หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุและวิธีทดลอง

วัสดุ

1. เชื้อ *Escherichia coli*

1.1 เชื้อมาตรฐาน

1.1.1 *Escherichia coli* ATCC 25922 ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานสำหรับการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) โดยทำหน้าที่เป็น control strain ตรวจสอบความถูกต้องของความเข้มข้นของยาในจานเพาะเชื้อแต่ละจาน

เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้มาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

1.1.2 *Escherichia coli* W667 เป็นเชื้อ *E. coli* ที่มีลักษณะพิเศษคือเป็น non-lactose fermenter และดื้อต่อยา Streptomycin ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน สำหรับการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อยา โดยทำหน้าที่เป็น recipient cell รับการถ่ายทอด plasmid จาก *E. coli* ตัวอย่าง

เชื้อ *E. coli* W 667 ได้มาจาก Dr. Aoki มหาวิทยาลัย Miyazaki ประเทศญี่ปุ่น

เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานแต่ละชนิดจะเตรียมเป็น stock cultures โดยการกระจายเชื้อใน sterile skimmed milks จากนั้นแบ่งสารแขวนตะกอนของเชื้อบรรจุในหลอดแก้วขนาด 1 มล. นำหลอดแก้วแต่ละหลอดแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ

1.2 เชื้อ *Escherichia coli* ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดสอบจะทำการเก็บจากกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่ม ซึ่งรายละเอียดและจำนวนเชื้อที่เก็บในแต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงแหล่งที่มาและจำนวนสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

แหล่งที่มาของเชื้อ	จำนวนสายพันธุ์	หมายเหตุ
คนปกติ		
อายุ แรกเกิด-18 เดือน	10	เก็บเชื้อจากสถานรับเลี้ยงเด็กพงษ์แก้วเนสเซอรี่ กรุงเทพ
อายุ 20-25 ปี	20	เก็บเชื้อจากนิสิตคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คนป่วย	50	เก็บเชื้อจากผู้ป่วยด้วยโรคท้องร่วงใน ร.พ. ศิริราช
ไก่ปกติ		
อายุ 3 วัน	18	เก็บเชื้อจากคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อายุ 1 สัปดาห์	16	
อายุ 1 เดือน	16	
ไก่ป่วย	119	จากไก่ที่ป่วยเป็นโรค Coli-septicemia จากคณะสัตว์แพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แหล่งน้ำธรรมชาติ		เก็บเชื้อจากบ่อน้ำในสวนสาธารณะและคลองต่าง ๆ ในเขตกรุงเทพมหานคร ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 : (ต่อ)

แหล่งที่มาของเชื้อ	จำนวนสายพันธุ์	หมายเหตุ
แหล่งน้ำธรรมชาติ	3, 3	สวนลุมพินี, สวนจตุจักร
	2, 2	คลองหัวลำโพง, คลองโอ่งอาง
	2, 2	คลองบางบัว, ทางระบายน้ำ ริมถนนวิภาวดีรังสิต
	2, 2	คลองสาธร, คลองหลอด
	2, 2	แม่น้ำเจ้าพระยาบริเวณท่าน้ำ ศิริราช, บริเวณท่าน้ำสี่พระยา
	3, 3	บ่อน้ำในบริเวณจุฬาลงกรณ์ฯ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	2	บ่อน้ำบริเวณ มหาวิทยาลัย กรุงเทพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารเคมี

2.1 ตัวทำละลาย

- Potassium phosphate buffer
- 0.1 N HCl
- 0.05 N HCl
- 0.1 N NaOH
- 1 N NaOH

2.2 น้ำยาทดสอบ

- สารละลาย gram stain
- Kovacs'reagent
- สารละลาย Methyl red
- สารละลาย Voges Proskauer

3. ยาต้านจุลชีพ

รายชื่อยาต้านจุลชีพ รวมทั้งรายละเอียดเกี่ยวกับตัวช่วยละลาย ตัวทำละลาย ความแรงของยาและแหล่งที่มาของยาแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 4

4. เครื่องแก้วและเครื่องมือ

4.1	Autoclave Model H.A 3D	(Hirayama, Japan)
4.2	Beaker	(Pyrex, USA)
4.3	Erlenmeyer flasks	"
4.4	Glass slides	(Pyrex, USA)
4.5	Hot air oven Model 27	(Precision)
4.6	Incubator	(Memmest)
4.7	Inoculum - replicating apparatus	-
4.8	Light microscopy	(Olympus)
4.9	Measuring cylinders	(Pyrex, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.10 Measuring pipettes (Pyrex, USA)

