รหัสโครงการ SUT1-111-60-12-20

รายงานการวิจัย

การศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในการสร้างสารและปล่อยออกมาเพื่อยับยั้ง hemolysins ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus*

Study of the capability of normal flora in producing and secreting factors for *Staphylococcus aureus* hemolysin inhibition

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-111-60-12-20

รายงานการวิจัย

การศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในการสร้างสารและปล่อยออกมาเพื่อยับยั้ง hemolysins ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus*

Study of the capability of normal flora in producing and secreting factors for *Staphylococcus aureus* hemolysin inhibition

คณะผู้วิจัย
หัวหน้าโครงการ
ดร. มัณฑนา แจ่มกลาง
สาขาวิชาปรีคลินิก
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2563

บทคัดย่อ

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยทำให้เกิดโรคติดเชื้อได้ในหลายระบบของร่างกายและโรคติดเชื้อที่สามารถทำให้เกิดอาการรุนแรงในผู้ป่วยและทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูงคือ กลุ่มอาการติดเชื้อในกระแสเลือด และ staphylococcal toxic shock syndrome โดย *S. aureus* หลั่งสารพิษจำนวนมากเข้าสู่กระแสเลือด เช่น กลุ่มสารพิษที่เป็น polypeptides ที่สามารถทำลายเยื่อหุ้มเมมเบรนของเซลล์โฮสต์ สารพิษในกลุ่มนี้รวมถึง pore-forming toxins ประกอบด้วย α-hemolysin, β-hemolysin และ γ-hemolysin ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาตัวช่วยลดฤทธิ์ของสารพิษเหล่านี้ ซึ่งสามารถลดการทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงแตกจากสาร hemolysins ที่หลั่งออกมาจากเชื้อ *S. aureus* โดยเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น กลุ่มแกรมบวกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร ถูกนำมาทดสอบด้วยวิธีการทดสอบ reverse-CAMP test เพื่อดูความสามารถของเชื้อประจำถิ่นว่าสามารถลดฤทธิ์ของ hemolysins แล้วทำให้การแตกของเม็ดเลือดแดงลดลงหรือไม่ เราพบว่าจากเชื้อประจำถิ่น 25 isolates จาก rectal swab และ 183 สายพันธุ์ของ *Enterococcus* spp. ที่ได้รับมาจากแหล่งอื่น มีเชื้อจำนวน 9 isolates ให้ผลบวกจากการทดสอบ ซึ่งเมื่อทำการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบว่าเชื้อทั้ง 9 isolates เป็นชนิด *Enterococcus faecalis* จากนั้นเรานำเชื้อ 2 ใน 9 isolates ที่เป็นเชื้อ *E. faecalis* ไปทดสอบยืนยันความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกจาก *S. aureus* ลดลง ความสามารถในการรบกวนการทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกยืนยันโดยใช้วิธี co-incubation เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี co-incubation ของ supernatant ที่เลี้ยง *S. aureus* ร่วมกับ *Enterococcus* R3 พบการลดลงของการทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกได้ผลดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ *E. faecalis* บางสายพันธุ์มีความสามารถในการทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกลดลง โดยสารที่หลั่งออกมาจาก *E. faecalis* จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อไปและคาดว่าโมเลกุลที่ถูกสร้างใน *E. faecalis* จะเป็นชีวโมเลกุลที่มีศักยภาพในการพัฒนายารักษาโรคติดเชื้อจาก *S. aureus* ที่สร้างสารพิษที่มีฤทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและทำให้เกิดความรุนแรงของโรค

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Staphylococcus aureus, a commensal bacterium and human pathogen, is a leading cause of a variety of human diseases and the life-threatening staphylococcal toxic shock syndrome. *S. aureus* secretes numerous exotoxins including a group of polypeptides capable of damaging the host cell plasma membrane. These polypeptides include pore-forming toxins such as α-hemolysin, β-hemolysin, and γ-hemolysin. In this study, we aimed to search for a biological control that have ability to attenuate the hemolytic activity of the hemolysins produced from *S. aureus*. Twenty-five isolates of Gram-positive bacterial normal flora including *Enterococcus* spp. were isolated from human gastrointestinal tract and a collection of 183 *Enterococcus* spp were received from elsewhere. A reverse-CAMP test using human-blood agar was used as a screening method for hemolysis attenuation. There were 9 isolates of *Enterococcus* spp. demonstrating a hemolysis inhibition of *S. aureus*. All 9 isolates were identified as *Enterococcus faecalis* by MALDI-TOF MS. The capability in hemolysis inhibition was confirmed by using a co-incubation method. The co-incubation of the growth supernatant of *Enterococcus* R3 remarkably attenuated the hemolysis caused by the growth supernatant of *S. aureus*. The species identification of *Enterococcus* spp. exhibiting hemolysis attenuation was all found in *E. faecalis*. The effector molecules released from the enterococci isolates affecting the hemolysins of *S. aureus* will be further identified because they are promising biomolecules holding a potential in the development of a new generation of therapeutics.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันอยากขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้ให้โอกาสในการทำวิจัยครั้งนี้ ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560 ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้พื้นที่ อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในการให้การสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ภาวนา พนมเขต วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งในการทำการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวณัฐชยา ภักดีศิริวงษ์ และนางสาวสายน้ำทิพย์ รังดิษฐ นักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผู้ให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มกำลังในการทำการทดลองต่างๆ ครั้งนี้

ดร.มัณฑนา แจ่มกลาง
22 มกราคม 2563

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ
บทคัดย่อภาษาไทย
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ
สารบัญ
สารบัญตาราง
สารบัญภาพ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
..... 3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
การเก็บเชื้อแกรมบวก..... 12
Revers-CAMP test..... 12
Co-incubation 13
MALDI-TOF MS..... 13
บทที่ 4 ผลการวิจัย
การตรวจคัดกรองเชื้อประจำถิ่น..... 14
ผลการทดสอบด้วยวิธี Reverse-CAMP test..... 16
ผลของ Co-incubation method..... 17
Enterococcus spp. Identification..... 18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ
..... 20
บรรณานุกรม 23
ประวัติผู้วิจัย 30

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. แสดงผลการวินิจฉัยชนิดของเชื้อแกรมบวกที่แยกได้จาก rectal swab.....15
ตารางที่ 2. แสดงผลการวินิจฉัยสายพันธุ์ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS.....19

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1. แสดงลักษณะ Gram-positive cocci in cluster ของเชื้อ *S. aureus* จากการย้อมแบคทีเรียด้วยวิธี Gram stain....4
รูปที่ 2. แสดงลักษณะ hemolysis zone ที่เกิดจากการเลี้ยง *S. aureus* บน blood agar....7
รูปที่ 3. แสดงลักษณะ Gram-positive cocci in chain ของเชื้อ *Enterococcus* spp. จากการย้อมแบคทีเรียด้วยวิธี Gram stain....9
รูปที่ 4. แสดงหลักการการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบคทีเรีย....11
รูปที่ 5. แสดงวิธีการทดสอบด้วย Reverse-CAMP test....13
รูปที่ 6. แสดงสัดส่วนของเชื้อแกรมบวกที่แยกได้จาก rectal swab....14
รูปที่ 7. แสดงผลลบจากการทดสอบ Reverse-CAMP test จากตัวอย่างเชื้อกลุ่มแกรมบวก....16
รูปที่ 8. แสดงผลบวกจากการทดสอบด้วย Reverse-CAMP test ในเชื้อ *Enterococcus* spp....17
รูปที่ 9. (A) แสดงผลการทดสอบโดยวิธี co-incubation ของ *Enterococcus* spp. และ *S. aureus* (B) เปอร์เซ็นต์ hemolytic activity ของ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Enterococcus* spp....18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1.
บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

เชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่พบอิงอาศัยอยู่ตามช่องจมูก ผิวหนังของโฮสต์ที่เป็นคนและสัตว์ (Wertheim 2005) โรคที่พบบ่อยจากการติดเชื้อ *S. aureus* คือ โรคติดเชื้อในกระแสเลือด โรคติดเชื้อที่เยื่อหุ้มหัวใจ กระดูก ปอด ผิวหนัง และเนื้อเยื่อต่างๆ และที่สำคัญ โรคติดเชื้อที่ส่งผลให้มีโอกาสเสียชีวิตสูงคือ staphylococcal toxic shock syndrome (Tong et al., 2015) เชื้อ *S. aureus* ที่มีความสามารถในการก่อโรคได้รุนแรงนั้นมีความเกี่ยวข้องกับสารที่เชื้อผลิตออกมาทำให้การดำเนินโรคมีความรุนแรง (virulence factors) ทำให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้ายึดเกาะกับเซลล์ของโฮสต์ เชื้อแพร่กระจายในร่างกายของโฮสต์ บุกรุกระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ สารที่ก่อความรุนแรงคือสารพิษชนิดต่างๆ เช่น สารพิษที่มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) (Otto, 2014; Rouha, 2018) โดยสารพิษเหล่านี้เรียกว่า hemolysins ซึ่งถูกสร้างและปล่อยออกมาเพื่อทำลายเซลล์ของโฮสต์โดยตรง (Malachowa & DeLeo, 2011). Hemolysins ในกลุ่มที่เป็น polypeptides มีหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดความเสียหายต่อ plasma membrane ของเซลล์โฮสต์ เช่น pore-forming toxins ชนิด α-hemolysin, δ-hemolysin, and γ-hemolysin, ซึ่งมีบทบาททำให้เกิดโรค *S. aureus*-mediated diseases (Prévost, 2005; Vandenesch et al., 2012). การศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อประจำถิ่น (microbiota) บางชนิด เช่น เชื้อกลุ่ม Lactobacilli สามารถลดการยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผนังในคอ (pharyngeal epithelial cells) ของเชื้อก่อโรค *Streptococcus pyogenes* และบางรายงานพบเชื้อ *Enterococcus* spp. สามารถป้องกันการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคและมีการสร้างปัจจัยโมเลกุลบางอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น (Özdemir et al., 2011) ในการศึกษาครั้งนี้เราต้องการหาตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีความสามารถในการลดปฏิกิริยาการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) จาก hemolysins ที่ผลิตจากเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากโดยปกติการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ในกระแสเลือด จะใช้ยาปฏิชีวนะในการฆ่าเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามสารพิษที่สร้างจากเชื้อ *S. aureus* จะยังคงอยู่ในกระแสเลือดของโฮสต์ต่อไปได้อีกระยะหนึ่ง และสามารถทำให้เกิดการดำเนินโรคได้ต่อเนื่อง ยาปฏิชีวนะไม่สามารถกำจัดสารพิษนี้ได้ ดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อแบบที่ใช้ยาเพื่อไปยับยั้งสารที่สร้างจากเชื้อก่อโรคเพื่อทำให้เกิดความรุนแรงของโรค (antivirulence therapy) จึงมีความจำเป็นในการยับยั้งสารพิษและเพื่อลดความรุนแรงของโรค ทำให้ผู้ป่วยจากการติดเชื้อ *S. aureus* มีโอกาสเสียชีวิตลดลง มากไปกว่านั้นเราหวังว่า เชื้อประจำถิ่นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง จะสามารถนำมาพัฒนาต่อเป็นเชื้อ probiotics ได้เพื่อประโยชน์ในแง่ของการป้องกันโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ และช่วยเรื่องสุขภาพลำไส้ของคนและสัตว์ เชื้อที่เราให้ความสนใจคือเชื้อกลุ่มของเชื้อประจำถิ่น ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อประจำถิ่นจะมีคุณสมบัติอย่างใดอย่างหนึ่ง ในการช่วยป้องกัน ยับยั้ง การก่อโรคจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค งานวิจัยครั้งนี้จึงมีการคัดกรองหาเชื้อประจำถิ่นเพื่อมาทดสอบคุณสมบัติของสารที่ปล่อยออกมาเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหาเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (Gram-positive) ในการผลิตสารที่มีความสามารถในการยับยั้ง hemolysins ที่ถูกสร้างจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *S. aureus*

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้มีความสนใจในการคัดกรองหาเชื้อประจำถิ่นชนิดแกรมบวก (Gram-positive) รวมถึงในกลุ่มของเชื้อ Enterococci ในระบบทางเดินอาหารของคนซึ่งอาจจะมีสายพันธุ์ที่สามารถเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ลดความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญและพบบ่อยในคน ซึ่งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สามารถสร้าง virulence factors หลายชนิด จะทำให้การดำเนินโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วและทำให้คนไข้มีอาการรุนแรง virulence factors ที่สร้างจาก *S. aureus* ที่เราสนใจในงานงานวิจัยครั้งนี้คือ hemolysins เป็นสารพิษที่มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และมีความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเมมเบรนของเซลล์อื่นๆ ของร่างกายด้วย โดยเราต้องการคัดกรองหาเชื้อประจำถิ่นที่มีคุณสมบัติยับยั้ง hemolysins ทำให้ลดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ โดยเราจะใช้วิธีเพาะเชื้อแยกเชื้อกลุ่มแกรมบวกจากตัวอย่างที่เป็น rectal swab และได้รับเชื้อ Enterococci ส่วนหนึ่งมาจากวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จากนั้นนำเชื้อเหล่านี้ไปทำการวินิจฉัยชนิดของเชื้อถึงระดับ genus และ species โดยใช้เครื่อง MALDI-TOF MS และทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง hemolysins จากเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี reverse-CAMP test และยืนยันผลด้วยวิธี co-incubation

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะได้ข้อมูลสายพันธุ์ของเชื้อประจำถิ่นกลุ่มแกรมบวก ที่มีคุณสมบัติในการต้านการแตกของเม็ดเลือดแดงจากสารพิษ hemolysins ที่สร้างจาก *S. aureus* ซึ่งจะเป็นองค์ความรู้ใหม่ในการต่อยอดงานวิจัยต่อไป

2. โมเลกุลที่พบในเชื้อประจำถิ่นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง hemolysins จะถูกนำไปประยุกต์เป็นยารักษาโรคติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) หรือการติดเชื้อของระบบร่างกายอื่นๆ (systemic infections) ที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* โดยจะเป็นยาประเภท antivirulence therapy นั่นก็คือเป็นยาที่ลดความรุนแรงของโรคติดเชื้อจากการไปยับยั้งปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรค (virulence factors) ที่สร้างออกมาจากเชื้อก่อโรค

3. หากเราได้ข้อมูลเชื้อประจำถิ่นที่มีฤทธิ์ลดการแตกของเม็ดเลือดแดง เราจะนำข้อมูลนี้ไปใช้ประโยชน์ในการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อประจำถิ่น เพื่อใช้เป็นเชื้อ probiotics เพื่อช่วยแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในระดับ microenvironment ในลำไส้ เพื่อลดการยึดเกาะและลดความเสียหายของเซลล์บุผิวของลำไส้จากเชื้อก่อโรค *S. aureus* หรือเชื้อก่อโรคอื่นๆ ในระบบลำไส้

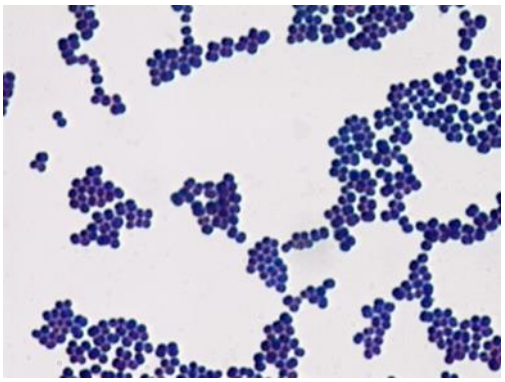
บทที่ 2.
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทบทวนวรรณกรรม (Literature Review)

Staphylococcus aureus และบทบาทในการก่อโรค

เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มีการเรียงตัวเป็นอยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวกองุ่น (Gram-positive cocci in cluster) ดังแสดงในรูปที่ 1. เชื้อเป็นชนิด facultative anaerobic ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและสายพันธุ์ที่อาศัยอยู่ในร่างกายโดยไม่ก่อโรค เช่น อยู่ที่ผิวหนัง จมูก และ mucosal membranes ในทุกๆ ระบบของร่างกาย อย่างไรก็ตาม *S. aureus* สามารถเปลี่ยนจากเชื้อ commensal ไปเป็นเชื้อก่อโรคได้ (Belkaid & Tamoutounour, 2016) ในกลุ่มจีนัสของ *Staphylococcus* เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่สุด โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *S. aureus* โดยปกติแล้วจะทำให้เกิดฝีหนอง หรือรอยโรคที่มีหนองเป็นองค์ประกอบ รอยโรคเหล่านี้มักจะเกิดที่ผิวหนังหรือส่วนอื่นๆ ที่เชื่อมโยงกับผิวหนัง ทำให้เกิดรอยโรคชนิด boil, carbuncles, acne, และ impetigo (Hepburn et al., 2017) นอกจากนี้ *S. aureus* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน รวมไปถึงการติดเชื้อที่อวัยวะภายในร่างกาย และโรคปอดอักเสบ (Cohen et al., 2016), การติดเชื้อที่กระดูก (osteomyelitis) (Elasri et al., 2002), เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) (Salgado-Pabón et al., 2013), กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) (Walsh & Collyns, 2017), กรวยไตอักเสบ (pyelonephritis) (Kim, 2016), อาหารเป็นพิษจากการสร้างสารพิษ enterotoxin ปนเปื้อนในอาหาร (Castro, Silva & Teixeira, 2018), การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) (Vogel, 2016) และโรคที่สำคัญที่ทำให้อัตราการเสียชีวิตสูงคือ staphylococcal toxic shock syndrome (Sharma, 2018) สายพันธุ์ของ *S. aureus* สามารถสร้างสารก่อความรุนแรงของโรค (virulence factors) ได้หลายชนิด ซึ่งมีบทบาทในการทำให้เกิดความรุนแรงของโรคติดเชื้อ และทำให้เชื้อสามารถหลบหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (Howden et al., 2010) virulence factors ที่สร้างจากเชื้อประกอบไปด้วยสารพิษชนิดต่างๆ เอนไซม์ และแอนติเจนที่อยู่บนผิวด้านนอกของเซลล์ สารพิษที่สร้างจากตัวเชื้อมีผลทำให้การตอบสนองของโฮสต์ต่อตัวเชื้อลดลงได้เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยองค์ประกอบบางส่วนของเซลล์โฮสต์ได้ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ innate และ adaptive immunity ทำงานได้ไม่สมบูรณ์ และเชื้อสามารถย่อยปัจจัยเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ ซึ่งมีส่วนให้เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Grumann et al., 2014) โดย virulence factors ที่มีความสำคัญได้แก่ hemolysins, coagulase, cytotoxins ซึ่งมีส่วนช่วยให้เชื้อยึดเกาะ บุกรุกและแพร่กระจายภายในเซลล์ของโฮสต์ (Sandel & McKillip, 2004) ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับ virulence ของเชื้อและอาการแสดงของโรคได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น สารพิษ (toxins) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค toxic shock syndrome (TSS), staphylococcal scaled skin syndrome (SSSS), necrotizing pneumonia (Dinges et al., 2000; Holtfreter et al., 2005; Jarraud et al., 1999; Jarraud et al., 2002; Ladhani et al., 2003) ซึ่งองค์ความรู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของสารพิษและโรคที่เกี่ยวข้องกับสารพิษนั้นๆ จะนำไปสู่ความเข้าใจ

พยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อ *S. aureus* สาเหตุของการเกิดโรค ระบาดวิทยา พยาธิสภาพ และกลไกที่ควบคุมให้มีการสร้างสารพิษออกมาได้



รูปที่ 1. แสดงลักษณะ Gram-positive cocci in cluster ของเชื้อ *S. aureus* จากการย้อมแบคทีเรียด้วยวิธี Gram stain (www.pharmamicroresources.com)

***Staphylococcus aureus* Etiology, Epidemiology and Pathophysiology**

S. aureus เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญก่อให้เกิดโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย ตัวเชื้อประกอบไปด้วย ผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งมีองค์ประกอบของชั้นไขมัน 1 ชั้น ล้อมรอบโดยชั้น peptidoglycan ที่หนา และชั้น lipoteichoic acid ที่ยึดเกาะกับเซลล์โดยใช้ diacylglycerol (Shockman et al., 1983) ชั้น peptidoglycan เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของ Staphylococci ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สูงถึงร้อยละ 50 ของผนังเซลล์ของเชื้อ และประกอบไปด้วยหน่วยย่อย polysaccharide subunits ของ *N*-acetylglucosamine และ *N*-acetylmuramic acid with 1,4-β linkages (Lowy, 1998) peptidoglycan เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดความแข็งแรงของผนังเซลล์ ช่วยรักษารูปร่างและป้องกันการแตกของเซลล์ที่เกิดจาก osmotic lysis และองค์ประกอบอีกหนึ่งอย่างของเซลล์คือ teichoic acid ซึ่งเป็น polymer ที่ประกอบด้วยกลุ่ม phosphate ซึ่งมีสัดส่วนประมาณ 40% ของมวลของผนังเซลล์ (cell wall mass) (Knox & Wicken 1973) teichoic acid ทำให้ผนังเซลล์ของ Staphylococci มีประจุเป็นลบทำให้มีบทบาทสำคัญในการดึงเอา metal ions เข้ามาใช้ (Wilkinson, 1997) เมื่อรวมองค์ประกอบของ peptidoglycans และ teichoic acid แล้ว สององค์ประกอบนี้มีค่าน้ำหนักของเซลล์ถึงร้อยละ 90 ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 10 ของผนังเซลล์ของ Staphylococci นั้นประกอบไปด้วย surface protein, exoproteins และ autolysins (Harris et al., 2002)

S. aureus ถูกวินิจฉัยครั้งแรกเมื่อปี 1884 โดย Anton Rosenbach ซึ่งเป็นศัลยแพทย์ชาวเยอรมัน (Orenstein, 2018) Rosenbach ได้เพาะแยกเชื้อ Staphylococci 2 สายพันธุ์คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งตั้งชื่อเชื้อตามลักษณะการสร้าง pigment ของโคโลนีของเชื้อ ในช่วงที่ค้นพบเชื้อช่วงแรกๆ นั้น ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. aureus* มีอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างสูงคือร้อยละ 82 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. aureus* ในกระแสเลือด (bacteremia) (Skinner & Keefer, 1941) ซึ่งอัตราการตายนี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อมีการค้นพบยา Penicillin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ ที่ถูกนำมาใช้ทางคลินิกในเวลาต่อมา (Harris et al., 2002) อย่างไรก็ตาม ในช่วงต้นปี 1940 ก็ได้มีเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา penicillin ตัวแรกเกิดขึ้น เรียกว่า penicillin-resistant *S. aureus* ซึ่ง ขณะนั้นร้อยละ 25 ของเชื้อ *S. aureus* ที่พบใน

โรงพยาบาลเป็นเชื้อดื้อยา penicillin (Rammelkamp & Maxon, 1942) จากนั้นในปี 1960 ได้มีการค้นพบยา methicillin และ oxacillin เพื่อนำมาใช้รักษาเชื้อดื้อยาเหล่านี้ แต่หลังจากนั้นเพียงปีเดียว เชื้อบางส่วนก็ได้พัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยา methicillin และ oxacillin ซึ่งเชื้อเหล่านี้ถูกเรียกว่า methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) ดังนั้น ช่วงระหว่างปี 1960s และ 1980s นั้น พบ MRSA ที่เป็นโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้นเรื่อยๆ และช่วงท้ายปี 1990s เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA พบได้สูงขึ้นมาก (Boyce & Causey, 1982; Panlilio et al., 1992) ปัจจุบันผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลยังคงมีแนวโน้มที่จะรับเชื้อนี้ระหว่างนอนพักรักษาตัวที่โรงพยาบาล เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่นอนโรงพยาบาลมักจะมีภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ต่ำกว่าปกติ และมีการรับยาปฏิชีวนะอยู่ หรือมีการสัมผัสกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น เครื่องช่วยหายใจ หรืออุปกรณ์จำพวก สายน้ำเกลือ สายสวนปัสสาวะ เป็นต้น (Chatterjee & Otto, 2013; Millar et al., 2007)

การรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *S. aureus* จะมีประสิทธิภาพไม่ดี เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* มีความสามารถในการพัฒนากลายเป็นเชื้อดื้อยาได้ในอัตราที่สูง (Penesyan et al., 2015) ดังนั้นการควบคุมโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *S. aureus* จึงต้องอาศัยความเข้าใจพันธุกรรมและชีวเคมีของตัวเชื้อ รวมไปถึงองค์ความรู้อย่างลึกซึ้งเกี่ยวกับการสร้าง biofilm ของตัวเชื้อที่ทำให้มีผลกระทบต่อการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา และการพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยา ทันทีที่เชื้อแบคทีเรียเข้าไปร่วมในการสร้าง biofilm เชื้อแบคทีเรียนั้นมีโอกาสรับยีนดื้อยาจากเชื้อที่อยู่ในชุมชนเดียวกัน ซึ่งแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ใน biofilm นี้จะแสดงฟีโนไทป์เกี่ยวกับ การเจริญของเชื้อ การแสดงออกของยีน และการสังเคราะห์โปรตีน รวมไปถึงความสามารถในการแสดงการทนต่อความกดดันจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเซลล์ที่อยู่เดี่ยวๆ ไม่สามารถแสดงลักษณะเหล่านี้ได้ (Archer et al., 2011; Donlan, 2001) สาร polymer ที่ล้อมรอบแบคทีเรียที่อยู่ใน biofilm นี้ จะช่วยป้องกันเชื้อจากกระบวนการ phagocytosis หรือการถูกจับกินด้วยเม็ดเลือดขาวจำพวก macrophage ป้องกันเชื้อจากน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectants) และสารน้ำอื่นๆ จากระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ innate และ adaptive immunity และสารจากระบบที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory response) ของโฮสต์ ซึ่งสาร polymer นี้ทำให้เชื้อแบคทีเรียในชุมชนดึงสารอาหาร เช่น แหล่ง carbon, nitrogen และ phosphate ที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเข้ามายัง biofilm ได้ดี (Archer et al., 2011; Beveridge et al., 1997; Bahna, 2007).

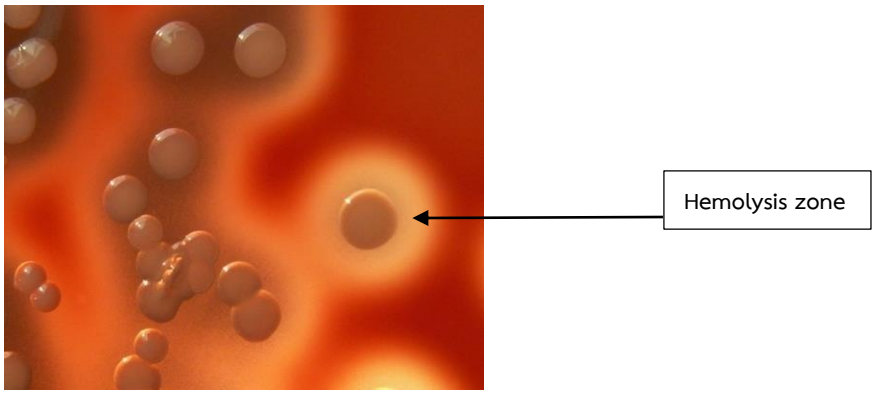
Virulence factors ที่ถูกสร้างและปล่อยจาก *S. aureus* บางชนิดเป็นสารพิษหรือ toxins (Otto, 2014) toxins แตกต่างจาก virulence factors ชนิดอื่นๆ คือสารพิษถูกสร้างจากเชื้อและและมีผลกระทบโดยตรงต่อเซลล์ของโฮสต์ โดยผลกระทบของ toxins ต่อการสร้าง biofilm ของเชื้อ พบว่า toxins บางชนิดมีบทบาทในการพัฒนาการสร้าง biofilm ได้ ตัวอย่างเช่น Scheer et al. แสดงให้เห็นว่า ถึงผลกระทบของ hemolysin-**α** (Hla หรือ **α**-toxin) and leukotoxin AB (LukAB) ในการช่วยให้ biofilm คงตัวอยู่ได้นาน (Scherr et al., 2015). ความสำคัญของ toxins เหล่านี้ ถูกศึกษาในหนู ซึ่งเปิดเผยว่า มีการเสริมฤทธิ์กันของ Hla and LukAB ในการทำให้ macrophage ทำงานได้ไม่ดี และกระตุ้นการเกิดการตายของเซลล์ การลดความสามารถของ macrophage ในการทำหน้าที่ในกระบวนการ phagocytosis ช่วยให้ *S. aureus* หลบหลีกการถูกทำลายจากการตอบสนองของโฮสต์เมื่ออยู่รวมกันในโครงสร้าง biofilm

Staphylococcus aureus Toxins

ความสามารถของ *S. aureus* ในการก่อโรคได้หลากหลายรูปแบบนั้น เนื่องมาจากการมี virulence factors หลายชนิด ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ toxins (Otto, 2010; Bartlett & Hulten 2010) สารพิษหลักๆ ที่สร้างจาก *S. aureus* สามารถแบ่งกลุ่มหลักๆ ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ pore-forming toxins (PFTs), exfoliative toxins (ETs) และ superantigens (SAgs) ซึ่ง pore-forming toxins สามารถถูกแบ่งออกได้เป็นอีก 4 ชนิดคือ hemolysin-α (Hla หรือ α-toxin), hemolysin-β, leukotoxins และ phenol-soluble modulins (PSMs) (Grumann et al., 2013) การกระตุ้นการสร้างสารพิษเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนอง สภาวะต่างๆ ที่มีผลกับเชื้อ ดังนั้นการทำความเข้าใจกลไกที่มีการกระตุ้นการสร้างสารพิษเหล่านี้ จะส่งผลให้มีการควบคุมโรคติดเชื้อจากเชื้อกลุ่ม Staphyloccocci ได้ดีขึ้น สารพิษที่สร้างจาก *S. aureus* มีผลต่อการทำให้เกิดโรคได้แก่ Toxic shock syndrome (TSS), staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS), necrotizing pneumonia หรือ deep-seated skin infections สารพิษเหล่านี้มีความสามารถในการทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเมมเบรนของเซลล์ โดยการย่อย inter-cellular connections หรือโดยการปรับเปลี่ยนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้

Hemolysins ที่สร้างจาก *S. aureus*

Hemolysins เป็นสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ซึ่งสามารถสร้างจากเชื้อก่อโรคหลายชนิด โดย hemolysins เกือบทั้งหมดเป็นสารพิษที่มีผลต่อเซลล์ สารพิษเหล่านี้เรียกชื่อรวมๆ ว่า cytotoxins จัดเป็น pore-forming toxins ซึ่งมีคุณสมบัติทำลายเซลล์ของโฮสต์และเป็น virulence factors ที่มีความสำคัญที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคติดเชื้อ *S. aureus* เมื่อเพาะเชื้อ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ซึ่งมีการเตรียมจากการผสมเลือดลงไปในอาหาร จะพบลักษณะของ clear zone หรือ hemolysis zone ที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เห็นลักษณะเป็นใสๆ รอบโคโลนีของเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 2. โดยเชื้อ *S. aureus* สามารถปล่อย hemolysins ได้หลายชนิด ได้แก่ alpha-hemolysin ซึ่งมีรายงานว่าสารพิษชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการรบกวนของระบบเลือด เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) และมีรอยโรคที่ปอด (pulmonary lesions)



รูปที่ 2. แสดงลักษณะ hemolysis zone ที่เกิดจากการเลี้ยง *S. aureus* บน blood agar (www.medical-labs.net)

Pore-forming toxins

Pore-forming-toxins (PFTs) เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อ *S. aureus* ซึ่ง staphylococcal pore-forming toxins สามารถแบ่งกลุ่มจากการดูโครงสร้าง 3 มิติประกอบด้วย **α**-helix and **β**-strand content (Dal Peraro & Van Der Goot, 2016) เชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. มี hemolysins ที่เป็น **α**-helix and **β**-strand hemolysins หรือกลุ่ม leucotoxins. Delta-hemolysin (**δ**-hemolysin) มีโครงสร้างของ **α**-helix ส่วน pore-forming toxins อื่นๆ ประกอบด้วย alpha-hemolysin (**α**-hemolysin) และ gamma-hemolysin (**γ**-hemolysin) เป็นสารพิษที่มีโครงสร้างเป็นแบบ **β**-strands โดยมีองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 65-75 (Parker & Feil, 2005). Staphylococcal pore-forming toxins ที่มีโครงสร้างของ **β**-strands จำนวนมาก (staphylococcal **β**-strands rich pore-forming toxins) มีผลกระทบต่อเซลล์เม็ดเลือดมากที่สุด จึงมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วย (immune defense) ของโฮสต์มากที่สุด (Gilles et al, 2015; Seilie & Wardenburg, 2017).

Delta-hemolysin

Staphylococcal delta-hemolysin (**δ**-hemolysin) มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน 26 หน่วย โดยถูก encoded ด้วยยีน hlg และเป็น single **α**-helices ซึ่งเป็น octamers ที่ผิวด้านนอกของเมมเบรน โดย octamer จะขยายผ่านชั้น bilayer ทำให้สร้างรูที่เกิดจากแต่ละ monomers ซึ่ง monomer มีโครงสร้างเป็น amphipathic structure ทำให้เกิดปฏิกิริยากับ phospholipids ของเซลล์ (Verdon et al., 2009)

Alpha-hemolysin

Alpha-toxin หรือ alpha-hemolysin (**α**-hemolysin) ออกฤทธิ์ต่อเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ แต่มีประสิทธิภาพต่อเม็ดเลือดแดงของกระต่ายมากกว่าเม็ดเลือดแดงของคน (Füssle et al., 1981) สารพิษชนิดนี้มีขนาดกรดอะมิโน 293 หน่วย ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ staphylococcal **β**-strands rich pore-forming toxins โดยเฉพาะส่วนที่เป็นโดเมนตรงกลางของโปรตีน ซึ่งถูกสร้างจาก

S. aureus เกือบทุกตัวในระยะท้ายของ exponential growth phase ของเชื้อโดยสร้างออกมาเป็น monomers (Song et al., 1996)

Gamma-hemolysin

เป็น leucocidins ชนิดหนึ่ง และ gamma-hemolysin (γ-hemolysin) เป็น β-barrel pore-forming toxins (β-PFTs) ที่สร้างจาก *S. aureus* โดยมีฤทธิ์ต่อ polymorphonuclear cell, monocytes และ macrophages สารพิษนี้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนจาก class S (31-32 kDa) และ class F (34-35 kDa) ทำให้เกิดความเสียหายต่อ cell membrane ตัวอย่างเช่นโปรตีน class S proteins จะจับกับ cell membrane ทำให้เกิดโครงสร้างแบบ secondary interaction กับ F component ทำให้เกิด oligomer เพื่อให้เกิดการฟอร์มของรูที่ membrane ของเซลล์ (Sugawara, et al, 1997)

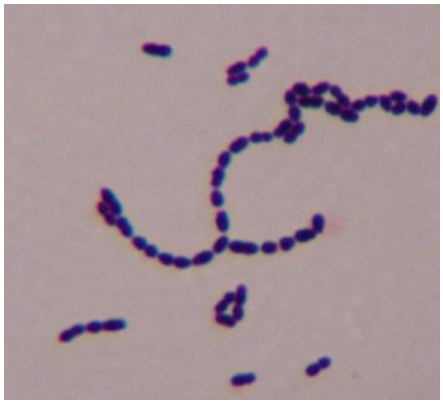
Beta-hemolysin

Beta-hemolysin (β-hemolysin) เป็นเอนไซม์ sphingomyelinase มีผลการลดการมีชีวิตเม็ดเลือดขาวโดยไม่ได้ทำให้เกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดขาว (Marshall et al., 2000) ฤทธิ์ของสารพิษนี้ยังคลุมเครือเกี่ยวกับการก่อโรคในคน ผลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบพบว่า β-hemolysin มีผลเกี่ยวข้องกับการอักเสบได้น้อยกว่า α-hemolysin และ γ-hemolysin ใน keratitis model (Dajcs et al., 2002)

Enterococci

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

Enterococci เป็นเชื้อกลุ่มแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่สร้างสปอร์ มีการเรียงตัวแบบเป็นสายสั้นๆ (Gram-positive cocci (non spore-forming) in chain) (Anagnostopoulos et al, 2018; Kadri Z., et al, 2015) ดังแสดงในรูปที่ 3. จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic เชื้อ *Enterococcus* spp. เป็นเชื้อจำพวกที่สามารถสร้างกรด lactic ได้ (Lactic acid bacteria (LAB)) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อ LAB ที่เป็นกลุ่มใหญ่รองจากเชื้อ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* โดยมีสายพันธุ์ทั้งหมด 37 สปีชีส์ ตามการแบ่งโดย 16s rRNA gene sequencing และ DNA-DNA hybridization (Franz et al, 2011) สปีชีส์ที่มีความสำคัญมากที่สุดคือ *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus faecalis*



รูปที่ 3. แสดงลักษณะ Gram-positive cocci in chain ของเชื้อ *Enterococcus* spp. จากการย้อมแบคทีเรียด้วยวิธี Gram stain (https://quizlet.com/)

แหล่งที่อยู่ (habitat) ของเชื้อ Enterococci

เชื้อกลุ่ม *Enterococcus* spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมหลากหลายรูปแบบ เช่น ในดิน น้ำ น้ำเสีย และพืชต่างๆ นอกจากนี้ เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ยังพบว่าเป็นเชื้อ commensal microbiota ของคนและสัตว์โดยทั่วไป โดยอยู่ร่วมกับโฮสต์ที่เป็นคนและสัตว์ในสภาวะเกื้อกูล โดยเชื้อ *E. faecalis* พบได้มากในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ เชื้อ Enterococci ยังสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิดเช่น dairy products จำพวก cheese นมดิบ (Morandi et al., 2012; Gaaloul et al., 2014; Pieniz et al., 2015; Elmoslih et al., 2017) ผักดอง (Tamang et al., 2016; Rezac 2016; Shah & Patel, 2017; Kandasamy et al., 2018; Lianou et al., 2016; Thapa & Tamang, 2015; Latha et al., 2015) เนื้อสัตว์ ปลา อาหารทะเล (Noordiana et al., 2013; Sarra et al., 2013; Ghomrassi et al., 2016; Ben Braïek et al., 2018; Vinderola et al., 2017) นอกจากนี้เชื้อ Enterococci ยังมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมและหลายๆ รูปแบบ

Enterocins ที่สร้างจาก Enterococci

เชื้อ Enterococci สามารถสร้างสาร enterocins ซึ่งเป็น antimicrobial peptides ขนาดเล็ก (small antimicrobial peptides) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแบบมีฤทธิ์ในวงกว้าง (broad-spectrum) (Ahmadova et al., 2013; O'Connor et al., 2015; Arqués et al., 2015; Baños et al., 2016) ซึ่งฤทธิ์ของ enterocins ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เห็นผลได้อย่างชัดเจน พบในเชื้อก่อโรค *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp., และ *Clostridium* spp. ส่วนฤทธิ์ในการต้านเชื้อ หรือ antagonistic activity พบได้ในเชื้อก่อโรคกลุ่ม *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, และ *Vibrio cholera*, เชื้อรา (Fungi), ยีสต์ (Yeast) ไวรัส (Viruses) ก็สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย

enterocins ที่สร้างจาก Enterococci (Ben Braïek et al., 2018; Simonetta et al., 1997; Svetoch et al., 2011)

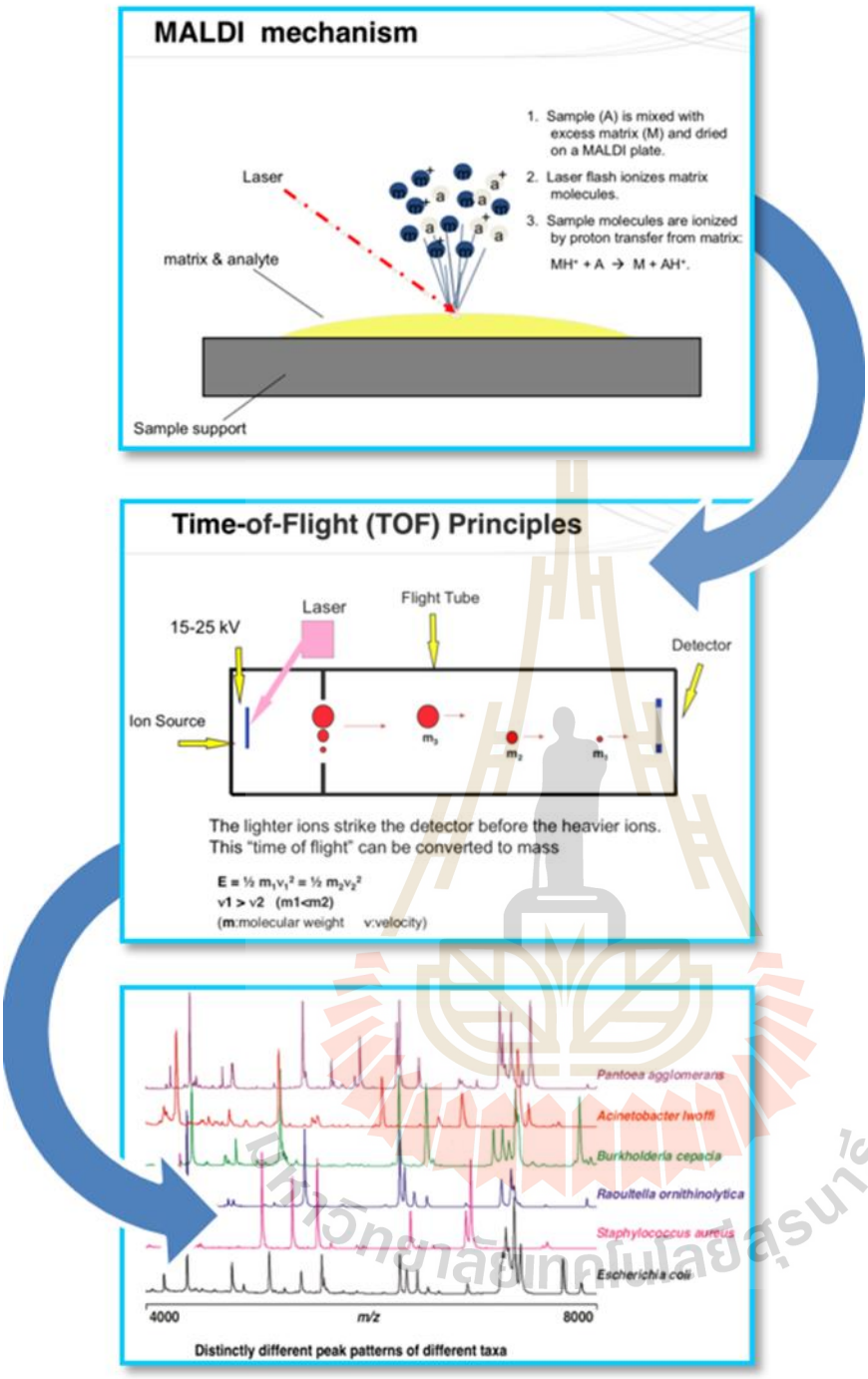
กลไกการออกฤทธิ์ของ Enterocins (Mode of Action)

Enterocins เป็น bacteriocins ที่มีฤทธิ์หรือเป้าหมายที่เยื่อหุ้มเมมเบรน (cytoplasmic membrane) ของเป้าหมาย enterocin สามารถทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิด transmembrane potential หรือ pH gradient ทำให้เกิดการไหลของโมเลกุลภายใน cytoplasm ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคออกมาภายนอกแล้วเกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้หรือเกิดการตายของเซลล์ได้ (Krulwich et al., 2011; Hutkins & Nannen; 1933; Kakinuma, 1998)

อย่างไรก็ตามเชื้อ Enterococci บางสายพันธุ์ก็อาจทำให้เกิดโรคได้ เช่น, endocarditis, urinary tract infections หรือการติดเชื้ออื่น โดยเชื้อ Enterococci มักพบเป็นเชื้อ opportunistic pathogen หรือก่อโรคในคนที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยมี virulence factors เช่น aggregation substances (agg, asa1) cytolysin (cyl) gelatinase (gelE) เป็นต้น (Barbosa et al., 2010) สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคและถูกนำมาใช้เป็นเชื้อ probiotics เพื่อช่วยเรื่องสุขภาพลำไส้ของคนและสัตว์ การได้รับ Enterococci probiotics ทำให้มีผลต่อต้านโรคทางระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากเชื้อที่รับจากอาหาร หรือเกิดจากการเสียสมดุลของของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งเชื้อ Enterococci นี้อาจจะนำไปสู่การแข่งขันระดับ microenvironments ให้สามารถ colonize ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อก่อโรคในลำไส้ (Franz et al. 2011)

วิธี MALDI-TOF MS

วิธี MALDI-TOF MS เป็นวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้หลักการตรวจชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน โดยการตรึงโปรตีนหรือเปปไทด์กับผลึกของ matrix ซึ่งช่วยดูดซับพลังงาน เมื่อยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียโปรตีนจะเกิดการแตกตัวเป็นไอออน แล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า โดยสารที่มวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ เรียกว่า time-of-flight (TOF) จะถูกคำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ ได้เป็น m/z peak ที่เรียงตัวกันเป็น peptide mass fingerprint (PMF) แล้วสามารถนำมาวิเคราะห์จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะ PMF เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (Data base) ที่มีอยู่ โดยหลักการของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 4.



รูปที่ 4. แสดงหลักการการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข)

บทที่ 3.
วิธีดำเนินการวิจัย

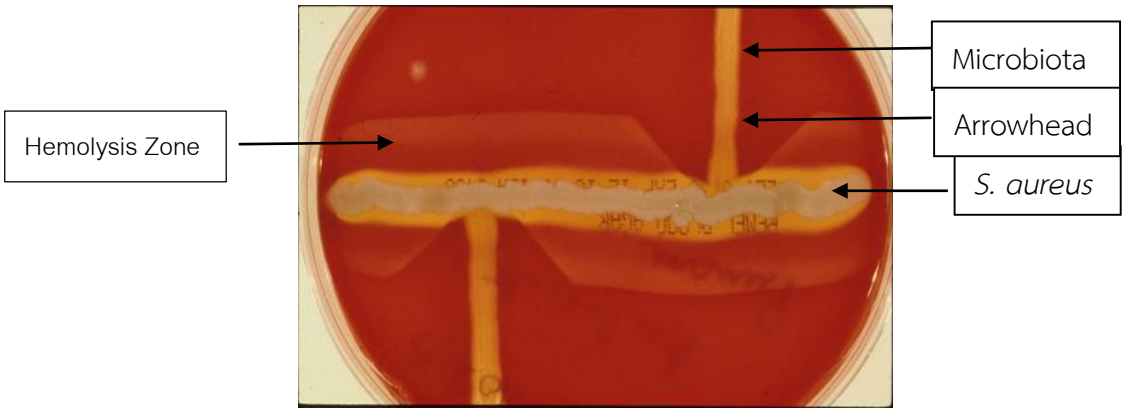
3.1 การเก็บเชื้อแกรมบวก (Gram-positive)

เชื้อแกรมบวกที่ได้จากการทดลองนี้ถูกแยกออกเป็น 2 ชุด คือ collection 1 และ collection 2 โดย collection 1 เป็นเชื้อที่ถูกแยกได้จากตัวอย่างที่เป็น rectal swab โดยคัดกรองเฉพาะเชื้อประจำถิ่นที่เป็นกลุ่มแกรมบวก โดยทำการเลี้ยงเชื้อจาก rectal swab บน blood agar และ MacConkey agar แล้วเลือกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แต่ไม่เจริญบน MacConkey agar เชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็นชนิดแกรมบวกจะทำการยืนยันผลโดยวิธีการย้อมสีแบคทีเรีย ชนิด Gram stain หากได้เชื้อแบคทีเรียที่ติดสีม่วงน้ำเงินซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงว่าเชื้อเป็นชนิดแกรมบวก มาทำการวินิจฉัยชนิดของเชื้อต่อ โดยใช้การทดสอบเบื้องต้นทางชีวเคมี (biochemical test) จากบริษัท Biomedia (Thailand) เช่น catalase test, bile esculin, 6.5% NaCl

