

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller–Hinton agar (MHA)

ประกอบด้วย

Beef infusion	300.0	กรัม
Casamino	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Bacto-agar	17.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมด 336 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 7.3 $\pm$ 0.2 ต้มให้วุ้นละลาย แล้วจึงฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้อุ่นที่ 50 องศาเซลเซียส โดยใส่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และเทลงในจานอาหารที่ปราศจากเชื้อ อาหารนี้ใช้สำหรับการทดสอบ Disk-agar diffusion ในการทำ Antimicrobial susceptibility test ของแบคทีเรีย

2. Nutrient agar (NA)

ประกอบด้วย

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 6.8 $\pm$ 0.2 ต้มให้วุ้นละลาย แล้วจึงฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Trypticase soy broth

ประกอบด้วย

Bacto tryptone	17.0	กรัม
Bacto soytone	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Trypticase Soy Agar

ประกอบด้วย

Tryptone	15.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ชั่งอาหารตามอัตราส่วนและนำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้ข้นละลาย แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สารเคมี

1. 0.85 % Normal Saline

ประกอบด้วย

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. ชุดย้อมสี Gram stain

2.1 Gram's crystal violet

สารละลาย A ประกอบด้วย

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol (95%)	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย B ประกอบด้วย

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน แล้วนำไปกรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนออก ก่อนนำไปใช้

2.2 Gram's iodine

ประกอบด้วย

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน โดยละลาย Potassium iodine กับน้ำกลั่นก่อน จากนั้นจึงเติม Iodine

2.3 Gram's safanin

ประกอบด้วย

Safanin (2.5% solution in 95% ethyl alcohol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายกับน้ำกลั่นให้เข้ากันแล้วจึงนำไปใช้

2.4 Gram's alcohol

ประกอบด้วย

Ethyl alcohol	98.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.0	มิลลิลิตร

ผสมกับน้ำกลั่นให้เข้ากันแล้วจึงนำไปใช้

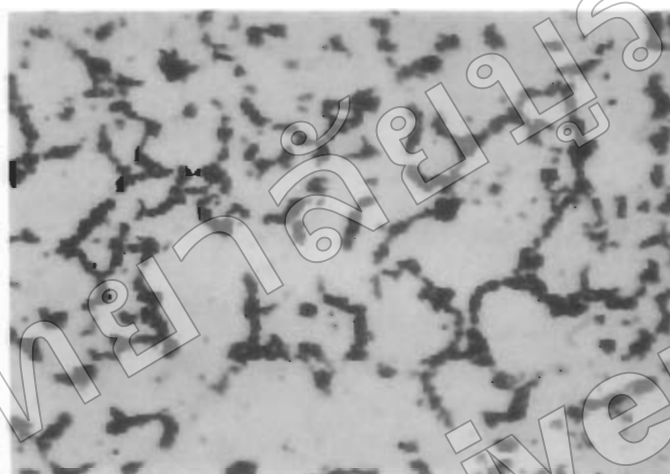
ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียที่แยกทดสอบ

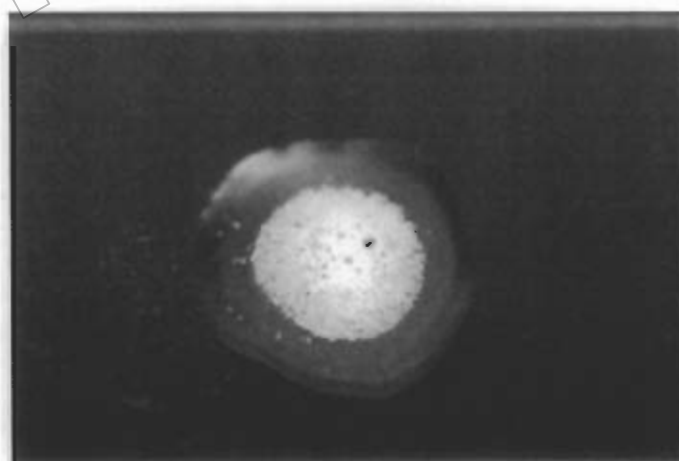
ได้ทำการทดสอบลักษณะการย้อมสีแกรม การสร้างเอนไซม์คัตเตเลส, โคแอกกูเลส, ออกซิเดส และการสร้างเอนไซม์ β -lactamase

การย้อมแกรม (Gram's stain) *S. aureus* ติดสีแกรมบวก รูปกลม มีการเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (grape like clusters) ดังภาพที่ 24



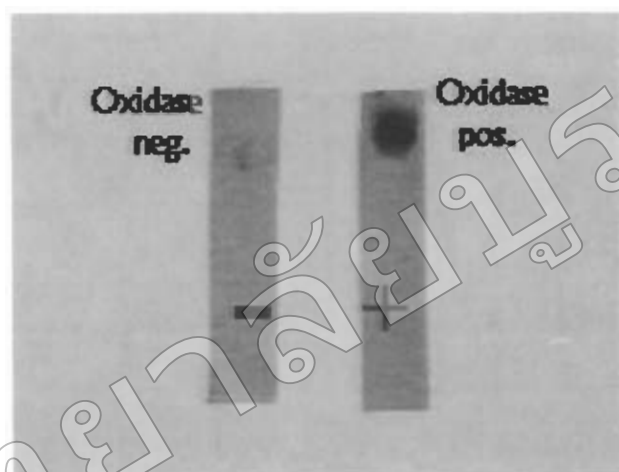
ภาพที่ 24 ลักษณะการติดสีแกรมและการเรียงตัวของ *S. aureus*

การทดสอบ Catalase (Catalase test) ให้ผลบวก เมื่อเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ลงบนสไลด์ แล้วหยด 3% H_2O_2 1 เกิดฟองของ O_2 ทันที ดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 การเกิดฟองของ O_2 เมื่อทดสอบกับ *S. aureus*

การทดสอบ Oxidase (Oxidase test) ให้ผลลบ เมื่อเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ลงบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อที่มีสารละลาย 1% Tetramethylene-*p*-phenylenediamine dihydrochloride แล้ว ไม่เกิดสีน้ำเงินเข้มให้เห็นบนกระดาษกรอง ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การเปลี่ยนสีในการทดสอบ Oxidase

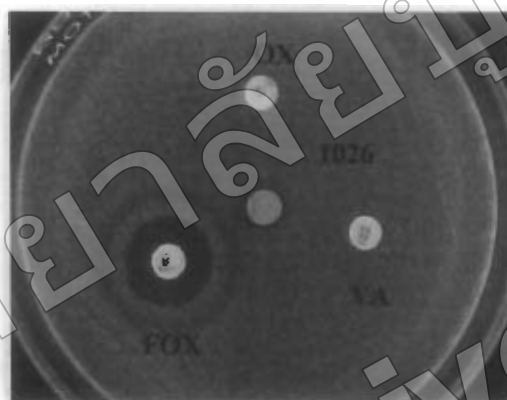
การทดสอบ Coagulase (Coagulase test) ให้ผลบวก เมื่อเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ลงในหลอดที่มีพลาสมา 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง โดยพลาสมาจะเกิดการแข็งตัว ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 การแข็งตัวของพลาสมาในการทดสอบ Coagulase

2. การทดสอบความไวของแบคทีเรียทดสอบต่อยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความไวของแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* ทั้งกลุ่ม MRSA และ MSSA กับยา Oxacillin 1 ไมโครกรัม (OX 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์), ยา Vancomycin 30 ไมโครกรัม (VA 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และยา Cefoxitin 30 ไมโครกรัม (FOX 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) พบว่าแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA 1 ไอโซเลต คือ MRSA5 ไม่พบ Inhibition zone กับดิสก์ยา Vancomycin 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ แสดงดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 การทดสอบความไวของแบคทีเรียทดสอบ MRSA5 ซึ่งไม่พบบริเวณยับยั้งของยา Vancomycin (VA 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

ตารางที่ 9 บริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของแบคทีเรียทดสอบ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร)

เมื่อทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam และ Glycopeptides ด้วยวิธี

Disk diffusion

แบคทีเรีย ทดสอบ	ยาปฏิชีวนะ		แบคทีเรีย ทดสอบ	ยาปฏิชีวนะ	
	OX	VA		OX	VA
MRSA1	6	17	MSSA1	32	18
MRSA2	6	15	MSSA2	19	16
MRSA3	6	17	MSSA3	20	18
MRSA4	6	17	MSSA4	30	17
MRSA5	6	0	MSSA5	28	17
MRSA6	6	18	MSSA6	28	17
MRSA7	6	17	MSSA7	20	17
MRSA8	6	17	MSSA8	23	18
MRSA9	6	17	MSSA9	30	16
MRSA10	6	18	MSSA10	28	18
MRSA11	6	20	MSSA11	18	17
MRSA12	6	17	MSSA12	21	16
MRSA13	6	18	MSSA13	22	17
MRSA14	6	16	MSSA14	19	16
MRSA15	6	18	MSSA15	20	16
MRSA16	6	18	MSSA16	30	16
43300	6	17	25923	23	18

หมายเหตุ

43300, *S. aureus* ATCC43300

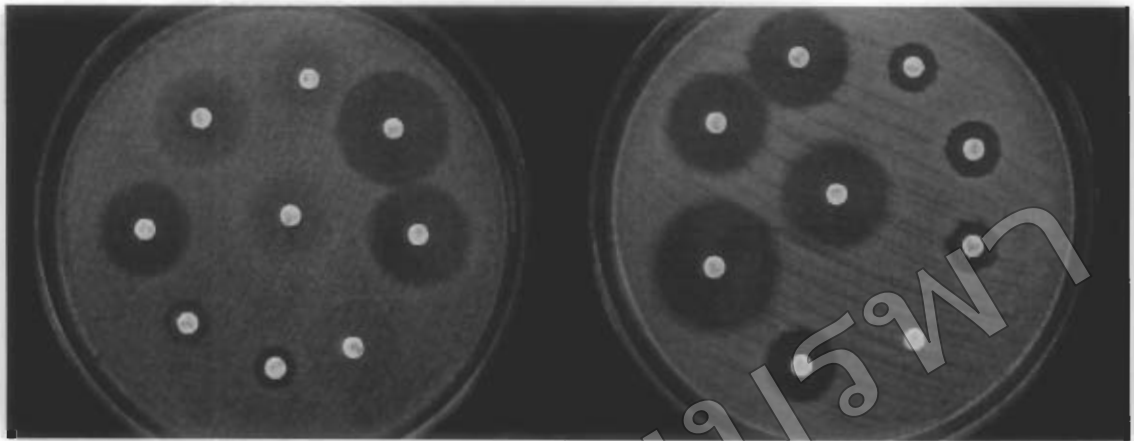
OX, Oxacillin 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์

25923, *S. aureus* ATCC25923

VA, Vancomycin 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

FOX, Cefoxitin 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

*, ดิสก์ของยา Oxacillin ที่ใช้ในการทดลองนี้มีขนาดประมาณ 6 มิลลิเมตร ดังนั้นการอ่านค่าบริเวณยับยั้งของยา Oxacillin ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม MRSA ได้ จึงอ่านค่าได้เป็น 6 มิลลิเมตร



ภาพที่ 29 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* ATCC43300



ภาพที่ 30 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* ATCC25923

ตารางที่ 10 บริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC43300 และ *S. aureus* ATCC25923

ยาปฏิชีวนะ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)	
	<i>S. aureus</i> ATCC43300	<i>S. aureus</i> ATCC25923
Penicillin G (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : P(10)	14	31
Oxacillin (1 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : OX(1)	NZ	23
Ampicillin (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : AMP(10)	14	29
Cefoxitin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : FOX(30)	12	24
Sulfphmethoxazole/Trimethoprim (25 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : SXT(25)	25	28
Vancomycin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : VA(30)	17	18
Gentamicin (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : CN(10)	11	10
Erythromycin (15 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : E(15)	NZ	28
Cephalothin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : KF(30)	12	30
Clindamycin (2 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : DA(2)	NZ	25
Ciprofloxacin (5 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : CIP(5)	25	22
Chloramphenicol (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : C(30)	21	26
Cefuroxime sodium (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : CXM(30)	NZ	29
Cefotaxime (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : CTX(30)	19	25
Linezolid (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : LZD(30)	26	ND
Fosfomycin (50 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : FOS(50)	25	ND
Fusidic acid (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : FD(10)	26	ND
Rifampicin (5 ไมโครกรัมต่อดิสก์) : RD(5)	27	ND

หมายเหตุ NZ, No zone; ND, Not do

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก จำนวน 12 ชนิด

การทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก 12 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disk diffusion ตามมาตรฐานของ National committee for clinical laboratory standards (NCCLS, 2004) เพื่อเป็นการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 บริเวณยับยั้งการเจริญของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก 12 ชนิด ต่อแบคทีเรียทดสอบ ด้วยวิธี Disk diffusion