4.11 Petri dishes ..

4.12 Screw cap test tubes ..

4.13 Spectrophotometer Spectronic 710 (Baush Lamp.)

5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 Blood agar (Difco Laboratory, USA)

5.2 Brain - Heart - Infusion broth ..

5.3 Nutrient agar ..

5.4 Mac Conkey agar ..

5.5 Mueller - Hinton broth ..

5.6 Mueller - Hinton agar ..

5.7 Triple Sugar Iron agar ..

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ

ยาที่ใช้ในการทดสอบ	ตัวทำละลาย	ตัวช่วยเจือจาง	ความแรง	แหล่งที่มา
Ampicillin (ABP)	น้ำ	น้ำ	98.9 %	องค์การเภสัชกรรม
Gentamycin (GM)	1% Phosphate buffer pH 8	1% Phosphate buffer pH 8	686.1 มคก/มก	องค์การเภสัชกรรม
Kanamycin (KM)	1% Phosphate buffer pH 8	1% Phosphate buffer pH 8	690.0 มคก/มก	Dumex
Neomycin (NM)	1% Phosphate buffer pH 8	1% Phosphate buffer pH 8	690.0 มคก/มก	Upjohn
Streptomycin (SM)	1% Phosphate buffer pH 8	1% Phosphate buffer pH 8	751.6 มคก/มก	Dumex
Chloramphenicol (CP)	Phosphate buffer pH 6	Phosphate buffer pH 6	100.0 %	Warner-lambert
Thiamphenicol (TP)	Phosphate buffer pH 6	Phosphate buffer pH 6	98.8 %	Chinta
Tetracycline (TC)	0.1 N HCl	น้ำ	999.1 มคก/มก	องค์การเภสัชกรรม
Doxycycline (DC)	0.1 N HCl	น้ำ	850 Unit/มก	Dumex
Sulfadiazine (SLD)	0.1 N NaOH	น้ำ	99.3 %	องค์การเภสัชกรรม
Sulfamethoxazole (SLX)	0.1 N NaOH	น้ำ	99.5 %	Warner-lambert
Trimethoprim (TMP)	0.05 N HCl	น้ำ	100.0 %	องค์การเภสัชกรรม
Cotrimoxazole* (CT) (TMP + SLX, 1:5)				
Nalidixic acid (NA)	1 N NaOH+น้ำ	น้ำ	100.00 %	Sigma
Oxolinic acid (OA)	1 N NaOH+น้ำ	น้ำ	100.3 %	Tanabe Seiyaku

* การเตรียม Cotrimoxazole จะเตรียมโดยผสมยา Trimethoprim กับ Sulfamethoxazole ในอัตราส่วน 1 : 5

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการวิจัย แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การแยกเชื้อ *E. coli* จนได้เชื้อสายพันธุ์เดียว และการพิสูจน์เอกลักษณ์

ขั้นตอนที่ 2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ

ขั้นตอนที่ 3 การหาความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อยาของเชื้อที่ดื้อยา 9 ชนิด ได้แก่ยา Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Neomycin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Cotrimoxazole, Doxycycline, และ Tetracycline

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การแยกเชื้อและการพิสูจน์เอกลักษณ์

1.1 การแยกเชื้อ

เก็บเชื้อจากตัวอย่างจากคนปกติ คนป่วย และไก่ปกติ โดยใช้ rectal swabs หรือใช้อุจจาระตัวอย่างโดยตรง ป้ายลงบนผิวหน้าของ Mac Conkey agar และทำการถ่ายเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากไก่ป่วยจากสต็อกเชื้อลงบน blood agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ 24ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเชื้อลงบน Mac Conkey agar ในกรณีของการเก็บเชื้อจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ให้นำน้ำจากแหล่งน้ำนั้น ๆ ผสมกับ Mueller-Hinton broth ในอัตราส่วน 1:1 นำไปบ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเชื้อบนMac Conkey agar นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไป บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา24 ชั่วโมง

หลังจาก 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ให้โคโลนีสีชมพู จำนวน 3 โคโลนี โดยถ่ายเชื้อลง Nutrient agar slant จากนั้นนำมาย้อมสีกรัม โคโลนีของเชื้อ *E. coli* จะมีลักษณะเป็นเชื้อรูปแท่งติดสีแดง

1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์

การพิสูจน์เอกลักษณ์จะทำตามวิธีของ Edward และ Eving (1972) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 Acid formation and gas production test

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อในหลอดเลี้ยงเชื้อ stab เชื้อลงในส่วนก้นและ streak เชื้อบนผิวหน้าของอาหาร Triple Sugar Iron agar (TSI) จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ 24 ชั่วโมง เชื้อ *E. coli* จะสร้างกรดและก๊าซ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเกิดฟองก๊าซแทรกอยู่ในเนื้ออาหาร ทั้งนี้จะต้องไม่มีสีดำ ซึ่งแสดงว่ามีการสร้างก๊าซ H_2S

1.2.2 Methyl red test

ถ่ายเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อลงใน MR-VP Medium นำไป บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°ซ 24 ชั่วโมง หยดน้ำยาทดสอบ methyl red test solution 5 หยด ผลบวกสำหรับการทดสอบจะให้สีแดง

1.2.3 Voges-Proskauer test

นำเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงใน MR-VP Medium นำไป บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยดน้ำยาทดสอบ VP I และ

VP II 15 และ 10 หยด ตามลำดับ เช่น ผลบวกของการทดสอบจะให้สีแดง ภายใน 15-30 นาที

1.2.4 Indole test

นำเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงใน 1 % tryptone broth นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดน้ำยาทดสอบ Kovacs' reagentอย่างช้า ๆ ผลบวกสำหรับการทดสอบจะให้ชั้นวงแหวนสีแดง

1.2.5 Citrate utilization test

นำเชื้อจากหลอดทดลองเลี้ยงใน Simmon's citrate agar นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ 24 ชั่วโมง ผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

สำหรับเชื้อ *E. coli* จะให้ผลบวกต่อการทดสอบ Methyl red test, Indole test และให้ผลลบต่อการทดสอบ Voges-Proskauer และ Citrate utilization test

เชื้อ *E. coli* ที่ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุก ๆ 2 เดือน

2. <u>การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้</u> (Minimal Inhibitory Concentration : MIC)

การหาค่า MIC ใช้วิธี agar dilution technique โดยการ spot-inoculated เชื้อ *E.coli* แต่ละสายพันธุ์ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะมียาต้านจุลชีพผสมอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ค่า MIC เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่เชื้อไม่ขึ้น

วิธีการหาค่า MIC ดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และคณะ(1981) และ Koeda (1981) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1 การเตรียม antimicrobial media agar

เตรียมสารละลายของยาต้านจุลชีพที่จะทดสอบ โดยใช้ ตัวทำละลาย และตัวช่วยเจือจาง ที่เหมาะสม(ตามตารางที่4) ละลายตัวยาให้มีความเข้มข้นขั้นต้นตามกำหนด (ตามตารางที่ 5) จากนั้นจึงเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 1 เท่าตามลำดับ จนได้สารละลายของยาทั้งหมด 9 ความเข้มข้นโดยให้ สารละลายของยามีความ

เข้มข้นต่ำสุดต่ำกว่าค่า MIC ของยานั้นต่อเชื้อ *E. coli* มาตรฐาน (*E. coli* ATCC 25922) 2 - 4 เท่าและมีความเข้มข้นสูงสุดสูงกว่าค่า MIC ของเชื้อ *E.coli* มาตรฐาน 4 - 6 เท่า ความเข้มข้นต่าง ๆ ของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบแสดงในตารางที่ 5

หลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วหลอดละ 18 มลและทำให้เย็นลงจนอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 50-55 °ซ ใช้ไปเปตดูดสารละลายของยาที่ใช้ทดสอบแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในอาหารแต่ละหลอด หลอดละ 2 มล. ผสมจนเข้ากันดี เทลงในจานเพาะเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม.ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งบนพื้นเรียบ วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว สำหรับการเตรียม antimicrobial plate จะทำการเตรียม ความเข้มข้นละ 2 จาน

เตรียม control plate 1 จานต่อ antimicrobial plate 1 ชุด โดยการใช้น้ำกลั่น 2 มล. แทนสารละลายของยาต้านจุลชีพ เติมลงในอาหารหลอมเหลว 18 มล ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

จานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด เตรียมขึ้นในวันเดียวกับวันที่ทำการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ

ยาที่ใช้ในการทดสอบ	ความเข้มข้นขั้นต้น* มคก/มล	ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ** มคก/มล	ระยะเวลาสูงสุดในการเก็บ stock solution
Ampicillin	1280	0.5,1,2,4,8,16,32,64,128	7 วัน
Gentamycin	320	0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16,32	1 เดือน
Kanamycin	320	0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16,32	1 เดือน
Neomycin	320	0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16,32	1 เดือน
Streptomycin	320	0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16,32	14 เดือน
Chloramphenicol	1280	0.5,1,2,4,8,16,32,64,128	1 เดือน
Thiamphenicol	1280	0.5,1,2,4,8,16,32,64,128	- ***
Tetracycline	1280	0.5,1,2,4,8,16,32,64,128	-
Doxycycline	1280	0.5,1,2,4,8,16,32,64,128	-
Sulfadiazine	12160	4.75,9.5,19,38,76,152,304, 608,1216	1 เดือน
Sulfamethoxazole	12160	4.75,9.5,19,38,76,152,304, 608,1216	1 เดือน
Trimethoprim	166.4	0.065,0.13,0.26,0.52,1.04, 2.08,4.16,8.32,16.64	1 เดือน
Cotrimoxazole	1280	0.5,1,2,4,8,16,32,64,128	-
Nalidixic acid	640	0.25,0.5,1,2,4,8,16,32,64	-
Oxolinic acid	25.22	0.01,0.02,0.04,0.08,0.16, 0.32,0.64,1.26,2.52	-

* ความเข้มข้นขั้นต้นนี้จะสูงเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ เมื่อผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอัตราส่วน 1:9 ก็จะมีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นสูงสุด

** ความเข้มข้นตามลำดับนี้ เป็นความเข้มข้นหลังจากผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว

*** จะทำการเตรียมสารละลายของยาใหม่ทุกครั้ง เมื่อทำการทดสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การเตรียมเชื้อ *E. coli* ตัวอย่าง

ถ่ายเชื้อตัวอย่างที่เก็บไว้ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar นำไปบ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°ซ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระจายเชื้อโดยใช้ Mueller-Hinton broth เป็นสารช่วยกระจาย ปรับความขุ่นของเชื้อให้มีค่า absorbance ที่ 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.125 ซึ่งจะทำให้ได้จำนวนเชื้อประมาณ 3×10^8 เซลล์/มล.

2.3 การเพาะเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้เครื่องมือ inoculum-replicating apparatus ซึ่งเครื่องมือ 1 ชุด สามารถ เพาะเชื้อได้ครั้งละ 28 สายพันธุ์ซึ่งในการทดสอบแต่ละชุดจะใช้ เชื้อ *E. coli* ตัวอย่าง 27 สายพันธุ์ และ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน (*E.coli* ATCC 25922) 1 สายพันธุ์ เพื่อทำหน้าที่เป็น control strain

ในขั้นแรก ใส่เชื้อ *E. coli* ตัวอย่าง และ *E. coli* มาตรฐานลงในแต่ละหลุมของ seed plate หลุมละ 1 สายพันธุ์ จากนั้นใช้ replicating device จุ่มลงในหลุมของ seed plate ยกขึ้น และนำไปแตะลงบนผิวหน้าของ control plate จุ่ม replicating device ลงในหลุมของ seed plate อีกครั้งหนึ่งจากนั้นจึงแตะบนผิวหน้า antimicrobial media agar ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ทำเช่นนี้ในจานเพาะเชื้อที่มียาต้านจุลชีพความเข้มข้นต่ำสุดก่อนจนถึงความเข้มข้นสูงสุด นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไป บ่มเชื้อ ที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง

2.4 การอ่านผลและการแปลผล

หลังจากบ่มจานเพาะเชื้อในข้อ 2.3 แล้ว อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อเริ่มจาก control plate ก่อน เนื่องจาก control plate ไม่มียาต้านจุลชีพผสมอยู่ดังนั้นเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์จะต้องสามารถเจริญได้

จากนั้นอ่านผลในจานเพาะเชื้อที่เหลือ โดยเริ่มจากจานเพาะเชื้อที่มียาผสมอยู่ในความเข้มข้นต่ำไปหาสูง ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ คือค่า MIC ของเชื้อสายพันธุ์นั้น ๆ

สำหรับค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐานจะต้องเท่ากัน

ในแต่ละชุดของเชื้อทดสอบ

หลังจากหาค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* ตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์แล้ว ทำการแปลผลการดื้อยาของเชื้อโดยใช้ตารางการแปลผลของ National Committee on Clinical Laboratory Standards (N.C.C.L.S) (Finegold และคณะ, 1982)(ตารางที่ 6) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 50% (MIC_{50})และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 90% (MIC_{90}) วิธีการหาค่า MIC_{50} และ MIC_{90} แสดงในภาคผนวก (Lee และ Febiger, 1976)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการแปลผลการดื้อยา (จากสถาบัน N.C.C.L.S)(Finegold และคณะ, 1982)

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้นที่ใช้แปลผลการดื้อยา (มคก/มล)
Ampicillin	≥ 32
Chloramphenicol	≥ 25
Cotrimoxazole	≥ 200
Doxycycline	≥ 16
Gentamycin	≥ 8
Kanamycin	≥ 25
Neomycin	≥ 25
Nalidixic acid	≥ 32
Oxolinic acid	≥ 1
Sulfadiazine	≥ 350
Sulfamethoxazole	≥ 350
Streptomycin	≥ 15
Tetracycline	≥ 12
Thiamphenicol	≥ 25
Trimethoprim	≥ 16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทดลองหาความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อยา

ในขั้นตอนนี้ เป็นการทดลองหาความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ตัวอย่างที่ดื้อยาโดยทำหน้าที่เป็น donor strain ทำการถ่ายทอดการดื้อยาไปยัง *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐานที่ทำหน้าที่เป็น recipient strain วิธีและขั้นตอนโดยละเอียดใช้วิธีของ Sundaram และ Murthy (1984)

- Donor strain : ทำการคัดเลือกเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบซึ่งจะแบ่งเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ดื้อต่อยาที่ความเข้มข้นสูง และกลุ่มเชื้อที่ดื้อต่อยาที่ความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 7)

- Recepient strain : ใช้ *E. coli* W 667 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพวก non lactose fermenter และดื้อต่อยา Streptomycin

- ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ: ชนิดและความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดลองในขั้นตอนนี้ แสดงในตารางที่ 8

- วิธีทดลอง

3.1 เตรียมสารแขวนตะกอนของเชื้อ *E. coli* donor strain โดยวิธีเดียวกับการเตรียมเชื้อในข้อ 2.2 และปรับความขุ่นให้มีค่า absorbance ที่ 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.075 ซึ่งจะทำให้ได้จำนวนเชื้อประมาณ 2×10^8 เซลล์/มล. หลังจากนั้นนำไปบ่มเชื้อ ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 เตรียมสารแขวนตะกอนของเชื้อ recipient strainโดยให้มีค่า absorbance เท่ากับ 0.325 ซึ่งทำให้ได้จำนวนเชื้อประมาณ 5×10^8 เซลล์/มลหลังจากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมงเขย่าตลอดเวลา

3.3 ผสม donor strain และ recipient strain อย่างละ 0.5 มล โดยใช้ aseptic technique เขย่าเบา ๆ จนผสมเข้ากันดี นำไปบ่มเชื้อ ที่ 37 °ซเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมของเชื้อทั้งสองชนิด streak ลงบนผิวหน้าของ Mac Conkey agar ซึ่งมียาต้านจุลชีพผสมอยู่ในความเข้มข้นที่แสดงในตารางที่ 8 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 เก็บเชื้อที่ให้โคโลนีสีขาว และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนผิวหน้า Mac Conkey agar จนได้โคโลนีเดี่ยว ๆ จากนั้นเก็บโคโลนีของเชื้อมาทำการ streak ลงบน Mac Conkey agar ซึ่งมียาต้านจุลชีพผสมอยู่

เช่นเดียวกับข้อ 3.3 เพื่อยืนยันถึงการดื้อต่อยาอีกครั้งหนึ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อยา

ยาต้านจุลชีพ	จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา* ที่ความเข้มข้นสูง	จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา** ที่ความเข้มข้นต่ำ	รวม (สายพันธุ์)
Ampicillin	71	10	81
Chloramphenicol	41	34	75
Cotrimoxazole	58	13	71
Doxycycline	12	34	46
Kanamycin	44	7	51
Neomycin	31	16	47
Sulfamethoxazole	74	12	86
Tetracycline	20	40	60
Trimethroprim	79	7	86

* ระดับยาที่ความเข้มข้นสูง สำหรับ ABP,CP,CT,DC,TC คือ >128 มคก/มล.
สำหรับ KM,NM คือ >32 ..
สำหรับ SLX คือ >1216 ..
สำหรับ TMP คือ >16.64 ..

** ระดับยาที่ความเข้มข้นต่ำ สำหรับ ABP,CP,CT,DC,TC คือ >32 - 128 ..
สำหรับ KM,NM คือ 20 - 32 ..
สำหรับ SLX คือ 152 - 1216 ..
สำหรับ TMP คือ 10 - 16.64 ..

ตารางที่ 8 แสดงชนิดและความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดลองหาความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อยา

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้นที่ใช้ มคก/มล
Ampicillin	25
Chloramphenicol	25
Cotrimoxazole	20
Doxycycline	20
Kanamycin	20
Neomycin	20
Sulfamethoxazole	100
Tetracycline	20
Trimethoprim	10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย