในแบคทีเรียแกรมลบ

2.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformation) ของไรโบโซมป้องกันไม่ให้ยาเข้าจับ (ribosomal protection) กลไกการดื้อยาในรูปแบบนี้พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่พบได้บ่อยกว่าในแบคทีเรียแกรมบวก

2.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยา (chemical modification) โดยการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาทำลายฤทธิ์ของยา กลไกการดื้อยาในรูปแบบนี้พบเฉพาะในเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม anaerobic bacteria เท่านั้น ตัวอย่างเช่น *Bacteroides* spp. เป็นต้น

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines เป็นผลมาจากการมี tetracycline-resistance gene (*tet* gene) (Mims et al., 2004) ซึ่งจากการศึกษาลำดับเบสของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของ *tet* gene ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย (ตารางที่ 2-2) ได้แก่

2.1 กลุ่มที่สร้าง transporter protein (คือ โปรตีนที่ใช้ในการขับยาออกจากเซลล์) ซึ่ง *tet* gene กลุ่มนี้จะแตกต่างกันในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ในแบคทีเรียแกรมบวก มี 5 ชนิด ได้แก่ *tet* (K), *tet* (L), *tet* (Z), *tet* A(P) และ *tet* (V) และในแบคทีเรียแกรมลบ มี 12 ชนิด ได้แก่ *tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D), *tet* (E), *tet* (G), *tet* (H), *tet* (I), *tet* (J), *tet* (Y), *tet* (30) และ *tet* (31)

2.2 กลุ่มที่สร้าง ribosomal protein (คือ โปรตีนที่ทำให้โครงสร้างของของยาเปลี่ยนแปลง ทำให้ไรโบโซมจับไม่ได้) มีอยู่ 7 ชนิด ได้แก่ *tet* (O), *tet* (S), *tet* (M), *tet* (Q), *te t*(T), *tet* B(P) และ *tet* (W)

2.3 กลุ่มที่สร้างเอนไซม์ขึ้นมาทำลายฤทธิ์ของยา ซึ่งได้แก่ *tet* (X)

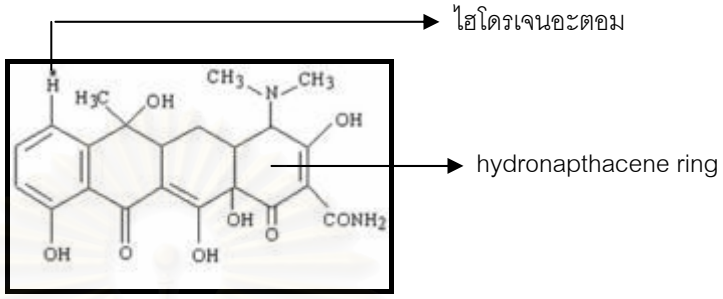
ตารางที่ 2-2 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ *tet* gene กับกลไกการดื้อต่อยากลุ่ม Tetracyclines

drug efflux pump		ribosomal protection	chemical
Gram-negative	Gram-positive	Gram-positive/negative	modification
tet (A)	*tet* (K)	*tet* (O)	*tet* (X) [from *Bacteroides* spp.]
tet (B)	*tet* (L)	*tet* (S)	
tet (C)	*tet* (Z)	*tet* (W)	
tet (D)	*tet* A (P) [from *Clostridium*]	*tet* (M) [from different genera]	
tet (E)	*tet* (V) [from *Mycobacterium smegmatis*]	*tet* (Q) [from *Bacteroides* spp.]	
tet (G)		*tet* (T) [from *Streptococcus pyogenes*]	
tet (H)		*tet* (P) [from *Clostridium*]	
tet (I)			
tet (J)			
tet (Y)			
tet (30)			
tet (31)			

ที่มา: Zhanel et al., 2004

จากการศึกษาของ Robert (1996) พบว่า *tet* gene ที่พบในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriaceae มี 5 ชนิด ได้แก่ *tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D) และ *tet* (G) ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้าง transporter protein แสดงให้เห็นว่า กลไกที่เชื้อกลุ่มนี้ใช้ในการดื้อต่อยากลุ่ม Tetracyclines ก็คือ การขับยาออกจากเซลล์ โดยระบบขนส่งสาร และจากการศึกษาของ Chopra และ Robert (2001) พบว่า *tet* gene ที่พบในเชื้อ *Samonella* spp. มี 5 ชนิด ได้แก่ *tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D) และ *tet* (G) เช่นกัน โดย *tet* gene ที่มีจำนวนมากที่สุด คือ *tet* (B) และ *tet* (C) ตามลำดับ ซึ่งยีนทั้งสองมีหน้าที่ในการสร้าง transporter protein ดังนั้น กลไกที่เชื้อ *Salmonella* spp. ใช้ในการดื้อต่อยากลุ่ม Tetracyclines ก็คือ การขับยาออกจากเซลล์ โดยระบบขนส่งสาร (Levy, 1998)

- **Tetracycline** เป็นยาต้านจุลชีพกึ่งสังเคราะห์ในกลุ่ม Tetracyclines ที่ออกฤทธิ์สั้น ซึ่งมีโครงสร้างหลัก คือ hydronapthacene ring ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อราบางชนิด และมี side chain เป็นไฮโดรเจนอะตอม (H^+) ยานี้เป็นยาที่ออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum) ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ, rickettsia, mycoplasma รวมถึง protozoa บางชนิด



รูปที่ 2-4 โครงสร้างทางเคมีของ tetracycline

ข.3 <u>ยาต้านจุลชีพกลุ่ม</u> Fluoroquinolones

ยาต้านจุลชีพกลุ่มนี้ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยตรง โดยเกิดจากการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีมาจากยากลุ่ม Quinolone (เช่น nalidixic acid) เนื่องจากยากลุ่ม Quinolone มีฤทธิ์แทรกแซงค่อนข้างมาก (เช่น มีอาการข้างเคียงทางสมอง) และเชื้อดื้อต่อยากลุ่มนี้ได้ง่าย

ยาต้านจุลชีพกลุ่ม Fluoroquinolone ทุกชนิดจะต้องมี 4-quinolone เป็นโครงสร้างหลักเสมอ ยาจะออกฤทธิ์โดยจับกับหน่วยย่อย A (A-subunit หรือ α-monomer) ของเอนไซม์ DNA gyrase (DNA topoisomerase II) แล้วทำให้การสังเคราะห์สาย DNA เกิดขึ้นไม่ได้ และยังทำให้ DNA ไม่สามารถขดเป็นเกลียว (negative supercoil) ได้ ส่งผลให้เชื้อตายในที่สุด ดังนั้น ยากลุ่มนี้จึงออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bacteridal activity) ยากลุ่มนี้แบ่งโดยพิจารณาจากจำนวนฟลูออรีนอะตอมในโมเลกุลของยา ออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

3.1 กลุ่มที่มีฟลูออรีนอะตอม 1 อะตอม (single-fluoronate) เช่น norfloxacin และ ciprofloxacin

3.2 กลุ่มที่มีฟลูออรีนอะตอมมากกว่า 1 อะตอม (multiple-fluoronate) เช่น lomefloxacin (มี 2 อะตอม) และ temafloxacin (มี 3 อะตอม)

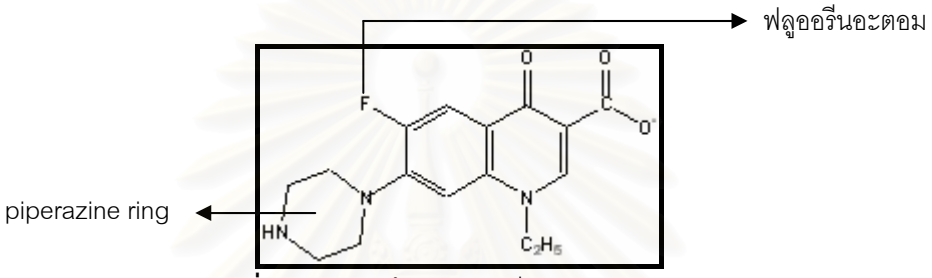
การดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Fluoroquinolone เกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบ คือ

3.1 การลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ โดยการลดขนาดของ porin channel ซึ่งเป็นทางผ่านเข้าออกของสารให้เล็กลงหรือเปลี่ยนชนิดไป หรือการขับยาออกจากเซลล์ (Reyna et al., 1995)

3.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (configuration) ของหน่วยย่อย A ของเอนไซม์ DNA gyrase ทำให้ยาจับกับเอนไซม์ดังกล่าวได้ไม่ดี โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์เกิดขึ้น

เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ (mutation) ที่ยีน *gyr* A ซึ่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์หน่วยย่อย A ของเอนไซม์ดังกล่าว (Reyna et al., 1995)

- **Norfloxacin** เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่ม single-fluoronate โดยมีฟลูออรีนอะตอม 1 อะตอม ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และมีการเปลี่ยนแปลง functional group จาก CH_3O^- (ในโมเลกุลของ nalidixic acid) เป็น piperazine ring ทำให้ยานี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีขึ้น เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น



รูปที่ 2-5 โครงสร้างทางเคมีของ norfloxacin

ค. ปัญหาของการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS

ในปัจจุบันพบว่า เชื้อกลุ่มนี้มีอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง Kariuki และคณะ (2005) ได้ศึกษาเชื้อกลุ่ม NTS ที่แยกจากเลือดของผู้ป่วยในประเทศเคนย่า ระหว่างปี ค.ศ.1994-2003 พบว่า ในปี ค.ศ.1994 เปอร์เซ็นต์การดื้อยา (% resistance) ของเชื้อต่อ ampicillin, streptomycin, chloramphenicol และ co-trimoxazole เท่ากับ 48, 49, 46 และ 26 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 62, 64, 67 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2003 และในปี ค.ศ. 1994 พบว่า ค่า MIC ของเชื้อกลุ่มนี้ต่อยาทั้งสี่ชนิดดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 64, 128, 32 และ 32 มคก/มล และเพิ่มสูงขึ้นเป็น >256, >1024, >32 และ >32 มคก/มล ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2003 นอกจากนี้ Marimon และคณะ (2004) ซึ่งได้ทำการศึกษาเชื้อกลุ่ม NTS ในประเทศสเปน พบว่า ช่วงระหว่าง ค.ศ. 1981-1991 เชื้อดื้อต่อ nalidixic acid ในระดับต่ำมาก (เกือบเท่ากับศูนย์) แต่หลังจากปี ค.ศ. 1991 เป็นต้นมา พบว่า อุบัติการณ์การดื้อต่อ nalidixic acid ของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสูงสุดในปี ค.ศ. 2003 (% resistance เท่ากับ 38.5 เปอร์เซ็นต์) และมีค่า MIC สูงมาก (มีค่าระหว่าง 128-1024 มคก/มล)

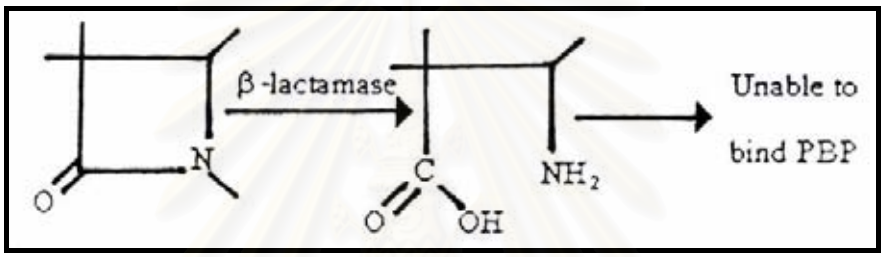
ในประเทศไทย มีรายงานอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของเชื้อกลุ่ม NTS ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณะสุข (ที่มา: http://narst.dmsc.moph.go.th) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1998-2005 เชื้อมีความไวต่อ ampicillin เฉลี่ยประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ และในปี ค.ศ. 2006 ความไวได้ลดลงอย่างมาก เหลือเพียง 11.36 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

ง. การดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพ β-lactams มี 3 รูปแบบ (ดังที่กล่าวไปแล้วในหัวข้อ ข.) แต่กลไกหลักในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ก็คือ การสร้างเอนไซม์ β-lactamase ขึ้นมาทำลายฤทธิ์ของยา

ง.1 <u>การทำงานของเอนไซม์ β-lactamase</u>

เอนไซม์ β-lactamase จะทำลายฤทธิ์ของยากลุ่ม β-lactams โดยการทำให้ β-lactam ring ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของยากลุ่มนี้แตกออก โดยเกิดปฏิกิริยา hydrolysis แบบไม่ผันกลับ (irreversible hydrolysis) ที่พันธะเอไมด์ (amide bond) (รูปที่ 2-6)



รูปที่ 2-6 การทำงานของเอนไซม์ β-lactamase

ง.2 <u>การจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์ β-lactamase</u> มี 2 วิธี ได้แก่

ง.2.1 การจัดหมวดหมู่ตามวิธีของ Bush และคณะ (1995)

เป็นการจัดกลุ่มตามหน้าที่ (functional group classification) โดยพิจารณาจากความไวต่อ substrate และตัวยับยั้ง (inhibitor) ต่างๆ ซึ่งทำให้สามารถแบ่งเอนไซม์ ออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (ตารางที่ 2-3) ดังต่อไปนี้

- <u>Group 1</u> ประกอบด้วยเอนไซม์ cephalosporinase ซึ่งไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วย clavulanic acid เอนไซม์กลุ่มนี้พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Enterobacter* spp., *Citrobacter frundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* และ *Klebsiella pneumoniae*

- <u>Group 2</u> ประกอบด้วยเอนไซม์ penicillinase, cephalosporinase และ broad-spectrum penicillinase ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย clavulanic acid เอนไซม์กลุ่มนี้หากพิจารณาจากความสามารถในการทำลายยา carbenicillin, cloxacillin, ceftazidime, cefotaxime, aztreonem และยากลุ่ม extended-spectrum β-lactams ร่วมกับการถูกยับยั้งการทำงานได้/ไม่ได้ด้วย clavulanic acid จะทำให้สามารถแบ่งเอนไซม์กลุ่มนี้ ออกได้เป็น 8 กลุ่มย่อย (subgroup) คือ 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e และ 2f

- Group 3 ประกอบด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม metallo-β-lactamase ที่สามารถทำลายยากลุ่ม penicillins, cephalosporins และ carbapenems ได้ โดยเอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งเป็น metal chelating agent ชนิดหนึ่ง

- Group 4 ประกอบด้วยเอนไซม์ penicillinase ซึ่งไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วย clavulanic acid

ง.2.2 การจัดกลุ่มตามวิธีของ Ambler (1980)

เป็นการจัดกลุ่มตามคุณสมบัติทางโมเลกุล (molecular classification) โดยพิจารณาจากลำดับเบสของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ β-lactamase (β-lactamase sequence) ซึ่งทำให้สามารถแบ่งเอนไซม์ ออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (ตารางที่ 2-3) ได้แก่ Class A, B, C และ D โดยสำหรับ Class A, C และ D จะเรียกว่า “serine active-site enzyme” เพราะว่า เอนไซม์กลุ่มนี้จะทำลายยา โดยเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ในตำแหน่ง active site ที่มี serine เป็นองค์ประกอบ และสำหรับ Class B จะเรียกว่า “Zn^{2+}-dependent enzyme” เพราะว่า เอนไซม์กลุ่มนี้ต้องการ Zn^{2+} เป็นตัวช่วย (co-factor) ในการทำลายยา โดยในแต่ละกลุ่มย่อยมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

- Class A ประกอบด้วยเอนไซม์ penicillinase, cephalosporinase และ broad-spectrum β-lactamase ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย clavulanic acid ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ β-lactamase ที่สร้างจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* (จัดอยู่ในกลุ่ม 2a) และเอนไซม์ β-lactamase ที่เป็นอนุพันธุ์ของกลุ่ม TEM และ SHV ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (จัดอยู่ในกลุ่ม 2b และ 2be ตามลำดับ)

- Class C ประกอบด้วยเอนไซม์ cephalosporinase (AmpC enzyme) ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างอยู่บนโครโมโซม (chromosomal cephalosporinase)

- Class D ประกอบด้วยเอนไซม์ β-lactamase ที่สามารถทำลายยา oxacillin ได้ดี (oxacillin hydrolyzing enzyme, OXA)

- Class B ประกอบด้วยเอนไซม์กลุ่ม metallo β-lactamase ที่ต้องการ Zn^{2+} เป็นตัวช่วยในการเข้าทำลายยา เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถทำลายยาต้านจุลชีพได้หลายชนิด (broad range) รวมถึงยากลุ่ม carbapenems (เช่น imipenem และ meropenem) อีกด้วย เอนไซม์กลุ่มนี้ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยตัวยับยั้งต่างๆ ตัวอย่างของเชื้อที่พบเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, และ *Flavobacterium* spp.

ตารางที่ 2-3 เปรียบเทียบการจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์ β-lactamase ตามวิธีของ Ambler และ Bush

Structural class (Ambler)	Functional group (Bush)	Preferred substrates	Inhibition by clavulanate	Representative enzyme
Serine β-lactamases				
A	2a	Penicillins	++	Penicillinase for gram-positive bacteria
	2b	Penicillins, cephalosporins	++	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Penicillins, narrow spectrum and extended spectrum cephalosporins, monobactams	++	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, *Klebsiella oxytoca* K 1
	2br	Penicillins	-	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
	2c	Penicillins, carbenicillin	+	PSE-1, PSE-3, PSE-4
	2e	Cephalosporins	++	Inducible cephalosporinase from *Proteus vulgaris*
	2f	Penicillins, cephalosporins, carbapenem	+	NMC-A from *Enterobacter cloacae*, Sme-1 from *Serratia marcescen*
C	1	Cephalosporins	-	AmpC enzyme from gram-negative bacteria; MIR-1
D	2d	Penicillins, cloxacillin	±	OXA-1 to Oxa-11, PSE-2 (OXA-10)
Undetermined	4	Penicillins	-	Penicillinase from *Pseudomonas cepacia*
Zinc β-lactamases				
B	3	Most β-lactams, including carbapenems	-	L1 from *Xanthomonas maltophilia*, CcrA from *Bacteroides fragilis*

(++) = strong inhibitor of all member of class , (+) = moderate inhibition,

(±) = inhibition varies within the class, (-) = no inhibition

ที่มา: Bush et al., 1995

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ง.3 <u>การจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์ β-lactamase ชนิดใหม่</u>

ในการจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์ β-lactamase ชนิดใหม่ จะพิจารณาจากความสามารถในการทำลายยาหลายกลุ่มร่วมกัน ซึ่งได้แก่ ยากลุ่ม cephamycins (เช่น cephalothin), ยากลุ่ม oxy-imino cephalosporins (เช่น ceftazidime), ยากลุ่ม carbapenems (เช่น imipenem, meropenem) และยากลุ่ม monobactams (เช่น aztreonam) ซึ่งจะทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย คือ 1. กลุ่ม Extended -Spectrum β-lactamase (ESBL) 2. กลุ่ม plasmid-mediated AmpC enzyme และ 3. กลุ่ม Carbapenem hydrolyzing β-lactamase (Carbapenemase) (ตารางที่ 2-4) (Jacoby and Munoz-Price, 2005) ซึ่งในแต่ละกลุ่มมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

ง.3.1 กลุ่ม Extended-Spectrum β-lactamase (ESBL)

เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม oxy-imino cephalosporins และยากลุ่ม monobactams ได้ดี โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้จะพบบนพลาสมิด (plasmid) ดังนั้นเอนไซม์กลุ่มนี้จึงจัดเป็น plasmid-mediated enzyme เอนไซม์ในกลุ่ม ESBL แบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มย่อย ได้แก่

ง.3.1.1 <u>เอนไซม์ที่เป็นอนุพันธุ์ของกลุ่ม TEM</u> (Class A)

substrate profile ของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ ยากลุ่ม oxy-imino cephalosporins(โดยเฉพาะ ceftazidime และ cefotaxime), ยากลุ่ม monobactams (เช่น aztreonam) และยากลุ่ม extended-spectrum cephalosporins (เช่น cefepime และ cefpirome) เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย clavulanic acid, sulbactam และ tazobactam เอนไซม์กลุ่มนี้พบได้บ่อยในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (ประมาณร้อยละ 70), *E.coli* (ประมาณร้อยละ 20) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ เช่น *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* และ *Salmonella* spp. ปัจจุบันพบเอนไซม์กลุ่มนี้แล้วประมาณ 130 ชนิด (Jacoby and Munoz-Price, 2005) และพบว่า TEM-1 เป็นเอนไซม์ที่พบได้บ่อยที่สุดในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Bradford et al., 2001)

ง.3.1.2 <u>เอนไซม์ที่เป็นอนุพันธ์ของกลุ่ม SHV</u> (Class A)

substrate profile ของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ ยากลุ่ม penicillins, ยากลุ่ม oxy-imino cephalosporins (เช่น ceftazidime) และยากลุ่ม monobactams (เช่น aztreonam) เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย clavulanic acid, sulbactam และ tazobactam โดยหากพิจารณา substrate profile ของเอนไซม์กลุ่มนี้เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่เป็นอนุพันธ์ของกลุ่ม TEM จะเห็นว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก เพราะว่าเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวมีลำดับเบสของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันมาก เช่น TEM-1 และ SHV-1 มีลำดับของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันถึง 68 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์กลุ่มนี้พบได้บ่อย

ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus*, *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งปัจจุบันพบเอนไซม์กลุ่มนี้แล้วประมาณ 50 ชนิด โดยพบว่า SHV-5 และ SHV-12 เป็นเอนไซม์ที่พบได้บ่อยที่สุด (Jacoby and Munoz-Price, 2005)

ง.3.1.3 เอนไซม์ที่เป็นอนุพันธ์ของกลุ่ม CTX-M (Class A)

CTX-M มาจากคำว่า “CTX” ซึ่งมาจาก “cefotaximase” คือ คุณสมบัติเด่นของเอนไซม์กลุ่มนี้ที่สามารถทำลายยา cefotaxime ได้ดีกว่า ceftazidime และคำว่า “M” มาจาก “Munick” คือ ชื่อเมืองที่พบเอนไซม์นี้ครั้งแรก เอนไซม์กลุ่มนี้พบได้บ่อยในเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae เช่น *Salmonella* Typhimurium และ *E.coli* (Bauernfeind et al., 1990; Bonnet et al., 2000; Gazouli et al., 1998) ปัจจุบันพบเอนไซม์กลุ่มนี้แล้วประมาณ 40 ชนิด โดยพบว่า CTX-M-14, CTX-M-3 และ CTX-M-2 เป็นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด (Jacoby and Munoz-Price, 2005)

ง.3.1.4 เอนไซม์ในกลุ่มอื่นๆ ที่อยู่ใน Class A

เอนไซม์กลุ่มนี้พบได้ไม่บ่อยนัก ส่วนใหญ่พบในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยชนิดของเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะแตกต่างกันตามบริเวณที่พบ (geographical distribution) ตัวอย่างเช่น PER-1 พบในประเทศตุรกี ฝรั่งเศส และอิตาลีเท่านั้น, VEB-1 และ VEB-2 (Vietnamese extended spectrum β-lactamase) พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น, GES-1, GES-2 และ IBC-2 พบในประเทศฝรั่งเศสและกรีซเท่านั้น (Jacoby and Munoz-Price, 2005) และ BES-1, IBC-1, SFO-1 และ TLA-1 พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriaceae เท่านั้น (Matsumoto and Inoue, 1999; Silva et al., 2000; Giakkoupi et al., 2000; Bonnet et al., 2000)

ง.3.1.5 เอนไซม์ในกลุ่ม OXA (Class D และ functional group 2d)

OXA มาจากคำว่า “Oxacillinase hydrolyzing enzyme” เพราะว่าเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถทำลายยา oxacillin และ cloxacillin ได้ดีมาก นอกจากนี้ ยังสามารถทำลายยา ampicillin และ cephalothin ได้อีกด้วย เอนไซม์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วย clavulanic acid (Jacoby and Munoz-Price, 2005) และเอนไซม์กลุ่มนี้พบได้บ่อยในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon et al., 1997)

ง.3.2 กลุ่ม plasmid-mediated AmpC enzyme (Class C)

เอนไซม์กลุ่มนี้ทำลายยากลุ่ม cephamycins (เช่น cefalothin) และยากลุ่ม oxy-imino cephalosporins (เช่น ceftazidime) ได้ดี โดยเอนไซม์กลุ่มนี้ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วย clavulanic acid ผลจากการศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ เดิมพบว่า อยู่บนโครโมโซมเท่านั้น แต่ปัจจุบันพบว่า

บนพลาสมิดก็ก็พบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้ได้เช่นกัน ดังนั้น จึงเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า plasmid-mediated AmpC enzyme โดยในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น ในเชื้อ *Klebsiella* spp. และ *Salmonella* spp. พบว่า เอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อได้รับยากลุ่ม β-lactams แล้วเท่านั้น (inducible) (Jacoby and Munoz-Price, 2005)

ง.3.3 กลุ่ม Carbapenemase (Class A, B และ D)

เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถทำลายยากลุ่ม cephamycins (เช่น cefalothin), ยากลุ่ม oxy-imino cephalosporins (เช่น ceftazidime) และยากลุ่ม carbapenems (เช่น imipenem) ได้ดี เอนไซม์กลุ่มนี้มี 2 รูปแบบ ได้แก่ 1. เป็นเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นเองอยู่แล้ว (chromosomal carbapenemase) และ 2. เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นหลังจากเชื้อได้รับยากลุ่ม carbapenems แล้ว (acquired carbapenemase) ซึ่งในกรณีที่สองมีโอกาสเกิดได้น้อยกว่า (Jacoby and Munoz-Price, 2005)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-4 เอนไซม์ β-lactamase ชนิดต่างๆ ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ

β-lactamase	Examples	Substrates	Inhibition by clavulanic acid	Molecular class
Broad-spectrum	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzylpenicillin (penicillin G), aminopenicillins (amoxicillin and ampicillin), carboxypenicillins (carbenicillin and ticarcillin), narrow spectrum cephalosporins (cefazolin, cephalothin,cefamanole, cefuroxime and other)	+++	A
	OXA family	Substrate of the broad-spectrum group plus cloxacillin, methicillin and oxacillin	+	D
Extended-spectrum (ESBL)	TEM family and SHV family	Substrate of the broad-spectrum group plus oxyimino-cephalosporins (cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime and ceftriazone) and monobactams (aztreonam)	++++	A
	Others (BES-1, GES/IBC family, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1 and VEB-2)	Same as for TEM family and SHV family	++++	A
	CTX-M family	Substrates of the extended-spectrum group plus for some enzyme, cefepime	++++	A
	OXA family	Same as for CTX-M family	+	D
AmpC	AAC-1, ACT-1, CFE-1, CMY family, DHA-1, DHA-2, FOX family, MIR-1, MOX-1 and MOX-2	Substrate of the extended-spectrum group plus cephamycins (cefotetan, cefoxitin and other)	0	C
Carbapenemase	IMP family, VIM family, GIM-1 and SPM-2	Substrates of the extended-spectrum group plus cephamycins and carbapenems (imipenem and meropenem)	0*	B
	KPC-1, KPC-2 and KPC-3	Same as for IMP family, VIM family, GIM-1 and SPM-1	+++	A
	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40 and OXA-48	Same as for IMP family, VIM family, GIM-1 and SPM-1	+	D

Plus signs denote relative sensitivity to inhibition

ที่มา: Jacoby and Munoz-Price, 2005

ง.4 <u>เอนไซม์ β-lactamase ที่พบในเชื้อ *Salmonella* spp.</u> แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่

ง.4.1 เอนไซม์ที่เป็นอนุพันธุ์ของกลุ่ม TEM และ SHV

Orman และคณะ (2002) ได้พบ TEM-1 ในเชื้อกลุ่ม NTS สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ ampicillin และ Revathi และคณะ (1998) ได้พบ SHV-5 ในเชื้อ *Salmonella* Senftenberg สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในเมืองนิวเดลี ประเทศอินเดีย นอกจากนี้ Cardinale และคณะ (2001) ได้พบ SHV-12 ในเชื้อ *Salmonella* spp. ซีโรไทป์ 35:c:1,2 (ซึ่งเป็นซีโรไทป์ใหม่) สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศเซเนกัล

ง.4.2 เอนไซม์ที่เป็นอนุพันธุ์ของกลุ่ม CTX-M

Bradford และคณะ (1998) ได้พบ CTX-M-5 ในเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Extended-Spectrum Cephalosporins (ESC) ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในประเทศสลัตเวีย และนอกจากนี้ Gazouli และคณะ (1998) ได้พบ CTX-M-4 ในเชื้อ *Salmonella* Typhimurium สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศรัสเซีย

นอกจากนี้ ยังมีเอนไซม์ β-lactamase บางกลุ่มที่อาจพบได้ในเชื้อ *Salmonella* spp. อีกเช่นกัน แต่จะมีข้อจำกัดในบริเวณที่พบ (geographical distribution) ได้แก่ PER-1 และ PER-2 ซึ่งพบในเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศตุรกีและอาร์เจนตินา่ ตามลำดับ เท่านั้น (Vahaboglu et al., 1995)

จ. การแพร่กระจายของยีนดื้อยา มี 3 รูปแบบ ได้แก่

จ.1 <u>การแพร่กระจายผ่านทาง plasmid</u>

plasmid คือ DNA ที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายฤทธิ์ของยา หรือทำให้ความสามารถในการผ่านเข้าออกของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) เปลี่ยนแปลงไป การแพร่กระจายของยีนดื้อยาผ่านทางนี้ ถือว่ามีความสำคัญทางคลินิก เนื่องจากสามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด และพบว่า plasmid มักจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดร่วมกัน (Levinson and Jawetz, 2000) ตัวอย่าง เช่น จากการศึกษาของ Kariuki และคณะ (2005) พบว่า ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อต่อ ampicillin, streptomycin, co-trimoxazole และ tetracycline ของเชื้อกลุ่ม NTS สามารถถ่ายทอดผ่านทาง plasmid ที่มีขนาด 100 Kb. ได้

จ.2 <u>การแพร่กระจายผ่านทาง transposon</u>

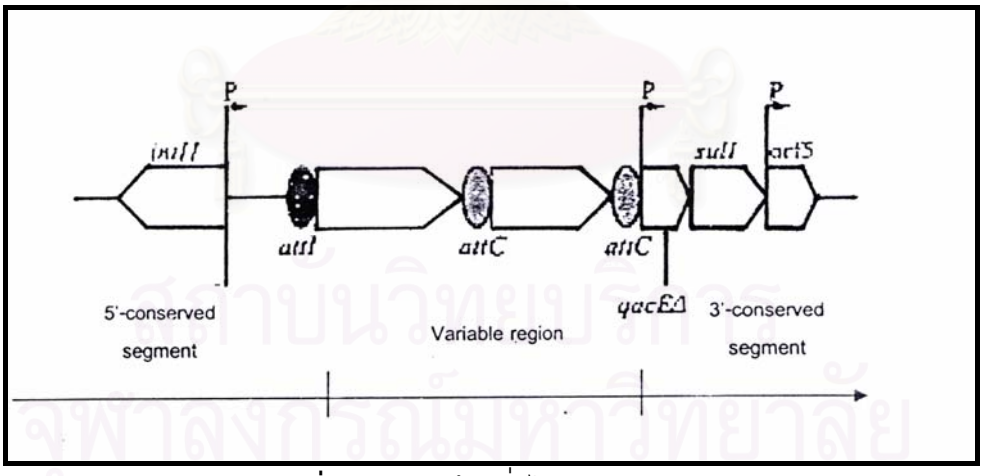
การแพร่กระจายของยีนดื้อยาผ่านทางนี้เกิดจากการที่ transposon (jumping gene) รวมเข้ากับโครโมโซมหรือ plasmid ของแบคทีเรีย (Mims et al., 2004)

จ.3 <u>การแพร่กระจายผ่านทาง</u> integron

การแพร่กระจายของยีนดื้อยาผ่านทางนี้เกิดจาก site-specific recombination system (Stokes and Hall, 1989) ซึ่งพบได้บ่อยในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriaceae (Peter et al., 2001) ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของ Orman และคณะ (2002) พบว่า ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม Extended-Spectrum Cephalosporins (ESC) ของเชื้อกลุ่ม NTS สามารถถ่ายทอดผ่านทาง integron ใน class 1 ได้

ฉ. บทบาทของ integron ต่อการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดแบบข้ามกลุ่ม

integron คือ สารพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) ซึ่งจะมีโครงสร้างทั่วไป 2 ส่วน (conserved segment) ได้แก่ **5'-conserved segment** (5'-CS) โดยส่วนนี้จะประกอบด้วยส่วนย่อย 2 ส่วน ได้แก่ ***int I*** (site specific integrase recombination site) ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ integrase และ ***att l*** (integron attachment site) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ resistane gene cassette (คือ ชุดของยีนดื้อยา) จะเข้ามาเกาะกับสาย integron และ **3'-conserved segment** (3'-CS) โดยส่วนนี้จะประกอบด้วยส่วนย่อย 3 ส่วน ได้แก่ ***qacEΔ*** ซึ่งมียีนที่ทำให้เชื้อดื้อต่อ antiseptic ในกลุ่ม quaternary ammonium compound, ***sul l*** ซึ่งมียีนทำให้เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม sulfonamides และ **orf 5** (open reading frame) ซึ่งยังไม่รู้บทบาทหน้าที่ (Fluit and Schmitz, 1999) (รูปที่ 2-7)



รูปที่ 2-7 โครงสร้างทั่วไปของ integron

เนื่องจากบน integron สามารถมียีนดื้อยาหลายชนิดอยู่ร่วมกันได้ จึงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกันได้ เช่น ยากลุ่ม β-lactams, ยากลุ่ม macrolides และยากลุ่ม sulfonamides รวมถึง antiseptic และ disinfectant ชนิดต่างๆ ด้วย

integron แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ class 1, class 2 class 3 และ class 4 โดยพิจารณาจากความแตกต่างของชนิดของเอนไซม์ intergrase ที่สาย integron สังเคราะห์ขึ้น integron ใน class 1

เป็นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะในกลุ่ม Enterobacteriaceae รวมถึง *Salmonella* spp. ด้วย และ integron ใน class 4 เป็นกลุ่มที่พบได้น้อยที่สุด เนื่องจากพบได้ในแบคทีเรียบางกลุ่ม เท่านั้น เช่น *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Xanthomonas* spp. สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. พบว่า integron ส่วนใหญ่ จะอยู่ใน class 1 และ class 2 ตามลำดับ (Fluit and Schmitz, 2004)

เอนไซม์ β-lactamase ที่อยู่บน integron มีอยู่ด้วยกันหลาย Class (ดังตารางที่ 2-5 ถึง 2-7) ตัวอย่างเช่น CTX-M-2 ซึ่งจัดอยู่ใน Class A และ OXA-1 ซึ่งจัดอยู่ใน Class D พบได้ในเชื้อ Salmonella enterica (ตารางที่ 2-5 และ 2-7)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-5 เอนไซม์ β-lactamase ใน Class A ที่อยู่บน integron ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

β-lactamase	Host species	Origin
VEB-1	*Klebsiella pneumoniae*	Vietnam
	Escherichia coli	Vietnam
	Pseudomonas aeruginosa	France
	Citrobacter freundii	Thailand
VEB-1a	*Pseudomonas aeruginosa*	Kuwait
VEB-1b	*Pseudomonas aeruginosa*	Kuwait
VEB-2	*Pseudomonas aeruginosa*	Thailand
GES-1	*Klebsiella pneumoniae*	French Guiana
	Pseudomonas aeruginosa	France
	Klebsiella pneumoniae[a]	Portugal
GES-2	*Pseudomonas aeruginosa*	South Africa
IBC-1	*Enterobacter cloacae*	Greece
IBC-2	*Pseudomonas aeruginosa*	Greece
CTX-M-2	*Salmonella enterica*	Argentina
	Proteus mirabilis	Argentina
CTX-M-9	*Escherichia coli*	Spain
PSE-1	*Vibrio cholerae*	Thailand

All genes lists were found in class 1 integron structure

[a] class 3 integron location

ที่มา: Weldhagen, 2004

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-6 เอนไซม์ β-lactamase ใน Class B ที่อยู่บน integron ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

β-lactamase	Host species	Origin
IMP-1	*Serratia marcescens*[a]	Japan
	Pseudomonas aeruginosa	Japan
IMP-2	*Acinetobacter baumannii*	Italy
IMP-3	*Shigella flexneri*	Japan
IMP-4	*Acinetobacter baumannii*	Hong Kong
	Citrobacter youngae	China
IMP-6	*Serratia marcescens*	Japan
IMP-7	*Pseudomonas aeruginosa*	Canada
IMP-8	*Klebsiella pneumoniae*	Taiwan
IMP-12	*Pseudomonas putida*	Italy
VIM-12	*Acinetobacter baumannii*	Italy
	Pseudomonas aeruginosa	Italy
	Achromobacter xylosoxydans	Italy
	Pseudomonas aeruginosa	Greece
VIM-2	*Pseudomonas aeruginosa*	France
	Pseudomonas aeruginosa	Italy
	Pseudomonas aeruginosa	Spain

All genes lists were found in class 1 integron structure

[a] class 3 integron location

ที่มา: Weldhagen, 2004

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-7 เอนไซม์ β-lactamase ใน Class D ที่อยู่บน integron ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

β-lactamase	Host species	Origin
OXA-1	*Salmonella enterica*	Italy
OXA-5	*Pseudomonas aeruginosa*	South Africa
OXA-9	*Enterobacter aerogenes*	France
OXA-10	*Pseudomonas aeruginosa*	Vietnam
OXA-11	*Pseudomonas aeruginosa*	Turkey
OXA-14	*Pseudomonas aeruginosa*	Turkey
OXA-16	*Pseudomonas aeruginosa*	Turkey
OXA-19	*Pseudomonas aeruginosa*	France
OXA-20	*Pseudomonas aeruginosa*	France
OXA-28	*Pseudomonas aeruginosa*	France
OXA-30	*Escherichia coli*	France

All genes lists were found in class 1 integron structure

ที่มา: Weldhagen, 2004

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช. การตรวจยีนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain Reaction, PCR)

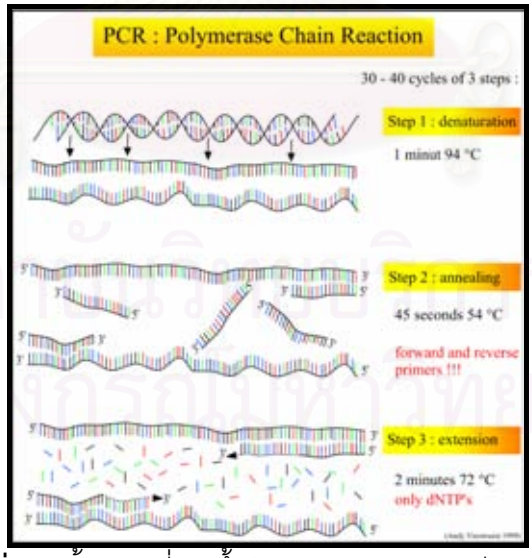
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เป็นวิธีที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยมีองค์ประกอบในการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้ 1.**Oligonucleotide primer** (primer) คือ นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์สาย DNA 2.***Taq* DNA polymerase** ซึ่งเป็นเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อนสูง (heat stable) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการต่อสาย DNA 3.**Deoxynucleotide triphosphate** (dNTP) ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ทำหน้าที่ต่อสาย DNA ให้ยาวออกไป และ 4.**Target DNA** ก็คือ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวน

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (รูปที่ 2-8) ได้แก่

1. Denature step: ขั้นตอนนี้จะทำให้ DNA สายคู่แยกออกจากกันกลายเป็น DNA สายเดี่ยว 2 สาย โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2.Annealing step: ขั้นตอนนี้จะลดอุณหภูมิลงมาจนถึง 50-55 องศาเซลเซียส (ขึ้นกับชนิดของ primer ที่ใช้) โดยในขั้นตอนนี้ primer ที่เติมลงไป จะเข้ามาจับกับสาย DNA เป้าหมายในตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (complementary) กัน ด้วยพันธะไฮโดรเจน

3. Extention step: เป็นขั้นตอนการสร้างสาย DNA สายใหม่ขึ้น โดย dNTP แต่ละชนิดที่เติมลงไปจะเข้ามาต่อจาก primer โดยมีเอนไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะอยู่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2-8 ขั้นตอนที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

เมื่อปฏิกิริยาดังกล่าวผ่านไปแล้ว 25-30 รอบ (cycle) ก็จะทำให้จำนวนของ DNA เพิ่มขึ้น (จนมีจำนวนมากกว่า 10^6 ชิ้น (copy)) ซึ่งเพียงพอที่จะนำมาวิเคราะห์ชนิดของยีนที่อยู่บน DNA นั้นๆ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

ซ. การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกัน (Antimicrobial Combination)

การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกัน มักใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) หรือมีภาวะติดเชื้อที่รุนแรงเพื่อลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย

เหตุผลของการใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกัน ได้แก่

1. เพื่อให้ยาออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อได้กว้างขึ้น
2. เพื่อลดโอกาสที่เชื้อจะเกิดการดื้อต่อยา
3. เพื่อเสริมฤทธิ์ต่อกัน
4. เพื่อลดโอกาสที่จะเกิดความเป็นพิษ (toxicity) เนื่องจากการใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันจะทำให้สามารถลดขนาดยาที่ใช้ลงได้ ตัวอย่างเช่น ยากลุ่ม sulfonamides หากใช้ในปริมาณสูง อาจจะทำให้เกิดพิษต่อไต (nephrotoxicity) ได้

สำหรับการใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันในการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS มีรายงานระบุว่า การใช้ Trimethroprim (TMP) ร่วมกับ Sulfamethoxazole (SMZ) ในอัตราส่วน 1.25: 23.75 (ไมโครกรัม) จะให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ได้ (Marks, Kazemi and Mackey, 1973)

วิธีการที่ใช้ในการประเมินฤทธิ์ร่วมของยาต้านจุลชีพในห้องปฏิบัติการ มี 2 วิธี ได้แก่

- วิธี Checkerboard วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการประเมินฤทธิ์ร่วมของยาต้านจุลชีพในหลอดทดลอง (*in vitro*) เบื้องต้น เนื่องจากขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก และการแปลผลเข้าใจง่าย โดยการแปลผลของวิธีนี้จะพิจารณาได้จาก 2 ส่วนประกอบกัน คือ 1. จากการคำนวณค่า Σ FIC (Fractional Inhibitory Concentration, FIC) และ 2. จากลักษณะของกราฟ isobologram

- วิธี Time kill assay วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการประเมินทางเภสัชพลศาสตร์ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างยาต้านจุลชีพทั้งสองชนิดที่นำมาใช้ร่วมกัน เนื่องจากวิธีนี้ทำให้ทราบจำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ โดยพิจารณาจากกราฟ time kill assay

ญ. การรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ด้วยสมุนไพร

สมอพิเภก (*Terminalia belerica* Roxb.)

Terminalia belerica Roxb. มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ที่พ้องกันอีกหลายชื่อ ได้แก่

Myrobalanus bellerica Gaertn. (Council of Scientific & Industrial Research [CSIR], 1976; Weerachai Nanakorn, 1985)

T. belerica Roxb. (Kirtikar, Basu and An, 1935; Perry and Metzger, 1980)

T. bellerica (Gaertn.) Roxb (Weerachai Nanakorn, 1985)

T. laurinoides Teijsm & Binn. (Perry and Metzger, 1980)

รูปที่ 2-9 ลักษณะใบและผลสมอพิเภก

สมอพิเภกเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE จัดเป็นไม้ต้นขนาดใหญ่ มีความสูง 25-50 เมตร ส่วนยอดแผ่กว้าง บริเวณโคนต้นมักมีรากค้ำยัน (พูพอน) ขนาดใหญ่ เปลือกหนา และมีรอยแตกเป็นร่องตามยาว **ใบ** เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงเวียนสลับกัน รูปไข่กลับ กว้าง 2-10 เซนติเมตร ยาว 4-16 เซนติเมตร ปลายใบมนกลมหรือแหลม โคนใบสอบแคบ เนื้อใบค่อนข้างหนาเป็นมัน มีเส้นใบ 6-8 คู่ ก้านใบมีความยาว 3-9 เซนติเมตร และมักมีตุ่มหูดเล็กๆอยู่กลางก้านใบหรือใกล้ๆโคนใบ **ดอก** มีสีเหลืองมีขนาดเล็กออกเป็นช่อตามง่ามใบ ช่อดอกยาว 3-15 เซนติเมตร เป็นดอกย่อยไม่มีก้านดอก ดอกเพศผู้จะอยู่ที่ปลายช่อ ส่วนดอกสมบูรณ์เพศจะอยู่ที่โคนช่อ มีกลีบรองดอกเชื่อมติดกัน มีขน ตอนล่างเป็นรูปท่อยาว 1.5-3 มิลลิเมตร ตอนบนแผ่ออกเป็นรูปถ้วยตื้นๆ กว้าง 0.4 เซนติเมตร ยาว 0.1 เซนติเมตร ส่วนปลายแยกเป็นกลีบรูปสามเหลี่ยม ไม่มีกลีบดอก เกสรตัวผู้มี 10 อัน และก้านเกสรตัวผู้ยาว 3 มิลลิเมตร รังไข่มี 1 ช่อง โดยท่อเกสรตัวเมียมีลักษณะเกลี้ยง ยาว 4 มิลลิเมตร **ผล** มีลักษณะค่อนข้างกลมหรือรูปกลมรี ออกรวมกันเป็นพวงโตๆ กว้าง 1.5-2 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร มีสันให้เห็นรางๆ 5 สัน เปลือกผลมีลักษณะแข็งและมีขนละเอียดขึ้นเล็กน้อย **เมล็ด** มีลักษณะเรียวยาวรูปวงรี กว้าง 0.5 เซนติเมตร และยาว 1.2 เซนติเมตร โดยสมอพิเภกจะออกดอกระหว่างเดือนมีนาคมถึงเมษายน และผลจะแก่จัดในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน (ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ และถนอมจิต สุภาวิตา, 2521; สายสนม กิตติขจร, 2526; ก่องกานดา ชยามกฤต, 2528; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะเภสัชศาสตร์ ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์, 2530; ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ, 2535)

เนื่องจากสมอพิเภกเป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย จึงมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น ตัวอย่างเช่น สมอแหน (ภาคกลาง); แหน, แหนขาว, แหนต้น (ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ); ลัน (เชียงราย); สะคู้ (กระเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน); ซิบะดู่ (กระเหรี่ยง-เชียงใหม่) (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2493; สายสนม กิตติขจร, 2526; พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529; ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ, 2535) นอกจากชื่อภาษาไทยแล้ว สมอพิเภกยังมีชื่อเรียกในภาษาอื่นอีกหลายภาษา ดังนี้

ภาษาอังกฤษ: Belleric Myrobalan, Bastard Myrobolan, Bedda Nuts

ภาษาฮินดู: Bahera, Behara, Behra, Bhaira, Bhairach, Bharla, Bulla, Sagona

ภาษาสันสกฤต: Vibhitaka

ภาษาศรีลังกา: Tanti

ภาษามาเลเซีย: Jilawei

(Kirtikar, Basu and An, 1935)

ตามตำรับยาแผนโบราณของประเทศไทย ได้มีการระบุสรรพคุณของสมอพิเภกไว้ ดังนี้ **ลูกสมอพิเภกอ่อน** (เกือบสุก) มีรสเปรี้ยว ใช้เป็นยาถ่าย **ลูกสมอพิเภกแก่** มีรสเปรี้ยวฝาดหวาน (ฝาดสุขุม) ใช้เป็นยาขับเสมหะ ยาละลายเสมหะ แก้ท้องเสีย ลดไข้ และรักษาโรคภูมิแพ้ แต่ถ้าหากรับประทานในปริมาณมากจะเป็นยาเสพติดและอาจทำให้หลับได้ **เมล็ด** มีรสฝาด ใช้แก้โรคบิด **ใบ** มีรสฝาด ใช้แก้อาการอักเสบ **ดอก** มีรสฝาดเย็น ใช้แก้โรคตาและอาการตาเปียกแฉะ **ราก** มีรสฝาดเย็น ใช้แก้โลหิตร้อนและโลหิตเป็นพิษ **เปลือกต้น** มีรสฝาด ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ **แก่นไม้** มีรสฝาด ใช้แก้โรคริดสีดวงพลวก (ประเสริฐ พรหมณี และคณะ; พินิจ แจ้งจิต และปัญญา บูรพาชีพ, 2513; หลวงประเสริฐวิทยาศาสตร์, 2484; เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2493; นันทวัน บุญยะประภัศร บรรณาธิการ, 2535; สมิง ศรีพลอย, 2537)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของสมอพิเภก (ตารางที่ 2-8) จะเห็นว่าผลสมอพิเภกเมื่อนำมาสกัดด้วยน้ำ หรือเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด แต่ถ้าสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhi ได้

ตารางที่ 2-8 ฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของส่วนต่างๆ ของต้นสมอพิเภก

ส่วนของพืช	วิธีการสกัด	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
ผล	EtOH 95%	Antibacterial : *Bacillus subtilis* : *Vibrio cholerae* : *Escherichia coli* : *Shigella dysenteriae* : *Salmonella* Typhi : *Staphylococus aureus*	Mokkhasmit et al., 1971 Avirutnant and Pongpon, 1983
		Antifungal : *Trichophyton* : *Candida albicans*	Mokkhasmit et al., 1971
		Antiyeast : *Saccharomyces cerevisiae*	
	EtOH: H_2O (1:1) (ED_{50} < 20.0 μg/ml)	Cytotoxic : Cell culture (CA-9KB)	Dhar et al., 1968
	MeOH: H_2O (1:1) MeOH (IC_{50} = 240 μg/ml)	Plaque formation suppressant : *Streptococcus mutans*	Namba et al., 1985
	Water	Antibacterial : *Shigella dysenteriae* : *Staphylococcus aureus*	Avirutnant and Pongpon, 1983
	Hot water (5 g/ animal)	Antihyperglycemic : Rabbit	Tripathi et al., 1979
	Hot water (0.1 mg/ml) (0.5 mg/ml) (0.5 mg/ml)	Antiviral : Cell culture (Poliovirus I) : Cell culture (Herpes simplex I) : Cell culture (Measle virus)	Kurokawa et al., 1993

ตารางที่ 2-8 (ต่อ) ฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของส่วนต่างๆ ของต้นสมอพิเภก

ส่วนของพืช	วิธีการสกัด	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
ลำต้นแห้ง	-	Antiasthmatic : Human adult	Trivedi, Nesamany and Sharma, 1985
	-	Antitussive : Human adult	
ลำต้นสด	Decoction (10 mg/ml)	Nematocidal : *Toxacara canis*	Kiuchi et al., 1989
รากแห้ง	EtOH 95 %	Antibacterial (Weak activity) : *Shigella flexneri* : *Shigella sonnei* : *Staphylococcus aureus*	Naovi, Khan and Vohora, 1991
	Water	Antibacterial : *Shigella flexneri* : *Shigella sonnei* : *Staphylococcus aureus*	

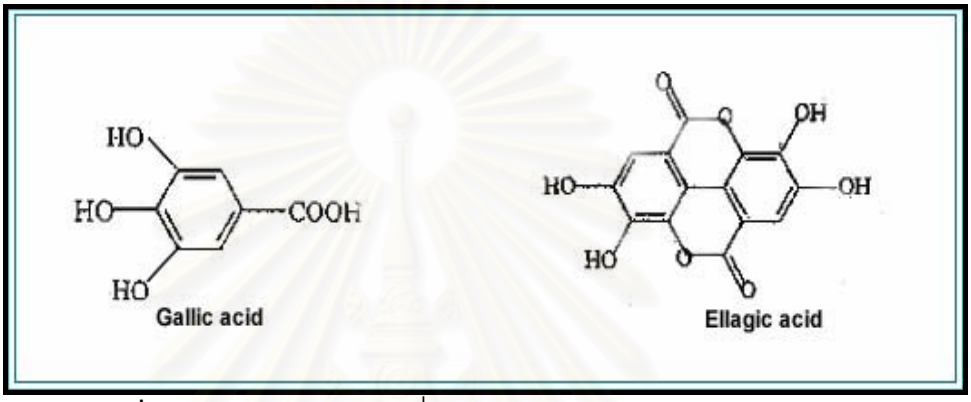
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-9 สารสำคัญ (active compound) ที่พบตามส่วนต่างๆ ของต้นสมอพิเภก

ส่วนของพืช	สารสำคัญ	เอกสารอ้างอิง
ผล	Tannin: - egallic acid - gallic acid - chebulic acid Sugar: - mannitol - glucose - galactose - fructose - rhamnose β-sitosterol	Row and Murty, 1951 Ali and Bhutani, 1991 Row, Rukmeni and Subba, 1961
เปลือกหุ้มเมล็ด	gallic acid	Row, Rukmeni and Subba, 1961
ผล, เปลือกไม้ และแก่นไม้	ellagic acid	Row, Rukmeni and Subba, 1961
เมล็ด	linoleic acid myristic acid hexadecenoic acid	Bhambhani et al., 1970
ลำต้น	oxalic acid ajungenin and arjunglucoside I belleric acid and bellericoside ajungenin belleric acid bellericagenin A, B bellericaside A, B	Bhambhani et al., 1970 Nandy et al., 1989 Mahato et al., 1992

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาสารสำคัญที่พบในส่วนต่างๆของต้นสมอพิเภก (ตารางที่ 2-9) พบว่า ในส่วนผลของสมอพิเภกจะมีสารกลุ่ม tannin, น้ำตาลชนิดต่างๆ และกรดไขมันประเภทต่างๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ และจากการศึกษากลุ่มสารสำคัญที่มีในผลสมอพิเภกที่ปลูกในประเทศไทย พบว่า เป็นสารกลุ่ม tannin ตัวอย่างเช่น chebulagic acid, ellagic acid, gallic acid และ chebulinic acid (ดังรูปที่ 2-10) (ภัสรา เงินดี และ สุนทร จิรสถาพร, 2521) นอกจากนี้ ยังพบสารกลุ่ม phenol และ β-sitosterol รวมถึง น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น fructose, rhamnose และ glucose อีกด้วย (Anand et al., 1997)



รูปที่ 2-10 กลุ่มสาร tannin ที่เป็นองค์ประกอบหลักในต้นสมอพิเภก

สาร tannin เป็นสารประเภท complex polyphenol ที่ละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ อะซิโตน และกลีเซอรอล โดยคุณสมบัติที่สำคัญของสาร tannin คือ สามารถตกตะกอนโปรตีนในสารละลายได้ดี และมีฤทธิ์ฝาดสมาน (astringent action) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางยาได้ ตัวอย่างเช่น ใช้ในการสมานบาดแผลที่ผิวหนัง และบรรเทาอาการท้องร่วง ท้องเสียได้ (พยอม ตันติวัฒน์, 2521; นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวัฒน์, 2531)

สาร tannin พบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูงทั่วไปเกือบทุกชนิด โดยพืชจะสร้างขึ้นเมื่อถูกแมลงรบกวนหรือเกิดบาดแผลขึ้น เมื่อสร้างขึ้นแล้วก็จะเก็บไว้ตามส่วนต่างๆ เช่น ราก ผล ใบ แก่นไม้ หรือเปลือกต้น

สาร tannin แบ่งตามโครงสร้างทางเคมี ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ **condense tannin** หรือ catechol tannin ซึ่งพบได้ในพืชกลุ่ม myrobalan oak และ chestnut โดยบริเวณที่พบมาก คือ ผล เปลือกต้นและแก่นไม้ สาร tannin กลุ่มนี้เมื่อทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ จะได้สารละลายสีเขียวเข้ม และ **hydrolysable tannin** หรือ pyrogallol tannin ซึ่งพบได้ในพืชกลุ่ม wattle, quebracho, sorghum, carob pod และ โกโก้ (cocoa) โดยบริเวณที่พบมาก คือ ผล ใบ ฝัก และ gall (ส่วนที่ปูดออกมาเมื่อต้นไม้ได้รับอันตราย) สาร tannin กลุ่มนี้เมื่อทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม (Frank, 1999; รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และคณะ, 2544) และมี

รายงานว่า สาร tannin ทั้งสองกลุ่มดังกล่าวนี้ มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน (Scalbert, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรีย

1.1 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เชื้อกลุ่ม Nontyphoid Salmonella (NTS) จำนวน 30 ไอโซเลท ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2548 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล

1.2 เชื้อสายพันธุ์ควบคุม

Escherichia coli ATCC 25922

2. สมุนไพรและสารเคมี

ลูกสมอพิเภกที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ซื้อจากร้านเจ้ากรมเป๋อ เลขที่ 229-231 ริมประตูวัดจักรวรรดิ์ (วัดสามปลื้ม) กรุงเทพมหานคร ซึ่งต้องได้รับการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์และลักษณะทางพฤกษศาสตร์เปรียบเทียบกับลูกสมอพิเภกในพิพิธภัณฑ์สมุนไพร โดย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัตนา อำนวยผล ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

antibiotic disc ที่ใช้สำหรับตรวจความไวรับของเชื้อ ได้แก่ ampicillin (10 ไมโครกรัม/disc), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 ไมโครกรัม/disc), tetracycline (10 ไมโครกรัม/disc) และ norfloxacin (10 ไมโครกรัม/disc) [บริษัท Sigma Chemical (U.S.A.)]

