การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ที่ดื้อยาเซฟาโลสปอริน ซึ่งแยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยในโรงพยาบาลเพชรบูรณ์

ณัฏวรรณ โทนมี

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์
มิถุนายน 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยา cephalosporin แบบขยายและแยกได้จากการเพาะเชื้อปัสสาวะในโรงพยาบาลเพชรบูรณ์ ประเทศไทย"

ของ นางณัฏวรรณ โทนมี

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปราณีต โอปณะโสภิต)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร. เชิดชาย แซ่ฮ่วน)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรศักดิ์ โรจนราธา)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก / ภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระภูธร)

อนุมัติ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)

รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ปฏิบัติราชการแทน

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

27 มิถุนายน 2559

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ดร.เชิดชาย แซ่ฮ่วน ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบไปด้วย ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราธา กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระภูธร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

กราบขอบพระคุณ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลเพชรบูรณ์เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์อนุมัติให้ทำการศึกษาวิจัยข้อมูลจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยในโรงพยาบาล กราบขอบพระคุณ ทนพ.ญ.มยุรี จันทร์โท นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยา และ ทนพ.ญ.สุกัญญา โชคงาม นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ หัวหน้าแผนกจุลชีววิทยา โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัยและเก็บข้อมูลในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการเก็บตัวอย่างปัสสาวะและรวบรวมข้อมูลการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้ป่วยที่มารับบริการโรงพยาบาลเพชรบูรณ์ส่งตรวจปัสสาวะทำให้ได้มาซึ่งตัวอย่างเชื้อจุลชีพในการทำวิจัยครั้งนี้ด้วย

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะของแพทย์และผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย

ณัฏวรรณ โทนมี

ชื่อเรื่อง	การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาเซฟาโลสปอริน ซึ่งแยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยในโรงพยาบาลเพชรบูรณ์
ผู้วิจัย	ณัฏวรรณ โทนมี
ประธานที่ปรึกษา	ดร.เชิดชาย แซ่ฮ่วน
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราธา
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2558
คำสำคัญ	การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาเซฟาโลสปอริน ปัสสาวะของผู้ป่วย

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นโรคที่พบได้บ่อยโดยสาเหตุส่วนใหญ่มาจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ในปัจจุบันพบว่า การรักษาเป็นไปได้ยากมากขึ้นเนื่องจากมีแนวโน้มเป็นเชื้อดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยากลุ่ม cephalosporins ที่แยกได้จากปัสสาวะในโรงพยาบาลเพชรบูรณ์ต่อยาชนิดอื่นๆ โดยวิธีวางแผ่นทดสอบและเพื่อหาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยากลุ่ม cephalosporins ที่มีรูปแบบเชื้อดื้อยาหลายขนาน จากการศึกษาพบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1,422 ไอโซเลต เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่แยกได้คือเชื้อ *Escherichia coli* จำนวน 382 ไอโซเลต (26.87%) เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* จำนวน 71 ไอโซเลต (4.99%) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 39 ไอโซเลต(2.74%) เชื้อ *Enterobacter* spp. จำนวน 35 ไอโซเลต (2.46%) และ เชื้อ *Acinobacter baumannii* จำนวน 21 ไอโซเลต (1.47%) โดยดื้อยา cephalosporins เป็น 19.89%, 26.76%, 17.95%, 37.15% และ 33.4% ตามลำดับ และมีรูปแบบการดื้อยาหลายขนานเท่ากับ 65.8%, 52.6%, 85.7%, 84.6% และ 100% ตามลำดับ สรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่แยกได้มากที่สุดจากการเพาะเชื้อปัสสาวะได้แก่เชื้อ *Escherichia coli* และให้ผลการทดสอบที่ดื้อยา cephalosporins มากที่สุดเช่นกัน เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยา cephalosporins มีรูปแบบการดื้อยาเป็นเชื้อดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป มากกว่า 50% และ เชื้อ *Acinobacter baumannii* มีรูปแบบการดื้อยาเป็นแบบดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป 100%

Title	ANTIMICROBIAL DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING AMONG CEPHALOSPORIN-RESISTANT GRAM NEGATIVE BACTERIA ISOLATED FROM PATEINT URINE IN PETCHABUN HOSPITAL
Author	Nuttawan Tonmee
Advisor	Choedchai Saehuan, Ph.D.
Co - Advisor	Theerasak Rojanarata, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Medical Technology, Naresuan University, 2015
Keywords	Antimicrobial drug susceptibility testing, Cephalosporin-resistant gram negative bacteria, Patient urine

ABSTRACT

Urinary tract infections are common diseases caused mainly by gram-negative bacteria. At present, the treatment tends to be more difficult because of higher drug resistance. The purpose of this study was to determine antimicrobial drug susceptibility testing by disk diffusion method, and find out multidrug resistance (MDR) of cephalosporins-resistance gram-negative bacteria from urine cultures in Petchabul Hospital. The result showed that 382 isolates of *Escherichia coli* (26.87%), 71 isolates of *Klebsiella pneumoniae* (4.99%), 39 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (2.74%), 35 isolates of *Enterobacter* spp. (2.46%), and 21 isolates of *Acinobacter baumannii* (1.47%) were included in 1,422 isolates of bacteria, classified as cephalosporins-resistance with 19.89%, 26.76%, 17.95%, 37.15% and 33.34%, respectively, and found to be MDR with 65.8%, 52.6%, 85.7%, 84.6% and 100%, respectively. In conclusion, the most gram negative bacteria isolated from urine culture were *Escherichia coli* with the highest resistance to cephalosporins. Cephalosporins-resistant gram-negative bacteria showed MDR with more than 50% and *Acinobacter baumannii* demonstrated MDR with 100%.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษา	1
	ขอบเขตของงานวิจัย	2
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	3
	ชนิดของยาต้านเชื้อจุลชีพ	3
	การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา	11
	การจัดกลุ่มเชื้อดื้อยา	14
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	20
	การเพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในปัสสาวะ	20
	การเลือกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	20
	การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา	20
	แผ่นยาต้านจุลชีพที่นำมาทดสอบ	21
	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	22
4	ผลการวิจัย	24
	เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	24
	ผลความไวต่อยากลุ่มอื่นๆ ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins	25
	รูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins	26
5	**บทสรุป**	28
	สรุปผลการวิจัย	28
	อภิปรายผล	28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	30
ภาคผนวก	33
ประวัติผู้วิจัย	46

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงการแบ่งกลุ่มยาต่อเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae..... 15

2 แสดงการแบ่งกลุ่มยาต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*..... 16

3 แสดงการแบ่งกลุ่มยาต่อเชื้อ *Acinetobacter spp.* 17

4 แสดงกลุ่มและชนิดของยาที่นำมาทดสอบ..... 21

5 แสดงชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบ..... 24

6 แสดงชนิดเชื้อแบคทีเรียที่พบและดื้อยากลุ่ม cephalosporins..... 25

7 แสดงผลความไวต่อยากลุ่มอื่นๆของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins..... 25

8 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins และให้ผลทดสอบเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance: MDR)..... 27

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะในผู้หญิงแต่การวินิจฉัยโรคให้ถูกต้องกลับถูกมองข้ามไปเนื่องจากผู้ป่วยไม่มีอาการหรืออาการที่แสดงไม่มีความสัมพันธ์กับโรคหรือบางครั้งอาการที่ปรากฏไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในระบบนี้ [1] ความรุนแรงของการติดเชื้อในแต่ละรายมีความแตกต่างกัน ในบางรายอาจมีอาการเพียงเล็กน้อยโดยไม่มีความจำเป็นต้องใช้ยาต้านจุลชีพหรือสามารถรักษาได้ด้วยยาต้านจุลชีพชนิดรับประทาน ในบางรายที่ไปพบแพทย์อาจมีความรุนแรงของโรคการติดเชื้อลุกลามจนทำให้มีการติดเชื้อที่เนื้อไตก่อให้เกิดโรคไตและกรวยไตอักเสบแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรังได้ ต้องเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเพื่อรับยาต้านจุลชีพชนิดฉีด ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากมีการติดเชื้อในกระแสเลือดหรือเกิดภาวะ septic shock ร่วมด้วย ดังนั้นการวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องและการเลือกยาต้านจุลชีพสำหรับผู้ป่วยแต่ละรายได้อย่างเหมาะสมสามารถครอบคลุมเชื้อก่อโรคตั้งแต่ระยะแรกเริ่มได้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้มีการติดเชื้อรุนแรงลุกลามมากขึ้น [2] วิธีที่สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะได้อย่างถูกต้องและแน่นอนต้องอาศัยการเพาะเชื้อจุลชีพที่เป็นสาเหตุจากปัสสาวะของผู้ป่วย [2, 3] เชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุอันดับต้นๆได้แก่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบและข้อมูลจากโครงการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า แบคทีเรียแกรมลบมีแนวโน้มการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากขึ้นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพจึงมีความสำคัญในการเลือกใช้ยาเพื่อการรักษาของแพทย์อย่างถูกต้อง ทำให้การติดเชื้อไม่ลุกลามผู้ป่วยหายจากภาวะโรคติดเชื้อ และเป็นการป้องกันการดื้อยาของเชื้อได้อีกทางหนึ่งด้วย

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อหาความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาเซฟาโลสปอรินที่แยกได้จากปัสสาวะต่อยาชนิดอื่นๆในงานประจำวันโดยวิธีวางแผ่นทดสอบ
2. เพื่อหารูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาเซฟาโลสปอริน

ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาเซฟาโลสปอรินจำนวน 122 ไอโซเลต จากตัวอย่างปัสสาวะที่ส่งตรวจเพาะเชื้อและทดสอบความไวของยาที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ โดยไม่ซ้ำราย ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2555 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2555

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชนิดของยาต้านเชื้อจุลชีพ

1. β-lactam antibiotics

เป็นยาต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก ได้แก่ penicillins, cephalosporins, monobactams และ carbapenems

1.1 Penicillins

Penicillins ค้นพบโดย Sir Alexander Fleming โมเลกุล penicillins มีสูตรโครงสร้างพื้นฐาน คือ 6-aminopenicillanic acid penicillin อาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ β-lactamase จากเชื้อบางชนิดโดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* ซึ่งทำให้ได้สารที่ไม่มีฤทธิ์ คือ penicilloic acid

ยาในกลุ่ม Penicillin แบ่งออกได้เป็นกลุ่มตามความสามารถในการฆ่าเชื้อ ได้แก่

1.1.1 Benzylpenicillin and congeners

ได้แก่ benzylpenicillin (penicillin G) ให้โดยการฉีดเนื่องจากดูดซึมได้ไม่ดีและ phenoxymethylpenicillin (penicillin V) ซึ่งให้โดยการรับประทานได้ยาในกลุ่มนี้ไม่ทนต่อเอนไซม์ β-lactamase มี activity ต่อเชื้อ gram positive cocci เชื้อกลุ่ม gram negative cocci และเชื้อกลุ่ม non-β-lactamase producing anaerobes และมีฤทธิ์ต่อเชื้อกลุ่ม gram negative bacilli เล็กน้อย

1.1.2 β-lactamase resistant penicillin

ยาในกลุ่มนี้จะทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ได้แก่ cloxacillin, flucloxacillin, dicloxacillin, methicillin และ nafcillin เป็นต้นยากลุ่มนี้ให้โดยการรับประทานได้ยกเว้น methicillin และ nafcillin ที่ต้องให้โดยการฉีดเนื่องจากดูดซึมได้ไม่ดีและไม่ทนต่อกรดส่วนยาตัวอื่นๆ ที่ให้ได้โดยการรับประทานนั้นควรรับประทานก่อนอาหารเนื่องจากยาจะมีการดูดซับ (adsorb) กับอาหารที่รับประทานและทำให้การดูดซึมลดลงได้ยากลุ่มนี้ใช้ได้ผลต่อเชื้อ *Staphylococci* spp. เชื้อ *Streptococci* spp. แต่ไม่ได้ผลต่อเชื้อ *Enterococci* spp. เชื้อกลุ่ม Anaerobic bacteria เชื้อกลุ่ม gram negative cocci และเชื้อกลุ่ม gram negative bacilli

1.1.3 Broad-spectrum penicillin

ยากลุ่มนี้ ได้แก่ ampicillin, pivampicillin, bacampicillin, amoxycillin ยากลุ่มนี้ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ β-lactamase และให้โดยการรับประทานได้เนื่องจากดูดซึมได้ดีโดยเฉพาะ amoxicillin

อาหารจะลดการดูดซึมของ ampicillin ได้ส่วน pivampicillin และ becampicillin นั้นเป็นผลิตภัณฑ์ของ ampicillin อาหารไม่มีผลรบกวนการดูดซึมของยาทั้งสองชนิดนี้ ยากลุ่มนี้มี spectrum ในการฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับ benzylpenicillin และมีฤทธิ์ครอบคลุมต่อเชื้อกลุ่ม gram negative cocci บางชนิดเพิ่มขึ้นด้วย

1.1.4 Extended-spectrum penicillin

ยากลุ่มนี้ ได้แก่ carbenicillin, ticarcillin, azlocillin piperacillin ยานี้มี activity ที่ดีขึ้นต่อเชื้อกลุ่ม gram negative bacilli โดยเฉพาะ *Enterobacter* spp. และ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ β-lactamase

Penicillin มีฤทธิ์เป็น bactericidal สำหรับเซลล์แบคทีเรียที่กำลังมีการเจริญเติบโต โดยการดื้อต่อ Penicillins เกิดได้เนื่องจากหลายกลไกด้วยกัน ได้แก่

1. การถูกทำลายโดยเอนไซม์ β-lactamase จากเชื้อแบคทีเรียที่สร่างขึ้น เชื้อแบคทีเรียที่พบว่ามีการสร้างได้แก่ เชื้อ *Staphylococci* spp. และเชื้อกลุ่ม gram negative bacteria บางชนิดเช่น เชื้อ *Haemophilus spp.* เชื้อ *Pseudomonas* spp. เชื้อ *Enterobacter* spp. เป็นต้นซึ่ง β-lactamase มีหลายชนิดด้วยกัน และมีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ยับยั้งได้โดย β-lactamase inhibitor

2. การเปลี่ยนแปลง peniciilin binding proteins (PBPs) ของเชื้อทำให้ penicillins ไม่สามารถเข้าจับกับ PBPs ได้เช่น Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)

3. การลดการนำยา penicillins เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย

4. การมี efflux pump นำยาออกมาจากตัวเชื้อแบคทีเรีย

กลไกการดื้อยาของเชื้อที่พบมากที่สุดคือการสร้างเอนไซม์ β-Lactamase จึงมีการพัฒนาสารที่เป็น β-lactamase inhibitor เพื่อเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ของ penicillins การดูดซึมของยา penicillins ในแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ยากระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆได้ดี ยกเว้นน้ำไขสันหลัง ยาจะเข้าสู่น้ำไขสันหลัง ได้มากขึ้นในภาวะที่มีการอักเสบของเยื่อหุ้มสมอง penicillin ขับออกทางไตได้ดีอย่างรวดเร็วโดย 10% ขับออกทาง glomerular filtration และ

90% ขับออกทาง tubular secretion การให้ยา penicillin ร่วมกับ probenecid ซึ่งเป็นสารที่แย่งการขับออกทางท่อไตกับ penicillin จะทำให้การขับออกของ penicillin ทาง tubular secretion ลดลง

1.2 Cephalosporins

Cephalosporins เป็นยาที่มีสูตรโครงสร้าง กลไกการออกฤทธิ์และความเป็นพิษที่คล้ายคลึงกับ penicillin แต่ cephalosporins จะทนต่อเอนไซม์ β-lactamase บางชนิดได้มากกว่า penicillin จึงมีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้หลายชนิดมากกว่า โครงสร้างหลัก คือ 7-aminocephaosporanic acid ซึ่งการดัดแปลงในตำแหน่งต่างๆจะได้ยา cephalosporins ที่แตกต่างกันไปปัจจุบันแบ่งยา cephalosporins ได้ออกเป็น 4 generations ตามความสามารถในการฆ่าเชื้อโดยที่ First generation จะมีความสามารถในการเชื้อกลุ่ม gram positive bacteria ได้ดีที่สุดและ generation ถัดมาจะมีฤทธิ์ต่อ gram negative bacteria มากขึ้นเรื่อยๆ

1.2.1 First generation cephalosporins ได้แก่ cefadroxil, cefazolin, cephalexin cephapirin และ cephradine

ได้ผลดีต่อเชื้อกลุ่ม gram positive cocci ทั้ง เชื้อ *Staphylococci* spp. เชื้อ *Streptococci* spp. เชื้อ *Streptococci pneumoniae* แต่ไม่ได้ผลต่อ methicillin resistant Staphylococci ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์เล็กน้อยต่อ เชื้อ *Escherichai coli* เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และไม่ได้ผลต่อเชื้อ *Enterobacter spp.* เชื้อ *Serratia* spp. เชื้อ *Citrobacter* spp. เชื้อ *Acinetobacter* spp. เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และได้ผลต่อเชื้อกลุ่ม anaerobes บางชนิด ยาในกลุ่มนี้ที่ให้ได้โดยการรับประทานได้แก่ cephalexin, cephradine และ cefadroxil ยาขับออกทาง glomerular filtration และ tubular secretion เป็นหลัก ยากลุ่มนี้ไม่ค่อยเป็น Drug of choice ในการรักษา โดยยาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้ได้แก่การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อที่เนื้อเยื่ออ่อนประเภท cellulitis และ cefazolin ใช้เพื่อเป็น surgical prophylaxis

1.2.2 Second generation cephalosporins ได้แก่ cefaclor, cefamandole, cefonicid, cefuroxime, cefprozil, loracarbef และ ceforanide รวมทั้งยาในกลุ่ม cephamycins เช่น cefoxitin cefmetazole cefotetan

ยากลุ่มนี้ครอบคลุมเชื้อที่ไวต่อ First generation cephalosporin และมีความสามารถครอบคลุมต่อเชื้อกลุ่ม gram negative มากกว่า โดยที่ได้ผลต่อเชื้อ *Klebsiella spp.* เชื้อ *H. influenza* แต่ไม่ได้ผลต่อเชื้อ *Serratia spp.* เชื้อ *B. fragilis* เชื้อ *Enterococci* spp.

และเชื้อ *P. aeruginosa* ส่วน cephamycins ได้ผลดีต่อเชื้อกลุ่ม anaerobes ยาที่ให้ได้โดยการรับประทานได้แก่ cefaclor, cefuroxime, axetil, cefprozil และ loracarbef ใช้ในการรักษาโรค sinusitis โรคotitis และ lower respiratory tract infection

1.2.3 Third generation cephalosporins ได้แก่ cefoperazone, cefotaxime ceftazidime, ceftizoxim, ceftriaxone, cefixime, cepodoxime, proxetil, ceftibuten และ moxalactam

ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อกลุ่ม gram negative bacteria มากขึ้นและผ่านเข้าสู่สมองได้ โดยที่นอกจากจะมีผลต่อเชื้อกลุ่ม gram negative bacteria เช่นเดียวกับ cephalosporin generation อื่นๆ แล้วยังได้ผลต่อเชื้อ *P. aeruginosa* เชื้อ *Citrobacter* spp. เชื้อ *Serratia* spp.เชื้อ *B. fragilis* การดื้อยาของเชื้อเกิดได้เนื่องจากการสร้างเอนไซม์ cephalosporinase ยาที่สามารถให้โดยการรับประทานได้แก่ cefixime, ceftibuten, cefpodoximeproxetil ยาถูกขับออกทางไตเป็นหลักยกเว้น cefoperazone และ ceftriaxone ถูกขับออกทาง biliary tract

Third generation cephalosporins ใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่รุนแรงและดื้อต่อยาชนิดอื่นๆเช่นใช้ในการรักษา meningitis ที่เกิดจากเชื้อ *S. pneumoniae* เชื้อ *N. meninitidis* เชื้อ *H. influenza* เชื้อกลุ่ม enteric gram negative rods เชื้อ *P. aeruginosa* โดยที่ต้องให้ร่วมกับ aminoglycosides และการรักษา penicillin-resistant pneumococci (PRSP)

Third generation cephalosporins ที่ใช้เป็น first choice ในการรักษาหนองในแท้ ได้แก่ cefixime และ ceftriaxone

1.2.4 Fourth generation cephalosporins ได้แก่ cefepime และ cepirome

ยากลุ่มนี้คล้ายกับ Third generation cephalosporins แต่ทนต่อการทำลายโดยβ-lactamase ได้มากกว่าและมีฤทธิ์ที่ดีต่อเชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. pneumoniae* เชื้อ *Haemophilus* spp. เชื้อ *Neisseria* spp. เชื้อ *P.aeruginosa* และเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae การใช้ประโยชน์ทางคลินิกคล้ายกับ third generation cephalosporins

1.3 Other β-lactam antibiotics

azteonam ทนต่อ β-lactamase ชนิด metallo-β-lactamase ซึ่งสร้างได้จากเชื้อบางชนิด เช่น เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* เชื้อ *B. fragilis* เชื้อ *P. aeruginosa* และได้ผลดีต่อเชื้อกลุ่ม gram negative baciili รวมทั้งเชื้อ *Pseudomonas* spp. และเชื้อ *Serratia* spp. แต่ไม่มี activity ต่อเชื้อกลุ่ม gram positive bacteria หรือเชื้อกลุ่ม anaerobic bacteria ข้อดีของยา aztreonam คือ ไม่มีการแพ้ยาข้ามกับ penicillins

aztreonam ได้ผลดีต่อการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ออกซิเจน ตัวอย่างเช่น เชื้อ *E. coli* เชื้อ *Enterobacter spp.*เชื้อ *Serratia marcescens* เชื้อ *Citrobacter spp.*เชื้อ *Klebsiella pneomoniae* เชื้อ *Proteus mirabilis* เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นต้น

aztreonam มีข้อบ่งใช้ในการรักษา 1) Urinary tract infection ทั้งแบบ complicated และ uncomplicated 2) Lower respiratory tract infection รวมทั้ง pneumonia และ bronchitis 3) Septicemia 4) Skin and skin structure infections 5) Intraabdominal infection 6) Gynecologic infection

1.4 Carbapenems

ได้แก่ imipenem, meropenem และ ertapenem

ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์กว้างครอบคลุมเชื้อกลุ่ม gram positive bacteria เชื้อกลุ่ม gram negative bacteria เชื้อกลุ่ม anaerobic bacteria และทนต่อ β-lactamase หลายชนิดแต่ไม่ได้ผลต่อ methicillin resisitant Staphylococci (MRSA)

1. imipenem และ meropenem imipenem ถูก inactive ได้โดยเอนไซม์ dehydropeptidaseที่ไตได้จึงมีการให้ร่วมกับ dehydropeptidase inhibitors คือ cilastatin ส่วน meropenem นั้นไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์นี้ ยาทั้งสองใช้ในกรณีการติดเชื้อที่ดื้อต่อยาอื่นๆ โดยที่ได้ผลต่อ Penicillin resistant pneumococci (PRSP) การติดเชื้อจากเชื้อ Enterobacter spp. การติดเชื้อจากเชื้อ *Pseudomonas* spp.

2. carbapenem เป็น beta-lactam antibiotics of choice ในการรักษาการติดเชื้อ Enterobacter เนื่องจากสามารถทนต่อเอนไซม์ beta-lactamase ที่ผลิตจากเชื้อนี้ได้ การใช้ยาเพื่อรักษาการติดเชื้อ *Pseudomonas* ควรให้ร่วมกับ aminoglycosides เพราะจะเกิดการดื้อยาได้รวดเร็ว

3. ertapenem เป็นยากลุ่ม carbapenem ตัวใหม่ออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ imipenem และ meropenem ยามีความทนต่อเอนไซม์ β-lactamase หลายชนิดทั้งเอนไซม์ penicillinase เอนไซม์ cephalosporinase และ เอนไซม์ Extended spectrum β-lactamase (ESBL) แต่ ertapenemไม่ทนต่อเอนไซม์ metallo-β-lactamase

1.5 β-lactamase inhibitors

ได้แก่ Clavulanic acid, Sulbactam, Tazobactam

เป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ β-lactamase แต่มี antibacterial activity แบบอ่อน แต่จะช่วยทำให้ยาในกลุ่มβ-lactam ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นโดยการช่วยเพิ่ม

spectrum ในการฆ่าเชื้อของยาโดยมากจะอยู่ในรูป combination ของ penicillin + β-lactamase inhibitors เช่น clavulanic acid + amoxycillin (Augmentin®) หรือ tazobactam + piperacillin (Tazocin®)

2. Sulfonamides

เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์โดยการรบกวนการสังเคราะห์และการทำงานของกรดโฟลิก

ยาในกลุ่มนี้ตัวแรกที่พบคือ sulphonilamide ต่อมามีการพัฒนาอนุพันธ์ของยากลุ่มนี้ขึ้นมาอีกหลายชนิดตัวอย่างเช่น sulfadiazine, sulfadimidine, sulfamethoxazole, sulfametopyrazine, sulfasalazine โดย Sulfamethoxazole มีการ combination ร่วมกับยา trimethoprim เรียกว่า co-trimoxazole

กลไกการออกฤทธิ์

sulfonamides มีโครงสร้างที่คล้ายกับ para-aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ folic acid ของแบคทีเรียซึ่ง folic acid นั้นเป็นสารสำคัญในการสังเคราะห์ purine base และ thymidine ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ DNA ทั้งในแบคทีเรียและในมนุษย์แต่ในมนุษย์นั้นจะไม่มีการสังเคราะห์ folic acid ขึ้นภายในร่างกายแต่ได้รับ folic acid จากการรับประทานอาหาร

Sulfonamides จะแย่ง PABA ในการจับกับเอนไซม์ dihydropteroate synthase และยับยั้งการสังเคราะห์ folic acid หากอยู่ในภาวะที่มี PABA มากๆ PABA จะสามารถต้านฤทธิ์ของ sulfonamides ได้เช่นกัน sulfonamides มีฤทธิ์เป็น bacteriostatic ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียฤทธิ์ของ Sulfonamides จะลดลงในบริเวณที่มีหนองหรือมี tissue breakdown product เนื่องจากแบคทีเรียจะอาศัย precursor จากสิ่งเหล่านั้นในการสร้าง DNA และ RNA โดยไม่ต้องสร้าง folic acid

การดื้อต่อยา Sulfonamides นั้นเกิดจากการสร้างเอนไซม์ dihydropteroate synthase ที่ไม่ไวต่อยาหรือโดยการสร้าง PABA ในปริมาณมากๆ Sulfonamides ส่วนมากดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหารยาถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับและถูกขับออกทางไต

3. Trimethoprim

Trimethoprim มีสูตรโครงสร้างที่คล้ายกับ pteridine moiety ของ folic acid

กลไกการออกฤทธิ์

ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase จึงอาจเรียกยาในกลุ่มนี้ว่าเป็น folate antagonists ซึ่งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ของแบคทีเรียจะมีความไวต่อยา trimethoprim มากกว่าเอนไซม์นี้ของคนหลายเท่า เอนไซม์ dihydrofolate reductase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง folate ไปเป็น tetrahydrofolate ซึ่งจะใช้ในการสังเคราะห์สารที่เป็น precursor ของ DNA และ RNA ต่อไป การยับยั้งเอนไซม์นี้จึงสามารถยับยั้งการสร้าง precursor ของ DNA และ RNA ได้ trimethoprim เป็น bacteriostatic เช่นกันและมักให้ร่วมกับยา sulfamethoxazole ซึ่งยาทั้งสองชนิดนี้จะช่วยเสริมฤทธิ์กันในการฆ่าเชื้อ trimethoprim ให้โดยการรับประทานและดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหารและกระจายไปยังเนื้อเยื่อต่างๆได้ดีการขับออกของ trimethoprim จะเพิ่มขึ้นในภาวะที่เป็นกรด

4. Aminoglycosides

ยาในกลุ่ม aminoglycosides ได้แก่ streptomycin, amikacin, tobramysin, netilmycin, neomycin, kanamycin, gentamycin

ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยทำให้การอ่านรหัส codon บน mRNA ผิดพลาดจึงยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนการออกฤทธิ์ของ aminoglycosides จะต้องอาศัยการพาเข้าเซลล์โดย O_2 dependent active transport ทำให้ยา aminoglycosides มีฤทธิ์ต่อเชื้อ ananreoic bacteria ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนน้อยมาก aminoglycoside มีฤทธิ์เป็น bactericidal และฤทธิ์ของยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้กับยาที่รบกวนการสังเคราะห์ cell wall เช่น penicillin

การดื้อยาเกิดขึ้นได้จากหลายกลไกเช่นการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาทำลายยาการลดการนำยาเข้าสู่เชื้อ

Aminoglycosides ได้ผลต่อเชื้อ gram negative bacteria เป็นส่วนใหญ่ และอาจให้ร่วมกับ penicillin ในกรณีการติดเชื้อ *Streptococcus* spp. เชื้อ *Listeria* spp. เชื้อ *Pseudomonas* spp.

Amikacin เป็นยาที่มี spectrum กว้างที่สุดส่วน neomycin และ kanamycin มี toxicity มากจะให้เฉพาะบริเวณ topical เท่านั้น

aminoglycoside มีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงไม่สามารถดูดซึมได้จากทางเดินอาหารจึงให้โดยการฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำหรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อยาขับออกทาง glomerular filtration หากไตมีความผิดปกติจะเกิดการสะสมของยาอย่างรวดเร็ว

5. Fluoroquinolones

เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA-gyrase ยาในกลุ่ม fluoroquinolones เป็น fluorinated analog ของ nalidixic acid ซึ่งเป็นยา quinolone ตัวแรกซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ลดลงมากเนื่องจากมี spectrum of activity ที่ต่ำกว่ายาในกลุ่มfluoroquinolones มาก ยากลุ่ม Fluoroquinolones ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้าง DNA ในขั้นตอน DNA replication โดยการยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการคลาย (relaxation) supercoiled DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการ transcription และ replication ของ DNA และยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase IV ซึ่งใช้ในการแยก chromosome ไปยัง daughter cell

quinolones ในรุ่นแรกได้แก่ nalidixic acid, oxolinic acid และ cinoxacin ซึ่งเป็นยาที่มี narrow spectrum of activity และใช้ในการรักษาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะส่วนล่างเท่านั้น fluoroquinolones รุ่นใหม่มีการพัฒนาครอบคลุมเชื้อได้ดีขึ้นโดยเริ่มแรกยากลุ่มนี้เป็นยาที่มีการออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อ gram negative bacteria ต่อมายาใหม่มีฤทธิ์ครอบคลุมต่อเชื้อกลุ่ม gram positive bacteria ได้ด้วยยา fluoroquinolones สามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามความสามารถในการออกฤทธิ์ได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ norfloxacin มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อกลุ่ม gram negative bacteria และมีฤทธิ์น้อยที่สุด

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ciprofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, levofloxacin, ofloxacin และ pefloxacin มีฤทธิ์ต่อเชื้อกลุ่ม gram negative bacteria ดีมากและมีฤทธิ์ปานกลางต่อเชื้อกลุ่มเชื้อกลุ่ม gram positive bacteria

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ clinafloxacin, gatifloxacin, sparfloxacin มีฤทธิ์ต่อเชื้อกลุ่ม gram positive bacteria ที่ดีขึ้นโดยเฉพาะต่อเชื้อ *Staphylococci* spp.

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ moxifloxacin, trovafloxacinมีฤทธิ์ต่อเชื้อกลุ่ม gram positive bacteria ดีมากขึ้น และมีฤทธิ์ต่อเชื้อเชื้อกลุ่ม anaerobic bacteria ด้วย

การดื้อยา fluoroquinolones เกิดจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการจับของยากับ topoisomerase II enzyme และการลดการนำยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและสามารถเกิดการดื้อยาข้ามชนิดในยากลุ่ม fluoroquinolones เหมือนกันได้ ยา fluoroquinolones ดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหารและกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆได้ดีการดูดซึมยาจะลดลงหากให้ร่วมกับยาลดกรดซึ่งมี divalent cations ส่วนมากยาถูกขับออกทางไต และห้ามใช้ยา fluoroquinolones ในหญิงที่ให้นมบุตรเนื่องจากยาถูกขับออกทางน้ำนมได้และไม่ควรใช้ยานี้ในหญิงตั้งครรภ์ด้วย

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา [4, 5, 6]

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาในหลอดทดลอง (susceptibility testing in vitro) จะช่วยให้สามารถเลือกใช้ยาได้อย่างเหมาะสมที่สุดเพื่อรักษาการติดเชื้อชนิดนั้นๆโดยเลือกใช้ยาที่มี narrow spectrum มากที่สุดค่าที่บ่งบอกถึงความไวของเชื้อต่อยาได้แก่

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (growth) ของเชื้อได้

Minimal Bactericidal Concentration (MBC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

Antimicrobial หมายถึง ยาหรือสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ทั้งที่เป็นยาปฏิชีวนะ และทั้งที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์

Antimicrobial susceptibility test หมายถึง การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพในห้องปฏิบัติการ (in vitro) มีหลายวิธีทดสอบ ได้แก่

1. Disk diffusion method เป็นการทดสอบที่ทำได้ง่าย ที่นิยมคือ Kirby Bauer method หลักการคือใช้ยาต้านจุลชีพใส่ในกระดาษกรองแผ่นกลมเล็กเรียกว่าแผ่น disk วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไม้พันสำลีป้ายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนวางแผ่นยาทดสอบ แล้วดูผลของยาที่ซึมออกไปรอบ ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยาจะไปยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อ ให้วัดบริเวณรอบ ๆ แผ่น disk ที่เชื้อไม่ขึ้นเทียบกับขนาดมาตรฐาน (standard inhibition zone) ที่กำหนดไว้สำหรับยาแต่ละชนิด แปลผลการทดสอบเป็น sensitive (S) หรือไวต่อยา เป็น intermediate sensitive (I) หรือไวปานกลาง และเป็น resistant (R) หรือดื้อยา โดยผล sensitive คือยาใช้ได้ผลในขนาดปกติที่ให้กับผู้ป่วย intermediate sensitive คือยาใช้ได้ผลเมื่อเพิ่มขนาดยาเป็นขนาดสูงสุด (maximum dose) ที่ให้กับผู้ป่วยได้และ resistant คือแม้จะให้ยาในขนาดสูงสุดแล้วก็ยังใช้ไม่ได้ผล

วิธีการทดสอบ disc diffusion method (Kirby-Bauer disc diffusion method) ใช้ลูปแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ 3-5 โคโลนี ใส่ลงใน tryptic soy broth นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 2-5 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญ แล้วนำปรับวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวิธี growth method ให้ได้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland ถ้าเชื้อขุ่นมากกว่าความขุ่นมาตรฐานให้เจือจางด้วย tryptic soy broth เชื้อที่มีความขุ่นนี้จะมีจำนวนเชื้อประมาณ 1-2x10^8 cfu/ml. จากนั้นใช้ sterile swab จุ่มลงในหลอดเชื้อ หมุน swab หลายๆครั้งเพื่อให้เชื้อซึมเข้าให้ทั่ว แตะ swab ที่ผิวด้านในหลอดแก้วบิดให้หมาดป้ายลงบน Mueller Hinton agar ให้เชื้อกระจายทั่วผิวของอาหารแล้วป้ายขอบด้านในของอาหารอีกครั้งหนึ่ง ปล่อยทิ้งไว้ให้

แห้ง ภายใน 15 นาทีหลังป้ายเชื้อแผ่นวางยาที่ต้องการทดสอบใช้ forcep ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการลนไฟแล้วทิ้งไว้ให้เย็นและกดทับแผ่นยาเบาๆ เพื่อให้แผ่นยาแนบติดกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำเข้าตู้อบที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยใช้ไม้บรรทัดวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้นรอบแผ่นยาทดสอบ (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตรและแปลผลการทดสอบตามคู่มือมาตรฐาน [5]

2. Broth dilution method เป็นการหาความเข้มข้นของยาที่มีขนาดต่ำสุดที่ยังสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อได้ ซึ่งเรียกว่า MIC (minimal inhibitory concentration) และหาความเข้มข้นของยาที่มีขนาดต่ำสุดที่ยังสามารถฆ่าเชื้อได้ ซึ่งเรียกว่า MBC (minimal bactericidal concentration) ยาใดที่ให้ค่า MIC ไม่เกิน serum level หรือระดับของยาในเลือดที่สามารถทำลายเชื้อได้โดยไม่เป็นพิษต่อร่างกาย แสดงว่าเป็นยาที่ให้ผล sensitive ใช้รักษาได้ผล ถ้ายาใดให้ค่า MIC สูงกว่า normal serum level แสดงว่าเป็นยาที่ให้ผล resistant ใช้รักษาไม่ได้ผล

MIC แตกต่างกับ MBC ที่ระดับความเข้มข้นของ MIC สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อ แต่เชื้ออาจจะยังไม่ตาย เพียงแต่หยุดแบ่งตัวเท่านั้น เมื่อใดที่มีความเข้มข้นของยาลดลง เชื้อก็สามารถแบ่งตัวต่อไปได้ แต่ระดับความเข้มข้นของ MBC นั้น เชื้อจะถูกฆ่าให้ตายไม่มีโอกาสแบ่งตัวได้อีก MIC จะมีค่าเท่ากับหรือต่ำกว่า MBC ยาในกลุ่ม bactericidal drug จะมีค่า MIC ใกล้เคียงกับ MBC ยาในกลุ่ม bacteriostatic drug จะมีค่า MBC สูงกว่า MIC มาก

วิธี Broth dilution มี 2 วิธีทดสอบ คือ

1. Macrobroth dilution โดยการเจือจางยาที่จะทำการทดสอบเป็น serial two fold dilution โดยใช้หลอดแก้วประมาณ 10 หลอด นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland แล้วนำมาเจือจาง 1:100 ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อจะได้แบคทีเรียจำนวนประมาณ 10^6 cfu/ml ใส่เชื้อจำนวนเท่า ๆ กันลงไปทุกหลอด นำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลโดยดูหลอดที่เชื้อไม่ขุ่น หลอดที่มียาเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่ขุ่นอ่านเป็นค่า MIC และควรทดสอบแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานควบคู่ไปด้วยเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

2. Microbroth dilution ใช้ microtiter plate แทนหลอดแก้ว เหมาะในการทดสอบครั้งละมากๆ เพราะช่วยประหยัดปริมาณของยาต้านจุลชีพและปริมาณเชื้อหลักการเตรียมสารต้านจุลชีพ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ การอบเพาะเชื้อ และการอ่านค่าแปลผล เช่นเดียวกันกับการทดสอบ Macrobroth dilution

3. Agar dilution method เป็นการทดสอบความไวโดยเจือจางสารต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเพาะแบคทีเรียบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจุดๆโดยเครื่องมือ inoculums replicating apparatus ซึ่งมี multipoint inoculators หรืออาจใช้หลอดฉีดยาทูเบอร์คูลินก็ได้

การเตรียมสารต้านจุลชีพต้องทราบค่า potency ของสารต้านจุลชีพ คำนวณปริมาณผงของสารมาตรฐานและสารจุลชีพที่ต้องการใช้ การคำนวณนี้จะต้องให้เข้มข้นกว่าความเป็นจริง 20 เท่าเนื่องจากสารต้านจุลชีพจะต้องถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 เท่า เมื่อชั่งผงมาตรฐานได้แล้วควรใส่ในหลอดปราศจากเชื้อนำมาละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสมกับยาต้านจุลชีพนั้น นำยาต้านจุลชีพที่ละลายแล้วมาเจือจางแบบ twofold dilution ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาต้านจุลชีพ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ Mueller Hinton agar นำมาต้มให้ละลายแล้วแบ่งใส่หลอด หลอดละ19 มิลลิลิตร นำไปนึ่งทำลายเชื้อแล้วตั้งในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำยาที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผสมให้เข้ากันเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวและตากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้ง

การเตรียมแบคทีเรียที่จะทดสอบ จำนวนแบคทีเรียที่จะเพาะควรมีปริมาณเชื้อ 10^4-10^5cfu/จุด เตรียมโดยการเพาะเชื้อในอาหารเหลว อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^8cfu/ml. นำมาเจือจาง 1:10 ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ จะได้เป็น 10^7cfu/ml. เมื่อนำ multipoint inoculators มาแตะเชื้อนี้จะติดประมาณเชื้อ 10^4-10^5cfu/หยด เมื่อปรับความขุ่นและเจือจางแล้วควรนำมาทดสอบภายใน 15 นาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อ

วิธีทำนำแบคทีเรียที่เตรียมแล้วมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมยาต้านจุลชีพ ใส่ใน inoculums replicating apparatus หลุมละ 0.5-1 มิลลิลิตร จากนั้นนำ multipoint inoculators แตะเชื้อในหลุมแล้วนำมาแตะบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อผสมยาต้านจุลชีพ เริ่มจากจานอาหารเพาะเชื้อที่ไม่มีความเข้มข้นของยาผสมก่อนเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตและความบริสุทธิ์ของเชื้อที่ใช้ทดสอบ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาแตะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาต้านจุลชีพความเข้มข้นน้อยก่อน และทำซ้ำไปหาจานเพาะเชื้อผสมความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพมาก นอกจากนี้ควรทดสอบร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานควบคู่ไปด้วยเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการทดสอบ เสร็จแล้ววางจานเพาะเชื้อในระนาบให้หยดแบคทีเรียแห้งแล้วคว่ำ นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การทดสอบด้วยวิธี Agar dilution method เป็นวิธีการที่ยุ่งยากไม่เหมาะกับงานประจำวัน มักใช้ในงานวิจัยหรืองานระบาดวิทยา การอ่านและการแปลผลให้อ่านค่าความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่แบคทีเรียไม่เจริญเป็นค่า MIC โดยค่า MIC นี้จะมีความถูกต้องและเชื่อถือได้เมื่อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานซึ่งเป็นตัวควบคุมได้ค่า MIC อยู่ในช่วงที่กำหนด

4. Epsilometer method หรือ E-test ใช้หลักการของ exponential gradient method สามารถการบอกค่า MIC วิธีการโดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 3-5 โคโลนี ใส่ลงใน tryptic soy broth ปรับวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้ได้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland จากนั้นใช้ sterile swabจุ่ มบิดให้หมาดป้ายลงบน Muller Hinton agar วางแผ่น plastic strip E-test ที่ต้องการทดสอบภายใน 15 นาที ให้แนบกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้ forcep กดเบาๆ เพื่อไล่ฟองอากาศและนำเข้าตู้อบที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 16-18 ชั่วโมง แผ่น plastic strip E-test ชุบยาด้วยความเข้มข้นสูงจากปลายด้านหนึ่งแล้วค่อยลดความเข้มข้นลงไปจนถึงปลายอีกด้านหนึ่ง มีขีดตัวเลขบอกค่าความเข้มข้น ตำแหน่งที่เป็นรอยต่อระหว่างเชื้อขึ้นและเชื้อไม่ขึ้นตรงกับระดับความเข้มข้นใด ก็จะเป็นค่า MIC ข้อดีของวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการหาค่า MIC แต่ข้อเสียคือ มีราคาแพง

การจัดกลุ่มเชื้อดื้อยา

คำนิยามเชื้อดื้อยาหลายขนาน [7] โดยแบ่งกลุ่มเชื้อดื้อยาตามรูปแบบการดื้อยามาตรฐานของ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

Multidrug resistance (MDR): หมายถึง เชื้อที่ดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งกลุ่มยานี้ได้แก่ aminoglycoside, carbapenem, cephalosporins, beta-lactam plus beta-lactamase inhibitor, quinolone

Extreme drug resistance (XDR): หมายถึง เชื้อที่ดื้อต่อยาทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่ม polymyxin หรือยากลุ่ม glycylcycline

Pandrug resistance (PDR): หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาทุกกลุ่ม รวมถึงยากลุ่ม polymyxin และ glycylcycline ด้วย

ตาราง 1 แสดงการแบ่งกลุ่มยาต่อเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae

Antimicrobial category	Antimicrobial agent
Aminoglycosides	Gentamicin
	Tobramycin
	Amikacin
	Netilmicin
Antipseudomonal penicillins + betalactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid
	Pipercillin-tazobactam
Carbapenems	Ertapenem
	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Non-extended spectrum cephalosporins; 1st and 2nd generation cephalosporins	Cefazolin
	Cefuroxime
extended spectrum cephalosporins; 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime or Ceftriaxone
	Ceftazidime
	Cefepime
Cephamycins	Cefoxitin
	Cefotetan
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole
Glycylcyclines	Tigecycline
Monobactams	Aztreonam
Penicillins	Ampicillin
Penicillins+betalactamase inhibitors	Amoxicillin-clavulanic acid
	Ampicillin-sulbactam

ตาราง 1 (ต่อ)

Antimicrobial category	Antimicrobial agent
Phenicols	Chloramphenicol
Phosphonic acid	fosfomycin
Polymyxins	Colistin
Tetracyclins	Tetracycline
	Doxyclycline
	Monocycline

ตาราง 2 แสดงการแบ่งกลุ่มยาต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrobial category	Antimicrobial agent
Aminoglycosides	Gentamicin
	Tobramycin
	Amikacin
	Netilmicin
Antipseudomonal carbapentms	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Antipseudomonal fluoroquinolone	Ciprofloxacin
	Levofloxacin
Antipseudomonal penicillins +	Ticarcillin-clavulanic acid
betalactamase inhibitors	Pipercillin-tazobactam
Monobactams	Aztreonam
Phosphonic acid	fosfomycin
Polymyxins	Colistin
	Polomycin B

ตาราง 3 แสดงการแบ่งกลุ่มยาต่อเชื้อ *Acinetobacter spp.*

Antimicrobial category	Antimicrobial agent
Aminoglycosides	Gentamicin
	Tobramycin
	Amikacin
	Netilmicin
Antipseudomonal carbapentms	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Antipseudomonal fluoroquinolone	Ciprofloxacin
	Levofloxacin
Antipseudomonal penicillins + betalactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid
	Pipercillin-tazobactam
Extended spectrum cephalosporins; 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime
	Ceftriaxone
	Ceftazidime
	Cefepime
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole
Penicillins+betalactamase inhibitors	Ampicillin-sulbactam
Polymyxins	Colistin
	Polomycin B
Tetracyclins	Tetracycline
	Doxyclycline
	Monocycline

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อที่ดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์ ESBL ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก Shio-Shin Jean, et al. [8] ทดสอบความไวของยาต่อกลุ่มเชื้อ extended-spectrum cephalosporin resistant gram-negative bacteria ที่แยกได้จากผู้ป่วยพบว่า เชื้อแกรมลบดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะ *A. baumanii* และ *P. aeruginosa*

Matthew E Falagas, et al. [9] ศึกษาการทดสอบความไวของเชื้อดื้อยารวมถึงเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ต่อ ยา fosfomycin จำนวน 17 งานวิจัย พบว่า ส่วนใหญ่ใช้ CLSI breakpoint สำหรับเชื้อ *E. coli* ในปัสสาวะเป็นมาตรฐานอ้างอิงในการทดสอบความไวของเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaciae และ 11 งานวิจัยจากทั้งหมดให้ผลการทดสอบความไวต่อยา fosfomycin มากกว่าร้อยละ 90

M. Eshwarappa, et al. [10] ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยที่มีกับไม่มีภาวะแทรกซ้อนที่แยกได้จากปัสสาวะและทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าทั้งสองกลุ่มมีเชื้อสาเหตุเป็นแกรมลบแบคทีเรียเป็นอับดับต้นๆ และโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะเป็นภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน แต่ร้อยละของการดื้อยาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนมีการดื้อยาสูงกว่ากลุ่มไม่มีภาวะแทรกซ้อน เชื้อ *E. coli* สร้างเอนไซม์ ESBL เกือบร้อยละ 50 และผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา carbapenems พบว่าให้ผลการทดสอบความไวสูงทั้งสองกลุ่ม

Larry M Bush, et al. [11] อธิบายข้อมูลยา levofloxacin เป็นยากลุ่ม fluoroquinolones ใช้รักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะมาเป็นเวลาหลายทศวรรษ ปัจจุบันถูกใช้อย่างแพร่หลายโดยทั่วไป ไม่เฉพาะกับโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบความไวของเชื้อต่อยา fosfomycin กับ ciprofloxacin ซึ่งเป็นยาในกลุ่มเดียวกัน ผลการทดสอบพบว่า levofloxacin ให้ผลความไวดีกว่ากลุ่มเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะแบบไม่มีภาวะแทรกซ้อนแต่ให้ผลความไวไม่แตกต่างกันกลุ่มเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะแบบที่มีภาวะแทรกซ้อน

Levofloxacin เป็นยาที่ให้ผลการรักษาทางคลินิกที่ดีใช้รักษาได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบและในกลุ่มที่สร้างเอ็นไซม์ ESBL มักให้ผลการทดสอบความไวในระดับต่ำ มีผลข้างเคียงในการรักษาน้อย กลไกการดื้อยาของเชื้อโดยการขับยาออกหรือเปลี่ยนตัวเป้าหมาย

Hsin-Yi Liu, et al. [12] ศึกษาผลความไวของยา fosfomycin ต่อเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumonia*ที่สร้างเอ็นไซม์ ESBL ในปัสสาวะผู้ป่วยในประเทศไต้หวันเปรียบเทียบกับยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ พบว่า fosfomycin ให้ผลความไวของเชื้อดีในเชื้อกลุ่ม *E. coli* ที่สร้างเอ็นไซม์

ESBL และเสนอให้ใช้ยา fosfomycin เป็นยาทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในปัสสาวะ

เก็บจากตัวอย่างปัสสาวะที่ส่งตรวจเพาะเชื้อและทดสอบความไวของยาที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ ตั้งแต่ วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2555 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2555 ปัสสาวะที่บรรจุในภาชนะปราศจากเชื้อถูกนำส่งในห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชั่วโมง หรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar (MAC) โดยวิธีลูปมาตรฐาน (calibrated-loop method) นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียแกรมลบและคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (colony forming unit per milliliter, cfu/ml.) โดยปัสสาวะจากช่วงกลางจะมีค่านัยสำคัญตั้งแต่ 10^5cfu/ml. และปัสสาวะจากสายสวนจะมีค่านัยสำคัญตั้งแต่ 10^4cfu/ml. พิสูจน์ชนิดแบคทีเรียแกรมลบโดยทำการทดสอบทางชีวเคมีได้แก่ การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) การทดสอบ Lysine-Indole-Motile Medium (LIM) การทดสอบ Motility การทดสอบ Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) การทดสอบ Urea-hydrolysis การทดสอบ Citrate utilization การทดสอบ Malonate การทดสอบ Sorbital การทดสอบ DNase การทดสอบ Lactose การทดสอบ Cetrimine การทดสอบ Oxidase และ การทดสอบ Oxidation-Fermentation (O/F)

การเลือกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะถูกเก็บใน 15% glycerol ที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทดสอบนำมา subculture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MAC เพื่อทำการศึกษาความไวของยาต่อไป

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

นำเชื้อแบคทีเรียเก็บใน 15% glycerol ที่ -20 องศาเซลเซียส ออกมาวางที่อุณหภูมิห้องจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้ว sub culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อบเพาะเชื้อเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมงเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะเหมือนกัน 3-5 โคโลนีนำไปทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาโดยวิธี disk diffusion method โดยวิธี Kirby-Bauer disc diffusion method โดยใช้ลูปแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ 3-5 โคโลนี เพื่อให้ได้เชื้อ 10^4 – 10^5cfu/ml ใส่ลงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth [5] นำเข้าตู้อบที่ 35 องศาเซลเซียสเวลา 1-2 ชั่วโมง นำมาปรับวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland เชื้อที่ได้จะมีปริมาณ 10^8cfu/mlจากนั้นใช้ sterile swab จุ่มบิดให้หมาดป้ายลงบน Muller Hinton agar โดยใช้เครื่อง spreader แล้ววางแผ่นยาที่ต้องการทดสอบใช้ forcep ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการลนไฟแล้วทิ้งไว้ให้เย็นและกดทับแผ่นยาเบาๆเพื่อให้แผ่นยาแนบติดกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำเข้าตู้อบที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยใช้ เวอร์เนีย คาลิบเปอร์ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้นรอบแผ่นยาทดสอบหน่วยเป็นมิลลิเมตร [5] และแปลผลการทดสอบตามคู่มือมาตรฐาน Clinical Laboratory Standards Institute ปี ค.ศ. 2012 (CLSI 2012) โดยใช้เชื้อมาตรฐาน *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นตัวควบคุมคุณภาพเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins ได้แก่ cefazolin (30 µg) และ cefotaxime (3 µg) ในเชื้อจีนัส *Enterobacteriaciae* และยา ceftazidime (30 µg) ในเชื้อกลุ่มไม่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส (Non-fermentative gram negative bacilli; NFB)

แผ่นยาต้านจุลชีพที่นำมาทดสอบ

ตาราง 4 แสดงกลุ่มและชนิดของยาที่นำมาทดสอบ

Antimicrobial category	Antimicrobial agent
Aminoglycosides	Gentamicin
	Amikacin
Antipseudomonal penicillins + betalactamase inhibitors	Amoxicillin-clavulanic acid
	Cefoperzone-sulbactam
	Pipercillin-tazobactam
Carbapenems	Ertapenem
	Imipenem
	Meropenem

ตาราง 4 (ต่อ)

Antimicrobial category	Antimicrobial agent
Non-extended spectrum cephalosporins; 1st and 2nd generation cephalosporins	Cefazolin
extended spectrum cephalosporins; 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime
	Ceftazidime
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin
	Norfloxacin
	Levofloxacin
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole
Glycylcyclines	Tigecycline
Penicillins	Ampicillin
Phosphonic acid	fosfomycin
Polymyxins	Colistin

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้อบเพาะเชื้อทดสอบความไวของยา 35 องศาเซลเซียส Memmert
2. ตู้อบเพาะเชื้อแบคทีเรีย 35 องศาเซลเซียส INCUCELL รุ่น 111
3. ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 องศาเซลเซียส SANYO
4. ตู้แช่แข็งเก็บแผ่นยาที่ใช้ทดสอบและเชื้อแบคทีเรีย -20 องศาเซลเซียส SANYO
5. เครื่องดูดอากาศ Laminar air flow (Class II) FASTER รุ่น BHA48
6. เครื่อง Autoclave
7. เครื่อง Spreader
8. เครื่องผสมสาร (mixer)
9. เครื่องวัดความขุ่น
10. เครื่องวางแผ่นยา (dispensor)
11. เวอร์เนีย คาลิบเปอร์

12. เพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ
13. หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยกชนิดแบคทีเรีย
14. ลูปพลาสติกสำหรับ streak เพลท

บทที่ 4

ผลการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

ผลการทดสอบพบว่า ปัสสาวะที่ส่งเพาะเชื้อพบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 1,422 ไอโซเลต เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมดที่แยกได้ คือ เชื้อ *Escherichia coli* จำนวน 382 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 26.87 เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* จำนวน 71 ไอโซเลต คิดเป็น 4.99 % *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 39 ไอโซเลต คิดเป็น 2.74 % เชื้อ *Enterobacter* spp. จำนวน 35 ไอโซเลต คิดเป็น 2.46 %และ เชื้อ *Acinetobacter baumannii* จำนวน 21 ไอโซเลต คิดเป็น 1.47 % และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆดังแสดงในตาราง 5

ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่แยกได้ต่อยากลุ่ม cephalosporins พบว่ามีจำนวน 122 ไอโซเลต ที่ดื้อยา cephalosporins ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 5 แสดงชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบ

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์
Escherichia coli	382	26.87
Klebsiella pneumoniae	71	4.99
Pseudomonas aeruginosa	39	2.74
Enterobacter spp.	35	2.46
Acinetobacter baumannii	21	1.47
Proteus mirabilis	20	1.40
Citrobacter spp.	6	0.42
Salmonella spp.	3	0.22
Aeromonas spp.	1	0.07
Serratia marcescens	1	0.07
Burkholderia pseudomallei	1	0.07
Other bacteria	842	59.22
Total	1,422	100.00

ตาราง 6 แสดงชนิดเชื้อแบคทีเรียที่พบและดื้อยากลุ่ม cephalosporins

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตที่ดื้อ cephalosporins (เปอร์เซ็นต์)
Escherichia coli	382	76 (19.89)
Klebsiella pneumoniae	71	19 (26.76)
Pseudomonas aeruginosa	39	7 (17.95)
Enterobacter spp.	35	13 (37.15)
Acinetobacter baumannii	21	7 (33.34)

ผลความไวต่อยากลุ่มอื่นๆ ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins

ตาราง 7 แสดงผลความไวต่อยากลุ่มอื่นๆ ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins

ยาต้านจุลชีพ	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*Enterobacter* spp.	*P. aeruginosa*	*A. baumannii*
Amikacin	26.3	0	46.15	85.71	57.14
Gentamicin	71.05	52.63	92.31	85.71	100
Ceftazidime	78.95	100	100	ND	ND
Amoxcillin/Clavulanic acid	57.89	63.16	100	ND	ND
Cefoperazone/Sulbactam	18.42	36.84	92.31	85.71	28.57
Piperacillin/Tazobactam	25	36.84	92.31	85.71	100
Ertapenem	5.26	10.53	ND	84.61	ND
Imipenem	2.63	5.26	0	85.71	57.14
Meropenem	0	10.53	0	85.71	57.14
Fosfomycin	3.95	10.53	15.39	ND	ND

ตาราง 7 (ต่อ)

ยาต้านจุลชีพ	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*Enterobacter* spp.	*P. aeruginosa*	*A. baumannii*
Norfloxacin	92.1	84.21	84.61	85.71	ND
Ciprofloxacin	ND	ND	ND	ND	100[(a)]
Levofloxacin	ND	ND	ND	ND	100
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	85.2	73.68	92.31	100	57.14
Tigecycline	ND	ND	ND	0[(b)]	57.14
Colistin	ND	ND	ND	0[(b)]	0

หมายเหตุ: (a) = จำนวน 5 ไอโซเลต (b) = จำนวน 2 ไอโซเลต, ND = Not Done

รูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins

พบว่า เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins จำนวน 122 ไอโซเลตนำมาทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มอื่นๆ ให้ผลการทดสอบเป็นเชื้อที่ดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (multidrug resistance: MDR) จำนวน 84 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อ *E. coli* จำนวน 50 ไอโซเลต เชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 10 ไอโซเลต เชื้อ *Enterobacter* spp. จำนวน 11 ไอโซเลต เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 7 ไอโซเลต และ เชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 6 ไอโซเลต และโดยเชื้อ *A. baumannii* ไม่พบรูปแบบการดื้อยา extreme drug resistance (XDR) หรือ pandrug resistance (PDR)

ตาราง 8 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins และให้ผลทดสอบเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance: MDR)

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลตเชื้อดื้อยาหลายขนาน	เปอร์เซ็นต์
Escherichia coli	50	65.8
Klebsiella pneumoniae	10	52.6
Pseudomonas aeruginosa	6	85.7
Enterobacter spp.	11	84.6
Acinetobacter baumannii	7	100

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่แยกได้จากการเพาะเชื้อปัสสาวะมากที่สุด ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* และให้ผลการทดสอบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins มากที่สุด เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins ในกลุ่ม Enterobacteericiae ให้ผลทดสอบความไวต่อยากลุ่ม carbapenems มากที่สุดโดย เชื้อ *E. coli* ให้ผลทดสอบความไวไว 100% ต่อยา meropenem เชื้อ *K. pneumoniae* ให้ผลทดสอบความไว 100% ต่อยา amikacin เชื้อ *P. aeruginosa* ให้ผลทดสอบความไว 100% ต่อยา tigecycline และ colistin และ เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ให้ผลทดสอบความไว 100% ต่อยา colistin

เชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อยากลุ่ม cephalosporins พบว่า มีรูปแบบการดื้อยาเป็น MDR เท่านั้น แต่ไม่พบรูปแบบการดื้อยา XDR หรือ PDR

อภิปรายผล

จากผลการทดสอบพบว่า เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เพาะได้จากปัสสาวะผู้ป่วยในครั้งนี้เป็นเชื้อที่สอดคล้องกับการรายงานผลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติและงานวิจัยอื่นๆ [8, 9, 17] เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่แยกได้จากการเพาะเชื้อปัสสาวะมากที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง ได้แก่ เชื้อ *E. coli* จำนวน 382 ไอโซเลต จากทั้งหมด 1,422 ไอโซเลต คิดเป็น 26.87 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kahlmeter, et al. [13] ที่ได้ทำการเพาะเชื้อจากปัสสาวะพบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแยกได้เป็นเชื้อ *E. coli* จำนวน 486 ไอโซเลต จากทั้งหมด 908 ไอโซเลต คิดเป็น 53.52 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Manjunath, et al. [14] ที่ได้ทำการเพาะเชื้อจากปัสสาวะผู้ป่วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสูงสุด ได้แก่ *E. coli* จำนวน 3,760 ไอโซเลต จากทั้งหมด 6,350 ไอโซเลต คิดเป็น 59.21 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยนี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins 76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Manjunath, et al. [14] ที่ได้พบว่าเชื้อ *E. coli* ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins 62 เปอร์เซ็นต์ด้วยเช่นเดียวกัน

งานวิจัยนี้พบว่า เชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins จะให้ผลการทดสอบดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones ด้วย เชื้อแบคทีเรียแกรมลบให้ผลการทดสอบดื้อยา norfloxacin มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดย เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา ciprofloxacin 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Pankaj Baral, et al. [15] ที่ได้ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียในปัสสาวะพบว่าเชื้อ *E. coli* มากที่สุดคิดเป็น 81.3 เปอร์เซ็นต์ด้วยเช่นกัน แต่ผลการทดสอบความไวต่อยา norfloxacin ให้ผลการทดสอบเป็นดื้อต่อยา norfloxacin 36.5 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่งานวิจัยนี้พบการเชื้อ *E. coli* ดื้อต่อยาสูงถึง 92.1 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นผลมาจากการเลือกใช้ยา norfloxacin รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะเป็นอันดับแรก

เชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins มีรูปแบบการดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (multidrug resistance: MDR) โดยเชื้อ *E. coli* จากจำนวน 76 ไอโซเลตเป็น MDR จำนวน 50 ไอโซเลต คิดเป็น 65.8 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสอดคล้อง กับงานวิจัยของ Shohren Farshad, et al. [16] ที่ได้ทำการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ที่เพาะจากปัสสาวะพบว่าเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins จำนวน 10 ไอโซเลต เป็นเชื้อดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป จำนวน 9 ไอโซเลต คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins มักเป็นเชื้อดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

[1] มาลัย วรจิตร. (2545). **แบคทีเรียก่อโรค**. กรุงเทพฯ: สยามศิลปการพิมพ์.

[2] ดิษยา วัฒนาไพศาล. (2554). **การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ**. กรุงเทพฯ: ประชาชน.

[3] สุภาภรณ์ พัวเพิ่มพูนศิริ และเกษแก้ว เพียรทวีชัย. (2549). **แบคทีเรียวินิจฉัย**. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

[4] วิจิตร ทองนอก. (2542). **คู่มือปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป**. กรุงเทพฯ: กองโรงพยาบาลภูมิภาค กระทรวงสาธารสุข.

[5] สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์. (2557). การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ. ใน มาลัย วรจิตร (บรรณาธิการ), **คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและรา สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป** (หน้า 247-249). กรุงเทพฯ: ธนาเพรส.

[6] นิรันดร์ จ่างคง. (2553). Clinical Application of In Vitro Microbiology Laboratory Tests. ใน ณัฐาศิริ ฐานะวุฑฒ์ (บรรณาธิการ), Trends in Infectious disease pharmacotherapy (หน้า 24-28). กรุงเทพฯ: ประชาชน.

[7] Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli y., Falagas, M.E., Giske, C.G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, 18, 268-281.

[8] Jean, S.S., Teng, L.J., Hsueh, P.R., Ho, S.W. and Luh, K.T. (2002). Antimicrobial susceptibilities among clinical isolates of extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria a Taiwan University Hospital. J Antimicrob Chemother, 49(1), 69-76.

[9] Falagas, M.E., Kastoris, A.C., Kapaskelis, A.M. and Karageorgopoulos, D.E.(2010). Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including entended-spectrum beta-lactamase producing, Enterobacteriaceae infection: A systematic review. **Lancet Infect Dis**, 10(1), 43-50.

[10] Eshwarappa, M., Dosegowda, R., Aprameya, I.V., Khan, M.W., Kumar, P.S. and Kempegowda, P. (2011). Clinico-microbiological profile of urinary tract infection in south India. **Indian J Nephrol**, 21(1), 30-36.

[11] Larry, M.B., Fredy, C.R., Victor, O. and Joseph, E. (n.d.). Cumulative clinical experience from over a decade of use levofloxacin in urinary tract infection: Critical appraisal and role in therapy. **Infect drug resist,** 4, 177-189.

[12] Liu, H.Y., Lin, H.C., Lin, Y.C., Yu, S.H., Wu, W.H. and Lee, Y.J. (2011). Antimicrobial susceptibilities of urinary entended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect,** 44(5), 364-368.

[13] Kahlmeter, G. and Poulsen, H.O. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: The ECO.SENS study revisited. Inter J Antimicrob Agents, 39(1), 45-51.

[14] Manjunath, G.N., Prakash, R., Vamseedhar, A. and Kiran, S. (2011). Changing trends in the spectrum of antimicrobial drug resistance pattern of uropathogens isolated from hospitals and community patients with urinary tract infections in Tumkur and Bangalore. Inter J Biol Med Res, 2(2), 504-507.

[15] Baral, P., Neupane, S., Marasini, B.P., Ghimire, K.R., Lekhak, B. and Shrestha, B. (2012). High prevalence of multidrug resistance in bacterial uropathogens from Kathmandu, Nepal. BMC Res Notes, 5, 38.

[16] Shohreh, H., Riza, R., Mojtaba, A., Maneli, A.H. and Marziyeh, H. (2010). Emergence of Multi Drug Resistant Strains of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection. TOPROCJ, 1, 192-196.

[17] ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). Percent susceptibility of organisms isolated from urine, 60 hospitals. สืบค้นเมื่อ 6 มิถุนายน 2559, จาก http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiograms/2015/9/Jan-Sep2015-Urine.pdf

[18] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). **Performance standards for antimicrobial susceptibility: Twenty-first informational supplement.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

ภาคผนวก

1. การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ทดสอบคุณภาพ

1.1 การเก็บรักษาระยะยาว เก็บเชื้อใน fetal calf serum ผสมกับ glycerol หรือ skimmed milk ผสมกับ glycerol ใส่ใน vial เล็กๆ แล้วเก็บใส่กล่องในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส

1.2 การเก็บระยะสั้น เพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบ media และเชื้อมาตรฐานชนิดต่างๆ โดย subculture เดือนละ 2 ครั้ง เก็บไว้ในตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียส

1.3 ซื้อที่ใช้งานประจำวัน เพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ media โดย subculture สัปดาห์ละครั้ง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีทั้งชนิดสำเร็จรูปที่จัดซื้อจากบริษัทเอกชนและชนิดที่เตรียมเอง

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

Sheep blood agar (SDA) บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อและบรรจุจัดส่งเป็นแพค ถูกตรวจสอบและควบคุมคุณภาพมาตั้งแต่ขั้นตอนการผลิตจากบริษัทผู้ผลิต เมื่อถูกจัดส่งมาจะถูกนำเก็บตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียส โดยเรียงลำดับตามวันหมดอายุ และเมื่อต้องการใช้งานให้นำออกจากตู้เย็นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้หายเย็นก่อน จึงนำไปทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเอง

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MacCONKEY (MAC) Agar

1) MAC เป็น moderately inhibitory media ใช้แยกกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก และ fastidious gram negative bacteria บางชนิด มี lactose เป็นแหล่งของ carbohydrate และ neutral red เป็น indicator เชื้อที่สามารถย่อยสลาย lactose จะให้โคโลนีสีชมพู-แดง หลังจากเพาะเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เชื้อที่ไม่ย่อยสลาย lactoes (non lactose fermenting bacteria) จะให้โคโลนีใสไม่มีสี อาหารที่เตรียมสามารถเก็บไว้ในตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน

2) การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

เชื้อ *Escherichia coli* เชื้อเจริญเป็นโคโลนีสีชมพู (lactose fermenter)

เชื้อ *Proteus mirabilis* เชื้อเจริญเป็นโคโลนีไม่มีสี (non lactose fermenter)

เชื้อ *Staphylococcus spp.* เชื้อไม่เจริญ

2.2.2 Mueller Hinton Agar (MHA)

1) MHA เป็นอาหารที่แนะนำโดย CLSI ใช้สำหรับทดสอบหาความไว non fastidious microorganisms ต่อสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ โดยวิธี disk diffusion method อาหารที่เตรียมสามารถเก็บไว้ในตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียส ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 7 วัน

2) การควบคุมคุณภาพ

2.1) อาหารที่เตรียมเสร็จแล้วต้องมี pH 7.2 - 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง

2.2) ความหนาของอาหารในจานเพาะเชื้อต้องหนา 4 มิลลิเมตร และสม่ำเสมอทั่วจาน

2.3) อาหารที่นำมาใช้ต้องไม่แห้ง

2.4) การทำ Quality control กับเชื้อที่ใช้ทดสอบ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922, เชื้อ *E. coli* ATCC 3521 เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ผลตามที่กำหนด

2.2.3 วิธีตรวจสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบทางคุณภาพโดยเขี่ยเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกและเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ อบที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง และทดสอบการปราศจากเชื้อโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 5 ของจำนวนที่ผลิต อบที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจการเจริญของเชื้อหรือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นถ้าอาหารที่เตรียมไม่ได้คุณภาพ ต้องหาสาเหตุความผิดพลาด แก้ไข แล้วเตรียมใหม่ ห้ามนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้คุณภาพมาใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการควบคุมคุณภาพแล้วนำ เก็บตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียส โดยเรียงลำดับตามผลิตเพื่อใช้งานต่อไป

3. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

ได้แก่ การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) การทดสอบ Lysine-Indole-Motile Medium (LIM) การทดสอบ Motility การทดสอบ Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) การทดสอบ Urea-hydrolysis การทดสอบ Citrate utilization การทดสอบ Malonate การทดสอบ Sorbital การทดสอบ DNase การทดสอบ Lactose การทดสอบ Cetrimine การทดสอบ Oxidase และการทดสอบ Oxidation-Fermentation (O/F)

3.1 การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI)

TSI ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิดคือ sucrose lactose และ glucose ในสัดส่วน 10:10:1 ทดสอบการสร้าง H_2S โดยมี sodium thiosulfate เป็นแหล่งของ sulfur atoms มี ferric ammonium citrate ซึ่งทำปฏิกิริยากับ H_2S ให้ตะกอนสีดำของ ferrous sulfide ในหลอด TSI

ส่วนที่เป็น slant มีภาวะ aerobicเพราะสัมผัสกับ oxygen ในอากาศ ขณะที่ส่วนใหญ่เป็น bitt มีภาวะเป็น anaerobe เพราะไม่สัมผัสกับอากาศ การสร้าง CO_2 และ H_2Sตรวจได้จากการพบฟองอากาศในอาหาร การทดสอบใช้ needle ปราศจากเชื้อ แตะโคโลนีของเชื้อที่อยู่เดี่ยวๆ หรือเชื้อในอาหารเหลวเทลงให้ถึงก้นหลอด และขีดที่หน้า slant อบเชื้อไว้ 16-18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ (K/N) แสดงว่าไม่หมักย่อยน้ำตาลในอาหาร เชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae ถ้าเชื้อย่อยสลาย glucose อย่างเดียว จะให้สีเหลืองที่ butt ส่วน slant จะเป็นสีแดงเนื่องจากการย่อย peptone ในภาวะที่มีออกซิเจนจะได้เป็น K/A ถ้าได้ A/A แสดงว่าย่อยสลาย glucose และ lactose หรือ sucrose

การควบคุมคุณภาพ

Salmonella Typhi = K/A, H_2S

Shigella sonnei = K/A

Citrobacter freundii = A/A, gas+

3.2 **การทดสอบ** Lysine-Indole-Motile Medium (LIM)

ใช้ทดสอบปฏิกิริยาได้ 4 ชนิดในหลอดเดียว คือ การทดสอบ lysine decarboxylase การทดสอบ lysine deaminase การทดสอบ indole และ การทดสอบ motile วิธีการคือใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบแทงลงไปจนถึงก้นหลอดอาหาร อบเชื้อไว้ 16-18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

3.2.1 Lysine decarboxylase test (LDC) ในอาหารมีน้ำตาล glucose ในปริมาณน้อย เริ่มแรกเชื้อจะหมักย่อย glucose หมด เปลี่ยนสี indicator เป็นสีเหลือง จากนั้นเชื้อจะไปใช้อาหารอื่นและถ้าเชื้อนั้นมีเอนไซม์ decarboxylase ที่จำเพาะต่อกรดอะมิโนที่ใช้ทดสอบ (lysine) จะย่อยอะมิโนได้เป็นเอมีน มีฤทธิ์เป็นด่าง และเปลี่ยนสี indicator จากเหลืองเป็นม่วง

ผลบวก อาหารที่ส่วนล่างมีสีม่วง

ผลลบ อาหารที่ส่วนล่างเป็นสีเหลือง

3.2.2 Lysine deaminase (LDA)

ผลบวก มีสีแดงที่ผิวหน้าอาหาร ประมาณ1/4ของหลอด

ผลลบ ไม่เกิดสีแดงที่ผิวหน้าอาหาร

3.2.3 **การทดสอบ** Indole

จุลชีพที่สามารถสร้างเอนไซม์ trytophanase จะเปลี่ยน trytophan เป็น indole ตรวจหา indole ได้โดยเติม p-dimethyaminobenzaldehyde (Ehlich's หรือ Kovac's reagent) ลงในอาหารเหลวที่มี trytophan ผลบวกจะมีสีแดงบนชั้นของอาหารเหลว ผลลบจะเห็น

เป็นสีเหลืองของน้ำยา การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ *Escherichia coli* เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพผลบวก และ เชื้อ *Enterobacter cloacae* เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพผลลบ

3.2.4 **การทดสอบ** Motile

เชื้อที่เคลื่อนที่ได้จะเจริญออกมารอบๆรอบ stab ทำให้อาหารขุ่น ส่วนเชื้อที่ไม่เคลื่อนที่จะเจริญเฉพาะรอยที่แทงเท่านั้น

ผลบวก เชื้อเจริญมานอกรอยแทงจนทำให้อาหารขุ่น

ผลลบ เชื้อเจริญเฉพาะรอยแทงเท่านั้น

3.3 **การทดสอบ** Motility

ใช้ทดสอบว่าแบคทีเรียเคลื่อนไหวได้หรือไม่ ซึ่งแบคทีเรียเคลื่อนไหวโดย flagella ซึ่งพบในแบคทีเรียที่เป็นรูปแท่ง แบคทีเรียที่เคลื่อนไหวได้อาจมี flagella เส้นเดียวหรือหลายเส้นก็ได้ ตำแหน่งของ flagella อาจแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิดและภาวะที่เลี้ยงเชื้อ ในบางครั้งแบคทีเรียที่เคลื่อนไหวได้อาจเป็นแบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนไหว แบคทีเรียที่เคลื่อนไหวไม่ได้ไม่มี flagella

การควบคุมคุณภาพ

Klebsiella pneumonia = non motile

Enterobacter cloacae = motile

3.4 **การทดสอบ** Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP)

3.4.1 ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้างและคงไว้ซึ่งกรดการย่อยสลาย glucose เป็นการตรวจปริมาณของกรด (quantitative test) เชื้อบางชนิดสร้างกรดจำนวนมากว่าบางชนิด อ่านผลโดยเติม methyl red reagent ผลบวกให้สีแดง ผลลบให้สีเหลือง

3.4.2 ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้าง acetylmethylcarbinol (acetoin) จากการย่อยสลาย glucose ในภาวะที่เป็นกลางอ่านผลโดยเติม 5% alpha-naphthol ใน absolute ethyl alcohol และ 40% potassium hydroxide ผลบวกให้สีแดง ผลลบเป็นสีน้ำตาล

3.4.3 การควบคุมคุณภาพ

Escherichia coli ให้ ผล MR+ มี สีแดง ผล VP- มี สีน้ำตาล

Enterobacter spp. ให้ ผล MR- มี สีเหลือง ผล VP+ มี สีแดง

3.5 **การทดสอบ** Urease

ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้างเอนไซม์ urease ไป hydrolyze urea ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ammonium และ CO_2และรวมเป็น ammonium carbonate ซึ่งเป็นด่าง

มีค่า pH 8.1 ในอาหารมี phenol red เป็น indicator เมื่อได้ด่างจะเกิดสีชมพูเข้ม ผลลบอาจไม่เปลี่ยนสี

ควบคุมคุณภาพ

Proteus mirabilis = positive (สีชมพูเข้ม)

Escherichia coli = negative (ไม่เปลี่ยนสี)

3.6 **การทดสอบ** Malonate

ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการใช้ sodium malonate **เป็นแหล่งของ** carbon ถ้าสามารถใช้ได้จะให้ผลลัพธ์ที่เป็นด่าง โดยมีข้อควรระวังในการอ่านผลดังนี้**การอ่านผล** malonate เป็นการอ่านความเป็นด่างในอาหารไม่ใช่อ่านการใช้ Malonate เชื้อบาง**ชนิดให้ด่าง** จำนวนน้อยการอ่านผลจึงควรเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อและการอ่านผลลบต้**องอ่านเมื่อ**อบหลอดที่ใส่เชื้อไว้ครบ 48 ชั่วโมง การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* **เป็นเชื้อ**ควบคุมคุณภาพผลบวกให้สีน้ำเงินและ เชื้อ *Escherichia coli* เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพ**ผลลบให้สี**

3.7 **การทดสอบ** Oxidation-Fermentation (OF)

OF-basal medium เป็น based ที่ใช้เติมน้ำตาลต่างๆ 1% เพื่อทดสอบ oxidative หรือ fermentative metabolism ของ carbohydrate ในแบคทีเรียที่สามารถ ferment **น้ำตาลใน**หลอดจะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองในภาวะที่มีและไม่มี oxygen แต่ถ้าเหลืองเฉพาะ**ภาวะที่มี** oxygen เท่านั้นแสดงว่าเชื้อสามารถ oxidize น้ำตาลในหลอด ถ้าอาหารไม่มีการเปลี่**ยนแปลงทั้ง**ภาวะที่มีและไม่มี oxygen แสดงว่าแบคทีเรียนั้นเป็นเชื้อ non-oxidizer สำหรับน้ำตาลใน**หลอด**

การควบคุมคุณภาพ

Escherichia coli = fermenter

Pseudomonas aeruginosa = oxidizer

4. ตารางแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย

ตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute ปี ค.ศ. 2012

Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Table 2A. Zone Diameter and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Standards for *Enterobacteriaceae*

Testing Conditions	Minimal Quality Control (QC) Recommendations (See Tables 3A and 4A for acceptable QC ranges.)
Medium: Disk diffusion: Mueller-Hinton agar (MHA) Broth dilution: cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) Agar dilution: MHA	*Escherichia coli* ATCC®[a] 25922 *Escherichia coli* ATCC® 35218 (for β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations)
Inoculum: Growth method or direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard	
Incubation: 35±2°C; ambient air; Disk diffusion: 16 to 18 hours Dilution methods: 16 to 20 hours	

[a] ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Refer to Table 2A Supplemental Tables 1, 2, and 3 at the end of Table 2A for additional recommendations for testing conditions, reporting suggestions, and QC.

General Comments

(1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and 5 disks on a 100-mm plate (see M02 Section 9.2). Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black, nonreflecting background illuminated with reflected light. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. Strains of *Proteus* spp. may swarm into areas of inhibited growth around certain antimicrobial agents. With *Proteus* spp., ignore the thin veil of swarming growth in an otherwise obvious zone of growth inhibition. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter.

(2) When fecal isolates of *Salmonella* and *Shigella* spp. are tested, only ampicillin, a fluoroquinolone, and trimethoprim-sulfamethoxazole should be reported routinely. In addition, for extraintestinal isolates of *Salmonella* spp., a third-generation cephalosporin should be tested and reported, and chloramphenicol may be tested and reported if requested.

(3) The dosage regimens shown in the comment column below are those required to achieve plasma drug exposures (in adults with normal renal and hepatic functions) on which breakpoints were based. When implementing new breakpoints, it is strongly recommended that laboratories share this information with infectious disease practitioners, pharmacists, pharmacy and therapeutics committees, and infection control committees.

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm S	I	R	MIC Interpretive Criteria (µg/mL) S	I	R	Comments
PENICILLINS									
A	Ampicillin	10 µg	≥17	14–16	≤13	≤8	16	≥32	(4) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See comment (2).
B	Piperacillin	100 µg	≥21	18–20	≤17	≤16	32–64	≥128	
D	Mecillinam	10 µg	≥15	12–14	≤11	≤8	16	≥32	(5) For testing and reporting of *E. coli* urinary tract isolates only.
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
B	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≥18	14–17	≤13	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12–14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18–20	≤17	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4	
B	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥20	15–19	≤14	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2	
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
	(6) WARNING: For *Salmonella* spp. and *Shigella* spp., first- and second-generation cephalosporins and cephamycins may appear active *in vitro*, but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.								
	(7) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions, revised interpretive criteria for cephalosporins (cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftizoxime, and ceftriaxone) and aztreonam were first published in January 2010 (M100-S20) and are listed in this table. Cefazolin interpretive criteria were revised again in June 2010 and are listed below. Cefepime and cefuroxime (parenteral) were also evaluated; however, no change in interpretive criteria was required for the dosages indicated below. When using the current interpretive criteria, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (ie, it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins from susceptible to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current interpretive criteria, ESBL testing should be performed as described in Table 2A Supplemental Table 1. Note that interpretive criteria for drugs with limited availability in many countries (eg, moxalactam, cefoniclid, cefamandole, and cefoperazone) were not evaluated. If considering use of these drugs for *E. coli*, *Klebsiella*, or *Proteus* spp., ESBL testing should be performed (see Table 2A Supplemental Table 1). If isolates test ESBL positive, the results for moxalactam, cefoniclid, cefamandole, and cefoperazone should be reported as resistant. (8) *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Serratia* may develop resistance during prolonged therapy with third-generation cephalosporins as a result of derepression of AmpC β-lactamase. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.								
A	Cefazolin	30 µg	≥23	20–22	≤19	≤2	4	≥8	(9) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 2 g every 8 h. See comment (7).
U	Cephalothin	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(10) Cephalothin interpretive criteria can be used only to predict results to the oral agents, cefadroxil, cefpodoxime, cephalexin, and loracarbef. Older data that suggest that cephalothin results could predict susceptibility to some other cephalosporins may still be correct, but there are no recent data to confirm this.

Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm S	I	R	MIC Interpretive Criteria (µg/mL) S	I	R	Comments
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.) (Continued)									
B	Cefepime	30 µg	≥19	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(11) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h or 2 g every 12 h. See comment (7).
B B	Cefotaxime or ceftriaxone	30 µg 30 µg	≥26 ≥23	23–25 20–22	≤22 ≤19	≤1 ≤1	2 2	≥4 ≥4	(12) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 24 h for ceftriaxone and 1 g every 8 h for cefotaxime. See comment (7).
B	Cefotetan	30 µg	≥16	13–15	≤12	≤16	32	≥64	
B	Cefoxitin	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(13) The interpretive criteria for cefoxitin are based on a dosage regimen of at least 8 g per day (eg, 2 g every 6 h).
B	Cefuroxime (parenteral)	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(14) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1.5 g every 8 h. See comment (7).
C	Ceftazidime	30 µg	≥21	18–20	≤17	≤4	8	≥16	(15) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h. See comment (7).
O	Cefamandole	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	See comment (7).
O	Cefmetazole	30 µg	≥16	13–15	≤12	≤16	32	≥64	(16) Insufficient new data exist to reevaluate interpretive criteria listed here.
O	Cefoniclid	30 µg	≥19	15–17	≤14	≤8	16	≥32	See comment (7).
O	Cefoperazone	75 µg	≥21	16–20	≤15	≤16	32	≥64	See comment (7).
O	Ceftizoxime	30 µg	≥25	22–24	≤21	≤1	2	≥4	(17) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 12 h. See comment (7).
O	Moxalactam	30 µg	≥23	15–22	≤14	≤8	16–32	≥64	See comment (7).
CEPHEMS (ORAL)									
B	Cefuroxime (oral)	30 µg	≥23	15–22	≤14	≤4	8–16	≥32	
O	Loracarbef	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(18) Because certain strains of *Citrobacter*, *Providencia*, and *Enterobacter* spp. have been reported to give false-susceptible results when tested by disk diffusion with cefdinir and loracarbef, strains of these genera should not be tested by disk diffusion with these agents.
O	Cefaclor	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cefdinir	5 µg	≥20	17–19	≤16	≤1	2	≥4	See comment (18).
O	Cefixime	5 µg	≥19	16–18	≤15	≤1	2	≥4	(19) For disk diffusion, not applicable for testing *Morganella* spp.
O	Cefpodoxime	10 µg	≥21	18–20	≤17	≤2	4	≥8	See comment (19).
O	Cefprozil	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(20) Because certain strains of *Providencia* spp. have been reported to give false-susceptible results when tested by disk diffusion with cefprozil, strains of this genus should not be tested by disk diffusion with this agent.
Inv.	Cefetamet	10 µg	≥19	15–17	≤14	≤4	8	≥16	See comment (19).
Inv.	Ceftibuten	30 µg	≥21	18–20	≤17	≤8	16	≥32	(21) For testing and reporting of urine isolates only.

©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm S	I	R	MIC Interpretive Criteria (µg/mL) S	I	R	Comments
MONOBACTAMS									
C	Aztreonam	30 µg	≥21	18–20	≤17	≤4	8	≥16	(22) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h. See comment (7).
CARBAPENEMS									
(23) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions that include recently described carbapenemase producing strains, revised interpretive criteria for carbapenems were first published in June 2010 (M100-S20-U) and are listed below. Because of limited treatment options for infections caused by organisms with carbapenem MICs or zone diameters in the intermediate range, clinicians may wish to design carbapenem dosage regimens that use maximum recommended doses and possibly prolonged intravenous infusion regimens, as has been reported in the literature.[14] Consultation with an infectious diseases practitioner is recommended for isolates for which the carbapenem MICs or zone diameter results from disk diffusion testing are in the intermediate or resistant ranges.									
Until laboratories can implement the current interpretive criteria, the MHT should be performed as described in the updated Table 2A Supplemental Table 3. After implementation of the current interpretive criteria, the MHT does not need to be performed other than for epidemiological or infection control purposes (refer to Table 2A Supplemental Table 2).									
The following information is provided as background on carbapenemases in *Enterobacteriaceae* that are largely responsible for MICs and zone diameters in the new intermediate and resistant ranges, and thus the rationale for setting revised carbapenem breakpoints:									
• The clinical effectiveness of carbapenem treatment of infections produced by isolates for which the carbapenem MIC or disk diffusion test results are within the new intermediate (I) range is uncertain due to lack of controlled clinical studies.									
• Imipenem MICs for *Proteus* spp., *Providencia* spp., and *Morganella morganii* tend to be higher (eg, MICs in the new intermediate or resistant range) than meropenem or doripenem MICs. These isolates may have elevated MICs by mechanisms other than production of carbapenemases.									
B	Doripenem	10 µg	≥23	20–22	≤19	≤1	2	≥4	(24) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 500 mg every 8 h.
B	Ertapenem	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤0.5	1	≥2	(25) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 24 h.
B	Imipenem	10 µg	≥23	20–22	≤19	≤1	2	≥4	(26) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 500 mg every 6 h or 1 g every 8 h.
B	Meropenem	10 µg	≥23	20–22	≤19	≤1	2	≥4	(27) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h.
AMINOGLYCOSIDES									
(28) WARNING: For *Salmonella* spp. and *Shigella* spp., aminoglycosides may appear active in vitro but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.									
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64	
O	Kanamycin	30 µg	≥18	14–17	≤13	≤16	32	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13–14	≤12	≤8	16	≥32	
O	Streptomycin	10 µg	≥15	12–14	≤11	–	–	–	(29) There are no MIC interpretive standards.
TETRACYCLINES									
(30) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.									
O	Tetracycline	30 µg	≥15	12–14	≤11	≤4	8	≥16	
O	Doxycycline	30 µg	≥14	11–13	≤10	≤4	8	≥16	
O	Minocycline	30 µg	≥15	13–15	≤12	≤4	8	≥16	

Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm S	I	R	MIC Interpretive Criteria (µg/mL) S	I	R	Comments
FLUOROQUINOLONES									
(31) NOTE: Reevaluation of fluoroquinolones is ongoing. See comment (2).									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16–20	≤15	≤1	2	≥4	(32) For testing and reporting against *Enterobacteriaceae* other than *S. typhi* and extraintestinal *Salmonella* spp.
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	14–16	≤13	≤2	4	≥8	
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥31	21-30	≤20	≤0.06	0.12–0.5	≥1	(33) For reporting against *S. typhi* and extraintestinal *Salmonella* spp. only. (34) Because of limited clinical experience in the treatment of infections caused by *S. typhi* and extraintestinal *Salmonella* spp. with ciprofloxacin MICs or zone diameters in the intermediate range, clinicians may wish to use maximal oral or parenteral dosage regimens. See comment (36).
U	Lomefloxacin or	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤2	4	≥8	
U	ofloxacin	5 µg	≥16	13–15	≤12	≤2	4	≥8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥17	13–16	≤12	≤4	8	≥16	
O	Enoxacin	10 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gemifloxacin	5 µg	≥20	16–19	≤15	≤0.25	0.5	≥1	(35) FDA-approved for *Klebsiella pneumoniae*.
O	Grepafloxacin	5 µg	≥18	15–17	≤14	≤1	2	≥4	
Inv.	Flerocaxin	5 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	
QUINOLONES									
O	Cinoxacin	100 µg	≥19	15–18	≤14	≤16	32	≥64	See comment (21).
O	Nalidixic acid	30 µg	≥19	14–18	≤13	≤16	–	≥32	(36) In addition to testing urine isolates, nalidixic acid may be used to test for reduced fluoroquinolone susceptibility in isolates from patients with extraintestinal *Salmonella* infections. Strains of *Salmonella* that test resistant to nalidixic acid may be associated with clinical failure or delayed response in fluoroquinolone-treated patients with extraintestinal salmonellosis. However, nalidixic acid may not detect all mechanisms of fluoroquinolone resistance. Therefore, *Salmonella* strains may also be tested with ciprofloxacin and reported using the *Salmonella* spp. interpretive criteria above. See comments (32) and (33). See comments (21) and (31).
FOLATE PATHWAY INHIBITORS									
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11–15	≤10	≤2/38	–	≥4/76	See comment (2).
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≥17	13–16	≤12	≤256	–	≥512	(37) Sulfisoxazole can be used to represent any of the currently available sulfonamide preparations.
U	Trimethoprim	5 µg	≥16	11–15	≤10	≤8	–	≥16	

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2A. (Continued)

PHENICOLS									
C	Chloramphenicol	30 µg	≥18	13–17	≤12	≤8	16	≥32	(38) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.
FOSFOMYCINS									
O	Fosfomycin	200 µg	≥16	13–15	≤12	≤64	128	≥256	(39) For testing and reporting of *E. coli* urinary tract isolates only. (40) The 200-µg fosfomycin disk contains 50 µg of glucose-6-phosphate. 41) The only approved MIC method for testing is agar dilution using agar media supplemented with 25 µg/mL of glucose-6-phosphate. Broth dilution MIC testing should not be performed.
NITROFURANS									
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥17	15–16	≤14	≤32	64	≥128	

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; FDA, US Food and Drug Administration; MHA, Mueller-Hinton agar; MHT, modified Hodge test; MIC, minimal inhibitory concentration; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; QC, quality control.

Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Table 2B-1
Pseudomonas aeruginosa
M02 and M07

Table 2B-1. Zone Diameter and MIC Interpretive Standards for *Pseudomonas aeruginosa*

62

Testing Conditions

Medium:	Disk diffusion: MHA Broth dilution: CAMHB Agar dilution: MHA
Inoculum:	Growth method or direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard
Incubation:	35 ± 2 °C; ambient air; Disk diffusion: 16 to 18 hours Dilution methods: 16 to 20 hours

Minimal QC Recommendations (See Tables 3A and 4A for acceptable QC ranges.)

Escherichia coli ATCC® 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853
Escherichia coli ATCC® 35218 (for β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations)

January 2012

General Comments

(1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and 5 disks on a 100-mm plate (see M02 Section 9.2). Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black, nonreflecting background illuminated with reflected light. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth.

(2) The susceptibility of *P. aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis can be reliably determined by disk diffusion or dilution methods, but may require extended incubation for up to 24 hours before reporting as susceptible.

(3) *P. aeruginosa* may develop resistance during prolonged therapy with all antimicrobial agents. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.

(4) The dosage regimens shown in the comment column below are those required to achieve plasma drug exposures (in adults with normal renal and hepatic functions) on which breakpoints were derived. When implementing new breakpoints, it is strongly recommended that laboratories share this information with infectious disease practitioners, pharmacists, pharmacy and therapeutics committees, and infection control committees.

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
A	Piperacillin	100 µg	≥21	18–20	≤17	≤16	32–64	≥128	**(5) Interpretive criteria for piperacillin (alone or with tazobactam) are based on a piperacillin dosage regimen of at least 3 g every 6 h.**
B	Ticarcillin	75 µg	≥24	16–23	≤15	≤16	32–64	≥128	**(6) Interpretive criteria for ticarcillin (alone or with clavulanate) are based on a ticarcillin dosage regimen of at least 3 g every 6 h.**

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2B-1. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
See comment (4).									
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	15–20	≤14	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4	(7) Interpretive criteria for piperacillin (alone or with tazobactam) are based on a piperacillin dosage regimen of at least 3 g every 6 h.
O	Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 µg	≥24	16–23	≤15	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2	(8) Interpretive criteria for ticarcillin (alone or with clavulanate) are based on a ticarcillin dosage regimen of at least 3 g every 6 h.
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(9) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h or 2 g every 8 h.
B	Cefepime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(10) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h or 2 g every 12 h.
MONOBACTAMS									
B	Aztreonam	30 µg	≥22	16–21	≤15	≤8	16	≥32	(11) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h or 2 g every 8 h.
CARBAPENEMS									
B	Doripenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(12) Interpretive criteria for doripenem are based on a dosage regimen of 500 mg every 8 h.
B	Imipenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(13) Interpretive criteria for imipenem and meropenem are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h.
B	Meropenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	
LIPOPEPTIDES									
O	Colistin	10 µg	≥11	–	≤10	≤2	4	≥8	
O	Polymyxin B	300 units	≥12	–	≤11	≤2	4	≥8	
AMINOGLYCOSIDES									
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13–14	≤12	≤8	16	≥32	
FLUOROQUINOLONES									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16–20	≤15	≤1	2	≥4	
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	14–16	≤13	≤2	4	≥8	
U	Lomefloxacin or	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤2	4	≥8	
U	ofloxacin	5 µg	≥16	13–15	≤12	≤2	4	≥8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥17	13–16	≤12	≤4	8	≥16	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	(14) For testing and reporting of urinary tract isolates only.

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration.

Table 2B-1
Pseudomonas aeruginosa
M02 and M07

Table 2B-2. Zone Diameter and MIC Interpretive Standards for *Acinetobacter* spp.

Testing Conditions

Medium: Disk diffusion: MHA
Broth dilution: CAMHB
Agar dilution: MHA
Inoculum: Growth method or direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard
Incubation: 35±2°C; ambient air; 20 to 24 hours, all methods

Minimal QC Recommendations (See Tables 3A and 4A for acceptable QC ranges.)

Escherichia coli ATCC® 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853
Escherichia coli ATCC® 35218 (for β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations)

General Comments

(1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and 5 disks on a 100-mm plate (see M02 Section 9.2). Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black, nonreflecting background illuminated with reflected light. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter.

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
B	Piperacillin	100 µg	≥21	18–20	≤17	≤16	32–64	≥128	
O	Mezlocillin	75 µg	≥21	18–20	≤17	≤16	32–64	≥128	
O	Ticarcillin	75 µg	≥20	15–19	≤14	≤16	32–64	≥128	
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
A	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12–14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18–20	≤17	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4	
B	Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 µg	≥20	15–19	≤14	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2	
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	
B	Cefepime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	
B	Cefotaxime	30 µg	≥23	15–22	≤14	≤8	16–32	≥64	
B	Ceftriaxone	30 µg	≥21	14–20	≤13	≤8	16–32	≥64	
CARBAPENEMS									
A	Imipenem	10 µg	≥16	14–15	≤13	≤4	8	≥16	
A	Meropenem	10 µg	≥16	14–15	≤13	≤4	8	≥16	
LIPOPEPTIDES									
O	Polymyxin B	–	–	–	–	≤2	–	≥4	
O	Colistin		–	–	–	≤2	–	≥4	

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2B-2. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
AMINOGLYCOSIDES									
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64	
O	Netilmicin	–	–	–	–	≤8	16	≥32	
TETRACYCLINES									
(2) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.									
B	Tetracycline	30 µg	≥15	12–14	≤11	≤4	8	≥16	
B	Doxycycline	30 µg	≥13	10–12	≤9	≤4	8	≥16	
B	Minocycline	30 µg	≥16	13–15	≤12	≤4	8	≥16	
FLUOROQUINOLONES									
A	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16–20	≤15	≤1	2	≥4	
A	Levofloxacin	5 µg	≥17	14–16	≤13	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	
FOLATE PATHWAY INHIBITORS									
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11–15	≤10	≤2/38	–	≥4/76	

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control.

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.