แบคทีเรียทดสอบ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของแบคทีเรียกลุ่มสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก 500 ในโวกซ์มินดิสก์ (มิลลิเมตร)										Positive control		Negative control
	IMC1003	IMC1004	IMC1006	IMC1010	IMC1013	IMC1014	IMC1026	Cefoxitin (30 ไมโครกรัมดิสก์)					
MRSA1	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 1.00	8.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	17.00 ± 1.00	10.67 ± 1.53			6.00 ± 0.00		
MRSA2	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	15.33 ± 1.15			6.00 ± 0.00		
MRSA3	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.33 ± 1.15	15.33 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MRSA4	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.33 ± 0.58	15.00 ± 1.00			6.00 ± 0.00		
MRSA5	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	7.67 ± 0.58	15.00 ± 1.00			6.00 ± 0.00		
MRSA6	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	16.00 ± 0.00	11.67 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MRSA7	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.33 ± 0.58	11.00 ± 1.00			6.00 ± 0.00		
MRSA8	8.33 ± 0.58	9.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	9.00 ± 1.00	9.67 ± 0.58	15.33 ± 0.58	14.67 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MRSA9	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.33 ± 0.58	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.00 ± 0.00	9.00 ± 1.00			6.00 ± 0.00		
MRSA10	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	10.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.00 ± 1.00	9.33 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MRSA11	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.67 ± 0.58	9.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	17.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MSSA1	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	14.00 ± 0.00	34.00 ± 1.00			6.00 ± 0.00		
MSSA2	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.00 ± 0.00	31.67 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MSSA3	6.00 ± 0.00	9.00 ± 1.00	9.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	33.33 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MSSA4	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	34.00 ± 0.73			6.00 ± 0.00		
MSSA5	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	34.00 ± 1.00			6.00 ± 0.00		
MSSA6	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.00 ± 0.00	35.00 ± 1.00			6.00 ± 0.00		
MSSA7	8.33 ± 0.58	8.00 ± 0.00	9.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	14.00 ± 1.00	34.67 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MSSA8	6.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	32.67 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MSSA9	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.00 ± 0.00	34.33 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
MSSA10	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	7.00 ± 1.73	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	32.33 ± 0.58			6.00 ± 0.00		
43300	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	7.33 ± 0.58	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.33 ± 0.58	16.33 ± 1.15			6.00 ± 0.00		
25923	6.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	17.67 ± 0.58	35.33 ± 0.58			6.00 ± 0.00		

หมายเหตุ 43300, *S. aureus* ATCC43300; 25923, *S. aureus* ATCC25923; สารสังเคราะห์ IMC1007, 1008, 1011, 1027 และ 1030 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียทดสอบทุกไอโซเลต

4. การหา MIC ของสารสังเคราะห์ IMC1026 และยาปฏิชีวนะ Oxacillin

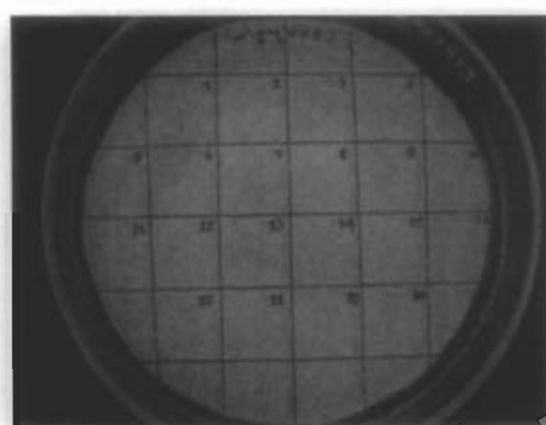
ตารางที่ 12 ค่า MIC ของสารสังเคราะห์ IMC1026 และยาปฏิชีวนะ Oxacillin กับแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรีย ทดสอบ	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)		แบคทีเรีย ทดสอบ	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	
	IMC1026	OX		IMC1026	OX
MRSA1	128	256	MSSA1	256	0.5
MRSA2	512	256	MSSA2	256	1
MRSA3	32	256	MSSA3	128	2
MRSA4	128	256	MSSA4	256	0.5
MRSA5	128	256	MSSA5	256	2
MRSA6	128	256	MSSA6	256	2
MRSA7	128	256	MSSA7	256	2
MRSA8	128	256	MSSA8	256	2
MRSA9	128	256	MSSA9	128	2
MRSA10	256	256	MSSA10	128	2
MRSA11	128	256	MSSA11	256	2
MRSA12	256	256	MSSA12	256	2
MRSA13	256	256	MSSA13	128	2
MRSA14	256	256	MSSA14	256	2
MRSA15	128	256	MSSA15	128	2
MRSA16	256	256	MSSA16	128	2
43300	256	128	25923	256	2

หมายเหตุ IMC1026, สารสังเคราะห์ IMC1026 43300, *S. aureus* ATCC43300

OX, Oxacillin

25923, *S. aureus* ATCC25923



Oxacillin ความเข้มข้น 256 µg/ml

ด้อยเชื้อกลุ่ม MRSA

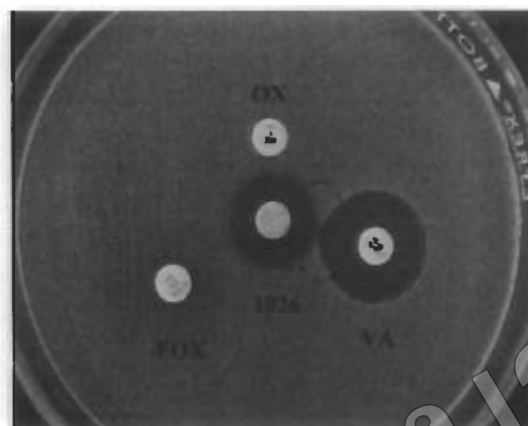
ข้อที่	ชื่อ
1	MRSA1
2	MRSA2
3	MRSA3
4	MRSA4
5	MRSA5
6	MRSA6
7	MRSA7
8	MRSA8
9	MRSA9
10	MRSA10
11	MRSA11
12	MRSA12
13	MRSA13
14	MRSA14
15	MRSA15
16	MRSA16
17	<i>S. aureus</i> ATCC43300
18	<i>S. aureus</i> ATCC25923

ภาพที่ 31 การเจริญของแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA บนอาหาร MHA เติมน้ำ 4% NaCl ผสมกับ

ยา Oxacillin ความเข้มข้น 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

5. การศึกษาคุณสมบัติการใช้ร่วมกันในการต้านแบคทีเรียระหว่างยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* กับสารสังเคราะห์ IMC1026 โดยวิธี Double disk diffusion synergy

การทดสอบการใช้ร่วมกันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* พบว่าเกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยาปฏิชีวนะ Oxacillin ในแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MSSA ได้แก่ MSSA 8 และ MSSA13 และเกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยาปฏิชีวนะ Vancomycin ในแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA ได้แก่ MRSA10, MRSA11, MRSA12, MRSA13, MRSA15 และ MRSA16 และในแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MSSA ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 แสดงดังภาพที่ 32 และตารางที่ 13



ภาพที่ 32 การเกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยาปฏิชีวนะ Vancomycin
กับแบคทีเรียทดสอบ MRSA10

ตารางที่ 13 การเกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษา
โรคติดเชื้อ *S. aureus* ในแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA โดยวิธี Double disk diffusion
synergy

แบคทีเรีย ทดสอบ	พื้นที่ยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)			
	IMC1026	OX	VA	FOX
MRSA 1	16	R	S	R
MRSA 2	8	R	S	R
MRSA 3	16	R	S	R
MRSA 4	15	R	S	R
MRSA 5	8	R	R	R
MRSA 6	16	R	S	R
MRSA 7	15	R	S	R
MRSA 8	15	R	S	R
MRSA 9	15	R	S	R
MRSA 10 ^a	15	R	S	R
MRSA 11 ^a	17	R	S	R
MRSA 12 ^a	15	R	S	R
MRSA 13 ^a	16	R	S	R
MRSA 14	16	R	S	R
MRSA 15 ^a	15	R	S	R
MRSA 16 ^a	15	R	S	R
43300	13	R	S	R

หมายเหตุ a, เกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยา Vancomycin

43300, *S. aureus* ATCC43300

IMC1026, สารสังเคราะห์ IMC1026 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์

OX, Oxacillin 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์

VA, Vancomycin 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

FOX, Cefoxitin 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

ตารางที่ 14 การเกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษา
โรคติดเชื้อ *S. aureus* ในแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MSSA โดยวิธี Double disk diffusion
synergy

แบคทีเรีย ทดสอบ	พื้นที่ยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)			
	IMC1026	OX	VA	FOX
MSSA1	14	S	S	S
MSSA2	13	S	S	S
MSSA3	13	S	S	S
MSSA4	14	S	S	S
MSSA5	14	S	S	S
MSSA6	13	S	S	S
MSSA7	13	S	S	S
MSSA8 ^b	14	S	S	S
MSSA9	13	S	S	S
MSSA10	14	S	S	S
MSSA11	13	S	S	S
MSSA12	13	S	S	S
MSSA13 ^b	15	S	S	S
MSSA14	13	S	S	S
MSSA15	13	S	S	S
MSSA16	14	S	S	S
25923 ^a	18	S	S	S

หมายเหตุ a. เกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยา Vancomycin

b. เกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยา Oxacillin

25923, *S. aureus* ATCC25923

IMC1026, สารสังเคราะห์ IMC1026 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์

OX, Oxacillin 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์

VA, Vancomycin 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

FOX, Cefoxitin 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

6. การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความไวต่อยาปฏิชีวนะ Oxacillin ของ *S. aureus* ATCC43300 ด้วยสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ IMC1026 ด้วยวิธี IMC1026-induction

6.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ตารางที่ 15 จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MHA ที่มี 4% NaCl ผสมกับยา Oxacillin ความเข้มข้น 1/8 MIC (16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
หลังจากแยกหน่อยาน้ำที่ชั่วโม่งต่างๆ

ชั่วโมงที่	Conditions	จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร																	
		Oxacillin ความเข้มข้น 1/8 MIC (16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
		10 ⁻⁴					10 ⁻⁵					10 ⁻⁶							
ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	CFU ต่อ มิลลิลิตร	CFU เฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
24	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	0	0	30	18	20	18	20	18	7x10 ⁸	6x10 ⁸	1.2x10 ⁹	8.3x10 ⁸	3.2
12/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	8	9	10	3	1	2	3x10 ⁸	1x10 ⁸	2x10 ⁸	1x10 ⁸	2x10 ⁸	2.0x10 ⁸	1.0
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	1	6	5	1x10 ⁸	6x10 ⁸	5x10 ⁸	6x10 ⁸	4.0x10 ⁸	4.0x10 ⁸	2.6
48	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	11	10	11	1.1x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.1x10 ⁹	0.6
13/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	0	0	30	18	20	18	1.8x10 ⁹	2.0x10 ⁹	1.8x10 ⁹	2.0x10 ⁹	1.9x10 ⁹	1.9x10 ⁹	1.2
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	17	16	20	1.7x10 ⁹	1.6x10 ⁹	2.0x10 ⁹	1.6x10 ⁹	1.8x10 ⁹	1.8x10 ⁹	2.1
72	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	15	16	13	1.5x10 ⁹	1.6x10 ⁹	1.3x10 ⁹	1.6x10 ⁹	1.5x10 ⁹	1.5x10 ⁹	1.5
	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	32	31	30	3.2x10 ⁹	3.1x10 ⁹	3.0x10 ⁹	3.1x10 ⁹	3.1x10 ⁹	3.1x10 ⁹	1.0
14/9/2551	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	16	15	12	1.6x10 ⁹	1.5x10 ⁹	1.2x10 ⁹	1.5x10 ⁹	1.4x10 ⁹	1.4x10 ⁹	2.1
	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	14	11	12	1.4x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.2x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.2x10 ⁹	1.2x10 ⁹	1.5
15/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	21	23	22	2.1x10 ⁹	2.3x10 ⁹	2.2x10 ⁹	2.3x10 ⁹	2.2x10 ⁹	2.2x10 ⁹	1.0
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	21	18	19	2.1x10 ⁹	1.8x10 ⁹	1.9x10 ⁹	1.8x10 ⁹	1.9x10 ⁹	1.9x10 ⁹	1.5

ตารางที่ 16 จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MHA เต็ม 4% NaCl ผสมกับยา Oxacillin ความเข้มข้น 1/4 MIC (32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
หลังจากถูกเหนี่ยวนำที่ชั่วโมงต่างๆ

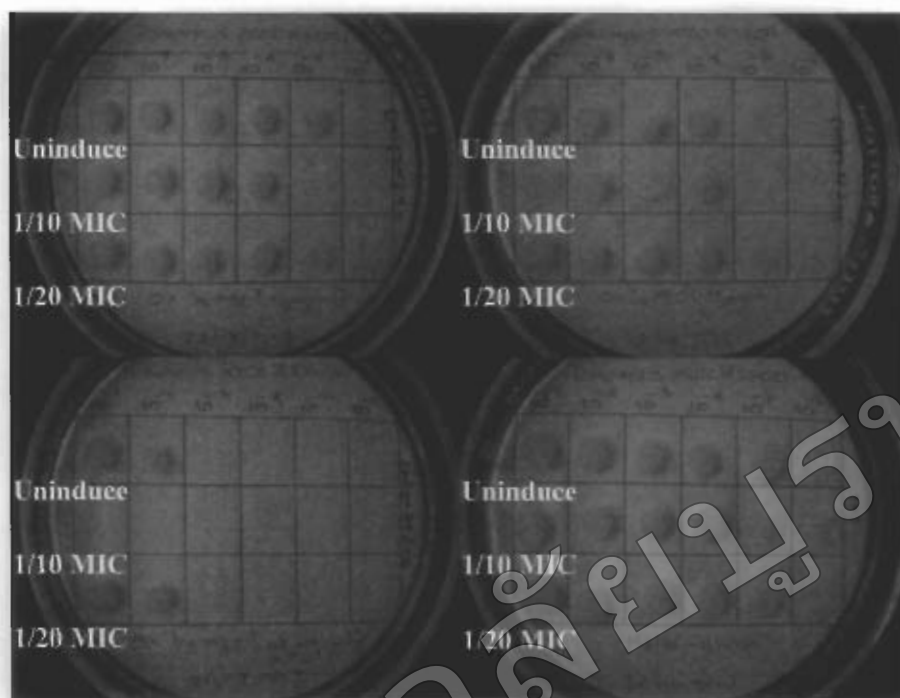
ชั่วโมงที่	Conditions	จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร															
		Oxacillin ความเข้มข้น 1/4 MIC (32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)															
		10 ⁻⁴				10 ⁻⁵				10 ⁻⁶				CFU ต่อ มิลลิลิตร			
		ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
24	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	2	2	1	2x10 ⁸	2x10 ⁸	1x10 ⁸	1.7x10 ⁸
12/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	15	18	13	0	0	0	0	0	0	1.5x10 ⁸	1.8x10 ⁸	1.3x10 ⁸	1.5x10 ⁸
	1/20 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	9	7	8	9x10 ⁸	7x10 ⁸	8x10 ⁸	8.0x10 ⁸
48	Uninduce	ER	TNTC	TNTC	32	29	36	9	9	9	8	8	8	9x10 ⁸	9x10 ⁸	8x10 ⁸	8.7x10 ⁸
13/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	12	15	13	1.2x10 ⁹	1.5x10 ⁹	1.3x10 ⁹	1.3x10 ⁹
	1/20 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	11	9	12	1.1x10 ⁹	9x10 ⁸	1.2x10 ⁹	1.1x10 ⁹
72	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	4	16	17	3	4	4	4	4	4	3x10 ⁸	4x10 ⁸	4x10 ⁸	3.7x10 ⁸
14/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	13	32	36	22	21	20	21	20	20	2.2x10 ⁹	2.1x10 ⁹	2.0x10 ⁹	2.1x10 ⁹
	1/20 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	10	25	24	2	1	1	1	1	1	2x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ⁸	1.3x10 ⁸
96	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	2	4	3	2x10 ⁸	4x10 ⁸	3x10 ⁸	3x10 ⁸
15/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	15	14	14	1.5x10 ⁹	1.4x10 ⁹	1.4x10 ⁹	1.4x10 ⁹
	1/20 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	10	9	11	1.0x10 ⁹	9x10 ⁸	1.1x10 ⁹	1.0x10 ⁹

ตารางที่ 17 จำนวน โคโลนีที่เจริญบนอาหาร MHA เติม 4% NaCl ผสมกับยา Oxacillin ความเข้มข้น 1/2 MIC (64 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)
หลังจากถูกเหนี่ยวนำที่ชั่วโมงต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	Conditions	จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร															
		Oxacillin ความเข้มข้น 1/2 MIC (64 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)															
		10 ⁻³				10 ⁻⁴				10 ⁻⁵				CFU ต่อมิลลิตร			
		ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
24	Uninduce	3	2	3	0	0	0	0	0	0	3x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵	2.7x10 ⁵			0.58
12/9/2551	1/10 MIC	3	1	2	1	1	0	0	0	0	3x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁵	2.0x10 ⁵			1.00
	1/20MIC	8	8	6	0	1	1	0	0	0	8x10 ⁵	8x10 ⁵	6x10 ⁵	7.3x10 ⁵			1.15
48	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	1	1	2	0	0	0	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	1.3x10 ⁶			0.58
13/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	1	1	1	0	0	0	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1.0x10 ⁶			0.00
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	2	2	2	0	0	0	2x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	2.0x10 ⁶			0.00
72	Uninduce	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1.0x10 ⁵			0.00
14/9/2551	1/10 MIC	1	2	3	0	0	0	0	0	0	1x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵	2.0x10 ⁵			1.00
	1/20MIC	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1.0x10 ⁵			0.00
96	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	8	7	8x10 ⁷	8x10 ⁷	7x10 ⁷	7.7x10 ⁷			0.58
15/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	13	13	H	1.3x10 ⁸	1.3x10 ⁸	1.1x10 ⁸	1.2x10 ⁸			1.15
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	15	16	15	1.5x10 ⁸	1.6x10 ⁸	1.5x10 ⁸	1.5x10 ⁸			0.58

ตารางที่ 18 จำนวน โคโลนีที่เจริญบนอาหาร MHA เติม 4% NaCl ไม่ผสมกับยา Oxacillin (Positive control) หลังจากถูกเหนี่ยวนำที่ชั่วโมงต่างๆ

ชั่วโมงที่	Conditions	จำนวน โคโลนีที่เจริญบนอาหาร													
		MHA เติม 4% NaCl (Positive control)							CFU ต่อหลอดลิตร						
		10 ⁻⁴							10 ⁻⁶						
		ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	CFU เฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
24	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	5	9	8	5x10 ⁸	9x10 ⁸	8x10 ⁸	7.3x10 ⁸	2.08
12/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	14	14	14	7	4	3	7x10 ⁸	4x10 ⁸	3x10 ⁸	4.7x10 ⁸	2.08
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	5	5	5	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5.0x10 ⁸	0.00
48	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	19	16	18	1.9x10 ⁹	1.6x10 ⁹	1.8x10 ⁹	1.8x10 ⁹	1.53
13/9/2551	1/10 MIC	ER	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	11	6	16	1x10 ⁸	6x10 ⁸	1.6x10 ⁹	1.1x10 ⁹	5.00
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	19	17	17	1.9x10 ⁹	1.7x10 ⁹	1.7x10 ⁹	1.8x10 ⁹	1.15
72	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	33	34	34	12	10	11	1.2x10 ⁹	1.0x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.00
14/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	27	21	24	2.7x10 ⁹	2.1x10 ⁹	2.4x10 ⁹	2.4x10 ⁹	3.00
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	6	5	10	6x10 ⁸	5x10 ⁸	1.0x10 ⁹	7.0x10 ⁸	2.65
96	Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	15	17	10	1.5x10 ⁹	1.7x10 ⁹	1.0x10 ⁹	1.4x10 ⁹	3.61
15/9/2551	1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	23	22	24	2.3x10 ⁹	2.2x10 ⁹	2.4x10 ⁹	2.3x10 ⁹	1.00
	1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	15	15	15	1.5x10 ⁹	1.5x10 ⁹	1.5x10 ⁹	1.5x10 ⁹	0.00



ภาพที่ 33 การเจริญของ *S. aureus* ATCC43300 บนอาหาร MHA เติม 4% NaCl ผสมกับ
ยา Oxacillin ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากถูกเหนี่ยวนำที่ชั่วโมงที่ 24

5.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำ

ตารางที่ 19 จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MHA เติม 4% NaCl ผสมกับยา Oxacillin ความเข้มข้น 1/8 MIC (16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ความเข้มข้นต่าง ๆ

จำนวน โคโลนีที่เจริญบนอาหาร															
Oxacillin ความเข้มข้น 1/8 MIC (16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)															
Conditions	10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			CFU ค่ำเบี่ยงเบน		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย	มาตรฐาน	
Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	ER	>40	>40	ER	13	12	14	1.3x10 ⁹	1.3x10 ⁹	
1/2 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	ER	19	18	17	0	0	0	1.8x10 ⁸	1.8x10 ⁸	
1/5MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	>40	>40	40	11	6	9	6x10 ⁸	8.7x10 ⁸	
1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	ER	15	20	18	4	4	3	4x10 ⁸	3.7x10 ⁸	
1/20MIC	TNTC	TNTC	TNTC	ER	ER	ER	>40	38	>40	2	2	2	2x10 ⁸	2.0x10 ⁸	

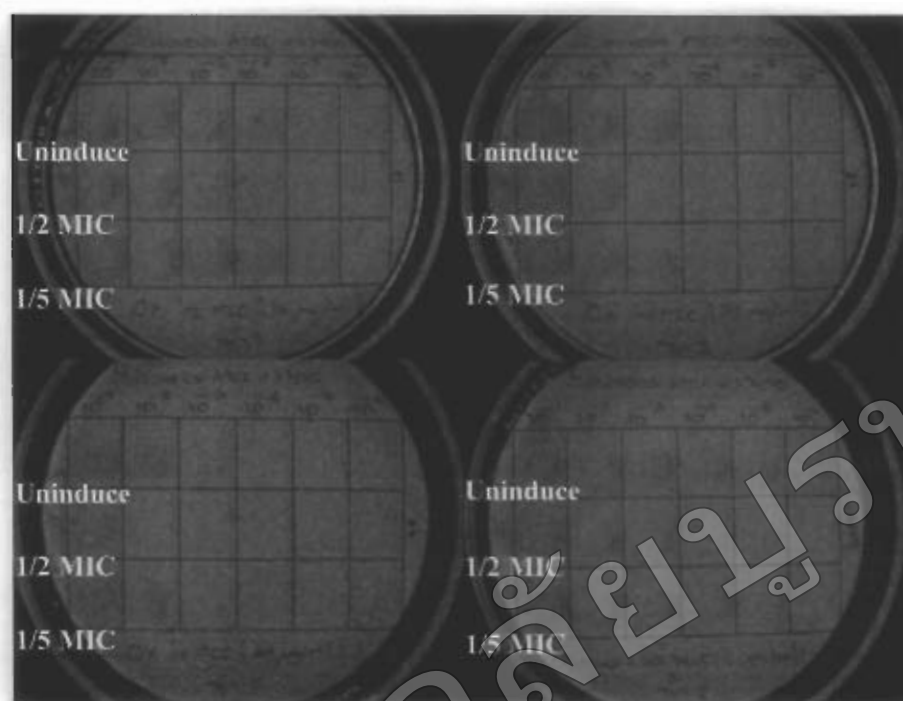
ตารางที่ 20 จำนวน โคโตนที่เจริญบนอาหาร MHA เติม 4% NaCl ผสมกับยา Oxacillin ความเข้มข้น 1/4 MIC (32 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)
หลังจากถูกหนย่นำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ความเข้มข้นต่างๆ

จำนวนโคโตนที่เจริญบนอาหาร																		
Oxacillin ความเข้มข้น 1/4 MIC (32 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)																		
Conditions	10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			CFU ต่อมิลลิตร			CFU เฉลี่ย	มาตรฐาน	
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3			
Uninduce	TNTC	TNTC	TNTC	ER	>40	ER	ER	ER	ER	ER	7	7	8	7x10 ⁸	7x10 ⁸	8x10 ⁸	7.3x10 ⁸	0.6
1/2 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	>40	>40	>40	4	5	4	0	0	0	0	4x10 ⁷	5x10 ⁷	4x10 ⁷	4.3x10 ⁷	0.6
1/5 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	>40	>40	>40	37	38	35	3	3	4	3	3x10 ⁸	4x10 ⁸	3x10 ⁸	3.3x10 ⁸	0.6
1/10 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	6	3	4	1	0	0	0	6x10 ⁷	3x10 ⁷	4x10 ⁷	4.3x10 ⁷	1.5
1/20 MIC	TNTC	TNTC	TNTC	ER	ER	ER	6	5	6	0	0	0	0	6x10 ⁷	5x10 ⁷	6x10 ⁷	5.7x10 ⁷	0.6

ตารางที่ 21 จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MHA เติม 4% NaCl ผสมกับยา Oxacillin ความเข้มข้น 1/2 MIC (64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ความเข้มข้นต่าง ๆ

		จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร															
Conditions		Oxacillin ความเข้มข้น 1/2 MIC (64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)															
		10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			CFU ต่อมิลลิลิตร			ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Uninduce	14	13	16	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	1.3x10 ⁶ 0.6
1/2 MIC	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	1.7x10 ⁵ 0.6
1/5 MIC	7	13	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7x10 ⁵	1.3x10 ⁶	6x10 ⁵	8.7x10 ⁵ 3.8
1/10 MIC	7	5	5	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	1x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	2.0x10 ⁶ 1.0
1/20 MIC	14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.4x10 ⁶	1.4x10 ⁶	1.4x10 ⁶	1.4x10 ⁶ 0.0

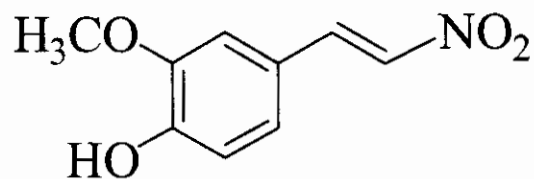


ภาพที่ 34 การเจริญของ *S. aureus* ATCC43300 บนอาหาร MHA เติม 4% NaCl ผสมกับ
ยา Oxacillin ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026
ความเข้มข้น 1/2 และ 1/5 MIC

ภาคผนวก ค

สูตรโครงสร้างของสารตั้งเคราะห์ IMC1026 และยาปฏิชีวนะ

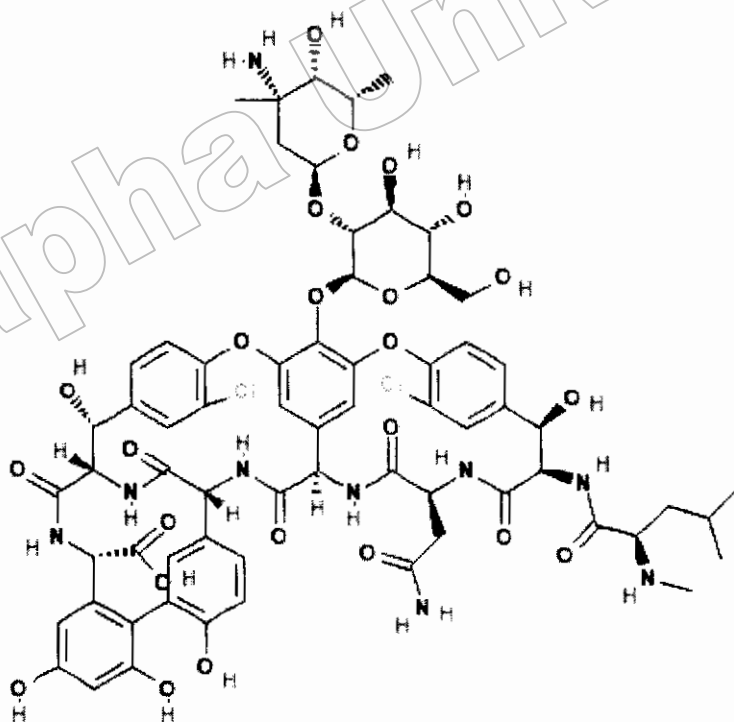
สูตรโครงสร้างของสารสังเคราะห์ IMC1026, Vancomycin และ Oxacillin



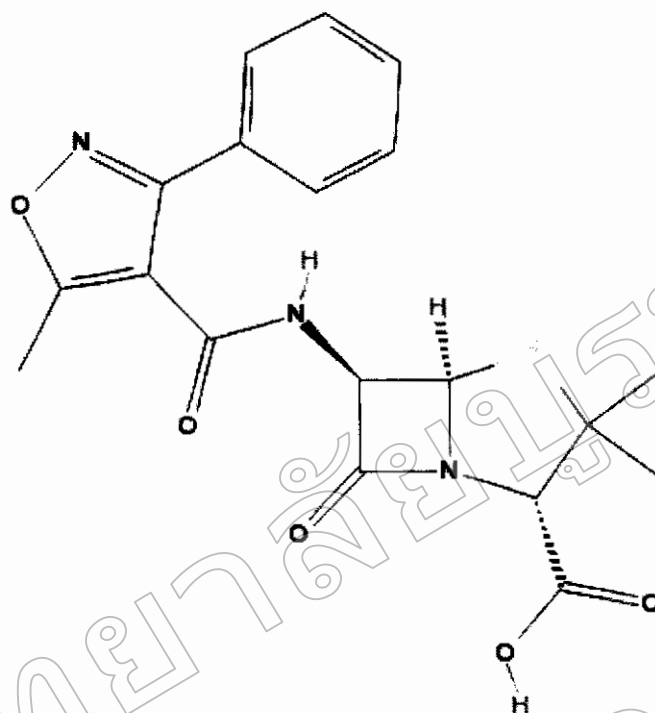
IMC1026 $C_9H_9NO_4$ MW 195.17

ภาพที่ 35 สูตรโครงสร้างของสารสังเคราะห์ IMC1026 (2-methoxy-4-(2-nitroethenyl) phenol)

2-methoxy-4-(2-nitroethenyl) phenol: 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 3.96 (s, 3H), 6.06 (s, 1H), 6.97 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 13.6 Hz, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 56.1, 110.1, 115.3, 122.4, 124.9, 135.0, 139.5, 147.1, 149.8. CAS No. 6178-42-3. (Karnkla, 2008)



ภาพที่ 36 สูตรโครงสร้างของยา Vancomycin ($C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$)



ภาพที่ 37 สูตรโครงสร้างของยา Oxacillin ($C_{19}H_{19}N_3O_5S$)

ภาคผนวก ง

การแปลผลการทดสอบความไวตามมาตรฐานของ CLSI 2007

ตารางที่ 23 บริเวณยับยั้งการเจริญมาตรฐาน (Zone diameter interpretive standards) และ
Equivalent MIC breakpoints สำหรับ *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2007)

ยาปฏิชีวนะ	ปริมาณยาที่ บรรจุในดิสก์ (ไมโครกรัม)	บริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)			Equivalent MIC breakpoints (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		R	I	S	R	S
Oxacillin (OX)	1	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2
Vancomycin (VA)	30	-	-	≥ 15	-	≤ 2

หมายเหตุ R, Resistant; I, Intermediate; S, Susceptible

ตารางที่ 24 การทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion สำหรับการทำนาย *mecA*-Mediated resistance ใน
Staphylococci (CLSI, 2007)

ยาปฏิชีวนะ (ปริมาณ ยาที่บรรจุในดิสก์)	แบคทีเรียกลุ่ม	บริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)		หมายเหตุ
Cefoxitin (30 ไมโครกรัม)	<i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i>	≤ 21	≥ 22	บริเวณยับยั้งของ Cefoxitin disk สำหรับ <i>S. aureus</i> ≤ 21 มิลลิเมตร รายงานว่า Oxacillin-resistant, บริเวณ ยับยั้ง ≥ 22 มิลลิเมตร รายงานว่า Oxacillin- susceptible
	Coagulase-negative staphylococci ยกเว้น <i>S. lugdunensis</i>	≤ 24	≥ 25	บริเวณยับยั้งของ Cefoxitin disk สำหรับ Coagulase- negative staphylococci ≤ 24 มิลลิเมตร รายงานว่า Oxacillin-resistant, บริเวณ ยับยั้ง ≥ 25 มิลลิเมตร รายงานว่า Oxacillin- susceptible

ตารางที่ 25 มาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของเชื้อ *S. aureus* ATCC43300 และ
S. aureus ATCC25923 (CLSI, 2007)

ยาปฏิชีวนะ	ปริมาณยาที่ บรรจุในดิสก์ (ไมโครกรัม)	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Penicillin G (P)	10	≤ 28	-	≥ 29
Oxacillin (OX)	1	≤ 10	11-12	≥ 13
Ampicillin (AMP)	10	≤ 28	-	≥ 29
Cefoxitin (FOX)	30	≤ 21	-	≥ 22
Sulphmethoxazole/ Trimethoprim (SXT)	25	≤ 10	11-15	≥ 16
Vancomycin (VA)	30	-	-	≥ 15
Gentamicin (CN)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Erythromycin (E)	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Cephalothin (KF)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Clindamycin (DA)	2	≤ 14	15-20	≥ 21
Ciprofloxacin (CIP)	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Chloramphenicol (C)	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Cefuroxime sodium (CXM)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxime (CTX)	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Linezolid (LZD)	30	-	-	≥ 21

ภาคผนวก จ

Growth curve ของ *S. aureus* ATCC43300

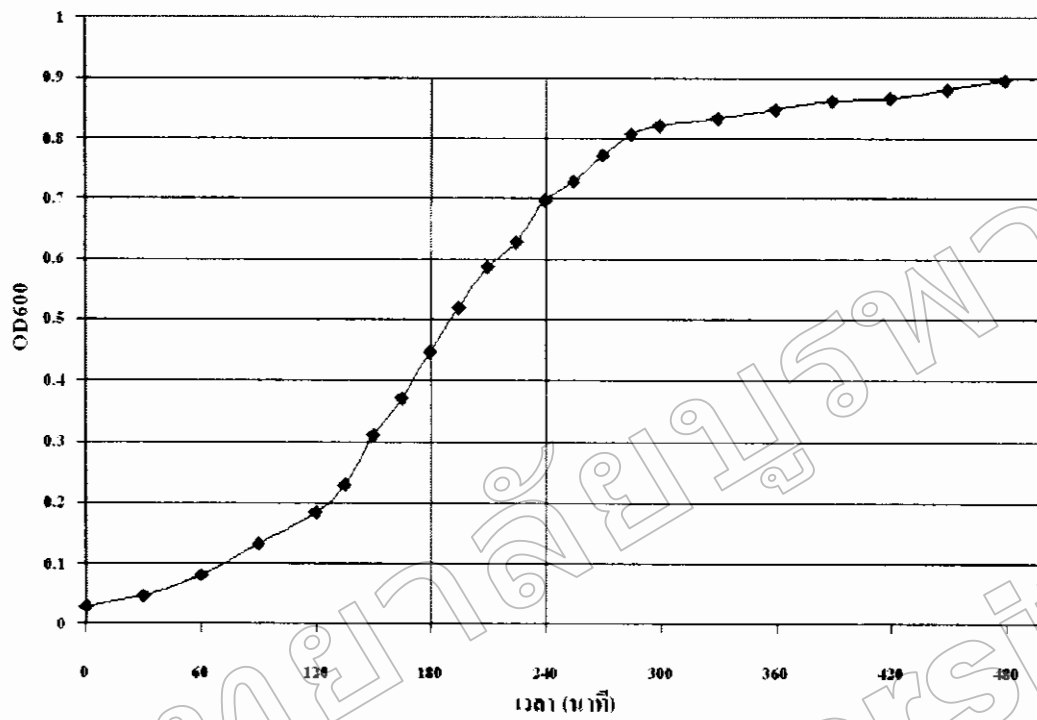
การหา Growth curve ของ *S. aureus* ATCC43300

ตารางที่ 26 ค่า OD₆₀₀ ที่วัดได้จากการหาอัตราการเจริญของ *S. aureus* ATCC43300

เวลา (นาที)	ค่า OD ₆₀₀				ค่าเบี่ยงเบน
	flask 1	flask 2	flask 3	ค่าเฉลี่ย	มาตรฐาน
0	0.030	0.033	0.025	0.029	0.0040
30	0.049	0.054	0.039	0.047	0.0076
60	0.085	0.088	0.070	0.081	0.0096
90	0.144	0.142	0.110	0.132	0.0191
120	0.198	0.199	0.155	0.184	0.0251
135	0.247	0.247	0.194	0.229	0.0306
150	0.334	0.337	0.259	0.310	0.0442
165	0.388	0.410	0.315	0.371	0.0497
180	0.481	0.478	0.380	0.446	0.0575
195	0.554	0.545	0.457	0.519	0.0536
210	0.622	0.624	0.512	0.586	0.0641
225	0.647	0.666	0.570	0.628	0.0508
240	0.725	0.730	0.632	0.696	0.0552
255	0.749	0.763	0.671	0.728	0.0496
270	0.812	0.806	0.694	0.771	0.0665
285	0.839	0.833	0.746	0.806	0.0520
300	0.850	0.848	0.766	0.821	0.0479
330	0.861	0.857	0.782	0.833	0.0445
360	0.877	0.875	0.791	0.848	0.0491
390	0.890	0.894	0.801	0.862	0.0526
420	0.910	0.875	0.817	0.867	0.0470
450	0.902	0.923	0.818	0.881	0.0556
480	0.925	0.931	0.832	0.896	0.0555

ตารางที่ 27 จำนวนโคโลนีของ *S. aureus* ATCC43300 ที่นับได้ ด้วยวิธี Drop plate

เวลา (นาที)	CFU ต่อ มิลลิลิตร			
	flask 1	flask 2	flask 3	ค่าเฉลี่ย
0	2.2×10^6	2.2×10^6	2.1×10^6	2.2×10^6
30	2.5×10^6	3.0×10^6	2.6×10^6	2.7×10^6
60	9.3×10^6	7.6×10^6	9.0×10^6	8.6×10^6
90	8.6×10^6	9.3×10^6	12×10^6	9.9×10^6
120	2.6×10^7	1.3×10^7	1.0×10^7	1.6×10^7
135	2.2×10^7	1.5×10^7	1.3×10^7	1.7×10^7
150	2.5×10^7	1.9×10^7	2.5×10^7	2.3×10^7
165	3.3×10^7	2.2×10^7	2.3×10^7	2.6×10^7
180	3.0×10^7	6.0×10^7	3.3×10^7	4.1×10^7
195	7.6×10^7	6.3×10^7	7.0×10^7	7.0×10^7
210	1.4×10^8	1.4×10^8	3.6×10^8	2.1×10^8
225	1.0×10^8	1.0×10^8	7.3×10^8	3.1×10^8
240	1.3×10^8	1.3×10^8	1.0×10^8	1.2×10^8
255	1.1×10^8	1.1×10^8	1.1×10^8	1.1×10^8
270	1.0×10^8	1.0×10^8	0.8×10^8	0.9×10^8
285	1.1×10^8	1.3×10^8	1.2×10^8	1.2×10^8
300	1.3×10^9	1.0×10^9	1.1×10^9	1.1×10^9
330	1.3×10^9	1.5×10^9	1.3×10^9	1.4×10^9
360	1.7×10^9	1.4×10^9	1.3×10^9	1.5×10^9
390	1.6×10^9	1.3×10^9	1.5×10^9	1.5×10^9
420	1.8×10^9	1.8×10^9	2.0×10^9	1.9×10^9
450	1.7×10^9	2.0×10^9	2.1×10^9	1.9×10^9
480	2.0×10^9	1.9×10^9	2.3×10^9	2.1×10^9



ภาพที่ 38 กราฟอัตราการเจริญของ *S. aureus* ATCC43300