รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ของยา fusidic acid เดี่ยว และฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยาต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่อเชื้อสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน ที่มีปริมาณเชื้อสูงในหลอดทดลอง

In vitro activity of fusidic acid alone and in combination with other antimicrobial agents against high-inoculum methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

คณะนักวิจัย

ผศ. ดร. สุทธิพร ภัทรชยากุล

อ. ดิษยา วัฒนาไพศาล

คุณธนภร หอทิวากุล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ PHA570560S

บทคัดย่อ

การรักษาการติดเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) บริเวณกระดูกเรื้อรัง ต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 6-8 สัปดาห์ การใช้ยาต้านจุลชีพรูปแบบรับประทานเมื่ออาการดีขึ้นเป็นทางหนึ่งในการลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลานอนโรงพยาบาล ยา fusidic acid จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษา แต่การใช้ยา fusidic acid เพียงชนิดเดียวอาจก่อปัญหาการดื้อยาและล้มเหลวในการรักษาตามมาได้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณเชื้อต่อการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid เดี่ยว และการเสริมฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยารับประทานชนิดอื่น (clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/ sulfamethoxazole (TMP/SMX) และ rifampicin) ในการยับยั้งเชื้อ MRSA โดยทำการทดสอบกับเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 - ธันวาคม พ.ศ. 2557 ทั้งหมด 70 สายพันธุ์มาทดสอบ โดยนำเชื้อ MRSA จากรพ.พระมงกุฎเกล้า อีก 1 สายพันธุ์มาทดสอบร่วมด้วย ผลการทดสอบความไวของเชื้อด้วยวิธี broth microdilution พบว่าเชื้อไวต่อยา fusidic acid, TMP/SMX และ rifampicin ร้อยละ 91.5 เท่ากัน ไวต่อยา doxycycline, clindamycin และ ciprofloxacin ร้อยละ 48, 4 และ 3 ตามลำดับ โดยยาทั้ง 6 ชนิดได้รับผลกระทบจาก inoculums ทำให้มีความไวลดลงอย่างมากจากการทดสอบในเชื้อ 11 สายพันธุ์ การทดสอบฤทธิ์ของยา fusidic acid เพียงชนิดเดียวด้วยวิธี time kill ในเชื้อ 5 สายพันธุ์พบว่าต้องใช้เวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ยาจึงออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แต่เชื้อที่สัมผัสกับยาในความเข้มข้นต่ำกลับพบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้น สำหรับการทดสอบการเสริมฤทธิ์ด้วยวิธี checkerboard โดยใช้ยา fusidic acid เป็นยาหลัก พบว่าคู่ยา fusidic acid-doxycycline และ fusidic acid-rifampicin ให้ผลการเสริมฤทธิ์มากที่สุดสองอันดับแรก และยังพบผล bactericidal activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี time-kill อีกด้วย แต่มีเพียงคู่ยา fusidic acid-rifampicin เท่านั้นที่พบการเสริมฤทธิ์ เมื่อทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ด้วยวิธี checkerboard และ time kill พบว่าคู่ยา fusidic acid-doxycycline เป็นคู่ยาที่พบการเสริมฤทธิ์มากที่สุดเช่นเดิม โดยสรุปจะเห็นได้ว่าการใช้ยา fusidic acid เพียงชนิดเดียวโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีระดับยาต่ำเกินไป ไม่สามารถป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อ MRSA ได้ นอกจากนี้การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา doxycycline ให้ผลการเสริมฤทธิ์มากที่สุด อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา doxycycline ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA บริเวณกระดูกเรื้อรังแทนการใช้ยา fusidic acid และ rifampicin

ABSTRACT

Systemic antibiotic therapy for chronic osteomyelitis caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) requires extended duration of up to eight weeks. Oral anti-MRSA agents showed important role to reduce cost and length of hospital stay. Oral fusidic acid monotherapy in a clinical setting shows the emergence of resistance during treatment and might result in treatment failure. The objective of this study was to determine effect of inoculums on activity of fusidic acid monotherapy or synergistic activity of combination therapy (clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) and rifampicin were included) against MRSA. Seventy unduplicated MRSA isolates were collected from clinical specimens of admitted patients at Songklanagarind hospital between April 2013 and December 2014. One isolate from Phramongkutklao Hospital was also included. Susceptibility test was determined by a broth microdilution method. Ninety one percent of isolates were susceptible to fusidic acid, TMP/SMX and rifampicin followed by 48, 4 and 3 % to doxycycline, clindamycin and ciprofloxacin, respectively. All six agents were affected by high inoculums in eleven selected isolates. Killing activity of fusidic acid alone against five isolates in time kill study took at least 12 hours to suppress bacterial growth. Low fusidic acid concentration does not prevent re-growth of bacteria. Synergy test was done by checkerboard method. The most synergistic effects were found when doxycycline or rifampicin was added in combination with fusidic acid. In time kill study, these two combination regimens showed bactericidal activity, but synergism was only found when rifampicin combined with fusidic acid. During the checkerboard method and time kill study with high inoculums, fusidic acid-doxycycline regimen was the most active combination. In conclusion fusidic acid alone required high concentration to suppress re-growth of MRSA. Doxycycline added in combination with fusidic acid was the most active regimen in this study. Further studies are required to confirm efficacy of fusidic acid and doxycycline combination regimen for treating osteomyelitis instead of fusidic acid and rifampicin combination regimen.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2557 (รหัสโครงการ PHA570560S)

คณะนักวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
ABSTRACT	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(9)
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
- การศึกษาฤทธิ์ของยา fusidic acid ในการต้านเชื้อ MRSA ในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง	4
- การใช้ยา fusidic acid เดี่ยว (monotherapy)	4
- การศึกษาที่มีการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยาอื่น (combination therapy)	4
- การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin	4
- การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยากลุ่ม quinolones	5
- ผลการรักษาการติดเชื้อ MRSA ด้วยยา fusidic acid	6
- การใช้ยา fusidic acid เดี่ยว	6
- การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin	6
ข้อมูลยาที่ใช้ในงานวิจัย	7
- ยา fusidic acid	7
- ยา rifampicin	8
- ยา cotrimoxazole (trimethoprim/sulfamethoxazole)	9
- ยา ciprofloxacin	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
- ยา clindamycin	11
- ยา doxycycline	12
นิยามศัพท์	13
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	
รูปแบบการวิจัย	14
ขอบเขตการวิจัย	14
วิธีดำเนินการวิจัย	14
- การคัดเลือกเชื้อ MRSA	14
- การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา	14
- การทดสอบผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา	15
- การทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill	16
- การทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy	18
- การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy	23
ขั้นตอนของแผนการทำงาน	25
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
จำนวนเชื้อ MRSA แยกตามสิ่งส่งตรวจ	26
การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา	26
การทดสอบผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา	27
การทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill	28
การทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy	29
การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	
จำนวนเชื้อ MRSA แยกตามสิ่งส่งตรวจ	37
การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาและผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา	37
การทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill	39
การทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard และ Time kill	39
การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard และ Time kill	41
บทสรุป	42
บรรณานุกรม	43
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	49
ภาคผนวก	
ประวัติคณะนักวิจัย	50

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	การแปลผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ	15
2.	การแปลผลการเสริมฤทธิ์	20
3.	จำนวนเชื้อ MRSA แยกตามสิ่งส่งตรวจ	26
4.	ผลความไวของเชื้อ MRSA 71 ตัวอย่างต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด	27
5.	ความไวของเชื้อต่อยาเมื่อปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น (inoculum effect)	28
6.	ผลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard	30
7.	ผลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี Time kill	30
8.	ผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard	33
9.	ผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี Time kill	34

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	ตัวอย่างการบรรจุยาในการทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill	17
2.	ตัวอย่างการบรรจุยาต้านจุลชีพในการทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA	19
3.	ตัวอย่างการบรรจุยาต้านจุลชีพในการทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill โดยยา B เป็นตัวแทนของยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/ sulfamethoxazole หรือ rifampicin โดยยาแต่ละชนิดจะนำมาทดสอบคู่กับยา fusidic acid	21
4.	ฤทธิ์ของยา fusidic acid เดี่ยวในการยับยั้งเชื้อ MRSA ด้วยวิธี Time-kill	29

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

CA-MRSA	Community-acquired Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
cfu	Colony forming unit
CLI	Clindamycin
CIP	Ciprofloxacin
DOX	Doxycycline
FA	Fusidic acid
HA-MRSA	Hospital-acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*
MHA	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton broth
µg	Microgram
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*
RIF	Rifampicin
SMX	Sulfamethoxazole
TMP	Trimethoprim
TSA	Tryptic Soy Agar

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ยา fusidic acid มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus และ Staphylococcus epidermidis* ไม่ว่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์ ที่ไวหรือดื้อต่อยา methicillin[1] แต่มีฤทธิ์ไม่ดีนักในการต้านเชื้อ Streptococci [1-3] เนื่องจากแบคทีเรียมีกลไกการดื้อยา fusidic acid ที่แตกต่างจากยาในกลุ่ม beta-lactams จึงไม่มีการดื้อยาข้ามกันระหว่างยา fusidic acid และยาในกลุ่ม beta-lactams ปัจจุบันยา fusidic acid จึงเป็นยาทางเลือกหนึ่งในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus และ S. epidemidis* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม beta-lactams ที่เรียกว่า methicillin resistant *S. aureus*; MRSA หรือ methicillin resistant *S. epidermidis*; MRSE

ยา fusidic acid ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1962 สำหรับรักษาการติดเชื้อบริเวณต่างๆ ของร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อในกระแสเลือด กระดูกและข้อ ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน และลิ้นหัวใจ เนื่องจากยา fusidic acid มีในรูปแบบยารับประทานจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาการติดเชื้อ MRSA ที่ต้องใช้ระยะเวลาในการรักษานาน เช่น การติดเชื้อในกระดูก โดยการให้ยาผู้ป่วยไปรับประทานต่อที่บ้าน ทำให้ลดระยะเวลาในการนอนโรงพยาบาล

ผลจากการศึกษาการใช้ fusidic acid เดี่ยวในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* ในหลอดทดลองหรือเป็นยาเดี่ยวในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* พบว่าเชื้ออาจเกิดการดื้อยาระหว่างการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อหรือระหว่างการรักษาได้[4, 5] จากการรวบรวมข้อมูลการศึกษาทางคลินิก[6] พบว่าการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ยา fusidic acid เพียงชนิดเดียว ทำให้เกิดการดื้อยาขึ้นระหว่างหรือหลังการรักษาร้อยละ 0-46 และในผู้ป่วยที่เชื้อมีการดื้อยาเกิดขึ้นให้ผลการรักษาล้มเหลวถึงร้อยละ 13.6 นอกจากนี้การใช้ยา fusidic acid เป็นยาเดี่ยวในการรักษาการติดเชื้อที่มีลักษณะเป็นการติดเชื้อเรื้อรัง เช่น การติดเชื้อที่กระดูก การติดเชื้อจากการที่ผู้ป่วยมีวัสดุเทียมในร่างกาย (prosthetic implants) หรือ การติดเชื้อในผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวกมีโอกาสเกิดการดื้อยาสูงกว่าการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเฉียบพลัน เช่น ติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน[6] ในขณะที่เมื่อให้ยา fusidic acid ร่วมกับยาอื่น พบการดื้อยาในระหว่างการรักษาเพียงแค่ร้อยละ 1.1 เท่านั้น [6]

งานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ MRSA ของ fusidic acid มีเพียงหนึ่งการศึกษาที่ทำโดย Fantin และคณะ (1993) [4] ที่ศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid ด้วยวิธี time kill พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อขึ้นกับความเข้มข้นของยา โดยที่ความเข้มข้นที่ 0.5 และ 8 μg/ml ยามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (bacteriostatic) เท่านั้น แต่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (นิยามคือการลดจำนวนเชื้อได้ 4 $\log_{10}$ CFU/ml) ที่ความเข้มข้นของยาตั้งแต่ 32 μg/ml นอกจากนี้ความเข้มข้นของยา fusidic acid ที่เพิ่มขึ้น (1, 10, 100 μg/ml) ยังช่วยลดการเกิดเชื้อดื้อยาได้

ในงานวิจัยเดียวกันมีการศึกษาฤทธิ์ของ fusidic acid ในสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดลิ้นหัวใจอักเสบจากการติดเชื้อ MRSA (experimental MRSA endocarditis) พบว่ายาสามารถผ่านเข้าไปใน vegetation ได้ร้อยละ 71 ของระดับยาในเลือด แต่มีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่านั้น สำหรับบริเวณ vegetation ที่มีเชื้อปริมาณมาก นอกจากยาจะไม่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อแล้วยังทำให้เกิดเชื้อดื้อยาขึ้นและสัตว์ทดลองส่วนใหญ่เสียชีวิตลงก่อนสิ้นสุดการศึกษา แต่ในกรณีที่มีเชื้อปริมาณน้อย ยา fusidic acid สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้และไม่พบเชื้อดื้อยาขึ้นระหว่างการให้ยา[4] ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการใช้ยา fusidic เดี่ยวนั้น มีโอกาสทำให้เกิดการดื้อยาขึ้นได้ในระหว่างรักษาและส่งผลให้การรักษาล้มเหลวได้

สำหรับงานวิจัยทางคลินิกเองก็ให้ผลสอดคล้องกันกับงานวิจัยในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยจากงานวิจัยของ Chang และ คณะ (2000)[5] ที่ศึกษาประสิทธิภาพของยา fusidic acid ในการลดการ colonization ของเชื้อ MRSA ในผู้ป่วยที่เข้ารักษาตัวในหอผู้ป่วยวิกฤติ โดยให้ยา fusidic acid ในขนาด 500 mg ทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ในผู้ป่วยกลุ่มแรกเปรียบเทียบกับการไม่ให้ยาต้าน MRSA ใดๆ ในผู้ป่วยกลุ่มที่สอง ผลการศึกษาพบว่าร้อยละ 50 และ ร้อยละ 33 ของผู้ป่วยในกลุ่มที่ไม่ได้รับยาและกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา fusidic acid ตามลำดับ สามารถกำจัดการ colonization ของ MRSA ไปได้ และเมื่อพิจารณาผู้ป่วยในกลุ่มที่ได้รับยาและไม่สามารถกำจัดเชื้อได้พบว่ามีการดื้อยาของ MRSA เกิดขึ้นในผู้ป่วย 2 ราย โดย MRSA จากผู้ป่วยรายแรก MIC ของยา fusidic acid เท่ากับ 0.25 μg/ml ก่อนได้รับยา และ MIC เพิ่มขึ้นเป็น 64-128 μg/ml หลังจากได้รับยา ส่วน MRSA จากผู้ป่วยรายที่สองมีค่า MIC ของ fusidic acid เพิ่มขึ้นจาก 0.25 μg/ml ก่อนได้รับยาเป็นมากกว่า 256 μg/ml หลังจากได้รับยาซึ่งเชื้อที่มี MIC เพิ่มขึ้นนั้นเป็นเชื้อตัวเดิม (emerging resistance) ที่เกิดการดื้อยาขึ้น

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการให้ยา fusidic acid เพียงชนิดเดียวนั้น มีโอกาสทำให้เชื้อ MRSA ที่เคยไวต่อยา fusidic acid กลับดื้อยาขึ้นได้หลังจากใช้ยาเป็นระยะเวลาเพียงแค่ 7 วันเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ยามีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จากการศึกษาของ Craft และคณะ (2011)[7] ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพการรักษาการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง ที่ผู้ป่วยมีอาการมาไม่เกิน 7 วัน และคาดว่าระยะเวลาที่ต้องใช้ยาต้านจุลชีพอยู่ในช่วง 10-14 วัน พบว่า ระหว่างการใช้ยา fusidic acid (loading dose ขนาด 1500 mg วันละ 2 ครั้ง ในวันแรก และลดขนาดยาลงเหลือขนาด 600 mg วันละ 2 ครั้ง) เปรียบเทียบกับยา linezolid (ขนาด 600 mg วันละ 2 ครั้ง) พบว่าประสิทธิภาพในการรักษาและความปลอดภัยไม่แตกต่างกัน แต่ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา fusidic acid พบว่ามีเชื้อ MSSA 1 ตัวอย่างที่มีค่า MIC ของยา fusidic acid เพิ่มขึ้นจาก 0.12 เป็น 8 μg/ml ในวันที่ 11 ของการรักษา แม้จะให้ยาแบบ loading dose ซึ่งให้ระดับยาในเลือดต่ำสุด (trough concentration)

มากกว่าค่า MIC (8 μg/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคเดิมเกิดการกลายพันธุ์ แต่เนื่องจากความสามารถในการแบ่งตัว (fitness) ลดลง จึงไม่ส่งผลกระทบต่อผลการรักษาทางคลินิก

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมา จึงสรุปได้ว่าการใช้ยา fusidic acid ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ควรต้องให้ร่วมกับยาต้านจุลชีพชนิดอื่นเสมอ เพื่อป้องกันการดื้อยาในระหว่างการรักษา ซึ่งน่าจะส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสเกิดความล้มเหลวในการรักษาลดลง แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าข้อมูลการศึกษาเรื่องการเสริมฤทธิ์กัน (synergy) ของยา fusidic acid กับยาต้านจุลชีพในรูปแบบรับประทานชนิดอื่นในการต้านเชื้อ MRSA มีค่อนข้างจำกัด โดยมีเพียงการศึกษาการให้ fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin เท่านั้นที่มีข้อมูลสนับสนุน ในขณะที่ยาต้านจุลชีพอื่นๆ ที่มีการใช้ทางคลินิก ยังไม่มีข้อมูลสนับสนุนเพียงพอ

สำหรับข้อมูลความไวของเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในปี พ.ศ. 2543-2544[8] ต่อยา fusidic acid พบว่ามีความไวสูงถึงร้อยละ 100 และยังมีความไวเท่าเดิม จนถึงปี พ.ศ. 2556 โดยมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากัน คือน้อยกว่า 0.016 μg/ml (MIC อยู่ในช่วงน้อยกว่า 0.016 ถึง 0.016 μg/ml) ซึ่งถือว่าเชื้อมีความไวต่อยา fusidic acid ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์จุดตัดความไว (susceptible breakpoint) ของยุโรป (EUCAST 2013) ซึ่งกำหนดไว้ที่ MIC $\leq$ 1 μg/ml จึงอาจทำให้ฤทธิ์ของยา fudic acid ในการฆ่าเชื้อ MRSA ที่แยกได้ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อาจแตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาได้ คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาการออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MRSA ของ fusidic acid เพียงตัวเดียว เปรียบเทียบกับเมื่อใช้ร่วมกับยาอื่น (rifampicin, cotrimoxazole, ciprofloxacin, clindamycin และ doxycycline) อีก 1 ชนิดว่าการที่เชื้อมี MIC ต่อยา fusidic acid ที่ต่ำมากๆ นั้นได้รับผลกระทบจาก inoculum effect หรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาความจำเป็นในการใช้ยาอื่นร่วมกับยา fusidic acid ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลของ inoculums ต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ของยาต้านจุลชีพเดี่ยว (fusidic acid, clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ rifampicin)
2. ศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy
3. ศึกษาผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการทบทวนวรรณกรรม มีการศึกษาเกี่ยวกับการเสริมฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid กับยาอื่น ทั้งการศึกษาในหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง รวมทั้งข้อมูลการใช้ทางคลินิก แต่เนื่องจากการศึกษาค่อนข้างมีความหลากหลายทั้งในเรื่องระเบียบวิธีวิจัยและผลการศึกษา จึงขอแบ่งออกเป็นหัวข้อตามลักษณะการศึกษาและยาที่ใช้ร่วมกัน ดังนี้

1. **การศึกษาฤทธิ์ของยา fusidic acid ในการต้านเชื้อ MRSA ในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง**

- **<u>การใช้ยา fusidic acid เดี่ยว (monotherapy)</u>**

งานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของ fusidic acid มีเพียงหนึ่งการศึกษาที่ทำโดย Fantin B. และคณะ (1993) [1] ที่ศึกษาด้วยวิธี time kill พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของยา fusidic acid ขึ้นกับความเข้มข้นของยา โดยที่ความเข้มข้นที่ 0.5 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) เท่านั้น แต่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (ลดจำนวนเชื้อได้ 4 $\log_{10}$ CFU/ml) ที่ความเข้มข้นของยาเพิ่มเป็น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ความเข้มข้นของยา fusidic acid ที่เพิ่มขึ้น (1, 10, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถป้องกันการเกิดเชื้อดื้อยาได้

ในงานวิจัยเดียวกันมีการศึกษาฤทธิ์ของ fusidic acid ในสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดลิ้นหัวใจอักเสบจากการติดเชื้อ MRSA (experimental MRSA endocarditis) พบว่ายาสามารถผ่านเข้าไปใน vegetation ได้ร้อยละ 71 ของระดับยาในเลือด แต่มีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในบริเวณ vegetation ที่มีเชื้อปริมาณมาก นอกจากยาจะไม่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อแล้วยังทำให้เกิดเชื้อดื้อยาขึ้นและสัตว์ทดลองส่วนใหญ่เสียชีวิตลงก่อนสิ้นสุดการศึกษา แต่ในกรณีที่มีเชื้อปริมาณน้อย ยา fusidic acid สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้และไม่พบเชื้อดื้อยาเกิดขึ้นระหว่างการให้ยา ผลจากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการใช้ยา fusidic เดี่ยวนั้น มีโอกาสทำให้เกิดการดื้อยาขึ้นได้ในระหว่างรักษาและส่งผลให้การรักษาล้มเหลวได้ โดยเฉพาะในกรณีที่มีเชื้อปริมาณมากบริเวณตำแหน่งติดเชื้อ

- **<u>การศึกษาที่มีการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยาอื่น (combination therapy)</u>**
  - **<u>การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin</u>**

Drageon HB. และคณะ (1994) [2] ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MSSA และ MRSA ของยา fusidic acid ร่วมกับ rifampicin โดยวิธี time-kill เชื้อ MRSA ในการศึกษานี้มีค่า MIC ต่อยา fusidic acid และ rifampicin เท่ากับ 0.12 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์พบว่าการใช้ยาร่วมกัน (โดยใช้ความเข้มข้นของ rifampicin เท่ากับ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ให้ผลแบบ additive effect หลังเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง และ มีการเสริมฤทธิ์

(synergy) ที่ 24 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าการใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC ของยา rifampicin สามารถเสริมฤทธิ์ของยา fusidic acid ได้

จากงานวิจัยของ Farber BF. และคณะ (1986) [3] ศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ MRSA (จำนวน 20 ตัวอย่าง) ของยา rifampicin เมื่อให้ร่วมกับยา fusidic acid ด้วยวิธี time-kill พบว่าเมื่อใช้ยาร่วมกัน สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้อย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่เมื่อใช้ยาทั้งคู่เป็นยาเดี่ยวให้ผลเหมือนกัน คือ สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียงแค่ 8 ชั่วโมงเท่านั้น หลังจากนั้นเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีก และเมื่อทดสอบด้วยวิธี checkerboard พบว่าการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับ rifampicin ไม่มีการต้านฤทธิ์กัน แต่ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ยาเดี่ยวในเชื้อส่วนใหญ่ (ร้อยละ 85) และพบการเสริมฤทธิ์กันในเชื้อจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งแตกต่างไปจากการศึกษาของ Foldes M. และคณะ [4] ที่ไม่พบการเสริมฤทธิ์ในเชื้อ MRSA จำนวน 37 ตัวอย่าง

- **<u>การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยากลุ่ม quinolones</u>** Roder BL. และคณะ (1989) [5] ทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* 10 ตัวอย่าง (MRSA 2 ตัวอย่าง, MSSA 8 ตัวอย่าง) ของยา ciprofloxacin และยา fusidic acid โดยวิธี time-kill ซึ่งเชื้อ MRSA ที่นำมาทดสอบมีค่า MIC ต่อยา ciprofloxacin เท่ากับ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งสองตัวอย่าง และมีค่า MIC ต่อยา fusidic acid เท่ากับ 0.13 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่ายา ciprofloxacin มีฤทธิ์ในการลดจำนวนเชื้อได้ดีกว่ายา fusidic acid (ที่ชั่วโมงที่ 6 สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้เฉลี่ย 3.4 log_{10} และ 0.77 log_{10} ตามลำดับ) และเมื่อทดสอบการใช้ยาร่วมกันระหว่างยา fusidic acid และ ciprofloxacin พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อได้ใกล้เคียงกับการใช้ยา fusidic acid เดี่ยว ซึ่งเป็นการลดปริมาณเชื้อได้น้อยกว่าการใช้ยา ciprofloxacin เพียงชนิดเดียว สรุปได้ว่ายา fusidic acid นั้นต้านฤทธิ์กับยา ciprofloxacin เมื่อใช้ร่วมกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ertek M. และคณะ (2002)[6] ทดสอบการต้านฤทธิ์กันระหว่างยา fusidic acid และยากลุ่ม quinolones โดยใช้วิธี disk approximation test ของเชื้อ *S. aureus* 15 ตัวอย่าง (ไม่ได้ระบุว่าเป็น MRSA หรือ MSSA) และ coagulase-negative staphylococci 11 ตัวอย่าง พบว่า zone-of-inhibition diameter ของยากลุ่ม quinolones ทุกตัวแคบลงบริเวณด้านที่อยู่ใกล้แผ่นยา fusidic acid ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการต้านฤทธิ์กัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาที่กล่าวมามีจำนวนเชื้อที่นำมาทดสอบค่อนข้างน้อย ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่ายา fusidic acid นั้นต้านฤทธิ์กับยาในกลุ่ม quinolones จึงยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาข้อสรุปดังกล่าว

2. ผลการรักษาการติดเชื้อ MRSA ด้วยยา fusidic acid

- **<u>การใช้ยา fusidic acid เดี่ยว</u>**

งานวิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ด้วยยา fusidic acid มีอยู่อย่างจำกัด จากงานวิจัยของ Craft JC. และคณะ (2011) [7] ศึกษาประสิทธิภาพของยา fusidic acid ในการรักษาการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง (acute bacterial skin and skin structure infections) ที่มีอาการมาไม่เกิน 7 วัน และคาดว่าระยะเวลาที่ต้องใช้ยาต้านจุลชีพอยู่ในช่วง 10-14 วัน ผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 ได้รับยา fusidic acid แบบ loading dose ขนาด 1500 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 2 ครั้ง ในวันแรก และลดขนาดยาลงเหลือขนาด 600 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง เปรียบเทียบกับผู้ป่วยในกลุ่มที่ 2 ที่ได้รับยา linezolid ขนาด 600 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 2 ครั้ง พบว่าประสิทธิภาพในการรักษาและความปลอดภัยไม่แตกต่างกัน แต่ผู้ป่วย 1 รายในกลุ่มที่ 1 มีผลเพาะเชื้อก่อนการรักษาพบเชื้อ MSSA มีค่า MIC ต่อยา fusidic acid เท่ากับ 0.12 และต่อมา MIC เพิ่มขึ้นเป็น 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรระหว่างการรักษา (วันที่ 11) ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคเดิมเกิดการกลายพันธุ์ แต่เนื่องจากความสามารถในการแบ่งตัว (fitness) ลดลง จึงไม่ส่งผลกระทบต่อผลการรักษาทางคลินิก การศึกษาของ Craft JC. และคณะ (2011) [7] ดังที่กล่าวมาแล้วให้ผลไม่สอดคล้องกับงานวิจัยทางคลินิกของ Chang SC. (2000) [8] ที่ศึกษาประสิทธิภาพของยา fusidic acid ในการลด colonization ของเชื้อ MRSA ในผู้ป่วยที่เข้ารักษาตัวในหอผู้ป่วยวิกฤติ โดยให้ยา fusidic acid ในขนาด 500 มิลลิกรัม รับประทานทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ในผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 เปรียบเทียบกับการไม่ให้ยาต้าน MRSA ในผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 พบว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยในกลุ่มที่ 2 ไม่พบการ colonization ของ MRSA ในขณะที่ผู้ป่วยในกลุ่มที่ 1 นั้น มีเพียงร้อยละ 33 (2 ใน 6 ราย) ที่สามารถกำจัดการ colonization ได้ เมื่อพิจารณาผู้ป่วยในกลุ่มที่ได้รับยาและไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ พบว่ามีการดื้อยาเกิดขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา 2 ราย โดยในผู้ป่วยรายแรกก่อนได้รับยา เชื้อมี MIC 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น 64-128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรหลังจากได้รับยา ส่วนผู้ป่วยรายที่สอง MIC ของเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 0.25 เป็นมากกว่า 256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเชื้อที่มี MIC เพิ่มขึ้นนั้นพบว่าเป็นเชื้อตัวเดิมที่เคยไวต่อยาเกิดการดื้อยาขึ้นในภายหลัง (emerging resistance)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการให้ยา fusidic acid เพียงชนิดเดียวนั้น มีโอกาสทำให้เชื้อ MRSA ที่เคยไวต่อยา fusidic acid กลับดื้อยาขึ้นได้หลังจากใช้ยาเป็นระยะเวลาเพียงแค่ 7 วันเท่านั้น แม้จะมีการปรับวิธีการบริหารยาให้ยาขนาดสูงใน dose แรก (loading dose) แล้วก็ตาม

- **<u>การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin</u>**

จากงานวิจัยของ Aboltins CA. และคณะ (2007) [9] ทำการศึกษาย้อนหลัง (retrospective cohort analysis) เพื่อดูผลการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin ในผู้ป่วย 20 รายที่มีการติดเชื้อที่ข้อเข่าและสะโพกเทียม ระหว่างปี 1998-2003 พบว่าเชื้อสาเหตุหลัก ร้อยละ 55 คือเชื้อ

MRSA หลังจากผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพในรูปแบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำแล้ว จะเปลี่ยนเป็นยารับประทาน 2 ชนิด ประกอบด้วยยา rifampicin ขนาด 300 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้งร่วมกับยา fusidic acid ขนาด 500 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง เป็นระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 12 เดือน (6 - 33 เดือน) ร่วมกับการ debridement พบว่าประสบผลสำเร็จในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA สูงถึงร้อยละ 90 โดยไม่ต้องเอาข้อเทียมออก นอกจากนี้ยังมีรายงานกรณีศึกษาผู้ป่วย 1 รายที่มีการติดเชื้อที่กระดูกเรื้อรัง (chronic ostoemyelitis) และล้มเหลวจากการใช้ยาต้านจุลชีพมาหลายชนิดจนเกือบต้องผ่าตัดบริเวณที่ติดเชื้อออก แต่กลับประสบความสำเร็จในการรักษาโดยไม่ต้องผ่าตัด จากการใช้ยา fusidic acid ในขนาด 1,500 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง (loading dose) ในวันแรก จากนั้นให้ยาขนาด 900 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลาประมาณ 9 เดือน โดยในสัปดาห์แรกมีการให้รับประทานยา linezolid 600 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้งร่วมด้วย[10]

จากงานวิจัยทั้งหมดที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าข้อมูลในเรื่องการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง fusidic acid และยาต้าน MRSA อื่นในรูปแบบรับประทาน ทั้งในหลอดทดลองและการใช้ในทางคลินิกค่อนข้างมีความหลากหลายและยังไม่ชัดเจนว่ามีปัจจัยใดบ้างที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ทำให้ไม่สามารถใช้เป็นยาเดี่ยวได้ และในกรณีที่เชื้อ MRSA ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์มีค่า MIC ต่อยา fusidic acid ที่ต่ำมากอาจเป็นตัวแปรที่ช่วยส่งเสริมให้ยา fusidic acid มีฤทธิ์ที่ดีขึ้นและมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้เป็นยาเดี่ยวได้ หรือปริมาณเชื้อในตำแหน่งที่มีการติดเชื้อก็อาจเป็นตัวแปรสำคัญจนส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของยาในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ได้เช่นกัน งานวิจัยนี้จึงน่าจะช่วยพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าวเบื้องต้นได้

3. ข้อมูลยาที่ใช้ในงานวิจัย

ยาที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ต้องเป็นยาที่มีในรูปแบบรับประทานในประเทศไทย ราคาไม่แพง สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ตำแหน่งที่มีการติดเชื้อได้ดี ซึ่งการวิจัยนี้สนใจการติดเชื้อที่บริเวณกระดูกเป็นสำคัญ ยาทดสอบในงานวิจัยนี้จึงต้องเข้าสู่กระดูกได้ดี นอกจากนี้ยังเป็นยาที่มีรายงานการใช้รักษาการติดเชื้อ MRSA บริเวณกระดูกและข้อมาก่อน ซึ่งประกอบด้วยรายการยาดังนี้

- **ยา fusidic acid**

ยา fusidic acid เป็นยาที่มีโครงสร้างเป็น tetracyclic triterpenoid ซึ่งคล้ายกับยาในกลุ่มสเตียรอยด์ [11] ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่ง elongation factor G (EF-G) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ Staphylococci ทั้ง *S. aureus* และ *S. epidermidis* ไม่ว่าจะเป็นเชื้อที่ไวหรือดื้อต่อยา methicillin (methicillin-sensitive; MS, methicillin-resistant; MR) [12] ยาจับโปรตีนสูงถึงร้อยละ 91-98 [11] เมแทบอลิซึมทางตับและขับออก

ทางน้ำดีเป็นหลัก ขับออกทางปัสสาวะเพียงเล็กน้อย [11] อาการไม่พึงประสงค์ที่พบมักไม่รุนแรง ส่วนใหญ่เกิดกับระบบทางเดินอาหาร เช่น คลื่นไส้ อาเจียน บิลลิรูบินในเลือดเพิ่มขึ้น

เนื่องจากยา fusidic acid มีโครงสร้างทางเคมี กลไกการออกฤทธิ์ และกลไกการดื้อยาแตกต่างจากยาในกลุ่ม beta-lactams จึงไม่มีการดื้อยาข้ามกันระหว่างยา fusidic acid และยาในกลุ่ม beta-lactams ทำให้สามารถใช้ยานี้เพื่อรักษาการติดเชื้อที่ดื้อยากลุ่ม beta-lactams ได้ fusidic acid เป็นยาที่ใช้ทั่วไปในทวีปยุโรป ออสเตรเลีย และเอเชีย แต่ยังไม่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาในประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้มีข้อมูลการใช้ยาในทางคลินิกไม่มากนัก แต่หลังจากมีการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์อย่างจริงจัง ทำให้ทราบพฤติกรรมการออกฤทธิ์ของยามากขึ้น[13-15] โดยพบว่าควรบริหารยาแบบ loading dose ในวันแรกก่อนแล้วจึงตามด้วยขนาดยาปกติ เพื่อให้ระดับยาสูงภายในเวลาอันรวดเร็วและออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้เร็วขึ้น ลดการเพิ่มจำนวนเชื้อในภายหลัง ปัจจุบันยา fusidic acid อยู่ในระหว่างการศึกษาผลการใช้ยาแบบ loading dose และผลลัพธ์ทางคลินิกในการรักษาการติดเชื้อ เช่น การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน[7] เพื่อขึ้นทะเบียนยาในประเทศสหรัฐอเมริกาต่อไป

จากรายงานความไวของเชื้อ MRSA ในรพ.สงขลานครินทร์ที่ผ่านมา พบว่าเชื้อยังคงมีความไวค่อนข้างสูงต่อยา fusidic acid และนอกจากนั้น fusidic acid ยังเป็นยาในรูปแบบรับประทาน มีระดับยาที่กระดูกสูงประมาณร้อยละ 50-90[16] จึงมักใช้ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ที่กระดูกและข้อในผู้ป่วยที่อาการดีขึ้นและไม่จำเป็นต้องนอนโรงพยาบาล แต่เนื่องจากข้อมูลการใช้ยาเพียงชนิดเดียวยังจำกัดอยู่ที่การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ในขณะที่ข้อมูลทางคลินิกส่วนใหญ่ยังเป็นการใช้ยาแบบ combination therapy อยู่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทดสอบทั้งยา fusidic acid เดี่ยวและทดสอบร่วมกับยาอื่น เลือกใช้ระดับยาที่ได้จากการใช้ยาขนาด 500 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้งซึ่งเป็นขนาดยาที่ใช้ในประเทศไทยมาทดสอบฤทธิ์ของยา โดยอ้างอิงจากการศึกษาระดับยาจากการใช้ยาขนาดต่างกัน[17] จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของยา fusidic acid เท่ากับ 70 μg/ml ทดสอบในงานวิจัยนี้

- **ยา rifampicin**

ยา rifampicin ออกฤทธิ์ยับยั้ง DNA-dependent RNA polymerase มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อ *Mycobacterium* spp. จึงเป็นยาหลักในการรักษาวัณโรค และยังมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้ง *S. aureus* ด้วย แต่การรักษาด้วยยา rifampicin เพียงชนิดเดียว ทำให้เกิดการดื้อยาระหว่างรักษาได้อย่างรวดเร็ว จำเป็นต้องใช้ยาชนิดนี้ร่วมกับยาต้าน MRSA ชนิดอื่นเสมอ เช่น vancomycin, fusidic acid เป็นต้น เพื่อหวังผลการเสริมฤทธิ์และลดการดื้อยาดังกล่าว

นอกจากนี้ยายังสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในสภาวะที่เชื้อสร้าง biofilm จึงมักใช้ร่วมกับยาอื่นในการรักษาการติดเชื้อที่มีการสอดใส่สายสวนหรือวัสดุเทียม ไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อที่สายสวนหลอด

เลือด ติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจเทียม[18] รวมทั้งการติดเชื้อที่กระดูกและข้อ[16] เนื่องจากยาสามารถเข้าสู่กระดูกได้ดีมาก และตรวจพบระดับยาที่กระดูกแม้ไม่พบระดับยาในเลือดก็ตาม[16, 19] โดยส่วนใหญ่ขนาดยาเป็น 600-900 มิลลิกรัมต่อวัน[16, 20] ซึ่งการศึกษาระดับยาในผู้ป่วยวัณโรคที่ใช้ยาขนาด 600 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าระดับยาในเลือดที่ steady state ประมาณ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[21] และมีผู้ร่วมการศึกษาบางรายที่พบระดับยาต่ำกว่า 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของยา rifampicin เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในการทดสอบ

การศึกษา Pushkin R และคณะ[22] ศึกษาผลของการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin ในการรักษาการติดเชื้อที่ข้อเทียม แต่กลับพบอันตรกิริยาระหว่างยา ทำให้ระดับยา fusidic acid ต่ำลงมากจนต้องยุติการศึกษาเนื่องจากอาจส่งผลต่อผลการรักษาการติดเชื้อได้

- **ยา cotrimoxazole (trimethoprim/sulfamethoxazole)**

ยา cotrimoxazole เป็นยาผสมที่ประกอบด้วยยา 2 ชนิดในสัดส่วนคงที่ คือ ยา trimethoprim (TMP) 1 ส่วน และ sulfamethoxazole (SMX) 5 ส่วน แต่ระดับยาในเลือดนั้นจะเป็นสัดส่วนต่างกัน คือ TMP 1 ส่วน และ SMX 19 ส่วน ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ของยาทั้งคู่จึงต้องเตรียมความเข้มข้นของยาในสัดส่วนของระดับยาในเลือดเสมอ

ยา SMX ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dihydropteroate synthetase (DHPS) ส่วน TMP ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต่อเนื่องกันในการสังเคราะห์ tetrahydrofolate ซึ่งเป็น metabolically active cofactor ในการสังเคราะห์ purines, thymidine และ DNA ดังนั้นการใช้ยาร่วมกันจึงเสริมฤทธิ์กัน ยาทั้งคู่มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้ง *S. aureus* ทั้งที่ไวและดื้อต่อยา methicillin ได้ โดยส่วนใหญ่ถ้าเป็นเชื้อ MRSA ในต่างประเทศมักต้องเป็น community-acquired methicillin-resistant S. aureus (CA-MRSA) จึงจะยังคงไวต่อยา ในขณะที่ประเทศไทยมีรายงานของ CA-MRSA น้อยมาก จึงถือว่า MRSA ที่พบเป็น hospital-acquired methicillin-resistant S. aureus (HA-MRSA) ซึ่งมักดื้อต่อยา cotrimoxazole แต่ข้อมูลภาพรวมของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2556 และของโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าในปี พ.ศ. 2556-2557 พบว่าเชื้อ MRSA ไวต่อยา cotrimoxazole เท่ากับร้อยละ 76.4 และ 95 ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีความไวค่อนข้างดี ประกอบกับเป็นยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ MRSA ทั้ง CA-MRSA และ HA-MRSA ได้เร็วไม่แตกต่างกัน[23] ยาถูกดูดซึมได้ดี ทำให้ระดับยาในเลือดของยารูปแบบรับประทานและรูปแบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำใกล้เคียงกัน ยามีราคาถูก จึงเป็นยาที่น่าสนใจในการนำมาใช้รักษาการติดเชื้อ MRSA เช่นเดียวกัน

ยา TMP/SMX รับประทานในขนาด 160/800 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง จะมีระดับยา TMP และ SMX ในเลือดที่ steady state เท่ากับ 1.72 และ 68 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ[24] และ

การใช้ยา TMP ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ SMX 25 มิลลิกรัม ทุก 8 ชั่วโมง รักษา *Pneumocystis jirovecii* pneumonia พบว่ามีระดับยา TMP และยา SMX เท่ากับ 5.0±1.4 และ 157 ± 52 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรระดับ ตามลำดับ[25]

ยา TMP/SMX มีความสามารถในการกระจายไปบริเวณกระดูกได้ต่างกัน โดยอัตราส่วนระหว่างระดับยาในกระดูกและในเลือดของยาทั้งคู่เท่ากับ 50 และ 15 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ยา TMP มีระดับยาในกระดูกประมาณครึ่งหนึ่งของระดับยาในเลือด ในขณะที่ SMX มีระดับยาเพียงร้อยละ 15 เมื่อเทียบกับระดับยาในเลือด ซึ่งไม่เป็นไปตามสัดส่วนของยาในหลอดทดลอง จึงเป็นสิ่งที่ต้องระมัดระวังในการใช้ยาทางคลินิกด้วย

ปัจจุบันมีการให้ยา TMP/SMX รักษาการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนจากเชื้อ MRSA โดยเฉพาะ CA-MRSA มากขึ้น[26] รวมทั้งการรักษาการติดเชื้อที่กระดูกเรื้อรังเช่นกัน[16] ซึ่งให้ผลรักษาค่อนข้างดี โดยมีคำแนะนำเกี่ยวกับขนาดที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นขนาดยาคงที่ คือ 160/800 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง[16, 20] หรือคำนวณตามน้ำหนักตัวโดยให้มียา TMP ในขนาด 3.5-5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง[20] หรือให้มียา TMP (รูปแบบรับประทานหรือฉีดเข้าหลอดเลือดดำ โดยให้ร่วมกับยา rifampicin 600 มิลลิกรัม/วัน กรณีเป็นการติดเชื้อในกระดูก) ในขนาด 3.5-4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ครั้ง แบ่งให้ทุก 8-12 ชั่วโมง[27] ซึ่งการคำนวณขนาดยาตามน้ำหนักจะได้ขนาดยาที่สูงกว่าแบบขนาดยาคงที่ ดังนั้นจึงน่าจะมีระดับยาในเลือดสูงกว่าด้วยเช่นกัน ซึ่งจากข้อมูลระดับยาข้างต้นและความสามารถของยาในการกระจายเข้ากระดูกที่ต่างกันของยา TMP และยา SMX งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของยา TMP/SMX เท่ากับ 3/57 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบในงานวิจัยนี้ เพื่อไม่ให้ระดับยา SMX สูงเกินไปจากระดับยาจริง

- **ยา ciprofloxacin**

ยา ciprofloxacin เป็นยาในกลุ่ม fluoroquinolones ออกฤทธิ์รบกวนการสร้าง DNA ของเชื้อแบคทีเรีย โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV ซึ่งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ topoisomerase IV เป็นหลักต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อ *S. aureus* แล้วยายังมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งเชื้อ Enterobacteriaceae และ *P. aeruginosa* ได้อีกด้วย ยาถูกดูดซึมดี มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ร้อยละ 60-80 ระดับยาในเลือดขึ้นกับขนาดยา โดยยารับประทานขนาด 500 มิลลิกรัม จะมีระดับยาสูงสุดอยู่ในช่วง 2-2.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเพิ่มเป็น 2.6-3.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเพิ่มขนาดยาเป็น 750 มิลลิกรัม[28]

ข้อมูลความไวของเชื้อ MRSA ในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2559 พบว่าไวต่อยา ciprofloxacin ร้อยละ 15.9 [29] จึงไม่ใช่เป็นยาลำดับแรกๆ สำหรับการรักษาการติดเชื้อ MRSA แต่

อาจมีประโยชน์ในกรณีที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *P. aeruginosa* ที่ไวต่อยา ciprofloxacin ร่วมกับการติดเชื้อ MRSA โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากทดสอบแล้วพบว่าการใช้ยาร่วมกันช่วยเสริมฤทธิ์ในการรักษา ก็อาจใช้พิจารณาเลือกใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา ciprofloxacin ในการรักษาได้ ซึ่งปัจจุบันมีข้อมูลการใช้ยา ciprofloxacin รูปแบบรับประทานสำหรับรักษาการติดเชื้อที่กระดูกเรื้อรังอยู่พอสมควร[16] แต่อาจต้องเฝ้าระวังการดื้อยาร่วมด้วย[20] นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ยา ofloxacin ร่วมกับยา rifampicin ในการรักษาการติดเชื้อจากการใส่วัสดุเทียมทางออร์โธปิดิกส์ ซึ่งให้ผลการรักษาใกล้เคียงกับการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับ rifampicin ยกเว้นการกลับเป็นซ้ำมากขึ้น 2 รายในกลุ่มที่รักษาด้วยยา ofloxacin ร่วมกับยา rifampicin[30]

สำหรับขนาดยา ciprofloxacin ที่มีข้อมูลในการรักษาการติดเชื้อที่กระดูกเรื้อรัง คือ รับประทาน 500-750 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง โดยยาสามารถผ่านเข้าสู่กระดูกได้ประมาณร้อยละ 30-60 เมื่อเทียบกับระดับยาในเลือด ซึ่งระดับยาในเลือดของการรับประทานยา ciprofloxacin 750 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง อยู่ในช่วง 0.9-6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[16] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงกำหนดความเข้มข้นของยา ciprofloxacin เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสะท้อนระดับยาในเลือดของยา ciprofloxacin

- **ยา clindamycin**

ยา clindamycin เป็นยาในกลุ่ม lincosamide มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เป็นต้น รวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) บางชนิด โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในกระบวนการ transpeptidation โดยจับกับ 50S ribosome ซึ่งเชื่อว่ากลไกดังกล่าวช่วยลดการสร้าง toxin ที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกได้ ยา clindamycin จึงมีประโยชน์ในการรักษาการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนเป็นอย่างมาก แต่การทดสอบความไวของเชื้อจำเป็นต้องทำการทดสอบการเหนี่ยวนำการดื้อยาจากยา erythromycin หรือที่เรียกว่า D-test เสมอ เพื่อป้องกันการดื้อยาระหว่างการรักษา

เชื้อ *S. aureus* ที่ยังไวต่อยา clindamycin ประกอบด้วยเชื้อ MSSA และเชื้อ CA-MRSA สำหรับเชื้อ HA-MRSA มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ไวต่อยา ซึ่งในประเทศไทย พบว่าเชื้อ MRSA ไวต่อยา clindamycin เพียงร้อยละ 15 เท่านั้น[29]

ยา clindamycin ในรูปแบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำขนาด 300 และ 600 มิลลิกรัม จะให้ระดับยาในเลือดสูงสุดเท่ากับ 2.6-26 และ 6-29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ[31] ยาในรูปแบบรับประทานมีการดูดซึมสูงถึงร้อยละ 90 ยาสามารถผ่านเข้าสู่กระดูกได้ประมาณร้อยละ 30-70 ของระดับยาในเลือด[16, 32] ในกรณีที่มีการติดเชื้อ MRSA บริเวณกระดูก สามารถใช้ยาในรูปแบบรับประทาน ขนาด 600 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง[27] ซึ่งการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์พบว่าระดับยา

ต่ำสุดของการใช้ยาขนาดรักษาจะอยู่ในช่วง 1-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[32, 33] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงกำหนดความเข้มข้นของยา clindamycin เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- **ยา doxycycline**

เป็นยาในกลุ่ม tetracycline รุ่นที่ 2 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่ง 30S ribosomal subunit ยา doxycycline มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบหลายชนิด แต่ปัจจุบันมีการดื้อยาค่อนข้างมาก จึงไม่ค่อยมีบทบาทในทางคลินิกมากนัก แต่ยังมีการใช้ในการรักษาการติดเชื้อบางชนิด เช่น *Leptospira* spp. และ rickettsia เนื่องจากยา doxycycline ยังมีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดี

ข้อมูลความไวของเชื้อ MRSA ในประเทศไทย พ.ศ. 2559 พบว่าไวต่อยา tetracycline ร้อยละ 26.4 จึงไม่ใช้ doxycycline เป็นยาตัวเลือกแรก แต่เนื่องจากเป็นยารับประทานที่มีราคาถูก จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อ MRSA โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับยา fusidic acid ประกอบกับปัจจุบันข้อมูลการใช้ยา doxycycline ในการรักษาการติดเชื้อที่กระดูกและข้อยังมีจำกัด เนื่องจากส่วนใหญ่ใช้ยา minocycline ในการรักษามากกว่า แต่รพ.สงขลานครินทร์ไม่มียา minocycline งานวิจัยนี้จึงทดสอบยา doxycycline แทนเพื่อให้มีข้อมูล *in vitro* ก่อนการนำไปใช้ทางคลินิก อย่างไรก็ตามมีการนำยา doxycycline มาใช้ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง[34]

ยาจับโปรตีนร้อยละ 80-93 ยาสามารถผ่านเข้าสู่กระดูกที่มีการติดเชื้อได้เกือบร้อยละ 90 ของระดับยาในเลือด[16] ยา doxycycline รูปแบบรับประทานในขนาด 200 มิลลิกรัม ให้ระดับยาสูงสุดในเลือดเฉลี่ย 2.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และลดลงเหลือ 1.45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง[35] ในงานวิจัยนี้จึงกำหนดความเข้มข้นของยา doxycycline เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อจะได้ทดสอบฤทธิ์ของยาในความเข้มข้นที่ต่ำก่อน

นิยามศัพท์

- **Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* (MRSA):** เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา cefoxitin เมื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion ตามมาตรฐานที่ CLSI ฉบับปี ค.ศ. 2013 กำหนด
- **Monotherapy:** การใช้ยา fusidic acid เพียงชนิดเดียวในการทดสอบความสามารถในการลดจำนวนเชื้อ หรือใช้สำหรับรักษาการติดเชื้อ
- **Combination therapy:** การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยาชนิดอื่น ได้แก่ ยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ rifampicin ในการทดสอบความสามารถในการลดจำนวนเชื้อ หรือใช้รักษาการติดเชื้อ
- **High inoculum:** ปริมาณเชื้อ MRSA ที่เกินกว่า 10^5-10^6 cfu/ml ในการศึกษานี้กำหนดปริมาณเชื้อไว้ที่ 10^8 cfu/ml
- **Minimal inhibitory concentration (MIC):** ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA จากการสังเกตด้วยตาเปล่า (หน่วยเป็น µg/ml)

วิธีการทดลอง

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ *In vitro*

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ *In vitro* โดยมีขอบเขตการวิจัย ดังนี้

1. การคัดเลือกเชื้อ MRSA
2. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา fusidic acid, clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ rifampicin ด้วยวิธี broth microdilution
3. การทดสอบผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา
4. การทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill
5. การทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard และวิธี time-kill
6. การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard และวิธี time-kill

วิธีดำเนินการ

1. การคัดเลือกเชื้อ MRSA

คัดเลือกเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 ที่มีการเก็บเชื้อโดยการแช่แข็งอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยจากข้อมูลรายงานผลความไวของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ที่ผ่านมา คาดว่าเชื้อมีความไวต่อยา fusidic acid ค่อนข้างมาก จึงขอตัวอย่างเชื้อ MRSA จากรพ.พระมงกุฎเกล้าจำนวน 1 ตัวอย่าง เพื่อให้มีตัวอย่างเชื้อ MRSA ที่ดื้อยา fusidic acid มาทดสอบร่วมด้วย

2. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา (Antimicrobial susceptibility testing)

- นำเชื้อ MRSA ทั้งหมดที่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือก มาทำการทดสอบ
- เตรียมสารละลายเชื้อ MRSA ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard

- ทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อต่อยา fusidic acid, clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ rifampicin โดยใช้วิธี broth microdilution โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC ® 29213 เป็นมาตรฐาน (quality control) ตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ฉบับปี ค.ศ. 2013
- แปลผลความไวของเชื้อต่อยาจากค่า MIC ที่ได้โดยใช้เกณฑ์จุดตัดความไว (susceptible breakpoint) ของเชื้อ *S. aureus* ตามคำแนะนำของ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ฉบับปี ค.ศ. 2013 สำหรับยา fusidic acid และ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ฉบับปี ค.ศ. 2013 สำหรับยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/ sulfamethoxazole และ rifampicin ตามตารางที่ 1
- ทำการทดสอบซ้ำ ทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย
- **การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล**: รายงานผลเป็นค่า MIC ต่ำสุด, MIC สูงสุด, MIC_{50}, MIC_{90} , ร้อยละความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด

ตารางที่ 1 การแปลผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ยา	MIC breakpoint (µg/ml)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Fusidic acid	≤ 1	-	> 1
Clindamycin	≤ 0.5	1-2	≥ 4
Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Doxycycline	≤ 4	8	≥ 16
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Rifampicin	≤ 1	2	≥ 4

3. การทดสอบผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา

- พิจารณาค่า MIC ของยา fusidic acid, clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ rifampicin เพื่อคัดเลือกเชื้อ MRSA ให้มีทั้งเชื้อที่ดื้อและไวต่อยาทุกชนิด จำนวน 11 สายพันธุ์ โดยนำเชื้อ MRSA จากรพ.พระมงกุฎเกล้า มาทดสอบร่วมด้วย รวมเป็น 12 สายพันธุ์
- เตรียมสารละลายเชื้อ MRSA ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

- ทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อต่อยา fusidic acid, clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ rifampicin โดยใช้วิธี broth microdilution โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATC$^{C®}$ 29213 เป็นมาตรฐาน (quality control) ตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ฉบับปี ค.ศ. 2013 และใช้เชื้อ MRSA ที่ทดสอบด้วยวิธี disk diffusion พบว่าดื้อยา fusidic acid มาทดสอบร่วมด้วย
- แปลผลความไวของเชื้อต่อยาจากค่า MIC ที่ได้โดยใช้เกณฑ์จุดตัดความไว (susceptible breakpoint) ของเชื้อ *S. aureus* ตามคำแนะนำของ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ฉบับปี ค.ศ. 2013 สำหรับยา fusidic acid และ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ฉบับปี ค.ศ. 2013 สำหรับยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/ sulfamethoxazole และ rifampicin ตามตารางที่ 1
- ทำการทดสอบซ้ำ ทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย
- **การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล**: รายงานผลเป็นค่า MIC ต่ำสุด, MIC สูงสุด, MIC_{50}, MIC_{90}

4. การทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill

- นำตัวอย่างเชื้อ MRSA จำนวน 5 สายพันธุ์ที่ทราบค่า MIC แล้ว มาทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid เดี่ยว เพื่อสังเกตการออกฤทธิ์ของยาในกรณีที่เชื้อมีค่า MIC ต่อยา fusidic acid ต่ำมาก เนื่องจากกรณีที่เชื้อมีค่า MIC ต่ำมาก การใช้ยา fusidic acid เดี่ยวจะมีระดับยาอยู่เหนือค่า MIC หลายเท่าอยู่แล้ว จึงอาจสามารถใช้เป็นยาเดี่ยวได้ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ยาแบบ combination therapy
- เตรียมความเข้มข้นของยา fusidic acid ให้มีความแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (1x), ความเข้มข้น 4 เท่าของค่า MIC (4x), ความเข้มข้น 10 เท่าของค่า MIC (10x), ความเข้มข้น 50 เท่าของค่า MIC (50x) และความเข้มข้น 100 เท่าของค่า MIC (100x)
- เตรียมสารละลายเชื้อ MRSA ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard
- บรรจุสารละลายยาต้านจุลชีพและสารละลายเชื้อลงใน 6-well plate ดังแสดงในรูปที่ 1 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะนำออกมาสุ่มตัวอย่างสารละลายเพื่อนับจำนวนเชื้อที่เวลา 2, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

1x	4x
10x	50x
100x	Control

รูปที่ 1 ตัวอย่างการบรรจุยาในการทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill

- ก่อนนำ 6-well plate ไป incubate ต้องสุ่มสารละลายออกมาเพื่อจะได้ทราบปริมาณเชื้อเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ก่อน โดยสุ่มสารละลายประมาณ 50-100 µL เจือจางด้วยสารละลาย 0.9% NaCl ให้มีความเข้มข้นลดลง เช่น ลดลง 10, 100, 1000 เท่า เป็นต้น จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาณ 5 µL หยดลงบน Mueller-Hinton agar (MHA) plate จำนวน 5 หยด โดยเว้นระยะห่างระหว่างแต่ละหยดพอประมาณสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ นำ MHA plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำ MHA plate ออกมานับจำนวนโคโลนี โดยนำจำนวนโคโลนีของทั้ง 5 หยดมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำจำนวนโคโลนีเฉลี่ยมาคูณด้วยจำนวนเท่าของความเข้มข้นที่ถูกเจือจางมา เช่น 10, 100, 1000 เท่า เพื่อให้ทราบปริมาณเชื้อที่แท้จริง ณ จุดเวลานั้นทำให้ทราบปริมาณเชื้อเริ่มต้น (0 ชั่วโมง)
- สำหรับ 6-well plate เมื่อ incubate ครบตามเวลาที่ 2, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ต้องนำ 6-well plate ออกมาจาก incubator เพื่อสุ่มสารละลายออกมา 50-100 µL เจือจางด้วยสารละลาย 0.9% NaCl ให้มีความเข้มข้นลดลง เช่น ลดลง 10, 100, 1000, 10000 เท่า เป็นต้น โดยอาจเจือจางมากขึ้นตามความขุ่นของสารละลายเชื้อใน 6-well plate กล่าวคือเมื่อเวลาผ่านไปสารละลายจะมีความขุ่นมากขึ้น แสดงว่ามีจำนวนเชื้อมากจึงต้องเจือจางสารละลายมากขึ้นกว่าเดิม
- ดูดสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาณ 5 µL หยดลงบน MHA plate จำนวน 5 หยด ให้มีระยะห่างระหว่างแต่ละหยดพอประมาณสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ นำ MHA plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำ MHA plate ออกมานับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่แท้จริง ณ จุดเวลานั้น เช่นเดียวกับขั้นตอนการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (0 ชั่วโมง)
- บันทึกผลและแปลผลตามนิยาม ดังนี้

- **Bactericidal activity** หมายถึง ความสามารถของยาต้านจุลชีพในการลดจำนวนเชื้อลงได้อย่างน้อย 3 log_{10} cfu/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี time-kill
- **Bacteriostatic activity** หมายถึง ความสามารถของยาต้านจุลชีพในการลดจำนวนเชื้อลงได้น้อยกว่า 3 log_{10} CFU/ml เมื่อทดสอบด้วยวิธี time-kill

- **การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล**: รายงานผลเป็นกราฟแสดงจำนวนเชื้อที่เวลา 0, 2, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของยาที่แตกต่างกัน

5. การทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy

- **ทดสอบด้วยวิธี checkerboard**
  - นำเชื้อ MRSA 12 สายพันธุ์เช่นเดียวกับที่นำมาทดสอบผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา มาทำการทดสอบ
  - เตรียมสารละลายเชื้อ MRSA ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard
  - เตรียมสารละลายยา fusidic acid, clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole และ rifampicin ให้มีช่วงของความเข้มข้นครอบคลุมค่า MIC ที่ทราบจากการทดสอบก่อนหน้า
  - จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution)
  - บรรจุสารละลายยาต้านจุลชีพและสารละลายเชื้อลงใน 96-well plate ดังแสดงในรูปที่ 2

			ความเข้มข้นของยา **B** (x MIC)											
			64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031
		คอลัมน์ / แถว	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ความเข้มข้นของยา FA (x MIC)	8	A												
	4	B												
	2	C												
	1	D												
	0.5	E												
	0.25	F												
	0.125	G												
	0.0625	H												

			ความเข้มข้นของยา **FA หรือ ยา B** (x MIC)											
			64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031
		คอลัมน์ / แถว	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
สายพันธุ์เชื้อ MRSA ที่ทดสอบ	**สายพันธุ์ 1**	A												
	สายพันธุ์ 2	B												
	สายพันธุ์ 3	C												
	สายพันธุ์ 4	D												
	สายพันธุ์ 5	E												
	สายพันธุ์ 6	F												
	Quality control	G												
	Neg Ctr	H												

<u>หมายเหตุ</u> ยา B เป็นตัวแทนของยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole หรือ rifampicin โดยยาแต่ละชนิดจะนำมาทดสอบคู่กับยา fusidic acid

รูปที่ 2 ตัวอย่างการบรรจุยาต้านจุลชีพในการทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA โดยแยก plate ที่ใช้หาค่า MIC (รูปล่าง) ออกจาก plate ที่ใช้ทดสอบการเสริมฤทธิ์ (รูปบน)

- นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลานำ 96-well plate ออกมาเพื่ออ่านผล
- ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ เมื่อใช้ยา fusidic acid monotherapy ถือเป็นค่า MIC ของยา fusidic acid หรือเมื่อใช้ยา fusidic acid แบบ combination therapy ถือว่าเป็นค่า MIC ของยา

fusidic acid แบบ combination therapy คำนวณหาค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ดังสูตร

$$FIC = (Xy / X) + (Yx / Y)$$

X คือ ค่า MIC ของยา fusidic acid

Y คือ ค่า MIC ของยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline trimethoprim/sulfamethoxazole หรือ rifampicin

Xy คือ ค่า MIC ของยา fusidic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline trimethoprim/sulfamethoxazole หรือ rifampicin

Yx คือ ค่า MIC ของ clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline trimethoprim/sulfamethoxazole หรือ rifampicin เมื่อใช้ร่วมกับยา fusidic acid

- แปลผลการเสริมฤทธิ์จากค่า FIC ที่คำนวณได้ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแปลผลการเสริมฤทธิ์

FICI	การแปลผล
≤0.5	Synergism
> 0.5 – 1.0	Additive
> 1.0 - < 4.0	Indifferent
≥4.0	Antagonism

- ทำการทดสอบซ้ำตามขั้นตอนข้างต้น จำนวน 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย
- หากมีคู่ยาที่ให้ผลว่าเสริมฤทธิ์กับยา fusidic acid พิจารณาทดสอบด้วยวิธี time-kill ต่อ โดยกำหนดความเข้มข้นของยาตามผลการทดสอบด้วยวิธี checkerboard
- **การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล:** รายงานผลเป็นคู่ยาที่ให้ผล synergism, additive, indifferent และ antagonism เมื่อใช้ร่วมกับ fusidic acid

- **ทดสอบด้วยวิธี time-kill**
  - นำเชื้อ MRSA สายพันธุ์ที่ให้ผลเสริมฤทธิ์ (synergism) จากการทดสอบด้วยวิธี checkerboard มาทำการทดสอบ
  - เตรียมสารละลายเชื้อ MRSA ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard
  - เตรียมความเข้มข้นของยาตามระดับยาในเลือดของยาแต่ละชนิด ดังนี้

- fusidic acid 70 μg/ml
- clindamycin 1 μg/ml
- ciprofloxacin 1 μg/ml
- doxycycline 1 μg/ml
- trimethoprim 3 μg/ml /sulfamethoxazole 57 μg/ml
- rifampicin 1 μg/ml

- บรรจุสารละลายยาต้านจุลชีพและสารละลายเชื้อลงใน 6-well plate ดังแสดงในรูปที่ 3 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะนำออกมาสุ่มตัวอย่างสารละลายเพื่อนับจำนวนเชื้อที่เวลา 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ โดยในการศึกษานี้ทำการทดสอบต่อเนื่องจนถึง 48 ชั่วโมง เพื่อจะได้ทราบการออกฤทธิ์ของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

ยา FA เดี่ยว	ยา B เดี่ยว
blank	blank
ยา FA + ยา B	Control

รูปที่ 3 ตัวอย่างการบรรจุยาต้านจุลชีพในการทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill โดยยา B เป็นตัวแทนของยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole หรือ rifampicin โดยยาแต่ละชนิดจะนำมาทดสอบคู่กับยา fusidic acid

- ก่อนนำ 6-well plate ไป incubate ต้องสุ่มสารละลายออกมาเพื่อจะได้ทราบปริมาณเชื้อเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ก่อน โดยสุ่มสารละลายประมาณ 50-100 μL เจือจางด้วยสารละลาย 0.9% NaCl ให้มีความเข้มข้นลดลง เช่น ลดลง 10, 100, 1000 เท่า เป็นต้น จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาณ 5 μL หยดลงบน MHA plate จำนวน 5 หยด โดยเว้นระยะห่างระหว่างแต่ละหยดพอประมาณสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ นำ MHA plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำ MHA plate ออกมานับจำนวนโคโลนี โดยนำจำนวนโคโลนีของทั้ง 5 หยดมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำจำนวนโคโลนีเฉลี่ยมาคูณด้วยจำนวนเท่าของความเข้มข้นที่ถูกเจือจางมา เช่น 10, 100, 1000 เท่า

เพื่อให้ทราบปริมาณเชื้อที่แท้จริง ณ จุดเวลานั้นทำให้ทราบปริมาณเชื้อเริ่มต้น (0 ชั่วโมง)

- สำหรับ 6-well plate เมื่อ incubate ครบตามเวลาที่ 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ต้องนำ 6-well plate ออกมาจาก incubator เพื่อสุ่มสารละลายออกมา 50-100 µL เจือจางด้วยสารละลาย 0.9% NaCl ให้มีความเข้มข้นลดลง เช่น ลดลง 10, 100, 1000, 10000 เท่า เป็นต้น โดยอาจเจือจางมากขึ้นตามความขุ่นของสารละลายเชื้อใน 6-well plate กล่าวคือเมื่อเวลาผ่านไปสารละลายจะมีความขุ่นมากขึ้น แสดงว่ามีจำนวนเชื้อมาก จึงต้องเจือจางสารละลายมากขึ้นกว่าเดิม
- ดูดสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาณ 5 µL หยดลงบน MHA plate จำนวน 5 หยด ให้มีระยะห่างระหว่างแต่ละหยดพอประมาณสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ นำ MHA plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำ MHA plate ออกมานับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่แท้จริง ณ จุดเวลานั้น เช่นเดียวกับขั้นตอนการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (0 ชั่วโมง)
- บันทึกผลและแปลผลตามนิยาม ดังนี้
    - **Bactericidal activity** หมายถึง ความสามารถของยาต้านจุลชีพในการลดจำนวนเชื้อลงได้<u>อย่างน้อย</u> 3 $\log_{10}$ cfu/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี time-kill
    - **Bacteriostatic activity** หมายถึง ความสามารถของยาต้านจุลชีพในการลดจำนวนเชื้อลงได้<u>น้อยกว่า</u> 3 $\log_{10}$ CFU/ml เมื่อทดสอบด้วยวิธี time-kill
    - **Synergism:** การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันสองชนิดแล้วสามารถ<u>ลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าหรือเท่ากับ</u> 2 $\log_{10}$ cfu/ml ใน 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการใช้ยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์สูงสุดเพียงชนิดเดียว
    - **Antagonism:** การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันสองชนิดแล้วทำให้จำ<u>นวนเชื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ</u> 2 $\log_{10}$ cfu/ml ใน 24 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับการใช้ยาต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียว
    - **Indifferent:** การใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันสองชนิดแล้วทำให้จำนวนเชื้อ<u>เพิ่มขึ้นหรือลดลงน้อยกว่า</u> 2 $\log_{10}$ cfu/ml ใน 24 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับการใช้ยาต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียว

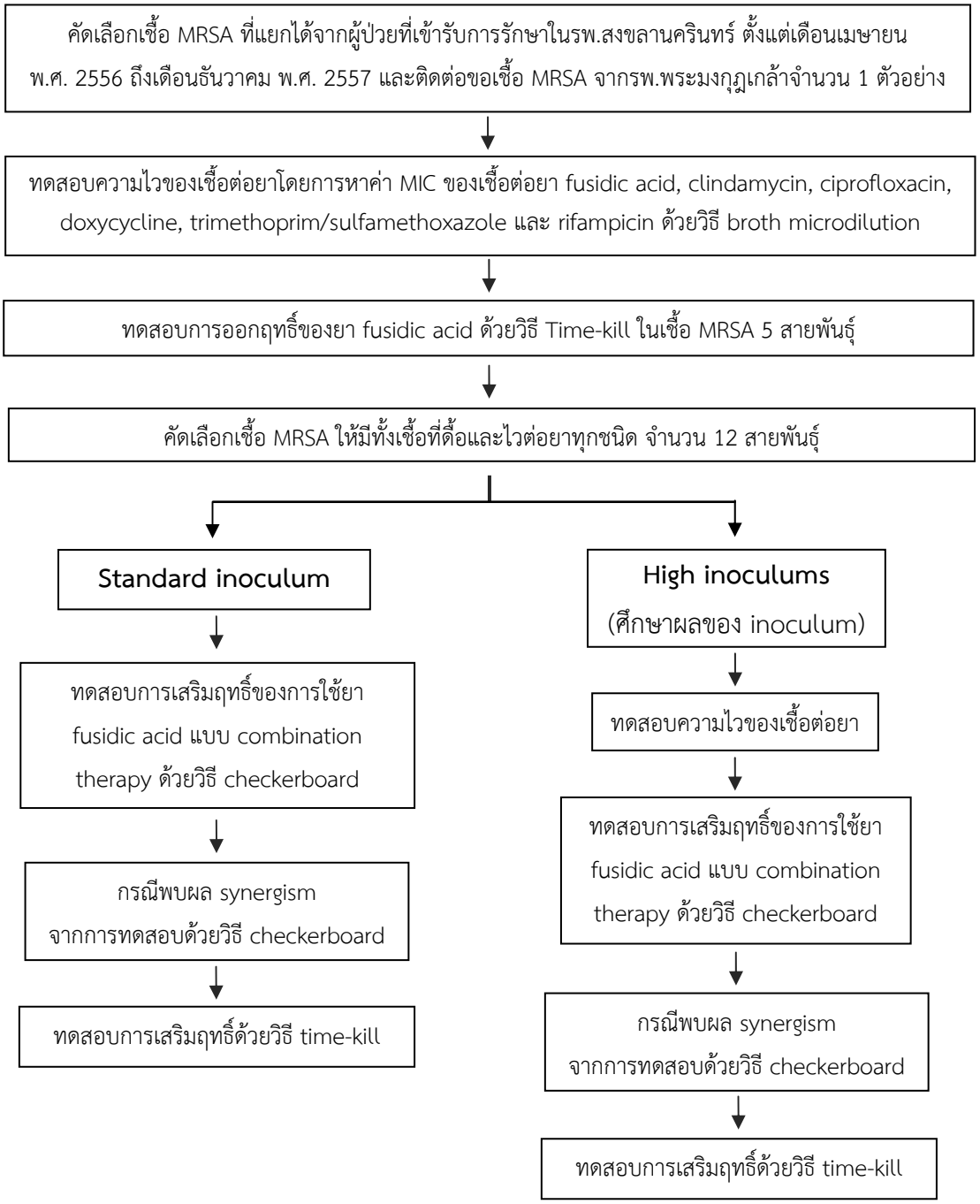
- **การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล:** รายงานผลเป็น
  - ตารางการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อ ที่เวลา 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ว่ามีการเพิ่มขึ้น เท่าเดิม หรือลดลงจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง หน่วยเป็น log_{10} cfu/ml หากเชื้อมีการเพิ่มขึ้นจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายบวก (+) และหากเชื้อมีการลดลงจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายลบ (-)
  - แปลผลการเสริมฤทธิ์ตามนิยามข้างต้น

6. การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy

- **ทดสอบด้วยวิธี checkerboard**
  - นำเชื้อ MRSA 12 สายพันธุ์เช่นเดียวกับที่นำมาทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ทดสอบด้วยวิธี checkerboard ก่อนหน้า
  - ทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard เช่นเดียวกับการทดสอบข้างต้น ยกเว้นการเตรียมสารละลายเชื้อ MRSA คือเตรียมให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml
  - บันทึกผลและแปลผลตามนิยามของการทดสอบด้วยวิธี checkerboard ข้างต้น
  - **การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล:** รายงานผลเป็นคู่ยาที่ให้ผล synergism, additive, indifferent และ antagonism เมื่อใช้ร่วมกับ fusidic acid
- **ทดสอบด้วยวิธี time-kill**
  - นำเชื้อ MRSA สายพันธุ์ที่ให้ผลเสริมฤทธิ์ (synergism) จากการทดสอบด้วยวิธี checkerboard ก่อนหน้า มาทำการทดสอบ
  - ทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี time-kill เช่นเดียวกับการทดสอบข้างต้น ยกเว้นการเตรียมสารละลายเชื้อ MRSA คือเตรียมให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml
  - บันทึกผลและแปลผลตามนิยามของการทดสอบด้วยวิธี Time kill ข้างต้น

- **การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล:** รายงานผลเป็น
  - ตารางการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อ ที่เวลา 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ว่ามีการเพิ่มขึ้น เท่าเดิม หรือลดลงจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง หน่วยเป็น log_{10} cfu/ml หากเชื้อมีการเพิ่มขึ้นจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายบวก (+) และหากเชื้อมีการลดลงจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายลบ (-)
  - แปลผลการเสริมฤทธิ์ตามนิยามข้างต้น

ขั้นตอนของแผนการทำงาน



ผลการวิจัย

จำนวนเชื้อ MRSA แยกตามสิ่งส่งตรวจ

เชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และถูกเก็บรักษาโดยการแช่แข็งในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกทั้งหมดมีจำนวน 70 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อที่ได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นบริเวณปลอดเชื้อ (sterile site) 16 ตัวอย่าง และบริเวณที่มีจุลชีพประจำถิ่นอยู่ (non sterile site) 54 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากรพ.พระมงกุฎเกล้าจำนวน 1 ตัวอย่าง รวมเป็น 71 ตัวอย่าง พบว่า สิ่งส่งตรวจที่พบเชื้อ MRSA ส่วนใหญ่ คือ เสมหะ คิดเป็น ร้อยละ 39.4 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อ MRSA แยกตามสิ่งส่งตรวจ (n = 71)

สิ่งส่งตรวจ	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)
เลือด	10 (14.1)
เนื้อเยื่อหรือของเหลวจากการผ่าตัดหรือสายสวน	11 (15.5)
หนอง	15 (21.1)
เสมหะ	28 (39.4)
ปัสสาวะ	3 (4.2)
อื่นๆ	4 (5.6)
รวม	**71 (100)**

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

จากการทดสอบความไวของเชื้อโดยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อยา fusidic acid, rifampicin, ciprofloxacin, cotrimoxazole, clindamycin และ doxycycline ด้วยวิธี broth microdilution โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC ® 29213 เป็นมาตรฐาน (positive control) ตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ฉบับปี ค.ศ. 2013 รายงานเป็นค่า MIC และร้อยละความไวของเชื้อดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลความไวของเชื้อ MRSA 71 ตัวอย่างต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด

ยาต้านจุลชีพ	MIC (μg/ml)			ร้อยละความไว (n/N)
	MIC50	MIC90	พิสัย	
Fusidic acid	0.25	1	0.0625 to 2	91.55 (65/71)
Clindamycin	1024	2048	<1 to >2048	4.23 (3/71)
Ciprofloxacin	64	64	0.25-128	2.82 (2/71)
Doxycycline	8	16	<0.016 to >32	47.89 (34/71)
Trimethoprim/sulfamethoxazole*	0.0625	2	<0.03125-16	91.55 (65/71)
Rifampicin	<0.008	1	<0.008 to 16	91.55 (65/71)

*รายงานโดยใช้ค่า MIC ของยา Trimethoprim (สัดส่วนยา Trimethoprim ต่อยา sulfamethoxazole เท่ากับ 1 : 19)

หมายเหตุ ค่า MIC ที่ใช้เป็นจุดตัดความไวของยาที่นำมาทดสอบ: Fusidic acid; MIC ≤ 1 μg/ml, Ciprofloxacin; MIC ≤ 1 μg/ml, Clindamycin; MIC ≤ 0.5 μg/ml, Trimethoprim/sulfamethoxazole; MIC ≤ 2/38 μg/ml, Rifampicin; MIC ≤ 1 μg/ml, Doxycycline; MIC ≤ 4 μg/ml

การทดสอบผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา

เมื่อทราบผลความไวของเชื้อ MRSA ทุกสายพันธุ์แล้ว จึงทดสอบว่าปริมาณความเข้มข้นของเชื้อมีผลเปลี่ยนแปลงความไวของเชื้ออย่างไร ก่อนที่จะทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของการใช้ยา 2 ชนิดร่วมกันในขั้นตอนถัดไป โดยคัดเลือกเชื้อ มา 11 สายพันธุ์ ตามการกระจายของค่า MIC โดยนำเชื้อที่ดื้อต่อยา fusidic acid 1 สายพันธุ์ มาทดสอบร่วมด้วย รวมเป็นทั้งหมด 12 สายพันธุ์

ผลการทดสอบ (ตารางที่ 5) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^8 cfu/ml ส่งผลให้ค่า MIC ของยาทั้ง 6 ชนิดเพิ่มขึ้นมาก ไม่ว่าจะเป็นยา fusidic acid, rifampicin และ trimethoprim/sulfamethoxazole ที่มีค่า MIC50 และ MIC90 เพิ่มสูงขึ้นหลายเท่าตัว ทั้งที่เมื่อทดสอบด้วยปริมาณเชื้อตามมาตรฐาน เชื้อมีความไวต่อยาทั้ง 3 ชนิดนี้มากกว่าร้อยละ 90 เช่นเดียวกับยา clindamycin, ciprofloxacin, และ doxycycline ที่ค่า MIC ได้รับผลกระทบจากปริมาณของเชื้อเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 5 ค่า MIC ของยาต้านจุลชีพเมื่อทดสอบด้วยปริมาณเชื้อสูง (inoculum effect)

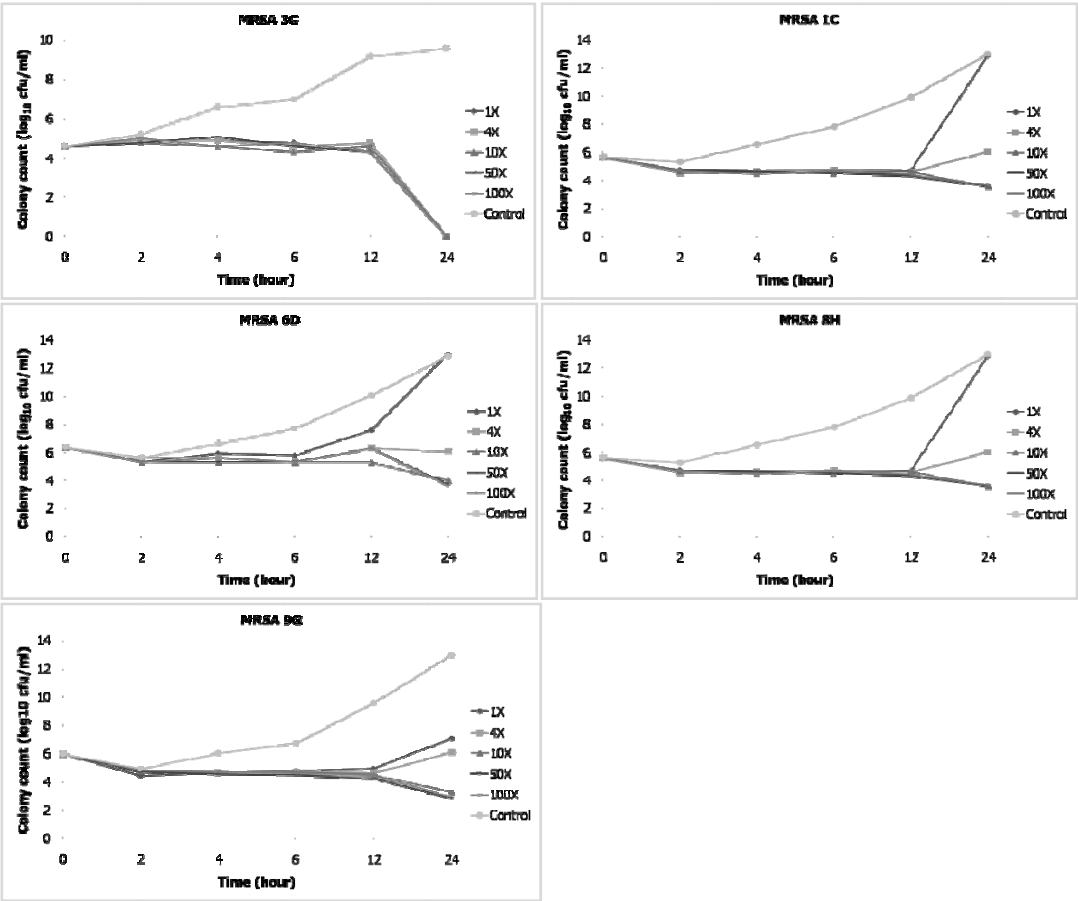
Antimicrobial agents	10^5 CFU/ml			10^8 CFU/ml		
	MIC (µg/ml)			MIC (µg/ml)		
	MIC50	MIC90	Range	MIC50	MIC90	Range
Fusidic acid	0.25	0.5	0.0625 to 2	≥8	≥8	0.5 to ≥8
Clindamycin	512	≥ 512	0.1 to ≥ 512	≥512	≥512	0.5 to ≥ 512
Ciprofloxacin	16	128	0.125 to 128	≥512	≥512	64 to ≥512
TMP/SMX*	0.125	8	≤0.031 to 16	≥64	≥64	≥64
Rifampicin	≤0.008	1	≤0.008 to 2	≥4096	≥4096	16.7 to ≥4096
Doxycycline	4	16	≤0.016 to 16	1024	2048	128 to 4096

TMP/SMX; Trimethoprim/Sulfamethoxazole

การทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill

จากการนำเชื้อ 5 สายพันธุ์ที่ทราบค่า MIC แล้ว มาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ MRSA ด้วยวิธี Time-kill โดยใช้ความเข้มข้นของยา fusidic acid แตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าแม้เชื้อมีความไวมาก (ค่า MIC ต่ำ) แต่ระดับยาที่ใกล้เคียงกับค่า MIC (1x และ 4x) ไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อได้ เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาให้สูงกว่าค่า MIC ตั้งแต่ 10 เท่า 50 เท่า ไปจนถึง 100 เท่า พบว่ายา fusidic acid ทั้ง 3 ความเข้มข้นนี้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อได้ใกล้เคียงกัน โดยเชื้อมีจำนวนลดลงอย่างช้าๆ ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจึงจะเริ่มเห็นการลดลงของจำนวนเชื้อชัดเจนขึ้น (ประมาณ 1 $\log_{10}$ cfu/ml) และบางสายพันธุ์พบว่ายาสามารถกำจัดเชื้อได้ทั้งหมดที่เวลา 24 ชั่วโมง (bactericidal activity) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ฤทธิ์ของยา fusidic acid เดี่ยวในการยับยั้งเชื้อ MRSA ด้วยวิธี Time-kill โดยใช้ความเข้มข้นของยา fusidic acid เท่ากับค่า MIC (1x), ความเข้มข้น 4 เท่าของค่า MIC (4x), ความเข้มข้น 10 เท่าของค่า MIC (10x), ความเข้มข้น 50 เท่าของค่า MIC (50x) และความเข้มข้น 100 เท่าของค่า MIC (100x)

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy

- **ทดสอบด้วยวิธี checkerboard**

ทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA 12 สายพันธุ์ โดยมียา Fusidic acid เป็นยาหลัก ร่วมกับยาอื่นอีก 5 ชนิด ทดสอบเป็นคู่ๆ ผลพบว่าคู่ยา fusidic acid และยา doxycycline ให้ผลเสริมฤทธิ์ (synergism) มากที่สุด จำนวน 6 สายพันธุ์, additive 2 สายพันธุ์, indifferent 4 สายพันธุ์ โดยไม่มีผล antagonism เลย ดังแสดงในตารางที่ 6

คู่ยา fusidic acid และ rifampicin ให้ผล synergism จำนวน 4 สายพันธุ์ ยา fusidic acid คู่ยา clindamycin และ trimethoprim/sulfamethoxazole ตามลำดับ ให้ผล synergism จำนวน 2 สายพันธุ์เท่ากัน นอกจากนี้มีผล antagonism 2 สายพันธุ์จากคู่ยา fusidic acid และ

trimethoprim/sulfamethoxazole สำหรับยา ciprofloxacin แม้ไม่ให้ผล synergism แต่ก็ไม่มีผล antagonism เช่นเดียวกัน โดยให้ผล additive 4 สายพันธุ์ และ indifferent 8 สายพันธุ์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6) โดยผลการทดสอบของเชื้อที่ดื้อต่อยา fusidic acid ให้ผลไม่แตกต่างจากเชื้อที่ไวต่อยา fusidic acid จึงรายงานผลร่วมกับเชื้อที่ไวต่อยา fusidic acid

ตารางที่ 6 ผลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard

ยา Fusidic acid ทดสอบร่วมกับยา	ผล (จำนวนสายพันธุ์)			
	Synergism	Additive	Indifferent	Antagonism
Clindamycin	2	5	5	0
Ciprofloxacin	0	4	8	0
Doxycycline	6	2	4	0
TMP/SMX	2	4	4	2
Rifampicin	4	0	8	0

TMP/SMX; Trimethoprim/Sulfamethoxazole

- **ทดสอบด้วยวิธี Time kill**

ทดสอบการเสริมฤทธิ์ด้วยวิธี Time kill ในเชื้อที่พบการเสริมฤทธิ์จากการทดสอบด้วยวิธี checkerboard โดยทดสอบยา fusidic acid ร่วมกับยา clindamycin 2 สายพันธุ์, ร่วมกับยา trimethoprim/sulfamethoxazole 2 สายพันธุ์, ร่วมกับยา doxycycline 6 สายพันธุ์, rifampicin 3 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี Time kill

เชื้อ	ยาที่ทดสอบ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (log_{10} cfu/ml)	จำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา* (log_{10} cfu/ml)						**หมายเหตุ**
		0 hr	**2 hr**	**4 hr**	**6 hr**	**12 hr**	**24 hr**	**48 hr**	
1G	FA	5	+0.4	+0.1	+1	+1.3	+0.3	-5.0	
	CLI	5	-0.1	-0.2	0	+0.9	+2.1	+5.9	
	FA+CLI	5	+0.1	-0.2	+1	+1.3	+1.3	-5.0	Indifferent
	Control	5	+0.4	+1.2	+3.3	+4	+4	+6.3	

เชื้อ	ยาที่ทดสอบ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (log_{10} cfu/ml)	จำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา* (log_{10} cfu/ml)						หมายเหตุ
		0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	
8F	FA	5	+0.2	+0.1	-0.3	-0.4	-0.7	-0.7	
	CLI	5	+0.1	+0.7	+2.5	+3.9	+5	+6	
	FA+CLI	5	+0.4	-0.1	0	+0.8	+0.3	+0.3	Indifferent
	Control	5	+1.0	+1.9	+3.2	+4	+4.7	+6.3	
1C	FA	5.3	0	+0.3	+1	+1	-5.3	-5.3	Bactericidal
	DOX	5.3	+1	+2	+2.5	+3.7	+5	+5.3	
	FA+DOX	5.3	+1	+1	0	+1	-5.3	-5.3	Bactericidal Indifferent
	Control	5.3	+1	+2.6	+3.3	+4.2	+5.7	+5	
1G	FA	6.3	0	0.3	0	0	-6.3	-6.3	Bactericidal
	DOX	6.3	0	+1.5	+1.3	+2	+3.7	+4.1	
	FA+DOX	6.3	-0.7	0	0	0	-1	-6.3	Antagonism
	Control	6.3	0	+1.6	+2.1	+3.3	+3.7	+4.2	
2G	FA	6.3	-0.7	-0.7	-1	-1	-1.7	-6.3	
	DOX	6.3	+0	+1	+1	+1	+3	+3.3	
	FA+DOX	6.3	-1	-0.7	0	0	-1.0	-6.3	Indifferent
	Control	6.3	-0.7	+1	1.5	2.3	3.6	4.1	
8F	FA	6.3	0	0	0	-1	-6.3	-6.3	Bactericidal
	DOX	6.3	-0.7	+1	+1.3	+2.5	+3.6	+3.8	
	FA+DOX	6.3	0	0	0	0	0	-6.3	Antagonism
	Control	6.3	0	+2	+2.4	+3.4	+3.7	+4.1	
8G	FA	6.3	-1	0	0	0	0	-6.3	
	DOX	6.3	0	+0.3	+0.6	+2.3	+3.4	+3.8	
	FA+DOX	6.3	-1	0	-1.5	-1	0	-6.3	Indifferent
	Control	6.3	0	+1	+1.6	+2.8	+4.8	+3.6	
8H	FA	6.3	0	0	0	0	-6.3	-6.3	Bactericidal
	DOX	6.3	0	0	0	+2	+3	+3	
	FA+DOX	6.3	0	0	0	0	0	-6.3	Antagonism
	Control	6.3	-0.7	+1.5	+2.1	+3.2	+3.5	+3.8	
6A	FA	5.3	+1	0	+1	0	+1	-1.0	
	TMP/SMX	5.3	+1	+1	+1.7	+1.7	+2	-5.3	

เชื้อ	ยาที่ทดสอบ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (log_{10} cfu/ml)	จำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา* (log_{10} cfu/ml)						หมายเหตุ
		0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	
	FA+TMP/SMX	5.3	0	0	0	0	+1	-1.0	Indifferent
	Control	5.3	+1	+1	+4	+5	+5.5	+5.7	
8F	FA	6.8	-1.5	-1.6	-1.1	-1.4	-1.5	-1.5	
	TMP/SMX	6.8	-0.9	+0.1	-0.3	+0.1	-0.2	+0.1	
	FA+TMP/SMX	6.8	-1.4	-1.8	-1.8	-1.5	-1.5	-0.5	Indifferent
	Control	6.8	0	+1.2	+1.7	+2.2	+2.9	+4.5	
1G	FA	6.3	-1	0	0	-1	-1	-6.3	
	RIF	6.3	-1.0	-1.0	0	0	0	+3.3	
	FA+RIF	6.3	0	0	0	0	-6.3	-6.3	Bactericidal Synergism
	Control	6.3	0	+1.6	+2	+3.1	+3.6	+3.9	
8G	FA	5.6	+0.7	+0.7	+0.7	-0.3	-5.6	-5.6	Bactericidal
	RIF	5.6	+0.7	+0.7	+0.7	+2.7	+3.7	+3.7	
	FA+RIF	5.6	-0.3	+0.7	0	-0.3	-0.3	-5.6	Antagonism
	Control	5.6	0	+2.2	+2.4	+3.5	+5.4	+4.3	
8H	FA	6.3	0	0	0	-0.4	-1	-6.3	
	RIF	6.3	0	+0.3	+0.3	0	-0.5	-0.7	
	FA+RIF	6.3	-1.0	+0.7	0	0	0	-6.3	Indifferent
	Control	6.3	0	+1.3	+1.8	+3.5	+3.7	+3.9	

CIP; Ciprofloxacin, CLI; Clindamycin, DOX; Doxycycline, FA; Fusidic acid, RIF; Rifampicin, TMP/SMX; Trimethoprim/Sulfamethoxazole

* หากเชื้อมีการเพิ่มขึ้นจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายบวก (+) และหากเชื้อมีการลดลงจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายลบ (-)

หมายเหตุ การอ่านผล **Bactericidal activity, Synergism, Antagonism, Indifferent อ่านผลที่ 24 ชั่วโมง**

การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy

- **ทดสอบด้วยวิธี checkerboard**

การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ทำการทดสอบในเชื้อสายพันธุ์ที่ทราบการเสริมฤทธิ์จากการทดสอบก่อนหน้า จำนวน 12 สายพันธุ์ โดยเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^8 cfu/ml ผลการทดสอบ

พบว่าคู่ยา fusidic acid และ doxycycline ให้ผลดีที่สุด คือ synergism 7 สายพันธุ์ และ additive 5 สายพันธุ์ โดยไม่มีผล antagonism เลย ดังแสดงในตารางที่ 8

ยา fusidic acid คู่ยา rifampicin ให้ผล synergism 5 สายพันธุ์, additive 3 สายพันธุ์ และให้ผล antagonism 3 สายพันธุ์ ในขณะที่ยา fusidic acid คู่ยา trimethoprim/ sulfamethoxazole ให้ผล synergism 4 สายพันธุ์, additive 2 สายพันธุ์ โดยให้ผล antagonism 5 สายพันธุ์

ยา fusidic acid คู่ยา clindamycin และ ciprofloxacin ตามลำดับ ให้ผล synergism 3 สายพันธุ์เท่ากัน โดยคู่ยา clindamycin ให้ผล additive 3 สายพันธุ์ และ antagonism 6 สายพันธุ์ ในขณะที่คู่ยา ciprofloxacin ให้ผล antagonism 5 สายพันธุ์, additive และ indifferent อย่างละ 2 สายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ระหว่างปริมาณเชื้อตามมาตรฐานและปริมาณเชื้อสูง พบว่าให้ผลการเสริมฤทธิ์ที่มากขึ้น ในขณะเดียวกันก็พบการต้านฤทธิ์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ยกเว้นคู่ยา fusidic acid และยา doxycycline ที่ให้ผลใกล้เคียงกันมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าได้รับผลกระทบจาก inoculums ไม่มากเท่ายาชนิดอื่นที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้

ตารางที่ 8 ผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard

ยา Fusidic acid ทดสอบร่วมกับยา	**ผล (จำนวนสายพันธุ์)**			
	Synergism	**Additive**	**Indifferent**	**Antagonism**
Clindamycin	3	3	0	6
Ciprofloxacin	3	2	2	5
Doxycycline	7	5	0	0
TMP/SMX	4	2	1	5
Rifampicin	5	3	1	3

TMP/SMX; Trimethoprim/Sulfamethoxazole

- **ทดสอบด้วยวิธี time-kill**

เมื่อทราบผลการเสริมฤทธิ์จากการทดสอบด้วยวิธี checkerboard แล้ว นำสายพันธุ์และคู่ยาที่พบว่าเสริมฤทธิ์กัน มาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจากการใช้ยาร่วมกันด้วยวิธี time-kill โดยได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี Time kill

เชื้อ	ยาที่ทดสอบ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (log_{10} cfu/ml)	จำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา* (log_{10} cfu/ml)						หมายเหตุ
		0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	12 hr	24 hr*	48 hr	
3G	FA	7.7	+0.4	+0.5	-0.1	+1.6	+0.6	+0.1	
	CLI	7.7	+0.2	+0.4	+0.3	+1.6	+1.6	+1.6	
	FA+CLI	7.7	+0.3	+0.1	-0.4	+1.6	+0.6	-7.7	Indifferent
	Control	7.7	+0.3	+1	+1.7	+1.9	+1.6	+1.6	
8F	FA	7.8	-0.2	-0.5	+0.7	+0.6	+1	+0.6	
	CLI	7.8	+0.3	+0.9	+1.4	+1.5	+2.1	+3	
	FA+CLI	7.8	-0.1	-0.8	+0.5	+0.3	+0.2	-0.1	Indifferent
	Control	7.8	+0.4	+0.9	+2	+2.2	+2.9	+3.6	
1G	FA	7.8	-0.2	-0.6	+0.2	0	-0.1	-0.4	
	CLI	7.8	-0.1	-0.4	+0.2	+1	+1.8	+2.6	
	FA+CLI	7.8	-0.2	-0.5	+0.2	0	-0.1	-0.4	Indifferent
	Control	7.8	+0.3	+0.9	+2.3	+2.2	+3.2	+3.6	
1C	FA	7.3	+0.3	-0.1	+1.2	+1	+1	+1	
	CIP	7.3	+0.8	+1.6	+2.6	+2.5	+3.5	+4	
	FA+CIP	7.3	+0.5	+0.1	+0.7	+0.9	+0.8	+0.8	Indifferent
	Control	7.3	+0.9	+1.6	+2.3	+2.3	+3.4	+4	
8G	FA	8.3	-0.1	+0.2	+0.3	+1.0	+0.3	+1.0	
	CIP	8.3	+0.1	+0.1	+1.3	+1.7	+2.3	+2	
	FA+CIP	8.3	+0.1	+0.2	+1.3	0	+1	+1	Indifferent
	Control	8.3	+0.4	+0.2	+1.6	+2	+2	+2.8	
4H	FA	8.3	0	0	+1	0	+1	+1	
	CIP	8.3	+0.5	+0.4	+1.7	+2.3	+2.5	+2.5	
	FA+CIP	8.3	0	0	+1	+1	0	0	Indifferent
	Control	8.3	+0.2	+0.5	+1.7	+2	+2.9	+2.6	
1C	FA	7.8	+0.3	+0.6	+1.5	+0.9	+1.5	+1.5	
	DOX	7.8	+0.7	+1.2	+1.5	+2.5	+2.8	+3	
	FA+DOX	7.8	+0.4	+0.8	+1.5	-7.8	-7.8	-7.8	Bactericidal Synergism
	Control	7.8	+0.7	+1.2	+2	+2.5	+2.5	+2.8	

เชื้อ	ยาที่ทดสอบ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (log_{10} cfu/ml)	จำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา* (log_{10} cfu/ml)						หมายเหตุ
		0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	12 hr	24 hr*	48 hr	
1G	FA	7.8	+0.4	+0.8	+1.5	+1.5	+0.5	+0.5	
	DOX	7.8	+0.6	+1.2	+2.1	+3	+2.8	+3	
	FA+DOX	7.8	+0.7	+0.9	+1.5	+1.5	+1.5	+0.5	Indifferent
	Control	7.8	+0.9	+1.2	+2	+2.5	+2.8	+2.5	
2A	FA	8.2	+0.6	+0.2	+1.1	+1.1	+1.1	-8.2	
	DOX	8.2	+0.2	+0.3	+0.6	+0.1	+2.1	+2.9	
	FA+DOX	8.2	+0.5	+0.8	+1.1	+1.1	+1.1	+1.1	Indifferent
	Control	8.2	+0.7	+0.8	+1.4	+1.7	+2.1	+2.6	
2G	FA	8.3	+0.3	+0.3	+1	+1	+1	+1	
	DOX	8.3	+0.3	+0.6	+1	+1.5	+2.3	+2.3	
	FA+DOX	8.3	+0.1	+0.9	+1	+1	+0.6	+1	Indifferent
	Control	8.3	+0.7	+0.9	+1.9	+2	+2	+2	
4H	FA	8.3	+0.3	+0.8	+1	+1	+1	0	
	DOX	8.3	+0.2	+0.8	+1.5	+2	+2.3	+2	
	FA+DOX	8.3	0	+0.6	+1	+1	+1	-0.5	Indifferent
	Control	8.3	+0.5	+1	+1.5	+2	+2.3	+2.3	
9G	FA	8.4	-0.1	0	+0.9	+0.2	+0.9	+0.9	
	DOX	8.4	+0.3	+0.4	+0.9	+0.9	+2.2	+2.4	
	FA+DOX	8.4	+0.2	+0.4	-0.1	+0.9	+0.9	-0.1	Indifferent
	Control	8.4	+0.1	+0.8	+1.9	+1.5	+1.4	+1.9	
6A	FA	8.4	+0.1	+0.2	+1.5	+1.4	+1.4	+0.9	
	TMP/SMX	8.4	+0.3	+0.6	+2	+2.3	+2.5	+2.2	
	FA+TMP/SMX	8.4	+0.2	+0.4	+1.7	+1.6	+1.7	+0.9	Indifferent
	Control	8.4	+0.1	+0.5	+1.7	+1.9	+2	+2.9	
4H	FA	8.1	+0.1	+0.6	+0.9	+1.2	+1.2	+1.2	
	TMP/SMX	8.1	+0.6	+0.9	+1.8	+2.2	+2.5	+2.8	
	FA+TMP/SMX	8.1	+0.2	+0.2	+0.2	+0.2	-0.3	-0.5	Indifferent
	Control	8.1	+0.6	+0.9	+1.9	+2.2	+2.5	+2.9	
8G	FA	8.3	-0.2	+0.1	+0.7	+1	+1.3	+1.3	
	TMP/SMX	8.3	+0.2	+0.6	+1.3	+2	+2	+2	
	FA+TMP/SMX	8.3	0	-0.2	+0.2	+1	+1	+1	Indifferent
	Control	8.3	+0.1	+0.8	+1.3	+2	+2.5	+2.3	

เชื้อ	ยาที่ทดสอบ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (log_{10} cfu/ml)	จำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา* (log_{10} cfu/ml)						หมายเหตุ
		0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	12 hr	24 hr*	48 hr	
9G	FA	8	+0.4	+0.3	0	-0.4	+0.6	+1.3	
	TMP/SMX	8	+0.6	+0.2	-0.1	0	+0.3	-8.0	
	FA+TMP/SMX	8	+0.3	+0.1	+1	+1.3	+1.3	+1.3	Indifferent
	Control	8	+0.3	+0.7	+1.8	+2.3	+2.3	+2.6	
1C	FA	8	+0.8	+0.7	+0.3	+0.3	-0.7	+0.3	
	RIF	8	+0.4	+0.1	-0.4	-1.4	+1.3	+2.6	
	FA+RIF	8	+0.5	+0.3	0	-0.7	-0.7	-1.7	Indifferent
	Control	8	+0.7	+1.1	+1.8	+2.3	+2.6	+2.3	
6A	FA	8.4	0	+0.1	+0.9	+1.2	+1.9	+2.4	
	RIF	8.4	-0.1	+0.1	+0.9	+1.2	+1.4	+2.2	
	FA+RIF	8.4	-0.3	+0.1	+0.9	+1.4	+1.9	-0.1	Indifferent
	Control	8.4	+0.4	+0.9	+1.2	+1.9	+1.9	+2.2	
8G	FA	8.3	+0.4	+0.2	+1	+1.3	+1.4	+1.3	
	RIF	8.3	+0.3	+0.2	+1.3	+2	+2.3	+2.4	
	FA+RIF	8.3	+0.5	+0.3	+1.3	+1	+1.3	+1.3	Indifferent
	Control	8.3	+0.6	+0.6	+1.7	+2	+2.4	+2.3	
8H	FA	8.4	+0.3	+0.2	+0.2	+0.2	-0.1	+0.2	
	RIF	8.4	-0.5	-0.4	-0.1	-0.1	+1.4	+1.9	
	FA+RIF	8.4	-0.6	-0.3	-0.1	-0.1	-0.1	+0.9	Indifferent
	Control	8.4	+0.6	+0.7	+1.4	+1.9	+1.9	+2.5	

CIP; Ciprofloxacin, CLI; Clindamycin, DOX; Doxycycline, FA; Fusidic acid, RIF; Rifampicin, TMP/SMX; Trimethoprim/Sulfamethoxazole

* หากเชื้อมีการเพิ่มขึ้นจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายบวก (+) และหากเชื้อมีการลดลงจากจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง จะแสดงโดยใช้เครื่องหมายลบ (-)

หมายเหตุ การอ่านผล **Bactericidal activity, Synergism, Antagonism, Indifferent อ่านผลที่ 24 ชั่วโมง**

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จำนวนเชื้อ MRSA แยกตามสิ่งส่งตรวจ

จากการคัดเลือกเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557 ที่มีการเก็บเชื้อโดยการแช่แข็งอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มีจำนวน 70 ตัวอย่าง โดยเป็นเชื้อที่ได้จากสิ่งส่งตรวจทั้งที่เป็นบริเวณปลอดเชื้อ (sterile site) และบริเวณที่มีจุลชีพประจำถิ่นอยู่ (non sterile site) โดยพบว่าสิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่ คือ เสมหะ คิดเป็นร้อยละ 39.4 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีจุลชีพประจำถิ่นอยู่ แต่ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้อก่อโรคในผู้ป่วยจริงหรือไม่ เนื่องจากเป็นการนำเชื้อที่แช่แข็งไว้มาทดสอบโดยไม่ได้ทบทวนประวัติของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้มีการนำเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรคจริงมาทดสอบร่วมด้วย เนื่องจากเป็นเชื้อที่ได้จากสิ่งส่งตรวจบริเวณปลอดเชื้อแม้จะมีเพียง 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 29.6) ก็ตาม

สำหรับการขอตัวอย่างเชื้อ MRSA จากรพ.พระมงกุฎเกล้า มาทดสอบร่วมด้วยนั้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อที่ดื้อต่อยา fusidic acid เนื่องจากรายงานผลความไวของเชื้อ MRSA ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ก่อนหน้านี้ มีความไวต่อยา fusidic acid ร้อยละ 100 มาตลอด[36, 37] ซึ่งการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของการใช้ยาแบบ combination ควรมีการทดสอบในเชื้อที่มีการดื้อยาร่วมด้วย

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาและผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยา

เชื้อ MRSA ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่พบในโรงพยาบาล (Hospital-acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*; HA-MRSA) มีกลไกการดื้อยา methicillin รวมทั้งยาส่วนใหญ่ในกลุ่ม beta-lactams โดยการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยา (penicillin-binding proteins; PBPs) ซึ่งเป็นสารสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ถูกควบคุมโดยยีน *mec*A ซึ่งยีนนี้มักพบเป็นส่วนหนึ่งบนโครงสร้างทางพันธุกรรมบนโครโมโซมที่เรียกว่า staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) โดยมักมียีนอื่นๆ ที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่มอยู่บน SCC*mec* ด้วย ส่งผลให้เชื้อ MRSA ดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่มอื่นอีกหลายกลุ่มไปด้วย เช่น clindamycin, macrolides, fluoroquinolones, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) เป็นต้น[38]

ในปัจจุบันพบว่ามีเชื้อ MRSA อีกชนิดหนึ่ง คือเชื้อ MRSA ในชุมชน (Community-acquired MRSA; CA-MRSA) ซึ่งดื้อต่อยากลุ่ม beta-lactams เหมือนกับ HA-MRSA แต่เนื่องจาก

SCC*mec* ของ CA-MRSA มีขนาดเล็กกว่าของ HA-MRSA ทำให้มียีนควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพน้อยกว่า ส่งผลให้เชื้อ CA-MRSA ยังคงไวต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นยา clindamycin, fluoroquinolones, tetracycline และ TMP/SMX ทำให้ยาเหล่านี้เป็นตัวเลือกสำหรับรักษาการติดเชื้อ CA-MRSA ได้ โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีอุบัติการณ์การติดเชื้อชนิดนี้ค่อนข้างสูง[39]

ในประเทศไทยยังมีอุบัติการณ์ของเชื้อ CA-MRSA ต่ำ[40, 41] ส่วนใหญ่การติดเชื้อ MRSA ยังเป็นการติดเชื้อจากโรงพยาบาล (HA-MRSA) ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อมักดื้อต่อยา clindamycin, fluoroquinolones, tetracycline และ TMP/SMX แต่ผลความไวที่ได้จากงานวิจัยนี้พบข้อแตกต่างไปจากหลักการเดิม คือเชื้อ MRSA ที่พบในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ร้อยละ 47.89 ไวต่อยา doxycycline โดยมีเพียงไม่ถึงร้อยละ 5 ที่ไวต่อยา clindamycin และ ciprofloxacin ในขณะที่ร้อยละ 91.55 ยังคงไวต่อยา TMP/SMX เทียบเท่ากับยา fusidic acid ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลความไวจากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ ที่พบว่าเชื้อ MRSA มีความไวต่อยา TMP/SMX สูงถึงประมาณร้อยละ 80[29] จากรายงานในช่วงปี พ.ศ. 2541-2553 เชื้อ MRSA ไวต่อยา TMP/SMX ต่ำกว่าร้อยละ 50 [42-45] โดยมีความไวของเชื้อสูงขึ้นเรื่อยๆ จนมากกว่าร้อยละ 80 ในปี พ.ศ. 2558[46] ซึ่งการที่เชื้อกลับมามีความไวต่อยาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อาจอธิบายได้จากการที่มีการใช้ยาทางคลินิกลดลงก็เป็นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อร้อยละ 91.55 ไวต่อยา rifampicin เช่นเดียวกัน ซึ่งถือว่ามีความไวต่อยามาก แม้ไม่สามารถวิเคราะห์แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากไม่มีข้อมูลความไวของเชื้อ MRSA ต่อยา rifampicin ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์มาก่อน

นอกจากงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาโดยการหาค่า MIC แล้ว ยังศึกษาผลของ inoculums ต่อความไวของเชื้อต่อยาอีกด้วย ซึ่งกำหนดปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/ml ตามปริมาณเชื้อที่พบในหนองจากผู้ป่วยที่มีฝีหรือมีการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน[47] แม้จะทำการทดสอบกับเชื้อเพียง 11 สายพันธุ์ แต่ผลการทดสอบก็ไปในแนวทางเดียวกันคือพบว่าปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น ส่งผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของยาที่นำมาทดสอบทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็น fusidic acid, clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, TMP/SMX และ rifampicin โดยมีค่า MIC สูงขึ้นมาก ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาผลของ inoculums ต่อการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid เดี่ยว[1] หากนำยาเหล่านี้ไปใช้ในกับการติดเชื้อที่มีจำนวนเชื้อมาก เช่น บริเวณที่มีหนอง จะส่งผลให้ยาออกฤทธิ์ได้ไม่ดี แม้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการแสดงว่าเชื้อไวต่อยามากเพียงใดก็ตาม

ดังนั้นในการรักษาการติดเชื้อที่มีการคั่งของหนองหรือมีเชื้อจำนวนมาก การผ่าตัดหรือการทำความสะอาดบริเวณที่มีการติดเชื้อเพื่อลดจำนวนเชื้อจึงเป็นวิธีการรักษาที่สำคัญควบคู่กับการให้ยาต้านจุลชีพเสมอ และอาจจำเป็นต้องใช้ยาอย่างน้อย 2 ชนิดร่วมกันในบางกรณี

การทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill

จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ด้วยวิธี Time-kill จะเห็นได้ว่ายา fusidic acid ไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC หรือเหนือกว่าค่า MIC เป็น 100 เท่า ก็แทบไม่สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้เลยในช่วง 12 ชั่วโมงแรก แสดงให้เห็นว่ายาออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ช้า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) ของยา fusidic acid ในอดีต[11] นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบข้อสังเกตที่ว่ากรณีความเข้มข้นของยาอยู่เหนือค่า MIC น้อยกว่า 10 เท่า เชื้อกลับมาแบ่งตัวจนมีจำนวนเพิ่มขึ้นได้หลังจากชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยา fusidic acid ให้มากกว่าค่า MIC ตั้งแต่ 10 เท่า, 50 เท่า ไปจนถึง 100 เท่านั้น สามารถควบคุมไม่ให้เชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นได้ แม้จะไม่สามารถลดจำนวนเชื้อจนหมดไปได้ก็ตาม

ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamics) หลายๆ การศึกษา เช่น การศึกษาของ Okusanya OO และคณะ[14], Tsuji BT และคณะ[13] รวมทั้ง Bulitta JB และคณะ[15] ที่พบว่ายา fusidic acid ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ช้า และความเข้มข้นของยาต้องสูงเพียงพอจึงจะมีผลป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้ จึงเป็นที่มาของการเปลี่ยนแปลงวิธีการบริหารยา คือควรให้ยาแบบ loading dose ในวันแรกแล้วจึงให้ยาในขนาดยาปกติที่เหมาะสมต่อไปเพื่อให้ระดับยาเข้าสู่ steady state ได้ในวันแรกและสูงเพียงพอที่จะลดจำนวนเชื้อได้อย่างรวดเร็ว จึงยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ MRSA ในภายหลังได้ โดยพบว่าการเพิ่มขนาดยามี maximum effect เช่นเดียวกับผลจากงานวิจัยนี้ ซึ่งเห็นได้จากการเพิ่มความเข้มข้นของให้สูงกว่าค่า MIC ตั้งแต่ 10 เท่า 50 เท่า ไปจนถึง 100 เท่า พบว่ายา fusidic acid ทั้ง 3 ความเข้มข้นนี้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้ยาขนาดสูงเกินไปจึงไม่ได้ประโยชน์เพิ่มขึ้น แต่เสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์เพิ่มขึ้นแทน จึงเป็นที่มาของการศึกษาขนาดยาที่เหมาะสมของยา fusidic acid ในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ตามมา เช่น acute bacterial skin and skin structure infections[7]

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard และ Time kill

ก่อนที่จะมีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์ของยา fusidic acid อย่างจริงจังเช่นในปัจจุบัน[13-15] มีเพียงรายงานคุณสมบัติทางเภสัชพลศาสตร์ของยา fusidic acid ว่ามีการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (bacteriostatic activity) โดยออกฤทธิ์ได้ช้า[11] จึงมีโอกาสดื้อยาได้สูง ดังนั้นการใช้ยา fusidic acid ในทางคลินิกส่วนใหญ่จึงอยู่ในรูปแบบ combination therapy คือใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพอื่น เช่น ยา rifampicin, TMP/SMX,

doxycycline, clindamycin เป็นต้น[48] โดยส่วนใหญ่ใช้ยา fusidic acid ในขนาดปกติ 500 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง โดยไม่มี loading dose[9]

แม้เชื้อ MRSA ในงานวิจัยนี้ ไวต่อยา fusidic acid มากถึงร้อยละ 91.55 แต่การใช้ยา fusidic acid เพียงชนิดเดียวโดยไม่มี loading dose มีการออกฤทธิ์ได้ช้าจากการทดสอบด้วยวิธี time kill และเชื้อกลับมาเพิ่มจำนวนขึ้นในภายหลังซึ่งอาจเกิดจากการดื้อยาได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบฤทธิ์ของการใช้ยา fusidic acid แบบ combination therapy เพื่อเป็นข้อมูลทางเลือกสำหรับการรักษาการติดเชื้อที่กระดูกและข้อ เนื่องจากการให้ยา fusidic acid ชนิดเดียวโดยให้ loading dose นั้นยังจำกัดอยู่ในรายงานกรณีศึกษาในผู้ป่วยเพียง 1 ราย[10]

งานวิจัยนี้ทดสอบการเสริมฤทธิ์ของยา 2 ชนิดโดยใช้ยา fusidic acid เป็นยาหลัก ทดสอบร่วมกับยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, TMP/SMX และ rifampicin เป็นคู่ๆ โดยทดสอบด้วยวิธี checkerboard พบว่าคู่ยา fusidic acid และยา doxycycline ให้ผล synergism มากที่สุด ตามด้วยยา rifampicin, TMP/SMX และ clindamycin ตามลำดับ โดยไม่พบผล synergism เมื่อทดสอบยา fusidic acid คู่กับยา ciprofloxacin โดยส่วนใหญ่การทดสอบจะให้ผลเป็น indifferent และ additive มีเพียงเชื้อ 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่พบ antagonistic จากการทดสอบยา fusidic acid คู่กับยา TMP/SMX จากนั้นนำคู่ยาที่พบผล synergism มาทดสอบด้วยวิธี time kill โดยกำหนดความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดให้ใกล้เคียงกับระดับยาในเลือด

ผลการทดสอบคู่ยาที่เสริมฤทธิ์ด้วยวิธี time kill พบว่า คู่ยา fusidic acid-clindamycin ให้ผล indifferent ทั้ง 3 สายพันธุ์, คู่ยา fusidic acid-doxycycline ให้ผล indifferent 3 สายพันธุ์ และ antagonist 3 สายพันธุ์, คู่ยา fusidic acid-TMP/SMX ให้ผล indifferent 2 สายพันธุ์ ในขณะที่คู่ยา fusidic acid-rifampicin ให้ผล synergism, indifferent และ antagonist อย่างละ 1 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ยา 2 ชนิดร่วมกันสามารถลดจำนวนเชื้อที่ 48 ชั่วโมงได้อีกด้วย

จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ายา doxycycline เสริมฤทธิ์กับยา fusidic acid มากที่สุดจากการทดสอบด้วยวิธี checkerboard ยาคู่นี้จึงอาจเป็นยาทางเลือกที่นำมาใช้ทดแทนยา rifampicin ในผู้ป่วยที่ไม่สามาถใช้ยา rifampicin ได้ ซึ่งยา doxycycline เองก็เป็นยาที่มีคุณสมบัติในการแพร่กระจายเข้าสู่กระดูกได้ดีเช่นเดียวกัน และเมื่อทดสอบด้วยวิธี time kill ก็เป็นยาคู่ที่ให้ผล bactericidal เช่นเดียวกับคู่ของยา fusidic acid-rifampicin โดยยาคู่อื่นๆ ไม่พบฤทธิ์ bactericidal เมื่อใช้ยาร่วมกัน แต่พบได้ในการใช้ยา fusidic acid เดี่ยว เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า[13, 14] ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ความเข้มข้นของยา fusidic acid สูงเพียงพอ ในขณะที่ยาชนิดอื่นใช้ความเข้มข้นต่ำมาทดสอบ

การทดสอบผลของ inoculums ต่อการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของยา fusidic acid แบบ combination therapy ด้วยวิธี checkerboard และ Time kill

ในบริเวณที่มีการติดเชื้อ มักมีเชื้อจำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณที่มีหนอง ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้ไม่ดี ซึ่งทราบจากค่า MIC ที่เพิ่มขึ้นของยาทุกชนิดในงานวิจัยนี้ งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของยา fusidic acid แบบ combination therapy โดยทดสอบร่วมกับยา clindamycin, ciprofloxacin, doxycycline, TMP/SMX และ rifampicin เป็นคู่ๆ โดยทดสอบด้วยวิธี checkerboard เช่นเดิม แต่จำลองการเกิด inoculums โดยใช้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/ml พบว่า คู่ยา fusidic acid-doxycycline ให้ผล synergism มากที่สุดเช่นเดิม โดยไม่พบการเกิด antagonist เลย โดยคู่ยาอีก 4 ชนิดที่เหลือพบการเกิด antagonist ตั้งแต่ 3-6 สายพันธุ์ สำหรับคู่ยา fusidic acid-rifampicin และคู่ยา fusidic acid-TMP/SMX พบผล synergism จำนวน 5 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ และคู่ยา fusidic acid-clindamycin ก็ให้ผล synergism ใน 3 สายพันธุ์ เท่ากับคู่ยา fusidic acid-ciprofloxacin เช่นเดียวกัน

เมื่อนำคู่ยาที่เสริมฤทธิ์มาทดสอบด้วยวิธี time kill โดยใช้เชื้อจำนวน 10^8 cfu/ml เห็นได้ชัดว่ายา fusidic acid เดี่ยว ไม่มีฤทธิ์ bactericidal อีกต่อไป แต่เมื่อใช้ร่วมกับยา doxycycline พบว่ามีฤทธิ์ synergism และสามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่า 3 log10 cfu/ml (bactericidal activity) ในขณะที่ยาอีก 4 คู่ให้เพียงผล indifferent เท่านั้น อย่างไรก็ตามการให้ยาร่วมกัน 2 ชนิดยังช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้จนถึง 48 ชั่วโมงอีกด้วย

ดังนั้นจากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าเมื่อมีปริมาณเชื้อสูงขึ้นส่งผลให้ยา fusidic acid ออกฤทธิ์ได้น้อยลง การใช้ยา doxycycline ร่วมด้วยน่าจะเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการใช้ทางคลินิกแทนยา rifampicin เนื่องจากการศึกษาของ Pushkin R และคณะ[22] พบว่ายา rifampicin ทำให้ระดับยา fusidic acid ลดลงได้ประมาณร้อยละ 50 จนอาจส่งผลทำให้การรักษาล้มเหลวได้ จึงยุติการศึกษาก่อนกำหนด ดังนั้นการใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยา rifampicin จึงต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อรับรองประสิทธิภาพในการรักษา แม้จะมีรายงานของ Aboltins et al. และคณะ[9] ที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ยาทั้งสองร่วมกันช่วยให้ประสบความสำเร็จในการรักษาได้[9]

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ที่มีปริมาณเชื้อมาก ควรผ่าตัดหรือทำความสะอาดตำแหน่งที่มีการติดเชื้อร่วมด้วยเสมอ เพื่อช่วยลดจำนวนเชื้อ และช่วยให้ยาต้านจุลชีพกลับมามีประสิทธิภาพในการรักษาเช่นเดิม

บทสรุป

จากผลการวิจัยทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าการออกฤทธิ์ของยา fusidic acid ขึ้นกับความไวของเชื้อและปริมาณของเชื้อก่อโรค (inoculums) การใช้ยาความเข้มข้นสูงขึ้นช่วยให้ยาออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น การใช้ยา fusidic acid ร่วมกับยาอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา doxycycline ช่วยเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแม้อยู่ในภาวะที่มีเชื้อปริมาณมาก ยา doxycycline จึงอาจเป็นยาทางเลือกสำหรับการรักษาการติดเชื้อที่กระดูกและข้อที่ใช้แทนยา rifampicin ได้

บรรณานุกรม

1. Fantin B, Leclercq R, Duval J, Carbon C. Fusidic acid alone or in combination with vancomycin for therapy of experimental endocarditis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(11):2466-9.
2. Drugeon HB, Caillon J, Juvin ME. In-vitro antibacterial activity of fusidic acid alone and in combination with other antibiotics against methicillin-sensitive and -resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 1994;34(6):899-907.
3. Farber BF, Yee YC, Karchmer AW. Interaction between rifampin and fusidic acid against methicillin-resistant coagulase-positive and -negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 1986;30(1):174-5.
4. Foldes M, Munro R, Sorrell TC, Shanker S, Toohey M. In-vitro effects of vancomycin, rifampicin, and fusidic acid, alone and in combination, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 1983;11(1):21-6.
5. Roder BL, Gutschik E. In-vitro activity of ciprofloxacin combined with either fusidic acid or rifampicin against Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 1989;23(3):347-52.
6. Ertek M, Yazgi H, Erol S, Altoparlak U. Demonstration of in vitro antagonism between fusidic acid and quinolones. J Int Med Res. 2002;30(5):525-8.
7. Craft JC, Moriarty SR, Clark K, Scott D, Degenhardt TP, Still JG, et al. A randomized, double-blind phase 2 study comparing the efficacy and safety of an oral fusidic acid loading-dose regimen to oral linezolid for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. Clin Infect Dis. 2011;52 Suppl 7:S520-6.
8. Chang SC, Hsieh SM, Chen ML, Sheng WH, Chen YC. Oral fusidic acid fails to eradicate methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and results in emergence of fusidic acid-resistant strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;36(2):131-6.

9. Aboltins CA, Page MA, Buising KL, Jenney AW, Daffy JR, Choong PF, et al. Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. Clin Microbiol Infect. 2007;13(6):586-91.
10. Wolfe CR. Case report: treatment of chronic osteomyelitis. Clin Infect Dis. 2011;52 Suppl 7:S538-41.
11. Turnidge J. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. Int J Antimicrob Agents. 1999;12 Suppl 2:S23-34.
12. Verbist L. The antimicrobial activity of fusidic acid. J Antimicrob Chemother. 1990;25 Suppl B:1-5.
13. Tsuji BT, Okusanya OO, Bulitta JB, Forrest A, Bhavnani SM, Fernandez PB, et al. Application of pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and the justification of a novel fusidic acid dosing regimen: raising Lazarus from the dead. Clin Infect Dis. 2011;52 Suppl 7:S513-9.
14. Okusanya OO, Tsuji BT, Bulitta JB, Forrest A, Bulik CC, Bhavnani SM, et al. Evaluation of the pharmacokinetics-pharmacodynamics of fusidic acid against Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes using in vitro infection models: implications for dose selection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(1):101-11.
15. Bulitta JB, Okusanya OO, Forrest A, Bhavnani SM, Clark K, Still JG, et al. Population pharmacokinetics of fusidic acid: rationale for front-loaded dosing regimens due to autoinhibition of clearance. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):498-507.
16. Spellberg B, Lipsky BA. Systemic antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults. Clin Infect Dis. 2012;54(3):393-407.
17. Still JG, Clark K, Degenhardt TP, Scott D, Fernandes P, Gutierrez MJ. Pharmacokinetics and safety of single, multiple, and loading doses of fusidic acid in healthy subjects. Clin Infect Dis. 2011;52 Suppl 7:S504-12.
18. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta JP, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society

of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). Eur Heart J. 2015;36(44):3075-128.

19. Roth B. Penetration of parenterally administered rifampicin into bone tissue. Chemotherapy. 1984;30(6):358-65.
20. Fraimow HS. Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis. Semin Plast Surg. 2009;23(2):90-9.
21. Mehta JB, Shantaveerapa H, Byrd RP, Jr., Morton SE, Fountain F, Roy TM. Utility of rifampin blood levels in the treatment and follow-up of active pulmonary tuberculosis in patients who were slow to respond to routine directly observed therapy. Chest. 2001;120(5):1520-4.
22. Pushkin R, Iglesias-Ussel MD, Keedy K, MacLauchlin C, Mould DR, Berkowitz R, et al. A Randomized Study Evaluating Oral Fusidic Acid (CEM-102) in Combination With Oral Rifampin Compared With Standard-of-Care Antibiotics for Treatment of Prosthetic Joint Infections: A Newly Identified Drug-Drug Interaction. Clin Infect Dis. 2016;63(12):1599-604.
23. Kaka AS, Rueda AM, Shelburne SA, 3rd, Hulten K, Hamill RJ, Musher DM. Bactericidal activity of orally available agents against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 2006;58(3):680-3.
24. Sulfamethoxazole/Trimethoprim. In: In Depth Answers [database on the Internet]. Ann Arbor (MI): Truven Health Analytics. 2017 [cited 10 June 2017]. Available from: www.micromedexsolutions.com.
25. Joos B, Blaser J, Opravil M, Chave JP, Lüthy R. Monitoring of co-trimoxazole concentrations in serum during treatment of pneumocystis carinii pneumonia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995;39(12):2661-6.
26. Enoch DA, Karas JA, Aliyu SH. Oral antimicrobial options for the treatment of skin and soft-tissue infections caused by meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the UK. International Journal of Antimicrobial Agents. 2009;33(6):497-502.
27. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the

treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011;52(3):e18-55.

28. Ciprofloxacin. In: In Depth Answers [database on the Internet]. Ann Arbor (MI): Truven Health Analytics. 2017 [cited 10 June 2017]. Available from: www.micromedexsolutions.com.
29. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Percentage of susceptible bacteria, 55 hospitals , Jan - Dec 2016. 2017 [10 June 2017]; Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/.
30. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Roiron R, Groulier P, Raoult D. Oral treatment of Staphylococcus spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. J Antimicrob Chemother. 1997;39(2):235-40.
31. Clindamycin. In: In Depth Answers [database on the Internet]. Ann Arbor (MI): Truven Health Analytics. 2017 [cited 10 June 2017]. Available from: www.micromedexsolutions.com.
32. Curis E, Pestre V, Jullien V, Eyrolle L, Archambeau D, Morand P, et al. Pharmacokinetic variability of clindamycin and influence of rifampicin on clindamycin concentration in patients with bone and joint infections. Infection. 2015;43(4):473-81.
33. Bouazza N, Pestre V, Jullien V, Curis E, Urien S, Salmon D, et al. Population pharmacokinetics of clindamycin orally and intravenously administered in patients with osteomyelitis. Br J Clin Pharmacol. 2012;74(6):971-7.
34. Ruhe JJ, Monson T, Bradsher RW, Menon A. Use of long-acting tetracyclines for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: case series and review of the literature. Clin Infect Dis. 2005;40(10):1429-34.
35. Doxycycline. In: In Depth Answers [database on the Internet]. Ann Arbor (MI): Truven Health Analytics. 2017 [cited 10 June 2017]. Available from: www.micromedexsolutions.com.
36. Hortiwakul R, Chayakul P, Ingviya N. In vitro activities of linezolid, vancomycin, fosfomycin and fusidic acid against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) J Infect Dis Antimicrob Agents. 2004;21:7-10.

37. Hortiwakul T, Siripaitoon P, Ingviriya N. In Vitro Activities of Vancomycin, Fosfomycin, Fusidic Acid and Linezolid Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Year 2011-2012. Songkla Med J 2014;32(4):231-6.
38. Maltezou HC, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Int J Antimicrob Agents. 2006;27(2):87-96.
39. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Dellinger EP, Goldstein EJ, Gorbach SL, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2014;59(2):e10-52.
40. Mekviwattanawong S, Srifuengfung S, Chokepaibulkit K, Lohsiriwat D, Thamlikitkul V. Epidemiology of Staphylococcus aureus infections and the prevalence of infection caused by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitalized patients at Siriraj Hospital. J Med Assoc Thai. 2006;89 Suppl 5:S106-17.
41. Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR, et al. Spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. J Antimicrob Chemother. 2011;66(5):1061-9.
42. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Percentage of susceptible bacteria, 32 Hospitals , Jan - Dec 2000. 2001 [2 June 2017]; Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms.html.
43. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Antibiogram 1999. 2000 [2 June 2017]; Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms/anti1999.html.
44. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Antibiogram 1998. 1999 [2 June 2017]; Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms/anti1998.html.
45. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Percentage of susceptible bacteria, 45 hospitals , Jan - Dec 2010. 2011 [2 June 2017]; Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms.html.

46. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. Percentage of susceptible bacteria, 65 hospitals , Jan - Dec 2015. 2016 [2 June 2017]; Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms.html.
47. Konig C, Simmen HP, Blaser J. Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid--implications for bactericidal activity of antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1998;42(2):227-32.
48. Wang JL, Tang HJ, Hsieh PH, Chiu FY, Chen YH, Chang MC, et al. Fusidic acid for the treatment of bone and joint infections caused by meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. 2012;40(2):103-7.

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ผลการวิจัยที่ได้จากการศึกษานี้เป็นเพียงการทดสอบแบบ In vitro ซึ่งยังมีข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับการนำไปใช้ทางคลินิกสำหรับรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA บริเวณกระดูกและข้อ ดังนั้นจึงควรเก็บตัวอย่างเชื้อที่มาจากบริเวณกระดูกและข้อ เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของยาเพิ่มเติม รวมทั้งควรทดสอบความสามารถในการสร้าง biofilm ของเชื้อเหล่านี้ เพื่อแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของยาได้ชัดเจนมากขึ้น

นอกจากนี้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อกำหนดขนาดยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมสำหรับการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA บริเวณกระดูกและข้อเป็นลำดับถัดไป เพื่อให้มีข้อมูลสนับสนุนมากขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ยาในทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยแก่ผู้ป่วย

ภาคผนวก

ประวัติคณะผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวสุทธิพร ภัทรชยากุล

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Sutthiporn Pattharachayakul
2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

   ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
   หมายเลขโทรศัพท์ 074-288871-2, 0894660988
   โทรสาร 074-428222
   ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail): sutthiporn@pharmacy.psu.ac.th
4. **ประวัติการศึกษา**
   - เภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
   - Doctor of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, USA
   - Certified ASHP accredited Residency in Pharmacy Practice
     Certified Specialized Residency in Infectious Disease Pharmacotherapy
     Certified Fellow in Infectious Disease Pharmacotherapy
     University of Illinois at Chicago, USA
5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)** สาขาโรคติดเชื้อ
6. **ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่**

   1. **Pattharachayakul S**, Neuhauser MM, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*: activity of single versus combination agents. J Antimicrob Chemother. 2003;51(3):737-9.
   2. Cannon JP, Fiscella R, **Pattharachayakul S**, Garey KW, De Alba F, Piscitelli S, et al. Comparative toxicity and concentrations of intravitreal amphotericin B formulations in a rabbit model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(5):2112-7.
   3. Phumipamorn S, Pongwecharak J, Soorapan S, **Pattharachayakul S**. Effects of the pharmacist's input on glycaemic control and cardiovascular risks in Muslim diabetes. Prim Care Diabetes. 2008;2(1):31-7.

4. Santimaleeworagun W, Wongpoowarak P, Chayakul P, **Pattharachayakul S**, Tansakul P, Garey KW. In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomycin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011;42(4):890-900.
5. Santimaleeworagun W, Wongpoowarak P, Chayakul P, **Pattharachayakul S**, Tansakul P, Garey KW. Clinical outcomes of patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with single or combination antibiotic therapy. J Med Assoc Thai. 2011;94(7):863-70.
6. Santimaleeworagun W, **Pattharachayakul S**, Chusri S, Chayagul P. Atazanavir induced first degree atrioventricular block and ventricular tachycardia: a case report. J Med Assoc Thai. 2013;96(4):501-3.
7. Katip W, Jaruratanasirikul S, **Pattharachayakul S**, Wongpoowarak W, Jitsurong A. Initial dosage regimen of vancomycin for septic shock patients: a pharmacokinetic study and Monte Carlo simulation. J Med Assoc Thai. 2014;97(11):1209-19.
8. Chusri S, McNeil EB, Hortiwakul T, Charernmak B, Sritrairatchai S, Santimaleeworagun W, **Pattharachayakul S**, et al. Single dosage of doxycycline for prophylaxis against leptospiral infection and leptospirosis during urban flooding in southern Thailand: a non-randomized controlled trial. J Infect Chemother. 2014 Nov;20(11):709-15.
9. Rungprai D, Jaruratanasirikul S, Wongpoowarak W, **Pattharachayakul S**, Wanakamanee U, Dandecha P, et al. Vancomycin Dosing Regimen by Monte Carlo Simulation in Patients on Intermittent High-Efficiency Hemodialysis (HEHD). J Med Assoc Thai. 2015;98(6):606-15.
10. Katip W, Jaruratanasirikul S, **Pattharachayakul S**, Wongpoowarak W, Jitsurong A, Lucksiri A. The pharmacokinetics of vancomycin during the initial loading dose in patients with septic shock. Infect Drug Resist. 2016;22(9):253-60.

<u>ผู้ร่วมวิจัยท่านที่ 1</u>

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวดิษยา วัฒนาไพศาล
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Dissaya Wattanapaisal
2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์
3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

   ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
   หมายเลขโทรศัพท์ 074-288871-2 โทรสาร 074-428222
   ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail): dissaya@pharmacy.psu.ac.th
4. **ประวัติการศึกษา**
   - เภสัชศาสตร์บัณฑิต (การบริบาลทางเภสัชกรรม) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
   - ประกาศนียบัตรเภสัชกรประจำบ้าน (Generalized residency in pharmacotherapy) วิทยาลัยเภสัชบำบัดแห่งประเทศไทย
5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)** สาขาโรคติดเชื้อ
6. **ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่** -

<u>ผู้ร่วมวิจัยท่านที่ 2</u>

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางธนภร หอทิวากุล
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Thanaporn Hortiwakul
2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** นักวิทยาศาสตร์ ชำนาญการพิเศษ
3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

   สาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
   คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
   โทรศัพท์ 0-7445-1451
   ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail): hratri@medicine.psu.ac.th
4. **ประวัติการศึกษา**
   - วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตสงขลา
   - วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี) คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
   - Training course (Drug Susceptibility) Schering-plough Research Institute, NY, USA

- Training & Research (ESBL detection, PFGE) Innsbruck Hospital, Innsbruck, Austria
- Training in Molecular Analysis of E.coli, Miyazaki Hospital, Japan

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) สาขาจุลชีววิทยา

6. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. สืบสาย กฤษณะพันธ์, สุเทพ จารุรัตนศิริกุล, **ราตรี วั่นสิทธ์** และ จินตนา วุฑฒยากร การสำรวจแอนติบอดีในซีรั่มต่อเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* ในประชากรภาคใต้ สงขลานครินทร์เวชสาร 2529;4(4):315-8.
2. Appassakij H, Silpapojakul K, **Wonsit R**, Pornpakul M. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area. Am J Trop Med Hyg. 1990;42(3):248-53.
3. Koranantakul O, Lekhakula O, **Wonsit R**, Korantakul Y. Case report "Cutaneous myiasis of vulva caused by the muscoid fly" (Chrysomyia Genus). South East Asian J Trop Med Public Health. 1991;22(3);458-60.
4. **Wonsit R**, Thammapalerd N, Tharavanij S. Enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of *Entamoeba histolytica* antigens in faecal specimens. Tran Roy Soc Trop Med Hyg. 1992;86:166-9.
5. Jaruratanasirikul S, **Hortiwakul R.** The inhibitory effect of Amiodarone on Dextromethorphan-O-Demethylation in Human and rat Liver Microsome. J Pharm Phamacol. 1994;46:933-5.
6. Appassakij H, Silpapojakul K, **R. Hortiwakul**, Wuttayakul J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human Leptospirosis. Am J Trop Med Hyg. 1995;52(4):340-43.
7. **Hortiwakul R**, Chayakul P. Activity of adenosine deaminase in pleural fluid for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. Songklanakarind Med J. 1996;14(1):19-23.

8. Jaruratanasirikul S, **Hortiwakul R**, Tantisarasart T, Phuenpathom N, Tassanasunthornwong S. Distribution of Azithromycin into Brain Tissue, Cerebrospinal fluid, and Aqueous Humor of the Eye. Antimicrobial Agents and Chemo. 1996;40(3):825-6.
9. Ratanalert S, **Wonsit R**, Piratvisuth T, Ovartlarnporn B, The specificity and sensitivity of serum immunoassay for anti-*H. pylori* antibodies: report of a preliminary result. J of Gastroenterology and Hepatology 1999;14(sppl):S71.
10. Jareoncharsri P, Jaruratanasirikul S, Voraprayoon S, **Hortiwakul R**, et al. Distribution of Azithromycin in sinonasal mucosal tissue in patients with chronic sinusitis. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2000;17(2):59-63.
11. Chayakul P, **Hortiwakul R.** In vitro Activity of Quinopristin/Dalfopristin, SCH 27899 (an Everninomicin), vancomycin and fosfomycin against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2000;17(2):69-73.
12. **Hortiwakul R**, Chayakul P, Vorachit M, et al. Mechanism of Aminoglycoside Resistant in Thailand. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2000;17(2):75-81.
13. Chayakul P, **Hortiwakul R**, Yipintsoi T, Ingviya N. Viridans Streptococci in the oral flora of the patients at risk for infective endocarditis: species and penicillin susceptibilities. J Med Assoc Thai 2002; 85:825-30.
14. Ingviya N, **Hortiwakul R**, Chayakul P, Thamjarungwong B. Prevalence and susceptibility pattern of *K. pneumoniae* and *E.coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Songklanagarind Hospital, Thailand. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2003;20:127-34.
15. **Hortiwakul R**, Chayakul P, Ingviya N. In vitro Activities of linezolid, vancomycin , fosfomycin and fusidic acid against Methicillin Resistant

Staphylococcus aureus (MRSA). J Infect Dis Antimicrob Agents. 2004;21:1-4.

16. Chayakul P, **Hortiwakul R**. In vitro Activity of penicillin G, cefotaxime, fosfomycin, fusidic acid and vancomycin against *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2004;21:41-46.
17. **Hortiwakul R**, Keeratichananont S, Chayakul P. The use of adenosine deaminase activity (ADA) for the diagnosis of tuberculous peritonitis. Songklanakarind Med J. 2005;23(2):87-92.
18. **Hortiwakul R**, Chayakul P, Ingviya N. In vitro Activities cefminox and other beta lactam antibiotics against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamases–producing *K. pneumoniae* and *E.coli*. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2006;23:9-14.
19. Chayakul P, **Hortiwakul R**, Ingviya N, Chayakul V. Species distribution and antimicrobial susceptibility of Enterococci in Hospitalized patients in Southern Thailand. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2007;24:49-54.
20. **Hortiwakul T,** Chayakul P, Ingviya N, Chayakul V. In vitro Activities of Colistin, Fosfomycin, and Piperacillin/tazobactam against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Songklanagarind Hospital,Thailand. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2009;26:91-6.
21. **Hortiwakul T**, Nagit S, Chusri S, Silpapojakul K. Nosocomial bloodstream infection in Songklanagarind Hospital : outcome and factors influencing prognosis. J Med Assoc Thai. 2012;95:170-4.
22. Chusri S, **Hortiwakul T,** Silpapojakul K, Siriyasatien P. Case report: consecutive cutaneous and visceral leishmania manifestations involving a novel *Leishmania* species in two patients in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:76-80.
23. Chusri S, Sritrairatanachai S, **Hortiwakul T**, Charoenmak B, Silpapojakul K. Leptospirosis among River Water Rafter in Satoon, Southern Thailand. J Med Assoc Thai. 2012;95:874 -7.

24. Chusri S, **Hortiwakul T**, Charoenmak B, Silpapojakul K. Outcome of patients with melioidosis treated with cotrimoxazole alone for eradication therapy. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:927-32.
25. Charoenmak B, Siripaitoon P, **Hortiwakul T**. The uptake rate and patient perception of cervical screening in HIV-infected women attending Infectious Disease, Medicine Clinic, Songklanagarind Hospital Thailand. Songkla Med J. 2013;31:1-9.
26. Chemoh W, Sawangjaroen N, Nissapatorn V, Suwanrath C, Chandeying V, **Hortiwakul T**, et al Toxoplasma gondii infection: What is the real situation? Exp Parasitol. 2013;135(4):685-9.
27. Chusri S, Siripaitoon P, Silpapojakul K, **Hortiwakul T**, Charoenmak B, Nisalak A, et al. Kinetics of Chikungunya Infections during an Outbreak in Southern Thailand, 2008–2009. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(3):410-17.
28. **Hortiwakul T**, Siripaitoon P, Ingviya N. In vitro Activities of vancomycin, fosfomycin, fusidic acid and linezolid against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),year 2011-2012. Songkla Med J. 2014;32:231-6.
29. Chusri S, McNeil EB, **Hortiwakul T**, Charernmak B, Sritrairatchai S, Santimaleeworagun W, et al. Single dosage of doxycycline for prophylaxis against leptospiral infection and leptospirosis during urban flooding in southern Thailand: a non-randomized controlled trial. J Infect Chemother. 2014;20(11):709-15.
30. Phumee A, Chusri S, Kraivichian K, Wititsuwannakul J, **Hortiwakul T**, Thavara U, et al. Multiple cutaneous nodules in an HIV-infected patient. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Dec 11;8(12):e3291.
31. Chemoh W, Sawangjaroen N, Siripaitoon P, Andiappan H, **Hortiwakul T**, Sermwittayawong N, et al. Toxoplasma gondii - Prevalence and Risk Factors in HIV-infected Patients from Songklanagarind Hospital, Southern Thailand. Front Microbiol. 2015;25(6):1304.

32. Siriyasatien P, Chusri S, Kraivichian K, Jariyapan N, **Hortiwakul T**, Silpapojakul K, et al. Early detection of novel Leishmania species DNA in the saliva of two HIV-infected patients. BMC Infect Dis. 2016;24(16):89.
33. Churuangsuk C, Chusri S, **Hortiwakul T**, Charernmak B, Silpapojakul K. Characteristics, clinical outcomes and factors influencing mortality of patients with melioidosis in southern Thailand: A 10-year retrospective study.