โยธิน ตีไธสง : ผลของสารสกัดจากกระชาย (*BOESENBERGIA ROTUNDA* (L) MANSF) และยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งผนังเซลล์ต้านแบคทีเรียดื้อยา และการพัฒนาวิธีการตรวจฟีโนไทป์เพื่อตรวจหาเอนไซม์บีตาแลคแทเมส (EFFECTS OF *BOESENBERGIA ROTUNDA* (L) MANSF EXTRACT AND CELL WALL INHIBITOR ANTIBIOTICS AGAINST DRUG-RESISTANT BACTERIA AND THE DEVELOPMENT OF PHENOTYPIC ASSAYS TO DETECT BETA-LACTAMASES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์เภสัชกร ดร.เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ, 181 หน้า.

การดื้อยาต้านจุลชีพกำลังเพิ่มขึ้นในระดับที่น่าเป็นห่วง วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกระชายและยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งผนังเซลล์ทั้งที่ใช้เดี่ยว ๆ และใช้ผสมกันในการต้านแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และเพื่อพัฒนาเครื่องมือวินิจฉัยเพื่อตรวจหาและตรวจแยกเอนไซม์บีตาแลคแทเมสชนิดต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดกระชายมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอย่างแรงต่อเชื้อ สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียสที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (เอ็มอาร์เอสเอ) ดีเอ็มเอสที 20651 และ ดีเอ็มเอสที 20652 และต้านเชื้อ สแตปฟิโลคอคคัส อีพิเดอร์มิดิส ดีเอ็มเอสที 14932 ที่ค่ายับยั้งต่ำสุด 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ค่ายับยั้งต่ำสุด > 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ทดสอบทั้งหมด ยาคลอกซาซิลลินมีค่ายับยั้งต่ำสุดที่ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการต้านเชื้อ เอ็มอาร์เอสเอ 20651 และ 20652 ผลจากการศึกษาด้วยวิธีเชคเกอร์บอร์ดแสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่างสารสกัดกระชายและยาคลอกซาซิลลินมีค่าดัชนีสัดส่วนการยับยั้งต่ำสุดที่ 0.502 ในการต้านเชื้อทั้ง เอ็มอาร์เอสเอ 20651 และ 20652 ทั้งนี้ไม่พบการเสริมฤทธิ์ของสารผสมระหว่างสารสกัดกระชายและยาเซฟตาซิดีมในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ทดสอบ กราฟแสดงการตายของเชื้อได้แสดงจำนวนเชื้อเอ็มอาร์เอสเอ 20651 ที่มีชีวิตมีจำนวนลดลงเล็กน้อยหลังจากได้รับสารผสมระหว่างสารสกัดกระชายและยาคลอกซาซิลลิน ขณะที่เชื้อนี้เมื่อได้รับการยากลุ่มอื่น ๆ มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าผนังเซลล์ของเชื้อเอ็มอาร์เอสเอ 20651 ที่ได้รับยาคลอกซาซิลลินเดี่ยว ๆ ได้รับความเสียหายและมีการแตกสลาย ขณะที่เชื้อที่ได้รับสารสกัดกระชายเดี่ยว ๆ พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหายและมีการยุบตัว สำหรับเชื้อเอ็มอาร์เอสเอ 20651 ที่ได้รับสารผสมระหว่างสารสกัดกระชายและยาคลอกซาซิลลินได้รับความเสียหายทั้งผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ สำหรับขนาดพื้นที่ของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับการทดสอบทุกกลุ่มพบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (พี < 0.05) ผลจากการทดสอบการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในพบว่า สารสกัดกระชายเดี่ยว ๆ ยาไน

ซินเดี่ยว ๆ และสารผสมระหว่างสารสกัดกระชายและยาคลอกซาซิลลินมีผลต่อการเพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาคลอกซาซิลลินเดี่ยว ๆ และกลุ่มที่ไม่ได้รับการทดสอบ (พี < 0.01) สำหรับฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์ม พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดกระชายเดี่ยว ๆ ยาคลอกซาซิลลินเดี่ยว ๆ และสารผสมระหว่างสารสกัดกระชายและยาคลอกซาซิลลินมีการลดลงของชีวมวลของไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการทดสอบ (พี < 0.01) สำหรับการตรวจหาและตรวจแยกชนิดของเอนไซม์บีตาแลคแทเมส การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาดิสผสมยาปฏิชีวนะและสารยับยั้งเอนไซม์บีตาแลคแทเมสที่จำเพาะร่วมการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งที่ผสมกับเรสาซูริน (วิธี อาร์ซีเอ) ซึ่งได้ทดสอบเชื้อในวงศ์เอนเทอโรแบคทีริเอซีอีที่ได้รับการระบุชนิดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ทั้งหมด 86 สายพันธ์ เพื่อทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่า สามารถตรวจหาและแยกเอนไซม์เมทาโล บีตาแลคแทเมส เอนไซม์เครบซีลลา นิวโมนิอี คาร์บาพีเนมเมส และเอนไซม์ ออกซา-48 คาร์บาพีเนมเมส ซึ่งมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 อีกทั้งวิธีดังกล่าวยังมีความสามารถยอดเยี่ยมในการตรวจหาและแยกเอนไซม์ชนิดอีเอสบีแอล (ความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 98.6) เอนไซม์ชนิดแอมป์ซี (ความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 96.36) และเอนไซม์ชนิดผสม (ความไวร้อยละ 88.89 และความจำเพาะร้อยละ 100) กล่าวโดยสรุป สารผสมระหว่างยาคลอกซาซิลลินและสารสกัดกระชายยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื่อ เอ็มอาร์เอส เอ โดยการยับยั้งที่ผนังเซลล์และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้านใน วิธีดิสผสมร่วมกับวิธี อาร์ซีเอ เป็นเทคนิคที่ง่าย ราคาไม่แพง และมีความเที่ยงตรงในการตรวจหาและแยกเอนไซม์ชนิดบีตาแลคแทเมสชนิดต่าง ๆ วิธีดังกล่าวสามารถนำไปใช้ห้องปฏิบัติการทางด้านจุลชีววิทยาทุกที่ เพื่อที่จะตรวจหาเอนไซม์ของแบคทีเรียดื้อยาดังกล่าว

สาขาวิชาปรีคลินิก ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

YOTHIN TEETHAISONG : EFFECTS OF *BOESENBERGIA ROTUNDA* (L) MANSF EXTRACT AND CELL WALL INHIBITOR ANTIBIOTICS AGAINST DRUG-RESISTANT BACTERIA AND THE DEVELOPMENT OF PHENOTYPIC ASSAYS TO DETECT BETA-LACTAMASES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. GRIANGSAK EUMKEB, Ph.D. 181 PP.

BOESENBERGIA ROTUNDA / CELL WALL INHIBITOR ANTIBIOTICS /DRUG-RESISTANT BACTERRIA/PHENOTYPIC TEST/BETA-LACTAMASES

Antimicrobial resistance is increasing at an alarming rate. The objectives of this study were to investigate the effect of *B. rotunda* extract (BRE) and cell wall inhibitor antibiotics, either used alone or in combination against antibiotic-resistant bacteria and to develop a diagnostic tool for rapid screening and discrimination of different types of β-lactamases. BRE exhibited a strong antibacterial activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20651 and DMST 20652 and *Staphylococcus epidermidis* DMST 14932 at a MIC value of 16 μg/mL, whereas no inhibitory activity (MIC > 1024 μg/mL) was observed in all Gram-negative bacteria tested. Cloxacillin (CLX) showed the highest MIC value at 512 μg/mL against MRSA 20651 and 20652. The results from the chequerboard assay revealed that the combination of BRE and CLX exhibited the lowest fraction inhibitory concentration (FIC) index at 0.502 against MRSA 20651 and 20652. No synergistic interaction between BRE and ceftazidime was seen in all Gram-negative bacteria tested. Time-kill curve assay displayed a slight reduction in viable counts of MRSA 20651 treated with the combination of BRE and CLX while other treated groups exhibited the steady increase in viable counts. Transmission electron microscope

clearly showed disruption of the cell wall (CW) in MRSA 20651 treated with CLX alone, whilst BRE alone exhibited collapse of the cytoplasmic membrane (CM). Damage of both CW and CM was observed in cells treated with CLX plus BRE. The cell areas of all treated groups were significantly reduced compared with untreated cells ($p < 0.05$). BRE alone, nisin alone and BRE plus CLX significantly induced CM permeability ($p < 0.01$). The biofilm biomass of MRSA 20651 was significantly reduced by BRE alone, CLX alone and BRE plus CLX compared with the control group ($p < 0.01$). To screen and differentiate distinct types of β-lactamases, a combined disc method along with resazurin chromogenic agar (RCA) has been developed. A total of 86-molecularly characterised β-lactamase-producing Enterobacteriaceae were employed to validate this assay. The results showed that the assay successfully detected and discriminated metallo-β-lactamases, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases and OXA-48 carbapenemases with 100% sensitivity and specificity. For the screening and differentiation of Extended-spectrum-β-lactamases (ESBL), AmpC β-lactamases and co-β-lactamases, the RCA assay exhibited excellent performance in detection of ESBL (100% sensitivity and 98.9 % specificity), AmpC (100% sensitivity and 96.36% specificity) and co-production of ESBL and AmpC (88.89% sensitivity and 100% specificity). In conclusion, the combination of CLX and BRE inhibited the growth of MRSA strains by inhibiting CW and damaging CM. A combined disc method along with RCA assay is very simple, inexpensive and reliable in the detection and discrimination of different types of β-lactamases. It could be exploited in any microbiological laboratory for detecting these bacterial enzymes.

School of Preclinic Student's Signature_____

Academic Year 2016 Advisor's Signature_____