ผงยามาตรฐาน (standard powder) ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ได้แก่ ampicillin, amoxicillin, tetracycline และ norfloxacin [บริษัท Sigma Chemical (U.S.A.)]

cefinase (nitrocefin disc) สำหรับทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ β- lactamase (β- lactamase activity) [บริษัท Becton, Dickson and company]

3. การเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก

3.1 นำลูกสมอพิเภกแห้ง (6,000 กรัม) มาบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า จนเป็นผงละเอียด (5,435 กรัม)

3.2 นำผงละเอียดของลูกสมอพิเภก แช่ลงในแอลกอฮอล์ (เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 14,356 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 7 วัน โดยเขย่าด้วยมือเป็นระยะ

(อัตราส่วนของลูกสมอพิเภก : เอทานอล เท่ากับ 265 กรัม: 700 มิลลิลิตร)

3.3 เมื่อครบ 7 วันแล้ว ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman no.1) เพื่อแยกส่วนกากและส่วนน้ำที่สกัดได้ออกจากกัน จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยภายใต้ความดันต่ำ (rotatory evaporator) แล้วจะได้สารสกัดหยาบ (445.73 กรัม) ที่สามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต้านจุลชีพ) ต่อไปได้

4. การตรวจหาสารพฤกษเคมีในสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก

วิธีการที่ใช้ในการตรวจสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในครั้งนี้ อ้างอิงตามวิธีการของ Brian and Turner ปี ค.ศ. 1975

4.1 การตรวจหาสาร tannin

4.1.1 ใช้สารละลายเจลาติน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารทดสอบ

4.1.1.1 ละลายสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกด้วยน้ำกลั่น แล้วแบ่งเป็น 2 หลอด คือ หลอดควบคุมและหลอดทดสอบ

4.1.1.2 หลอดทดสอบ: นำมาเติมสารละลายเจลาติน 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 2-3 หยด แล้วสังเกตความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทันที โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

4.1.1.3 การอ่านผล: ถ้าเกิดตะกอนขาวขุ่นขึ้นทันที แสดงว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก มีสาร tannin เป็นองค์ประกอบ

4.1.2 ใช้ $FeCl_3$ เป็นสารทดสอบ

4.1.2.1 ละลายสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกด้วยน้ำกลั่น แล้วแบ่งเป็น 2 หลอด คือ หลอดควบคุมและหลอดทดสอบ

4.1.2.2 หลอดทดสอบ: นำมาเติม $FeCl_3$ ลงไป 2-3 หยด แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

4.1.2.3 การอ่านผล: ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียวเข้มขึ้นทันที แสดงว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก มีสาร tannin เป็นองค์ประกอบ

4.2 การตรวจหาสาร alkaloid

4.2.1 ละลายสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วแบ่งออกเป็น 2 หลอด คือหลอดควบคุมและหลอดทดสอบ

4.2.2 หลอดทดสอบ: นำมาเติม Dragendorff's reagent ลงไป แล้วสังเกตความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

4.2.3 การอ่านผล: ถ้าเกิดตะกอนสีส้มขึ้น แสดงว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก มีสาร alkaloid เป็นองค์ประกอบ

4.3 การตรวจหาสาร flavonoid (Shinoda's test หรือ Cyanidin reduction test)

4.3.1 เติมกรดเกลือเข้มข้น (conc. HCl) ลงในสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ประมาณ 1-2 หยด แล้วแบ่งออกเป็น 2 หลอด คือ หลอดควบคุมและหลอดทดสอบ

4.3.2 หลอดทดสอบ: นำมาเติมชิ้น Mg^{2+} ribbon ลงไป 2-3 ชิ้น แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

4.3.3 การอ่านผล: ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู-สีแดง แสดงว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก มีสาร flavonoid เป็นองค์ประกอบ

5.การตรวจความไวรับของเชื้อต่อสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพ

การตรวจความไวรับของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท ใช้วิธี disk diffusion ตามที่กำหนดโดย The National Committee for Clinical Laboratory Standard 2000 (NCCLS, 2000) ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, norfloxacin และ tetracycline

5.1 การเตรียมอาหารทดสอบ

5.1.1 เตรียมอาหารเพาะเชื้อ Muller-Hinton Agar (MHA) ใส่ลงในฟลาสต์

5.1.2 นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำฟลาสต์บรรจุอาหารแช่ลงในเครื่องอังน้ำเดือด (water bath) เพื่อลดอุณหภูมิของอาหารลงจนเหลือประมาณ 45-55 องศาเซลเซียส

5.1.3 ปิเปตอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมในข้อ 5.1.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร

5.1.4 รอให้อาหารแข็งตัว

5.2 การเตรียมแผ่นทดสอบ

5.2.1 เตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วหยดลงบนกระดาษกรองมาตรฐาน (paper disk) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Whatman: Antibiotic assay cat no. 2017006) ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผ่น โดยคิดเป็นปริมาณสารสกัด 0.1 มิลลิกรัม/แผ่น

5.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

5.3.1 นำเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลท ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพาะลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) แล้วนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท เพาะลงบนอาหาร TSA อีกครั้งแล้วนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท ใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard solution (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2 x 10^8 CFU (colony forming unit)/มิลลิลิตร)

5.4 การทดสอบ

5.4.1 นำสำลีพันปลายไม้ (cotton swab) ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อแต่ละไอโซเลทที่ปรับความขุ่นแล้ว โดยหมุนปลายไม้ไป-มาหลายๆครั้ง เพื่อให้สำลีชุ่มทั่วถึงกัน แล้วกดปลายสำลีกับข้างหลอด เพื่อไม่ให้สำลีชุ่มเกินไป จากนั้นนำสำลีพันปลายไม้ดังกล่าวถูลงบนผิวหน้าอาหาร MHA ที่เตรียมไว้จนทั่ว โดยต้องถู 3 ทิศทางเอียงทำมุม 60 องศากัน ในแต่ละทิศทาง เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอ

5.4.2 ใช้ปากคีบ (forcep) ที่ปราศจากเชื้อ คีบแผ่นทดสอบ (antibiotic disc หรือกระดาษกรองชุบสารสกัด) วางลงบนหน้าอาหารทีละแผ่น แล้วกดเบาๆ เพื่อให้แน่ใจว่าแผ่นทดสอบที่วางลงไปสัมผัสกับหน้าอาหารแล้ว โดยแต่ละแผ่นต้องวางห่างกัน 22 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 14 มิลลิเมตร เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการทับซ้อนกันของโซนใส (inhibition zone) รอบแผ่นทดสอบแต่ละแผ่น

5.4.3 นำจานเพาะเชื้อเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.5 การอ่านผลและการแปลผล

5.5.1 การอ่านผล: วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นทดสอบแต่ละแผ่น ด้วยเวอร์เนีย (venier) โดยวัดทางด้านหลังของจานเพาะเชื้อ

5.5.2 การแปลผล: การเกิด inhibition zone รอบ disc ชุบสารสกัด แสดงว่า สารสกัดมี active compound ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม NTS ได้ และการเกิด inhibition zone รอบ antibiotic disc แสดงว่า ยาต้านจุลชีพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มดังกล่าวได้ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบ antibiotic disc กับค่ามาตรฐานที่กำหนดโดย NCCLS ปี ค.ศ. 2000 จะทำให้แบ่งเชื้อกลุ่ม NTS ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ 1.กลุ่มที่ไวต่อยา (susceptible) 2. กลุ่มที่ไวต่อยาระดับปานกลาง (intermediate) 3. กลุ่มที่ดื้อต่อยา (resistant) ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 การแปลผลของขนาด Inhibition zone ของเชื้อกลุ่ม NTS และเชื้อสายพันธุ์ควบคุม

ชนิดของยา	ขนาดยา/disc (ไมโครกรัม)	ขนาด inhibition zone (มม.)			
		เชื้อกลุ่ม NTS			*E. coli*
		R[a]	I[b]	S[c]	ATCC 25922
ampicillin	10	≤ 11	12-13	≥ 14	16-22
amoxicillin/ clavulanic acid	20/10	≤ 13	14-20	≥ 21	19-25
norfloxacin	10	≤ 12	13-16	≥ 17	ND
tetracycline	10	≤ 14	15-18	≥ 19	18-25

[a] Resistant, [b] Intermediate, [c] Susceptible, ND = not determined

6. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหรือยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์ควบคุม *E.coli* ATCC 25922 ใช้วิธี agar dilution ตามที่กำหนดโดย NCCLS ปี ค.ศ. 2000 โดยยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ampicillin, amoxicillin, norfloxacin และ tetracycline

6.1 การเตรียมอาหารทดสอบ

6.1.1 เตรียมอาหารเพาะเชื้อ MHA ใส่ลงในฟลาสต์ ปริมาตรฟลาสต์ละ 54 มิลลิลิตร

6.1.2 นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำฟลาสต์บรรจุอาหารแช่ลงในเครื่องอังน้ำเดือด (water bath) เพื่อลดอุณหภูมิของอาหารลงจนเหลือประมาณ 45-55 องศาเซลเซียส

6.2 การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพ

6.2.1 ความเข้มข้นของสารสกัด (stock solution) ให้มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ที่ต้องการ 10 เท่า (เตรียมแบบ two-fold dilution) โดยความเข้มข้นของ stock solution ของสารสกัด มีค่าระหว่าง 3-400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นของ stock solution ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด มีค่าระหว่าง 0.3-2,560 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6.2.2 ปิเปตสารสกัดหรือยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่เตรียมในข้อ 6.2.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในฟลาสต์บรรจุอาหารที่เตรียมไว้ (ความเข้มข้นละ 1 ฟลาสต์)

แล้วหมุนฟลาสต์ไป-มา เพื่อให้อาหารและสารสกัดหรือยาต้านจุลชีพที่ผสมลงไปเข้ากันอย่างดี

6.2.3 ปิเปตอาหารที่ผสมสารสกัดหรือยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ก็จะได้อาหารเพาะเชื้อ MHA ที่มีสารสกัดความเข้มข้น 0.31-40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้น 0.03-256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6.2.4 รอให้อาหารแข็งตัวและผิวหน้าอาหารแห้ง

6.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

6.3.1 นำเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลท ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพาะลงบนอาหาร TSA แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.3.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท เพาะลงบนอาหาร TSA อีกครั้งแล้วนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.3.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท ใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard solution (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร)

6.4 การทดสอบ

6.4.1 ใช้เครื่องมือ steer replicator โดยปิเปตเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของเครื่องมือดังกล่าว หลุมละ 1 ไอโซเลท (โดย steer replicator มีจำนวนหลุมทั้งหมด 32 หลุม)

6.4.2 เพาะเชื้อลงผิวบนหน้าอาหารที่แห้งแล้ว เริ่มต้นจากจานควบคุม (มีเฉพาะอาหาร MHA อย่างเดียว) จากนั้นตามด้วยอาหารที่ผสมสารสกัดหรือยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดก่อน แล้วไล่ไปยังความเข้มข้นสูงกว่าตามลำดับ

6.4.3 วางจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเชื้อที่เพาะลงไปซึมลงในอาหารจนหมด แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.5 การอ่านผลและการแปลผล

6.5.1 การอ่านผล: ความเข้มข้นแรกของสารสกัดหรือยาต้านจุลชีพที่ไม่มีเชื้อเจริญขึ้น เรียกว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหรือยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

6.5.2 การแปลผล: เปรียบเทียบค่า MIC ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดกับค่ามาตรฐานที่กำหนดโดย NCCLS ปี ค.ศ. 2000 จะทำให้แบ่งเชื้อกลุ่ม NTS ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้ 1.กลุ่มที่ไวต่อยา (susceptible) 2. กลุ่มที่ไวต่อยาระดับปานกลาง (intermediate) 3. กลุ่มที่ดื้อต่อยา (resistant) ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 การแปลผลค่า MIC ของเชื้อกลุ่ม NTS และเชื้อสายพันธุ์ควบคุม

ชนิดของยา	ค่า MIC (มคก/มล.)			
	เชื้อกลุ่ม NTS			*E. coli*
	S[a]	I[b]	R[c]	ATCC 25922
ampicillin	≤ 8	16	≥ 32	2-8
amoxicillin	≤ 8	16	≥ 32	2-8
norfloxacin	≤ 4	8	≥ 16	0.03-0.125
tetracycline	≤ 4	8	≥ 16	1-4

[a] Susceptible, [b] Intermediate, [c] Resistant

7. การตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase ที่เชื้อสร้างขึ้น (β-lactamase activity)

การตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี nitrocefin-based test (cefinase)

7.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

7.1.1 นำเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลท ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพาะลงบนอาหาร TSA แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท เพาะลงบนอาหาร TSA อีกครั้งแล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.2 การทดสอบ

7.2.1 วางแผ่น nitrocefin ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ โดยแต่ละแผ่นต้องเว้นระยะห่างจากกันพอสมควร

7.2.2 ดูดน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น nitrocefin แต่ละแผ่น เพื่อให้เกิดความชื้น

7.2.3 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) แตะโคโลนีเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ป้ายลงบนแผ่น nitrocefin แต่ละแผ่น

7.3 การอ่านผลและการแปลผล

7.3.1 การอ่านผล: สังเกตสีที่เกิดขึ้นบนแผ่น nitrocefin แต่ละแผ่น ภายในเวลา 3-5 นาที หลังจากป้ายโคโลนีเชื้อลงไปแล้ว

7.3.2 การแปลผล

7.3.2.1 ถ้าแผ่น nitrocefin เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง หมายความว่า ผลการทดสอบเป็นบวก แสดงว่า เชื้อสร้างเอนไซม์ β-lactamase

7.3.2.2 ถ้าแผ่น nitrocefin ไม่เปลี่ยนสี (ยังคงมีสีเหลืองเหมือนเดิม) หมายความว่า ผลการทดสอบเป็นลบ แสดงว่า เชื้อไม่สร้างเอนไซม์ β-lactamase

8. การตรวจหายีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams และยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยา

วิธีเพิ่มจำนวนของยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยากลุ่ม β-lactams ซึ่งได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M} และยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยา ได้แก่ *integrase gene* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Sambrook and Russel, 2001) โดยจะทำการศึกษากับเฉพาะเชื้อที่ตรวจพบ β-lactamase activity เท่านั้น

8.1 การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการสกัด DNA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อ้างอิงตามที่ระบุใน QIAamp DNA mini kit Handbook ปี ค.ศ. 1999 ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

8.1.1 นำเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลท ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพาะลงบนอาหาร TSA แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

8.1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท เพาะลงบนอาหาร TSA อีกครั้ง แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

8.1.3 ปิเปต Buffer ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge

8.1.4 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) แตะโคโลนีเชื้อ 4-5 โคโลนี ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วกวนผสมให้เข้ากัน

8.1.5 ปิเปต Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วกวนผสมให้เข้ากัน

8.1.6 นำหลอด microcentrifuge ลงบ่มในเครื่องอังน้ำเดือด (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

8.1.7 เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้ว นำหลอด microcentrifuge เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 rpm (round per minute) เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อไล่หยดน้ำบนฝาหลอดออกไป

8.1.8 ปิเปต Buffer AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้ว vortex เป็นเวลา 15 วินาที

8.1.9 นำหลอด microcentrifuge ลงบ่มในเครื่องอังน้ำเดือด (water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

8.1.10 เมื่อครบ 10 นาทีแล้ว นำหลอด microcentrifuge เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อไล่หยดน้ำบนฝาหลอดออกไป

8.1.11 ปิเปตเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (absolute alcohol) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้ว vortex เป็นเวลา 15 วินาที

8.1.12 นำหลอด microcentrifuge เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อไล่หยดน้ำบนฝาหลอดออกไป

8.1.13 ปิเปตของเหลวที่มีทั้งหมดในหลอด microcentrifuge อันเดิม ใส่ลงใน QIAamp spin column ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด collection แล้วปิดฝาหลอดให้สนิท

8.1.14 นำหลอด collection เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

8.1.15 ย้าย QIAamp spin column ใส่ในหลอด collection อันใหม่ แล้วทิ้งหลอด collection อันเก่าและของเหลวที่กรองได้ไป

8.1.16 ปิเปต Buffer AW 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column แล้วปิดฝาให้สนิท

8.1.17 นำหลอด collection เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

8.1.18 ย้าย QIAamp spin column ใส่ลงในหลอด collection อันใหม่ แล้วทิ้งหลอด collection อันเก่าและของเหลวที่กรองได้ไป

8.1.19 ปิเปต Buffer AW 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column แล้วปิดฝาให้สนิท

8.1.20 นำหลอด collection เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วสูงสุด (14,000 rpm) เป็นเวลา 3 นาที

8.1.21 ย้าย QIAamp spin column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge อันใหม่ แล้วทิ้งหลอด collection อันเก่าและของเหลวที่กรองได้ไป

8.1.22 ปิเปต Buffer AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column แล้วปิดฝาให้สนิท วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

8.1.23 นำหลอด microcentrifuge เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

8.1.24 ย้าย QIAamp spin column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge อันใหม่ แล้วนำหลอด microcentrifuge อันเดิม (ที่มีของเหลว) เก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

8.1.25 ปิเปต Buffer AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column อีกครั้ง แล้วปิดฝาให้สนิท วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

8.1.26 นำหลอด microcentrifuge เข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

8.1.27 ทิ้ง QIAamp spin column แล้วนำหลอด microcentrifuge เก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

8.2 การเพิ่มจำนวนของยีนบน DNA เป้าหมาย โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

8.2.1 ปริมาตรรวมทั้งหมด เท่ากับ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	38	ไมโครลิตร
dNTP (200 nM)	5	ไมโครลิตร
Buffer (10x)	5	ไมโครลิตร
Primer A (0.2-1 μM)	0.5	ไมโครลิตร
Primer B (0.2-1 μM)	0.5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (10 $\overline{U}$)	0.5	ไมโครลิตร
DNA template (50 ng)	0.5	ไมโครลิตร

8.2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา (thermal profile) มี 4 ขั้นตอน ดังนี้

Denaturing step	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
Annealing step	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
DNA extension step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
Final extension step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จำนวนรอบทั้งหมด เท่ากับ 30 รอบ (cycle)

ตารางที่ 3-3 ลำดับเบสของ primer ของยีนที่ต้องการศึกษา

ชื่อของยีน	ชื่อ primer	ลำดับเบส	ขนาด (base pair, bp)	เอกสารอ้างอิง
bla$_{TEM}$	TEM F TEM R	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3' 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA -3'	863	Rasheed et al., 1997
bla$_{SHV}$	SHV-F SHV-R	5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTGG-3'	867	Rasheed et al., 1997
bla$_{CTX-M}$	MA-1 MA-2	5'-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-3' 5'-CCGCRATATGRTTGGTGGTG-3'	554	Eckert et al., 2004
integrase	INT1F INT1R	5'-AAGGATCGGGCCTTGATGTT-3' 5'-CAGCGATCAAGCGGTGAGC-3'	471	Tribuddharat, C., 1999

8.3 การวิเคราะห์ชนิดของยีนบน DNA เป้าหมายที่เพิ่มจำนวนได้ (PCR product) โดยวิธี agarose gel electrophoresis

8.3.1 เตรียมแผ่นเจล 2 เปอร์เซ็นต์: ชั่ง agarose 0.8 กรัม เติมสารละลาย 0.5x TBE (Tris Borate Ethylenediaminetetraacetic acid) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำเข้าไมโครเวฟ เพื่อให้เจลละลาย

8.3.2 รอให้เจลที่ละลายแล้ว ลดอุณหภูมิลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในแบบพิมพ์ (casting tray) ที่มีหวี (sample comb) เสียบอยู่ เพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง (sample well) แล้วรอให้เจลแข็งตัว

8.3.3 เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ดึงหวีที่เสียบอยู่ออก

8.3.4 วางแผ่นเจลลงใน electrophoresis chamber ซึ่งบรรจุสารละลาย 0.5x TBE

8.3.5 การเตรียมตัวอย่าง: ผสม loading dye (bromphenol Blue) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร กับ PCR product หรือ marker DNA ปริมาตร 7 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุมสำหรับหยอดตัวอย่างแต่ละหลุม

8.3.6 ผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8.3.7 ย้อมสีแผ่นเจล (staining) ด้วย ethidium bromide (EtBr) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างสีส่วนเกิน (destaining) ด้วยน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) เป็นเวลา 15 นาที

8.3.8 การอ่านผล: ส่องแผ่นเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) เพื่อดูตำแหน่งและขนาดของยีนบน DNA เป้าหมายที่เพิ่มจำนวนได้ แล้วเปรียบเทียบกับขนาดของ marker DNA

9. การประเมินฤทธิ์ร่วม (combination activity) ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด

การประเมินฤทธิ์ร่วมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี checkerboard (Eliopoulos and Moellering, 1996) ซึ่งจะทำให้ทราบอัตราส่วนของการใช้สารสกัดร่วมกับยาต้านจุลชีพที่เสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) โดยยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ampicillin และ tetracycline ในการประเมินฤทธิ์ร่วมของสารสกัดกับ ampicillin จะทำการศึกษากับเชื้อกลุ่ม NTS ทุกไอโซเลท แต่การประเมินฤทธิ์ร่วมของสารสกัดกับ tetracycline จะทำการศึกษากับเฉพาะเชื้อกลุ่ม NTS ไอโซเลทที่ดื้อต่อยานี้แล้วเท่านั้น

9.1 การเตรียมอาหารทดสอบ

9.1.1 เตรียมอาหารเพาะเชื้อ Muller-Hinton broth (MHB)

9.1.2 นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9.1.3 รอจนกระทั่งอุณหภูมิของอาหารลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง

9.1.4 ปิเปตอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมในข้อ 9.1.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate (96-well plate) แต่ละหลุม

9.2 การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพ

9.2.1 ความเข้มข้นของสารสกัดและยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด มีค่าระหว่าง 1/32 MIC -4 MIC (เตรียมแบบ two-fold dilution) ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดมีค่าระหว่าง 1.25-160 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, ampicillin มีค่าระหว่าง 8-1,024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ tetracycline มีค่าระหว่าง 2-1,024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

9.2.2 ปิเปตสารสกัดที่เตรียมจากในข้อ 9.2.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate แต่ละหลุมในแนวนอน (row) เริ่มต้นจากความเข้มข้นต่ำที่สุด

9.2.3 ปิเปตยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่เตรียมจากในข้อ 9.2.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate แต่ละหลุมในแนวตั้ง (column) เริ่มต้นจากความเข้มข้นต่ำที่สุด

9.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

9.3.1 นำเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลท ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพาะลงบนอาหาร TSA แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

9.3.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท เพาะลงบนอาหาร TSA อีกครั้งแล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

9.3.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท ใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard solution (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร)

9.3.4 เจือจางเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่ปรับความขุ่นแล้วลง 10 เท่า ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2 x 10^7 CFU/มิลลิลิตร)

9.3.5 เจือจางเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่เจือจางแล้วลงอีก 10 เท่า ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2 x 10^6 CFU/มิลลิลิตร)

9.4 การทดสอบ

9.4.1 ปิเปตเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate ทุกหลุม

9.4.2 โดยปริมาตรรวมของทุกหลุมจะต้องเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ดังนั้น หลุมควบคุม (มีเฉพาะอาหารทดสอบอย่างเดียว) จึงต้องเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไป และในหลุมที่เป็นสารสกัดเดี่ยวๆ หรือยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ จึงต้องเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป

9.4.3 นำ microtiter plate เข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

9.5 การอ่านผลและการแปลผล

9.5.1 การอ่านผล: ความเข้มข้นแรกของหลุมร่วมที่ไม่มีเชื้อเจริญขึ้น เรียกว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของการใช้สารสกัดร่วมกับยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC ในหลุมร่วม) และความเข้มข้นแรกของหลุมสารสกัดเดี่ยวๆ หรือยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ที่ไม่มีเชื้อเจริญขึ้น เรียกว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเดี่ยวๆ หรือยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC ของสารสกัดเดี่ยวๆ หรือยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ (ampicillin หรือ tetracycline))

9.5.2 นำค่า MIC ที่อ่านได้มาคำนวณค่า Σ FIC จากสมการต่อไปนี้

Σ FIC = $FIC_{\text{สารสกัด}} + FIC_{\text{ยาต้านจุลชีพ}}$

เมื่อกำหนดให้

$FIC_{\text{สารสกัด}}$ = MIC ของสารสกัดในหลุมร่วม / MIC ของสารสกัดเดี่ยวๆ

$FIC_{\text{ยาต้านจุลชีพ}}$= MIC ของยาต้านจุลชีพในหลุมร่วม / MIC ของยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ

9.5.3 การแปลผล: นำค่า FIC ที่คำนวณได้แต่ละค่ามาพลอตกราฟ isobologram ระหว่างค่า $FIC_{\text{สารสกัด}}$ กับ ค่า $FIC_{\text{ยาต้านจุลชีพ}}$ และคำนวณค่า Σ FIC ซึ่งจะแปลผล ได้ดังนี้

9.5.3.1 เสริมฤทธิ์กัน (synergy) เมื่อค่า Σ FIC ≤ 0.5

9.5.3.2 เสริมฤทธิ์บางส่วน (partial synergy) เมื่อค่า $0.5 < \Sigma$ FIC > 1

9.5.3.3 เพิ่มฤทธิ์ (additive) เมื่อค่า Σ FIC = 1

9.5.3.4 ไม่มีผลต่อกัน (indifference) เมื่อค่า $1 < \Sigma$ FIC > 4

9.5.3.5 ต้านฤทธิ์กัน (antagonistic) เมื่อค่า Σ FIC ≥ 4

(Carlos et al., 2005)

10. การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ (antibacterial activity) ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆหรือใช้ร่วมกับ ampicillin

การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี time kill assay (Eliopoulos and Moellering, 1996) ซึ่งจะทำให้สามารถประเมินฤทธิ์ทางจลนศาสตร์ (kinetic parameter) ของการใช้สารสกัดเดี่ยวๆ หรือการใช้สารสกัดร่วมกับ ampicillin ได้ (อัตราส่วนของสารสกัด: ampicillin เท่ากับ 1/2 MIC : 1/2 MIC) โดยจะทำการศึกษากับเฉพาะเชื้อกลุ่ม NTS ไอโซเลทที่ดื้อต่อ ampicillin และให้ผลเพิ่มฤทธิ์กัน (additive) เมื่อศึกษาด้วยวิธี checkerboard เท่านั้น

10.1 การเตรียมอาหารทดสอบ

10.1.1 เตรียมอาหารเพาะเชื้อ MHB

10.1.2 นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10.1.3 ปิเปตอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมในข้อ 10.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม (control)

10.2 การเตรียมความเข้มข้นสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพ

10.2.1 ความเข้มข้นที่ต้องเตรียมต้องสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ 4 เท่า โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด เท่ากับ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ ampicillin เท่ากับ 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

10.2.2 ปิเปตสารสกัดและ ampicillin ที่เตรียมในข้อ 10.2.2 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองเดียวกัน (ปริมาตรรวม เท่ากับ 5 มิลลิลิตร) เพื่อเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับ ampicillin

10.2.3 เจือจางความเข้มข้นของสารสกัดที่เตรียมไว้ลง 2 เท่า (1:1) แล้วปิเปตออกมา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เพื่อเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ

10.2.4 เจือจางความเข้มข้น ampicillin ที่เตรียมไว้ลง 2 เท่า (1:1) แล้วปิเปตออกมา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองเพื่อเป็นกลุ่มที่ได้รับ ampicillin เดี่ยวๆ

10.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

10.3.1 นำเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลท ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพาะลงบนอาหาร TSA แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

10.3.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท เพาะลงบนอาหาร TSA อีกครั้งแล้วนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

10.3.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท ใส่ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard solution (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร)

10.3.4 เจือจางเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่ปรับความขุ่นแล้วลง 10 เท่า ด้วยอาหาร MHB ที่ปราศจากเชื้อ (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2 x 10^7 CFU/มิลลิลิตร)

10.4 การทดสอบ

10.4.1 ปิเปตเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองทุกหลอด (รวมทั้งสิ้น 4 หลอด)

10.4.2 นำหลอดทดลองทั้งหมดลงบ่มในเครื่องอังน้ำเดือด (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

10.4.3 เก็บตัวอย่างเชื้อจากแต่ละหลอด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วแช่หลอดเก็บตัวอย่างในน้ำแข็งทันที

10.4.4 เจือจางตัวอย่างที่เก็บมาลง 10 เท่า ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ

10.4.5 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนหน้าอาหาร TSA

10.4.6 วางจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนกระทั่งตัวอย่างซึมลงในอาหารจนแห้ง แล้วนำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10.5 การอ่านผลและการแปลผล

10.5.1 การอ่านผล: นับโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้น แล้วคำนวณค่า viable cell count

viable cell count = จำนวนโคโลนี x 50 x dilution factor

แล้วนำค่าที่คำนวณได้มา take log และพลอตกราฟ time kill ระหว่างค่า Log viable cell count (CFU/มิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)

10.5.2 การแปลผล: จากกราฟ time kill สามารถประเมินรูปแบบการออกฤทธิ์ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ได้ดังนี้

10.5.2.1 ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal activity) เมื่อจำนวนเชื้อในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ และสารสกัดร่วมกับ ampicillin ลดลง $\geq$ 3 log CFU/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้นของแต่ละกลุ่ม ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

10.5.2.2 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic activity) เมื่อจำนวนเชื้อในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ และสารสกัดร่วมกับ ampicillin ลดลง $<$ 3 log CFU/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้นของแต่ละกลุ่ม ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

10.5.2.3 ออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญได้ช่วงเวลาหนึ่ง แล้วกลับมีการเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) เมื่อจำนวนเชื้อในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ และสารสกัดร่วมกับ ampicillin เพิ่มขึ้น $\geq$ 2 log CFU/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้นของแต่ละกลุ่ม หลังจากเวลาผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง

(Amsterdam, 1996; Pankuch, Jacobs and Appelbaum, 1994; Satta et al., 1995)

10.5.3 การวิเคราะห์ผล: จากกราฟ time killสามารถพิจารณาจำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปหลังได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ และสารสกัดร่วมกับ ampicillin เมื่อเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้นของแต่ละกลุ่ม โดยค่าที่ได้จะออกมาในหน่วย Log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งผลการวิเคราะห์จะออกมาได้ 3 รูปแบบ ดังนี้

10.5.3.1 ถ้าจำนวนเชื้อลดลงไป เท่ากับ –1 Log CFU/มิลลิลิตร หมายความว่า มีเชื้อ 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ถูกฆ่าลงได้ (90% killing) แปลว่า สารทดสอบนั้นๆ ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic activity)

10.5.3.2 ถ้าจำนวนเชื้อลดลงไป เท่ากับ –2 Log CFU/มิลลิลิตร หมายความว่า มีเชื้อ 99 เปอร์เซ็นต์ ที่ถูกฆ่าลงได้ (99% killing) แปลว่า สารทดสอบนั้นๆ ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic activity)

10.5.3.3 ถ้าจำนวนเชื้อลดลงไป เท่ากับ –3 Log CFU/มิลลิลิตร หมายความว่า มีเชื้อ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ถูกฆ่าลงได้ (99.9% killing) แปลว่า สารทดสอบนั้นๆ ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal activity)

10.5.4 การประเมินค่าในเชิงปริมาณ (The quantitative Evaluation of Antimicrobial Effects) จากกราฟ time kill มีดังนี้ (Firsov et al., 1997)

10.5.4.1 ค่า Δ log CFU 2, 4, 6, 8, 24 hours = ความแตกต่างของจำนวนเชื้อในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ หรือสารสกัดร่วมกับ ampicillin เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้นในแต่ละกลุ่ม เมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

10.5.4.2 ค่า AUBKC $_{0\text{-}24}$ = พื้นที่ใต้กราฟของการฆ่าเชื้อ (Area Under the Bacterial Killing Curve) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ หรือสารสกัดร่วมกับ ampicillin ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้จากกฎสี่เหลี่ยมคางหมู (trapezoidal rule)

10.5.4.3 ค่า Bacteriolytic Area (BA_{24}) = จำนวนเชื้อที่ถูกฆ่าภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้จากความแตกต่างของพื้นที่ใต้กราฟของการฆ่าเชื้อระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ หรือสารสกัดร่วมกับ ampicillin ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

11. การคำนวณค่าทางสถิติ

ความแตกต่างของค่า Log viable cell count, ค่า $AUBKC_{0-24}$ และค่า BA_{24} จะคำนวณออกมาเป็นค่า mean $\pm$ S.D. แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละค่า โดยตาราง Analysis of variance (ANOVA) P-value เท่ากับ 0.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1.ผลการตรวจสารพฤกษเคมีและผลการตรวจความไวรับของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก

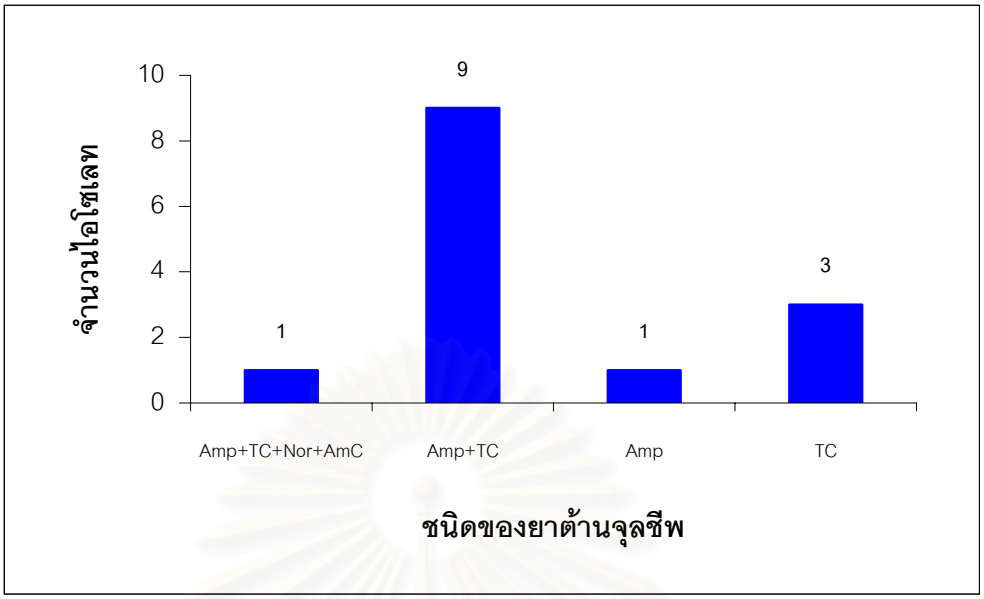
จากการตรวจสารพฤกษเคมีในสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก พบว่า มีสาร tannin เป็นองค์ประกอบหลัก และเมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทำการทดสอบความไวรับต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี disk diffusion ตามที่กำหนดโดย NCCLS ปี ค.ศ. 2000 พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกไอโซเลท (100%) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ระหว่าง 6.50-9.98 มิลลิเมตร (รายละเอียดของขนาด inhibition zone แสดงในตาราง ภ.9 ในภาคผนวก)

2. ผลการทดสอบความไวรับของยาต้านจุลชีพ

จากการทดสอบความไวรับของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท ต่อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ ampcillin, amoxicillin/clavulanic acid, norfloxacin และ tetracycline โดยวิธี disk diffusion ตามที่กำหนดโดย NCCLS ปี ค.ศ. 2000 พบว่า มีเชื้อ 20 ไอโซเลท (66.67%) ที่ไวต่อ ampicillin เชื้อ 29 ไอโซเลท (96.67%) ที่ไวต่อทั้ง amoxicillin/clavulanic acid และ norfloxacin และเชื้อ 17 ไอโซเลท (56.67%) ที่ไวต่อ tetracycline ดังตารางที่ 4-1 (รายละเอียดของขนาด inhibition zone แสดงในตาราง ภ.10 ในภาคผนวก)

ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจความไวรับของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี disk diffusion

ชนิดของยา	จำนวนไอโซเลท (%)		
	ดื้อต่อยา	ไวต่อยาในระดับปานกลาง	ไวต่อยา
ampicillin	10 (33.33)	0	20 (66.67)
amoxicillin/clavulanic acid	1 (3.33)	0	29 (96.67)
norfloxacin	1 (3.33)	0	29 (96.67)
tetracycline	12 (40)	1 (3.33)	17 (56.67)



รูปที่ 4-1 การกระจายของจำนวนของเชื้อกลุ่ม NTS ไอโซเลทที่ดื้อต่อยา

(Amp = ampicillin, TC = tetracycline, Nor = norfloxacin, AmC = amoxicillin/clavulanic acid)

จากการศึกษา พบว่า การกระจายของจำนวนของเชื้อกลุ่ม NTS ไอโซเลทที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทำการทดสอบ (รูปที่ 4-1) เป็นดังนี้

1. มีเชื้อเพียง 1 ไอโซเลท (3.33%) ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทั้งสี่ชนิด คือ Salmonella 14
2. มีเชื้อจำนวน 9 ไอโซเลท (30%) ที่ดื้อต่อทั้ง ampicillin และ tetracycline ได้แก่ Salmonella 3, 8, 9, 14, 19, 20, 21, 25 และ 30
3. มีเชื้อเพียง 1 ไอโซเลท (3.33%) ที่ดื้อต่อเฉพาะ ampicillin ได้แก่ Salmonella 16
4. มีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท (10%) ที่ดื้อต่อเฉพาะ tetracycline ได้แก่ Salmonella 2, 7 และ 26

3.ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentrations, MICs) ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

จากการหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ ampicillin, amoxicillin, norfloxacin และ tetracycline และสารสกัดแอลกอฮอล์จากผลสมอพิเภกแก่ ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี agar dilution ตามที่กำหนดโดย NCCLS ปี ค.ศ. 2000 สามารถหาค่า MIC range, MIC_{50}, MIC_{90}และเปอร์เซ็นต์ความไวต่อสารทดสอบทุกชนิดดังกล่าวข้างต้น แสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลการหาค่า MIC ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกและยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี agar dilution

ชนิดของสาร	ค่า MIC			จำนวนไอโซเลท (%)		
	MIC range	MIC_{50}	MIC_{90}	ดื้อต่อยา	ไวต่อยาระดับปานกลาง	ไวต่อยา
สารสกัด (มก/มล.)	40	40	40	ND	ND	ND
ampicillin (มคก/มล.)	0.5->256	2	256	10 (33.33)	0	20 (66.67)
amoxicillin (มคก/มล.)	1->256	4	>256	10 (33.33)	0	20 (66.67)
norfloxacin (มคก/มล.)	0.25-128	0.5	2	1 (3.33)	1 (3.33)	28 (93.33)
tetracycline (มคก/มล.)	1-256	1	128	13 (43.33)	0	17 (56.67)

ND = not determined

จากตารางที่ 4-2 แสดงให้เห็นว่า ค่า MIC ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกต่อเชื้อทุกไอโซเลท (100%) เท่ากับ 40 มก/มล.และค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากัน โดยเท่ากับ 40 มก/มล. สำหรับ ampicillin และ amoxicillin พบว่า มีเชื้อ 20 ไอโซเลท (66.67%) ที่ยังไวต่อยาทั้งสองชนิดนี้ โดยค่า MIC range ของ ampicillin มีค่าระหว่าง 0.5–>256 มคก/มล. และมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 2 และ 256 มคก/มล. ตามลำดับ และค่า MIC range ของ amoxicillin มีค่าระหว่าง 1->256 มคก/มล. และมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 4 และ >256 มคก/มล. ตามลำดับ สำหรับ norfloxacin พบว่า มีเชื้อ 28 ไอโซเลท (93.33%) ที่ไวต่อยานี้ โดยมีค่า MIC range อยู่ระหว่าง 0.25-128 มคก/มล. และมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 0.5 และ 2 มคก/มล. ตามลำดับ และสำหรับ tetracycline พบว่า มีเชื้อ 17 ไอโซเลท (56.67%) ที่ไวต่อยานี้ โดยมีค่า MIC range อยู่ระหว่าง 1-256 มคก/มล. และมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 1 และ 128 มคก/มล. ตามลำดับ

(รายละเอียดของค่า MIC แสดงในตาราง ภ.11 ในภาคผนวก)

4.ผลการตรวจหาเอนไซม์ β- lactamase และผลการตรวจยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams และยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยา

จากการตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อ 10 ไอโซเลท (33.33%) ที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase และเชื้ออีก 20 ไอโซเลทที่เหลือ (66.67%) ไม่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว

เชื้อกลุ่ม NTS ที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase ทุกไอโซเลท ตรวจไม่พบยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยากลุ่ม β-lactams ซึ่งได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{CTX-M} แต่ตรวจพบ *integrase* gene ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดการดื้อยาได้ในเชื้อ 1 ไอโซเลท คือ Salmonella 14 (รูปที่ 4-3) ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ดื้อต่อยา

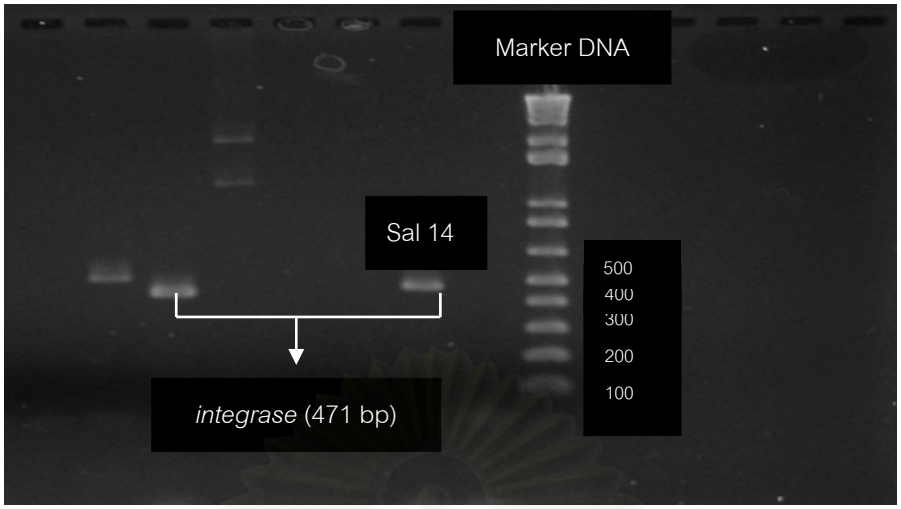
ต้านจุลชีพทุกชนิดที่ทำการทดสอบ โดยมีค่า MIC ต่อ ampicillin, amoxicillin, norfloxacin และ tetracycline เท่ากับ 256, 256, 128 และ 256 มคก/มล. ตามลำดับ และสำหรับเชื้อ 9 ไอโซเลท ที่เหลือพบว่า ดื้อต่อ ampicillin และ amoxicillin ในระดับสูงมาก โดยมีค่า MIC เท่ากับ > 256 และ 256 มคก/มล. ตามลำดับ และพบว่า เชื้อ 9 ใน 10 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin และ amoxicillin ยังดื้อต่อ tetracycline ในระดับสูงร่วมอีกด้วย โดยมีค่า MIC range อยู่ระหว่าง 64-256 มคก/มล. (ยกเว้น Salmonella 16 เพียงไอโซเลทเดียว ที่ยังไวต่อ tetracycline (ค่า MIC เท่ากับ 1 มคก/มล)) นอกจากนี้ พบว่า เชื้อที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase จำนวน 8 ไอโซเลท ยังไวต่อ norfloxacin อยู่ ดังตารางที่ 4-3
(รายละเอียดของการตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase และการตรวจยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams และยีนที่ถ่ายทอดการดื้อยา แสดงในตาราง ภ.12 ในภาคผนวก)

ตารางที่ 4-3 ผลการตรวจยีนในเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 10 ไอโซเลท ที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase และค่า MIC ของเชื้อกลุ่ม NTS ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ

ไอโซเลท	ชนิดของยีน				ค่า MIC (มคก/มล)			
	bla$_{TEM}$	*bla*$_{SHV}$	*bla*$_{CTX-M}$	*integrase*	Amp	Am	Nor	TC
Salmonella 3	-	-	-	-	256	> 256	2	256
Salmonella 8	-	-	-	-	> 256	> 256	8	128
Salmonella 9	-	-	-	-	256	128	2	128
Salmonella 14	-	-	-	+	256	256	128	256
Salmonella 16	-	-	-	-	256	>256	0.25	1
Salmonella 19	-	-	-	-	> 256	> 256	0.5	128
Salmonella 20	-	-	-	-	> 256	> 256	2	128
Salmonella 21	-	-	-	-	> 256	> 256	2	128
Salmonella 25	-	-	-	-	256	> 256	2	128
Salmonella 30	-	-	-	-	256	256	2	128

Amp = ampicillin, Am = amoxicillin, Nor = norfloxacin, TC = tetracycline

(-) = negative, (+) = positive



รูปที่4-2 PCR product ของ *integrase* gene ที่พบในเชื้อ Salmonella 14 (Sal14)

5. **ผลการประเมินฤทธิ์ร่วม** (combination activity) **ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด โดยวิธี** checkerboard

จากการศึกษาโดยวิธี checkerboard ทำให้สามารถประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกพิเภกร่วมกับยาต้านจุลชีพได้ โดยพิจารณาจากลักษณะของกราฟ isobologram และค่า $\sum$ FIC ที่คำนวณได้ ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS ทุกไอโซเลท หรือร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 13 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อยานี้แล้ว แสดงในตารางที่ 4-4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4-4 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin หรือร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท และ 13 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยวิธี checkerboard

ไอโซเลท	MIC ต่อ Amp	สารสกัดร่วมกับ ampicillin		MIC ต่อ TC	สารสกัดร่วมกับ tetracycline	
	(มคก/มล.)	ค่า $\sum$ FIC	การแปลผล	(มคก/มล.)	ค่า $\sum$ FIC	การแปลผล
Salmonella 1	2	1.50	indifference	1	ND	ND
Salmonella 2	1	1	additive	256	1.50	indifference
Salmonella 3	256	1	additive	64	1.50	indifference
Salmonella 4	4	1.50	indifference	1	ND	ND
Salmonella 5	1	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 6	1	1.50	indifference	1	ND	ND
Salmonella 7	1	1.50	indifference	64	1.50	indifference
Salmonella 8	> 256	1.50	indifference	128	1.50	indifference
Salmonella 9	256	1	additive	128	1.50	indifference
Salmonella 10	2	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 11	2	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 12	1	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 13	2	1	additive	2	ND	ND
Salmonella 14	256	1	additive	256	1.50	indifference
Salmonella 15	2	1	additive	2	ND	ND
Salmonella 16	256	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 17	1	1	additive	64	1.50	indifference
Salmonella 18	2	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 19	256	1	additive	128	1.50	indifference
Salmonella 20	> 256	1.50	indifference	128	1.50	indifference
Salmonella 21	> 256	1.50	indifference	128	1.50	indifference
Salmonella 22	2	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 23	1	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 24	2	1.50	indifference	1	ND	ND
Salmonella 25	256	1	additive	128	1.50	indifference
Salmonella 26	1	1	additive	256	1.50	indifference
Salmonella 27	1	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 28	0.5	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 29	2	1	additive	1	ND	ND
Salmonella 30	256	1	additive	128	1.50	indifference

ND = not determined เนื่องจากเชื้อยังไวต่อ tetracycline, Amp = ampicillin, TC = tetracycline

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin พบว่า แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ในเชื้อ 22 ไอโซเลท (73.33%) (รูปที่ 4-4) โดยกราฟ isobologram จะมีความชันน้อย และมีค่า $\sum$ FIC เท่ากับ 1 (รูปที่ 4-5) และไม่มีผลต่อกัน (indifference) ในเชื้ออีก 8 ไอโซเลทที่เหลือ (36.36%) เช่นเดียวกับเชื้อกลุ่ม NTS ที่ดื้อต่อ tetracycline จำนวน 13 ไอโซเลท ที่พบว่า การใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline ไม่แสดงผลต่อกัน (indifference) ในเชื้อทุกไอโซเลท (100%) (รูปที่ 4-6) โดยกราฟ isobologram จะมีความชันมาก และมีค่า $\sum$ FIC เท่ากับ 1.50 (รูปที่ 4-7)

สำหรับเชื้อกลุ่ม NTS ที่ดื้อต่อทั้ง ampicillin และ tetracycline ในระดับสูง จำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ Salmonella 3, 9, 14, 19, 25 และ 30 พบว่า การให้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วม ampicillin จะแสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) แต่ถ้าให้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline พบว่า ไม่มีผลต่อกัน (indifference)

เมื่อทำการแบ่งกลุ่มของเชื้อทดสอบตามความแตกต่างของค่า MIC ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก จะสามารถจัดเป็นกลุ่ม ได้ดังนี้

1. กลุ่มที่แสดงผล additive และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 0.5 มคก/มล และ 40 มก/มล. ตามลำดับ มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ Salmonella 28

2. กลุ่มที่แสดงผล additive และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอลล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 1 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 2, 5, 12, 17, 23, 26 และ 27

3. กลุ่มที่แสดงผล additive และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอลล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 2 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 10, 11, 13, 15, 18, 22 และ 29

4. กลุ่มที่แสดงผล additive และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 256 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 3, 9, 14, 16, 19, 25 และ 30

5. กลุ่มที่แสดงผล indifference และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 1 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 6 และ 7

6. กลุ่มที่แสดงผล indifference และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 2 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 1 และ 24

7. กลุ่มที่แสดงผล indifference และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 4 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ Salmonella 4

8. กลุ่มที่แสดงผล indifference และมีค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ > 256 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 8, 20 และ 21

9. กลุ่มที่แสดงผล indifference และมีค่า MIC ต่อ tetracycline และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 64 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 3, 7 และ 17

10. กลุ่มที่แสดงผล indifference และมีค่า MIC ต่อ tetracycline และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 128 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ Salmonella 8, 9, 19, 20, 21 และ 25

11. กลุ่มที่แสดงผล indifference และมีค่า MIC ต่อ tetracycline และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก เท่ากับ 256 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Salmonella 2, 14 และ 26

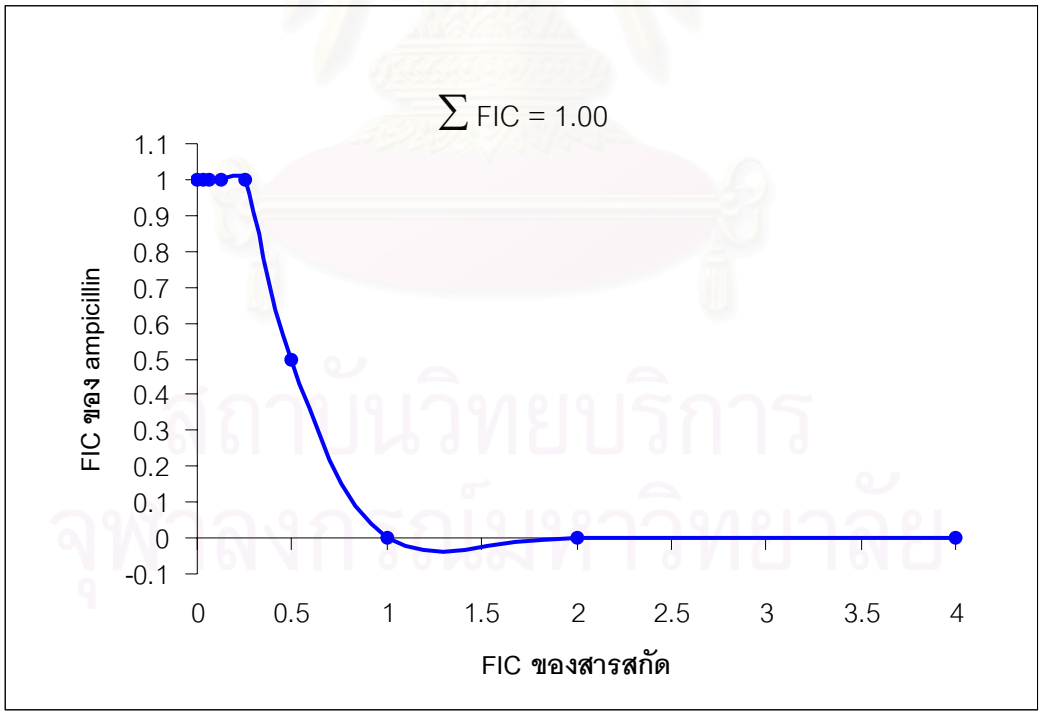
(รายละเอียดของผลการประเมินฤทธิ์ร่วมและกราฟ isobologram แสดงในรูปที่ ภ.1-ภ.11 ในภาคผนวก)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารสกัด								
160	160/8	160/16	160/32	160/64	160/128	160/256	160/512	160/1024
80	80/8	80/16	80/32	80/64	80/128	80/256	80/512	80/1024
40	40/8	40/16	40/32	40/64	40/128	40/256	40/512	40/1024
20	20/8	20/16	20/32	20/64	20/128	20/256	20/512	20/1024
10	10/8	10/16	10/32	10/64	10/128	10/256	10/512	10/1024
5	5/8	5/16	5/32	5/64	5/128	5/256	5/512	5/1024
2.5	2.5/8	2.5/16	2.5/32	2.5/64	2.5/128	2.5/256	2.5/512	2.5/1024
1.25	1.25/8	1.25/16	1.25/32	1.25/64	1.25/128	1.25/256	1.25/512	1.25/1024
	8	16	32	64	128	256	512	1024

ampicillin

รูปที่ 4-3 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 22 ไอโซเลท ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive)
(เมื่อค่า MIC ของ ampicillin และของสารสกัด เท่ากับ 256 มคก/มล และ 40 มก/มล ตามลำดับ)
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)



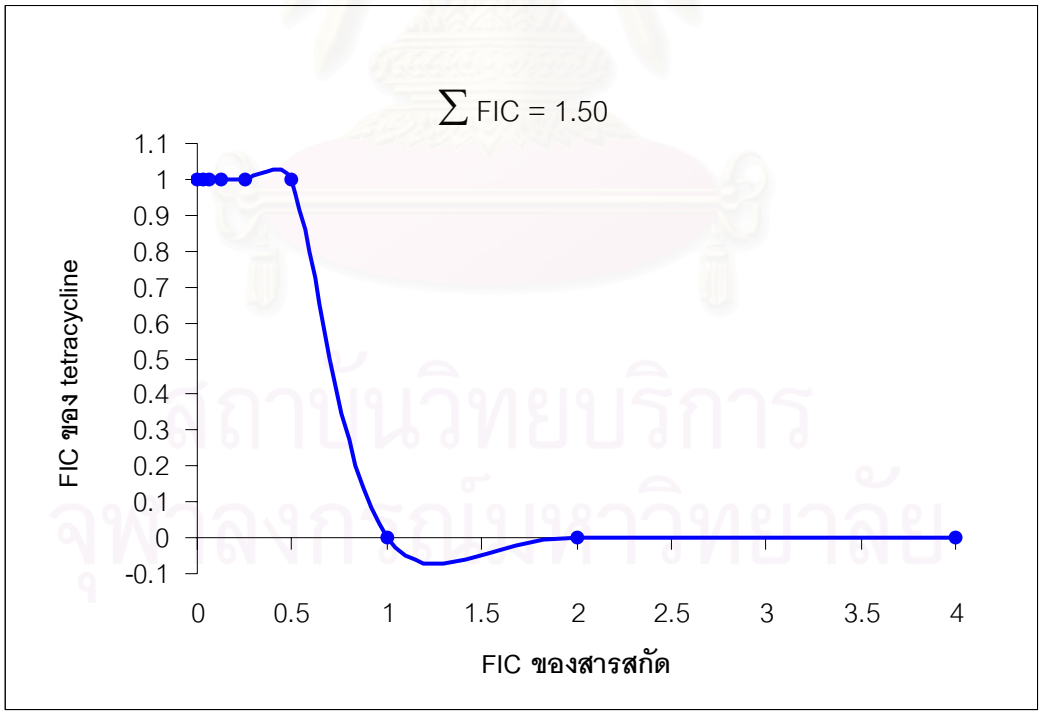
รูปที่ 4-4 กราฟ isobologram และค่า ∑ FIC ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 22 ไอโซเลท ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์

160	160/8	160/1	160/32	160/64	160/128	160/256	160/512	160/1024
80	80/8	80/16	80/32	80/64	80/128	80/256	80/512	80/1024
40	40/8	40/16	40/32	40/64	40/128	40/256	40/512	40/1024
20	20/8	20/16	20/32	20/64	20/128	20/256	20/512	20/1024
10	10/8	10/16	10/32	10/64	10/128	10/256	10/512	10/1024
5	5/8	5/16	5/32	5/64	5/128	5/256	5/512	5/1024
2.5	2.5/8	2.5/16	2.5/32	2.5/64	2.5/128	2.5/256	2.5/512	2.5/1024
1.25	1.25/8	1.25/16	1.25/32	1.25/64	1.25/128	1.25/256	1.25/512	1.25/1024
	8	16	32	64	128	256	512	1024

สารสกัด ↑

tetracycline →

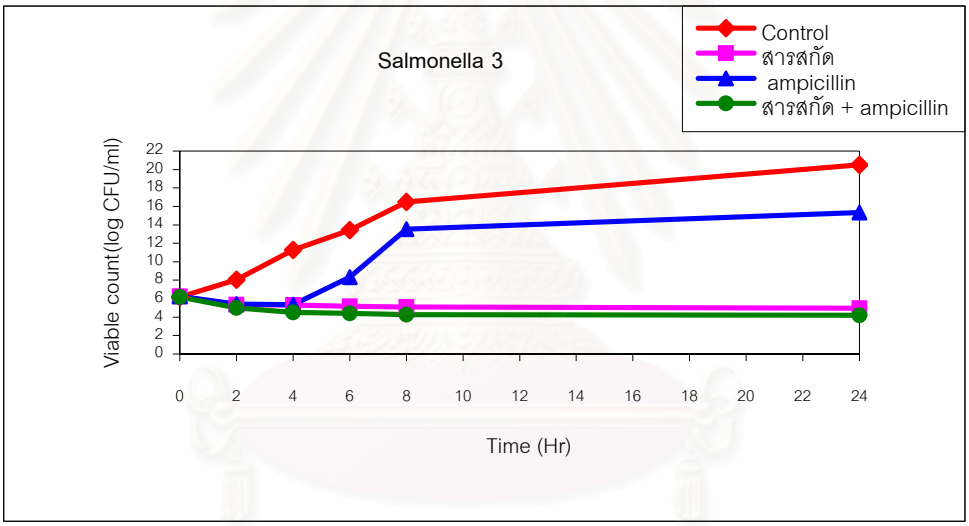
รูปที่ 4-5 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 13 ไอโซเลท ที่ไม่มีผลต่อกัน (indifference)
(เมื่อค่า MIC ของ tetracycline และของสารสกัด เท่ากับ 256 มคก/มล และ 40 มก/มล ตามลำดับ)
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)



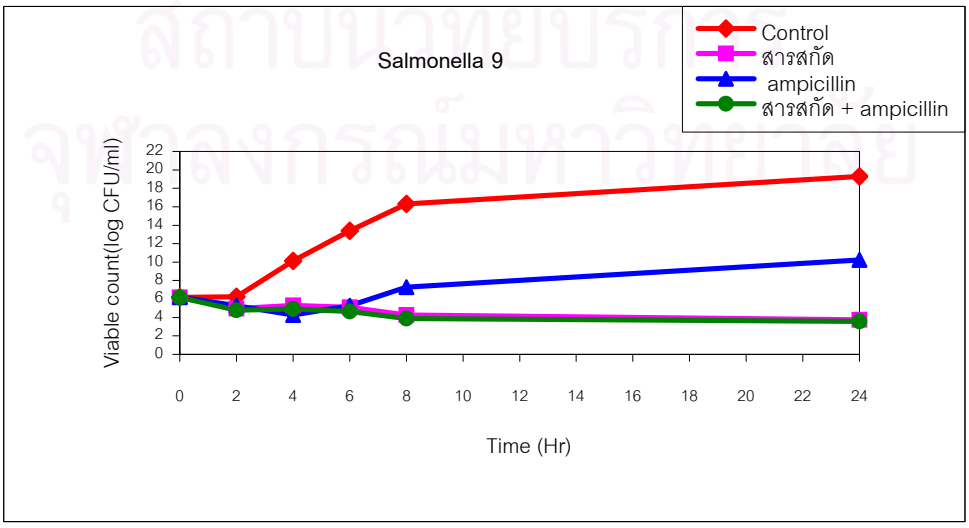
รูปที่ 4-6 กราฟ isobologram และค่า ∑ FIC ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 13 ไอโซเลท ที่ไม่มีผลต่อกัน

6. การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ (antibacterial activity) **ของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ** ampicillin **โดยวิธี** time kill

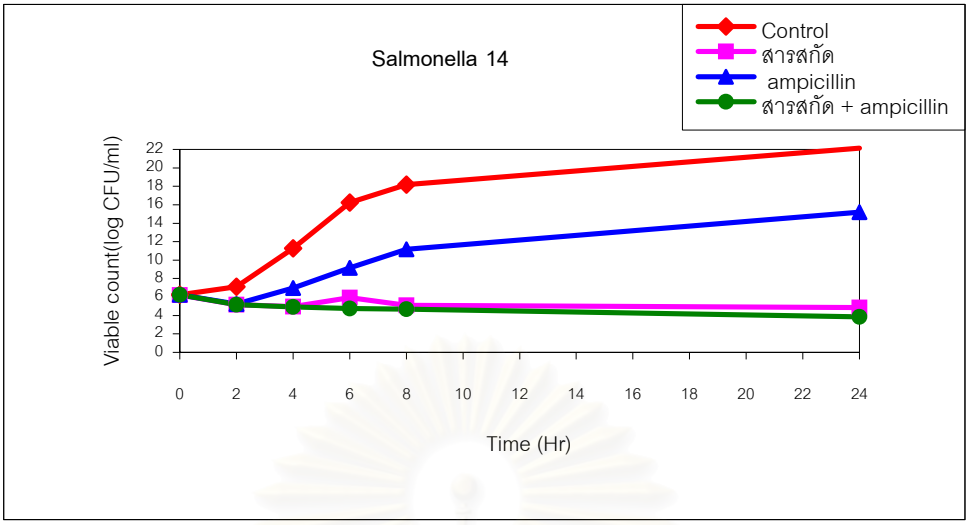
จากเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 22 ไอโซเลท ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) เมื่อประเมินฤทธิ์ร่วมโดยวิธี checkerboard พบว่า มีเพียง 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin ได้แก่ Salmonella 3, 9, 14, 16, 19, 25 และ 30 ซึ่งจะถูกนำมาประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ โดยใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ (1/2 MIC = 20 มก/มล) หรือใช้ร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC = 128 มคก/มล) โดยวิธี time kill ซึ่งกราฟ time kill ของเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท แสดงในรูปที่ 4-7 และจำนวนไอโซเลทที่ถูกฆ่า ณ. เวลาต่างๆ (0-24 ชั่วโมง) รวมทั้งจำนวนไอโซเลทที่กลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง หลังจากเวลาผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง (regrowth) แสดงในตาราง ที่ 4-5 (รายละเอียดผลการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ แสดงในตารางที่ ภ.13, ภ.14 และ ภ.15 ในภาคผนวก)



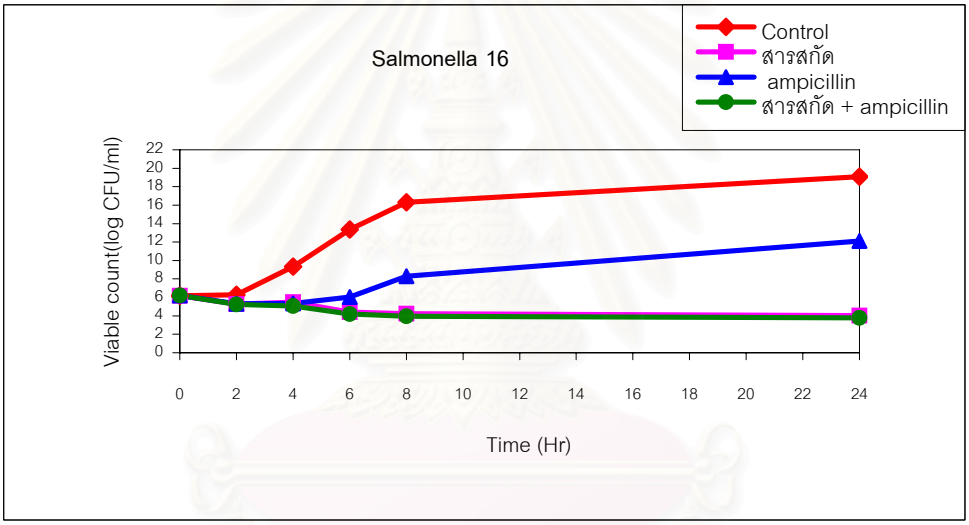
(a)



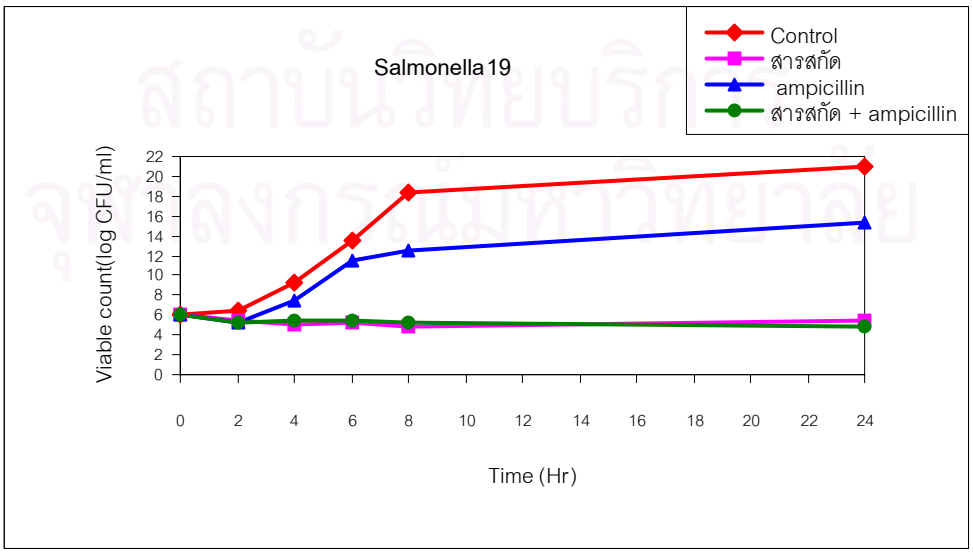
(b)


Salmonella 14
Control
สารสกัด
ampicillin
สารสกัด + ampicillin
Viable count(log CFU/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Time (Hr)

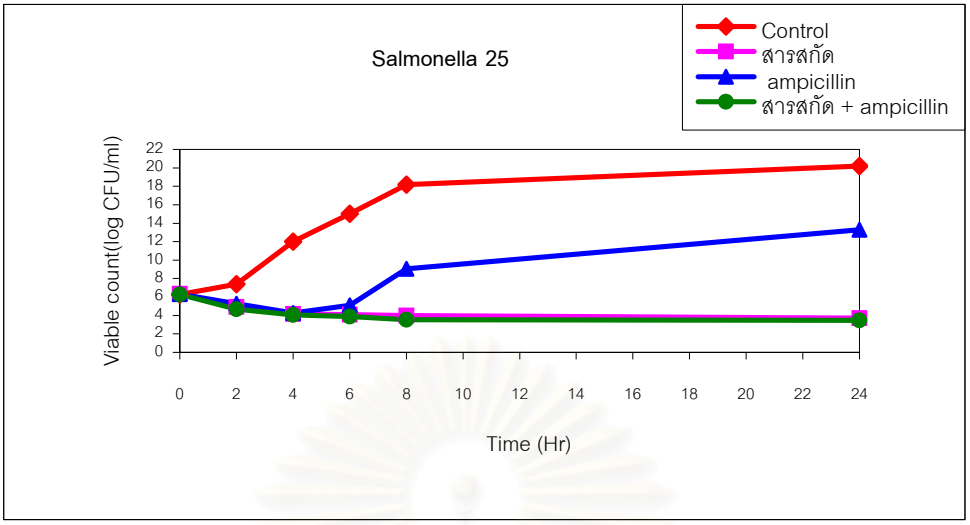
(c)


Salmonella 16
Control
สารสกัด
ampicillin
สารสกัด + ampicillin
Viable count(log CFU/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Time (Hr)

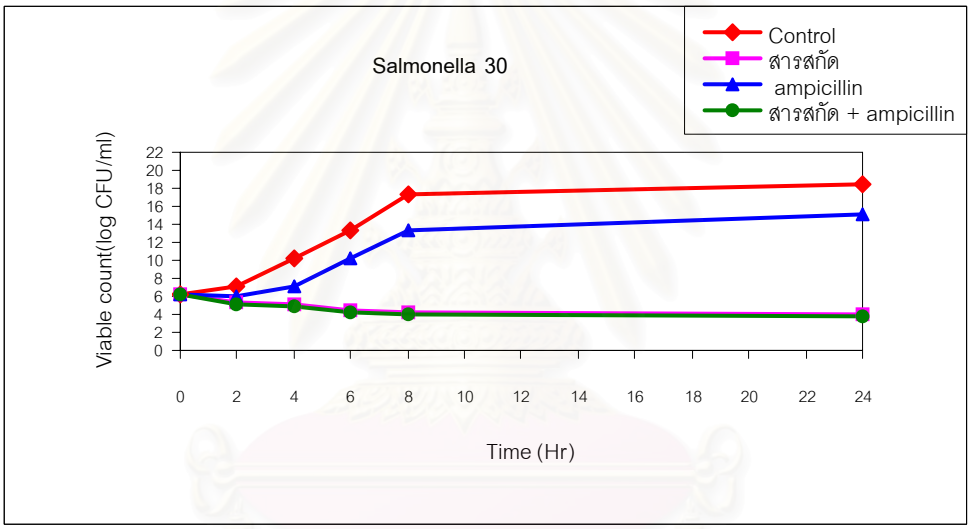
(d)


Salmonella 19
Control
สารสกัด
ampicillin
สารสกัด + ampicillin
Viable count(log CFU/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Time (Hr)

(e)



(f)



(g)

รูปที่ 4-7 กราฟ time kill ของเชื้อกลุ่ม NTS แต่ละไอโซเลท (จำนวน 7 ไอโซเลท) เมื่อได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC), ampicillin (1/2 MIC) และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC : 1/2 MIC)

กำหนดให้ (a) = Salmonella 3, (b) = Salmonella 9, (c) = Salmonella 14, (d) = Salmonella 16, (e) = Salmoenlla 19, (f) = Salmonella 25, และ (g) = Salmonella 30

ตารางที่ 4-5 จำนวนไอโซเลทที่ถูกฆ่า ณ.เวลาต่างๆ (0-24 ชั่วโมง) และจำนวนไอโซเลทที่กลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง หลังเวลาผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง (regrowth) ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท เมื่อได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin โดยวิธี time kill

สารทดสอบ / เวลา / ระดับการฆ่าเชื้อ	จำนวนไอโซเลท และระดับการฆ่าเชื้อและการกลับเจริญอีกครั้ง ที่เวลาต่างๆ ภายใน 24 ชม.																
	2 ชม.			4 ชม.			6 ชม.			8 ชม.				24 ชม.			
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	R	-1	-2	-3	R
สารสกัด (1/2 MIC)	3	0	0	3	1	0	4	1	0	6	1	0	0	3	4	0	0
ampicillin (1/2 MIC)	2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	7
สารสกัด + ampicillin (1/2 MIC : 1/2 MIC)	5	0	0	5	1	0	3	3	0	2	4	0	0	1	6	0	0

เมื่อ -1 หมายความว่า เชื้อถูกฆ่าลงได้ 90 เปอร์เซ็นต์ (90% killing)

-2 หมายความว่า เชื้อถูกฆ่าลงได้ 99 เปอร์เซ็นต์ (99% killing)

-3 หมายความว่า เชื้อถูกฆ่าลงได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ (99.9% killing)

R = regrowth หมายความว่า เชื้อที่กลับเจริญขึ้นอีกครั้ง หลังจากเวลาผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง

จำนวนไอโซเลทที่ถูกฆ่า ณ.เวลาต่างๆ และจำนวนไอโซเลทที่กลับเจริญขึ้นอีกครั้งหลังจากเวลาผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง (regrowth)แสดงในตารางที่ 4-5 จะเห็นว่า

1. ภายในเวลา 2 ชั่วโมงแรก พบว่า การได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin สามารถทำให้เชื้อ 5 ไอโซเลท (71.43%) ลดลงได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ และ ampicillin เดี่ยวๆ ที่จะทำให้จำนวนเชื้อลดลงถึงระดับดังกล่าว ได้เพียง 2 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ

2. ภายในเวลา 4 ชั่วโมง หลังได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ หรือสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin พบว่า ทุกกรณี ทำให้เชื้อ 1 ไอโซเลท (14.28%) (คือ Salmonella 25) ลดลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์

3. ภายในเวลา 6 ชั่วโมง หลังได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin พบว่า สามารถทำให้เชื้อ 3 ไอโซเลท (42.86%) (ได้แก่ Salmonella 16, 25 และ 30) ลดลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ ที่จะทำให้เชื้อลดลงถึงระดับดังกล่าวได้เพียง 1 ไอโซเลท (14.28%) (คือ Salmonella 25) เท่านั้น แต่ถ้าได้รับ ampicillin เดี่ยวๆ พบว่าไม่สามารถทำให้เชื้อลดลงได้ถึงระดับดังกล่าวเลย

5. ภายในเวลา 8 ชั่วโมง หลังได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin พบว่า สามารถทำให้เชื้อ 4 ไอโซเลท (57.14%) (ได้แก่ Salmonella 9, 16, 25 และ 30) ลดลงได้ถึง 99

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ ที่จะทำให้จำนวนเชื้อลดลงถึงระดับดังกล่าวได้เพียง 1 ไอโซเลท (14.28%) (คือ Salmonella 25) เท่านั้น แต่ถ้าได้รับ ampicillin เดี่ยวๆ จะทำให้เชื้อ 5 ไอโซเลท (71.43%) (ได้แก่ Salmonella 3, 14, 16, 19 และ 30) กลับเจริญขึ้นใหม่ได้อีกครั้ง (regrowth)

6. ภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin พบว่า สามารถทำให้เชื้อ 6 ไอโซเลท (85.71%) (ได้แก่ Salmonella 3, 9, 14, 16, 25 และ 30) ลดลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ ที่จะทำให้จำนวนเชื้อลดลงถึงระดับดังกล่าวได้เพียง 4 ไอโซเลท (57.14%) (ได้แก่ Salmonella 9, 16, 25 และ 30) เท่านั้น แต่ถ้าได้รับ ampicillin เดี่ยวๆ จะทำให้เชื้อทุกไอโซเลท (100%) กลับเจริญขึ้นใหม่ได้อีกครั้ง (regrowth)

สำหรับ Salmonella 14 ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ทำการทดสอบ และตรวจพบ *integrase* gene พบว่า มีเพียงการให้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin เท่านั้นที่ทำให้จำนวนเชื้อลดลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (99 %killing) เมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 24 ชั่วโมง โดยเกิดการไม่กลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth)

การให้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ หรือให้ร่วมกับ ampicillin สามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่เกิดการกลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) หมายความว่า การให้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ หรือการให้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin แสดง bacteriostatic activity ได้

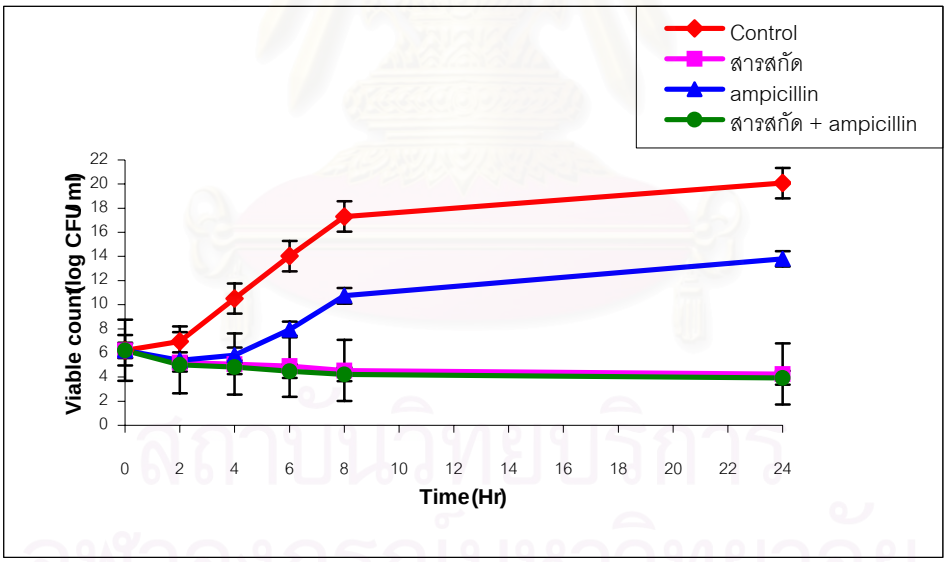
จากการประเมินค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อกลุ่ม NTS ทั้งหมด 7 ไอโซเลท ที่เปลี่ยนแปลงไป ณ.เวลาต่างๆ (0-24 ชั่วโมง), จำนวนเชื้อที่เหลืออยู่ ($AUBKC_{0-24}$) และจำนวนเชื้อที่ถูกฆ่าภายในเวลา 24 ชั่วโมง (BA_{24}) (รูปที่ 4-8 และตารางที่ 4-6) แสดงให้เห็นว่า

1. การได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ, ampicillin เดี่ยวๆ หรือสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ไม่สามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงได้ถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 24 ชั่วโมง หมายความว่า สารทั้งสามกลุ่มดังกล่าวข้างต้นไม่แสดง bactericidal activity

2. สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ (1/2 MIC) แสดง bacteriostatic activity ได้ เนื่องจากสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรก และลดลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 24 ชั่วโมง โดยไม่เกิดการเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) และมีจำนวนเชื้อที่ถูกฆ่า (BA_{24}) เท่ากับ 262.4354 ± 39.1587 log CFU/มล.

3. การได้รับ ampicillin เดี่ยวๆ (1/2 MIC) ไม่สามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และยังทำให้เชื้อกลับเจริญขึ้นใหม่ได้อีก หลังจากเวลาผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง (regrowth) ได้อีกด้วย

4. การได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC) ร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC) แสดง bacteriostatic activity ได้ เนื่องจากสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรก และจำนวนเชื้อจะลดลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 24 ชั่วโมง โดยไม่เกิดการเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) และมีจำนวนเชื้อที่ถูกฆ่า (BA_{24}) เท่ากับ 269.1952 $\pm$ 41.2995 log CFU/ มล. เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่ถูกฆ่า (BA_{24}) หลังได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC) ร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC) กับ จำนวนเชื้อที่ถูกฆ่าหลังได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ (1/2 MIC) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ถ้าเปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่ถูกฆ่าหลัง ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC) ร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC) กับ จำนวนเชื้อที่ถูกฆ่าหลังได้รับ ampicillin เดี่ยวๆ (1/2 MIC) พบว่า มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4-8 กราฟ time kill ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin เมื่อได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก (1/2 MIC), ampicillin (1/2 MIC) และสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin (1/2 MIC: 1/2 MIC)

ตารางที่ 4-6 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป ณ. เวลาต่างๆ (0-24 ชั่วโมง), ค่า $AUBKC_{0-24}$ และค่า BA_{24} ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin

สารทดสอบ	ค่า Log change viable count					$AUBKC_{0-24}$	BA_{24} (log CFU/ml)
	Δ 2	Δ 4	Δ 6	Δ 8	Δ 24		
กลุ่มควบคุม (Control)	0.7393 ± 0.6585	4.2846 ± 1.0201	7.8224 ± 1.1145	11.0913 ± 0.9204	13.8666 ± 1.2496	376.2592 ± 36.5282	-
สารสกัด (1/2 MIC)	-1.0193 ±0.2335	-1.1388 ±0.5017	-1.3096 ±0.6744	-1.6722 ± 0.4915	-1.9527 ± 0.5388	113.8242 ± 10.3446	262.4354 ± 39.1587
ampicillin (1/2 MIC)	-0.8153 ±0.2813	-0.3969 ±1.3679[a]	1.7308 ±2.5549[a]	4.5253 ± 2.5552[a]	7.5859 ± 2.0260[a]	252.7294 ±43.7092[a]	123.5298 ± 43.4037[a]
สารสกัด+ampicillin (1/2 MIC: 1/2 MIC)	-1.1729 ± 0.2463	-1.3824 ± 0.4720	-1.7075 ± 0.5330	-1.9771 ± 0.6123	-2.2635 ± 0.4986	107.0640 ± 11.5460	269.1952 ± 41.2995

ถ้าจำนวนเชื้อลดลงได้เท่ากับ –1 หมายความว่า เชื้อถูกฆ่าลงได้ 90 เปอร์เซ็นต์ (90% killing)

ถ้าจำนวนเชื้อลดลงได้เท่ากับ –2 หมายความว่า เชื้อถูกฆ่าลงได้ 99 เปอร์เซ็นต์ (99% killing)

ถ้าจำนวนเชื้อลดลงได้เท่ากับ –3 หมายความว่า เชื้อถูกฆ่าลงได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ (99.9% killing)

[a] ค่า $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับการได้รับสารสกัดแอลกอฮอลล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

เป็นที่ทราบกันแล้วว่า สาร tannin ที่พบในพืชชั้นสูงหลายชนิด มีคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีนและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial effect) ได้หลายชนิด (Scalbert, 1991) จากการศึกษาของ Toda และคณะ (1989) พบว่า สาร tannin ที่สกัดจากใบชา มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคท้องเสียได้ และจากการตรวจพบสาร tannin ในลูกสมอพิเภกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกน่าจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ และเมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี disk diffusion พบว่า เกิด inhibition zone ขึ้น แสดงให้เห็นว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกมีฤทธิ์ต้านเชื้อกลุ่ม NTS ได้

ปัจจุบันพบว่า เชื้อกลุ่ม NTS มีอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น ampicillin, streptomycin, chloramphenicol และ co-trimoxazole (Kariuki et al., 2005) โดยส่วนใหญ่มักเป็นการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกัน (multidrug resistance, MDR) ทำให้มีความยากลำบากในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพมาใช้ในการรักษา ซึ่งผลการทดสอบ พบว่า เชื้อกลุ่ม NTS ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ ดื้อต่อ ampicillin (33.33%) และ tetracycline (43.33%) นอกจากนี้ ยังพบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่ดื้อต่อ ampicillin แล้ว จะดื้อต่อ tetracycline ในระดับสูงร่วมอีกด้วย โดยมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 256 มคก/มล และ 128 มคก/มล ตามลำดับ

กลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams ที่พบได้บ่อยในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ การสร้างเอนไซม์ β-lactamase ขึ้นมาทำลายฤทธิ์ของยา (Quintiliano et.al., 1999) เนื่องจาก เชื้อทุกไอโซเลท (100%) ที่ดื้อต่อ ampicillin ตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า เชื้อกลุ่ม NTS ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ ดื้อต่อยากลุ่ม β-lactams โดยกลไกสร้างเอนไซม์ β-lactamase ขึ้นมาทำลายฤทธิ์ของยา แต่เนื่องจากตรวจไม่พบยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยากลุ่ม β-lactams (ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{CTX-M}) ในเชื้อทุกไอโซเลท (100%) แสดงว่า เอนไซม์ β-lactamase ที่เชื้อสร้างขึ้น ไม่ใช่เอนไซม์ Extended-Spectrum β-lactamase (ESBL) ที่เป็นอนุพันธุ์ของกลุ่ม TEM, SHV และ CTX-M ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bradford (2001) ที่ระบุว่า โอกาสที่จะพบเอนไซม์ β-lactamase ที่เป็นอนุพันธุ์ของกลุ่ม TEM และ SHV ในเชื้อ *Salmonella* spp. จะมีค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriacea ชนิดอื่นๆ ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อกลุ่ม NTS ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้

ดื้อต่อ ampicillin โดยสร้างเอนไซม์ β-lactamase ในกลุ่มอื่นขึ้นมาทำลายฤทธิ์ของยา และจากการที่ค่า MIC_{90} ของ ampicillin มีค่าเท่ากับ 256 มคก/มล. ซึ่งจัดสูงมาก แสดงให้เห็นว่า ในการดื้อต่อ ampicillin อาจมีกลไกการดื้อยาอื่นร่วมด้วย เช่น การขับยาออกนอกเซลล์ โดยระบบขนส่งสาร (drug efflux pump) โดยเกิดผ่าน Multidrug Resistance (MDR) Pump

การตรวจพบ *integrase* gene ในเชื้อ 1 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่า เชื้อกลุ่ม NTS มีโอกาสเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกัน (multidrug resistance, MDR) โดยได้รับการถ่ายทอดชุดของยีนดื้อยา (resistance gene cassette) ผ่านทาง integron ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจความไวของเชื้อ เนื่องจากเชื้อที่ตรวจพบ *integrase* gene คือ salmonella 14 เป็นไอโซลเลทเดียวที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่นำมาทำการทดสอบ ได้แก่ ampicillin, amoxicillin, norfloxacin และ tetracycline ในระดับสูง

สำหรับกลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines ที่พบบ่อยในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriaceae รวมถึง *Salmonella* spp. ก็คือ กลไกการขับยาออกจากเซลล์ โดยระบบขนส่งสาร (drug efflux pump) (Levy, 1998) โดยกลไกดังกล่าวเกิดขึ้นได้จาก 2 รูปแบบ คือ เกิดผ่าน Multidrug Resistance (MDR) Pump ซึ่งเป็นกลไกที่ใช้ในการขับยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ออกจากเซลล์ และอีกกลไกหนึ่ง คือ เกิดผ่าน Tetracycline-specific pump ซึ่งเป็นกลไกเฉพาะที่ใช้ในการขับยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines เท่านั้น โดยต้องอาศัย *tet* gene ในการสร้าง transporter protein ขึ้นมาใช้ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์ โดยกลไกนี้อาจเรียกว่า *tet* efflux pump และจากผลการทดสอบ แสดงให้เห็นว่า เชื้อกลุ่ม NTS ที่นำมาทำการศึกษาครั้งนี้ ดื้อต่อ tetracycline ในระดับสูง เนื่องจากมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 128 มคก/มล ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่า กลไกการดื้อต่อ tetracycline ที่เกิดขึ้น เกิดผ่านกลไกทั้งสองรูปแบบดังกล่าวข้างต้นร่วมกัน

การประเมินฤทธิ์ร่วม (combination activity) โดยวิธี checkerboard พบว่า การใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ได้ ในเชื้อส่วนใหญ่ (73.33%) แต่การใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline พบว่า ไม่มีผลต่อกัน (indifference) ในเชื้อทุกไอโซเลท (100%) ดังนั้น ในการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ (antibacterial activity) ต่อไป โดยวิธี time kill จึงเลือกการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin (อัตราส่วน 1/2 MIC: 1/2 MIC ซึ่งเท่ากับ 20 มก/มล: 128 มคก/มล)

การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ (antibacterial activity) โดยวิธี time kill พบว่า การใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ทำให้เชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 6 ใน 7 ไอโซเลท (85.71%) ถูกฆ่าลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (99% killing) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่เกิดการกลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) แต่การใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ ทำให้เชื้อเพียง 4 ไอโซเลท (57.14%) เท่านั้น ถูกฆ่าลงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่เกิดการกลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth) ส่วนการใช้ ampicillin เดี่ยวๆ ทำให้เชื้อถูกฆ่าได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เพียง 1 ไอโซเลท (14.29%) ภายในเวลา 4 ชั่วโมงแรกเท่านั้น แต่หลังจากนั้นเชื้อทุกไอโซเลท (100%) จะกลับเจริญขึ้นใหม่อีกครั้ง (regrowth)

สรุปผลการวิจัย

เมื่อเปรียบเทียบในแง่ของระยะเวลาการออกฤทธิ์ และจำนวนไอโซเลทของเชื้อที่ถูกยับยั้งการเจริญ จะเห็นว่า การใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin แสดง bacteriostatic activity ได้สูงกว่าการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกเดี่ยวๆ ดังนั้น การนำสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกมาใช้ร่วมกับ ampicillin อาจเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม NTS ที่มีสาเหตุจากเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ ampicillin แล้วได้ อย่างไรก็ตาม มีความจำเป็นต้องทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และอาสาสมัคร (clinical trial) ก่อน จึงจะสามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า มีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาได้หรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ก่องกานดา ชยามฤต. สมุนไพรไทย ตอนที่ 4. กรุงเทพมหานคร: ชุติมาการพิมพ์, 2528.

กัญจนา ดีวิเศษ และคณะ. คู่มือเภสัชกรรมแผนโบราณ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สำนักงานสาธารณะสุข จังหวัดปราจีนบุรี, 2537.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คณะเภสัชศาสตร์. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์. ชื่อพืชสมุนไพรและประโยชน์. (ม.ป.ท.), 2530.

นันทวัน บุญยะประภัศร, บรรณาธิการ. ศัพท์แพทย์ไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ประชาชน, 2535.

นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวัฒน์. พืชสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.

ประเสริฐ พรหมณี และคนอื่นๆ. ตำราเภสัชกรรมไทยแผนโบราณของสมาคมการแพทย์แผนโบราณวัดมหาธาตุฯ กรุงเทพ. กรุงเทพมหานคร: เอราวัณการพิมพ์, 2484.

ประเสริฐวิทยาศาสตร์, หลวง. ตำราสรรพคุณไทย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ใต้เชียง, 2484.

พยอม ตันติวัฒน์. สมุนไพร. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย, 2521.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. คู่มือการใช้สมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: เมดิคัล มีเดีย, 2526.

พินิจ แจ้งจิต และ ปัญญา บูรพาชีพ. คู่มือสอบฉบับก้าวหน้า เภสัชกรรมแผนโบราณ. กรุงเทพมหานคร: เอเชียการพิมพ์, 2513.

ภัสราภา เงินดี และ สุนทร จิรสถาพร. การศึกษาลักษณะทางเภสัชเวทของผลสมอ 3 ชนิด. วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 20 (2521): 157-180.

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา. กรุงเทพมหานคร: อักษราการพิมพ์, 2535.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และคนอื่นๆ. สมุนไพร ยาไทยที่ควรรู้. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สยามบุ๊ค แอนด์ พับลิเคชัน, 2544.

ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ และ ถนอม สุภาวิตา. ชื่อพืชสมุนไพรและประโยชน์. (ม.ป.ท.), 2521.

สมิง ศรีพลอย. สรรพคุณสมุนไพรไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ พี เอส กรุ๊ป, 2537.

สายสนม กิตติขจร. ตำราสรรพคุณสมุนไพรยาไทยแผนโบราณ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์อักษรไทย, 2526.

สุนทรี สิงหบุตรา. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สำนักอนามัยกรุงเทพมหานคร, 2540.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศ เมืองไทย สรรพคุณยาเทศและยาไทย. (ม.ป.ท.), 2593.

ภาษาอังกฤษ

Ali, M. Chemical examination of fruits of *Terminalia bellerica* Roxb. Oriental Journal of Chemistry 8 (1998): 255-256.

Ambler, R.P., Coulson, A.F.W., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., and Waley, S.G. A standard numbering scheme for a class A β-lactamases. Biochem J. 276 (1991): 269-272.

Anand, K.K., Singh, B., Saxene, A.K., Chandan, B.K., Gupta, V.N., and Bhardwaj, V.3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid), the hepatoprotective principle in the fruits of *Terminalia bellerica* bioassay guided activity. Pharmacological Research 30 (1997): 315-381.

Aroon, Bangtrakulnonth. Protocol for isolation, identification, serotyping, and susceptibility testing of *Salmonella*. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response (CSR), in collaboration with Centers for Disease Control and Prevalence, USA, Danish Veterinary Laboratory, Denmark and National Salmonella and Shigella Center, Thailand.

Avirutnant, W., and Pongpan, A. The antimicrobial activity of some Thai flowers and plants. Mahidol University Journal of Pharmaceutic Sciences 10 (1983): 81-86.

Bauernfeind, A., Grimm, H., and Schweighart, S. A new plasmidic cefotaximase in clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection 18 (1990): 294-298.

Bhambhani, T.R., Shitole., A.D. Subrahmanyam, V.V.R., and Kane, J.G. Minor oilseeds and oils. J Oil Technol Ass India 2 (1970): 8-11.

Bonnet, R., Sampaio, J.L., Channal, C. et.al. A novel class A extended-spectrum β-lactamase (BES-1) in *serratia marcescens* isolated in Brazil. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 44 (2000): 3061-3068.

Bopp, C.A., Brenner, F.W., Fields, P.I., Wells, J.G., and Stockbine, N.A. Escherichia, Shigella and Salmonella in Manual of Clinical microbiology. American Society for Microbiology (2003): 654-671.

Bradford, P.A. Extened-spectrum β-lactamases in the 21st century: Characterization, epidermiology, and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Reviews 14 (2001): 933-951.

Bradford, P.A., Yang, Y., Sahm, D., Grope, I., Gardovska, D., and Storch, G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 42 (1998): 1980-1984.

Brian, K.R., and Turner, T.D. The Practical Evaluation of Phytopharmaceuticals. John Wright & Sons: Great Britain, 1975.

Bush, K., Jacoby, G.A., and Menderios, A.A. A functional classification scheme for β-lactamase and its correlation with molecular structure. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 39 (1995): 1211-1233.

Cardinale, E., Colibachini, P., Perrier-Gros-Claude, J.D., Gassama, A., and Aidara-Kane, A. Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of Salmonella in Senegal: Salmonella entericaa subsp. Enterica serotype 35:c:1,2. Journal of Clinical Microbiology 39 (2001): 2373-2374.

Chopra, I., and Robert, M. Tetracycline Antibiotic: Mode of action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiology and Molecular Biology Review 65 (2001): 232-260.

Council of Scientific & Industrial Research [CSIR]. The wealth of India (vol. 10). Calcutta: N.K. Gossarin. 1976.

Danziger, L.H., and Pendland, S.L. Bacterial resistance to β-lactam antibiotics. Am J Health Syst Pharm 52 (1995): S3-S8.

Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N., and Ray, C. Screening of Indian plants for biological activity: Part I. Indian Journal of Experimental Biology 6 (1968): 232-247.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Eckert, C., Gautier, V., Hidri, N. et.al. Dissemination of CTX-M type β-lactamase among clinical isolate of Enterobacteriaceae in Paris, France. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 48 (2004): 1249-1255.

Elizabeth, M. Major Herbs of Ayurveda. Edinburg: Churchill Living stone, 2002

Epiloulos, G.M., and Moellering, R.C. Antimicrobial Combination. In V.lorian (ed.). Antibiotic in laboratory medicine. Baltimore: William&Wilkin, 1996.

Fisov, A.A., Vostrov, S.N., Shevchenko, A.A., and Cornaglia, G. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in term of area under the concentration time curve relationship: Action of Ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an in-vitro dynamic model. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 41 (1997): 1281-1287.

Fluit, A.C., and Schmitz, F.J. Class 1 integrons, gene cassette, mobility, and epidermiology. European journal of Microbiology Infection Disease 18 (1999): 761-770.

Fluit, A.C., and Schmitz, F.J. Resistance integrons and super-integrons. Journal of Clinical Microbiology Infection 10 (2004): 272-288.

Frank, S.D. Botanicals A phytocosmetic Desk Reference. Florida: CRC Press, 1999.

Gazouli, M., Sidorenko, S.V., Tzelepi, E., Kozlova, N.S., Gladin, D.P., and Tzouvelekis, L.S. A plasmid-mediated β-lactamase conferring resistance to cefotaximase in Salmonella typhimurium clone found in St. Peterburg, Russia. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 41 (1998): 119-121.

Giakkoupi, P., Tzourelekis, L.S., Tsakris, A., Loukova, V., Sofianou, D., and Tzelepi, E. IBC-1, a novel integron-associated class A β-lactamase with extened-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloaca*, Clinical strain. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 44 (2000): 2247-2253.

Gold, H.S., and Moellering, R.C. Antimicrobial-drug resistance. The New England Journal of Medicine 335 (1996): 1445-1453.

Hohmann, E.L. Nontyphoidal salmonellosis. Clinical Infectious Disease 32 (2001): 263-269.

Iqbal Ahmad, Zafar Mehmood, and Faiz Mohammad. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. Journal of Ethanopharmacology 62 (1998): 183-193.

Jacoby, G.A., and Munos-Price, L.S. The New β-lactamases. The New England Journal of Medicine 352 (2005): 380-3991.

Jewes, L.A. Antimicrobial therapy of non-typhi *Salmonella* and *Shigella* infection. Journal of antimicrobial agents and Chemotherapy 19 (1987): 557-560.

John, D. One hundred useful raw drugs of the kani tribes of Trivandrum forest division, Kerala, India. International Journal of Crude Drug Research 22 (1984): 17-39.

Kapur, S.K., and Sarin, Y.K. Medio-botanic survey of medicinal and aromatic plants of Katra valley (J.&K. state) India. Indian Drugs 22 (1984): 4-10.

Kariuki, S., Ravathi, G., Kariuki, M., Murodi, J., and Mwituria, J. Increasing prevalence of Multidrug resistant non-typhoid Salmonella, Kenya, 1994-2003. International Journal of Antimicrobial agents 25 (2005): 38-43.

Kirtikar, K.R., Basu, B.D., and An, I.C.S. Indian medicinal plants (vol. 2). Delhi: Jayyed Press, 1935.

Kiuchi, F. et.al. Screening of crude drug used in Sri Lanka for nematocidal activity on the larva of *Toxacria canis*. Shoyakugaku Zasshi 43 (1989): 288-293.

Kurokawa, M. et.al. Antiviral tradicinal medicines against Hepes simplex virus in *vitro* and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. Antiviral Research 22 (1993): 175-188.

Levy, S.B. Tetracycline resistance determinants are widespread. ASM News 54 (1988): 418-421.

Mahato, S.B., Nandy, A.K., and Kundu, A.P. Pentacyclic triterpeniod sapogenols and their glycosides from *Terminalia bellerica*. Tetrahedron 48 (1992): 2488-2494.

Marks, M., Kazemi, M., and Mackey, E. In vitro sensitivity of Salmonella to ten Antimicrobial Agents Including Sulfamethoxazole and Trimethroprim, Alone and in Combination. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 4 (1973): 555-559.

Marimon, J.M., Gomariz, M., Zigorraga, C., Cilla, G., and Perez, T. Increasing Prevalence of Quinolone Resistance in Human Nontyphoid Salmonella enterica isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 48 (2004): 3789-3793.

Matsumoto, Y., and Inoue, M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β-lactamase from *Enterobacter cloaca*. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 43 (1999): 307-313.

Mendez, B., Tachibana, C., and Levy, S.B. Heterogeneicity of tetracycline resistance determinants. Plasmid 3 (1980): 99-108.

Mokkahasmit, M., Ngarmwathana, W., Sawadimongkol, K., and Permphiphat, U. Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants (continued). J Med Ass Thailand 54 (1971): 490-504.

Mims, C., Dockrell, H.M., Goering, V., Roitt, I. et.al. The bacteria. Medical Microbiology. Edinburgh: Mosby, 2004.

Namba, T. et.al. Studies on dental caries prevention by traditional medicines (Part VII) screening of Ayurvedic medicines for anti-plaque action. Shoyakugayu Zasshi 39 (1985): 146-153.

Nandy, A.K., Poddet, G., Sahu, N.P., and Mahato, S.B. Triterpenoids and their glucosides from *Terminalia bellerica*. Phytochemistry 28 (1989): 2769-2772.

Naovi, S.A.H., Khan, M.S.Y., and Vohora, S.B. Anti-bacterial, anti-fungal and antihelmintic investigations on Indian medicinal plants. Foliterapia 62 (1991): 221-228.

Natarajan, D., John, B.S., Srinirasan, K., and Nagamurugan, N. Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*, A rare medicinal herb. Journal of Ethanopharmacology 102 (2005): 123-126.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically: Approved standard-fifth edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Vol. 20 No. 2 Pensylvania, 2000.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. Performance standards for antimicrobial disk diffusion tests: Approved standard-seventh edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Vol.20 No.1. Penssylvania, 2000.

Old, D, and Threlfall, E.J. Salmonella, in Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th edition. New Yolk: Oxford University Press, 1998.

Orman, B.E., Pineiro, S.A., Arduino, S., Galas, M., Melano, R. Caffer, M.I., Sordelli, D.O., and Centron, D. Evolution of Multiresistance in Nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 46 (2002): 3963-3970.

Owais, M., Sharad, K.S., Shehbaz, A., and Saleemuddin, M. Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plants against experimental murine salmonellosis. Phytomedicine 12 (2005): 229-235.

Perry, L.M., and Metzger. Journal of Medicinal plants of east and southeast Asia. USA: The Massachusettes Institute of Technology. 1980.

Peter, E.D.J., Leverstein-van Hall, M.A., Box, A.T.A et.al. Novel gene cassettes and integrons. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 45 (2001): 2961-2964.

Philippon, L.N., Nass, T., Bouthors, A.T., Barakett, V., and Nordmann, V. OXA-18, a class D clavulanic acid inhibited extended-spectrum β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 41 (1997): 2188-2195.

Rasheed, J.K., Jay, C., Metchock, B. et.al. Evolution of extended-spectrum β-lactamase resistance (SHV-8) in a strain of Escherichia coli during multiple episodes of bacteremia. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 41 (1997): 647-653.

Revathi, G., Shannon, K.P., Stapletton, P.D., Jain, B.K., and French, G.L. An outbreak of extended-spectrum β-lactamase-producing *Salmonella seftenberg* in a burns ward. J Hosp Infect 40 (1998): 295-302.

Reyna, F., Huesca, M., Gonzales, V., and Fusch, Y. Salmonella typhimurium gyr A mutations associated with fluoroquinolones resistance. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 39 (1995): 1621-1623.

Robert, M. Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiological Review 19 (1996): 1-24.

Row, L.R., and Murty, P.S. Chemical examination of *Terminalia bellarica*. Indian Journal of Chemistry 8 (1970): 1047-1048.

Row, L.R., Rukmini, C., and Subba-Rao, G.S.R. Chemistry of *Terminalia* species. II. Chemical examination of *Terminalia bellerica*. Journal of Science and Industrial Research 20 (1961): 554-555.

Sambrook, J., and Russel, D.W. Preparation of plasmid DNA. Molecular cloning: A laboratory manual volume 1. New York: Cold Spring Hador, 2001.

Scalbert, A. Antimcrobial properties of tannins. Phytochemistry 30 (1991): 3875-3883.

Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G. et.al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase from *Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy 44 (2000): 997-1003.

Stephania, D., Nola, C., Bhesh, B., and Dykes, A.G. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. Food Control 17 (2005): 421-464.

Stephen and Peter. Principle and Pratice of Clinical Bacteriology. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

Tiwari, K.C., Majumder, R., and Bhattacharjee, S. Folklore medicine from Assam and Arunachal Pradash (district Tirap). International Journal of Crude Drug Research 17 (1979): 61-67.

Tripathi, S.N., Tiwari, C.M., Upadhyay, B.N., and Singh, R.S. Screening of hypoglycemic action in certain indigenous drugs. J Res Indian Med Yoga Homepathy 14 (1979): 159-169.

Trivadi, V.P., Nesamany, S., and Sharma , V.K. A clinical study on the antitussive and antiasthmatic effects of Vibhitakphal churna (*Terminalia bellerica* Roxb.). J Res Ayur Siddha 3 (1985): 1-8.

Vahaboglu, H, Hall, L.M., Mulazimoglu L., Dodanli, S., Yildirim, I., Livermore, D.M. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. Journal of Medical Microbiology 43 (1995): 294-299.

Vugia, D.J., Samuel, M., Farley, M.M., Marcus, R., Shiferaw. B., Shallow. S., Smith, K., and Angulo, F.J. Invasive *Salmonella* infections in the United State, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. Clinical Infection Disease 38 (2004): 149-156.

Weldhagen, G.F. Integrons and β-lactamases: a novel perspective on resistance. International Journal of Antimicrobial agents 23 (2004): 556-562.

Weerachai Nanakorn. The genus *Terminalia* (Combretaceae) in Thailand. Thai Forest Bulletin 15 (1985): 59-107.

Zhanel, G.G., Homenuik, K., Nichol, K., Noreddin, A. et.al. The glycylcyclines: a comparative review with the tetracycline. Drugs 64 (2004): 63-88.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.1 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)										
		ใบฝรั่งสด	ใบกระเพราขาวสด	ใบกระเพราแดงสด	เปลือกต้นตะเคียนแห้ง	เปลือกต้นสมอดีงูแห้ง	ผลสมอดีงูแห้ง	เปลือกต้นตะคร้อแห้ง	เปลือกผลทับทิมแห้ง	เปลือกต้นอบเชยไทยแห้ง	เปลือกต้นพะยอมแห้ง	เปลือกต้นมะค่าโมงแห้ง
1	Salmonella 1	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
2	Salmonella 2	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
3	Salmonella 3	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
4	Salmonella 4	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
5	Salmonella 5	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
6	Salmonella 6	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
7	Salmonella 7	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
8	Salmonella 8	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
9	Salmonella 9	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
10	Salmonella 10	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
11	Salmonella 11	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
12	Salmonella 12	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
13	Salmonella 13	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
14	Salmonella 14	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
15	Salmonella 15	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.1 (ต่อ) ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)										
		ใบฝรั่งสด	ใบกระเพราขาวสด	ใบกระเพราแดงสด	เปลือกต้นตะเคียนแห้ง	เปลือกต้นสมอดีงูแห้ง	ผลสมอดีงูแห้ง	เปลือกต้นตะคร้อแห้ง	เปลือกผลทับทิมแห้ง	เปลือกต้นอบเชยไทยแห้ง	เปลือกต้นพะยอมแห้ง	เปลือกต้นมะค่าโมงแห้ง
16	Salmonella 16	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
17	Salmonella 17	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
18	Salmonella 18	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
19	Salmonella 19	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
20	Salmonella 20	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
21	Salmonella 21	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
22	Salmonella 22	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
23	Salmonella 23	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
24	Salmonella 24	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
25	Salmonella 25	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
26	Salmonella 26	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
27	Salmonella 27	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
28	Salmonella 28	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
29	Salmonella 29	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
30	Salmonella 30	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.2 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 3 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)										
		ใบฝรั่งสด	ใบกระเพราขาวสด	ใบกระเพราแดงสด	เปลือกต้นตะเคียนแห้ง	เปลือกต้นสมอดีงูแห้ง	ผลสมอดีงูแห้ง	เปลือกต้นตะคร้อแห้ง	เปลือกผลทับทิมแห้ง	เปลือกต้นอบเชยไทยแห้ง	เปลือกต้นพะยอมแห้ง	เปลือกต้นมะค่าโมงแห้ง
1	Salmonella 5	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
2	Salmonella 9	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
3	Salmonella 22	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ = no inhibition zone

ตาราง ภ.3 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 3 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)										
		ใบฝรั่งสด	ใบกระเพราขาวสด	ใบกระเพราแดงสด	เปลือกต้นตะเคียนแห้ง	เปลือกต้นสมอดีงูแห้ง	ผลสมอดีงูแห้ง	เปลือกต้นตะคร้อแห้ง	เปลือกผลทับทิมแห้ง	เปลือกต้นอบเชยไทยแห้ง	เปลือกต้นพะยอมแห้ง	เปลือกต้นมะค่าโมงแห้ง
1	Salmonella 5	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
2	Salmonella 9	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
3	Salmonella 22	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.4 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของพืช 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 5 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)											
		ใบฝรั่งสด		เปลือกผลทับทิมแห้ง		ผลเบญกานีแห้ง		ดอกจันทร์เทศน์แห้ง		ผลมะขามป้อมแห้ง		ผลสมอดีงูแห้ง	
		2.5 มก/มล.	5.0 มก/มล.	2.5 มก/มล.	5.0 มก/มล.	2.5 มก/มล.	5.0 มก/มล.	2.5 มก/มล.	5.0 มก/มล.	2.5 มก/มล.	5.0 มก/มล.	2.5 มก/มล.	5.0 มก/มล.
1	Salmonella 5	NZ	NZ	NZ	7.95	NZ	7.91	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
2	Salmonella 9	NZ	7.50	NZ	7.50	NZ	9.31	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
3	Salmonella 12	NZ	8.30	NZ	NZ	NZ	8.45	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
4	Salmonella 22	NZ	NZ	NZ	8.32	NZ	8.75	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
5	Salmonella 28	NZ	6.78	NZ	9.00	NZ	8.60	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.5 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของพืช 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)		
		ใบฝรั่งสด	เปลือกผลทับทิมแห้ง	ผลเบญกานีแห้ง
1	Salmonella 1	7.46	7.84	9.98
2	Salmonella 2	NZ	NZ	8.98
3	Salmonella 3	NZ	9.65	11.39
4	Salmonella 4	NZ	7.96	10.57
5	Salmonella 5	NZ	8.04	8.89
6	Salmonella 6	NZ	7.97	9.75
7	Salmonella 7	9.03	7.73	10.68
8	Salmonella 8	NZ	7.08	11.51
9	Salmonella 9	7.81	7.81	11.23
10	Salmonella 10	7.10	7.62	11.03
11	Salmonella 11	NZ	7.84	7.89
12	Salmonella 12	8.29	NZ	9.93
13	Salmonella 13	7.41	8.84	8.46
14	Salmonella 14	6.61	6.48	9.31
15	Salmonella 15	6.66	7.06	9.40

NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.5 (ต่อ) ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)		
		ใบฝรั่งสด	เปลือกผลทับทิมแห้ง	ผลเบญกานีแห้ง
16	Salmonella 16	6.89	8.13	8.83
17	Salmonella 17	6.73	6.54	9.90
18	Salmonella 18	6.53	7.86	9.04
19	Salmonella 19	7.19	8.56	10.19
20	Salmonella 20	NZ	7.16	7.94
21	Salmonella 21	NZ	8.45	8.55
22	Salmonella 22	NZ	8.52	9.95
23	Salmonella 23	7.51	7.81	9.92
24	Salmonella 24	7.48	7.40	10.29
25	Salmonella 25	NZ	NZ	12.06
26	Salmonella 26	7.59	7.13	9.51
27	Salmonella 27	7.31	6.82	8.92
28	Salmonella 28	6.85	9.09	11.03
29	Salmonella 29	7.18	7.02	8.08
30	Salmonella 30	5.81	6.94	11.97

NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.6 ข้อมูลจริงของค่า MIC ของสารสกัดน้ำของพืช 2 ชนิด ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ค่า MIC (มก/มล.)	
		เปลือกผลทับทิมแห้ง	ผลเบญกานีแห้ง
1	Salmonella 1	ND	ND
2	Salmonella 2	ND	ND
3	Salmonella 3	10	ND
4	Salmonella 4	ND	ND
5	Salmonella 5	ND	ND
6	Salmonella 6	ND	ND
7	Salmonella 7	ND	ND
8	Salmonella 8	ND	5
9	Salmonella 9	10	ND
10	Salmonella 10	ND	ND
11	Salmonella 11	ND	ND
12	Salmonella 12	ND	ND
13	Salmonella 13	ND	ND
14	Salmonella 14	10	ND
15	Salmonella 15	ND	ND

ND = not determined

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.6 (ต่อ) ข้อมูลจริงของค่า MIC ของสารสกัดน้ำของพืช 2 ชนิด ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ค่า MIC (มก/มล.)	
		เปลือกผลทับทิมแห้ง	ผลเบญกานีแห้ง
16	Salmonella 16	10	ND
17	Salmonella 17	ND	ND
18	Salmonella 18	ND	ND
19	Salmonella 19	ND	1.25
20	Salmonella 20	ND	ND
21	Salmonella 21	10	ND
22	Salmonella 22	ND	5
23	Salmonella 23	ND	5
24	Salmonella 24	10	ND
25	Salmonella 25	10	10
26	Salmonella 26	10	ND
27	Salmonella 27	10	ND
28	Salmonella 28	ND	ND
29	Salmonella 29	10	10
30	Salmonella 30	10	ND

ND = not determined

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.7 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของพืช 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 6 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)									
		ใบมะกอกฝรั่งสด	ใบคราดหัวแหวนสด	ใบพลูคาวสด	ต้นเทียนบ้านเทียนหยดสด	ต้นคนทีเขมาสด	เหง้าขมิ้นชันแห้ง	เหง้าว่านน้ำแห้ง	ผลสมอไทยแห้ง	แก่นมะหาดแห้ง	ผลสมอพิเภกแห้ง
1	Salmonella 1	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	9.50
2	Salmonella 2	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	9.31
3	Salmonella 3	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	9.10
4	Salmonella 16	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	8.69
5	Salmonella 19	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	7.69
6	Salmonella 25	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	8.50

NZ = no inhibition zone

ตาราง ภ.8 ข้อมูลจริงของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของพืช 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 6 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)									
		ใบมะกอกฝรั่งสด	ใบคราดหัวแหวนสด	ใบพลูคาวสด	ต้นเทียนบ้านเทียนหยดสด	ต้นคนทีเขมาสด	เหง้าขมิ้นชันแห้ง	เหง้าว่านน้ำแห้ง	ผลสมอไทยแห้ง	แก่นมะหาดแห้ง	ผลสมอพิเภกแห้ง
1	Salmonella 1	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6.76
2	Salmonella 2	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6.92
3	Salmonella 3	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6.02
4	Salmonella 16	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6.50
5	Salmonella 19	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6.68
6	Salmonella 25	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6.15

NZ = no inhibition zone

ตาราง ภ.9 ข้อมูลจริงของการทดสอบความไวรับของสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/มล. ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (มม.)
1	Salmonella 1	9.98
2	Salmonella 2	9.02
3	Salmonella 3	8.70
4	Salmonella 4	7.18
5	Salmonella 5	6.98
6	Salmonella 6	7.08
7	Salmonella 7	9.88
8	Salmonella 8	7.69
9	Salmonella 9	7.64
10	Salmonella 10	9.03
11	Salmonella 11	6.50
12	Salmonella 12	6.92
13	Salmonella 13	7.38
14	Salmonella 14	7.69
15	Salmonella 15	7.25
16	Salmonella 16	6.92
17	Salmonella 17	7.75
18	Salmonella 18	8.21
19	Salmonella 19	7.84
20	Salmonella 20	8.93
21	Salmonella 21	7.98
22	Salmonella 22	7.52
23	Salmonella 23	8.86
24	Salmonella 24	8.84
25	Salmonella 25	7.99
26	Salmonella 26	9.55
27	Salmonella 27	7.11
28	Salmonella 28	8.46
29	Salmonella 29	8.66
30	Salmonella 30	7.58

81

ตาราง ภ.10 ข้อมูลจริงของการตรวจความไวรับของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ampicillin		amoxicillin/clavulanic acid		norfloxacin		tetracycline	
		ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล	ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล	ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล	ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล
1	Salmonella 1	24.59	S	26.94	S	23.92	S	21.83	S
2	Salmonella 2	26.12	S	26.98	S	24.85	S	NZ	R
3	Salmonella 3	NZ	R	24.96	S	27.02	S	NZ	R
4	Salmonella 4	24.55	S	28.24	S	35.08	S	20.10	S
5	Salmonella 5	28.32	S	30.73	S	18.41	S	22.16	S
6	Salmonella 6	27.99	S	30.82	S	38.09	S	19.48	S
7	Salmonella 7	25.85	S	22.81	S	20.92	S	NZ	R
8	Salmonella 8	NZ	R	28.66	S	35.15	S	11.56	R
9	Salmonella 9	NZ	R	26.78	S	28.87	S	NZ	R
10	Salmonella 10	25.78	S	27.57	S	35.70	S	22.98	S
11	Salmonella 11	25.37	S	31.05	S	38.67	S	21.00	S
12	Salmonella 12	30.24	S	34.59	S	44.73	S	25.51	S
13	Salmonella 13	27.21	S	31.20	S	37.83	S	25.34	S
14	Salmonella 14	NZ	R	12.06	R	NZ	R	NZ	R
15	Salmonella 15	26.61	S	30.09	S	36.88	S	20.43	S

R = resistant, I = Intermediate, S = Susceptible, NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.10 (ต่อ) ข้อมูลจริงของการตรวจความไวรับของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ampicillin		amoxicillin/clavulanic acid		norfloxacin		tetracycline	
		ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล	ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล	ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล	ขนาด inhibition zone (มม.)	การแปลผล
16	Salmonella 16	NZ	R	26.74	S	40.60	S	24.66	S
17	Salmonella 17	31.74	S	38.26	S	34.59	S	15.34	I
18	Salmonella 18	24.83	S	29.96	S	36.49	S	22.99	S
19	Salmonella 19	NZ	R	21.94	S	31.21	S	NZ	R
20	Salmonella 20	NZ	R	23.26	S	27.64	S	NZ	R
21	Salmonella 21	NZ	R	26.01	S	28.83	S	NZ	R
22	Salmonella 22	26.86	S	32.65	S	39.30	S	24.56	S
23	Salmonella 23	24.94	S	26.69	S	35.69	S	22.48	S
24	Salmonella 24	25.50	S	28.92	S	28.28	S	20.69	S
25	Salmonella 25	NZ	R	26.10	S	30.77	S	NZ	R
26	Salmonella 26	26.05	S	26.92	S	27.65	S	NZ	R
27	Salmonella 27	24.20	S	26.83	S	35.29	S	21.74	S
28	Salmonella 28	31.28	S	31.29	S	34.93	S	20.87	S
29	Salmonella 29	24.15	S	29.13	S	37.82	S	22.57	S
30	Salmonella 30	NZ	R	27.42	S	32.51	S	NZ	R

R = resistant, I = Intermediate, S = Susceptible, NZ = no inhibition zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.11 ข้อมูลจริงของการหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆและสารสกัดแอลกอฮอล์ของผลสมอพิเภก ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ampicillin		amoxicillin		norfloxacin		tetracycline		สารสกัดแอลกอฮอล์จากผลสมอพิเภกแก่
		ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มก/มล.)
1	Salmonella 1	2	S	1	S	2	S	1	S	40
2	Salmonella 2	1	S	1	S	2	S	256	R	40
3	Salmonella 3	256	R	> 256	R	2	S	64	R	40
4	Salmonella 4	4	S	1	S	0.25	S	1	S	40
5	Salmonella 5	1	S	4	S	0.25	S	1	S	40
6	Salmonella 6	1	S	1	S	0.25	S	1	S	40
7	Salmonella 7	1	S	1	S	0.25	S	64	R	40
8	Salmonella 8	> 256	R	> 256	R	8	I	128	R	40
9	Salmonella 9	256	R	128	R	2	S	128	R	40
10	Salmonella 10	2	S	1	S	0.5	S	1	S	40
11	Salmonella 11	2	S	4	S	0.25	S	1	S	40
12	Salmonella 12	1	S	2	S	0.25	S	1	S	40
13	Salmonella 13	2	S	4	S	0.5	S	2	S	40
14	Salmonella 14	256	R	256	R	128	R	256	R	40
15	Salmonella 15	2	S	8	S	0.25	S	1	S	40

R = resistant, I = Intermediate, S = Susceptible

(break point ของ ampicillin, amoxicillin, norfloxacin และ tetracycline เท่ากับ 8, 8, 4 และ 8 มคก/มล. ตามลำดับ)

ตาราง ภ.11 (ต่อ) ข้อมูลจริงของการหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆและสารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภก ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ampicillin		amoxicillin		norfloxacin		Tetracycline		สารสกัดแอลกอฮอล์จากผลสมอพิเภกแก่
		ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มคก/มล.)	การแปลผล	ค่า MIC (มก/มล.)
16	Salmonella 16	256	R	> 256	R	0.25	S	1	S	40
17	Salmonella 17	1	S	1	S	2	S	64	R	40
18	Salmonella 18	2	S	1	S	0.5	S	1	S	40
19	Salmonella 19	256	R	> 256	R	0.5	S	128	R	40
20	Salmonella 20	> 256	R	> 256	R	2	S	128	R	40
21	Salmonella 21	> 256	R	> 256	R	2	S	128	R	40
22	Salmonella 22	2	S	1	S	0.5	S	1	S	40
23	Salmonella 23	1	S	1	S	0.5	S	1	S	40
24	Salmonella 24	2	S	1	S	2	S	1	S	40
25	Salmonella 25	256	R	> 256	R	2	S	128	R	40
26	Salmonella 26	1	S	1	S	2	S	256	R	40
27	Salmonella 27	1	S	1	S	0.25	S	1	S	40
28	Salmonella 28	0.5	S	1	S	0.25	S	1	S	40
29	Salmonella 29	2	S	8	S	0.25	S	1	S	40
30	Salmonella 30	256	R	256	R	2	S	128	R	40

R = resistant, I = Intermediate, S = Susceptible

(break point ของ ampicillin, amoxicillin, norfloxacin และ tetracycline เท่ากับ 8, 8, 4 และ 8 มคก/มล. ตามลำดับ)

ตาราง ภ.12 ข้อมูลจริงของการตรวจหาเอนไซม์ β-lactamase และผลการตรวจยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยากลุ่ม β-lactams และยีนที่ถ่ายทอดการดื้อยา ในเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 30 ไอโซเลท

หมายเลข	ไอโซเลท	ผลการตรวจเอนไซม์ β-lactamase	ผลการตรวจยีนที่มีบทบาทต่อการดื้อยากลุ่ม β-lactams และยีนที่ถ่ายทอดการดื้อยา			
			bla$_{TEM}$	*bla*$_{SHV}$	*bla*$_{CTX-M}$	*Integrase*
1	Salmonella 1	-	-	-	-	-
2	Salmonella 2	-	-	-	-	-
3	Salmonella 3	+	-	-	-	-
4	Salmonella 4	-	-	-	-	-
5	Salmonella 5	-	-	-	-	-
6	Salmonella 6	-	-	-	-	-
7	Salmonella 7	-	-	-	-	-
8	Salmonella 8	+	-	-	-	-
9	Salmonella 9	+	-	-	-	-
10	Salmonella 10	-	-	-	-	-
11	Salmonella 11	-	-	-	-	-
12	Salmonella 12	-	-	-	-	-
13	Salmonella 13	-	-	-	-	-
14	Salmonella 14	+	-	-	-	+
15	Salmonella 15	-	-	-	-	-
16	Salmonella 16	+	-	-	-	-
17	Salmonella 17	-	-	-	-	-
18	Salmonella 18	-	-	-	-	-
19	Salmonella 19	+	-	-	-	-
20	Salmonella 20	+	-	-	-	-
21	Salmonella 21	+	-	-	-	-
22	Salmonella 22	-	-	-	-	-
23	Salmonella 23	-	-	-	-	-
24	Salmonella 24	-	-	-	-	-
25	Salmonella 25	+	-	-	-	-
26	Salmonella 26	-	-	-	-	-
27	Salmonella 27	-	-	-	-	-
28	Salmonella 28	-	-	-	-	-
29	Salmonella 29	-	-	-	-	-
30	Salmonella 30	+	-	-	-	-

(+) = positive, (-) = negative

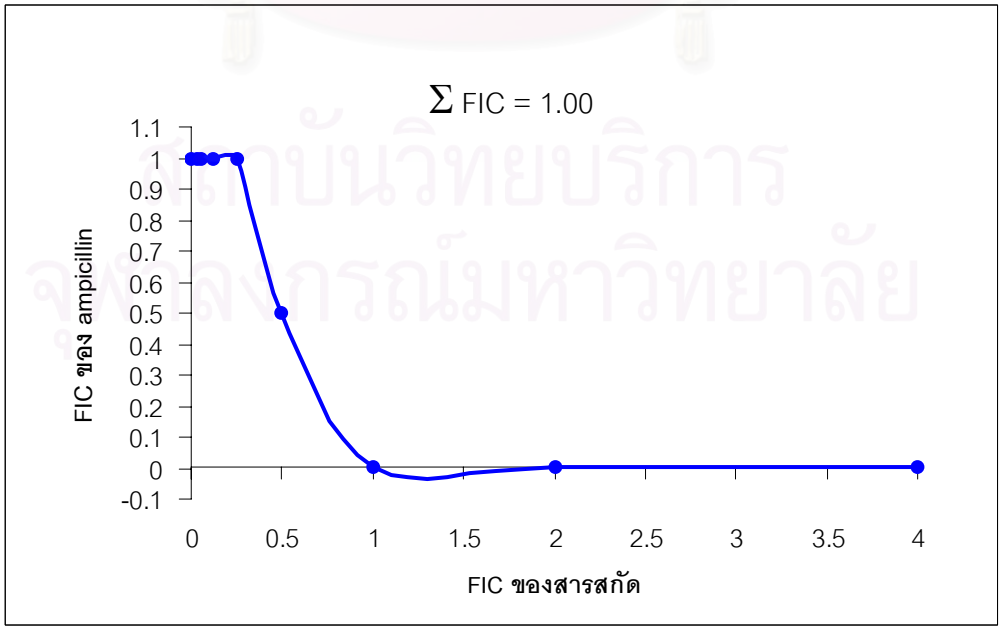
รูปที่ ภ.1 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 28

(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ 0.5 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด								
160	160/0.01	160/0.03	160/0.06	160/0.125	160/0.25	160/0.5	160/1	160/2
80	80/0.01	80/0.03	80/0.06	80/0.125	80/0.25	80/0.5	80/1	80/2
40	40/0.01	40/0.03	40/0.06	40/0.125	40/0.25	40/0.5	40/1	40/2
20	20/0.01	20/0.03	20/0.06	20/0.125	20/0.25	20/0.5	20/1	20/2
10	10/0.01	10/0.03	10/0.06	10/0.125	10/0.25	10/0.5	10/1	10/2
5	5/0.01	5/0.03	5/0.06	5/0.125	5/0.25	5/0.5	5/1	5/2
2.5	2.5/0.01	2.5/0.03	2.5/0.06	2.5/0.125	2.5/0.25	2.5/0.5	2.5/1	2.5/2
1.25	1.25/0.01	1.25/0.03	1.25/0.06	1.25/0.125	1.25/0.25	1.25/0.5	1.25/1	1.25/2
	0.01	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2
	ampicillin							

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	0.5	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1	1.25	1.125	1.06	1.03	1



รูปที่ ภ.2 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 2, 5, 12, 17, 23, 26 และ 27

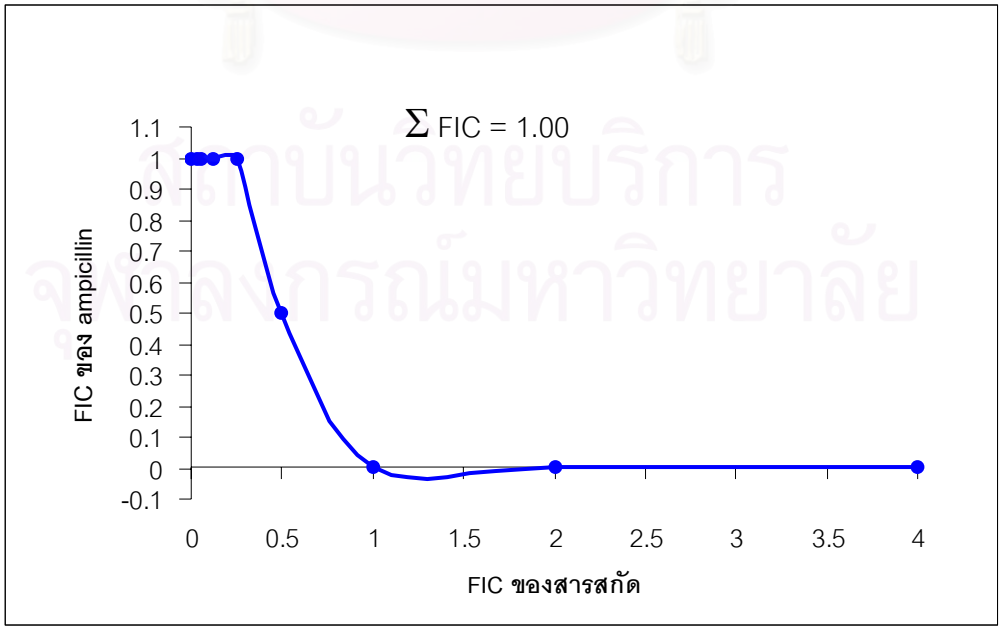
(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ 1 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด									
160	160/0.03	160/0.06	160/0.125	160/0.25	160/0.5	160/1	160/2	160/4
80	80/0.03	80/0.06	80/0.125	80/0.25	80/0.5	80/1	80/2	80/4
40	40/0.03	40/0.06	40/0.125	40/0.25	40/0.5	40/1	40/2	40/4
20	20/0.03	20/0.06	20/0.125	20/0.25	20/0.5	20/1	20/2	20/4
10	10/0.03	10/0.06	10/0.125	10/0.25	10/0.5	10/1	10/2	10/4
5	5/0.03	5/0.06	5/0.125	5/0.25	5/0.5	5/1	5/2	5/4
2.5	2.5/0.03	2.5/0.06	2.5/0.125	2.5/0.25	2.5/0.5	2.5/1	2.5/2	2.5/4
1.25	1.25/0.03	1.25/0.06	1.25/0.125	1.25/0.25	1.25/0.5	1.25/1	1.25/2	1.25/4
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4

ampicillin

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	0.5	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1	1.25	1.125	1.06	1.03	1

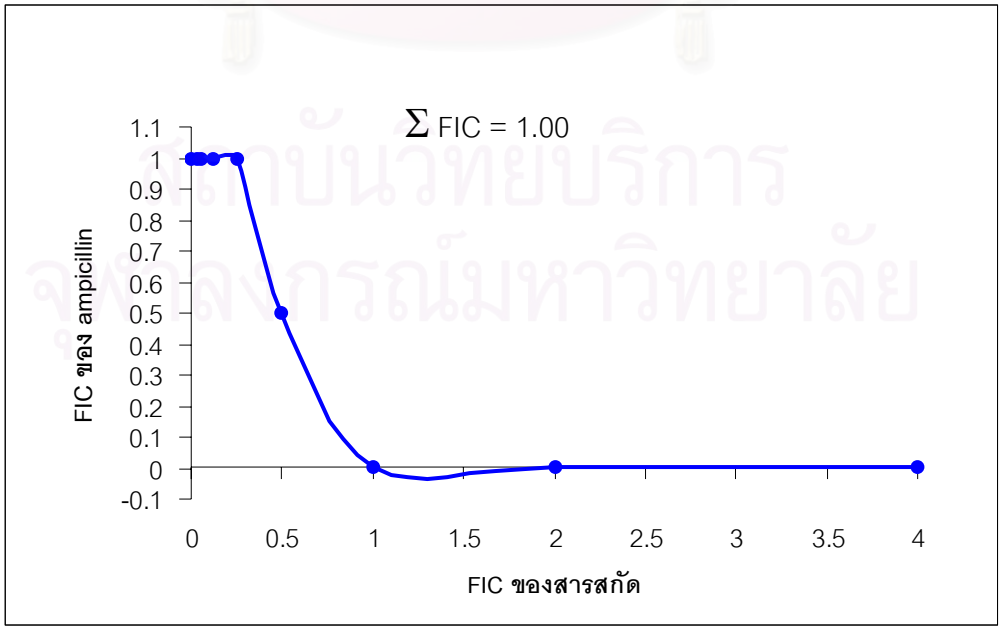


รูปที่ ภ.3 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 10, 11, 13, 15, 18, 22 และ 29
(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ 2 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด								
160	160/0.06	160/0.125	160/0.25	160/0.5	160/1	160/2	160/4	160/8
80	80/0.06	80/0.125	80/0.25	80/0.5	80/1	80/2	80/4	80/8
40	40/0.06	40/0.125	40/0.25	40/0.5	40/1	40/2	40/4	40/8
20	20/0.06	20/0.125	20/0.25	20/0.5	20/1	20/2	20/4	20/8
10	10/0.06	10/0.125	10/0.25	10/0.5	10/1	10/2	10/4	10/8
5	5/0.06	5/0.125	5/0.25	5/0.5	5/1	5/2	5/4	5/8
2.5	2.5/0.06	2.5/0.125	2.5/0.25	2.5/0.5	2.5/1	2.5/2	2.5/4	2.5/8
1.25	1.25/0.06	1.25/0.125	1.25/0.25	1.25/0.5	1.25/1	1.25/2	1.25/4	1.25/8
	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8

ampicillin

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	0.5	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1	1.25	1.125	1.06	1.03	1

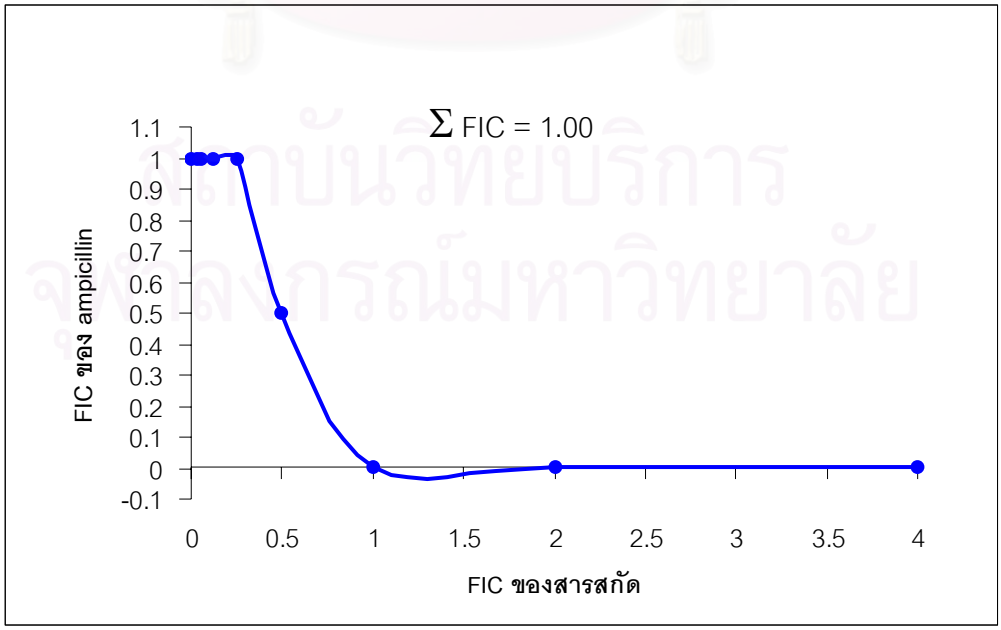


รูปที่ ภ.4 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเพิ่มฤทธิ์ (additive) ซึ่งได้แก่ Salmonella 3, 9, 14, 16, 19, 25 และ 30
(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ 256 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด									
160	160/8	160/16	160/32	160/64	160/128	160/256	160/512	160/1024
80	80/8	80/16	80/32	80/64	80/128	80/256	80/512	80/1024
40	40/8	40/16	40/32	40/64	40/128	40/256	40/512	40/1024
20	20/8	20/16	20/32	20/64	20/128	20/256	20/512	20/1024
10	10/8	10/16	10/32	10/64	10/128	10/256	10/512	10/1024
5	5/8	5/16	5/32	5/64	5/128	5/256	5/512	5/1024
2.5	2.5/8	2.5/16	2.5/32	2.5/64	2.5/128	2.5/256	2.5/512	2.5/1024
1.25	1.25/8	1.25/16	1.25/32	1.25/64	1.25/128	1.25/256	1.25/512	1.25/1024
	8	16	32	64	128	256	512	1024

ampicillin

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	0.5	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1	1.25	1.125	1.06	1.03	1



รูปที่ ภ.5 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 6 และ 7

(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ 1 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

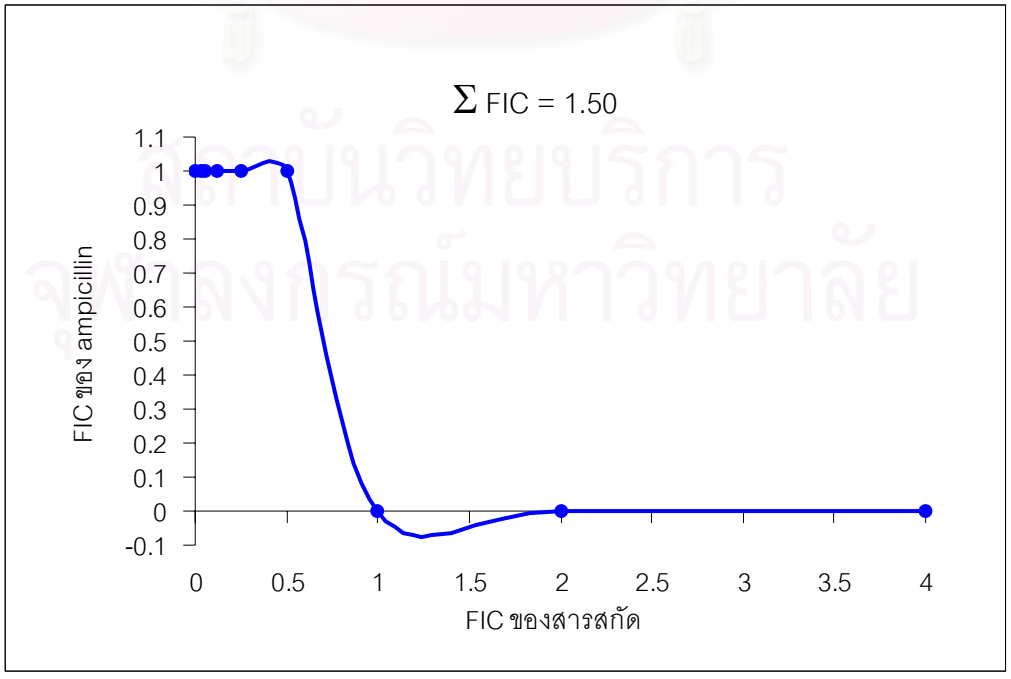
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด ↑

160	160/0.03	160/0.06	160/0.125	160/0.25	160/0.5	160/1	160/2	160/4
80	80/0.03	80/0.06	80/0.125	80/0.25	80/0.5	80/1	80/2	80/4
40	40/0.03	40/0.06	40/0.125	40/0.25	40/0.5	40/1	40/2	40/4
20	20/0.03	20/0.06	20/0.125	20/0.25	20/0.5	20/1	20/2	20/4
10	10/0.03	10/0.06	10/0.125	10/0.25	10/0.5	10/1	10/2	10/4
5	5/0.03	5/0.06	5/0.125	5/0.25	5/0.5	5/1	5/2	5/4
2.5	2.5/0.03	2.5/0.06	2.5/0.125	2.5/0.25	2.5/0.5	2.5/1	2.5/2	2.5/4
1.25	1.25/0.03	1.25/0.06	1.25/0.125	1.25/0.25	1.25/0.5	1.25/1	1.25/2	1.25/4
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4

ampicillin →

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1.50	1.25	1.125	1.06	1.03	1



รูปที่ ภ.6 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 1 และ 24

(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ 2 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

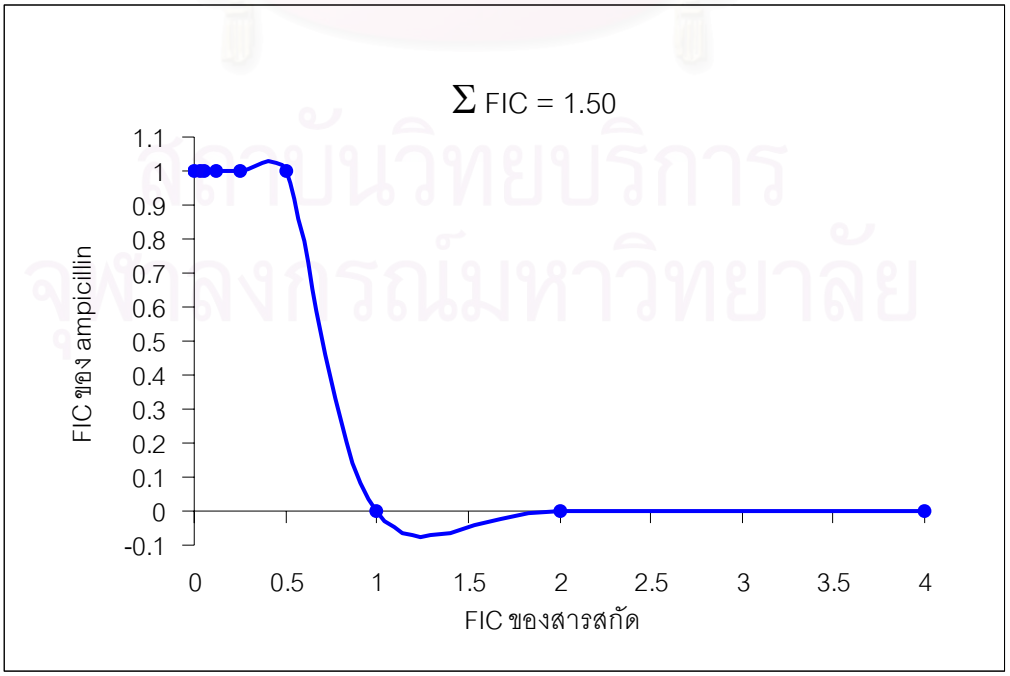
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด ↑

160	160/0.06	160/0.125	160/0.25	160/0.5	160/1	160/2	160/4	160/8
80	80/0.06	80/0.125	80/0.25	80/0.5	80/1	80/2	80/4	80/8
40	40/0.06	40/0.125	40/0.25	40/0.5	40/1	40/2	40/4	40/8
20	20/0.06	20/0.125	20/0.25	20/0.5	20/1	20/2	20/4	20/8
10	10/0.06	10/0.125	10/0.25	10/0.5	10/1	10/2	10/4	10/8
5	5/0.06	5/0.125	5/0.25	5/0.5	5/1	5/2	5/4	5/8
2.5	2.5/0.06	2.5/0.125	2.5/0.25	2.5/0.5	2.5/1	2.5/2	2.5/4	2.5/8
1.25	1.25/0.06	1.25/0.125	1.25/0.25	1.25/0.5	1.25/1	1.25/2	1.25/4	1.25/8
	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8

ampicillin →

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1.50	1.25	1.125	1.06	1.03	1



รูปที่ ภ.7 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 4

(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ 4 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

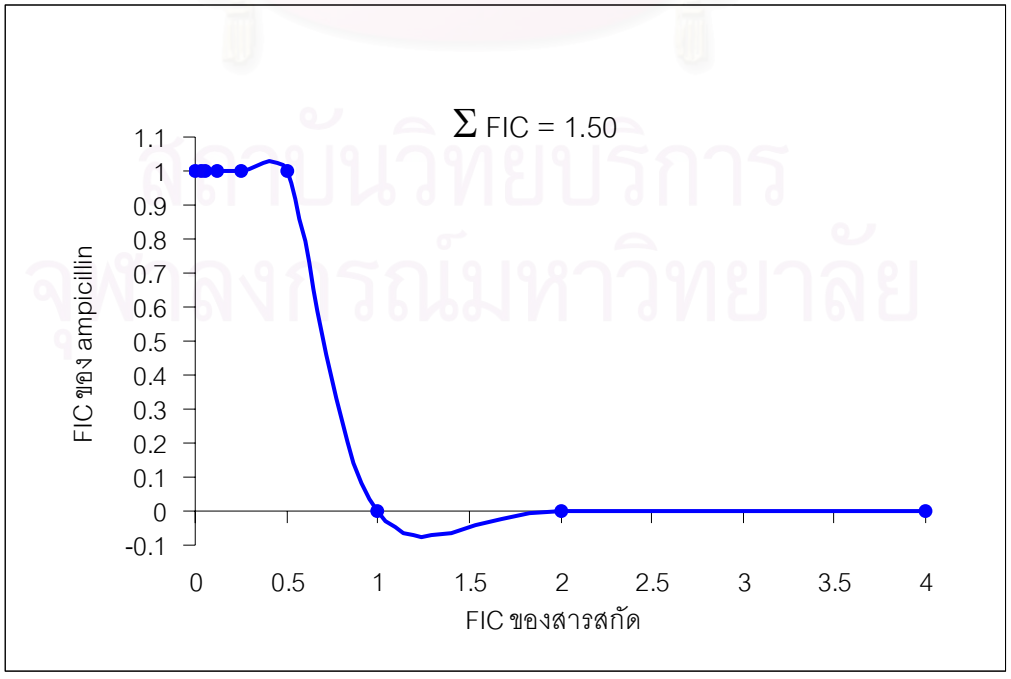
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด ↑

160	160/0.125	160/0.25	160/0.5	160/1	160/2	160/4	160/8	160/16
80	80/0.125	80/0.25	80/0.5	80/1	80/2	80/4	80/8	80/16
40	40/0.125	40/0.25	40/0.5	40/1	40/2	40/4	40/8	40/16
20	20/0.125	20/0.25	20/0.5	20/1	20/2	20/4	20/8	20/16
10	10/0.125	10/0.25	10/0.5	10/1	10/2	10/4	10/8	10/16
5	5/0.125	5/0.25	5/0.5	5/1	5/2	5/4	5/8	5/16
2.5	2.5/0.125	2.5/0.25	2.5/0.5	2.5/1	2.5/2	2.5/4	2.5/8	2.5/16
1.25	1.25/0.125	1.25/0.25	1.25/0.5	1.25/1	1.25/2	1.25/4	1.25/8	1.25/16
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16

ampicillin →

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1.50	1.25	1.125	1.06	1.03	1



รูปที่ ภ.8 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 8, 20 และ 21

(เมื่อค่า MIC ต่อ ampicillin และสารสกัด เท่ากับ > 256 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

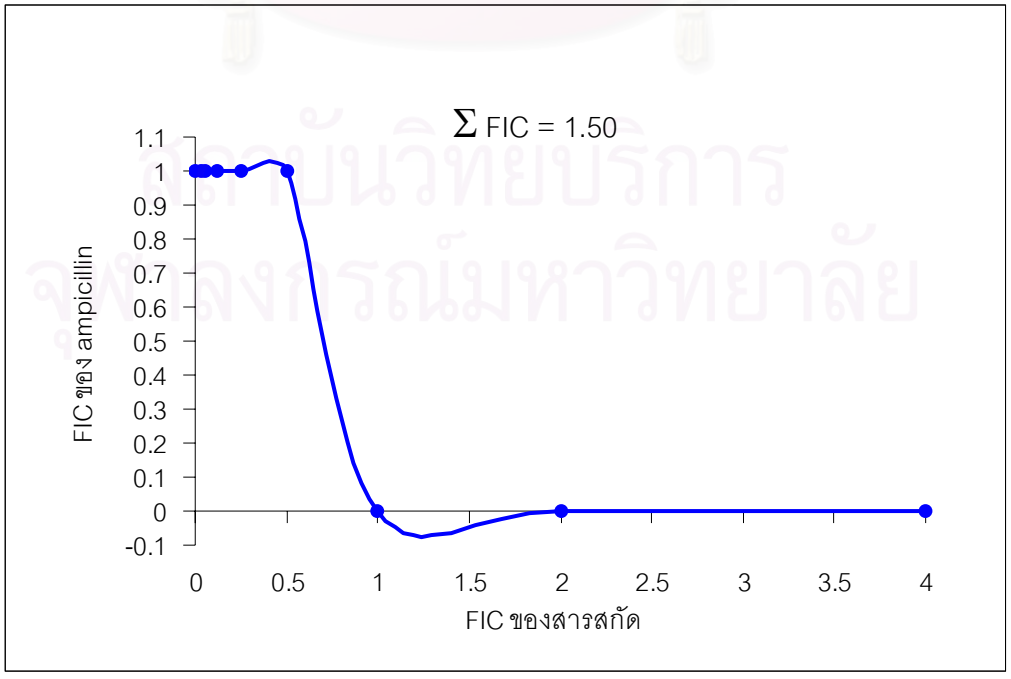
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด

160	160/8	160/1	160/32	160/64	160/128	160/256	160/512	160/1024
80	80/8	80/16	80/32	80/64	80/128	80/256	80/512	80/1024
40	40/8	40/16	40/32	40/64	40/128	40/256	40/512	40/1024
20	20/8	20/16	20/32	20/64	20/128	20/256	20/512	20/1024
10	10/8	10/16	10/32	10/64	10/128	10/256	10/512	10/1024
5	5/8	5/16	5/32	5/64	5/128	5/256	5/512	5/1024
2.5	2.5/8	2.5/16	2.5/32	2.5/64	2.5/128	2.5/256	2.5/512	2.5/1024
1.25	1.25/8	1.25/16	1.25/32	1.25/64	1.25/128	1.25/256	1.25/512	1.25/1024
	8	16	32	64	128	256	512	1024

ampicillin

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ ampicillin	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1.50	1.25	1.125	1.06	1.03	1



รูปที่ ภ.9 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 3, 7 และ 17

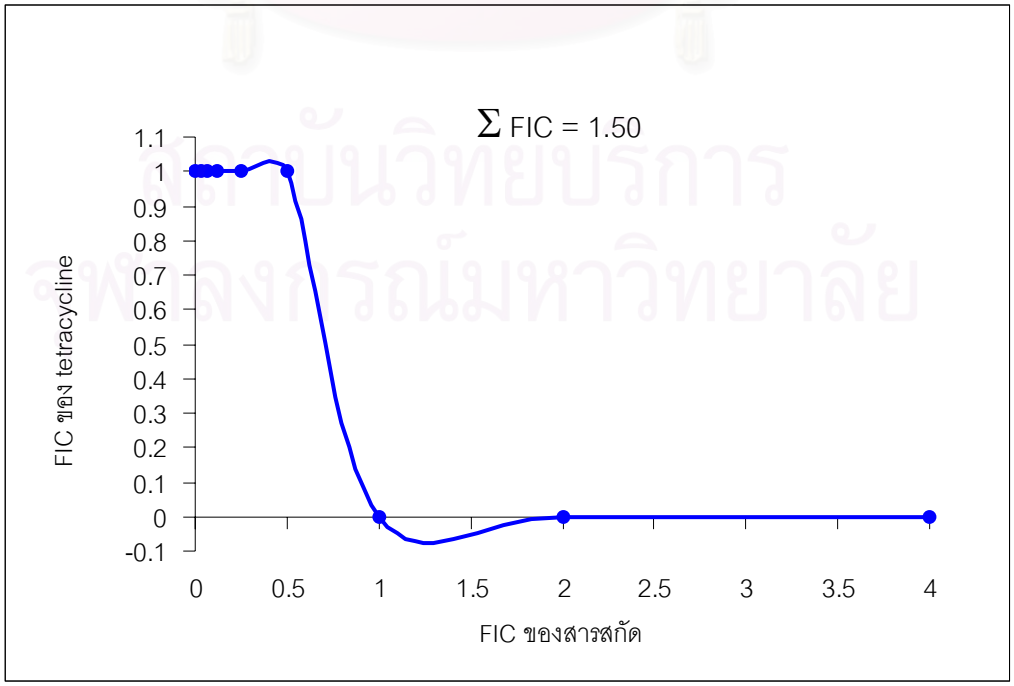
(เมื่อค่า MIC ต่อ tetracycline และสารสกัด เท่ากับ 64 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด ↑								
160	160/2	160/4	160/8	160/16	160/32	160/64	160/128	160/256
80	80/2	80/4	80/8	80/16	80/32	80/64	80/128	80/256
40	40/2	40/4	40/8	40/16	40/32	40/64	40/128	40/256
20	20/2	20/4	20/8	20/16	20/32	20/64	20/128	20/256
10	10/2	10/4	10/8	10/16	10/32	10/64	10/128	10/256
5	5/2	5/4	5/8	5/16	5/32	5/64	5/128	5/256
2.5	2.5/2	2.5/4	2.5/8	2.5/16	2.5/32	2.5/64	2.5/128	2.5/256
1.25	1.25/2	1.25/4	1.25/8	1.25/16	1.25/32	1.25/64	1.25/128	1.25/256
	2	4	8	16	32	64	128	256

tetracycline →

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ tetracycline	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1.50	1.25	1.125	1.06	1.03	1

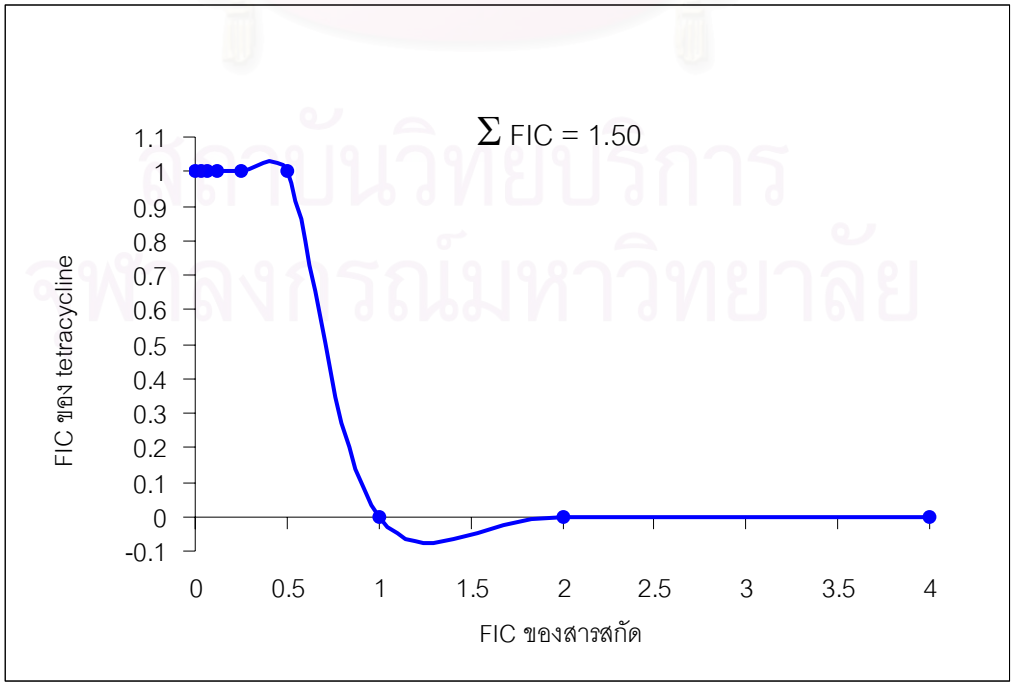


รูปที่ ภ.10 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 8, 9, 19, 20, 21 และ 25
(เมื่อค่า MIC ต่อ tetracycline และสารสกัด เท่ากับ 128 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)
(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด								
160	160/4	160/8	160/16	160/32	160/64	160/128	160/256	160/512
80	80/4	80/8	80/16	80/32	80/64	80/128	80/256	80/512
40	40/4	40/8	40/16	40/32	40/64	40/128	40/256	40/512
20	20/4	20/8	20/16	20/32	20/64	20/128	20/256	20/512
10	10/4	10/8	10/16	10/32	10/64	10/128	10/256	10/512
5	5/4	5/8	5/16	5/32	5/64	5/128	5/256	5/512
2.5	2.5/4	2.5/8	2.5/16	2.5/32	2.5/64	2.5/128	2.5/256	2.5/512
1.25	1.25/4	1.25/8	1.25/16	1.25/32	1.25/64	1.25/128	1.25/256	1.25/256
	4	8	16	32	64	128	256	512

tetracycline

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ tetracycline	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1.50	1.25	1.125	1.06	1.03	1



รูปที่ ภ.11 ผลการประเมินฤทธิ์ร่วมของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ tetracycline ,การคำนวณค่า Σ FIC และลักษณะกราฟ isobologram ของเชื้อกลุ่ม NTS ที่แสดงผลเป็นไม่มีผลต่อกัน (indifference) ซึ่งได้แก่ Salmonella 2, 14 และ 26

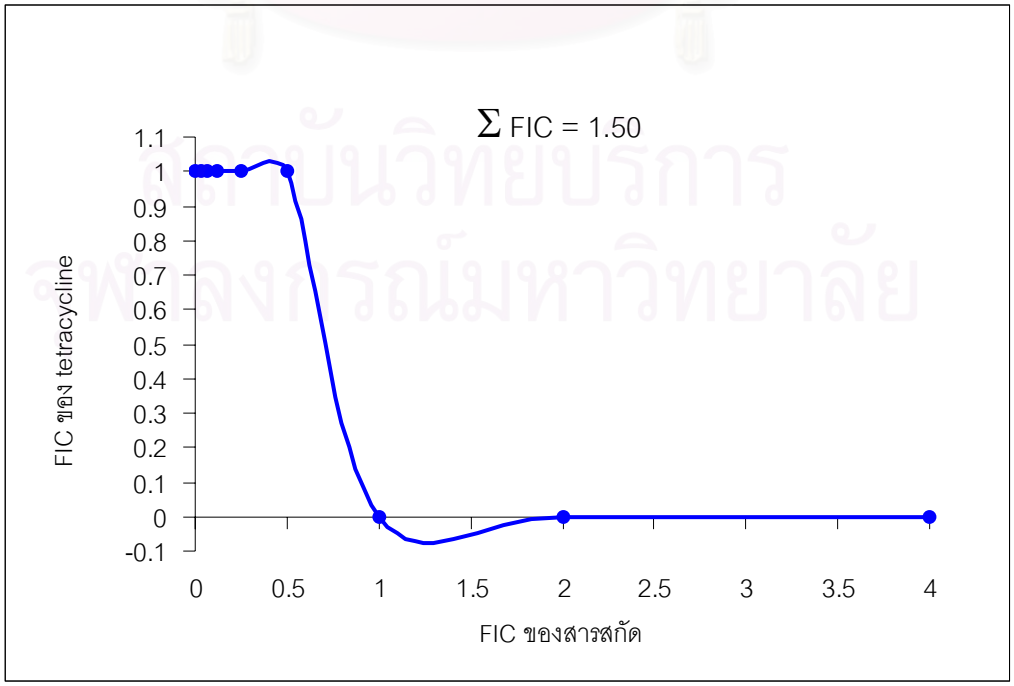
(เมื่อค่า MIC ต่อ tetracycline และสารสกัด เท่ากับ 256 มคก/มล. และ 40 มก/มล. ตามลำดับ)

(ส่วนที่แรเงา: มีเชื้อเจริญ, ส่วนที่ไม่แรเงา: ไม่มีเชื้อเจริญ)

สารสกัด									
160	160/8	160/1	160/32	160/64	160/128	160/256	160/512	160/1024
80	80/8	80/16	80/32	80/64	80/128	80/256	80/512	80/1024
40	40/8	40/16	40/32	40/64	40/128	40/256	40/512	40/1024
20	20/8	20/16	20/32	20/64	20/128	20/256	20/512	20/1024
10	10/8	10/16	10/32	10/64	10/128	10/256	10/512	10/1024
5	5/8	5/16	5/32	5/64	5/128	5/256	5/512	5/1024
2.5	2.5/8	2.5/16	2.5/32	2.5/64	2.5/128	2.5/256	2.5/512	2.5/1024
1.25	1.25/8	1.25/16	1.25/32	1.25/64	1.25/128	1.25/256	1.25/512	1.25/1024
	8	16	32	64	128	256	512	1024

tetracycline

ค่า FIC ของสารสกัด	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0
ค่า FIC ของ tetracycline	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ค่า Σ FIC	4	2	1	1.50	1.25	1.125	1.06	1.03	1



ตาราง ภ.13 ข้อมูลจริงของการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin โดยวิธี time kill

ไอโซเลท	สารทดสอบ	Viable count (CFU/ml) ที่เวลาต่างๆ						Log viable count (log CFU/ml) ที่เวลาต่างๆ					
		0	2	4	6	8	24	0	2	4	6	8	24
1. Salmonella 3	1. Control	1.50E+06	1.13E+08	1.88E+11	2.65E+13	3.13E+16	3.33E+20	6.1761	8.0512	11.2730	13.4232	16.4949	20.5218
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	1.73E+06	2.15E+05	1.98E+05	1.53E+05	1.30E+05	9.25E+04	6.2368	5.3324	5.2956	5.1833	5.1139	4.9661
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	1.70E+06	2.68E+05	2.20E+05	2.08e+08	3.30E+13	2.18E+15	6.2304	5.4273	5.3424	8.3170	13.5185	15.3375
	4. สารสกัด + ampicillin	1.53E+06	9.75E+04	3.30E+04	2.53E+04	1.80E+04	1.53E+04	6.1833	4.9890	4.5185	4.4023	4.2553	4.1833
2. Salmonella 9	1. Control	1.55E+06	1.83E+06	1.38E+10	2.58E+13	2.03E+16	2.03E+19	6.1903	6.2613	10.1383	13.4108	16.3064	19.3064
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	1.50E+06	9.00E+04	2.05E+05	1.30E+05	1.85E+04	5.50E+03	6.1761	4.9542	5.3118	5.1139	4.2672	3.7404
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	1.58E+06	1.85E+05	1.93E+05	1.93E+05	1.88E+07	1.70E+10	6.1973	5.2672	4.2844	5.2844	7.2730	10.2304
	4. สารสกัด + ampicillin	1.53E+06	6.25E+04	8.75E+04	4.50E+04	7.50E+03	3.75E+03	6.1833	4.7959	4.9420	4.6532	3.8751	3.5740
3. Salmonella 14	1. Control	1.75e+06	1.35E+07	1.83E+11	1.68E+16	1.55E+18	1.38E+22	6.2430	7.1303	11.2613	16.2240	18.1903	22.1383
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	1.68E+06	1.50E+05	9.00E+04	8.50E+05	1.28E+05	7.50E+04	6.2240	5.1761	4.9542	5.9294	5.1055	4.8751
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	1.73E+06	1.70E+05	9.50E+06	1.40E+09	1.53E+11	1.53E+15	6.2368	5.2304	6.9778	9.1461	11.1833	15.1833
	4. สารสกัด + ampicillin	1.78E+06	1.45E+05	8.25E+04	5.50E+05	5.00E+04	7.25E+03	6.2492	5.1614	4.9165	4.7404	4.6990	3.8603

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.13 (ต่อ) ข้อมูลจริงจากการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin โดยวิธี time kill

ไอโซเลท	สารทดสอบ	Viable count (CFU/ml) ที่เวลาต่างๆ						Log viable count (log CFU/ml) ที่เวลาต่างๆ					
		0	2	4	6	8	24	0	2	4	6	8	24
4. Salmonella 16	1. Control	1.48E+06	1.98E+06	2.18E+09	2.38E+13	2.03E+16	1.18E+19	6.1688	6.2956	9.3375	13.3757	16.3064	19.0700
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	1.55E+06	1.90E+05	3.00E+05	2.55E+04	1.65E+04	1.03e+04	6.1903	5.2788	5.4771	4.4065	4.2175	4.0107
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	1.58E+06	2.08E+05	2.28E+05	1.13E+06	1.93E+08	1.25E+12	6.1973	5.3170	5.3570	6.0512	8.2844	12.0969
	4. สารสกัด + ampicillin	1.63E+06	1.78E+05	1.20E+05	1.53E+04	9.25E+03	6.00E+03	6.2109	5.2492	5.0792	4.1833	3.9661	3.7782
5. Salmonella 19	1. Control	1.60E+06	2.48E+07	1.88E+09	3.00E+13	2.58E+18	8.00E+20	6.2041	6.3936	9.2730	13.4771	18.4108	20.9031
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	1.33E+06	2.60E+05	1.28E+05	1.73E+05	7.25E+04	3.25E+04	6.1222	5.4150	5.1055	5.2368	4.8603	5.4119
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	1.25E+06	1.83E+05	2.78E+07	3.00E+11	3.30E+12	2.70E+15	6.0969	5.2613	7.4433	11.4771	12.5185	15.4314
	4. สารสกัด + ampicillin	1.25E+06	1.48E+05	2.55E+05	2.40E+05	1.73E+05	6.50E+04	6.0969	5.1688	5.4065	5.3802	5.2368	4.8129
6. Salmonella 25	1. Control	1.95E+06	2.48E+07	1.05E+12	1.10E+15	1.53E+18	1.60E+20	6.2900	7.3936	12.0212	15.0414	18.1833	20.2041
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	2.20E+06	8.50E+04	1.50E+04	1.23E+04	9.50E+03	5.25E+03	6.3424	4.9294	4.1761	4.0881	3.9777	3.7202
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	2.10E+06	1.90E+05	1.93E+04	1.30E+05	1.15E+09	1.90E+13	6.3222	5.2788	4.2844	5.1139	9.0607	13.2788
	4. สารสกัด + ampicillin	1.93E+06	4.75E+04	1.18E+04	8.00E+03	3.50E+03	3.00E+03	6.2844	4.6767	4.0700	3.9031	3.5441	3.4771

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.13 (ต่อ) ข้อมูลจริงจากการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อของการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของลูกสมอพิเภกร่วมกับ ampicillin ต่อเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin โดยวิธี time kill

สายพันธุ์	สารทดสอบ	Viable count (CFU/ml) ที่เวลาต่างๆ						Log viable count (log CFU/ml) ที่เวลาต่างๆ					
		0	2	4	6	8	24	0	2	4	6	8	24
7. Salmonella 30	1. control	1.68E+06	1.40E+07	1.80E+10	2.00E+13	1.75E+17	2.63E+18	6.2240	7.1461	10.2553	13.3010	17.2430	18.4191
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	1.55E+06	1.83E+05	1.55E+05	2.28E+04	2.00E+04	9.75E+03	6.1903	5.2613	5.1903	4.3570	4.3010	3.9890
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	1.58E+06	9.75E+05	1.03E+07	1.60E+10	2.08E+13	1.05E+15	6.1973	5.9890	7.0107	10.2041	13.3170	15.0212
	4. สารสกัด + ampicillin	1.58E+06	1.43E+05	6.25E+04	1.55E+04	9.75E+03	7.50E+03	6.1973	5.1538	4.7959	4.1903	3.9890	3.8751

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.14 ค่า viable log ที่เปลี่ยนแปลงไป ณ.เวลาต่างๆและค่าทางจลนศาสตร์ (kinetic parameter) ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampiciilin โดยวิธี time kill

ไอโซเลท	สารทดสอบ	Viable log change						T 90%	T 99%	T 99.9%	T min	T eradication	$AUBKC_{0-24}$	BA_{24}
		Δ_2	Δ_4	Δ_6	Δ_8	Δ_{24}	Δ_{max}							
1. Salmonella 3	1. Control	1.8751	5.0969	7.2471	10.3188	14.3457	-	ND	ND	ND	ND	ND	384.2234	-
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	-0.9044	-0.9412	-1.0535	-1.1229	-1.2707	-1.2707	6	ND	ND	24	ND	123.6133	260.6101
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	-0.8031	-0.8880	2.0866	7.2881	9.1071	-0.8880	ND	ND	ND	4	ND	288.7703	95.4531
	4. สารสกัด + ampicillin	-1.1943	-1.6648	-1.7810	-1.9280	-2.0000	-2.0000	2	24	ND	24	ND	105.7670	278.4564
2. Salmonella 9	1. Control	0.0710	3.8770	7.2205	10.1161	13.1161	-	ND	ND	ND	ND	ND	367.0199	-
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	-1.2219	-0.8643	-1.0622	-1.9089	-2.4357	-2.4357	6	24	ND	24	ND	105.2639	261.7560
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	-0.9301	-1.9129	-0.9129	1.0757	4.0331	-1.9129	4	ND	ND	4	ND	183.1695	183.8504
	4. สารสกัด + ampicillin	-1.3874	-1.2413	-1.5301	-2.3082	-2.6093	-2.6093	2	8	ND	24	ND	98.4334	268.5865
3. Salmonella 14	1. Control	0.8873	5.0183	9.9810	11.9473	15.8953	-	ND	ND	ND	ND	ND	416.2933	-
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	-1.0479	-1.2698	-0.2946	-1.1185	-1.3489	-1.3489	2	ND	ND	24	ND	123.2937	292.9996
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	-1.0064	0.7410	2.9093	4.9465	8.9465	-1.0064	2	ND	ND	2	ND	271.0609	145.2324
	4. สารสกัด + ampicillin	-1.0878	-1.3327	-1.5088	-1.5502	-2.3889	-2.3889	2	24	ND	24	ND	109.0592	307.2341

ND = not determined

ตาราง ภ.14 (ต่อ) ค่า viable log ที่เปลี่ยนแปลงไป ณ.เวลาต่างๆและค่าทางจลนศาสตร์ (kinetic parameter) ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampiciilin โดยวิธี time kill

ไอโซเลท	สารทดสอบ	Viable log change						T 90%	T 99%	T 99.9%	T min	T eradication	$AUBKC_{0-24}$	BA_{24}
		Δ_2	Δ_4	Δ_6	Δ_8	Δ_{24}	Δ_{max}							
4. Salmonella 16	1. Control	0.1268	3.1687	7.2069	10.1376	12.9012	-	ND	ND	ND	ND	ND	302.8656	-
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	-0.9115	-0.7132	-1.7838	-1.9728	-2.1796	-2.1796	6	24	ND	24	ND	122.4120	180.4536
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	-0.8803	-0.8403	-0.1461	2.0871	5.8996	0.8803	ND	ND	ND	2	ND	219.5304	83.3352
	4. สารสกัด + ampicillin	-0.9617	-1.1317	-2.0276	-2.2448	-2.4327	-2.4327	4	6	ND	24	ND	119.8692	182.9964
5. Salmonella 19	1. Control	0.1895	3.0689	7.2730	12.2067	14.6990	-	ND	ND	ND	ND	ND	39734135	-
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	-0.7072	-1.0167	-0.8854	-1.2619	-1.6103	-1.6103	8	ND	ND	24	ND	117.4747	279.9388
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	-0.8356	1.3464	5.3802	6.4216	9.3345	-0.8356	ND	ND	ND	2	ND	290.5840	106.8295
	4. สารสกัด + ampicillin	-0.9281	-0.6904	-0.7167	-0.8601	-1.2840	-1.2840	24	ND	ND	24	ND	123.6423	273.7712
6. Salmonella 25	1. Control	1.1036	5.7312	8.7514	11.8933	13.9141	-	ND	ND	ND	ND	ND	395.8573	-
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	-1.4130	-2.1663	-2.2543	-2.3647	-2.6222	-2.6222	2	4	ND	24	ND	98.2905	297.5452
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	-1.0434	-2.0378	-1.2083	2.7385	6.9566	-2.0378	2	4	ND	4	ND	223.3631	172.4726
	4. สารสกัด + ampicillin	-1.6077	-2.2144	-2.3813	-2.7403	-2.8073	-2.8073	2	4	ND	24	ND	91.2977	304.5380

ND = not determined

ตาราง ภ.14 (ต่อ) ค่า viable log ที่เปลี่ยนแปลงไป ณ.เวลาต่างๆและค่าทางจลนศาสตร์ (kinetic parameter) ของเชื้อกลุ่ม NTS จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampiciilin โดยวิธี time kill

ไอโซเลท	สารทดสอบ	Viable log change						T 90%	T 99%	T 99.9%	T min	T eradication	$AUBKC_{0-24}$	BA_{24}
		Δ_2	Δ_4	Δ_6	Δ_8	Δ_{24}	Δ_{max}							
7. Salmonella 30	1. Control	0.9221	4.0313	7.0770	11.0190	12.1951	-	ND	ND	ND	ND	ND	370.1629	-
	2. สารสกัด (MIC = 40 มก/มล)	-0.9290	-1.0000	-1.8333	-1.8893	-2.2013	-2.2013	4	24	ND	24	ND	106.4285	263.7344
	3. ampicillin (MIC = 256 มคก/มล)	-0.2083	0.8134	4.0068	7.1197	8.8239	-0.2083	ND	ND	ND	2	ND	292.6275	77.5354
	4. สารสกัด + ampicillin	-1.0435	-1.4014	-2.0070	-2.2083	-2.3222	-2.3222	2	6	ND	24	ND	101.3791	268.7838

ND = not determined

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ภ.15 ค่า Log viable cell count ณ. เวลาต่างๆ ของเชื้อทดสอบ 7 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อ ampicillin จากการศึกษาโดยวิธี time kill

สารทดสอบ	ค่าเฉลี่ยของค่า Log ของจำนวนเชื้อที่นับได้ ณ.เวลาต่างๆ					
	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
Control	6.2138 ± 0.0426	6.9531 ± 0.6699	10.5085 ± 1.0439	14.0362 ± 1.1441	17.3050 ± 0.9520	20.0804 ± 1.2584
สารสกัด (1/2 MIC) (20 มก/มล)	6.2117 ± 0.0686	5.1925 ± 0.1860	5.0730 ± 0.4288	4.9021 ± 0.6451	4.5490 ±0.4660	4.2591 ± 0.5224
ampicillin (1/2 MIC) (128 มคก/มล)	6.2112 ± 0.0672	5.3959 ± 0.2692	5.8143 ± 1.3264	7.9420 ± 2.5113	10.7365 ± 2.5361	13.7971 ± 2.0143
สารสกัด+ampicllin 1/2 MIC: 1/2 MIC	6.2008 ± 0.0589	5.0278 ± 0.2165	4.8184 ± 0.4261	4.4933 ± 0.4861	4.2236 ± 0.5713	3.9373 ± 0.4483

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชมพูนุช ไทยบุญรอด เกิดเมื่อวันที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2546 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา (สหสาขา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย