



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้อยาปฏิชีวนะร่วมกับสารโรโดไมโนน
ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* spp.
ซึ่งเป็นสาเหตุของการดื้อยาปฏิชีวนะ

โดย ดร. จงกล สายสิงห์

มิถุนายน 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้อยาปฏิชีวนะร่วมกับสารโรโดไมโนน
ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* spp.
ซึ่งเป็นสาเหตุของการดื้อยาปฏิชีวนะ

ดร. จงกล สายสิงห์

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780115

ชื่อโครงการ: การใช้อยาปฏิชีวนะร่วมกับสารโรโดไมโทนในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* spp.

ซึ่งเป็นสาเหตุของการดื้อยาปฏิชีวนะ

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร. จงกล สายสิงห์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

อีเมล: jongkon.sai@mfu.ac.th หรือ ssjongkon@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยซึ่งเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเพียงเล็กน้อยจนกระทั่งการติดเชื้อรุนแรง ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งโครงสร้างของไบโอฟิล์มส่งผลต่อการดื้อยาปฏิชีวนะและต้านทานต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อดังกล่าวโดยวิธีเดียวอาจไม่ได้ผล การใช้อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด ร่วมกันจึงเป็นทางเลือกหนึ่งซึ่งมีความเป็นไปได้ในการรักษาการติดเชื้อดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีรายงานการเสริมฤทธิ์กันของการใช้สารธรรมชาติร่วมกับยาปฏิชีวนะในการต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ออกมาอย่างต่อเนื่อง งานวิจัยนี้ ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆ ต่อเซลล์แบคทีเรียร่วมกับสาร rhodomyrtone ต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) ของยาปฏิชีวนะที่ทดสอบต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 อยู่ระหว่าง 0.015-4 µg/ml ยกเว้นยา sulfamethoxazole ในขณะที่ค่า MIC ของยา rifampicin, tetracycline, rhodomyrtone, vancomycin และ chloramphenicol ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 เท่ากับ 0.015, 0.25, 2, 8 และ 16 µg/ml ตามลำดับ ตรวจสอบ total biofilm biomass และความมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC และ 2 MIC พบว่า การใช้อยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ไม่ทำให้ total biofilm biomass ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ลดลงมากกว่าการใช้อยาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone พบว่าการใช้อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ร่วมกับสาร rhodomyrtone ไม่สามารถลดการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้มากกว่าการใช้อยาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาปฏิชีวนะที่ทดสอบกับสาร rhodomyrtone ในการลดการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 ถึงแม้การศึกษาครั้งนี้จะไม่พบว่าเมื่อใช้อยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิด ร่วมกับสาร rhodomyrtone สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการใช้อยาปฏิชีวนะเพียง 1 ชนิด พบว่า ยาที่มีประสิทธิภาพต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มากที่สุด คือ rifampicin ตามด้วย ampicillin ในขณะที่ยาที่มีประสิทธิภาพต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 มากที่สุด คือ rifampicin ตามด้วยสาร rhodomyrtone

คำสำคัญ: โรโดไมโทน, ยาปฏิชีวนะ, ไบโอฟิล์ม, *Staphylococcus*, การใช้อยาปฏิชีวนะร่วมกัน

Abstract

Project code: TRG5780115

Project title: Antibiotic combinations with a new antibiotic candidate rhodomyrtone against staphylococcal biofilms causing antibiotic resistance

Investigator: Dr.Jongkon Saising, School of Health Science, Mae Fah Luang University

E-mail address: jongkon.sai@mfu.ac.th or ssjongkon@yahoo.com

Project period: 2 years

Abstract:

Staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis* are the most common pathogens involve in minor or severe infections. More seriously, biofilm formation is often associated with antibiotic resistance in the organisms. Biofilm structures facilitate the bacterial cells to resist to antimicrobial agents and host immune system. Monotherapy is not sufficient for treatment of biofilm infection. Therefore, the use of antibiotic combinations performs a promising option. In last decade, the synergism between natural compounds and antibiotics against *Staphylococcus* spp. has been continuously revealed. In this study we investigated the efficiency of rhodomyrtone in combination with 10 antibiotics in different mode of actions on *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* ATCC 35984 biofilms, representative biofilm forming strains. The minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal inhibitory concentrations (MBCs) were determined. The MICs of 10 antibiotics against *S. aureus* ATCC 25923 were between 0.015-4 µg/ml except that of sulfamethoxazole. The MICs of rifampicin, tetracycline, rhodomyrtone, vancomycin and chloramphenicol on *S. epidermidis* ATCC 35984 were 0.015, 0.25, 2, 8 and 16 µg/ml, respectively. The two strains were grown for 24 h biofilms and then treated with MIC and 2MIC of antibiotics and in combination with rhodomyrtone. After treatment, total biofilm biomass and viability of biofilms grown staphylococcal cells were measured. The reduction of total biofilm biomass of both *S. aureus* and *S. epidermidis* after treatment with antibiotic in combination with rhodomyrtone when compare with antibiotics or rhodomyrtone alone was not observed. Additionally, there was no synergistic effect between tested antibiotics and rhodomyrtone on viability of biofilms grown cells of *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* ATCC 35984. Although staphylococcal biofilms were not eliminated after treatment with antibiotics in combination with rhodomyrtone, when we considered the activity of single antibiotic or rhodomyrtone we can noticed that rifampicin was the most effective antibiotic to reduce *S. aureus* ATCC 25923 biofilms followed by ampicillin. Similarly, the most potent antibiotic to destroy biofilms of *S. epidermidis* ATCC 35984 was rifampicin followed by rhodomyrtone.

Keywords: rhodomyrtone, antibiotic, biofilms, *Staphylococcus*, combination

บทสรุปผู้บริหาร

Staphylococcus aureus และ *Staphylococcus epidermidis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อทั้งเล็กน้อยและรุนแรง เชื้อ *S. aureus* สร้าง virulence factor หลายชนิดซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่อวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ในขณะที่ *S. epidermidis* สร้าง virulence factor ได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม *S. epidermidis* สามารถเกาะติดกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใช้กับผู้ป่วย เช่น สายสวน อุปกรณ์ควบคุมการเต้นของหัวใจ และ ข้อเทียม เป็นต้น การติดเชื้อในโรงพยาบาลส่วนใหญ่เกิดจากการที่แบคทีเรียสามารถเกาะติดกับพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ ปัญหาหลักของการเพิ่มความรุนแรงของการติดเชื้อคือเชื้อมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ การเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียกับ host cell หรือพื้นผิววัสดุ และการสร้างกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียซึ่งล้อมรอบด้วยสาร polysaccharide ที่เซลล์แบคทีเรียหลั่งออกมา แบคทีเรียที่มีการสร้างไบโอฟิล์มสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้มากกว่าแบคทีเรียที่ล่องลอยอย่างอิสระหรือเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ดังนั้นทำให้การรักษาโรคติดเชื้อ *Staphylococcus* เป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น การรักษาโรคติดเชื้อดังกล่าวโดยวิธีเดียวอาจไม่ได้ผล การใช้ยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดร่วมกัน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งซึ่งมีความเป็นไปได้ในการรักษาการติดเชื้อดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีรายงานการเสริมฤทธิ์กันของการใช้สารธรรมชาติร่วมกับยาปฏิชีวนะในการต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ออกมาอย่างต่อเนื่อง งานวิจัยนี้ ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆ ต่อเซลล์แบคทีเรียร่วมกับสาร rhodomyrtone ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากไมกระทุ (Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk. ต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) ของยาปฏิชีวนะที่ทดสอบต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 อยู่ระหว่าง 0.015-4 µg/ml ยกเว้นยา sulfamethoxazole ในขณะที่ ค่า MIC ของยา rifampicin, tetracycline, rhodomyrtone, vancomycin และ chloramphenicol ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 เท่ากับ 0.015, 0.25, 2, 8 และ 16 µg/ml ตามลำดับ ผู้วิจัยเลือกศึกษาผลของยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone ต่อไบโอฟิล์มที่ความเข้มข้นต่ำ (MIC และ 2MIC) เพื่อคำนึงถึงความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้จริง ตรวจสอบ total biofilm biomass และความมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC และ 2 MIC พบว่า การใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ไม่ทำให้ total biofilm biomass ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ลดลงมากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ 10 ชนิดร่วมกับสาร rhodomyrtone ไม่สามารถลดการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้มากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาปฏิชีวนะที่ทดสอบกับสาร rhodomyrtone ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984

ถึงแม้การศึกษาครั้งนี้จะไม่พบว่าเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิด ร่วมกับสาร rhodomyrtone สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการใช้ยาปฏิชีวนะเพียง 1 ชนิด พบว่า ยาที่มีประสิทธิภาพต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มากที่สุด คือ rifampicin ตามด้วย ampicillin ในขณะที่ยาที่มีประสิทธิภาพต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 มากที่สุด คือ rifampicin ตามด้วยสาร rhodomyrtone ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่ายาปฏิชีวนะอีก 8 ชนิดที่ทดสอบ นอกจากนี้ เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มุ่งประเด็นไปที่การศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ต่อเชื้อ *Staphylococcus* ที่เจริญเป็นไบโอฟิล์มเรียบร้อยแล้ว อาจเป็นไปได้ว่างานวิจัยต่อไปมีการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าว

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

Staphylococcus aureus และ *Staphylococcus epidermidis* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อตั้งแต่การติดเชื้อเพียงเล็กน้อยไปจนถึงการติดเชื้อรุนแรง *S. aureus* มีปัจจัยก่อโรคต่างๆ หลายชนิด เชื้อสร้างและหลั่งเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งมีบทบาทต่อความรุนแรงของโรค ได้แก่ α , β , γ และ δ toxin ซึ่งมีบทบาทต่อ cell membrane ของ host และทำให้เกิดการทำลายเซลล์, leucocidin ทำลาย phagocytes, clumping factor coagulase และ hyaluronidase นอกจากนี้เชื้อสร้างเอนไซม์ lipase ซึ่งจะย่อยสลายไขมันบนผิวหนังของมนุษย์และเพิ่มจำนวนบนผิวหนัง สร้างเอนไซม์ protease ซึ่งทำหน้าที่ทั่วไปคือสลายโปรตีนทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ [1] เชื้อหลายสายพันธุ์หลั่ง exotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เช่น toxic shock syndrome (TSS), staphylococcal scaled skin syndrome (SSSS), staphylococcal food poisoning (SFP) [2] ในขณะที่เชื้อ *S. epidermidis* ถึงแม้จะมีปัจจัยก่อโรค เช่น เอนไซม์และท็อกซินต่างๆ น้อยกว่า *S. aureus* อย่างไรก็ตาม *S. epidermidis* มีความสามารถในการเกาะติดกับพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ต่างๆ ที่ใช้กับผู้ป่วย เช่น สายสวน อุปกรณ์ควบคุมการเต้นของหัวใจ และข้อเทียม เป็นต้น [3,4] ปัญหาหลักของการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* คือเชื้อมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilms) ในระหว่างการติดเชื้อทำให้การรักษามีความยากยิ่งขึ้น เนื่องจากยาปฏิชีวนะไม่สามารถทำลายเชื้อที่อยู่รวมกันเป็นไบโอฟิล์ม การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์โฮสต์หรือพื้นผิววัสดุ หลังจากนั้นแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนและมีการรวมกันของเซลล์และสร้าง extracellular matrix [5] ซึ่งแบคทีเรียที่มีการสร้าง biofilm จะทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียที่ล่องลอยอยู่อย่างอิสระ [6-10]

มีการสนใจศึกษาพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้เป็นสารทางเลือกในการต้านเชื้อจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่อง สารธรรมชาติจากพืช เช่น carvacrol, thymol, salvipisone, beberine, reserpine, eugenol และ curcumin เป็นสารที่มีฤทธิ์ต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* spp. [11-15] สารโรโดไมโทน (rhodomyrtone) ซึ่งแยกได้จากใบกระทุ (Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk.) เป็นสารในกลุ่ม acylphloroglucinol มีฤทธิ์ที่ดีมากในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก [16-19] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สาร rhodomyrtone มีฤทธิ์ต่อไบโอฟิล์ม และสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อส่วนใหญ่ที่ทดสอบ

สารต้านจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวอาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาทางเลือกในการควบคุมการติดเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุมาจากไบโอฟิล์ม การใช้อยาปฏิชีวนะร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด น่าจะเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งใช้ในการรักษาการติดเชื้อซึ่งมีการสร้างไบโอฟิล์ม ยิ่งไปกว่านั้นการใช้อยาปฏิชีวนะซึ่งใช้ในการรักษาโรคติดเชื้ออยู่ในปัจจุบันร่วมกับสารจากธรรมชาติ เช่น farnesol, ellagic acid derivatives และ 2-aminobenzimidazole [20-24] ได้มีรายงานออกมาอย่างต่อเนื่องถึงฤทธิ์ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ดังนั้น การใช้อยาปฏิชีวนะร่วมกับสารจากธรรมชาติจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *Staphylococcus* ที่มีการสร้างไบโอฟิล์ม การวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการใช้สาร rhodomyrtone ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและมีฤทธิ์ต่อไบโอฟิล์ม ร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*

บททวนวรรณกรรม

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis*

S. aureus จัดอยู่ใน Family Staphylococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 μm เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น (irregular grapelike cluster) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่สร้างแฟลกเจลลา ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีสีขาวจนถึงสีเหลืองทอง มีลักษณะเรียบ กลม นูน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 37°C pH 7-7.5 ค่า A_{600} ที่เหมาะสมกับการเติบโตคือ 0.99 เติบโตได้ดีในความเข้มข้น NaCl 7-10% สามารถเติบโตได้ทั้งใน

สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ทดสอบ catalase, coagulase, thermostable nuclease ให้ผลบวก สามารถใช้น้ำตาล manitol [25,26] นอกจากนี้ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานในสภาพแห้ง และทนต่อความร้อนซึ่งคุณสมบัตินี้ทำให้ *S. aureus* มีชีวิตอยู่ได้เกือบทุกสภาพแวดล้อมของร่างกายมนุษย์ 30-40% พบในโพรงจมูก นอกจากนั้นพบในเยื่อเมือกและผิวหนังซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ *S. aureus* ทำให้เกิดหนอง ผิวก้อนจะทุกส่วนของร่างกาย ตั้งแต่ผิวหนัง ปอด กระดูก ไต และหัวใจ [2] *S. aureus* สร้างและหลั่งเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทต่อความรุนแรงของเชื้อ ได้แก่ α , β , γ และ δ toxin ซึ่งมีบทบาทต่อ cell membrane ของ host และทำให้เกิดการทำลายเซลล์, leucocidin ทำลาย phagocytes, clumping factor coagulase และ hyaluronidase นอกจากนี้สร้างเอนไซม์ lipase ซึ่งจะย่อยสลายไขมันบนผิวหนังของมนุษย์และเพิ่มจำนวนบนผิวหนัง สร้างเอนไซม์ protease ซึ่งทำหน้าที่ทั่วไปคือสลายโปรตีนทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ [1] หลายสายพันธุ์หลั่ง exotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เช่น toxic shock syndrome (TSS), Staphylococcal scaled skin syndrome (SSSS), Staphylococcal food poisoning (SFP) [2] การแพร่กระจายของเชื้ออาจเกิดในคนเดียวกันโดยการกระจายจากบริเวณที่เป็นแผลไปยังบริเวณที่ไม่มีการติดเชื้อ หรืออาจกระจายจากคนหนึ่งไปสู่คนหนึ่งโดยสัตว์พวกปลวก มด อากาศ หรือ มือที่ไม่สะอาดของผู้ดูแลผู้ป่วยซึ่งอาจจะถ่ายทอดจากผิวหนังที่เป็นแผลไปสู่ผู้ป่วยได้ [27]

S. epidermidis จัดอยู่ใน Family Staphylococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 μm เรียงตัวคล้ายพวงอุ้งน้ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่สร้างแฟลกเจลลลา ไม่เคลื่อนที่ [26] โคโลนีบน sheep blood agar 5% มีขนาดเล็กจนถึงปานกลางสีเทา-ขาว สร้างสารเมือกที่มีลักษณะเหนียวและเกาะติดผิวหน้าอาหารแข็ง ทดสอบ catalase ให้ผลบวก coagulase ให้ผลลบ ไม่สามารถใช้น้ำตาล mannitol ได้ *S. epidermidis* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal microbiota) บนผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ กระจายอยู่อย่างกว้างขวางและเป็นจำนวนมากทั่วทั้งผิวของร่างกาย และจะไม่ก่อโรคในคนที่สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง [27] *S. epidermidis* เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม coagulase negative staphylococci ซึ่งขั้นตอนแรกของการติดเชื้อหรือเพิ่มจำนวนของเชื้อคือการเกาะติด host เช่น ผิวหนัง หรือ พื้นผิววัสดุต่างๆที่สอดใส่เข้าไปในร่างกาย เช่น สายสอดเข้าร่างกาย หรือ อวัยวะเทียมต่างๆ โดยเชื้อจะหลั่ง extracellular polysaccharide สร้างไบโอฟิล์ม เพื่อช่วยในการหลบหลีกกลไกการป้องกันของโฮสต์และยาปฏิชีวนะ [28] นอกจากนี้เชื้อยังสร้าง hemolysin, lipase, protease และ toxin [29] *S. epidermidis* เป็นอีกเชื้อหนึ่งซึ่งเป็นปัญหาหนักที่สุดของการติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาล ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อในแผลผ่าตัด ในผู้ป่วยที่มีอุปกรณ์สอดแทรกเข้าในร่างกาย เช่น การใช้อุปกรณ์สายสวนทางจมูก ท่อสายยางอาหารหรือน้ำ และข้อต่อเทียม [30] โดยเชื้อสามารถแพร่กระจายไปยังบริเวณที่ไม่มีการติดเชื้อได้ หรืออาจกระจายจากคนหนึ่งไปสู่คนหนึ่งในโรงพยาบาลสามารถนำไปสู่การติดเชื้อของผู้ป่วย [27]

ไบโอฟิล์ม (Biofilms)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในธรรมชาติจะไม่อยู่เป็นลักษณะเดี่ยว ๆ หรือลอยเป็นอิสระใน suspension แต่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและสร้างไบโอฟิล์ม [31] ไบโอฟิล์มเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียซึ่งเกาะติดกับพื้นผิวสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์เหล่านี้จะอยู่ภายใน extracellular polysaccharide ที่มันหลั่งออกมาหลังจากเกาะติดกับพื้นผิว เช่น อุปกรณ์การแพทย์ที่สอดใส่เข้าไปในร่างกาย คราบหินปูนที่เกาะบนฟัน บนผิวหนัง [32] แบคทีเรียส่วนมากจะสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งทั้งแบคทีเรียกรัมบวก กรัมนลบ และยีสต์สามารถอยู่ร่วมกันได้ภายใน ไบโอฟิล์มเดียวกัน [33] ไบโอฟิล์มเป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* การสร้างไบโอฟิล์มเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลัก 2 ขั้นตอนคือ 1. การเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์โฮสต์หรือพื้นผิววัสดุ 2. การเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียและมีการรวมกันของเซลล์และสร้าง extracellular matrix [5] การเกาะติดของจุลินทรีย์กับพื้นผิวขึ้นอยู่กับลักษณะหรือคุณสมบัติของผิวเซลล์และธรรมชาติของพื้นผิวที่แบคทีเรียจะเกาะติดซึ่งในช่วงแรกของการเกาะติดนั้นจะเกี่ยวข้องกับแรงต่างๆ เช่น แรง van der Waal's, hydrophobicity interactions และ polarity [34,35] ขั้นตอนการ

เกาะติดมีความสัมพันธ์กับ surface-associated proteins (staphylococcal surface proteins; SSP-1, SSP-2) และ biofilm-associated protein (Bap) [36] นอกจากโปรตีนแล้ว polysaccharide ได้แก่ polysaccharide/adhesin (PS/A) ยังมีส่วนเกี่ยวข้องในขั้นตอนการเกาะติด หลังจากนั้นแบคทีเรียมีการเติบโตเพิ่มจำนวนและมีการรวมกันของเซลล์เป็น multilayered cell clusters ในขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องกับ polysaccharide intracellular adhesin (PIA), accumulation-associated protein (AAP), และ polysaccharide/adhesin (PS/A) [34] extracellular polysaccharide ทำหน้าที่เป็น ตัวกรอง และเป็นทางสำหรับสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆเข้าไปในเซลล์ที่อยู่ด้านใน และป้องกันเซลล์จากระบบ ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ สารพิษต่างๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะ การแลกเปลี่ยนพลาสมิดจะเกิดขึ้นเร็วภายในไบโอฟิล์ม เนื่องจาก เซลล์อยู่ติดกันมาก [33] จากการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าแบคทีเรียที่มีการสร้างไบโอฟิล์ม จะทนทานต่อยา ปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียที่ล่องลอยอยู่อย่างอิสระ 50-500 เท่า [37] นอกจากนี้ พบว่า แบคทีเรียในไบโอฟิล์มจะมี อัตราการรอดชีวิตต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่า cell suspension 1000 เท่า [38] มีงานวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ สร้างไบโอฟิล์มต่อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าเชื้อที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ [39-41]

การใช้ยาปฏิชีวนะในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*

ปัญหาในการกำจัดการติดเชื้อ *Staphylococcus* ที่มีการสร้างไบโอฟิล์มคือไบโอฟิล์มจะต่อต่อยาปฏิชีวนะ มากกว่าแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอิสระใน suspension ไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากข้อ สะโพกเทียมที่ติดเชื้อต่อต่อยา benzylpenicillin, cefmetazole, cefotaxime, erythromycin และ vancomycin ที่ความ เข้มข้นสูงกว่า 512 µg/ml [40] ยา ciprofloxacin, clindamycin, cloxacillin, daptomycin fosfomycin, rifampicin, tigecycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ vancomycin ไม่มีประสิทธิภาพในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* and *S. epidermidis* ที่แยกได้จากการติดเชื้อที่ข้อเทียม [42] การศึกษาของ Hajdu และคณะ พบว่ายาน vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecycline และ ceftriaxone ไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกจากการติดเชื้อที่สายสวนได้ [43] ยา telavancin ที่ความเข้มข้น 0.125 - 2 µg/ml มีประสิทธิภาพใน การต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* และ *Enterococcus faecalis* ส่วนยา vancomycin ต้องใช้ความเข้มข้น มากกว่า 512 µg/ml จึงจะทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวได้ [44] ยา lysostaphin ทำลายเซลล์ที่มีชีวิตในไบโอฟิล์ม ของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ทั้งการทดสอบใน microtiter plate และ สายสวน [45] ยิ่งไปกว่านั้น ยา lysostaphin มีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA และ MSSA ในสายสวนหลอดเลือดในหนูทดลอง [46] เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของยา daptomycin, levofloxacin, linezolid, rifampicin tigecycline และ tobramycin ต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA พบว่า ยา tigecycline, daptomycin, rifampicin มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้าน ไบโอฟิล์มที่ทดสอบโดยมีค่า MBEC₉₀ เท่ากับ 16 µg/ml ค่า MBEC₉₀ ของยา tigecycline เท่ากับ 64 µg/ml ในขณะที่ ค่า MBEC₉₀ ของยา linezolid, levofloxacin, และ tobramycin สูงกว่า 128 µg/ml [47] จากการทดสอบยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ cefazolin, dicloxacillin, rifampicin, tetracycline, และ vancomycin ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *S. haemolyticus* โดยพบว่า ยา rifampicin สามารถลดจำนวนเชื้อดังกล่าวที่อยู่ในไบโอฟิล์มลงได้มากที่สุด โดยไบโอฟิล์ม จะไวต่อยาในกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และ โปรตีน มากกว่ายาในกลุ่มที่ยับยั้งผนังเซลล์ [39] ยา linezolid และ tigecycline มีฤทธิ์ต่อเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใน suspension อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดสามารถทำลายเซลล์ แบคทีเรียที่อยู่ในไบโอฟิล์มได้เพียง 50% [48]

การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus*

วิธีการรักษาเพียงวิธีเดียวไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียได้ การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด เป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่สร้างไบโอฟิล์ม การศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด โดยศึกษาในยา linezolid, rifampicin, cefazolin, oxacillin, vancomycin, gentamicin, azithromycin, ciprofloxacin, และ fusidic acid ทดสอบต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* พบว่า การใช้ยาร่วมกันในการต้านเชื้อ MSSA 11 สูตร และ *S. epidermidis* 9 สูตร ที่มีประสิทธิภาพในการต้านไบโอฟิล์ม โดยยา rifampicin เป็นยาที่ใช้มากที่สุดในการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับยาชนิดอื่น [49] หลังจากใช้ยา tetracycline ร่วมกับ rifampicin ยา tetracycline ร่วมกับ vancomycin และ trimethoprim sulfamethoxazole สามารถลดเซลล์มีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ลงได้ [50] การใช้ยา azithromycin ร่วมกับยา tigecycline หรือ ยา ceftriaxone ที่ความเข้มข้นสูงสามารถลดจำนวนเชื้อ *S. epidermidis* ในไบโอฟิล์มลงได้ 2 log และ 3 log ตามลำดับ ในขณะที่ยา daptomycin, fosfomycin และ vancomycin เมื่อใช้ร่วมกับยา azithromycin ไม่มีผลต่อไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าว [51] การใช้ยา rifampicin ร่วมกับยา gentamicin และ ยา clindamycin มีฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ทดสอบ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อใช้ยา rifampicin ร่วมกับยา levofloxacin สามารถฆ่าเชื้อได้ 3 สายพันธุ์จาก 5 สายพันธุ์ [52] เมื่อใช้ยา linezolid ที่ความเข้มข้น MIC ร่วมกับ N-acetylcysteine ที่ความเข้มข้น 10MIC สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. epidermidis* ที่เจริญในไบโอฟิล์มได้ 5 log CFU/ml [53] ยา lysoaphin ร่วมกับยา oxacillin ที่ความเข้มข้น sub-BMIC มีการเสริมฤทธิ์กัน ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA, MRSA และ *S. epidermidis* เมื่อทดสอบใน microtiter plate และ สายสวน [45] Ethanol, ethylenediaminetetraacetic acid, N-acetylcysteine, and talactoferrin เมื่อใช้ร่วมกับยา nafcillin และ vancomycin สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ [54]. การใช้ยา fosfomycin ร่วมกับยา arbekacin สามารถต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เมื่อทดสอบในหลอดทดลอง [55].