เชื้อ collection 2 เป็นเชื้อ Enterococci ซึ่งผ่านการทำการทดสอบด้วย Biochemical test ด้วย catalase test, bile esculin, 6.5% NaCl แล้ว ซึ่งมีการวินิจฉัยชนิดของเชื้อในเบื้องต้นแล้วว่าเป็น *Enterococcus* spp. เชื้อชุดนี้ได้ความอนุเคราะห์จากวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ทั้งหมด 183 สายพันธุ์ เชื้อทั้งสอง collection นี้ถูกนำไปทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.2 Reverse-CAMP Test

เนื่องจากเราต้องการคัดกรองหาเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งการปฏิกิริยาการแตกของเม็ดเลือดแดง เราจึงใช้วิธี reverse-CAMP test โดยวิธีการคือเราใช้เชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC25923 ขีดลากตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar จากนั้นใช้เชื้อประจำถิ่นขีดลากในแนวตั้งฉากกับเชื้อ *S. aureus* จากนั้นนำจานอาหารเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลโดยการสังเกตลักษณะหัวลูกศร (arrowhead) แบบทึบที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5. จะเห็นการเจริญของ *S. aureus* แล้วทำให้มีการแตกของเม็ดเลือดแดงเกิดเป็น hemolysis zone หรือ clear zone รอบๆ *S. aureus* ส่วนเชื้อประจำถิ่นเมื่อมีการเจริญจะทำให้ clear zone ที่เกิดจาก *S. aureus* ลดลงซึ่งจะสังเกตได้จากการเว้าเข้าไปของ clear zone ทำให้เห็นเป็นลักษณะหัวลูกศรแบบทึบ



รูปที่ 5. แสดงวิธีการทดสอบด้วยวิธี Reverse-CAMP test

3.3 วิธี Co-incubation

หลังจากการคัดกรองความสามารถของเชื้อประจำถิ่นในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี reverse-CAMP test ซึ่งเชื้อประจำถิ่นบางสายพันธุ์ได้แสดงผลบวกแล้ว เราได้ใช้วิธี co-incubation ในการยืนยันผลของปฏิกิริยานี้ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ใน nutrient broth และ เลี้ยงเชื้อประจำถิ่นที่ให้ผลบวกกับ reverse-CAMP test ใน Nutrient broth อีกหนึ่งหลอด จากนั้นนำสายละลาย (suspension) ของเชื้อไปปั่นเพื่อแยกเอา supernatant ออกมาจากเซลล์แบคทีเรียทั้ง 2 หลอด นำ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยง *S. aureus* และ เชื้อประจำถิ่นมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงที่ผ่านการเตรียมก่อนหน้านี้โดยการล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง หลังจากนั้น เราได้ทำการเจือจางเม็ดเลือดแดงให้มีความเข้มข้น 2% ใน PBS นำเม็ดเลือดแดงที่เจือจางแล้วผสมกับ mixture ของ supernatant ในสัดส่วน 1:1 จากนั้นทำการปั่นส่วนผสมและเก็บส่วนที่เป็น supernatant เพื่อวิเคราะห์อัตราการแตกของเม็ดเลือดแดง (red blood cell lysis) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD545 nm อัตราการแตกของเม็ดเลือดแดงคำนวณได้จากการเปรียบเทียบ การแตกของเม็ดเลือดแดงโดยการใช้น้ำกลั่นเป็น positive control ซึ่งจะปรับค่าให้เป็นอัตราการแตกของเม็ดเลือดเป็น 100%

3.4 MALDI-TOF MS สำหรับการวินิจฉัยชนิดของเชื้อ *Enterococcus* spp.

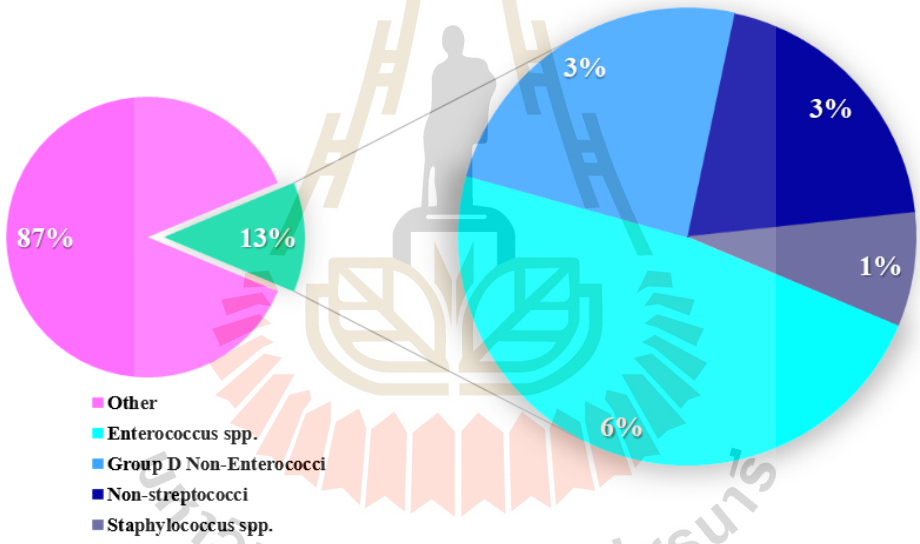
ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI MS เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อจะเตรียมโดยการผสม 2.5% TFA matrix (α-cyano 4-hydroxycinnamic acid, TFA 25 µl, ACN 500 µl, H_2O 475 µl) เลี้ยงเชื้อ *Enterococcus* spp. บนจานอาหาร Blood agar บ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยว เขี่ยเชื้อลงบน MALDI test plate โดยแต่ละตัวอย่างจะใช้เชื้อปริมาตร 1 µl บน matrix และรอให้แห้ง แล้วนำไปโหลดเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS โดยเครื่องจะทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้ software (MBT Standard) ที่มากับเครื่อง ซึ่งการวิเคราะห์นี้จะมีตัวอย่างเชื้อมาตรฐานคือ *Escherichia coli* ATCC25922) เพื่อยืนยันผลว่าเครื่องสามารถวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาตรฐานได้อย่างถูกต้อง

บทที่ 4.

ผลการวิจัย

4.1 การตรวจคัดกรองเชื้อประจำถิ่น

ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นจาก rectal swab ได้เชื้อ collection 1 ซึ่งพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 25 isolates แยกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ดังนี้: Enterococci 6%, Group D non-enterococci 3% , Non-streptococci 3% และ Streptococci อื่นๆ 1% รวมเป็น 13% ส่วนเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ได้วินิจฉัยชนิดของเชื้อเป็น 87% ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ ดังแสดงผลในรูปที่ 6. โดยการทดสอบที่นำมาใช้เพื่อแยกชนิดของเชื้อ และผลการทดสอบ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.



รูปที่ 6. แสดงสัดส่วนของเชื้อแกรมบวกที่แยกได้จาก rectal swab

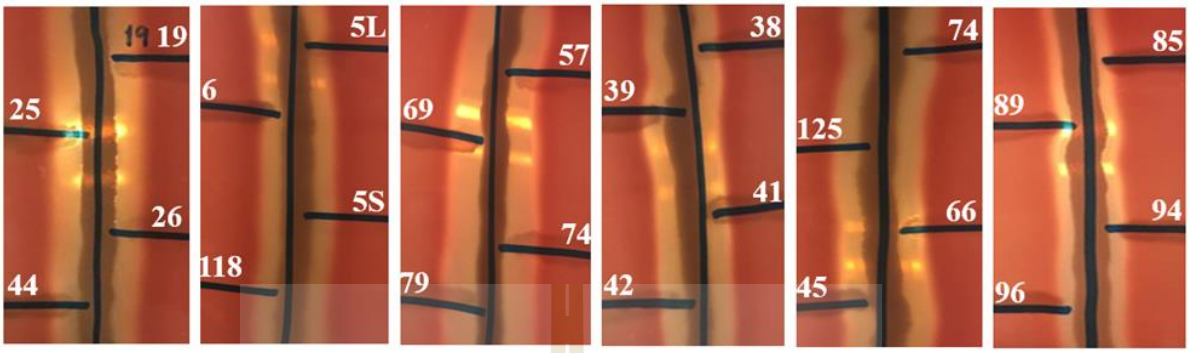
ตารางที่ 1. แสดงผลการวินิจฉัยชนิดของเชื้อแกรมบวกที่แยกได้จาก rectal swab

Table 1. Identification of Gram-positive normal flora

Sample ID	Biochemical test			
	Morphology	Catalase test	Bile esculin	6.5% NaCl
R5L	cocci	-	-	-
R5S	bacilli	-	-	-
R6	cocci	+	-	-
R19	cocci	+	+	-
R25	cocci	-	+	-
R26	cocci	-	-	-
R38	cocci	-	+	-
R39	cocci	-	+	-
R41	cocci	-	+	-
R42	cocci	-	+	-
R44	cocci	-	+	-
R45	cocci	-	+	+
R57	cocci	-	+	+
R66	cocci	-	+	+
R69	cocci	-	+	+
R74	cocci	-	+	+
R79	cocci	-	+	+
R85	cocci	-	+	+
R89	cocci	-	+	+
R94	cocci	-	+	+
R96	cocci	-	+	+
R118	cocci	-	-	-
R125	bacilli	-	-	-
R160	cocci	-	+	+
R181	cocci	-	+	+

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เชื้อ 13% นี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ต้องการนำไปทำการทดสอบด้วยวิธี Reverse-CAMP test เพื่อดูความสามารถของเชื้อประจำถิ่นในความสามารถในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงต่อไป

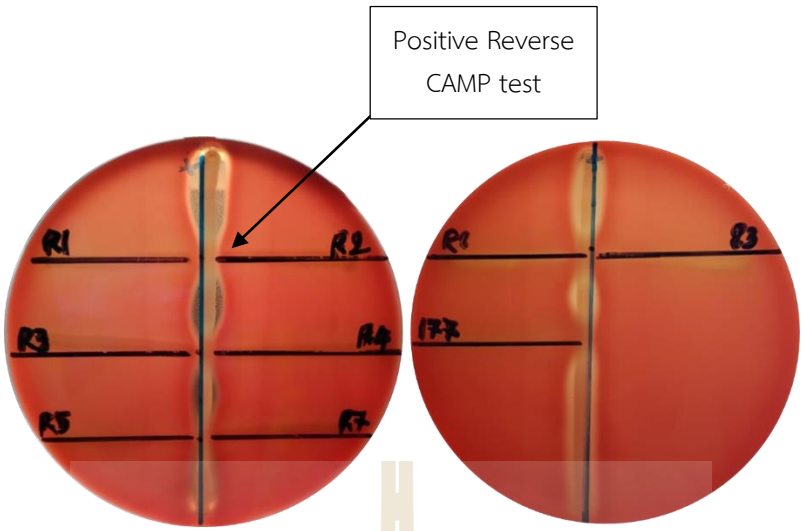


รูปที่ 7. แสดงผลลบจากการทดสอบ Reverse CAMP test จากตัวอย่างเชื้อกลุ่มแกรมบวก

4.2 ผลการทดสอบด้วยวิธี Reverse-CAMP test

เมื่อนำเชื้อประจำถิ่นมาทำการทดสอบด้วยวิธี Reverse-CAMP test จะเห็นว่าเชื้อแกรมบวกที่แยกได้จาก rectal swab ซึ่งเป็นเชื้อจาก collection 1 นั้น ยังไม่มีสายพันธุ์ใดแสดงลักษณะของหัวลูกศรแบบที่แสดงใน Reverse-CAMP test-positive นั่นคือ เชื้อทดสอบไม่สามารถลด hemolysis zone ของ *S. aureus* แล้วแสดงลักษณะหัวลูกศรแบบทึบได้ (รูปที่ 7)

จากนั้นเราได้นำเชื้อ *Enterococcus* spp จาก collection 2 อีก 183 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แล้วทำการทดสอบต่อโดยวิธี reverse-CAMP test technique โดยเราพบว่า เชื้อในกลุ่ม collection 2 มีเชื้อ Enterococci ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ที่แสดงผลบวกต่อวิธี reverse-CAMP test โดยจากรูปที่ 8. จะเห็นว่า เชื้อ *S. aureus* ที่ถูกขีดไว้ตรงกลาง Blood agar ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงเป็น hemolysis (clear) zone รอบๆ ตัวเชื้อ *S. aureus* เมื่อมีการนำเชื้อ *Enterococcus* spp. ทั้ง 9 สายพันธุ์นี้มาขีดให้ตั้งฉากกับเชื้อ *S. aureus* เราพบว่า เชื้อ *Enterococcus* spp. กลุ่มนี้ ทำให้เกิดการลดขนาดของ hemolysis (clear) zone ซึ่งบ่งชี้ถึงการที่ *Enterococcus* spp. เหล่านี้ ผลิตสารบางชนิดออกมาและซึมเข้าไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar เพื่อยับยั้ง hemolysins ที่สร้างจากเชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดรอยเว้าเข้าไปของ hemolysis zone



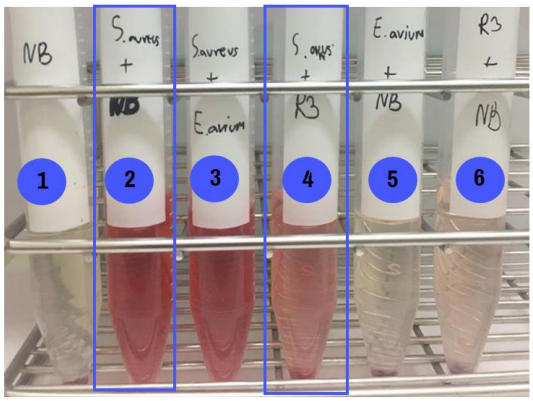
รูปที่ 8. แสดงผลบวกจากการทดสอบด้วย Reverse-CAMP test ในเชื้อ *Enterococcus* spp.

4.3 Co-incubation method

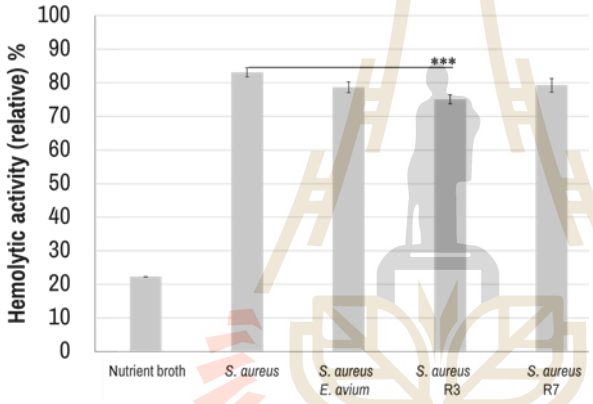
เราคัดเลือกเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ให้ผลบวกต่อวิธี reverse-CAMP test ทั้งหมด 9 สายพันธุ์มาทำการยืนยันผลการยับยั้ง Hemolysin ของเชื้อ *S. aureus* ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยวิธี Co-incubation method โดยเราเลือกสายพันธุ์ *Enterococcus* R3 และ *Enterococcus* R7 มาเป็นตัวแทนของเชื้ออื่นๆ ก่อนในเบื้องต้นนี้ โดยจากรูปที่ 9A เราจะเห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบสภาวะของเม็ดเลือดแดงที่ผสมกับ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* (หลอดทดสอบที่ 2) หลังการปั่นตกตะกอน กับสภาวะที่มีเม็ดเลือดแดงผสมกับ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยง *S. aureus* และ *Enterococcus* R3 (หลอดทดสอบที่ 4) จะเห็นว่าความเข้มของ hemoglobin ซึ่งจะแสดงให้เห็นเป็นสีแดงมีความเข้มมากกว่าในหลอดทดสอบที่ 2 โดยหลอดทดสอบที่ 4 พบ hemoglobin ที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าและแสดงความเข้มสีของ hemoglobin น้อยกว่าหลอดทดสอบที่ 2 โดยเมื่อเรานำเชื้อ *Enterococcus avium* มาใช้เป็นตัวควบคุมลบ (negative control) จะพบว่าสภาวะของเม็ดเลือดแดงที่ผสมกับ supernatant ที่เลี้ยง *S. aureus* และ *E. avium* (หลอดทดสอบที่ 3) นั้นไม่ได้ช่วยลดการแตกของเม็ดเลือดแดง ซึ่งบ่งชี้ว่า เชื้อ *E. avium* ไม่มีการสร้างปัจจัยที่ทำให้ลดการแตกของเม็ดเลือดแดง ทำให้ความเข้มข้นของ hemolglobin ที่ได้มีความใกล้เคียงกับสภาวะที่เป็น supernatant ที่เลี้ยง *S. aureus* เพียงอย่างเดียว

อัตราการแตกของเม็ดเลือดแดงได้มีการยืนยันผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ hemoglobin ในแต่ละตัวอย่างแล้วนำมาคำนวนเป็นเปอร์เซนต์ของ hemolytic activity (relative) เทียบกับการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยน้ำเปล่า ซึ่งจากรูปที่ 9B จะเห็นว่าสภาวะที่ผสมเม็ดเลือดแดงกับกับ supernatant ของ *S. aureus* และ *Enterococcus* R3 นั้น ช่วยลดเปอร์เซ็นต์ของ hemolytic activity ได้อย่างมีนัยสำคัญ

A



B



รูปที่ 9. (A) แสดงผลการทดสอบโดยวิธี co-incubation ของ *Enterococcus* spp. และ *S. aureus* (B) เปอร์เซ็นต์ Hemolytic activity ของ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Enterococcus* spp.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 *Enterococcus* spp. identification

เชื้อในกลุ่มของ Enterococci ที่นำมาทำการทดสอบในงานวิจัยนี้ได้ถูกวินิจฉัยเบื้องต้นโดย bile esculin และ 6.5% NaCl ซึ่งจะแสดงผลบวกจากการทดสอบทั้งสองชนิด ซึ่งจะสรุปว่าเป็นเชื้อชนิด *Enterococcus* spp. ซึ่งจะได้นำไปทดสอบต่อด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อเป็นการระบุสปีชีส์ของเชื้อ ผลการวินิจฉัยชนิดของเชื้อจาก collection 2 ที่เป็น *Enterococcus* spp. ทั้งหมด 183 isolates ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS โดยสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด คือ *E. faecium* พบ 172 isolates

คิดเป็น 94% พบ *E. faecalis* ทั้งหมด 9 isolates คิดเป็น 4.92% พบ *E. raffinosus* 1 isolate คิดเป็น 0.54% และ *E. avium* 1 isolate คิดเป็น 0.54% ดังแสดงในตารางที่ 2 เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อเหล่านี้ เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Reverse-CAMP test สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกเป็น *E. faecalis* ทั้งหมด โดยเชื้อ *Enterococcus* สปีชีส์อื่นๆ นั้นให้ผลลบต่อ Reverse-CAMP test

ตารางที่ 2. แสดงผลการวินิจฉัยสายพันธุ์ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

Reverse CAMP test	Species identification	No. of isolates (%)
Positive (+)	*E. faecalis*	9 (4.92%)
Negative (-)	*E. faecium*	172 (94%)
	E. raffinosus	1 (0.54%)
	E. avium	1 (0.54%)
Total		183 (100%)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5.

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคในคนที่พบบ่อยมากเป็นอันดับต้นๆ ซึ่ง *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่มีปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคจากการสร้างสารโมเลกุลต่างๆ เพื่อมาทำลายเซลล์ของโฮสต์ และมีผลทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงได้ ซึ่ง hemolysins เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคคือเป็นสารที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) และเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเมมเบรนของเซลล์ร่างกายของโฮสต์ได้ การติดเชื้อก่อโรค *S. aureus* นั้น สามารถใช้ยาปฏิชีวนะในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ แต่อย่างไรก็ตามสารพิษที่ถูกสร้างขึ้นจากตัวเชื้อ เช่น hemolysins จะยังคงอยู่ในร่างกายของโฮสต์ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องการจะพัฒนายาที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* เพื่อลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากสารพิษ (toxin) ที่เชื้อสร้างขึ้นมาทำลายเยื่อหุ้มเมมเบรนของโฮสต์ การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sunil D. Saroj et al. (2016) ก็ได้มีความพยายามที่จะหาเชื้อประจำถิ่นที่อาจมีฤทธิ์ป้องกันการ colonize หรือการเข้ายึดครองของเชื้อก่อโรค ซึ่งโดยปกติกลไกนี้เป็นกลไกด่านแรกของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อมีการหลุดเข้ามาของเชื้อก่อโรค หากมีเชื้อประจำถิ่น ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของร่างกาย ก็จะพบว่าเชื้อประจำถิ่นจะทำหน้าป้องกันมิให้เชื้อก่อโรคยึดเกาะและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ ผลจากงานวิจัยครั้งนั้นได้พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์ *L. rhamnosus* Kx151A1 และ *L. reuteri* PTA-5289 ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบ colonize ที่ระบบทางเดินหายใจ มีความสามารถในการรบกวนลักษณะฟีโนไทป์ของเชื้อก่อโรค Group. A streptococci (GAS) ซึ่ง Lactobacilli กลุ่มนี้นอกจากรบกวนความสามารถของ GAS ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้ว ยังมีความสามารถในการรบกวนการยึดเกาะของเชื้อ GAS ต่อเซลล์เยื่อบุของโฮสต์อีกด้วย นอกจากนั้นการศึกษาของ Na Guo et al. (2019) ได้มีการศึกษาสมุนไพรจากธรรมชาติที่ชื่อว่า Honokiol ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้ง **α**-hemolysin (Hla) ที่สร้างจากเชื้อ *S. aureus* และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และสมุนไพรดังกล่าวสามารถช่วยลดการอักเสบของเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นโดย *S. aureus* ได้ โดยการไปยับยั้งขั้นตอนการทำให้เกิด NLRP3 inflammasome นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้สารเคมีบางอย่างในการลดฤทธิ์ของ **α**-toxin ของ *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของความเสียหายของ cornea ซึ่งสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งสารพิษได้ดีที่สุดคือ cyclodextrin (CD)-cholesterol (Clare et al., 2009) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารพิษที่สร้างจาก *S. aureus* เป็นสิ่งที่ให้เกิดความรุนแรงของโรคไม่ว่าจะเป็นการทำให้เกิดโรคแบบทั้งระบบหรือโรคแบบเฉพาะที่ โมเลกุลที่สามารถมีส่วนช่วยลดความรุนแรงของโรคจึงมีความสำคัญในการลดความรุนแรงของโรคได้โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะจะทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อดีขึ้น

ในการศึกษาของเราครั้งนี้ พบว่าเชื้อ *E. faecalis* เมื่อบ่มร่วมกับเชื้อ *S. aureus* แล้ว สายพันธุ์ *E. faecalis* R3 สามารถลดเปอร์เซ็นต์ hemolytic activity ของ *S. aureus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามความสามารถของเชื้อ *E. faecalis* ต่อ hemolytic activity ก็มีความแตกต่างกันในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยโมเลกุลที่ถูกสร้างจาก *E. faecalis* นี้ควรมีการวินิจฉัยชนิดของโมเลกุลว่าเป็นสารประเภทไหน เนื่องจากหากเรานำโมเลกุลที่สร้างจาก *E. faecalis* สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงมากที่สุด ไปประยุกต์เป็นยารักษาโรคติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) หรือการติด

เชื้อของระบบร่างกายอื่นๆ (systemic infections) ที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* โดยจะเป็นยาประเภท antivirulence therapy นั่นก็คือเป็นยาที่ลดความรุนแรงของโรคติดเชื้อจากการไปยับยั้งปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรค (virulence factors) ที่สร้างออกมาจากเชื้อก่อโรค งานวิจัยต่อเนื่องจากนี้คือเราควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการทดสอบการทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์จาก *S. aureus* กับเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อวัดอัตราการอักเสบ การยึดเกาะเซลล์ของคนเช่น เซลล์ลำไส้ แล้วนำโมเลกุลที่ได้จาก *E. faecalis* มาทดสอบกับเซลล์ที่ติดเชื้อ *S. aureus* นี้ แล้วดูอัตราการอักเสบที่เกิดขึ้นหรืออัตราการยึดเกาะของเชื้อก่อโรค *S. aureus* ต่อเซลล์โฮสต์ ว่าสามารถถูกทำให้ลดลงได้โดยการรักษาด้วย โมเลกุลจาก *E. faecalis* หรือไม่ งานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Scherr et al. (2015) ยังพบว่า

S. aureus biofilms ยังมีบทบาทสำคัญในการลดการทำงานของ Macrophage (Macrophage dysfunction) ผ่านการสร้าง Hla ร่วมกับ Leukocidin AB ดังนั้นหากเราสามารถหาสารที่มายับยั้ง Hla ได้ ก็จะช่วยลด Macrophage dysfunction ที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้ควรทำการทดสอบฤทธิ์ของสารที่ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ *E. faecalis* ด้วยว่า มีฤทธิ์ยับยังการเจริญของเชื้อ *S. aureus* หรือไม่ เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า *Enterococcus* spp. หลายสายพันธุ์สามารถสร้าง enterocins ที่มีฤทธิ์ antimicrobial activity ด้วย

ผลการยืนยันของสารที่สร้างจาก *E. faecalis* จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการเลือกสายพันธุ์ของ *E. faecalis* เพื่อประยุกต์ใช้เป็นเชื้อ probiotics เพื่อช่วยแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในระดับ microenvironment ในลำไส้ เพื่อลดการยึดเกาะและลดความเสียหายของเซลล์บุผิวไส้จากเชื้อก่อโรค *S. aureus* หรือเชื้อก่อโรคอื่นๆ ในระบบลำไส้ การประยุกต์ใช้เชื้อ probiotics จะมีผลกระทบทางคุณภาพชีวิตของประชาชนเนื่องจากเชื้อ probiotics มีประโยชน์ต่อการรักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหารและป้องกันโรคที่อาจได้รับผ่านทางการกินเพื่อเสริมสร้าง สุขภาพของลำไส้ของคนและสัตว์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม (Bibliography)

Ahmadova A., Todorov S. D., Choiset Y. et al., “Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain Enterococcus faecium AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese,” Food Control, vol. 30, no. 2, pp. 631–641, 2013.

Anagnostopoulos D., Bozoudi D., and Tsaltas D., “Enterococci isolated from cypriot green table olives as a new source of technological and probiotic properties,” Fermentation, vol. 4, no. 2, p. 48, 2018.

Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirtliff M.E. Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. Virulence. 2011;2:445–459. doi: 10.4161/viru.2.5.17724.

Arqués J. L., Rodríguez E., Langa S., Landete J. M., and Medina M., “Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens,” BioMed Research International, vol. 2015, Article ID 584183, 9 pages, 2015.

Bahna P., Dvorak T., Hanna H., Yasko A.W., Hachem R., Raad I. Orthopaedic metal devices coated with a novel antiseptic dye for the prevention of bacterial infections. Int. J. Antimicrob. Agents. 2007;29:593–596. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.12.013.

Baños A., García-López J. D., Núñez C., Martínez-Bueno M., M. Maqueda, and E. Valdivia, “Biocontrol of Listeria monocytogenes in fish by enterocin AS-48 and Listeria lytic bacteriophage P100,” LWT- Food Science and Technology, vol. 66, pp. 672–677, 2016.

Barbosa J., Gibbs P. A., and Teixeira P., “Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal,” Food Control, vol. 21, no. 5, pp. 651–656, 2010.

Bartlett A.H., Hulten K.G. Staphylococcus aureus pathogenesis: Secretion systems, adhesins, and invasins. Pediatr. Infect. Dis. J. 2010;29:860–861. doi: 10.1097/INF.0b013e3181ef2477.

Belkaid Y. and Tamoutounour S. (2016). The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. Nature Reviews Immunology, 16(6), 353.

Ben Braïek O., Morandi S., Cremonesi P., Smaoui S., Hani K., and Ghrairi T., “Biotechnological potential, probiotic and safety properties of newly isolated enterocin-producing Enterococcus lactis strains,” LWT- Food Science and Technology, vol. 92, pp. 361–370, 2018.

Ben Braïek O., Cremonesi P., Morandi S., Smaoui S., Hani K., and Ghrairi T., “Safety characterisation and inhibition of fungi and bacteria by a novel multiple enterocin-producing Enterococcus lactis 4CP3 strain,” Microbial Pathogenesis, vol. 118, pp. 32–38, 2018.

Beveridge T.J., Makin S.A., Kadurugamuwa J.L., Li Z. Interactions between biofilms and the environment. FEMS Microbiol. Rev. 1997;20:291–303. doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x.

Bhakdi S. and Tranum-Jensen J. (1991). Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 55(4), 733-751.

Boyce J.M., Causey W.A. Increasing Occurrence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in the United States. Infect. Control. 1982;3:377–383. doi: 10.1017/S0195941700057337.

Carr F. J. (2017). Microbiology: A fundamental introduction.

Castro A., Silva J. and Teixeira P. (2018). Chapter 8 - Staphylococcus aureus, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. Foodborne Diseases. 213-238.

Chatterjee S.S., Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic waves. Clin. Epidemiol. 2013;5:205–217.

Clare C. McCormick; Armando R. Caballero; Charles L. Balzli; Aihua Tang; Richard J. O'Callaghan. Chemical Inhibition of Alpha-Toxin, a Key Corneal Virulence Factor of Staphylococcus aureus. Investigative Ophthalmology & Visual Science June 2009, Vol.50, 2848-2854. doi:https://doi.org/10.1167/iovs.08-3157

Cohen M. L. (1986). Staphylococcus aureus: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. The Journal of pediatrics. 108(5), 796-799.

Cohen T. S., Hilliard J. J., Jones-Nelson O., Keller A. E., O'Day T. and et al. (2016). Staphylococcus aureus α toxin potentiates opportunistic bacterial lung infections. Science translational medicine. 8(329), 329-331.

Dajcs J. J., Austin M. S., Sloop G. D., Moreau J. M., Hume E. B. and et al. (2002). Corneal pathogenesis of Staphylococcus aureus strain Newman. Investigative ophthalmology and visual science. 43(4), 1109-1115.

Dal Peraro M. and Van Der Goot F. G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. Nature reviews microbiology. 14(2), 77.

Devriese L. U. C., Baele M. and Butaye P. (2006). The genus enterococcus. The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 163-174.

Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Rev. 2000;13:16–34. doi: 10.1128/CMR.13.1.16-34.2000

Donlan R.M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. Clin. Infect. Dis. 2001;33:1387–1392. doi: 10.1086/322972

Elasri M. O., Thomas J. R., Skinner R. A., Blevins J. S., Beenken K. E. and et al. (2002). Staphylococcus aureus collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. Bone. 30(1), 275-280.

Elmoslih A., Zanzan M., Aissa R. et al., "Isolation and characterization of bacteriocinogenic enterococcal and lactococcal strains from south of Morocco dairy product," Biotechnology Journal International, vol. 18, no. 4, pp. 1–16, 2017.

Franz C. M. A. P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., and Gálvez A., "Enterococci as probiotics and their implications in food safety," International Journal of Food Microbiology, vol. 151, no. 2, pp. 125–140, 2011.

Füssle R., Bhakdi S., Sziegoleit A., Tranum-Jensen J, Wellensiek H. J. and et al. (1981). On the mechanism of membrane damage by Staphylococcus aureus alpha-toxin. The Journal of cell biology. 91(1), 83-94.

Gaaloul N., Ben Braiek O., Berjeaud J. M. et al., “Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of enterococcus italicusGGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk,” Journal of Food Safety, vol. 34, no. 4, pp. 300–311, 2014.

Ghomrassi H., Braiek O. B., Choiset Y. et al., “Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria,” Diseases of Aquatic Organisms, vol. 118, no. 1, pp. 31–43, 2016.

Griffin P. M., Price G. R., Schooneveldt J. M., Schlebusch S., Tilse M. H. and et al. (2012). Use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. Journal of clinical microbiology. 50(9), 2918-2931.

Grumann D., Nübel U., Bröker B.M. Staphylococcus aureus toxins—Their functions and genetics. Infect. Genet. Evol. 2014;21:583–592. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.013

Harris L.G., Foster S.J., Richards R.G. An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. Eur. Cells Mater. 2002;4:39–60. doi: 10.22203/eCM.v004a04.

Hepburn L., Hijnen D. J., Sellman B. R., Mustelin T., Sleeman M. A., May R. D. and Strickland I. (2017). The complex biology and contribution of Staphylococcus aureus in atopic dermatitis, current and future therapies. British Journal of Dermatology. 177(1), 63-71.

Holtfreter S., Bröker B.M. Staphylococcal superantigens: Do they play a role in sepsis? Arch. Immunol. Ther. Exp. 2005;53:13–27

Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D.R., Stinear T.P., Grayson M.L. Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. 2010;23:99–139. doi: 10.1128/CMR.00042-09

Hutkins R. W. and Nannen N. L., “pH homeostasis in lactic acid bacteria,” Journal of Dairy Science, vol. 76, no. 8, pp. 2354–2365, 1993.

Jarraud S., Cozon G., Vandenesch F., Bes M., Etienne J., Lina G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. J. Clin. Microbiol. 1999;37:2446–2449.

Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F. Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. 2002;70:631–641. doi: 10.1128/IAI.70.2.631-641.2002

Kakinuma Y., “Inorganic cation transport and energy transduction in Enterococcus hirae and other streptococci,” Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 62, no. 4, pp. 1021–1045, 1998.

Kadri Z, Spitaels F, Cnockaert M, et al., “Enterococcus bulliens sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk,” Antonie van Leeuwenhoek-Journal of Microbiology, vol. 108, no. 5, pp. 1257–1265, 2015.

Kim M. J., Koo H. M., Lee W. J., Choi J. H., Choi M. N. and et al. (2016). Development of epidural and paraspinal abscesses after insufficient evaluation and treatment of acute pyelonephritis caused by Staphylococcus aureus. Korean journal of family medicine. 37(5), 299-302.

Knox K.W., Wicken A.J. Immunological properties of teichoic acids. Bacteriol. Rev. 1973;37:215–257.

Krulwich T. A., Sachs G., and Padan E., "Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis," Nature Reviews Microbiology, vol. 9, no. 5, pp. 330–343, 2011.

Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2003;39:181–189. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00225-6

Lowy F.D. Staphylococcus aureus infections. N. Engl. J. Med. 1998;339:520–532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806

Malachowa N. and DeLeo F. R. (2011). Staphylococcus aureus survival in human blood. Virulence. 2(6), 567-569.

Marshall M. J., Bohach G. A. and Boehm D. F. (2000). Characterization of Staphylococcus aureus beta-toxin induced leukotoxicity. Journal of natural toxins. 9(2), 125-138.

Millar B.C., Loughrey A., Elborn J.S., Moore J.E. Proposed definitions of community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA) J. Hosp. Infect. 2007;67:109–113. doi: 10.1016/j.jhin.2007.06.003.

Morandi S., Cremonesi P., Povolo M., and Brasca M., "Enterococcus lactis sp. nov., from Italian raw milk cheeses," International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 62, no. 8, pp. 1992–1996, 2012

Na Guoa,c, Zuojia Liu a , Zhiqiang Yana , Zonghui Liuc , Kun Haoc , Chuanbo Liua and Jin Wanga,b. Subinhibitory concentrations of Honokiol reduce α-Hemolysin (Hla) secretion by Staphylococcus aureus and the Hla-induced inflammatory response by inactivating the NLRP3 inflammasome. Emerging Microbes & Infections 2019, VOL. 8 https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1617643

Noordiana N., A. B. Fatimah, and A. S. Mun, "Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from Threadfin Salmon and Grass Shrimp," International Food Research Journal, vol. 20, no. 1, pp. 117–124, 2013.

O'Connor P. M., Ross R. P., Hill C., and Cotter P. D., "Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective," Current Opinion in Food Science, vol. 2, pp. 51–57, 2015.

Orenstein A. The Discovery and Naming of Staphylococcus aureus. [(accessed on 8 January 2018)]; Available online: http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf.

Otto, M. (2014). Staphylococcus aureus toxins. Current opinion in microbiology. 17, 32-37.

Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Annu. Rev. Microbiol. 2010;64:143–162. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134309.

Özdemir G. B., Oryaşın E., Bıyık H. H., Özteber M. and Bozdoğan B. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. Indian journal of microbiology. 51(2), 182-187.

Panlilio A.L., Culver D.H., Gaynes R.P., Banerjee S., Henderson T.S., Tolson J.S., Martone W.J., System N.N.I.S., National Nosocomial Infections Surveillance System Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in US hospitals, 1975–1991. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 1992;13:582–586. doi: 10.2307/30148460.

Parker M. W. and Feil S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. Progress in biophysics and molecular biology. 88(1), 91-142.

Penesyan A., Gillings M., Paulsen I.T. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. Molecules. 2015;20:5286–5298. doi: 10.3390/molecules20045286.

Pieniz S., Andreazza R., Okeke B. C., Camargo F. A., and Brandelli A., “Antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus species isolated from meat and dairy products,” Brazilian Journal of Biology, vol. 75, no. 4, pp. 923–931, 2015.

Prévost G. (2005). Molecular and cellular biology: Microbial toxins, 243-283.

Prévost G., Tawk M. Y., Zimmermann-Meisse G. and Jover E. (2015). The staphylococcal alpha-toxin and leukotoxins. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. 739-72.

Rammelkamp C.H., Maxon T. Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin. Exp. Biol. Med. 1942;51:386–389. doi: 10.3181/00379727-51-13986.

Rouha H., Weber S., Janesch P., Maierhofer B. , Gross K. and et al. (2018). Disarming Staphylococcus aureus from destroying human cells by simultaneously neutralizing six cytotoxins with two human monoclonal antibodies. Virulence. 9(1), 231-247.

Sarra M., Taoufik G., Patrick L. C., Benjamin B., Yannick F., and Khaled H., “Isolation and characterization of enterococci bacteriocinic strains from Tunisian fish viscera,” Journal of Food and Nutrition Sciences, vol. 04, no. 06, pp. 701–708, 2013.

Salgado-Pabón W., Breshears L., Spaulding A. R., Merriman J. A., Stach C. S. and et al. (2013). Superantigens are critical for Staphylococcus aureus Infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. MBio. 4(4), 00494-13.

Sandel M. K. and McKillip J. L. (2004). Virulence and recovery of Staphylococcus aureus relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. Food Control. 15(1), 5-10.

Scherr T.D., Hanke M.L., Huang O., James D.B.A., Horswill A.R., Bayles K.W., Fey P.D., Torres V.J., Kielian T. Staphylococcus aureus Biofilms Induce Macrophage Dysfunction through Leukocidin AB and Alpha-Toxin. MBio. 2015;6 doi: 10.1128/mBio.01021-15

Seilie E. S. and Bubeck Wardenburg J. (2017). Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. Seminars in Cell & Developmental Biology. 72, 101-116.

Sharma H., Smith D., Turner C. E., Game L., Pichon B. and et al. (2018). Clinical and molecular epidemiology of staphylococcal toxic shock syndrome in the United Kingdom. Emerging infectious diseases. 24(2), 258.

Shockman G.D., Barren J.F. Structure, Function, and Assembly of Cell Walls of Gram-Positive Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 1983;37:501–527. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.002441

Skinner D., Keefer C.S. Significance of bacteremia caused by Staphylococcus aureus: A study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. Arch. Intern. Med. 1941;68:851–875. doi: 10.1001/archinte.1941.00200110003001.

Simonetta A. C., Moragues De Velasco L. G., and Frisón L. N., "Antibacterial activity of enterococci strains against Vibrio cholerae," Letters in Applied Microbiology, vol. 24, no. 2, pp. 139–143, 1997.

Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K. and Virdi J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology. 6(791).

Song L., Hobaugh M. R., Shustak C., Cheley S., Bayley H. and et al. (1996). Structure of staphylococcal α-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. Science. 274(5294), 1859-1865.

Sugawara N. Tomita T. and Kamio Y. (1997). Assembly of Staphylococcus aureus γ-hemolysin into a pore-forming ring-shaped complex on the surface of human erythrocytes. FEBS Letters. 410(2), 333-337.

Sunil D. Saroj†, Lisa Maudsdotter†, Raquel Tavares and Ann-Beth Jonsson* Lactobacilli Interfere with Streptococcus pyogenes Hemolytic Activity and Adherence to Host Epithelial Cells Front. Microbiol., 29 July 2016 https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01176

Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Levchulk V. P. et al., "Antimicrobial activity of bacteriocin S760 produced by Enterococcus faecium strain LWP760," Antibiot Khimioter, vol. 56, pp. 3–9, 2011.

Tang F., Li L., Meng X. M., Li B., Wang C. Q. and et al. (2019). Inhibition of alpha-hemolysin expression by resveratrol attenuates Staphylococcus aureus virulence. Microbial pathogenesis. 127, 85-90.

Tong S. Y., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L. and Fowler V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical microbiology reviews. 28(3), 603-661.

Vandenesch F., Lina G. and Henry T. (2012). Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2, 12.

Verdon J., Girardin N., Lacombe C., Berjeaud J. M. and Héchard Y. (2009). δ-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. Peptides. 30(4), 817-823.

Vítkova A. and Votava M. (2005). Inhibition of hemolytic activity of Staphylococcus aureus 3-hemolysin by an exosubstance produced by some Enterococcus faecalis strains. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne. 54(1), 11-15.

Vinderola G., Burns P., and Reinheimer J., "Probiotics in nondairy products," Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention, pp. 809–835, 2017.

Vogel M., Schmitz R. P., Hagel S., Pletz M. W., Gagelmann N. and et al. (2016). Infectious disease consultation for Staphylococcus aureus bacteremia–A systematic review and meta-analysis. Journal of Infection. 72(1), 19-28.

Walsh C. and Collyns T. (2017). The pathophysiology of urinary tract infections. Surgery (Oxford). 35(6), 293-298.

Wertheim H. F., Melles D. C., Vos M. C., Leeuwen van W., Belkum A. and et al. (2005). The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. The Lancet infectious diseasesm. 5(12), 751-762.

Wilkinson B.J. The Staphylococci in Human Disease. Churchill Livingstone; New York, NY, USA: 1997. The biology of staphylococci; pp. 1–38.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

แบบประวัติส่วนตัว

ชื่อ: อาจารย์ ดร. มัณฑนา แจ่มกลาง

เพศ: หญิง

วัน/เดือน/ปี เกิด: 9 ธันวาคม 2519

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์

ข้อมูลการติดต่อ

สถานที่ทำงาน: สาขาวิชาปรีคลินิก, สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

ที่อยู่ปัจจุบัน: 85/3 หมู่ 12 ต.บิง อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา 30160

E-mail address: mjamklang@sut.ac.th

เบอร์โทรศัพท์: 086-327-8417

การศึกษา/คุณวุฒิ:

2559 Ph.D. (Microbiology), University of California, Davis, USA

2546 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) (พยาธิวิทยาคลินิก), มหาวิทยาลัยมหิดล

2541 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ความรู้ความสามารถพิเศษและความชำนาญเชิงวิชาการ

- มีความเชี่ยวชาญในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อจุลชีพก่อโรคเช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และเชื้อวัณโรค
- การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อสารต้านจุลชีพ
- การศึกษาความสัมพันธ์ของโฮสต์และเชื้อจุลชีพโดยเฉพาะกลไกการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่ใช้ในการผ่าน Blood-Brain Barrier (BBB) โดยการใช้ ligands จากตัวเชื้อยึดเกาะกับตัวรับ (receptors)
- มีความเชี่ยวชาญด้านพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ผลงานทางวิชาการ/ผลงานวิจัย:

Referred Articles:

Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, **Jamklang M**, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(4):1147-1152.

Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, **Jamklang M,** Boyle-Vavra S. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. J. Infect. Dis. 2002; 186(9): 1344-1347.

Jamklang M, Santanirand P. Beta-lactamase enzymes in Gram-negative bacteria. Journal of Medical Technology. 2005; 33(3), 1187-1197.

Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, **Jamklang M**, Chavalit T, Song JH, Hiramatsu K. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in

11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(3): 1001-1012.

Hong MP, Vu K, Bautos JM, Tham R, **Jamklang M**, Uhrig JP, Gelli A. Activity of calcium channel pore Cch1 is dependent on a modulatory region of the subunit Mid1 in *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell. 2013; 12(1): 142-150.

Vu K, Tham R , Uhrig JP, Thompson GR, Pombejra SN, **Jamklang M**, Bautos JM, Gelli A. Invasion of the Central Nervous System by *Cryptococcus neoformans* requires a Secreted Fungal Metalloprotease. mBio. 3 June 2014; 5(3): e01101-14.

Phylycia A, **Jamklang M**, Uhrig J, Gelli A. The human Blood-Brain Barrier Internalizes Cryptococcus neoformans via the EphA2-Tyrosine Kinase Receptor. Cellular Microbiology, 2017; doi: 10.1111/cmi.12811.

Na Pombejra S, **Jamklang M**, Uhrig JP, Vu K, Gelli A. The structure-function analysis of the Mpr1 metalloprotease determinants of activity during migration of fungal cells across the blood-brain barrier. Plos one, 2018: https://bit.ly/2AkH5Z8

<u>ประวัติการทำงาน:</u>

2541-2553 นักเทคนิคการแพทย์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยมีหน้าที่ความรับผิดชอบดังนี้

- วินิจฉัยเชื้อจุลชีพก่อโรค เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และเชื้อวัณโรค ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลรามาธิบดี
- เทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อคือ เทคนิคในการเพาะเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา และตามด้วย การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมี

- ใช้เทคนิคการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี disk diffusion และวิธี Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

ประสบการณ์การสอนจากการเป็นผู้ช่วยสอนวิชาปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์

- สอนนักศึกษาแพทย์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และวชิระพยาบาล

2553-2559 ประสบการณ์สอนจากการเป็นผู้ช่วยสอนระหว่างการศึกษาปริญญาเอก

- วิชา Genetics and Biotech Lab (BIT161A)
- วิชา Microbiology Laboratory (MIC101L)

2559-ปัจจุบัน อาจารย์สังกัดสาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

LICENCES AND TRAININGS (SELECTED)

License on Medical Technologist (License no. ทน 3697) from the Medical Technology Council of Thailand (2541-ปัจจุบัน)

กรกฎาคม 2543 – กันยายน 2543

เป็น research fellow ศึกษาหัวข้อ“ Nosocomial Infections and Drug-resistant Microorganisms” ณ. Division of Microbiology, Faculty of Medicine, Juntendo University โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น

กรกฎาคม 2545 – กันยายน 2545

เป็น research fellow ศึกษาหัวข้อ“ Nosocomial Infections and Drug-resistant Microorganisms” ณ. Division of Microbiology, Faculty of Medicine, Juntendo University, โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น

9-11 กันยายน 2556

RNA seq workshop, Bioinformatics core, University of California, Davis.

12-14 กรกฎาคม 2560

Microbiome and Functional Metagenomics Analysis Workshop, มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพ

10-13 ธันวาคม 2561

Blended Learning Implementation from the Perspective of Quality Assurance Workshop, Atma Jaya Catholic University of Indoensia

5-9 สิงหาคม 2562

WHOCC for Medical Education, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand

ORAL PRESENTATION

Jamklang M., Uhrig JP, Pombjera SN, Gelli A. *Cryptococcus neoformans* Invades the Central Nervous System by Secreting a Newly Identified Metalloprotease. The 114th General Meeting American Society for Microbiology, May 17-20, 2014, Boston, Massachusetts.

POSTER PRESENTATIONS

Jamklang M, Santarasamit P, Nathisuwan, Chongtrakool P, and Santanirand P. ESBL-producing *Providencia stuartii* in a university hospital, Bangkok, Thailand at 6th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance, March 7-9, 2007, Singapore.

Jamklang M, Uhrig J, Gelli A. Transcriptome of Human Brain Endothelial cells challenged with *Cryptococcus neoformans* reveals a central role for a tyrosine kinase receptor-mediated pathway. Microbial Pathogenesis and Host Response, September 8-12, 2015, Cold Spring Laboratory.

Jamklang M, Pakdeesiriwong N, Rangdist S, Chumkiew S. Interference of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* by secreted effector molecules from *Enterococcus faecalis*. American Society for Microbiology (ASM2019), June 18-22, 2019, Moscone center, Sanfrancisco, USA