ฤทธิ์ของสารโรโดไมโทนในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

โรโดไมโทน (rhodomyrtone) เป็นสารซึ่งอยู่ในกลุ่ม acylphloroglucinol แยกได้จากใบกระทุ (Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk. มีฤทธิ์ที่ดีมากในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก [16-18] สารโรโดไมโทนมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) มีค่าเท่ากับ 0.5 µg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับค่า MIC ของยา vancomycin [16] นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus salivarius* [17-19] นอกจากนี้สารโรโดไมโทนยังมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *Clostridium difficile* โดยที่ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.625–2.5 mg/L และ ค่า MBC อยู่ระหว่าง 1.25–5 mg/L รวมทั้งสามารถยับยั้งการงอกของเอนโดสปอร์ของเชื้อดังกล่าว [56] สารโรโดไมโทนมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ผิวหนังโดยมีค่า IC₅₀ สูงกว่า 200 µg/ml หรือประมาณ 400 เท่าของค่า MIC [19] เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารโรโดไมโทนต่อเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* พบมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์การสร้างผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์ protein degradation, stress response และ oxidative stress, cell surface antigen, virulence factors และ กระบวนการเมตาบอลิซึม [57] นอกจากนี้ พบการเปลี่ยนแปลงของ secreted proteins เมื่อศึกษาในเชื้อ MRSA ที่ได้รับสาร rhodomyrtone เช่น staphylococcal immunodominant antigen A (IsaA), staphylococcal secretory antigen (SsaA), lipase precursor, glycerophosphoryl diester phosphodiesterase [58] เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค

รานสคริปโตมในเชื้อ MRSA พบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น amino acid metabolism, membrane function, ATP-binding cassette transportation และ lipoprotein และ nucleotide metabolism [59] การศึกษาในเซลล์แบคทีเรีย *Streptococcus pyogenes* พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับผนังเซลล์ การสร้าง septum ผิดปกติ และการแตกของเซลล์ นอกจากนี้ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, CAMP factor และ streptococcal pyrogenic exotoxin C ลดลง [60] กลไกการออกฤทธิ์ของสารโรโดไมโทนส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* โดยทำให้ membrane potential ของเซลล์ลดลงส่งผลให้มีการปล่อย ATP และ excretion cytoplasmic proteins ต่างๆ ออกจากเซลล์ [61] มีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารโรโดไมโทนอย่างต่อเนื่องและหลายงานวิจัยรายงานว่าเป้าหมายของสารดังกล่าวในการทำลายเซลล์อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ [62,63] นอกจากนี้สารโรโดไมโทนจะมีประสิทธิภาพต่อเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกแล้ว สารยังมีประสิทธิภาพต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยสามารถลดจำนวนเชื้อที่เจริญในไบโอฟิล์มที่มีอายุ 24 วัน และ 5 วัน ได้ นอกจากนี้การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวลดลงในทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ [64] เมื่อศึกษายีน *atl* และ *ica* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* หลังจากได้รับสารโรโดไมโทนพบว่า transcription signals ของยีนดังกล่าวลดลง [65] สาร rhodomlyrtone ที่ความเข้มข้น 1/16MIC and 1/8MIC สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Propionibacterium acnes* ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ความมีชีวิตของเชื้อ *P. acnes* ที่เจริญในไบโอฟิล์มเมื่อได้รับสารโรโดไมโทนที่ความเข้มข้น 4MIC และ 8MIC อยู่ระหว่าง 40-85% [66] นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของสารโรโดไมโทนต่อปัจจัยก่อโรคต่างๆ ที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรีย เช่น lipase [66,67]

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะและสาร rhodomlyrtone ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของการใช้สาร rhodomlyrtone ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อ total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของการใช้สาร rhodomlyrtone ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อการมีชีวิตของ biofilms ของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*

วิธีการวิจัย

1 แบคทีเรีย

การศึกษาค้นคว้านี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม เก็บเชื้อแบคทีเรียในอาหาร tryptic soy broth (TSB) ซึ่งมี glycerol 20% เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 h.

2. ยาปฏิชีวนะ

การศึกษาค้นคว้านี้เลือกยาปฏิชีวนะที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆ ต่อเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ ampicillin, Chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamicin, rifampicin, sulfamethoxazole, tetracycline, trimethoprim, vancomycin และ rhodomlyrtone

เตรียม combination ระหว่างยาปฏิชีวนะ 1 ชนิด กับสาร rhodomlyrtone ซึ่งการศึกษาค้นคว้านี้เลือกใช้ยาปฏิชีวนะทั้งหมด 10 ชนิด โดยใช้ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดและสาร rhodomlyrtone ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC

3. การเตรียมสาร rhodomyrtone

นำใบกระทุบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 48 ชม. บดให้ละเอียด แช่ในเอทานอล 95% เขย่าเบา ๆ ทิ้งไว้ 7 วัน ระบายเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ละลายสารสกัดหยาบจากใบกระทุบด้วยเมทานอล แล้วทำการแยกส่วนที่ไม่ละลายออกโดยการกรอง นำส่วนที่เป็นสารละลายมาระเหยให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-60°C นำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนในปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถละลายสารสกัดได้หมด ทำการแยกส่วนสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ใช้ไดคลอโรมีเทน และอะซีโตน เป็นตัวชะสารสกัดทิ้งบริสุทธิ์ออกจากคอลัมน์ตามลำดับ ใช้การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทำการคัดแยกสาร (bioassay-guided fractionation) ใช้วิธีการเอกซ์เทนซีฟ 1 (extensive 1) และ 2 ดี เอ็นเอ็มอาร์ สเปกโทรสโกปี (2D NMR spectroscopy) และ แมสสเปกโทรสโกปี (mass spectroscopy) สาร rhodomyrtone ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

4. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

ซึ่งยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดและสาร rhodomyrtone ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ทำการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์แบบลำดับสองให้มีความเข้มข้น 128-0.06 µg/ml ใน microtiter plate แบบ 96 หลุมให้ปริมาตรหลุมละ 20 µl ตูต Mueller-Hinton broth (MHB) ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 80 µl ตูตเชื้อ (มีเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml) ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 100 µl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 16-18 ชม. บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC ทดสอบหาค่า MBC โดยนำแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบหาค่า MIC เพาะเลี้ยงบนอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชม. บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MBC

5. ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ต่อ total biofilms biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984

นำเชื้อแบคทีเรีย 10^6 CFU/ml ปริมาตร 200 µl ในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) 200 µl 2 ครั้ง จากนั้นเติม TSB ปริมาตร 200 µl ซึ่งมียาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MIC และ 2MIC เพียงสารเดียว และยาปฏิชีวนะที่ใช้ร่วมกับสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MIC จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. ล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 200 µl 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ย้อมสี total biofilm biomass โดยการเติม 0.1% crystal violet 200 µl ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำและทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเติม DMSO ลงไป 200 µl เขย่าเบา ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 570 nm

6. ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ต่อ การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984

นำเชื้อแบคทีเรีย 10^6 CFU/ml ปริมาตร 200 µl เติมนใน 96 well microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งและล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเติม TSB (180 µl) และยาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone เพียงสารเดียว ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MIC และ 2MIC และยาปฏิชีวนะที่ใช้ร่วมกับสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MIC (20 µl) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งและเติม PBS 200 µl ซึ่งมี methylthiazolotetrazolium (MTT) ความเข้มข้น 0.05 mg/ml บ่มที่ 37°C นาน 2 ชม. จากนั้นละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm

ผลการทดลอง

1. ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของสารต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

ค่า MIC และ MBC ของสารต้านแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 1 โดยค่า MIC ในการต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 อยู่ระหว่าง 0.015-4 µg/ml ยกเว้นยา sulfamethoxazole ค่า MIC มากกว่า 32 µg/ml ในขณะที่ ค่า MIC ของยา rifampicin, tetracycline, rhodomyrtone, vancomycin และ chloramphenicol ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 เท่ากับ 0.015, 0.25, 2, 8 และ 16 µg/ml ตามลำดับ ส่วน MIC ของยา ampicillin clindamycin erythromycin gentamicin และ sulfamethoxazole มีค่ามากกว่า 32 µg/ml

ตารางที่ 1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

Antibacterial agents	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
Ampicillin	0.5	0.5	>32	ND
Chloramphenicol	8	>32	16	>32
Clindamycin	0.12	2	>32	ND
Erythromycin	0.25	>32	>32	ND
Gentamicin	0.5	1	>32	ND
Rifampicin	0.015	0.03	0.015	0.03
Sulfamethoxazole	>32	ND	>32	ND
Tetracycline	0.25	>32	0.25	>32
Trimethoprim	2	4	>32	ND
Vancomycin	4	4	8	8
Rhodomyrtone	1	1	2	2

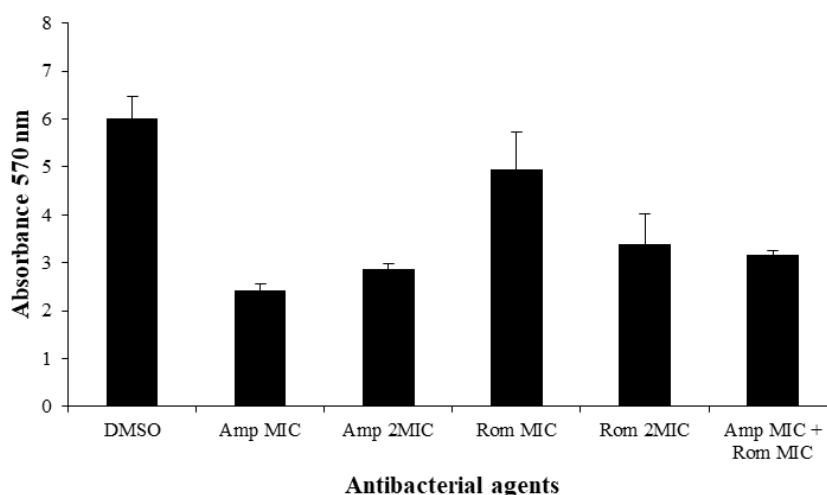
ND = not determine

2. ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ต่อ total biofilms biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984

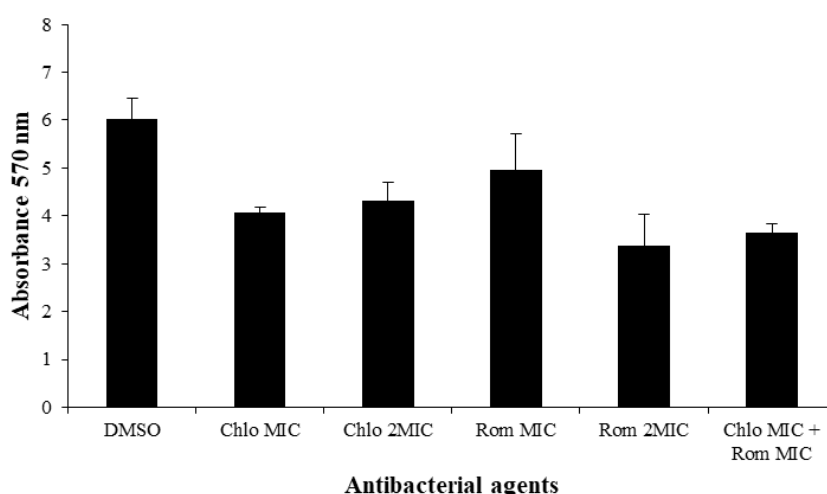
Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone แสดงดังรูปที่ 1-10 ที่ความเข้มข้น 2MIC ยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบยกเว้นยา vancomycin สามารถลด total biofilms biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ลงได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (1% DMSO) โดยยา rifampicin สามารถลด total biofilms biomass ลงได้มากที่สุดคือ 61.7% รองลงมาคือยา ampicillin (53%) และ clindamycin (48%) ตามลำดับ ในขณะที่สาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 2MIC สามารถลด total biofilms biomass ของเชื้อดังกล่าวลงได้ (46.7%) เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น MIC ร่วมกับสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC พบว่าการใช้ยา rifampicin ร่วมกับสาร rhodomyrtone สามารถลด total biofilms biomass ลงได้มากที่สุดคือ 53.4% รองลงมาคือยา ampicillin (48%) clindamycin (38.4%) และ chloramphenicol (38.4%) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม total biofilm biomass ของเชื้อดังกล่าวหลังจากได้รับยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่น่าจะ

เกิดการเสริมฤทธิ์กันของยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone ในขณะที่การใช้ยา trimethoprim และ vancomycin ไม่สามารถทำให้ total biofilms biomass ลดลงได้

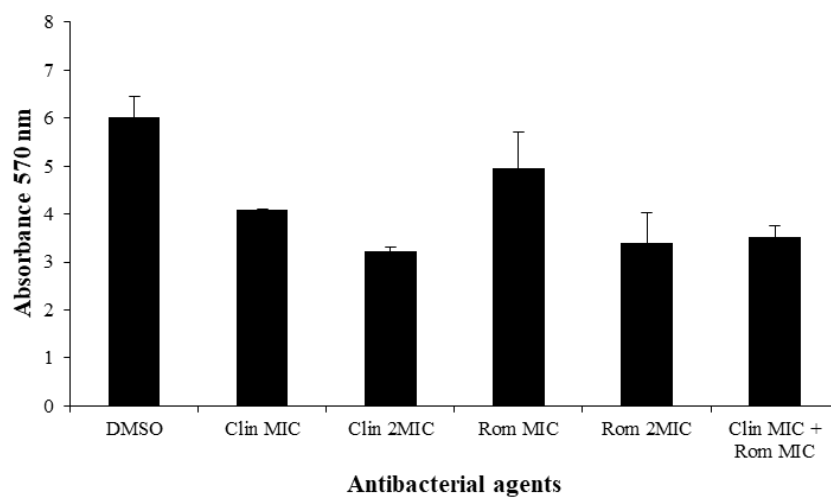
เนื่องจากค่า MIC ของยา ampicillin, clindamycin, erythromycin, gentamycin, sulfamethoxazole และ trimethoprim ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 มีค่ามากกว่า 32 µg/ml ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ยาดังกล่าวที่ความเข้มข้น 16 และ 32 µg/ml ทดสอบร่วมกับสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC ต่อ total biofilm biomass ของเชื้อ ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 11-20 โดยพบว่ายาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิดข้างต้นไม่สามารถลด total biofilms biomass ของเชื้อได้ ในขณะที่การใช้ยา chloramphenicol tetracycline vancomycin และ rifampicin ที่ความเข้มข้น 2MIC ไม่สามารถลด total biofilm biomass ได้ เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบร่วมกับสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC พบว่าไม่สามารถลด total biofilms biomass ลดลงได้เช่นกัน



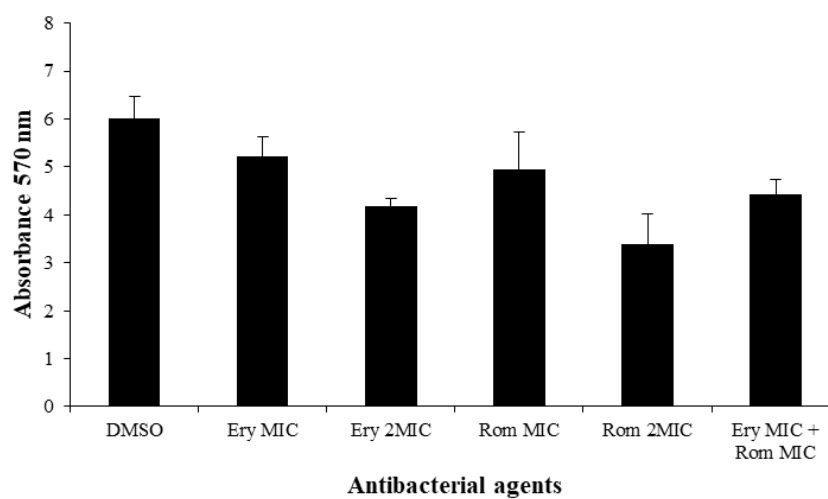
รูปที่ 1 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา ampicillin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



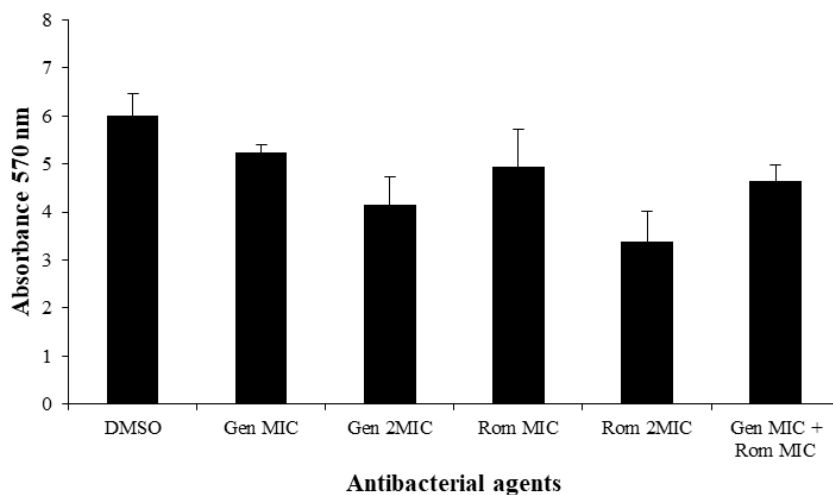
รูปที่ 2 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา chloramphenicol ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



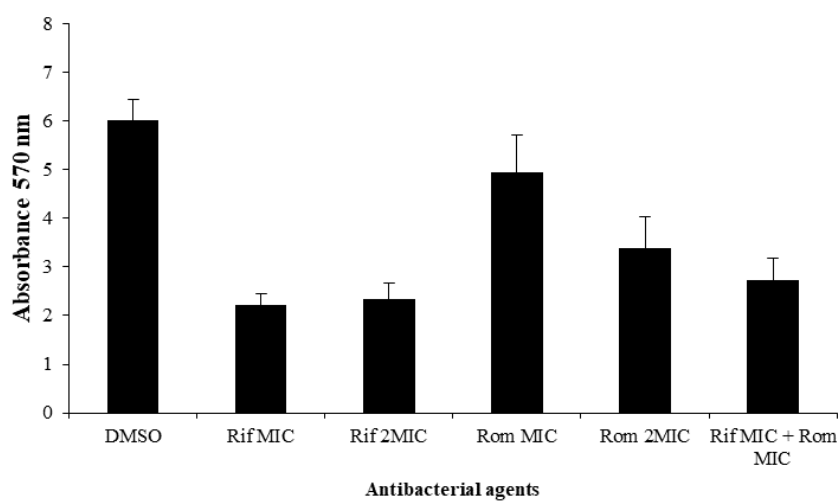
รูปที่ 3 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา clindamycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



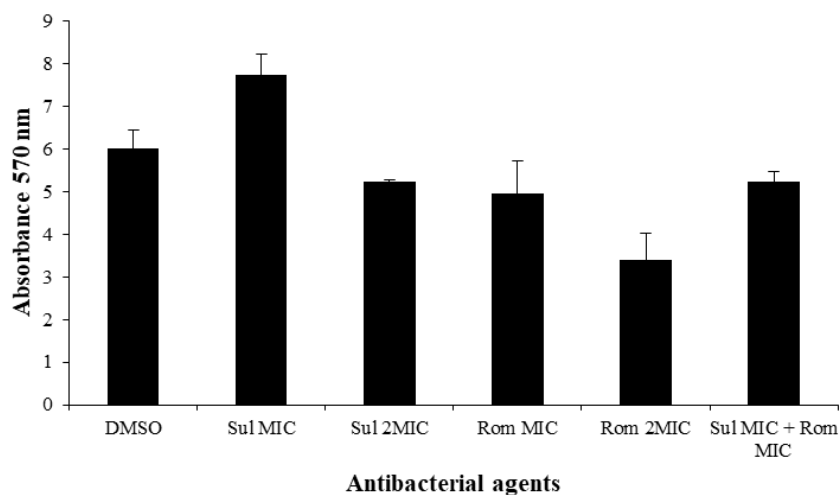
รูปที่ 4 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา erythromycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



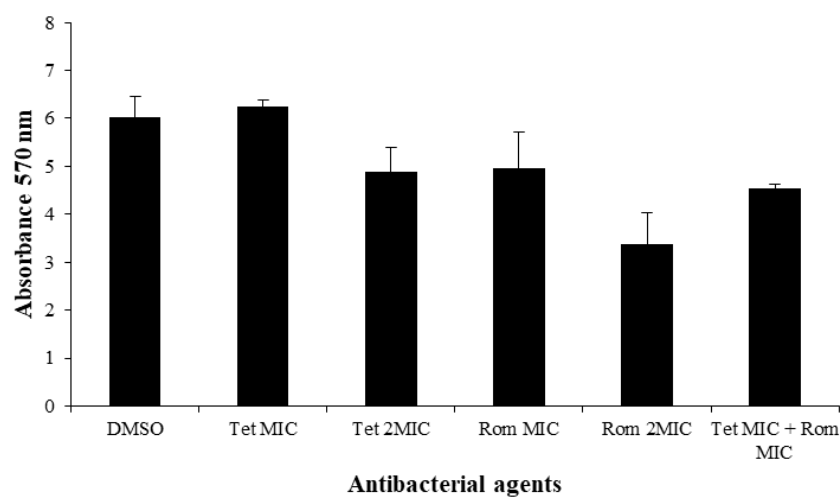
รูปที่ 5 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา gentamycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



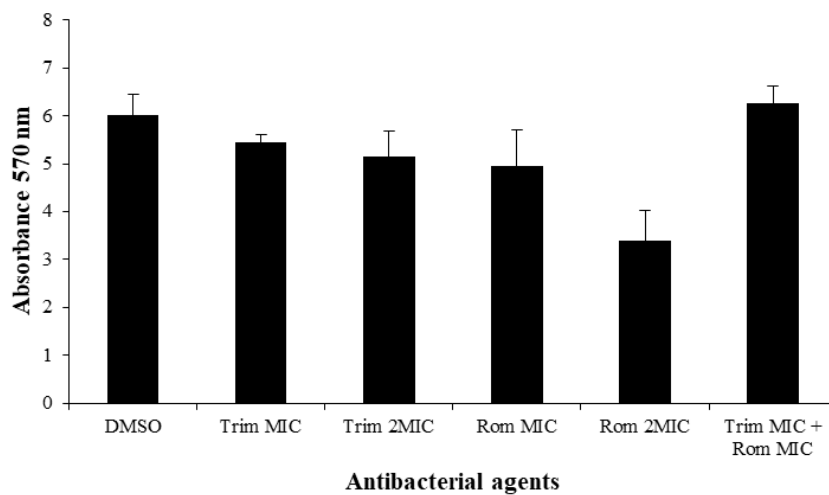
รูปที่ 6 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา rifampicin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



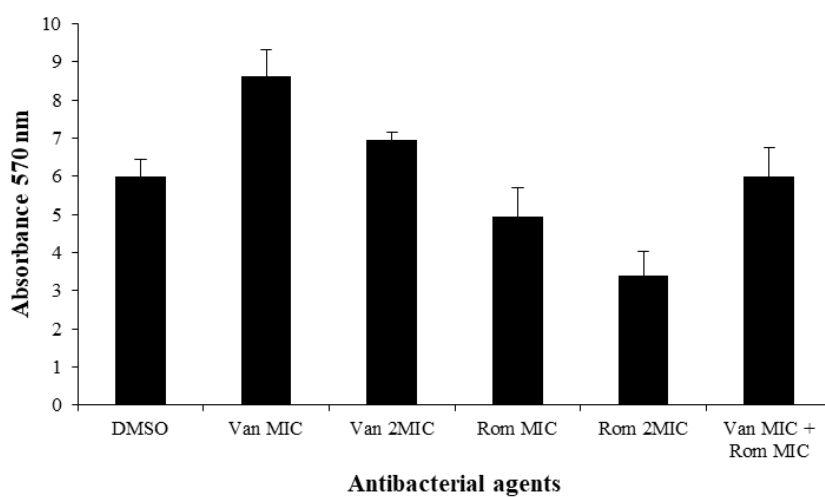
รูปที่ 7 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา sulfamethoxazole ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



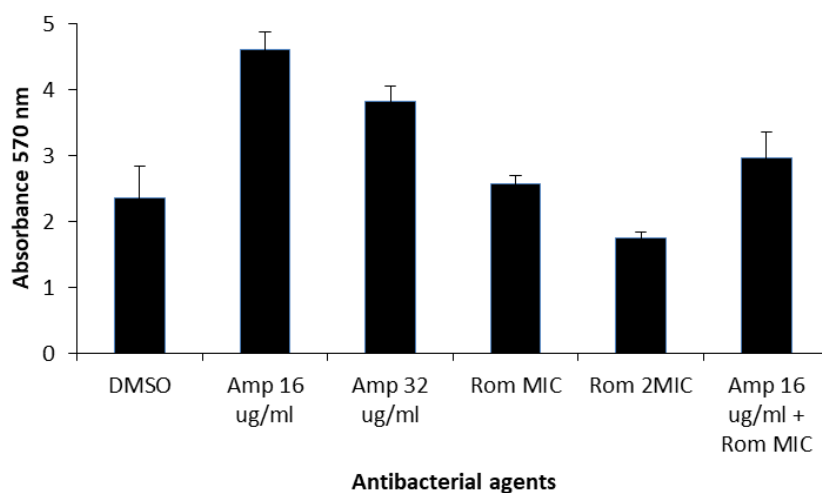
รูปที่ 8 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา tetracycline ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



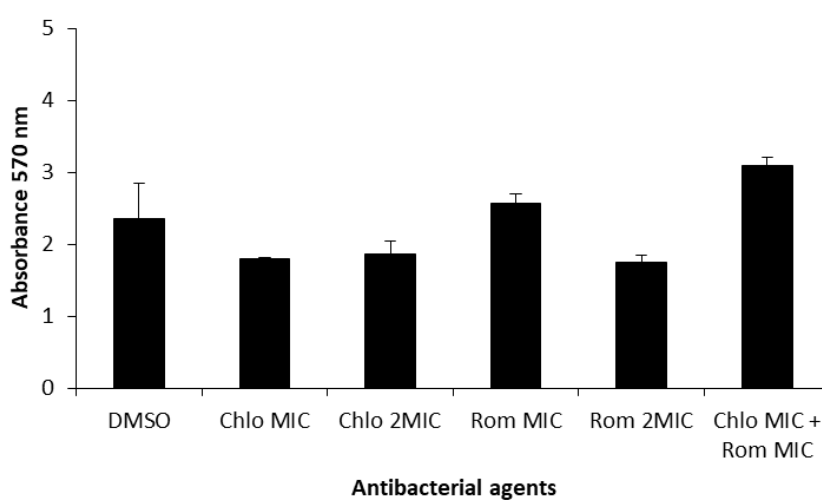
รูปที่ 9 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา trimethoprim ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



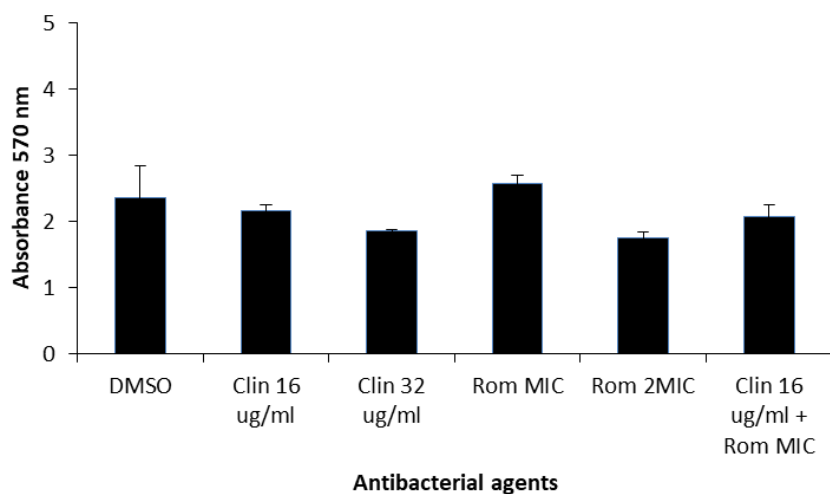
รูปที่ 10 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา vancomycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



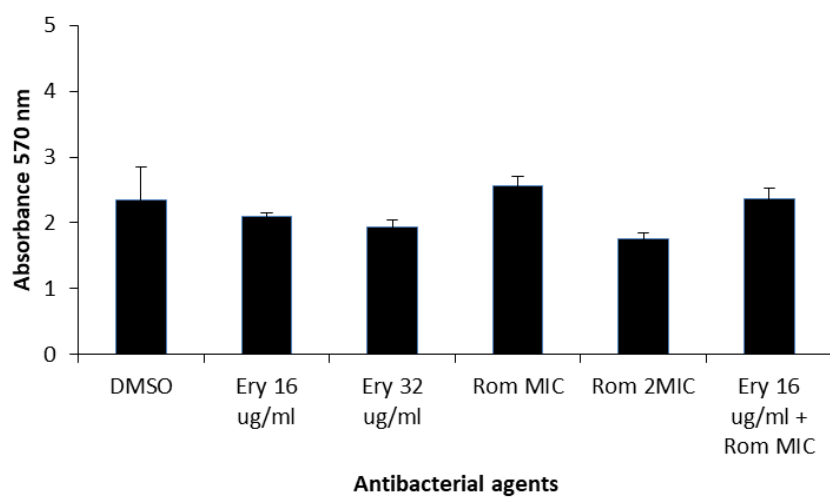
รูปที่ 11 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา ampicillin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



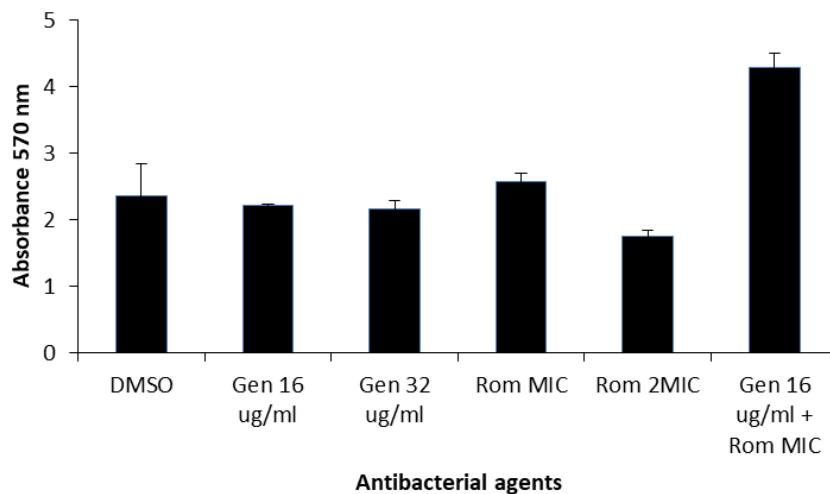
รูปที่ 12 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา chloramphenicol ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



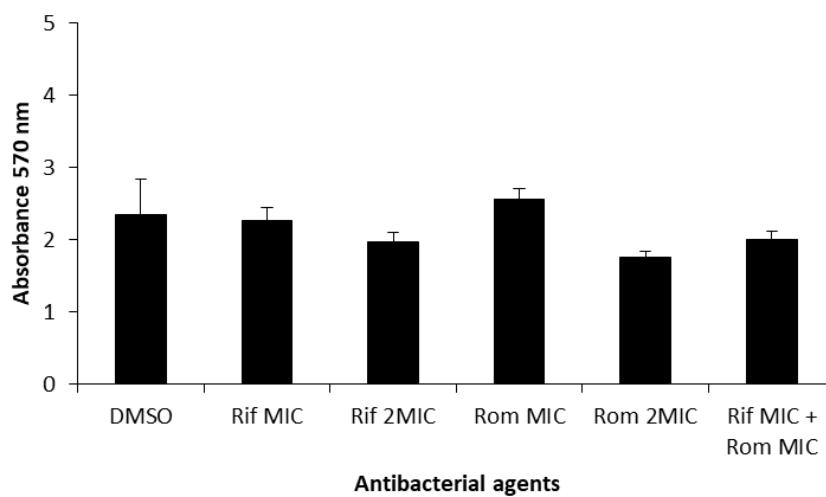
รูปที่ 13 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา clindamycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



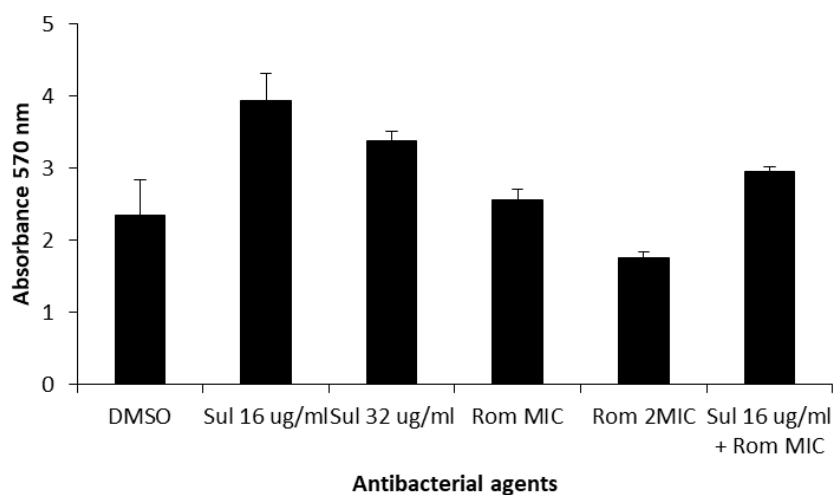
รูปที่ 14 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา erythromycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



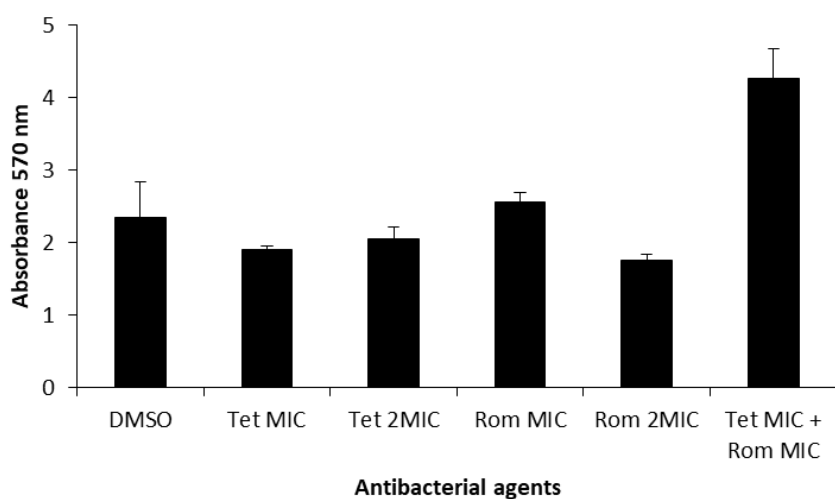
รูปที่ 15 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา gentamycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



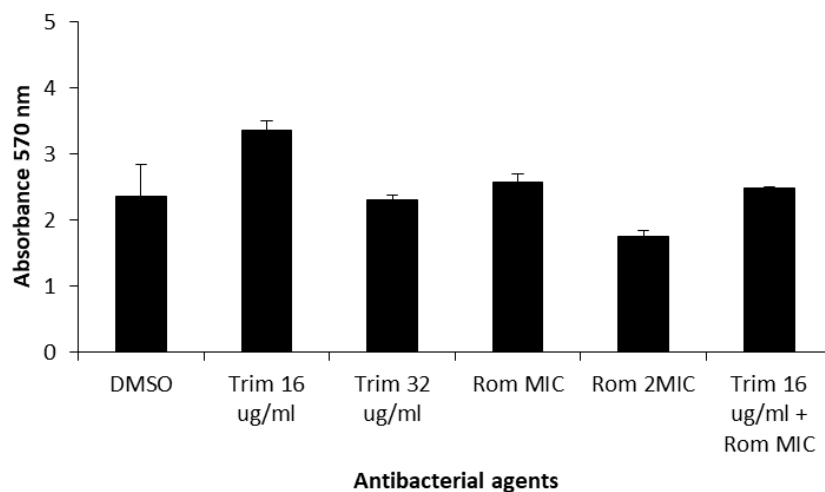
รูปที่ 16 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา rifampicin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



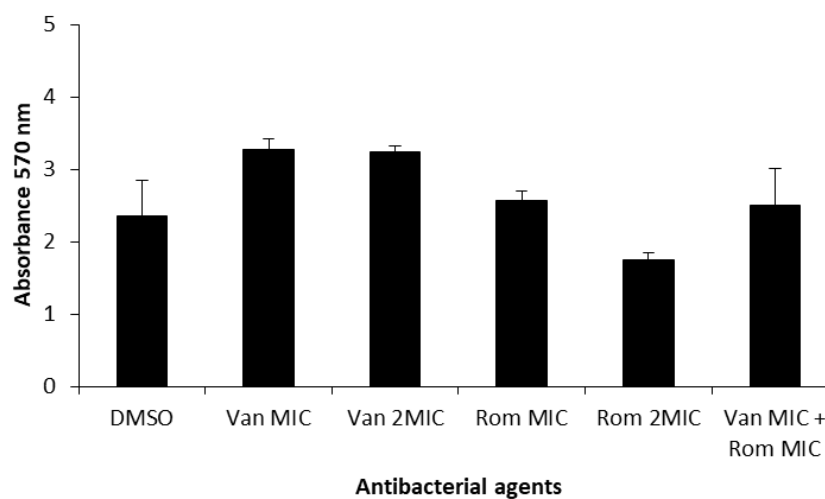
รูปที่ 17 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา sulfamethoxazole ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 18 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา tetracycline ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 19 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา trimethoprim ร่วมกับสาร rhodomirtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

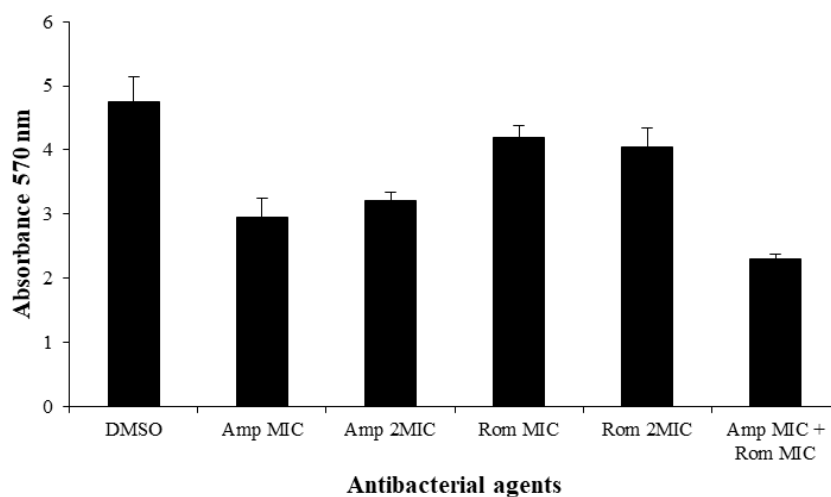


รูปที่ 20 Total biofilm biomass ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา vancomycin ร่วมกับสาร rhodomirtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

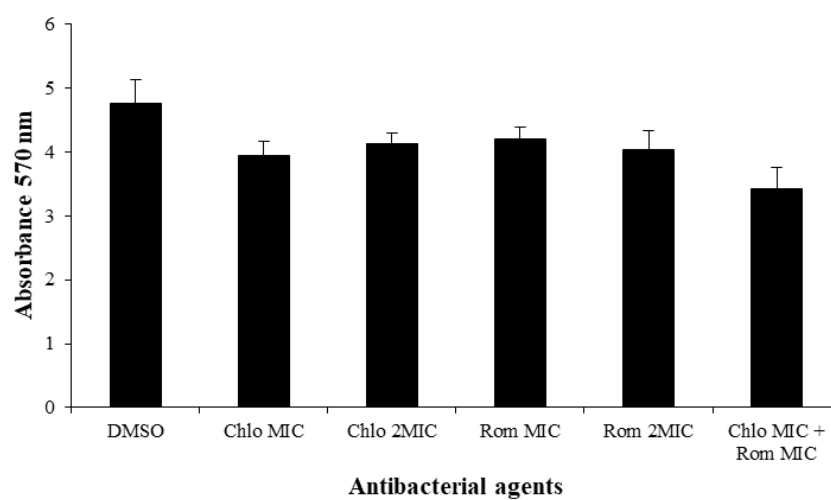
3. การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone

เมื่อทดสอบยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone ต่อการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 21-30 พบว่าที่ความเข้มข้น 2MIC ยา rifampicin, ampicillin, chloramphenicol และ tetracycline สามารถทำให้การมีชีวิตของเชื้อลดลง 57.5, 32, 29.8 และ 19.2% ตามลำดับ ในขณะที่ยา clindamycin erythromycin, gentamicin, sulfamethoxazole, trimethoprim และ vancomycin ไม่สามารถทำให้การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวลดลงได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 2MIC ลดการมีชีวิตของไบโอฟิล์มได้ 17.8% เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น MIC ร่วมกับสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC พบว่าการใช้ยา ampicillin หรือ chloramphenicol ร่วมกับสาร rhodomyrtone สามารถลดการมีชีวิตของ biofilms ลงได้ 51.1% หรือ 32% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวไม่ได้แตกต่างจากการใช้ยา ampicillin, chloramphenicol หรือสาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว

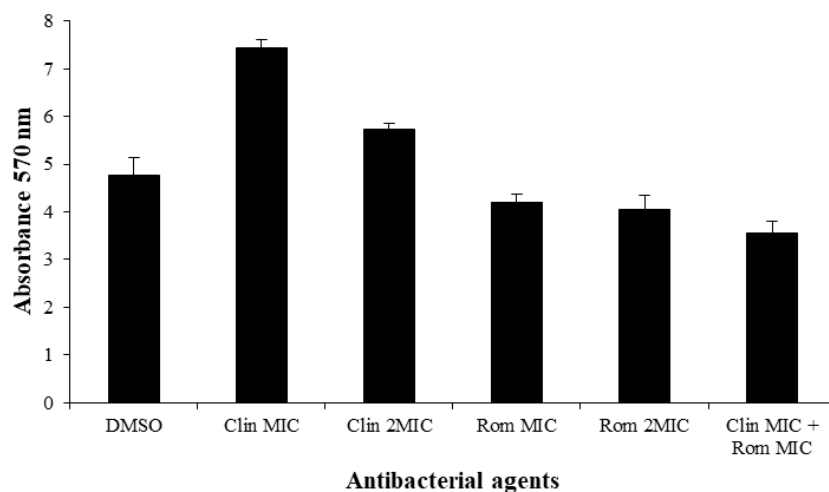
ผลการทดสอบการมีชีวิตของ biofilms ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone แสดงดังรูปที่ 31-40 เนื่องจากค่า MIC ของยา ampicillin clindamycin erythromycin gentamycin sulfamethoxazole และ trimethoprim ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 มีค่ามากกว่า 32 µg/ml ผู้วิจัยจึงใช้ยาดังกล่าวที่ความเข้มข้น 16 และ 32 µg/ml ในขณะที่ยา chloramphenicol, rifampicin, tetracycline และ vancomycin ทดสอบที่ความเข้มข้น MIC และ 2MIC พบว่ายา ampicillin, clindamycin, erythromycin, gentamycin sulfamethoxazole และ trimethoprim ที่ความเข้มข้น 16 และ 32 µg/ml และ ยา chloramphenicol, tetracycline และ vancomycin ที่ความเข้มข้น MIC และ 2MIC ไม่สามารถลดการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวได้ มีเพียงยา rifampicin เท่านั้นที่มีผลต่อการลดการมีชีวิตของเชื้อ โดยที่ความเข้มข้น 2MIC สามารถลดการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ 70.8% ในขณะที่สาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC และ 2MIC ลดการมีชีวิตของเชื้อได้ 26.9% และ 48.8% ตามลำดับ เมื่อใช้ยา ampicillin หรือ chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 16 µg/ml ร่วมกับสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC ปรากฏว่า การมีชีวิตของ biofilms ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ลดลง 41.5% หรือ 39.1% ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ยา ampicillin หรือ chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 2MIC เพียงชนิดเดียว แต่ไม่ได้มีความแตกต่างจากการใช้สาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว



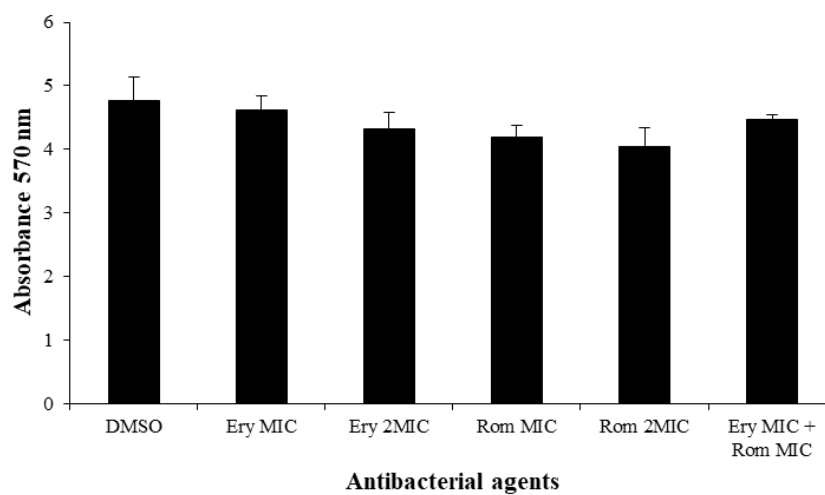
รูปที่ 21 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา ampicillin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



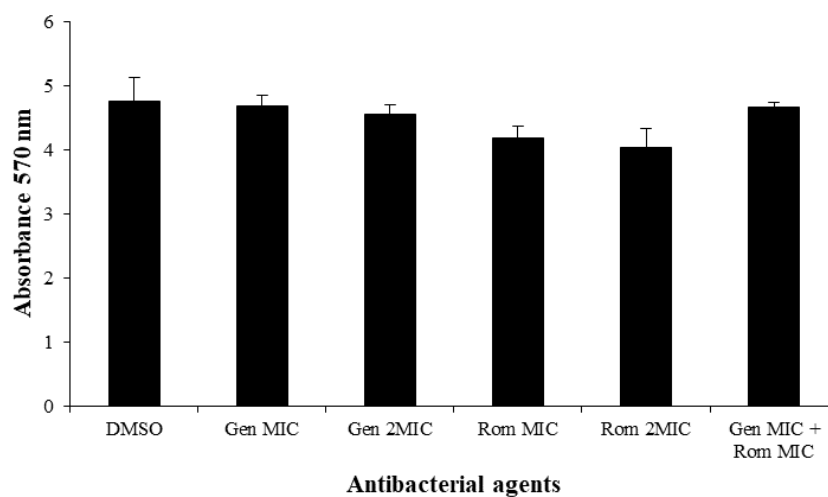
รูปที่ 22 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา chloramphenicol ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



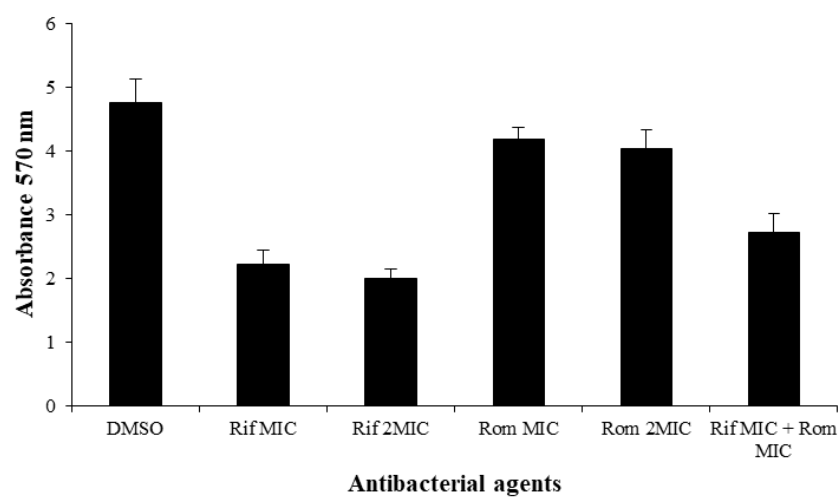
รูปที่ 23 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา clindamycin ร่วมกับสาร rhodomirtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



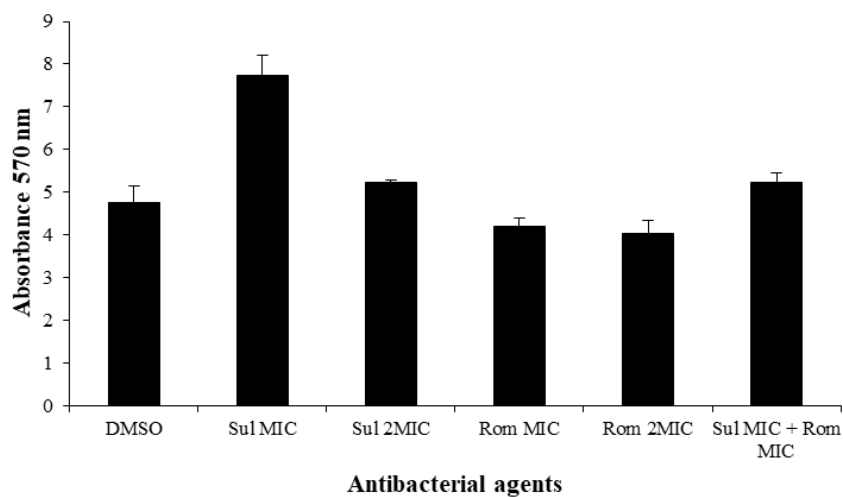
รูปที่ 24 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา erythromycin ร่วมกับสาร rhodomirtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



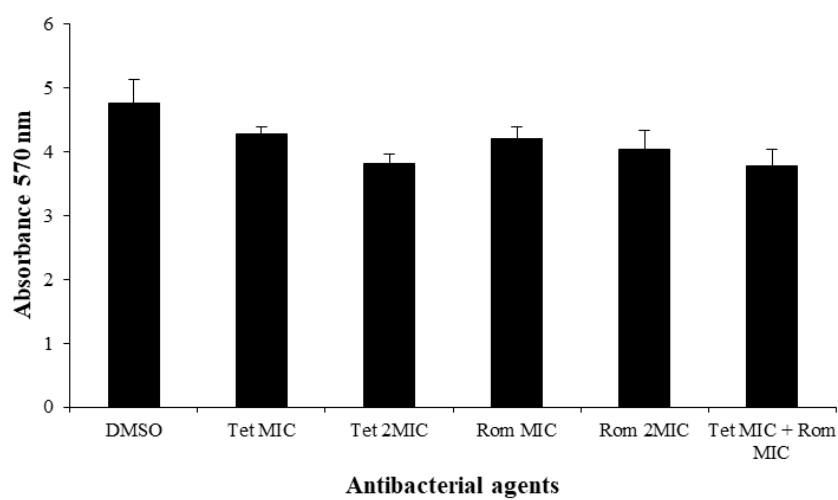
รูปที่ 25 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา gentamycin ร่วมกับสาร rhodomirtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



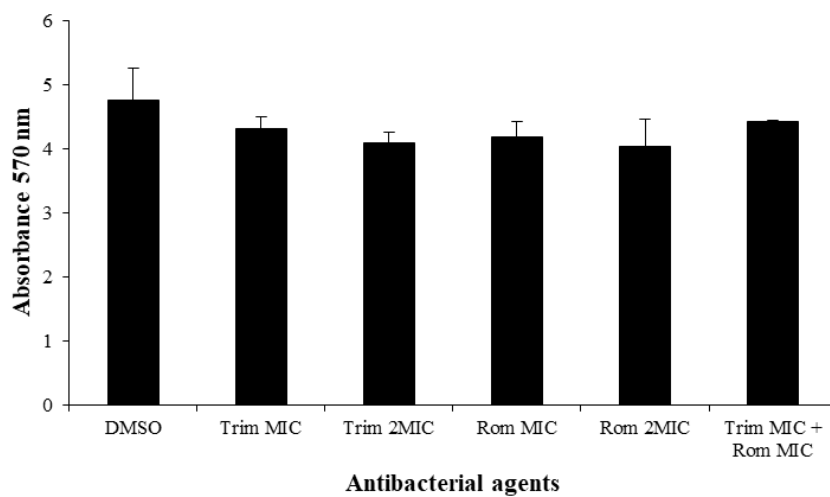
รูปที่ 26 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา rifampicin ร่วมกับสาร rhodomirtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



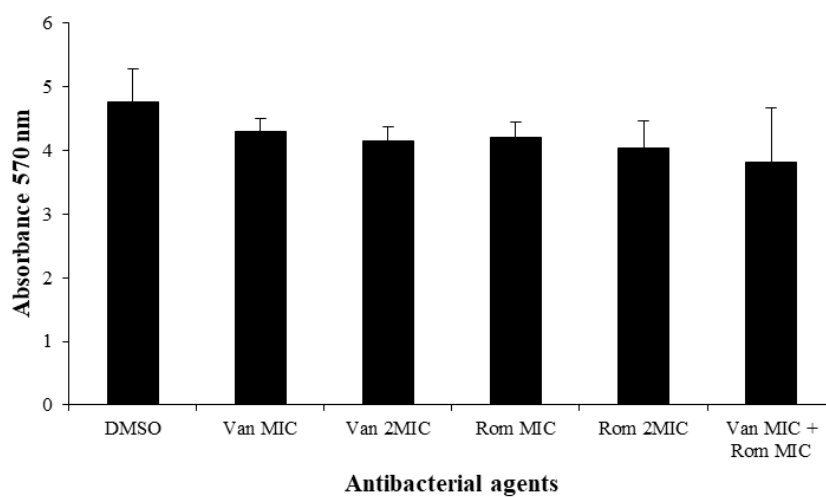
รูปที่ 27 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา sulfamethoxazole ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



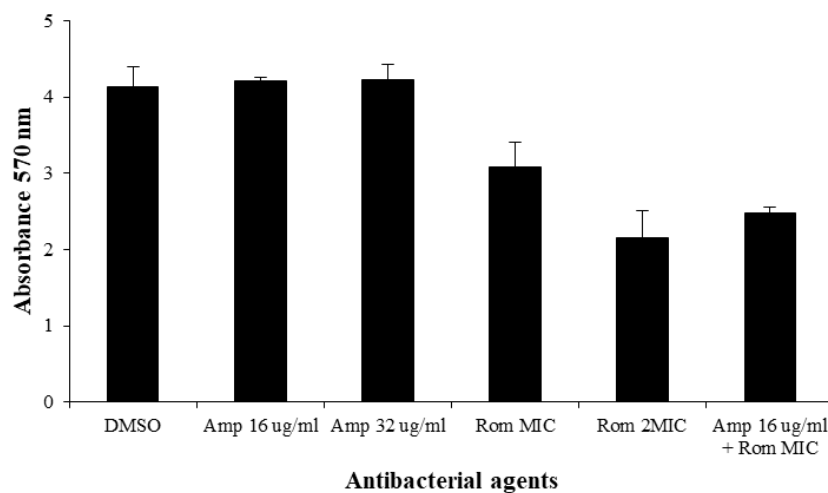
รูปที่ 28 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา tetracycline ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



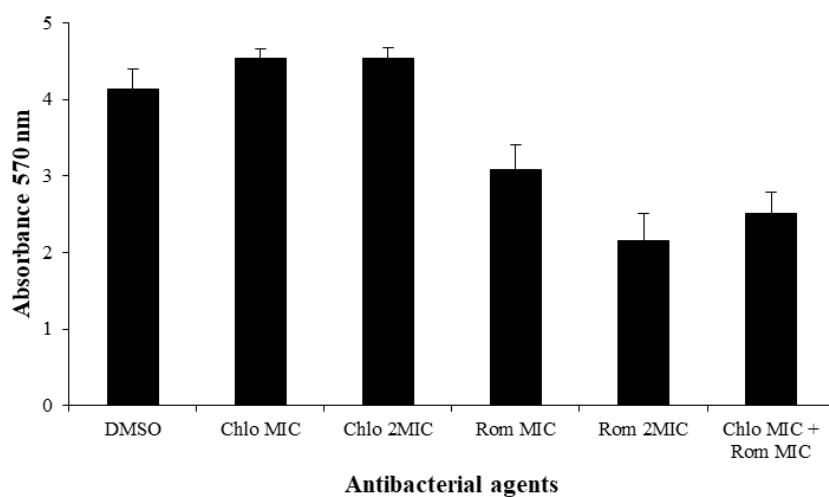
รูปที่ 29 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา trimethoprim ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



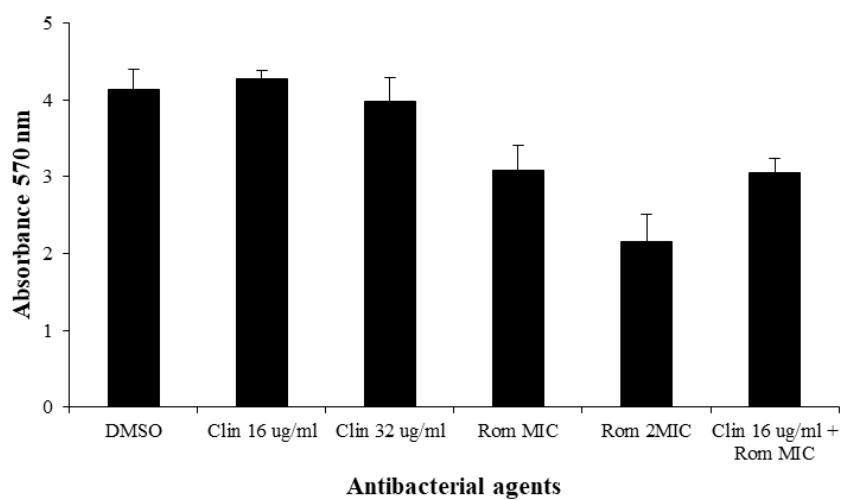
รูปที่ 30 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 หลังจากได้รับยา vancomycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



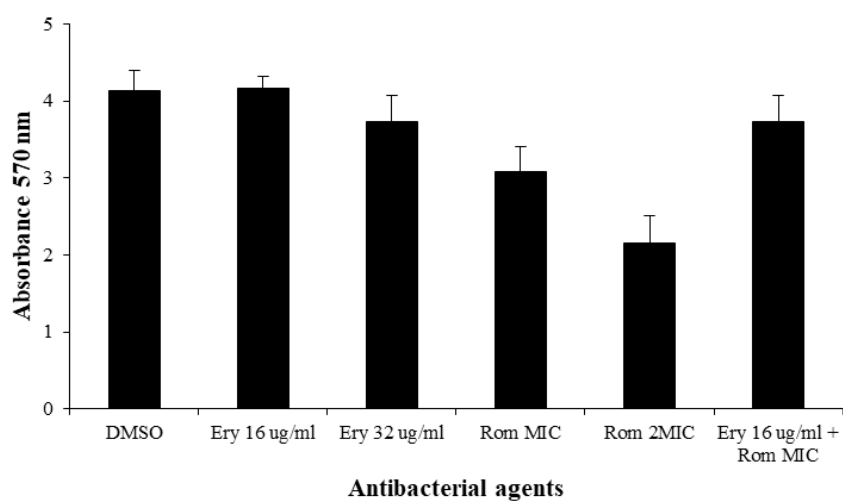
รูปที่ 31 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา ampicillin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



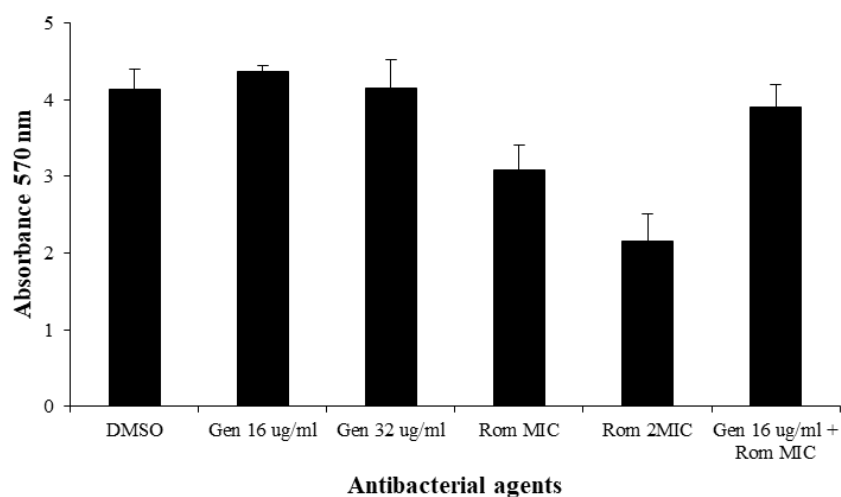
รูปที่ 32 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา chloramphenicol ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



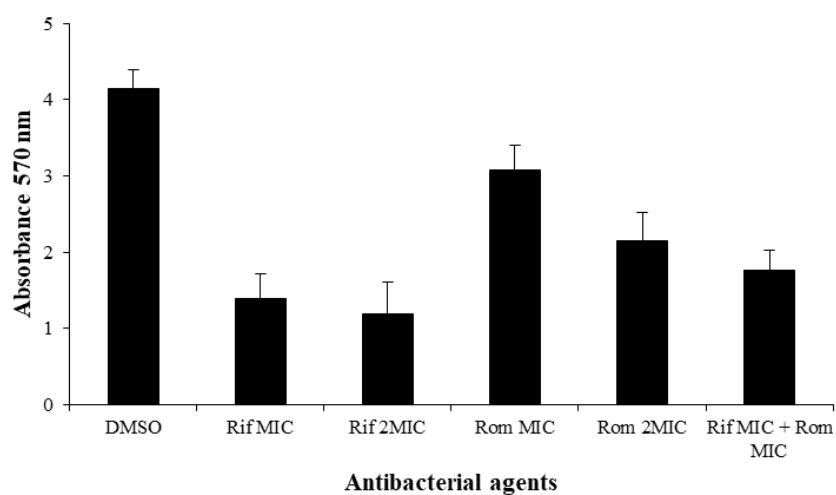
รูปที่ 33 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา clindamycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



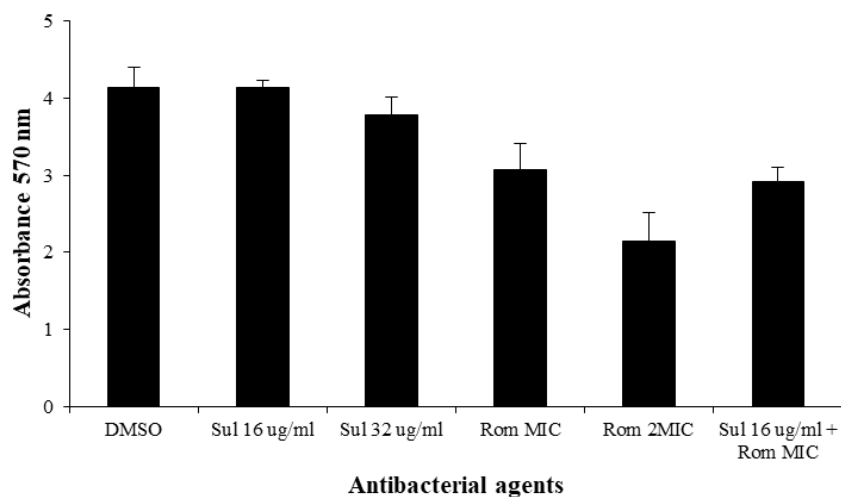
รูปที่ 34 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา erythromycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



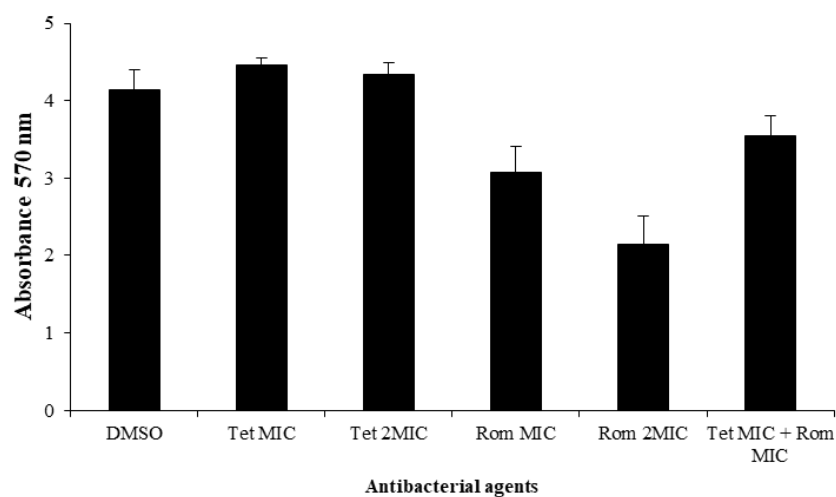
รูปที่ 35 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา gentamycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



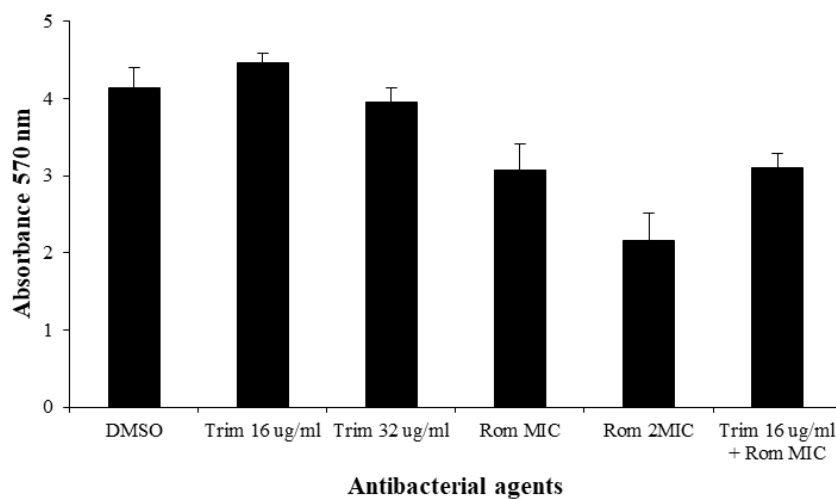
รูปที่ 36 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา rifampicin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



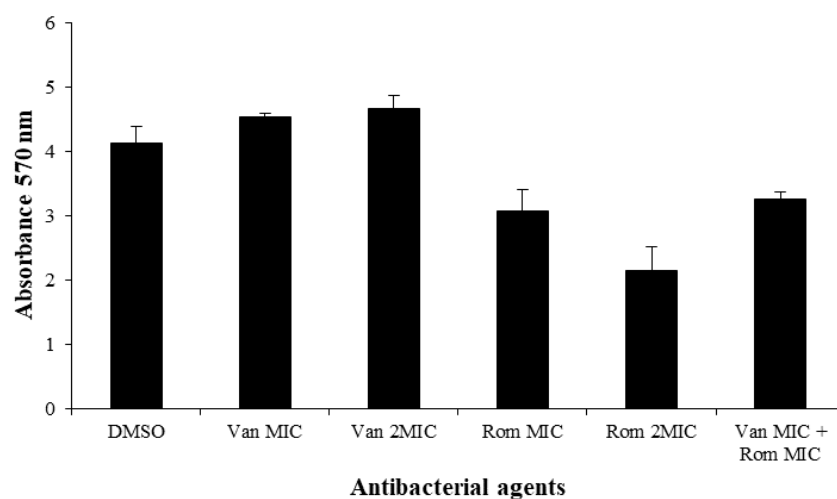
รูปที่ 37 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา sulfamethoxazole ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 38 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา tetracycline ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 39 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา trimethoprim ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 40 การมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยา vancomycin ร่วมกับสาร rhodomyrtone (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* ถือว่าเป็นปัญหาสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มส่งผลให้การทำลายเชื้ออย่างยั่งยืน extracellular polysaccharide ที่เชื้อสร้างขึ้นทำหน้าที่เป็นตัวกรองและเป็นทางสำหรับสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ เข้าไปในเซลล์ที่อยู่ด้านใน รวมทั้งป้องกันเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ สารพิษต่างๆ และยาปฏิชีวนะ [33] จากการที่แบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะทำให้การรักษาไม่ได้ผล นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นสูงมากในการรักษาจึงเป็นไปได้เนื่องจากผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้น

การใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด หรือ การใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสารสกัดจากพืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* งานวิจัยนี้เลือกใช้ยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด จากกลุ่มยาซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆ ต่อเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ทำให้การสร้างโปรตีนผิดปกติ ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ใช้ร่วมกับสาร rhodomyrtone ซึ่งออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยเลือกศึกษาหาความเข้มข้นต่ำ (MIC และ 2MIC) เพื่อคำนึงถึงความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้จริง

จากการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด และสาร rhodomyrtone พบว่า ยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบยกเว้นยา sulfamethoxazole มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 0.015-4 ug/ml ในขณะที่ค่า MIC ของยา rifampicin, tetracycline, rhodomyrtone, vancomycin และ chloramphenicol ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 เท่ากับ 0.015, 0.25, 2, 8 และ 16 ug/ml ตามลำดับ ค่า MIC ของยา ampicillin clindamycin erythromycin gentamicin และ sulfamethoxazole มีค่า มากกว่า 32 ug/ml ส่วนค่า MIC ของสาร rhodomyrtone ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 เท่ากับ 1 และ 2 ug/ml ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่า ยา ampicillin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, trimethoprim มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984

ผู้วิจัยศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะและสาร rhodomyrtone ต่อ total biofilm biomass ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 เนื่องจากไบโอฟิล์มประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีการเพิ่มจำนวนและมีการรวมกันของเซลล์และสร้าง extracellular matrix ใช้การย้อมสีคริสตัลไวโอเลตเพื่อตรวจสอบการสร้าง total biofilm biomass ของเชื้อเนื่องจากสีคริสตัลไวโอเลตจับกับโมเลกุลที่มีประจุลบ ได้แก่ เซลล์แบคทีเรียทั้งเซลล์ตายและเซลล์มีชีวิตรวมทั้ง matrix polysaccharides [68] ยา rifampicin มีประสิทธิภาพในการลด total biofilm biomass ของ *S. aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด รองลงมาคือยา ampicillin และ clindamycin ตามลำดับ ในขณะที่สาร rhodomyrtone สามารถลด total biofilm biomass ได้ใกล้เคียงกับยา clindamycin อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone ไม่พบว่าทำให้ total biofilm biomass ลดลง มากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกับการศึกษาต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 การใช้ยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิด ร่วมกับสาร rhodomyrtone ไม่สามารถลด total biofilm biomass ของเชื้อได้

เมื่อศึกษาการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะร่วมกับสาร rhodomyrtone พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ร่วมกับสาร rhodomyrtone ไม่สามารถลดการมีชีวิตของไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสาร rhodomyrtone เพียงชนิดเดียว ถึงแม้ว่าจะมีรายงานก่อนหน้านี้ถึงประสิทธิภาพของการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสารจากพืชในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย เช่น carvacrol, thymol, and eugenol เมื่อใช้ร่วมกับ nalidixic acid สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium [23] การใช้ beberine ร่วมกับยา ciprofloxacin สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Salmonella* ได้ [24]

ถึงแม้การศึกษาครั้งนี้จะไม่พบว่าเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิด ดังกล่าว ร่วมกับสาร rhodomyrtone สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการใช้ยาปฏิชีวนะเพียง 1 ชนิด พบว่า ยาที่มีประสิทธิภาพต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มากที่สุด คือ rifampicin ตามด้วย ampicillin ในขณะที่ยาที่มีประสิทธิภาพต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 มากที่สุด คือ rifampicin ตามด้วยสาร rhodomyrtone โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยา rifampicin ยับยั้งเอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase ส่งผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA [69] ยา ampicillin จับกับ penicillin binding protein ทำให้ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย [70] ในขณะที่สาร rhodomyrtone ออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ [61-63] การออกฤทธิ์ของยา 3 กลุ่มนี้ มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clinical Infectious Diseases. 1998; 26: 1179-1181.
2. Schlievert PM and Peterson ML. Staphylococci: abscesses and toxin-mediated diseases. In Engleberg NC, Dirita V, Dermody TS. Schaechter's mechanisms of microbial disease, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2007.
3. Inman RD, Gallegos KV, Brause BD, Redecha PB, Christian CL. Clinical and microbial features of prosthetic joint infection. The American Journal of Medicine. 1984; 77(1): 47-53.
4. McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2008; 60(12): 1551-1571.
5. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. Molecular Microbiology. 2002; 43(6): 1367-1378.
6. Minardi D, Montanari, MP, Tili E, Cochetti I, Mingoia M, et al. Effects of fluoroquinolones on bacterial adhesion and on preformed biofilm of strains isolated from urinary double J stents. Journal of Chemotherapy. 2008 20(2): 195-201.
7. Rose WE, Poppens PT. Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009; 63(3): 485-488.
8. Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Garland SM, Deighton MA. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2010; 9:16.
9. Marque C, Tasse J, Pracros A, Collin V, Franceschi C, et al. Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. Journal of Medical Microbiology. 2015; 64: 1021–1026.
10. Ardon CB, Prens EP, Fuursted K, Ejaz RN, Shailes J, et al. Biofilm production and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from Hidradenitis Suppurativa lesion. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2019; 33(1): 170-177.

11. Kuzma L, Rozalski M, Walencka E, Rozalska B, Wysokinska H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant staphylococci. *Phytomedicine*. 2007; 14(1): 31-35.
12. Nostro A, Roccaro SA, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56: 519-523.
13. Wang XQ, Yao X, Zhu ZA, Tang TT, Dai KR, et al. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009; 34(1): 60-66.
14. Rodriguesa JBS, Souzaa NT, Scaranoa JOA, Sousaa JM, Liraa MC, et al. Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. *LWT - Food Science and Technology*. 2018; 93: 293–299.
15. Agrawal A, Chaudhary U. Effect of natural compounds on inhibition of biofilm formation of multi drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* - an in vitro Study. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018; 7(2): 2921-2926.
16. Saising J, Hiranrat A, Mahabusarakam W, Ongsakul M, Voravuthikunchai SP. Rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as a natural antibiotic for staphylococcal cutaneous infections. *Journal of Health Science*. 2008; 54(5): 589-595.
17. Limsuwan S, Trip EN, Kouwen TR, Piersma S, Hiranrat A, et al. Rhodomyrtone: a new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytomedicine*. 2009; 16(6-7): 645-651.
18. Voravuthikunchai SP, Dolah S, Charennjiratrakul W. Control of *Bacillus cereus* in Foods by *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. leaf extract and its purified compound. *Journal of Food Protection*. 2010; 73(10): 1907-1912.
19. Saising J, Voravuthikunchai SP. Anti *Propionibacterium acnes* activity of rhodomyrtone, an effective compound from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe*. 2012; 18:400-404.
20. Pammi M, Liang R, Hicks JM, Barrish J, Versalovic, J. 2011. Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin. *Pediatric Research*. 70(6): 578-583.
21. Quave CL, Estevez-Carmona M, Compadre CM, Hobby G, Hendrickson H, et al. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS One*. 2012; 7(1): e28737.
22. Rogers SA, Huigens RW, Cavanagh J, Melander C. Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54(5): 2112-2118.
23. Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Chaabouni Y, Mahdouani K, Bakhrouf A, Chaieb K. 2017. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis*. 2017; 104: 56-63.

24. Shi C., Li M, Muhammad I, Ma X , Chang Y, et al. Combination of berberine and ciprofloxacin reduces multi-resistant *Salmonella* strain biofilm formation by depressing mRNA expressions of luxS, rpoE, and ompR. *Journal of Veterinary Science*. 2018; 19(6), 808-816.
25. Brooks GF, Butel JS, Ornston LM. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology, 20th ed. A Simon and Schuster company, Connecticut. 1995.
26. MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2000.
27. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 11th ed. Mosby, Missouri. 2002.
28. Venkatesh MP, Placencia F, Weisman LE. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2006; 17: 120-127.
29. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Win Jr WC. Color Atlas and Textbook Diagnostic Microbiology, 5th ed. JB Lippincott, Philadelphia 1997.
30. Oleksy A, Golonka E, Banbula A, Szmyd G, Moon J, et al. Growth phase-dependent production of a cell wall-associated elastinolytic cysteine proteinase by *Staphylococcus epidermidis*. *Biological Chemistry*. 2004; 385: 525-535.
31. Sutherland IW. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. 2001; 9: 222-227.
32. Burkhardt CN, Burkhardt CG. Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*. 2003; 42: 925-927.
33. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8: 881-890.
34. Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet*. 2002; 2: 667-685.
35. Veenstra GJ, Cremers FF, Dijk H, Fleer A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*. 1996; 178: 537-541.
36. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 2001; 183(9): 2888-2896.
37. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 2001; 9: 34-39.
38. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; 358: 135-138.
39. Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56(2) :331-336.
40. Nishimura S, Tsurumoto T, Yonekura A, Adachi K, Shindo H. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *Journal of Orthopaedic Science*. 2006; 11(1): 46-50.

41. Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51(3): 888-895.
42. Molina-Manso D, Prado G, Ortiz-Perez A, Manrubia-Cobo M, Gomez-Barrena E, et al. 2013. In Vitro Susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013; 41(6): 521-523.
43. Hajdu S, Lassnigg A, Graninger W, Hirschl AM, Presterl E. Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Orthopaedic Research*. 2009; 27(10): 1361-1365.
44. LaPlante KL, Mermel LA. In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; 53: 3166-3169.
45. Walencka E, Sadowska B, Rozalska S, Hryniewicz W, Rozalska B. Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication. *Polish Journal of Microbiology*. 2005; 54(3): 191-200.
46. Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009; 64(1): 94-100.
47. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Stefani S. Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: Comparison with other drugs. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2010; 59(3): 466-469.
48. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009; 33(4): 374-378.
49. Saginur R, Stdenis M, Ferris W, Aaron SD, Chan F, et al. Multiple combination bactericidal testing of Staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50(1): 55-61.
50. Monzon M, Oteiza C, Leiva J, Amorena B. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48(6): 793-801.
51. Presterl E, Hajdu S, Lassnigg AM, Hirschl AM, Holinka J, et al. Effects of azithromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 2009; 53(8): 3205-3210.
52. Gomes F, Teixeira P, Ceri H, Oliveira R. 2012. Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *The Indian Journal of Medical Research*. 2018; 135(4): 542-547.
53. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, et al. Combined effect of linezolid and *N*-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2013; 31(10): 655-659.

54. Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. 2009. Novel Synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58(7): 936-944.
55. Morikawa K, Nonaka M, Yoshikawa Y, Torii I. Synergistic effect of fosfomycin and arbekacin on a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced biofilm in a rat model. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005; 25(1): 44-50.
56. Srisuwan S, Mackin KE, Hocking D, Lyras D, Bennett-Wood V, et al. Antibacterial activity of rhodomyrtone on *Clostridium difficile* vegetative cells and spores in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018; 52(5): 724-729.
57. Sianglum W, Srimanote P, Wonglumsom W, Kittiniyom K, Voravuthikunchai SP. Proteome analyses of cellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrtone, a novel antibiotic candidate. *PLoS One*. 2011; 6 (2): e16628.
58. Visutthi M, Srimanote P, Voravuthikunchai SP. Responses in the expression of extracellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrtone. *Journal of Microbiology*. 2011; 49(6): 956-964.
59. Sianglum W, Srimanote P, Taylor PW, Rosado H, Voravuthikunchai SP. Transcriptome analysis of responses to rhodomyrtone in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45744.
60. Limsuwan S, Hesseling-Meinders A, Voravuthikunchai SP, Diji JM, Kayser O. Potential antibiotic and anti-infective effects of rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. on *Streptococcus pyogenes* as revealed by proteomics. *Phytomedicine*. 2011; 18(11): 934-940.
61. Saising J, Nguyen MT, Härtner T, Ebner P, Bhuyan AAM, et al. Rhodomyrtone (rom) is a membrane-active compound. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2018; 1860: 1114-1124.
62. Sianglum W, Saeloh D, Tongtawe P, Wootipoom N, Indrawattana N, et al. Early Effects of Rhodomyrtone on Membrane Integrity in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*. 2018; 24(7): 882-889.
63. Saeloh D, Tipmanee V, Jim KK, Dekker MP, Wilbert Bitter W, et al. The novel antibiotic rhodomyrtone traps membrane proteins in vesicles with increased fluidity. *PLoS Pathog* 2018; 14(2): e1006876.
64. Saising J, Ongsakul M, Voravuthikunchai SP. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*. 2011; 60: 1793-1800.
65. Saising J, Götz F, Dube L, Ziebandt AK and Voravuthikunchai SP. 2015. Inhibition of staphylococcal biofilm-related gene transcription by rhodomyrtone, a new antibacterial agent. *Annals of Microbiology*. 2015; 65: 659-665.
66. Wunnoo S, Saising J and Voravuthikunchai SP. Rhodomyrtone inhibits lipase production, biofilm formation, and disorganizes established biofilm in *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe*. 2017; 43: 61-68.
67. Leejae S, Hasap L, Voravuthikunchai SP. 2013. Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by rhodomyrtone, a novel antibiotic candidate. *Journal of Medical Microbiology*. 2013; 62: 421-8.

68. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, et al. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*. 2017; 43(3): 313-351.
69. Walter W. Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Reviews of Infectious Diseases*. 1983; 5: S407-S411.
70. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8: 423–435.