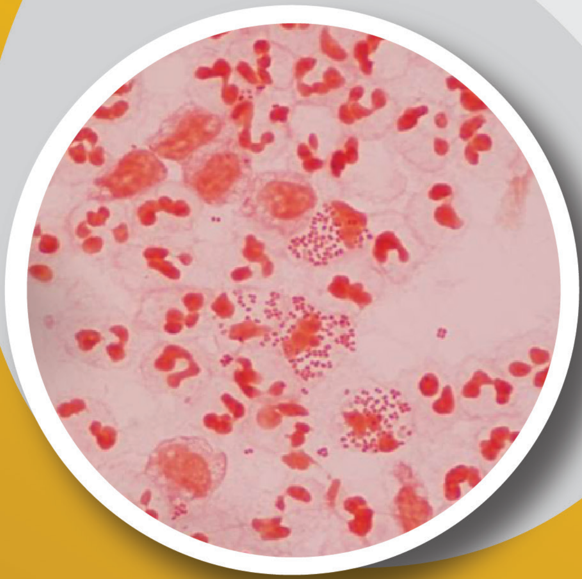
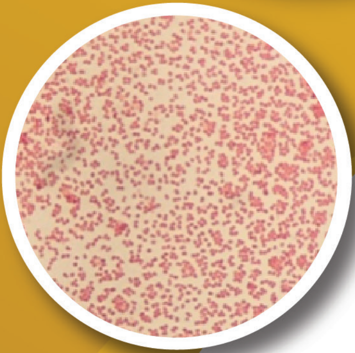
กรมควบคุมโรค
DEPARTMENT OF DISEASE CONTROL





คู่มือการตรวจวินิจฉัย
โรคหนองใน
ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

DDC 63002

คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

ISBN	978-616-11-4199-8	
บรรณาธิการ	พญ.รสพร	กิตติเยาวมาลย์
	นพ.ณัฐพล	งามจิรธรรม
	ทนพญ.ปริศนา	บัวสกุล
	ทนพญ.บุศรา	บำรุงศักดิ์

จัดพิมพ์โดย กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

พิมพ์ครั้งที่ 1 มกราคม 2563 จำนวน 100 เล่ม
พิมพ์ที่ หจก. สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์
161/477-478 ถนนจรัญสนิทวงศ์ แขวงบางขุนศรี
เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700

ที่ปรึกษาและคณะทำงานคู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

ที่ปรึกษา

1.	นางพัชรา ศิริวงศ์รังสรรค์	นายแพทย์ทรงคุณวุฒิ
2.	นายศรายุธ อุตตมางคพงศ์	ผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
3.	ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4.	ผศ.ดร.รัตนา ลาวัง	คณะเทคนิคการแพทย์ ม.มหิดล
5.	ผศ.ดร.นิตยา อินทราวัฒนา	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล
6.	น.ส.ฉัตรนภา ดวงดี	โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล

ประธานคณะทำงาน

7.	น.ส.รสพร กิตติเยาวมาลย์	หัวหน้ากลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

คณะทำงาน

8.	นายศุภโชค คงเทียน	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
9.	น.ส.ธันยนันท์ กังวาฬพรโรจน์	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
10.	น.ส.นฤมล เย็นยาซัน	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
11.	น.ส.จันทนา ชูเกียรติศิริ	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
12.	นางวนิดา รอดรังนก	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
13.	นายเอกชัย แดงสอาด	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

14. นายนัทธวิทย์ สุขรักษ์	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
15. น.ส.ปริศนา บัวสกุล	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
16. น.ส.มณีมณฑ์ โคเบนท์	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
17. น.ส.พรทิพย์ เผ่าผาง	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
18. น.ส.ธัญญาภรณ์ การพานิช	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
19. นางจิราย ุ แคสกี้	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
20. นางกมลศิริ รวีวรรุ่งจำรัส	สำนักอนามัย กรุงเทพฯ
21. น.ส.อัญชนา ถาวรวัน	สถาบันบำราศนราดูร
22. น.ส.พรนภา พูลลาภผล	สถาบันบำราศนราดูร
23. น.ส.อภิรดี ทองสง	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 1 จ.เชียงใหม่
24. น.ส.สาริณี ศรีเทพ	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 1 จ.เชียงใหม่
25. นายอนุกูล บุญคง	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 3 จ.นครสรรค์
26. นายปฐมพงศ์ แย้มปั้น	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 3 จ.นครสรรค์
27. นายปภังกร สละรักษ์	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 6 จ.ชลบุรี
28. นางวิภาวี แสนวงษา	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 10 จ.อุบลราชธานี
29. น.ส.โสภิตา โสพิลา	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 10 จ.อุบลราชธานี

30. น.ส.ก่าหมีหละ ยาชะรัด	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 11 จ.นครศรีธรรมราช
31. น.ส.กนกวรรณ จ๊ะสมัน	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 11 จ.นครศรีธรรมราช
32. นางณฐวร เธียรมนตรี	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 12 จ.สงขลา
33. น.ส.พิศุทธิดา แก้วเลี่ยม	สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 12 จ.สงขลา
34. นายสมยศ เจริญสุข	กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
35. นางอำพร จุ้ยอ่อน	กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

คณะทำงานและเลขานุการ

36. น.ส.บุศรา บำรุงศักดิ์	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ

37. นายพงศธร แสงประเสริฐ	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
38. นางกัญจมาภรณ์ ชุ่มเชิงรักษ์	กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

คำนำ

คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ได้จัดพิมพ์ขึ้นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2562 โดยผู้ทรงคุณวุฒิกรมควบคุมโรค คณะผู้เชี่ยวชาญ คณะทำงาน และผู้มีส่วนได้ส่วนเสียจากทีมสหวิชาชีพ ได้ร่วมจัดประชุมเชิงปฏิบัติการจัดทำคู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั้งหมด 2 ครั้ง เพื่อให้บุคลากรทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และบุคลากรสาธารณสุขทั้งภาครัฐ และเอกชนในประเทศไทย ใช้เป็นคู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ในการปฏิบัติงานเพื่อให้ได้ผลการตรวจวินิจฉัย ที่ถูกต้องแม่นยำ ตามมาตรฐาน

ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณที่ปรึกษา ผู้เชี่ยวชาญ คณะทำงาน และผู้มีส่วนได้ส่วนเสียจากทีมสหวิชาชีพทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมในการจัดทำคู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้ผ่านการตรวจประเมินและรับรองมาตรฐานผลิตภัณฑ์เพื่อการเฝ้าระวัง ป้องกัน ควบคุมโรคและภัยสุขภาพ กรมควบคุมโรคแล้ว ณ วันที่ 19 พฤศจิกายน 2562

(นายสุวรรณชัย วัฒนายิ่งเจริญชัย)
อธิบดีกรมควบคุมโรค

นิยามศัพท์และคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (USA)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DS	Decrease susceptible
I	Intermediate
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
NS	Nonsusceptible
PenR	Penicillin resistant *Neisseria gonorrhoeae*
QRNG	Quinolone resistant *Neisseria gonorrhoeae*
R	Resistant
S	Susceptible
SDD	Susceptible dose dependent
TetR	Tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae*
WHO	World Health Organization

สารบัญ

บทที่ 1 สถานการณ์โรคหนองในและการดื้อยา 15

บทที่ 2 แนวทางการรักษาโรคหนองใน 29

บทที่ 3 สารต้านจุลชีพ และกลไกการดื้อสารต้านจุลชีพ 37

บทที่ 4 การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย 65

บทที่ 5 การเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *N.gonorrhoeae* 83

ภาคผนวก 105

- การเก็บรักษาเชื้อ *N.gonorrhoeae* 105
- วิธีการส่งเชื้อเพื่อยืนยันผลการทดสอบที่กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ 107
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 109
- วิธีการเตรียมน้ำยาต่างๆ 114
- การเตรียม McFarland Standard 116
- การย้อมสีแกรม (Gram stain) 118
- การควบคุมคุณภาพของสีแกรม 119

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1	แสดงข้อมูลของ WHO จำนวนประเทศในแต่ละภูมิภาค ที่พบการดื้อยาต้านจุลชีพหลัก ของเชื้อ *N.gonorrhoeae* ในปี ค.ศ. 2016 (พ.ศ. 2559)	21
ตารางที่ 1.2	ร้อยละและจำนวนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทางห้องปฏิบัติการของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ปี พ.ศ. 2555-2560 (ข้อมูลจาก กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์)	24
ตารางที่ 1.3	ร้อยละและจำนวนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีผลความไวต่อยาลดลง ของ ceftriaxone, cefixime และ Azithromycin ในปี 2555-2560 (ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์และสำนักงานป้องกันควบคุมโรค)	27
ตารางที่ 4.1	การเตรียมสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 128 µg/ml โดยวิธี broth dilution	75
ตารางที่ 4.2	การเตรียมสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 128 µg/ml โดยวิธี agar dilution	78
ตารางที่ 5.1	การทดสอบทางชีวเคมี ของเชื้อ *Neisseria spp.*	90
ตารางที่ 5.2	ตารางแปลผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *N. gonorrhoeae*	98
ภาคผนวก		
ตารางที่ 1	ค่า MIC ที่กำหนดไว้สำหรับการส่งเชื้อเพื่อยืนยันผลการทดสอบ	107
ตารางที่ 2	แสดงเชื้อที่ใช้และผลการควบคุมคุณภาพภายในของอาหารเลี้ยงเชื้อ	113
ตารางที่ 3	การเตรียม McFarland standard และจำนวนแบคทีเรียเปรียบเทียบกับความขุ่นของ McFarland standard หมายเลขต่างๆ	117
ตารางที่ 4	แสดงเชื้อที่ใช้และผลการควบคุมของสีย้อมแกรม	119

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1	แสดงร้อยละของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่พบว่ามีความไวต่อยาลดลงหรือดื้อต่อยากลุ่ม extended-spectrum cephalosporin (ESC) อันได้แก่ ceftriaxone และ cefixime ในปี ค.ศ. 2016	18
รูปที่ 1.2	แสดงร้อยละของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่พบว่ามีความไวต่อยาลดลงหรือดื้อต่อยา azithromycin ในปี ค.ศ. 2016	19
รูปที่ 1.3	แสดงร้อยละของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่พบว่ามีความไวต่อยาลดลงหรือดื้อต่อยา ciprofloxacin ในปี ค.ศ. 2016	20
รูปที่ 2.1	ลักษณะเชื้อ *N. gonorrhoeae*	29
รูปที่ 3.1	โครงสร้างสารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams และสารยับยั้ง β-lactamase	41
รูปที่ 3.2	ตัวอย่างโครงสร้างสารต้านจุลชีพกลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจากกลุ่ม β-lactams	50
รูปที่ 3.3	ตัวอย่างการสร้างเอนไซม์ของเชื้อซึ่งมีผลในการทำลายสารต้านจุลชีพ	56
รูปที่ 3.4	ตัวอย่างการการเปลี่ยนแปลงเป้ามีผลให้เชื้อดื้อสารต้านจุลชีพ	57
รูปที่ 3.5	ภาพแสดงการมีปั๊มเพื่อขับสารต้านจุลชีพมีผลให้เชื้อดื้อสารต้านจุลชีพ	58
รูปที่ 4.1	การทดสอบ diffusion method	71
รูปที่ 4.2	การทดสอบ epsilometer test (E test)	81
รูปที่ 5.1	แสดงลักษณะการ streak เป็นรูปตัว Z หนองหรือสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยแล้วป้ายลงบน MTM หรือ Bangrak I media	84
รูปที่ 5.2	แสดงลักษณะการ cross streak ให้เชื้อกระจายตัวจากตัว Z	85
รูปที่ 5.3	แสดงลักษณะโคโลนีเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ไม่มีและมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นปน	86

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 5.4	แสดงลักษณะเชื้อในกลุ่ม *Neisseria* spp.	87
รูปที่ 5.5	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับน้ำยา 1% Oxidase	88
รูปที่ 5.6	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับ 30% H_2O_2	89
รูปที่ 5.7	แสดงผลการทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อ *N. gonorrhoeae*	90
รูปที่ 5.8	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับน้ำยา bromocresol purple (BCP)	92
รูปที่ 5.9	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับ cefinase disk®	93
รูปที่ 5.10	แสดงขั้นตอนการเพาะเชื้อและยืนยันเชื้อ *N. gonorrhoeae*	94
รูปที่ 5.11	รูปแบบการวาง disk บนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm และ 150 mm	96
รูปที่ 5.12	รูปแบบการวาง E test บนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm และ 150 mm	97
รูปที่ 5.13	ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา ciprofloxacin ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ชนิด disk	100
รูปที่ 5.14	ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา penicillin ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ชนิด disk	101
รูปที่ 5.15	ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา tetracycline ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ชนิด disk	102
รูปที่ 5.16	ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา tetracycline ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ชนิด E test	103

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1.1	แนวโน้มอัตราป่วยต่อแสนประชากรโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ จำแนกตามชนิดของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์หลัก ปี พ.ศ. 2547-2561 ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค	16
แผนภูมิที่ 1.2	แนวโน้มอัตราป่วยต่อแสนประชากรโรคหนองใน จำแนกตามอายุ ปี พ.ศ. 2551-2561 ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค	16
แผนภูมิที่ 1.3	ร้อยละของการทดสอบหาการดื้อของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่อยา cefixime จำแนกตามค่า MIC ปี พ.ศ. 2555-2560 (ข้อมูลจากกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์)	25
แผนภูมิที่ 1.4	ร้อยละของการทดสอบหาการดื้อของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่อยา ceftriaxone จำแนกตามค่า MIC ปี พ.ศ. 2555-2560 (ข้อมูลจากกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์)	25
แผนภูมิที่ 1.5	ร้อยละการกระจายของรูปแบบการดื้อยา penicillin, tetracycline และ ciprofloxacin ในการทดสอบอาการดื้อของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ปี พ.ศ. 2560	26

บทที่ 1

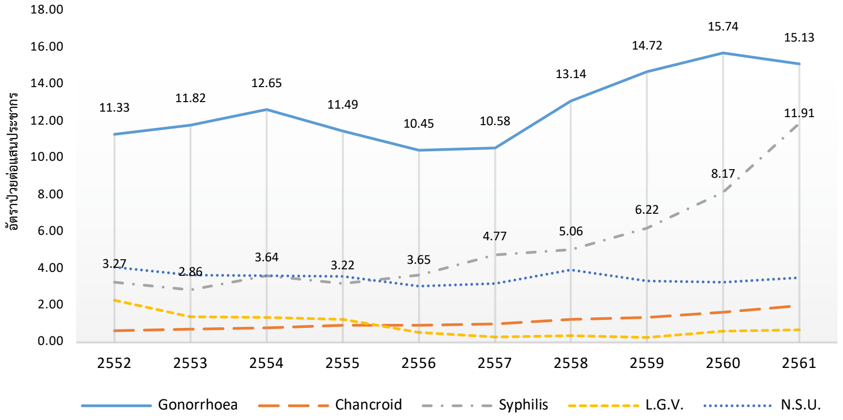
สถานการณ์โรคหนองในและการดื้อยา

นายแพทย์ศุภโชค คงเทียน
นางสาวปริศนา บัวสกุล

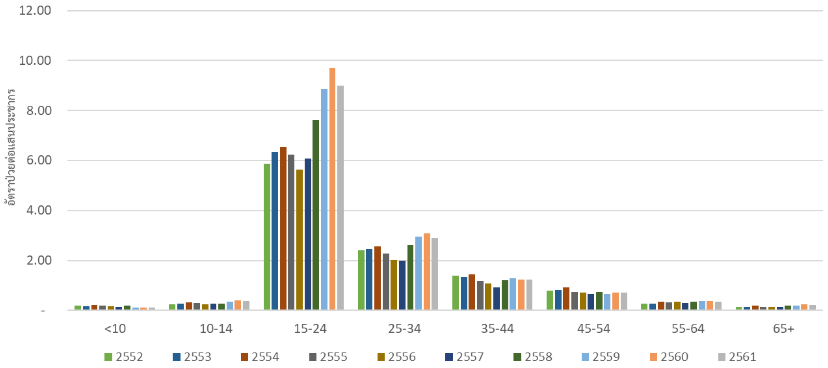
โรคหนองใน (gonorrhea) เกิดจากเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์หลักและมีอุบัติการณ์การติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้นทุกปี โรคหนองในเป็นโรคที่มีอาการและอาการแสดงที่หลากหลาย ตั้งแต่ไม่ปรากฏอาการ มีอาการเฉพาะที่ จนถึง กระจายทั่วร่างกาย โดยอาการเฉพาะที่เบื้องต้นในผู้ป่วยชายส่วนใหญ่จะมีปัสสาวะแสบขัดมีหนองไหลจากท่อปัสสาวะ แต่ในขณะที่ผู้ป่วยหญิงส่วนใหญ่มักไม่มีอาการ หากมีอาการจะมีตกขาวผิดปกติไม่คัน นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้ที่ลำคอ และทวารหนัก ซึ่งเป็นช่องทางที่ใช้สำหรับมีเพศสัมพันธ์

สถานการณ์โรคหนองใน

ข้อมูลเฝ้าระวังโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในประเทศไทย จากรายงาน 506 ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค พบว่าโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ที่มีอัตราป่วยสูงที่สุด ได้แก่ โรคหนองใน โรคซิฟิลิส และโรคหนองในเทียม ตามลำดับ**ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1.1** โดยโรคหนองใน มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2556 ที่มีอัตราป่วย 10.45 ต่อแสนประชากร เป็น 13.14 ต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2558 มีอัตราป่วยสูงสุดที่ 15.84 ต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2560 และมีแนวโน้มลดลงเป็น 15.13 ต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2561 สัดส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 1: 0.81 กลุ่มอายุที่พบมากที่สุดเรียงตามลำดับ คือ 15-24 ปี (60.48%) 25-34 ปี (19.60%) 35-44 ปี (8.27%)[1] **ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1.2**



แผนภูมิที่ 1.1 แนวโน้มอัตราป่วยต่อแสนประชากรโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ จำแนกตามชนิดของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์หลักปี พ.ศ. 2547-2561 ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค

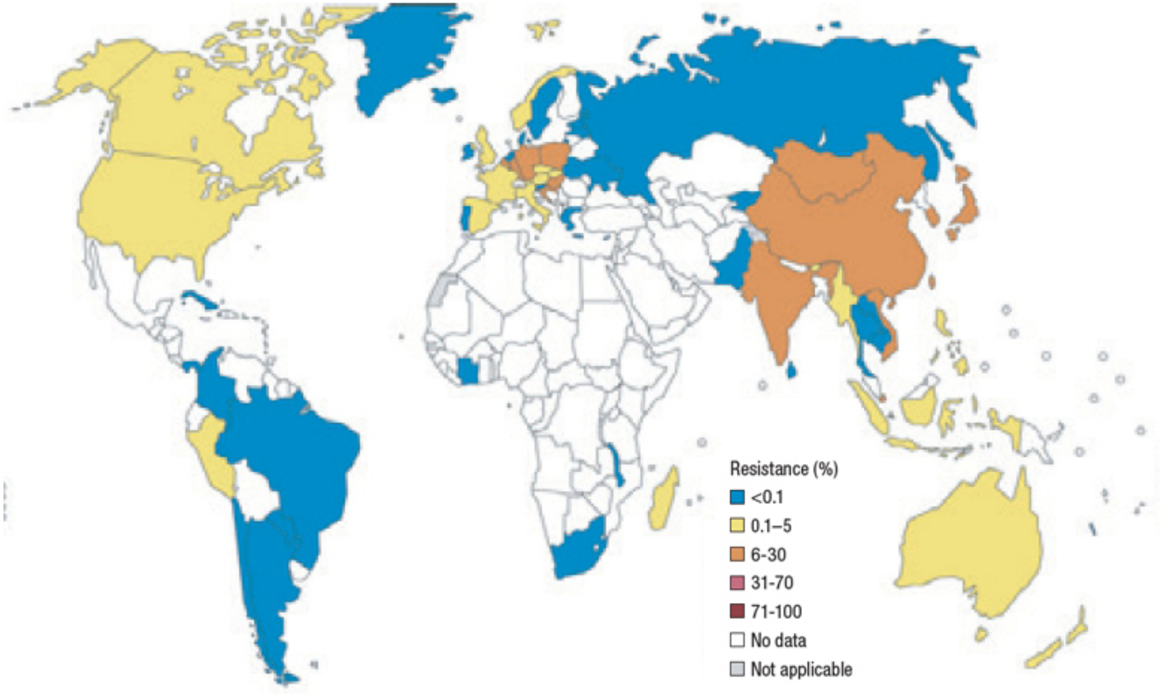


แผนภูมิที่ 1.2 แนวโน้มอัตราป่วยต่อแสนประชากรโรคหนองใน จำแนกตามอายุ ปี พ.ศ. 2552-2561 ข้อมูลจาก สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค

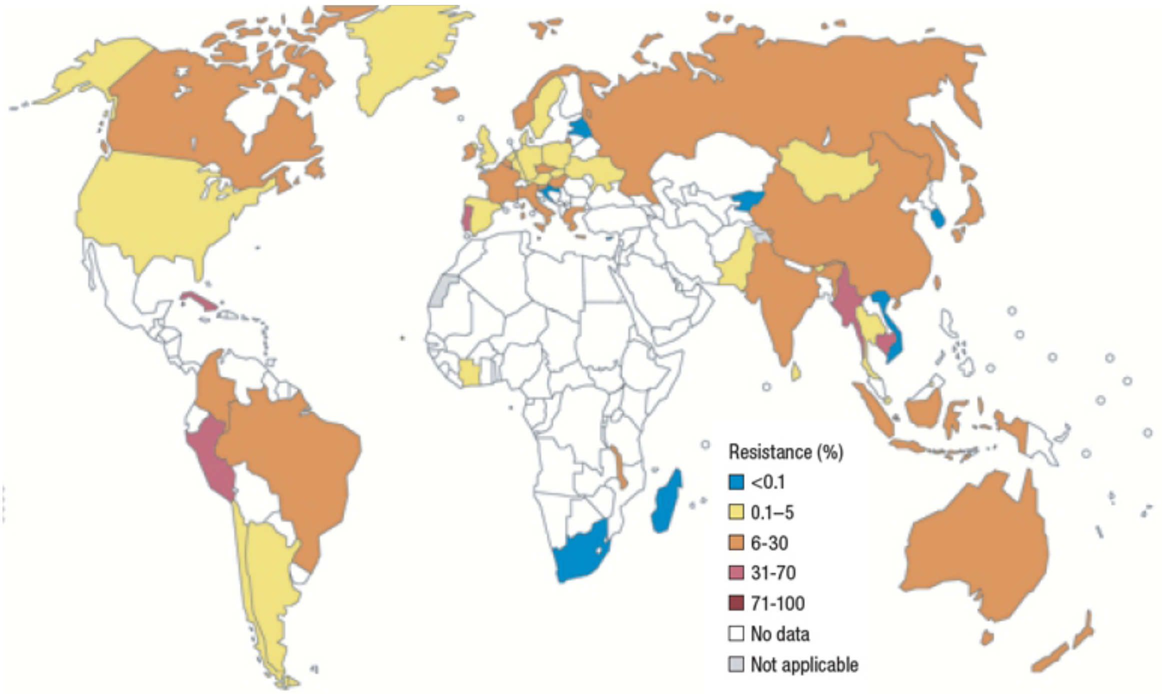
สถานการณ์การดื้อยา

การดื้อยาของเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีรายงานในหลายๆ ประเทศทั่วโลก และพบว่ามีแนวโน้มที่จะพบการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น และรายงานที่สำคัญคือได้พบการดื้อยา ceftriaxone ในประเทศญี่ปุ่น[2] ซึ่งยา ceftriaxone เป็นยาที่เป็นยาหลักในการรักษาโรคหนองใน และยังมีรายงานการพบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ดื้อยา ceftriaxone และ azithromycin รวมไปถึงยาทางเลือกอื่นๆ ในการรักษาหนองในหลายชนิดที่ประเทศอังกฤษและออสเตรเลีย[3] และยังพบว่า ผู้ป่วยการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ดื้อยา ดังกล่าวมีประวัติการได้รับเชื้อจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[1] จึงมีโอกาสเป็นไปได้สูงที่ประเทศไทยจะพบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ดื้อยาในอนาคตอันใกล้ ดังนั้นการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่องจึงมีความสำคัญ

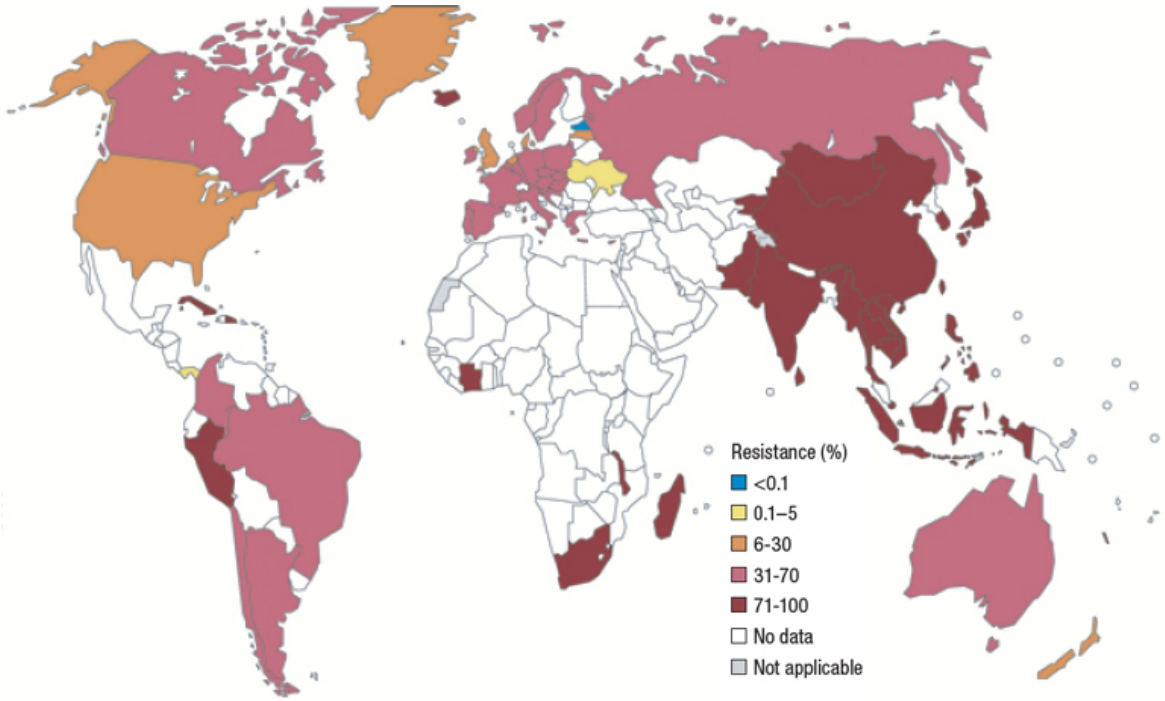
จากข้อมูลของ World Health Organization (WHO) และ Gonococcal Antimicrobial Surveillance programme (GASP) เกี่ยวกับร้อยละของความไวต่อยาที่ลดลง และการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *N. gonorrhoeae* จากทั่วโลกในปี ค.ศ. 2016 (พ.ศ. 2559) ดังรูปที่ 1.1, 1.2 และ 1.34 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีร้อยละการดื้อต่อยา ciprofloxacin สูงทั่วโลก โดยประเทศไทยมีเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin ในสัดส่วนที่สูงมากกว่า 70% ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ยาชนิดนี้โดยไม่มีการควบคุมในอดีต[5] และสิ่งที่ต้องเฝ้าระวังคือโอกาสพบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ดื้อต่อยา ceftriaxone ซึ่งแม้ว่าจะยังไม่พบในปัจจุบัน แต่ข้อมูลของประเทศรอบข้างประเทศไทย มีโอกาสเป็นไปได้สูงที่จะมีการแพร่กระจายของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ดื้อยาเข้ามาในอนาคตอันใกล้



รูปที่ 1.1 แสดงร้อยละของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่พบว่ามีความไวต่อยาลดลงหรือดื้อต่อยากลุ่ม extended-spectrum cephalosporin (ESC) อันได้แก่ ceftriaxone และ cefixime ในปี ค.ศ. 2016



รูปที่ 1.2 แสดงร้อยละของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่พบว่ามีความไวต่อยาลดลงหรือดื้อต่อยา azithromycin ในปี ค.ศ. 2016



รูปที่ 1.3 แสดงร้อยละของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่พบว่ามีความไวต่อยาลดลงหรือดื้อต่อยา ciprofloxacin ในปี ค.ศ. 2016

ตารางที่ 1.1 แสดงข้อมูลของ WHO จำนวนประเทศในแต่ละภูมิภาคที่พบการดื้อยาต้านจุลชีพหลัก ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในปี ค.ศ. 2016 (พ.ศ. 2559)[4]

Reported % of resistant isolates	Africa	Americas	Eastern Mediterranean	Europe	South-East Asia	Western Pacific	Total
Ceftriaxone (MIC[a] >0.125 µg/mL)							
# countries testing for AMR	4	9	0	27	6	11	57
≥5% decreased susceptibility	2	0	0	0	3	4	9
Of which ≥10% decreased susceptibility	2	0	0	0	2	2	6
Cefixime (MIC[a] >0.25 µg/mL)							
# countries testing for AMR	3	6	1	27	4	0	41
≥5% resistant isolates	0	0	0	6	2	0	8
Of which ≥10% resistant isolates	0	0	0	2	1	0	3
Azithromycin							
# countries testing for AMR	3	8	1	27	6	12	57
≥5% resistant isolates	2	5	0	13	3	5	28
Of which ≥10% resistant isolates	1	3	0	8	2	2	16
Ciprofloxacin/quinolones							
# countries testing for AMR	3	9	1	27	6	13	59
≥5% resistant isolates	3	9	1	25	6	12	56
50–90% resistant isolates	2	7	0	11	2	5	27
>90% resistant isolates	0	0	1	1	4	4	10

[a] Minimum inhibitory concentration

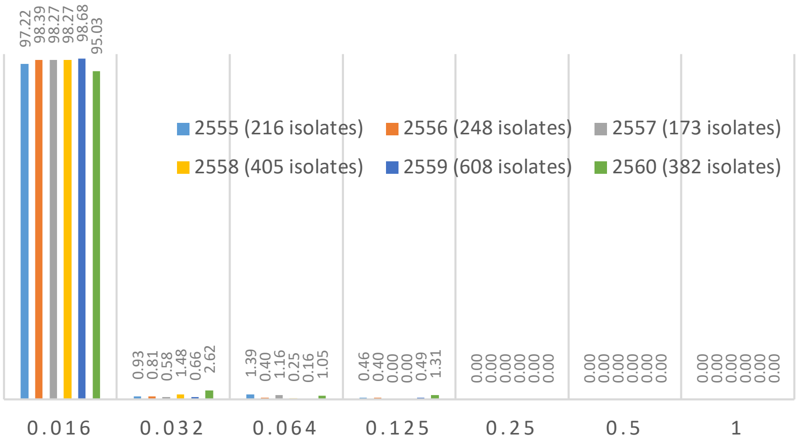
การเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ได้ดำเนินการเฝ้าระวังเชื้อ *N. gonorrhoeae* ดื้อยาต้านจุลชีพทางห้องปฏิบัติการ ติดต่อกันมาหลายปี โดยร่วมกับห้องปฏิบัติการของสำนักป้องกันควบคุมโรคเขตต่างๆ ผลจากการดำเนินการพบว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีอุบัติการณ์การดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นหลายชนิด และมีแนวโน้มของอัตราการดื้อต่อยาเพิ่มสูงขึ้น เช่น ยาในกลุ่ม quinolone เช่น ofloxacin, norfloxacin และ ciprofloxacin พบการดื้อยา ciprofloxacin เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในปี พ.ศ. 2555 มีอัตราการดื้อยาร้อยละ 87.42 เพิ่มเป็นร้อยละ 96.14 ในปี พ.ศ. 2560 ในปัจจุบันได้ยกเลิกการนำยาชนิดนี้มาใช้ในการรักษาโรคหนองในแล้ว ในส่วนยา gentamycin ตาม**ตารางที่ 1.2** ยังไม่มีรายงานเชื้อดื้อยา แต่เมื่อพิจารณาผลการทดสอบพบว่า ค่า intermediate ปี 2555 อยู่ร้อยละ 5.65 และเพิ่มเป็นร้อยละ 31.76 ในปี 2560 ซึ่งสามารถทำนายได้ว่า ในระยะเวลาไม่นาน อาจจะพบเชื้อที่ดื้อต่อยา gentamycin อีกทั้งยาชนิดนี้ ยังให้ผลการรักษาการติดเชื้อหนองในที่เยื่อบุคอไม่ดีเท่าที่ควร แต่อย่างไรก็ตาม ตามแนวทางการรักษาขององค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แนะนำให้ใช้ gentamycin ในรายที่แพ้ยากลุ่ม cephalosporin หรือพบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ดื้อต่อยา cephalosporin[6] ส่วนยาปฏิชีวนะอื่นๆ ที่พบการดื้อยาในระดับสูงและไม่สามารถนำมารักษาโรคหนองในได้ เนื่องจากพบการดื้อยา คือ penicillin, tetracycline เป็นต้น

สำหรับยาที่อยู่ในแนวทางการรักษาโรคหนองใน ในปัจจุบันของไทยคือยากลุ่ม 3rd generation cephalosporin ได้แก่ ceftriaxone โดยใช้ cefixime และ gentamicin เป็นยารักษาทางเลือก จากการเฝ้าระวังยังไม่พบรายงานเชื้อที่ความไวต่อยาลดลง สำหรับยากลุ่ม macrolides ที่ใช้เป็นยารักษาร่วมได้แก่ azithromycin ในปี 2560 พบรายงานเชื้อที่ให้ผลความไวต่อยาลดลง (MIC ≥ 2 µg/ml) 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 0.26

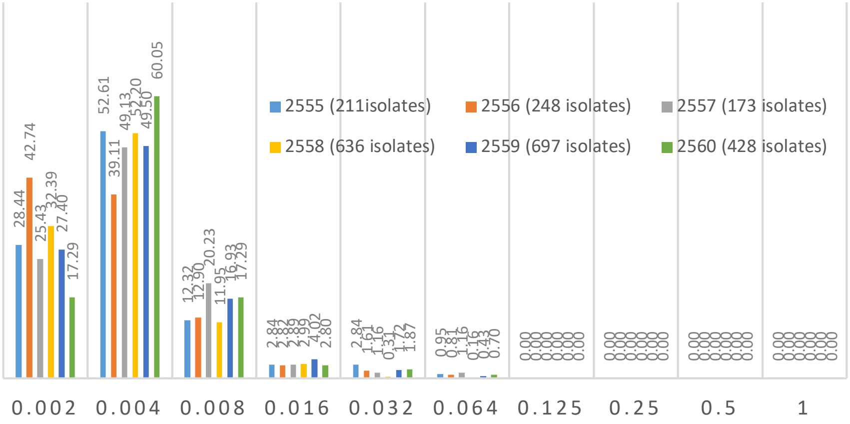
ถึงแม้ว่าในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อที่มีความไวต่อยา 3rd generation cephalosporin ลดลง แต่เมื่อพิจารณาค่า MIC (minimal inhibitory concentration) ของยา cefixime ในแผนภูมิที่ 1.3 และ Ceftriaxone ในแผนภูมิที่ 1.4 พบว่าในปี 2560 พบแนวโน้มค่า MIC ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะยา cefixime ซึ่งค่า MIC ที่ทดสอบได้ห่างจากค่า DS (MIC ≥ 0.25 µg/ml) เพียง 1 ความเข้มข้น (dilution) ส่วนค่า MIC ของ ceftriaxone ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน และจากตารางที่ 1.2 พบรายงานเชื้อกลุ่ม β-lactamase positive ลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีแนวโน้มว่าประเทศไทยจะมีรายงานเชื้อที่ความไวลดลงในเวลาอันใกล้นี้

ตารางที่ 1.2 ร้อยละและจำนวนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทางห้องปฏิบัติการของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ปี พ.ศ. 2555-2560 (ข้อมูลจากกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์)

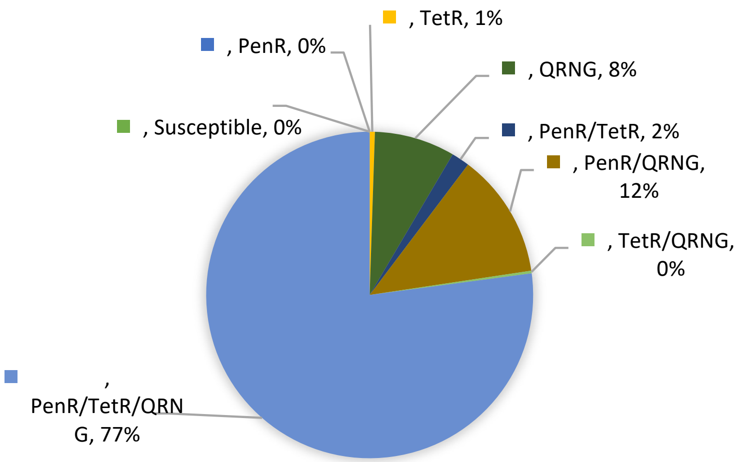
	2555	2556	2557	2558	2559	2560
Ceftriaxone	0	0	0	0	0	0
(No. of isolates)	(483)	(461)	(497)	(666)	(708)	(443)
Cefixime	0	0	0	0	0	0
(No. of isolates)	(483)	(461)	(497)	(666)	(708)	(443)
Azithromycin	0	0	0	0	0	0.26
(No. of isolates)	(260)	(169)	(251)	(397)	(609)	(381)
Penicillin	85.57	85.34	83.73	83.48	82.14	80.86
(No. of isolates)	(485)	(464)	(510)	(678)	(756)	(444)
Tetracycline	81.61	80.26	81.21	86.49	83.45	80.36
(No. of isolates)	(484)	(461)	(495)	(666)	(707)	(443)
Ciprofloxacin	87.42	91.76	90.73	90.28	93.16	96.14
(No. of isolates)	(485)	(461)	(496)	(679)	(702)	(440)
Gentamicin	0	0	0	0	0	0
(No. of isolates)	(177)	(241)	(250)	(401)	(608)	(381)
Spectinomycin	0	0	0	0	0	0
(No. of isolates)	(485)	(461)	(425)	(664)	(707)	(439)
β-lactamase positive	83.92	84.91	83.53	83.48	81.88	79.28
(No. of isolates)	(485)	(464)	(510)	(678)	(756)	(444)



แผนภูมิที่ 1.3 ร้อยละของการทดสอบหาการดื้อของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่อยา cefixime จำแนกตามค่า MIC ปี พ.ศ. 2555-2560 (ข้อมูลจากกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์)



แผนภูมิที่ 1.4 ร้อยละของการทดสอบหาการดื้อของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่อยา ceftriaxone จำแนกตามค่า MIC ปี พ.ศ. 2555-2560 (ข้อมูลจากกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์)



แผนภูมิที่ 1.5 ร้อยละการกระจายของรูปแบบการดื้อยา penicillin, tetracycline และ ciprofloxacin ในการทดสอบอาการดื้อของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ปี พ.ศ. 2560 (ข้อมูลจากกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์)

หมายเหตุ: PenR = penicillin resistant, TetR = tetracycline resistant, QRNG = quinolone-resistant *N. gonorrhoeae*

จากแผนภูมิที่ 1.5 พบว่าเชื้อหนองในที่พบในประเทศไทย ส่วนใหญ่มีการดื้อต่อยา penicillin, tetracycline และ quinolone พร้อมๆ กันถึง 77% โดยมีเพียงแค่ 3% ที่ไม่ดื้อต่อยากลุ่ม quinolone (ในกรณีนี้หมายถึงยา ciprofloxacin) และมีเพียงแค่ 20% ที่ไม่ดื้อต่อยา tetracycline ดังนั้นยา penicillin, tetracycline และ ciprofloxacin จึงไม่แนะนำให้นำมารักษาโรคหนองในอีกต่อไป

ตารางที่ 1.3 ร้อยละและจำนวนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีผลความไวต่อยาลดลง ของ ceftriaxone, cefixime และ azithromycin ในปี 2555-2561 (ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์และสำนักงานป้องกันควบคุมโรค)

	2555			2556			2557			2558			2559			2560			2561		
	สอวพ.	สคร.	Total	สอวพ.	สคร.	Total	สอวพ.	สคร.	Total	สอวพ.	สคร.	Total	สอวพ.	สคร.	Total	สอวพ.	สคร.	Total	สอวพ.	สคร.	Total
Ceftriaxone	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**
	(299)	(322)	**(621)**	(244)	(254)	**(498)**	(245)	(289)	**(534)**	(630)	(126)	**(756)**	(697)	(113)	**(810)**	(428)	(74)	**(502)**	(415)	(245)	**(660)**
Cefixime	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**
	(297)	(311)	**(608)**	(244)	(254)	**(498)**	(251)	(302)	**(553)**	(406)	(128)	**(534)**	(608)	(119)	**(727)**	(382)	(74)	**(456)**	(423)	(245)	**(668)**
Azithromycin	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0	**0**	0	0.85	**0.14**	0.26	0	**0.23**	0	0	**0**
	(251)	(294)	**(545)**	(169)	(250)	**(419)**	(250)	(301)	**(551)**	(394)	(132)	**(526)**	(600)	(118)	**(718)**	(308)	(74)	**(436)**	(415)	(222)	**(637)**

จากตารางที่ 1.3 แสดงให้เห็นว่านอกจากกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์แล้ว ยังมีการเฝ้าระวังเชื้อหนองในดื้อยาในส่วนภูมิภาคด้วย โดยมีสำนักงานป้องกันควบคุมโรค 6 แห่งเป็นหน่วยงานรับผิดชอบ ซึ่งผลการเฝ้าระวังยังไม่พบเชื้อที่มีความไวต่อยา ceftriaxone และ cefixime ลดลง แต่พบรายงานเชื้อที่มีความไวต่อยา azithromycin ลดลง โดยในปี พ.ศ. 2559 พบที่ สคร. 10 จ.อุบลราชธานี 1 ตัวอย่าง ปี พ.ศ. 2560 พบที่กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ 1 ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

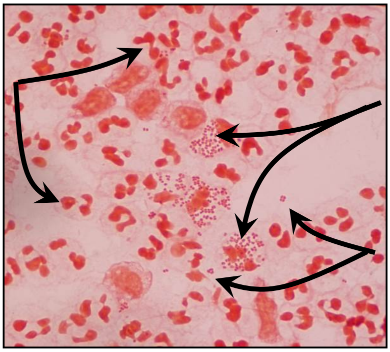
1. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. รายงานโรคในระบบเฝ้าระวัง ๕๐๖. Gonorrhoea. 2561
2. Akasaka S, Muratani T, Yamada Y, Inatomi H, Takahashi K, Matsumoto T. Emergence of cephem-and-aztreonam-high-resistant *Neisseria gonorrhoeae* that does not produce beta-lactamase. J Infect Chemother. 2001 Mar; 7(1): 49-50.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom and Australia-7 May 2018. Stockholm: ECDC; 2018.
4. World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018. Geneva: World Health Organization; 2018
5. Centers for Disease Control and Prevention, National Overview of STDs. Gonorrhea. Sexually Transmitted Disease Surveillance. 2016; 11-9; 76-87
6. World Health Organization. WHO guideline for treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. World Health Organization; 2016.

บทที่ 2

แนวทางการรักษาโรคหนองใน (gonococcal infection)

นายแพทย์ศุภโชค คงเทียน
แพทย์หญิงธันยนันท์ กังวาฬพรโรจน์
นายแพทย์ณัฐพล งามจิรธรรม

เชื้อที่ทำให้เกิดโรค คือ *N. gonorrhoeae* ซึ่งเป็น gram-negative diplococci มีขนาด 0.6 x 0.8-1.0 ไมครอน เมื่อย้อมสีแกรม เชื้อจะติดสี แกรมลบ (gram negative) มีลักษณะคล้ายเมล็ดถั่วหรือเมล็ดกาแฟหรือรูปไตอยู่เป็นคู่ (coffee bean or kidney shaped pairs) มีลักษณะพิเศษคือหันด้านเว้าเข้าหากัน ตัวเชื้อจะอยู่ได้ทั้งภายในและหรือภายนอกเม็ดเลือดขาว (intra and extra polymorphonuclear cells) สามารถเจริญเติบโตภายในเวลา 24-48 ชั่วโมงบนอาหารชนิดพิเศษเจริญได้ดีที่ pH 7.2-7.4 อุณหภูมิ 35-36 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี CO_2 3-5% ระยะฟักตัว 1-14 วัน แต่ที่พบบ่อยคือ 3-5 วัน



รูปที่ 2.1 ลักษณะเชื้อ *N. gonorrhoeae*

ลักษณะทางคลินิกในผู้ชาย[1] ส่วนใหญ่จะมีหนองไหลออกจากท่อปัสสาวะและมีอาการปัสสาวะแสบขัด บางรายมีเพียงอาการปัสสาวะแสบขัดเล็กน้อยหรือมีมูกขุ่น ประมาณร้อยละ 10 ไม่มีอาการ

ผู้ชายที่ใช้ปากกับอวัยวะเพศชาย (oral sex) โดยไม่ใช้ถุงยางอนามัยอาจติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ช่องคอได้ ผู้ชายที่ใช้ปากกับอวัยวะเพศหญิง อาจติดเชื้อที่ช่องคอได้เช่นกัน แต่พบอุบัติการณ์ของโรคต่ำกว่ากรณีที่ผู้หญิงใช้ปากกับอวัยวะเพศชาย ส่วนการติดเชื้อในทวารหนักมักไม่ปรากฏอาการ

ลักษณะทางคลินิกในผู้หญิง[1] ส่วนใหญ่ไม่ปรากฏอาการ หากมีอาการ จะพบตกขาวผิดปกติ ปัสสาวะแสบขัด ปวดท้องน้อย ตรวจพบการอักเสบที่ท่อปัสสาวะ ปากมดลูก หรือ ช่องทวารหนัก การวินิจฉัยโรคหนองในในผู้ป่วยหญิงจึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นหลัก

การใช้ปากร่วมเพศ (oral sex) โดยไม่ใช้ถุงยางอนามัยอาจติดเชื้อโรคหนองในที่ช่องคอได้ ส่วนใหญ่ไม่มีอาการ เช่นเดียวกับการติดเชื้อทางทวารหนัก

ในหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อหนองในที่บริเวณปากมดลูกและช่องคลอดอาจทำให้ทารกแรกคลอดติดเชื้อได้จากการคลอดผ่านช่องคลอด และทำให้เกิดยื่อบุตาอักเสบ (ophthalmia neonatorum) หากไม่รีบรับการรักษาอาจทำให้ทารกตาบอดได้

การวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น : การตรวจ Gram strain พบ gram-negative intracellular diplococci จากสารคัดหลั่งในท่อปัสสาวะ ปากมดลูก ช่องคอ หรือทวารหนัก

การตรวจวินิจฉัยยืนยันผล : การตรวจเพาะเชื้อพบ *N. gonorrhoeae* และ/หรือ nucleic acid amplification test (NAAT) ให้ผลบวกต่อ *N. gonorrhoeae*

หมายเหตุ

กรณีใช้ NAAT ในการตรวจยืนยันผล แนะนำให้เก็บสิ่งส่งตรวจจากท่อปัสสาวะและปากมดลูก[3]

แนะนำให้ตรวจเพาะเชื้อ และ/หรือ NAAT เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในสถานพยาบาลที่สามารถตรวจได้ รวมถึงการตรวจคัดกรองการติดเชื้อเอชไอวี และซิฟิลิสในผู้มารับบริการทุกราย

การรักษาหนองใน	
Ceftriaxone	500 มิลลิกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งเดียว[2] (ในเด็กน้ำหนักตัวน้อยกว่าหรือเท่ากับ 45 กิโลกรัม ให้ยาขนาด 50 mg/น้ำหนักตัว 1 kg (ไม่เกิน 250 mg) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งเดียว)[2] โดยทั้งหมดต้องร่วมกับให้การรักษาโรคหนองในเทียมร่วมด้วย[4]

ติดตามรักษาคู่เพศสัมพันธ์แม้ไม่มีอาการ รวมถึงติดตามคู่เพศสัมพันธ์ที่ผ่านมาใน 60 วันก่อนมารับการรักษา

งดการมีเพศสัมพันธ์ 7 วันหลังสิ้นสุดการรักษาและผู้ป่วยไม่ปรากฏอาการแล้ว

การรักษาทางเลือก	
Cefixime	400 มิลลิกรัม กินครั้งเดียว[2] ให้ในกรณีที่ไม่สามารถฉีดยาได้
Gentamicin	160-240 mg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำครั้งเดียว ให้ในกรณีแพ้ยา cephalosporins[2] (ให้ผลการตอบสนองไม่ดีนักในรายที่ติดเชื้อหนองในที่ช่องคอและไม่มีหลักฐาน เพียงพอในการรักษาหนองในที่ทวารหนัก[5])

ภาวะแทรกซ้อน[1] ในกรณีที่ได้รับการรักษาไม่ถูกต้องอาจเกิด

1. ภาวะแทรกซ้อนเฉพาะที่ (local complicated gonorrhea)

    1.1 ในผู้ป่วยชาย

    - การอักเสบของท่อปัสสาวะส่วนหลัง (posterior urethritis)
    - ท่อพักอสุจิอักเสบ (epididymitis) และลูกอัณฑะอักเสบ (orchitis) เป็นภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง เพราะอาจทำให้เกิดการตีบตันของท่อ epididymis ในกรณีที่เป็นทั้งสองข้างอาจทำให้เป็นหมันได้
    - ฝีของต่อมข้างปากท่อปัสสาวะ (paraurethral duct abscess)
    - ฝีบริเวณรอบท่อปัสสาวะ (periurethral abscess)
    - ฝีที่ต่อมคาวเปอร์ (Cowper's gland abscess)

    1.2 ในผู้ป่วยหญิง

    - ฝีของต่อมบาร์โธลิน (Bartholin's abscess) ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบบ่อยที่สุด
    - ฝีที่ปีกมดลูกและรังไข่ (tubo-ovarian abscess)
    - อุ้งเชิงกรานอักเสบ (pelvic inflammatory disease; PID)

    การรักษา ให้การรักษาเหมือนหนองในชนิดไม่มีภาวะแทรกซ้อน แต่ให้ยาต่อเนื่องอย่างน้อย 2 วัน หรือจนกว่าจะหาย

2. ภาวะแทรกซ้อนแพร่กระจาย (disseminated gonococcal infection; DGI) เกิดจากเชื้อแพร่กระจายไปตามกระแสเลือด ลักษณะทางคลินิกที่พบบ่อย คือ

    2.1 มีอาการปวดข้อ (arthralgia) ต่อมามีการอักเสบของข้อ (arthritis) อาจเกิดข้อเดียว หรือ หลายข้อย้ายตำแหน่งได้ (migratory polyarthritis) ข้อที่พบได้บ่อยคือ ข้อมือ หรือข้อเท้า อาจพบที่ข้อศอก หรือข้อเข่าได้

    2.2 รอยโรคที่ผิวหนังซึ่งเกิดจากการอักเสบที่เส้นเลือดของผิวหนัง (septic vasculitis) รอยโรคที่พบได้บ่อยคือ ตุ่มหนองอยู่บนฐานสีแดง สามารถพบการตายของเนื้อเยื่อบริเวณกลางรอยโรคได้ (necrotic pustule)

มักพบการกระจายของรอยโรคบริเวณมือเท้า และ แขนขาส่วนปลาย โดยรอยโรคบริเวณมือและเท้าอาจมีอาการเจ็บ แต่รอยโรคบริเวณบริเวณอื่นมักไม่มีอาการคันหรือเจ็บ[6]

2.3 ในผู้หญิง อาจเป็นสาเหตุของการตั้งครรภ์นอกมดลูก (ectopic pregnancy) หรือเป็นหมันได้

การรักษา ควรรับไว้รักษาในโรงพยาบาลและให้การรักษา ดังนี้

1. กรณีมีจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง (petechiae) หรือตุ่มหนอง (pustule) ที่ผิวหนัง, ปวดข้อ (arthralgia), ข้ออักเสบ (septic arthritis), เอ็นและเยื่อบุข้ออักเสบ (tenosynovitis) ให้ใช้ยา
   - Ceftriaxone 1-2 g ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ วันละ 1 ครั้ง[2,7] จนอาการดีขึ้นแล้วเปลี่ยนเป็นยากิน (cefixime 400 mg วันละ 2 ครั้ง) รวมระยะเวลาในการรักษาอย่างน้อย 7 วัน
   - ให้รักษาโรคหนองในเทียมร่วมด้วย[1,4]
   - คู่เพศสัมพันธ์ควรได้รับการประเมินการติดเชื้อและรักษา[1,4]
2. กรณีที่มีเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ร่วมด้วย ให้ใช้ยา
   - Ceftriaxone 1-2 g ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ทุก 12 ชั่วโมง นาน 10-14 วัน[1,6] ให้รักษาโรคหนองในเทียมร่วมด้วย[4]
   - คู่เพศสัมพันธ์ควรได้รับการประเมินการติดเชื้อและรักษา[1]
3. กรณีที่มีเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) ร่วมด้วย ให้ใช้ยา
   - Ceftriaxone 1-2 g ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ทุก 12 ชั่วโมง นานอย่างน้อย 4 สัปดาห์[2,7]
   - ให้การรักษาหนองในเทียมร่วมด้วย[4,7]
   - คู่เพศสัมพันธ์ควรได้รับการประเมินการติดเชื้อและรักษา[1]

หมายเหตุ

ผู้ป่วยโรคหนองใน ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีภาวะแทรกซ้อน หากผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วย ให้การรักษาเหมือนผู้ป่วยไม่ติดเชื้อเอชไอวี[2,7]

ในหญิงตั้งครรภ์

- Ceftriaxone 500 มิลลิกรัม[2] ฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งเดียว ร่วมกับ azithromycin 1 g กินครั้งเดียว

ในหญิงให้นมบุตร

- Ceftriaxone 500 มิลลิกรัม[2] ฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งเดียว ร่วมกับ azithromycin 1 g กินครั้งเดียว

การนัดผู้ป่วยหลังการรักษา[2]

หนองในชนิดไม่มีภาวะแทรกซ้อน (uncomplicated gonorrhea)

ครั้งที่ 1 7 วัน หลังจากวันที่รับการรักษา เพื่อทำการตรวจ Gram stain, culture ซ้ำ

ครั้งที่ 2 1-3 เดือน หลังจากวันที่รักษา พร้อมทั้งตรวจเลือดซ้ำเพื่อค้นหาโรคซิฟิลิส และให้การปรึกษาเพื่อตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวี

หนองในที่มีภาวะแทรกซ้อน (complicated gonorrhea)

ครั้งที่ 1 ในวันรุ่งขึ้น เพื่อฉีดยาซ้ำ

ครั้งที่ 2 7 วัน หลังฉีดยาซ้ำหรือวันรุ่งขึ้นหากอาการยังไม่ดีขึ้น เพื่อทำการตรวจ Gram stain, culture ซ้ำ

ครั้งที่ 3 3 เดือน หลังจากวันที่รับการรักษา พร้อมทั้งตรวจเลือดซ้ำเพื่อค้นหาโรคซิฟิลิสและให้การปรึกษาเพื่อตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวี ในกรณีที่ไม่มาติดตามใน 3 เดือน หากมารับบริการภายในหนึ่งปี ให้ตรวจหาโรค หนองในและซิฟิลิสซ้ำ เนื่องจากมีโอกาสติดเชื้อซ้ำสูง

หมายเหตุ

1. ในกรณีตรวจด้วย NAAT ของ *N. gonorrhoeae* แนะนำให้ตรวจซ้ำหลังจากรักษาแล้ว 2 สัปดาห์[2]
2. ในกรณีผู้ป่วยมีความเสี่ยงครั้งใหม่ ควรตรวจหาโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

การรักษาในกรณี treatment failure[2]

ในกรณีการรักษาด้วยยากลุ่มแนะนำข้างต้น (ceftriaxone 500 mg หรือ cefixime 400 mg) ไม่ได้ผล โดยผู้ป่วยยังคงมีอาการหลังทำการรักษา 7 วัน และซักประวัติไม่มีพบความเสี่ยงการติดเชื้อซ้ำ (re-infection) ควรตรวจหลังการรักษา (test of cure) ดังนี้

- เพาะเชื้อ (culture) และ
- ทดสอบความไวของเชื้อหนองในต่อสารต้านจุลชีพ (antimicrobial susceptibility testing for *N. gonorrhoeae*)

ยาที่แนะนำในกรณี treatment failure ของ ceftriaxone และ cefixime

- Ceftriaxone 1 g ฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งเดียว ร่วมกับ azithromycin 2 g กินครั้งเดียว
- Spectinomycin 2 g ฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งเดียว (ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่ได้มีการติดเชื้อหนองในที่ช่องคอ) ร่วมกับ azithromycin 2 g กินครั้งเดียว
- Gentamicin 160-240 mg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำครั้งเดียว ร่วมกับ azithromycin 2 g กินครั้งเดียว

หมายเหตุ

1. การใช้ gentamicin มีหลักฐานไม่เพียงพอที่จะยืนยันประสิทธิภาพในการรักษาหนองในที่ทวารหนักและช่องคอ[4]
2. ยา spectinomycin ขณะนี้ยังไม่มีจำหน่ายในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

1. Reddy BSN, Khandpur S, Sethi S, Unemo M. Gonococcol infections. In: Gupta S, Kumar B, editors. Sexually transmitted infections. 2nd ed. Delhi: Mosby; 2012. p. 473-93.
2. กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์. แนวทางการดูแลรักษาโรคหนองใน พ.ศ. 2562 ; 2562: 9-17.
3. World Health Organization: Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. 2013, Geneva: World Health Organization. Available from:http://www.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf?ua=1.
4. Lyss SB, Kamb ML, Peterman TA, Moran JS, Newman DR, Bolan G, et al. *Chlamydia trachomatis* among patients infected with and treated for *Neisseria gonorrhoeae* in sexually transmitted disease clinics in the United States. Ann Intern Med. 2003; 139 (3):178-185.
5. Dowell D, Kirkcaldy RD. Effectiveness of gentamicin for gonorrhea treatment: systematic review and meta-analysis. Sex Transm Infect. 2012;88 (8):589-594.
6. Strowd LC, McGregor S, Pichardo RO, Gonorrhea, Mycoplasma, and Vagionosis. In: Kang S, Amagai M, Bruckner AL, ENK AH, Margolis DJ, McMichael AJ, et al, editors. Fitzpatrick's Dermatology. Vol.2. 9th ed. New York, McGraw-Hill Education; 2019. P. 3209.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015; 64 (RR-03): 1-137.

บทที่ 3

สารต้านจุลชีพ และกลไกการดื้อสารต้านจุลชีพ

ผศ. ดร. รัตนา ลาวัง

สารต้านจุลชีพ

สารต้านจุลชีพมีหลายชนิด ทั้งที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ การสังเคราะห์ และกึ่งสังเคราะห์โดยสารต้านจุลชีพมีทั้งกลุ่มที่ออกฤทธิ์กว้างและแคบ ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ และยับยั้งเชื้อ โดยสารต้านจุลชีพมีทั้งใช้สำหรับแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ซึ่งในบทนี้จะกล่าวถึงสารต้านแบคทีเรีย โดยมีการจัดกลุ่มสารต้านแบคทีเรียได้หลายวิธีที่นิยมคือแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ แบ่งเป็น

1. ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์

ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีหลายขั้นตอน สารต้านจุลชีพที่ผลิตมีหลายชนิดที่สำคัญและการออกฤทธิ์ที่หลายตำแหน่งแตกต่างกัน สารต้านจุลชีพที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือ

1.1 β-lactams

สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่สำคัญ คือ β-lactam ring (รูปที่ 3.1) โดยโครงสร้างของสารต้านจุลชีพกลุ่มนี้ คล้ายกับ D-Alanyl-D-Alanine จึงออกฤทธิ์ในการจับได้กับเอนไซม์ transpeptidase (penicillin binding protein, PBP) มีผลเกิดการยับยั้งเอนไซม์ transpeptidase และ transglycosylase และมีผลฆ่าเชื้อ (bactericidal effect) และมีการใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งแบ่งได้หลายกลุ่ม ได้แก่

1.1.1 **Penicillins** มีสูตรโครสร้างพื้นฐานเป็น 6-aminopenicillanic acid (6-APA) และสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดต่างกันที่ acyl side chain ซึ่งมีผลให้ ออกฤทธิ์แตกต่างกันได้

- Natural penicillins เช่น penicillin G และ penicillin V เป็นสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์แคบ เนื่องจากออกฤทธิ์ได้เฉพาะแกรมบวกเท่านั้น
- Aminopenicillins เช่น ampicillin และ amoxicillin ออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อกลุ่มแกรมบวก และออกฤทธิ์กับเชื้อแกรมลบบางชนิดแต่ไม่สามารถทนต่อเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase ได้
- Penicillinase stable penicillins เช่น methicillin, oxacillin, cloxacillin สามารถทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ที่สร้างโดย Staphylococci ได้
- Extended spectrum penicillins สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างทั้งเชื้อแกรมบวก และแกรมลบ ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างหลายแบบ เช่น ureidopenicillins (azlocillin, mezlocillin, piperacillin), carboxypenicillins (carbonicillin, ticarcillin), amidopenicillins (mecillinam)

1.1.2 **Cephalosporins** และ related drugs มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น 7-aminocephalo sporanic acid (7-ACA) และแต่ละชนิดต่างกันที่ acyl side chain สองแห่ง (รูปที่ 3.1) ซึ่งมีผลให้ขอบข่ายการออกฤทธิ์แตกต่างกันได้ จึงมีการจัดแบ่ง cephalosporins เป็น 5 รุ่น (generation) คือ

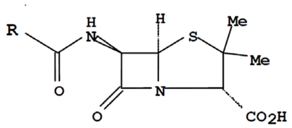
- **First generation** เช่น cephalothin, cephazolin, cephaloridine, cephalexin มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ และแกรมลบบางชนิด

- **Second generation** เช่น cefuroxime, cefaclor, ceprozil, cefamandole, loracarbef, cefoxitin มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมลบเพิ่มขึ้น โดยใช้ได้ดีกับเชื้อ *Haemophilus influenzae* และ *Moraxella catarrhalis* ที่สร้างเอนไซม์ ß-lactamase ด้วย ซึ่งนำไปใช้ในการรักษาไซนัสอักเสบ หรือ lower respiratory tract infection ได้ รวมถึงมีผลต่อเชื้อ anaerobes ด้วย โดย cefuroxime, cefaclor, ceprozil, loracarbef เป็นยากิน และ cefaclor ถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์ ß-lactamase
- **Third generation** เช่น ceftizoxime, cefixime, cefpodoxime, cefdinir, ceftibuten, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefoperazone, moxalactam เป็นสารต้านจุลชีพที่มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบดีขึ้นแต่มีฤทธิ์ ในการต้านแกรมบวกลดลง อย่างไรก็ตาม กลุ่มนี้เฉพาะ ceftazidime และ cefoperazone ที่มีผลต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ ceftizoxime และ moxalactam มีผลต่อเชื้อ *Bacteroides fragilis* ซึ่งสารต้านจุลชีพบางชนิดในกลุ่มนี้สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ด้วย โดย moxalactam จัดเป็น oxacephems เนื่องจากมีโครงสร้างต่างจาก cephalosporins เล็กน้อย โดยมียา cefixime, cefdinir, ceftibuten, cefpodoxime ที่พบในรูปยากิน

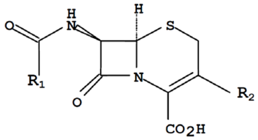
- **Fourth generation** เช่น cefepime, cefpirome มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้างกว่า third generation โดยมีคุณสมบัติเป็น zwitterionic และทนต่อเอ็นไซม์ cephalosporinase หลายชนิด เช่น inducible AmpC ออกฤทธิ์ได้ดีทั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, Haemophilus, และ Neisseria สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ดีด้วย
- **Fifth generation** เช่น ceftaroline ceftobiprole ขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้างทั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยรวมถึงเชื้อแกรมบวก เช่น methicillin resistant Staphylococci (MRS), penicillin resistant *S. pneumoniae* (PRSP), และ ceftriaxone resistant *S. pneumoniae*

1.1.3 **Cephamycins** เช่น cefoxitin และ cefotetan มีโครงสร้างคล้าย cephalospoins แต่มี side chain ของ β-lactam เป็น methoxy แทน hydrogen atom ของ cephalosporins มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกว้างทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งการทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ได้ดี รวมทั้ง extended spectrum β-lactamases (ESBLs)

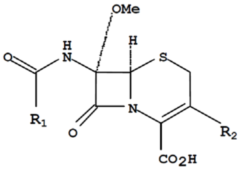
1.1.4 **Monobactams** เช่น aztreonam มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ดีกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และทนต่อ β-lactamase หลายชนิด แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและ anaerobes โดยมักใช้ในการรักษาร่วมกับสารต้านจุลชีพชนิดอื่น



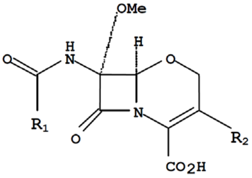
Penams



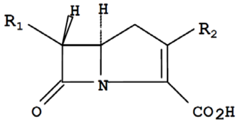
Cephems



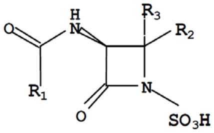
Cephamycins



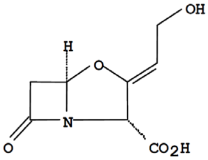
Oxacephamycins



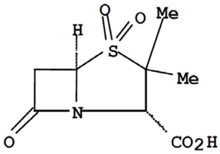
Carbapenems



Monobactams



Clavulanic acid



Sulbactam

รูปที่ 3.1 โครงสร้างสารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams และสารยับยั้ง β-lactamase

1.1.5 **Carbapenems** เช่น imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, biapenem, lenapenem, faropenem มีโครงสร้างคล้าย penicillins (ดังรูป 3.1) มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกว้างทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้ง anaerobes นอกจากนี้ ทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ได้ดี รวมทั้ง extended spectrum β-lactamases (ESBLs) และ AmpC (Class C) β -lactamases

1.1.6 **β-lactam / β-lactamase inhibitor combination** เช่น amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam มีการนำสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ β-lactamase ใช้ร่วมกับ aminopenicillins หรือ extended-spectrum penicillins โดยสารยับยั้ง β-lactamase ไม่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพ (ยกเว้น sulbactam มีฤทธิ์บ้าง) แต่จับ β-lactamase และ มีผลให้ β-lactams ออกฤทธิ์ได้

1.2 Glycopeptides

สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรท และ polypeptides เช่น vancomycin และ teicoplanin, dalbavancin, telavancin มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวกได้ดีแต่ไม่มีผลต่อเชื้อแกรมลบ ออกฤทธิ์แบบ bactericidal โดยจับกับ D-alanyl-D-alanine (D-ala-D-ala) ยับยั้งเอนไซม์ transpeptidase และ transglycosylase ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเกิด cross-linking ในการสร้าง peptidoglycan ของเชื้อ

1.3 Fosfomycin

สารต้านจุลชีพนี้ออกฤทธิ์โดยยับยั้งในขั้นตอนตั้งแต่การสร้าง precursor ของการสังเคราะห์ผนังเซลล์ โดยจับกับเอนไซม์ enolpyruvate transferase ซึ่งมีผลยับยั้งการเติม lactate จาก phosphoenolpyruvate (PEP) แก่ UDP-N-acetyl-glucosamine ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้าง N-acetyl-muramic acid ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และมีผลเสริมฤทธิ์กับการใช้ยากลุ่ม β-lactams, aminoglycosides และ fluoroquinolones ซึ่งสารต้านจุลชีพนี้ขับออกได้ดีที่ไต จึงใช้ได้ผลดีในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ

1.4 Bacitracin

สารต้านจุลชีพนี้จัดเป็นสาร cyclic peptide ออกฤทธิ์โดยรบกวนการเกิด dephosphorylation ใน cycling ของ lipid carrier ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวกได้ดีมาก แต่สารต้านจุลชีพนี้ มีผลข้างเคียงต่อไตสูง (nephrotoxic) จึงมีการใช้เฉพาะภายนอก โดยการยับยั้ง flora ที่ lesion ที่ผิวหนัง ใน wound หรือ mucous membrane

1.5 Cycloserine

สารต้านจุลชีพนี้มีโครงสร้างคล้าย D-alanine จึงมีผลยับยั้งเอนไซม์ alanine racemase และ D-alanine ligase ในการนำ D-alanine ไปใช้ในการสร้าง peptidoglycan pentapeptide จึงมีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ใช้มากในการติดเชื้อ Mycobacteria มีผลข้างเคียงได้ต่อ central nervous system

2. ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

การสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียมีหลายขั้นตอนทั้ง initiation, elongation และ termination ดังนั้น จึงมีการพัฒนาสารต้านจุลชีพหลายกลุ่มเพื่อยับยั้งขั้นตอนต่างๆ เช่น

2.1 Aminoglycosides

สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้มีโครงสร้างต่างกันได้ แต่ในสูตรโครงสร้างมักมีส่วนคาร์โบไฮเดรทที่คล้ายกันโดยเป็น amino sugar อย่างน้อยหนึ่งตัว เช่น streptomycin, amikacin, gentamicin, tobramycin, kanamycin, spectinomycin สำหรับ spectinomycin จัดเป็น aminocyclitol เนื่องจากขาดส่วนของ amino sugar แต่มี inositol ring และหมู่ methyl amino แทนหมู่ hydroxyl (รูปที่ 3.2) โดย aminoglycoside ผ่านเข้าทาง porin และ transport เข้าเซลล์ โดยยาจับกับ 30s subunit (12s subunit) ของไรโบโซม แล้วมีผลให้อ่านลำดับเบสเปลี่ยนไป การเรียงลำดับของกรดอะมิโนบนสายโปรตีนเปลี่ยน ทำให้สร้างโปรตีนผิดชนิดหรือสร้างไม่ได้ จึงมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (cidal effect) โดยออกฤทธิ์ได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบหลายชนิด

2.2 Tetracyclines

สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้ เช่น tetracycline, doxycycline, minocycline, tigecycline ซึ่งมีโครงสร้างหลักดังรูปที่ 2 โดยสารต้านจุลชีพนี้จับแบบ reversible กับ 30s subunit ของ ribosome และยับยั้งการจับของ amino-acyl-tRNA กับ mRNA-ribosome complex ที่ตำแหน่ง A site มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (bacteriostatic effect) มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้างทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ anaerobes, Rickettsia, Chlamydia, Mycoplasmas แต่สารต้านจุลชีพนี้มีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง ในเด็กทำให้ฟันที่งอกมีสีเหลืองผิดปกติ และทารกเกิดพิการได้

2.3 Macrolides

มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย lactone ring ขนาดใหญ่ และมี amino sugar หนึ่งหรือมากกว่ามาจับด้วย glycosidic bond (รูปที่ 3.2) เช่น erythromycin, roxithromycin, clarithomycin, azithromycin โดยออกฤทธิ์จับแบบ irreversible กับ 50s subunit ของ ribosome และมีผลยับยั้งขั้นตอนการ translocation ในการสังเคราะห์โปรตีน โดยตำแหน่งที่ยาไปจับใกล้เคียงกันทั้ง lincosamides, streptogramin B, และ chloramphenicol ยากลุ่ม macrolides มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลุ่ม Streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, Staphylococci, Corynebacteria, Listeria และเชื้ออื่นๆ บางชนิด เช่น Helicobacter, Legionella, Chlamydia

2.4 Lincosamides

โครงสร้างหลักประกอบด้วย amino acid, trans-L-4-n-propylhygric acid เชื่อมกับ amino sugar ที่มี sulfur อยู่ด้วย (รูปที่ 3.2) เช่น lincomycin และ clindamycin ซึ่ง lincomycin มีผลข้างเคียงสูงจึงไม่ใช้แล้ว โดย clindamycin จับกับ 50s subunit ของ ribosome ใกล้ P site มีผลรบกวนการจับของ aa-tRNA โดยแย่งจับแทนและเปลี่ยนโครงสร้างของ ribosome ซึ่ง clindamycin มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดโดยเฉพาะ *S. aureus*, Streptococcus และ Pneumococci แต่ไม่มีผลต่อเชื้อแกรมลบ

2.5 Streptogramins

Quinopristin (streptogramin B)-dalfopristin (streptogramin A) เป็นสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์โดยจับกับ 50s subunit ของ ribosome มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวกดี รวมทั้งเชื้อแกรมบวกดื้อยา เช่น multiple drug resistance streptococci, penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)

2.6. Phenicols

สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้ เช่น chloramphenicol และ thiamphenicol ออกฤทธิ์โดยจับแบบ reversible กับ 50s subunit ของ ribosome ใกล้ P site มีผลรบกวนการจับของ aa-tRNA โดยยับยั้งการต่อสาย peptide เป็นสารต้านจุลชีพที่มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้างทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (aerobes และ anaerobes) และ Rickettsiae แต่สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง โดยรบกวนการทำงานของไขกระดูกได้

2.7 Oxazolidinones

Linezolid เป็นสารต้านจุลชีพที่จับอย่างจำเพาะกับ 23s rRNA บน 50s subunit ของ ribosome โดยมีผลป้องกันการเกิด complex ของ 30s subunit, mRNA, initiation factor และ formyl methionyl tRNA ในการรวมเป็น 70s ribosome ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนแรก จึงออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ (Bactericidal effect) จากความจำเพาะในการจับจึงไม่มี cross-resistance กับยาต้านจุลชีพอื่น โดยออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งเชื้อดื้อยา เช่น vancomycin resistant Enterococci (VRE) methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) และเชื้อ multiple drug resistance แกรมบวกอื่นๆ

3. Cell membrane permeability

เป็นกลุ่มสารต้านจุลชีพที่มีผลข้างเคียงสูง จึงมีการพัฒนาสารต้านจุลชีพกลุ่มนี้น้อย ประกอบด้วย สารต้านจุลชีพกลุ่มหลักคือ polypeptides

3.1 Polymyxins เช่น polymyxin B และ polymyxin E (colistin) ออกฤทธิ์โดยทำลายผนังเซลล์บางส่วน ทำให้ศูนย์เสียสารในเซลล์บางส่วน มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ โดยออกฤทธิ์ได้กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumanii* และแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาด้วย ซึ่ง polymyxin มีผลโดยรบกวนการเรียงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ และเนื่องจาก polymyxin มีผลข้างเคียงสูงรวมทั้งต่อไต (nephrotoxicity) จึงมักใช้เป็นยาภายนอก หรือใช้ด้วยความระมัดระวังหรือเปลี่ยนเป็นรูปของเกลือและอื่นๆ เพื่อให้ความเป็นพิษลดลง

3.2 Daptomycin สารต้านจุลชีพนี้จัดเป็นสาร cyclic lipopeptide ออกฤทธิ์โดยยาจับกับ membrane และมีผลให้มีการเสียโปตัสเซียมจากเซลล์ ทำให้เสียสมดุลย์ของอิออน ซึ่งกระทบการทำงานในการสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีน ซึ่งเป็นยามีฤทธิ์แบบฆ่าเชื้อ (Bactericidal effect) และสารต้านจุลชีพนี้ใช้ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมบวก โดยรวมทั้งแกรมบวกดื้อยา เช่น เชื้อ methicillin resistant Staphylococci (MRS), vancomycin resistance Enterococci (VRE), และ vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA)

4. ยับยั้งการสังเคราะห์ nucleic acid

4.1 Quinolones สารต้านจุลชีพที่เกิดจากการสังเคราะห์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการคลายเกลียวของสาย DNA ซึ่งในการสังเคราะห์ DNA ทำให้มีการแตกของสาย DNA เพิ่มขึ้น โดยมีผลต่อเอนไซม์ 2 ชนิด คือ DNA gyrase และ topoisomerase IV มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ดีต่อแอโรบิกแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่ดีนักกับแกรมบวก จึงเปลี่ยน side chain เพื่อให้มีการออกฤทธิ์ที่ดีขึ้น จึงมีการจัดแบ่งเป็น 4 รุ่น คือ

- **First generation** เช่น nalidixic acid, cinoxacin ออกฤทธิ์ได้ดีกับ gram-negative bacilli ใช้ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ
- **Second generation** เช่น norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, enofloxacin, lomefloxacin ออกฤทธิ์ได้ดีกับ gram-negative bacilli และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
- **Third generation** เช่น levofloxacin, sparfloxacin, gatifloxacin ออกฤทธิ์กว้างโดยออกฤทธิ์ได้ดีกับ gram-negative bacilli และแกรมบวกหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Streptococcus pneumoniae* จึงใช้ในการรักษา Community-acquired pneumonia
- **Fourth generation** เช่น moxifloxacin, trovafloxacin, sitaflox-acin ขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้างมาก ได้ดีทั้งกับ gram-negative bacilli, gram-positive cocci และ anaerobes โดยยังพบการดื้อยาต่ำ

4.2 Ansamycins เช่น rifampin เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ขนาดใหญ่ เป็นอนุพันธ์ของ rifamycin มีขอบข่ายการออกฤทธิ์ทั้ง gram-positive cocci, gram-negative cocci, enteric bacteria บางชนิด, Mycobacteria, Chlamydia โดยออกฤทธิ์จับอย่างแน่นกับ β-subunit ของ DNA-dependent RNA polymerase จึงยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ซึ่งออกฤทธิ์แบบ bactericidal กับ Mycobacteria และการที่ยาเข้าสู่เซลล์ได้ดีจึงใช้กับการรักษา intracellular organism เนื่องจากความจำเพาะของตำแหน่งการจับของ rifampin จึงไม่มี cross-resistance กับการดื้อสารต้านจุลชีพกลุ่มอื่น แต่เกิด cross-resistance กับอนุพันธ์อื่นของ rifamycin ได้

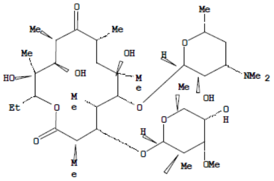
5. ยับยั้งการสังเคราะห์ Folic acid

5.1 Sulfonamides

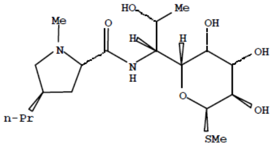
สารต้านจุลชีพกลุ่มนี้ เช่น sulfamethoxazole, sulfadiazine, sulfisoxazole เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้าย p-aminobenzoic acid (PABA) จึงสามารถจับกับเอนไซม์ dihydrofolate synthase ได้ ซึ่งมีผลยับยั้งการสร้าง folic acid ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการสร้าง purines และสังเคราะห์ nucleic acids โดยออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้างทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ Nocardia, *Chlamydia trachomatis* และโปรโตซัวบางชนิด

5.2 Trimethoprims

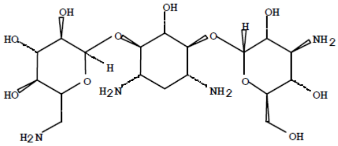
Trimethoprims เช่น trimethoprim, ormethoprim ออกฤทธิ์โดยยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolic acid reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน dihydrofolic acid เป็น tetrahydrofolic acid ซึ่งเป็นขั้นตอนในการสังเคราะห์ purines และ DNA ดังนั้นการใช้ trimethoprims ร่วมกับ sulfonamides จึงมีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ดังนั้นจึงมีการใช้ยา trimethoprim เดี่ยวหรือร่วมกับ sulfonamides ได้ สารต้านจุลชีพร่วมระหว่าง sulfonamides และ trimethoprims ที่นิยมใช้ เช่น sulfamethoxazole-trimethoprim



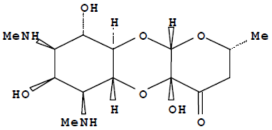
Erythromycin (Macrolides)



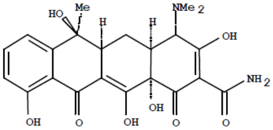
Lincomycin (Lincosamides)



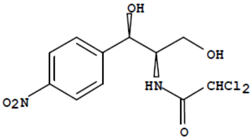
Kanamycin (Aminoglycosides)



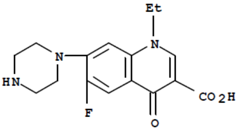
Spectinomycin (Aminocyclitol)



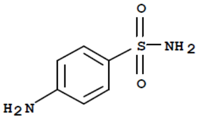
Tetracycline (Tetracyclines)



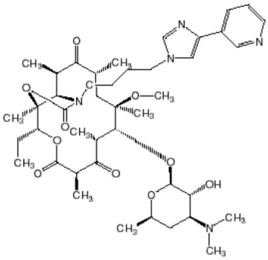
Chloramphenicol (Phenicols)



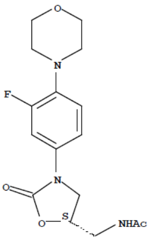
Norfloxacin (Quinolones)



Sulfonamide (Sulfonamides)



Teilithromycin (Ketolides)



Leinezolid (Oxazolidinones)

รูปที่ 3.2 ตัวอย่างโครงสร้างสารต้านจุลชีพกลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจากกลุ่ม ß-lactams

Antimycobacterial drugs

เชื้อ Mycobacteria มีกลไกการดื้อโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) ต่อสารต้านจุลชีพหลายชนิด โดยสารต้านจุลชีพที่มีผลต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัวมักใช้ไม่ได้ผลในการรักษาการติดเชื้อนี้ เนื่องจากเชื้อนี้เจริญช้า นอกจากนี้เชื้อ Mycobacteria เป็นเซลล์ที่มี lipid สูง และเป็น intracellular bacteria ของ macrophage มีผลให้สารผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ไม่ดี และเชื้อชนิดนี้ก็เกิดการดื้อต่อสารต้านจุลชีพได้ง่าย ดังนั้นในการรักษาจึงต้องใช้สารต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกันในการรักษา เพื่อป้องกันการเกิดการดื้อยา โดยต้องรักษาหลายเดือน ซึ่งสารต้านจุลชีพที่ใช้เป็น first line คือ isoniazid, rifampin (หรือ rifamycin ตัวอื่น), pyrazinamide, และ ethambutol

Isoniazid

Isoniazid (INH) เป็นสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ดีมากในการรักษา tuberculosis เนื่องจากเชื้อมักไวต่อยา ซึ่งยานี้มีขนาดเล็กจึงผ่านเข้าสู่เซลล์ macrophage ได้ดี จึงมีผลต่อเชื้อทั้งที่อยู่ในและนอกเซลล์ อย่างไรก็ตามยานี้จะออกฤทธิ์น้อยต่อการติดเชื้อ atypical mycobacterial species โดย isoniazid เป็น prodrug ซึ่งจะ active โดยอาศัย KarG และ mycobacterial catalase-peroxidase จากนั้น active isoniazid จะเกิด covalent complex กับ acyl carrier protein (AcpM) และ carrier protein synthetase (KasA) ซึ่งมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acids ที่ผนังเซลล์ และทำให้เซลล์ตาย จึงออกฤทธิ์แบบ bactericidal ต่อเชื้อที่กำลังเจริญเติบโต ผลข้างเคียงที่พบบ่อย คือการ induced เกิด hepatitis

Rifampin หรือ rifamycin ตัวอื่น

Rifampin เป็นสารอนุพันธ์ของ rifamycin ซึ่งออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อหลายกลุ่ม ทั้ง gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, Mycobacteria และ Chlamydia โดยออกฤทธิ์จับอย่างแน่นกับ β-subunit ของ DNA-dependent RNA polymerase จึงยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โดยสารต้านจุลชีพสามารถไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ และเข้าสู่ phagocytic cells ได้

Pyrazinamide

Pyrazinamide (PZA) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ nicotinamide โดยเป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์ในภาวะเป็นกลาง (neutral pH) แต่เมื่ออยู่ในภาวะเป็นกรด (pH 5.5) จะยับยั้งเชื้อ TB และ Mycobacteria อื่นบางชนิดได้ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ดังนั้นเมื่อยาเข้าสู่ macrophage จึงมีผลต่อเชื้อ Mycobacteria ในเซลล์ได้ โดย pyrazinamide จะถูกเปลี่ยนเป็น pyrazinoic acid โดยเอนไซม์ pyrazinamidase ที่ถูกควบคุมโดยยีน *pncA* ของเชื้อ Mycobacteria โดยยานี้เป็นตัวสำคัญในการใช้ร่วมกับ isoniazid และ rifampin ในการรักษาระยะสั้น (6 เดือน) ซึ่งการดื้ออาจเกิดจากการลดการนำเข้า หรือ mutation ของ *pncA* จึงมีผลให้มีการเปลี่ยนยาให้ active ลดลง โดยเกิดขึ้นค่อนข้างเร็วแต่จะไม่มี cross-resistance กับยาต้านวัณโรคกลุ่มอื่น ผลข้างเคียงที่พบบ่อย คือ hepatotoxicity (1-5%) คลื่นไส้ อาเจียน

Ethambutol

Ethambutol เป็นสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ mycobacterial arabinosyl transferases ซึ่งควบคุมโดย *embCAB* operon โดยเอนไซม์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด polymerization ของ arabinoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อ การดื้อยาเกิดจากการ mutation มีผลให้มี overexpression ของ *emb* gene product ซึ่งการดื้อยานี้เกิดขึ้นง่ายในเชื้อเมื่อมีการใช้เพียงชนิดเดียวในการรักษาการติดเชื้อ Mycobacteria จึงมักให้ร่วมกับยาชนิดอื่น ผลข้างเคียงที่รุนแรงจากการใช้คือ retrobulbar neuritis มีผลให้การมองเห็นไม่ดีและตาบอดสีได้

Alternative second line drugs

มีสารต้านจุลชีพบางชนิดใช้เป็น alternative drug ในกรณีที่ 1) พบเชื้อดื้อยากลุ่ม first line 2) ในรายที่การรักษาไม่ได้ผลในทางคลินิกในการรักษาด้วย conventional therapy 3) ในรายที่ผู้ป่วยแพ้ยาที่ใช้ในการรักษาอย่างรุนแรง 4) มี guideline สำหรับการดูแลเรื่องความเป็นพิษ ยาที่ใช้ เช่น

- Ethionamide มีความใกล้เคียงกับ isoniazid และยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid เช่นกัน
- Capreomycin เป็นสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งการสังเคราะห์ peptide ของโปรตีน โดยยานี้เป็นยาฉีดที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อยา
- Cycloserine เป็นสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ มีผลต่อเชื้อ Mycobacteria หลายชนิด แต่มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทส่วนกลางได้
- Aminosalicylic acid (PAS) เป็นสารต้านจุลชีพกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ Folic acid เนื่องจากมีโครงสร้างคล้าย PABA ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ได้ดีมากกับเชื้อ Mycobacteria เกือบทั้งหมด
- Kanamicin & amikacin โดย kanamicin ใช้รักษาวัณโรคที่เกิดจากเชื้อดื้อ streptomicin จากปัญหาการพบอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาหลายชนิดสูงขึ้น (multipledrug-resistant tuberculosis) ทำให้ amikacin มีบทบาทมากขึ้น เนื่องจากอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อ amikacin ต่ำ และ amikacin ยังใช้กับ atypical mycobacteria ได้ด้วย โดยมักใช้ amikacin ร่วมกับยาอื่น 2-3 ชนิด
- Fluoroquinolones ออกฤทธิ์กับ atypical mycobacteria ได้ด้วย โดยใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาอื่น 2-3 ชนิดโดยมักใช้ร่วมในการรักษากรณีพบเชื้อดื้อยา first line โดย moxifloxacin เป็นตัวที่ออกฤทธิ์ต่อ *M. tuberculosis* ดีที่สุดในยากลุ่มนี้
- Linezolid มีการใช้ร่วมกับยา second และ third line ในการรักษาการติดเชื้อชนิด multidrug-resistance ผลข้างเคียงของการใช้ยานาน คือ การกดไขกระดูก ดังนั้นยานี้ควรจะใช้เป็นตัวสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อดื้อ first และ second line
- Rifabutin เป็นอนุพันธ์ของ rifamycin โดยออกฤทธิ์ได้ดีต่อ *M. tuberculosis*, *M. avium intracellulare* และ *M. fortuitum* โดยออกฤทธิ์เหมือน rifampin และเกิด cross-resistance กับ rifampin ยานี้ใช้ได้ผลดีมากในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อโรค disseminated atypical mycobacteria ในผู้ป่วยเอดส์ที่มี CD4 <50 cells/µl และใช้ป้องกันการเกิด tuberculosis ได้

- Rifapentine เป็น analog ของ rifampin จึงมีฤทธิ์ยับยั้ง RNA polymerase โดยให้ผลดีมากกับ *M. tuberculosis* และ *M. avium* โดยยานี้มี cross-resistance ระหว่าง rifampin และ rifapentine นอกจากนี้ยานี้มี toxicity เหมือน rifampin ด้วย โดยยานี้อาจใช้ในการรักษาการติดเชื้อ Mycobacteria ที่ไวต่อยา rifampin เมื่อใช้ต่อเนื่องหลังจาก 2 เดือน อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยเอดส์ พบว่ามีอุบัติการณ์การติดเชื้อซ้ำสูงด้วยเชื้อดื้อยา rifampin จึงไม่ควรใช้ในการรักษาการติดเชื้อในผู้ป่วยกลุ่มนี้

กลไกการดื้อสารต้านจุลชีพ

การดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อเกิดขึ้นจากการที่เชื้อที่ไวมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยยีนดื้อสารต้านจุลชีพอาจอยู่บนโครโมโซมหรือพลาสมิดก็ได้ ซึ่งการดื้อยาอาจเป็นผลจากการเกิด mutation ของลำดับเบสบนโครโมโซม หรือการแลกเปลี่ยนยีนดื้อสารต้านจุลชีพระหว่างแบคทีเรีย (horizontal gene transfer) โดยวิธี transformation, transduction หรือ conjugation

1. **Transformation** เป็นการส่งต่อยีนโดยยีนดื้อยาอยู่ในรูปของ free DNA โดยอาจเป็นส่วนของโครโมโซมหรือพลาสมิดแล้วมีการยีนเข้าสู่เซลล์ตัวรับ (recipient) โดยยีนสามารถสอดแทรกรวมกับ genomic DNA ของเชื้อได้ โดยลำดับเบสใน genomic DNA กับ insertion sequence ต้องคล้ายคลึงกัน เพื่อให้ DNA ใหม่เข้าไปแทนที่และแลกเปลี่ยนกับ DNA เก่าของเชื้อได้ โดยเกิดทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่อยู่ในสกุลเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน
2. **Transduction** เป็นวิธีการส่งต่อยีนโดยยีนดื้อยาอยู่กับ bacteriophage และเมื่อ phage ไปอาศัยแบคทีเรียเซลล์ใหม่ก็จะนำยีนดื้อยาไปด้วย โดยยีนดื้อยาจะสอดแทรกกับ genomic DNA ของแบคทีเรีย การแลกเปลี่ยน

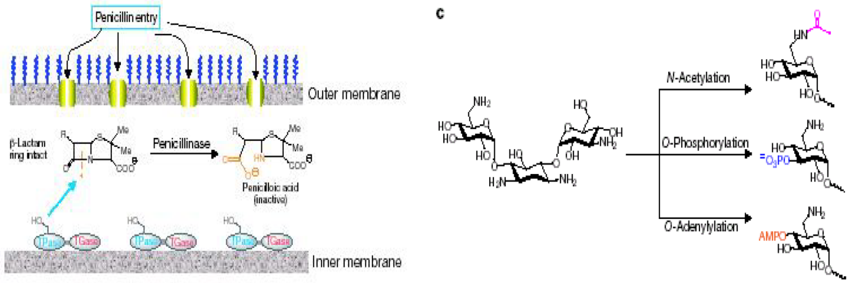
ยีนดื้อยาโดยวิธีการนี้เกิดได้ทั้งแบคทีเรีย แกรมบวกและแกรมลบ แต่ต้องเป็นชนิดที่ไวรัสอาศัย และเจริญเติบโตได้

3. **Conjugation** เป็นวิธีการส่งต่อยีนระหว่างแบคทีเรียโดยผ่านทาง sex pili เป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์ทั้งสอง ถ้ายีนดื้อยาอยู่บน conjugative plasmid จะสามารถส่งต่อการดื้อยาได้โดยตรงและอาจเป็นการถ่ายทอดการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันได้ แต่สำหรับยีนดื้อยาอยู่บน non-conjugative plasmid อาจถูกส่งไปยังเซลล์ตัวรับได้โดยอาศัยร่วมไปกับการส่งต่อของ conjugative plasmid

เชื้อจุลชีพที่มียีนดื้อสารต้านจุลชีพ พบการแสดงออกด้านกลไกทางชีวเคมีได้หลายแบบ โดยการดื้อสารต้านจุลชีพหนึ่งชนิดอาจเกิดได้จากกลไกหลายแบบ และกลไกที่พบบ่อยในเชื้อแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกันได้ ซึ่งกลไกที่พบบ่อยที่ก่อให้เชื้อดื้อสารต้านจุลชีพ คือ

1. Drug inactivation or modification (การทำลายยา)

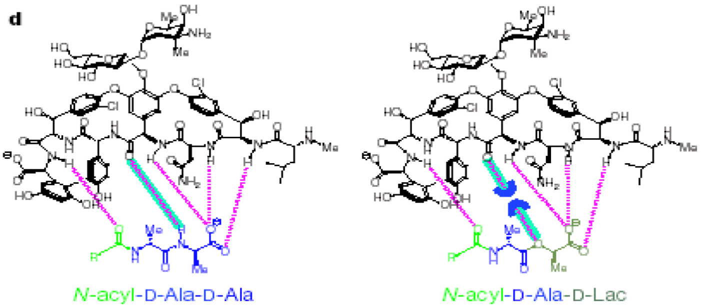
เชื้อดื้อยาหลายชนิดมีการสร้างเอนไซม์มาทำลายสารต้านจุลชีพได้ เช่น การสร้าง β-lactamases ของเชื้อเพื่อทำลายสารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams โดยเมื่อทำลาย penicillin เกิดเป็น penicilloic acid และทำลาย cephalosporin เกิดเป็น cephalosporic acid ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ โดยเอนไซม์ β-lactamase มีหลายชนิดดังนั้นความสามารถในการทำลาย β-lactams จึงแตกต่างกันได้ตามชนิดของเอนไซม์ เช่น ถ้าเชื้อสร้าง extended spectrum β-lactamases มีผลให้เชื้อดื้อ β-lactams เกือบทั้งหมด ยกเว้น cephamycin และ carbapenems ซึ่ง β-lactamase พบได้ทั้งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ พบเชื้อสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ซึ่งทำลายสารต้านจุลชีพ chloramphenicol ได้หรือเชื้อสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เปลี่ยนโครงสร้างสารต้านจุลชีพ aminoglycosides ด้วยการเกิด acetylation, adenylation หรือ phosphorylation ทำให้สารต้านจุลชีพออกฤทธิ์ไม่ได้อีกต่อไป



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างการสร้างเอนไซม์ของเชื้อซึ่งมีผลในการทำลายสารต้านจุลชีพ (Walsh C. Nature 2000;406: 775-781).

2. Modified target sites (การเปลี่ยนแปลงเป้าของสารต้านจุลชีพ)

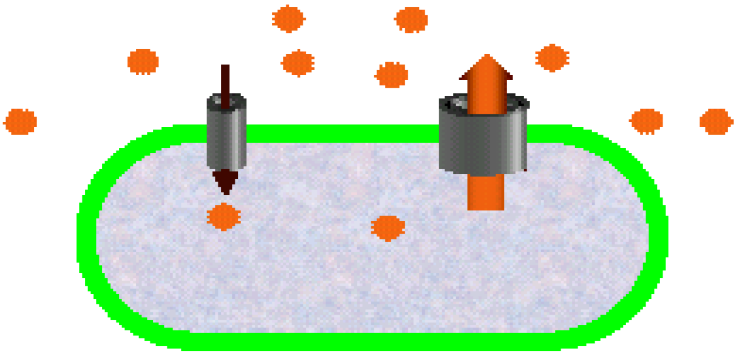
การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ ต้องจับกับเป้าหมาย (target sites) ได้จึงจะสามารถทำงานได้ ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเป้าหมาย จึงมีผลต่อการจับของสารต้านจุลชีพ เช่น เอนไซม์ transpeptidase (penicillin binding proteins, PBPs) เป็นเป้าหมายในการจับของสารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams เมื่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้รับยีน *mecA* ทำให้มีการสร้าง PBP2a (หรือเรียกว่า PBP2’) มีผลให้เชื้อดื้อสารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams ทั้งหมด (methicillin resistant Staphylococcus aureus, MRSA) หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBPs มีผลให้เชื้อ *Streptococcus pneumoniae*, *N. gonorrhoeae* ดื้อ penicillin การเปลี่ยนแปลงเป้าของสารต้านจุลชีพทำให้เชื้อดื้อยา พบในการดื้อต่อสารต้านจุลชีพชนิดอื่นนอกเหนือจาก β-lactams เช่นกัน เช่น การเปลี่ยนแปลงของ D-ala-D-ala (สารตั้งต้นการสังเคราะห์ peptidoglycan) เป็น D-ala-D-lac มีผลให้เชื้อเกิดการดื้อต่อ glycopeptides, การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV มีผลให้เชื้อเกิดการดื้อต่อ fluoroquinolone, การเปลี่ยนแปลงของ β-subunit ของ RNA polymerase มีผลให้เชื้อเกิดการดื้อต่อ rifampin และการเปลี่ยนแปลงของ dihydrofolate reductase มีผลให้เชื้อเกิดการดื้อต่อ trimethoprim



รูปที่ 3.4 ตัวอย่างการการเปลี่ยนแปลงเป้ามีผลให้เชื้อดื้อสารต้านจุลชีพ (Walsh C. Nature 2000; 406:775-781).

3. Decreased uptake (การลดการผ่านของสารต้านจุลชีพเข้าเซลล์)

การที่ยาจะยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อได้ จำเป็นต้องมีปริมาณสารต้านจุลชีพสูงพอที่จะออกฤทธิ์กระทบต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นการดื้อของเชื้อที่พบบ่อยอีกวิธีหนึ่งเกิดจากการมีปริมาณสารต้านจุลชีพในเซลล์ลดลง ทำให้เชื้อไม่ถูกยับยั้งหรือถูกทำลาย เชื้อดื้อยาหลายชนิดพบว่า เกิดจากลดการผ่านของยาเข้าเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงของ porins ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ตามรูในเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อลดการเข้าของสารต้านจุลชีพ (เช่น การดื้อ chloramphenicol) หรือการมีปั๊มเพื่อขับสารต้านจุลชีพออกนอกเซลล์ในปริมาณที่มากกว่าการ เข้าเซลล์ (เช่น การดื้อ tetracycline)



รูปที่ 3.5 ภาพแสดงการมีปั๊มเพื่อขับสารต้านจุลชีพมีผลให้เชื้อดื้อสารต้านจุลชีพ (Walsh C. Nature 2000;406: 775-781).

นอกจากกลไกดังกล่าวข้างต้น มีการพบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อด้วยกลไกอื่นๆ บ้าง เช่น sulfonamides มีโครงสร้างคล้ายสารตั้งต้น ดังนั้นการเพิ่มปริมาณการผลิตสารตั้งต้นให้มีปริมาณสูงจะทำให้สามารถแย่งจับเอ็นไซม์และเชื้อเจริญเติบโตต่อไปได้ เช่น การเพิ่มระดับของ papa-aminobenzoic acid (PABA) หรือเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์เพื่อแข่งกับปริมาณยา ก็จะทำให้เชื้อเจริญเติบโตต่อไปได้เช่นกัน เช่น การเพิ่ม dihydrofolate reductase (DHFR) ก็จะทำให้เชื้อดื้อ trimethoprim

โรคหนองในเป็นเชื้อก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่รักษาได้ (curable sexually transmitted diseases) เกิดจากเชื้อหนองใน (*Neisseria gonorrhoeae*) โดยเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ *Haemophilus ducreyi* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่มีการดื้อยาสูง ทำให้ยากแก่การรักษาและควบคุม โดยเชื้อหนองในมีการพัฒนาการดื้อยาได้หลายชนิดและที่สำคัญ ได้แก่

1. Penicillins

การดื้อยา Penicillins ในเชื้อหนองในมีการระบาดทั่วโลก ซึ่งยีนดื้อยาที่พบมีทั้งที่อยู่บนพลาสมิดและโครโมโซม โดยการระบาดด้วยการสร้างเอนไซม์ penicillinase ที่เรียกว่า penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (PPNG) มียีนควบคุมอยู่บนพลาสมิด และเอนไซม์ที่พบส่วนใหญ่เป็น penicillinase ชนิด TEM-1 ซึ่งเป็นชนิดของเอนไซม์ที่พบได้บ่อยที่สุดในเชื้อแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ penicillinase ชนิด TEM-1 เป็นชนิดที่สามารถย่อยได้เฉพาะ narrow spectrum penicillins (กลุ่ม 2b) เช่น penicillin, ampicillin และ amoxycillin เป็นต้น นอกจากนี้ มีการพบเอนไซม์ชนิด TEM-135 ในเชื้อหนองใน โดยเอนไซม์นี้มีความแตกต่างกับเอนไซม์ชนิด TEM-1 ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 182 โดยเปลี่ยนจาก methionine เป็น threonine (Met182Thr) ซึ่งเอนไซม์นี้ยังคงคุณสมบัติของการย่อยได้เฉพาะ narrow spectrum penicillins (กลุ่ม 2b) ซึ่งพลาสมิดพาหะของเอนไซม์ penicillinase ที่พบในเชื้อหนองในมีได้หลายชนิด คือ Africa, Asia, Toronto, Rio, Nimes, New Zealand และ Johannesberg โดยการระบาดของเชื้อ PPNG เกิดจากการพบพลาสมิดชนิด Africa, Asia, หรือ Toronto สำหรับกรณีพบยีนดื้อยาบนโครโมโซมเกิดจากกลไกอื่นๆ ที่ไม่ใช่การสร้างเอนไซม์ซึ่งมียีนควบคุมอยู่บนโครโมโซม จึงเรียกว่า chromosomal mediated resistance *N. gonorrhoeae* (CMRNG) เช่น การกลายพันธุ์ของ PBP-1 และ PBP-2 ทำให้ลดการจับของยา penicillins ต่อเป้าหมาย โดย PBP-1 และ PBP-2 มีการควบคุมด้วยยีน *ponA* และ *penA* ตามลำดับ นอกจากนี้ พบความเกี่ยวข้องกับยีนหลายชนิด

เช่น การกลายพันธุ์ของ *penB* และ *penC* (pilQ) มีผลต่อ porin โดยมีผลลดการเข้าของยาสู่เซลล์ได้หลายชนิด จึงมีผลให้เกิดการดื้อต่อยา penicillins, tetracyclines, และ quinolones สำหรับการกลายพันธุ์ของ *mtr* มีผลกระตุ้นต่อ MtrCDE efflux pump ซึ่งมีผลให้เกิดการดื้อต่อยา β-penicillins, tetracyclines และ quinolones โดยในเชื้อตัวเดียวกันอาจพบการดื้อยา penicillins ทั้ง PPNG และ CMRNG ร่วมกันได้

2. Tetracyclines

การดื้อยา tetracyclines ในเชื้อหนองในพบระบาดทั่วโลก โดยการดื้อยามียีนที่เกี่ยวข้องได้ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด โดยยีนบนโครโมโซมเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของ *mtr* และ *penB* ซึ่งก่อให้เกิดการดื้อยาในความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่ยีนควบคุมที่อยู่บนพลาสมิด เกิดจากมียีน *tetM* ใน 24.5 Mda conjugative plasmid โดยพบชนิดหลักของ *tetM* 2 ชนิด คือ Dutch และ America ซึ่งมีความแตกต่างของลำดับเบสเล็กน้อย โดยการดื้อยาที่มียีนบนพลาสมิด ก่อให้เกิดการดื้อยาในความเข้มข้นสูง เรียกเชื้อกลุ่มนี้ว่า tetracycline-resistant *N. gonorrhoeae* (TRNG) โดยยีน *tetM* มีการระบาดในเชื้อประจำถิ่นของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งการมียีนบนพลาสมิด ร่วมกับการมี selective pressure เนื่องจากการใช้ยากลุ่ม tetracyclines ในการรักษาโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อ TRNG

3. Quinolones

การดื้อยากลุ่ม quinolones ของเชื้อหนองใน (quinolone-resistant *N. gonorrhoeae,* QRNG) มียีนควบคุมอยู่บนโครโมโซม โดยมีกลไกที่พบหลัก คือ กลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *parC* ซึ่งมีผลให้การจับของยาที่เป้าหมายลดลง (target alteration) โดยการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* มีผลต่อ DNA gyrase subunit A (GyrA) โดยพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่พบบ่อย คือ serine ที่ตำแหน่ง 91

(Ser-91) และ aspartic acid ที่ตำแหน่ง 95 (Asp-95) ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน parC มีผลต่อ DNA topoisomerase IV โดยพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่พบบ่อย คือ Asp-86 Ser-87, Ser-88 และ Gly-91 ซึ่งการกลายพันธุ์ของ DNA topoisomerase IV ร่วมด้วยทำให้เพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น นั่นคือ การดื้อยาในความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อมีการกลายพันธุ์หลายเป้าหมาย (alteration in multiple targets) ในขณะที่กลไกจาก efflux pump พบการดื้อยาในความเข้มข้นต่ำ ซึ่งมีการรายงานพบเชื้อ QRNG สูงขึ้นและมี MIC สูงขึ้นด้วย

4. Spectinomycin และ aminoglycosides

ยา spectinomycin เป็นยาที่ออกฤทธิ์ได้ดีในการรักษาการติดเชื้อหนองในโดยพบเชื้อดื้อยาเป็นครั้งคราว ซึ่งการดื้อยากลุ่มนี้ มียีนควบคุมอยู่บนโครโมโซม โดยเกิดจากการกลายพันธุ์ของ ribosomal genes โดยการดื้อยา spectinomycin เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *spc* ในขณะที่การดื้อยา aminoglycosides เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *kan* นอกจากนี้ พบว่า เชื้อที่มีค่า MIC สูงขึ้นของยา gentamicin เกี่ยวข้องกับกลไกของ porin ด้วย

5. Macrolides

ยา azithromycin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ erythromycin เป็นยาที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อหนองในได้ดี โดยยานี้เป็นยาที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* สำหรับเชื้อดื้อยาพบยีนควบคุมการดื้อยา อยู่บนโครโมโซม โดยเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของ 23sRNA rrl ซึ่งควบคุมโดยยีน *mtrR* และ *mtrC* นอกจากนี้เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของ *ermB*, *ermC* และ *ermF* มีผลเกิด methylase ของเป้าหมายในการจับของยา ทำให้ยาจับได้ลดลง

6. Sulphonamide-trimethoprim combinations

Sulfamethoxazole -trimethoprim (cotrimoxazole) เคยเป็นยาที่นำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อหนองใน ซึ่งต้องใช้หลาย dose จึงทำให้ง่ายต่อการพัฒนาการดื้อยาเนื่องจากปัญหาในการควบคุมดูแลเรื่องการใช้ยา โดยยีนควบคุมการดื้อยาอยู่บนโครโมโซม โดยเกิดจากการสังเคราะห์สารตั้งต้น p-aminobenzoic acid (PABA) ในปริมาณมากกว่าปกติ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน dihydropteroate synthetase

7. Chloramphenicol /Thiamphenicol

Chloramphenicol เป็นยาที่นำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อในหลายประเทศ และมีการกล่าวถึงประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อหนองใน โดยการดื้อยา พบว่ามียีนควบคุมอยู่บนโครโมโซม โดยเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *penB*, *mtrR* และ *chl*

8. Cephalosporins

ปัจจุบันใช้เป็น first-line ในการรักษาหนองใน โดยการดื้อต่อ penicillins ของเชื้อพบการเกิด cross-resistance กับยา cephalosporins รุ่นแรกได้ โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของเป้าหมาย (target alteration) ทำให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง โดยขณะนี้ พบเชื้อให้ผลไวต่อยาลดลง (decreased susceptible) เพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบนโครโมโซม กลไกที่พบเกิดจาก mosaic และ non mosaic ของยีน *penA* นอกจากนี้ เกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของยีน *penB*, *ponA*, และ *mtrR*

เอกสารอ้างอิง

1. Katzung BG, edtor. Basic & clinical Pharmacology 10th ed. New York: McGraw-Hill Companies;2007.
2. Sabiha Y. Essack SY. The development of β-lactam antibiotics in response to the evolution of β-lactamases. Pharmaceutical Research 2001; 18 (10): 1391-1399.
3. Nora De Souza MV. New Fluoroquinolones: a class of potent antibiotics. Mini-Reviews inMedicinal Chemistry 2005; 5: 1009-1017.
4. Floss HG, Yu TW. Rifamycins-Mode of action, resistance, and biosynthesis. Chem Rev 2005;105: 621-632.
5. Zhanel GG, Walters M, Noreddin A, Vercaigne LM, Wierzbowski A, Embil JM, Gin AS, Douthwaite S, Hoban DJ. The Ketolides: A Critical Review. Drugs 2002; 62 (12): 1771-1804.
6. Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. Adv Drug Deliv Rev 2005;57(10): 1471-85
7. Ang JY, Ezike E, Asmar BI. Antibacterial resistance. Indian J Pediatr. 2004; 71(3): 229-39.
8. Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. Drugs. 2002; 62(4): 557-66.
9. Rice L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum β-lactamases. Chest 2001; 119 (suppl 2): 391s–396s.
10. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature 2000; 406: 775-781.
11. Lewis DA, Sheila A Lukehart SA. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*: evolution, therapeutic challenges and the need to strengthen global surveillance. Sex Transm Infect 2011; 87: ii39-ii43.

12. World Health Organization. Emergence of multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Threat of global rise in untreatable sexually transmitted infections. [document on the Internet]. 2011 [cited 2012 May 3]. Available from: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/who_rhr_11_14/en/index.html
13. Allen VG, Farrell DJ, Rebbapragada A, Tan J, Tijet N, Perusini SJ, Towns L, Lo S, Low DE, Melano RG. Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance Mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates from Ontario, Canada. Antimicrob Agents Chemother; 2011: 703-712.
14. Cole MJ, Chisholm SA, Hoffmann S, Stary A, Lowndes CA, Ison CA, the European Surveillance of Sexually Transmitted Infections Network. European surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Transm Infect 2010; 86: 427-432.
15. Su X, Jiang F, Qimuge, Dai X, Sun H, Ye S. Surveillance of antimicrobial susceptibilities in *Neisseria gonorrhoeae* in Nanjing, China, 1999-2006. Sex Trans Dis; 2007, 34 (11): p.000-000
16. Vernel-Pauillac F, Nandi S, Nicholas RA, Cyrille Goarant C. Genotyping as a tool for antibiotic resistance surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* in New Caledonia: evidence of a novel genotype associated with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (9): 3293-3300.
17. Bala M, Sood S. Cephalosporin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. J Glob Infect Dis. 2010 Sep; 2(3): 284-90.
18. Ohnishi M, Ono E, Shimuta K, Watanabe H, Okamura N. Identification of TEM-135 beta-lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54 (7): 3021-3.

บทที่ 4

การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย (Antimicrobial susceptibility testing)

นางสาวมณีมณฑ์ โคเบนท์

ผศ. ดร. รัตนา ลาวัง

การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียเป็นขบวนการสำคัญสำหรับการประเมินความสามารถของสารต้านจุลชีพ ในการยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เพื่อให้แพทย์ใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจเลือกชนิดและระดับของสารต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสำหรับการรักษาผู้ป่วย รวมทั้งใช้ในการศึกษาแนวโน้มการดื้อยาของเชื้อด้วย อย่างไรก็ตาม การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียจัดเป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ การแปลผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียอาศัยการอ้างอิงกับค่ามาตรฐานซึ่งถูกกำหนดโดยหน่วยงานสากล ที่นิยมใช้คือมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ของประเทศสหรัฐอเมริกา วิธีการทดสอบและค่ามาตรฐานในการแปลผลมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อแบคทีเรียและชนิดของสารต้านจุลชีพ โดยการทดสอบจำเป็นต้องทำด้วยวิธีมาตรฐานที่กำหนดไว้ เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบผลกับค่าอ้างอิงได้

วิธีการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบความไวสามารถทำได้หลายวิธี เมื่อพิจารณาตามความละเอียดของผลการทดสอบแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1. แบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semiquantitative method)
2. แบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative method)

1. การทดสอบความไวแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์

เป็นวิธีทดสอบความไวอย่างง่ายๆ และสะดวก นิยมใช้ในกรณีต่อไปนี้

1.1 ต้องการทดสอบกับแบคทีเรียหลายๆ สายพันธุ์

1.2 ต้องการทดสอบผลเพียงคร่าวๆ ว่าเชื้อดื้อหรือไม่ดื้อต่อยา

1.3 ต้องการทดสอบความไวกับสารต้านจุลชีพหลายชนิด

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบด้วยวิธีนี้จะต้องสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่ว ๆ ไปและมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ การทดสอบความไวแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ disk diffusion method หรือ agar diffusion method

1.1. Disk diffusion method หรือ Kirby Bauer's method

Disk diffusion method เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพเชิงคุณภาพ และได้รับการรับรองเป็นวิธีมาตรฐานโดยสถาบันควบคุมมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ CLSI ซึ่งนานาชาติยอมรับและนิยมใช้ในงานประจำวันของห้องปฏิบัติการต่างๆ ทั่วโลก เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration; MIC) และเป็นข้อมูลเบื้องต้นแก่แพทย์ในการเลือกใช้ยารักษาผู้ป่วย

1.1.1 หลักการ Disk diffusion method มีหลักการของการทดสอบคือสารต้านจุลชีพที่ทราบความเข้มข้น จะแพร่ทุกทิศทาง ออกจากแผ่นกระดาษกรองรูปกลม (disk) เพื่อไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็ง ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพสูงสุดจะอยู่ใกล้ disk และลดลงตามระยะห่างจาก disk โดยสารต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าสารต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก หลังจากอบเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว จะนำจานอาหารออกมาตรวจวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบ disk ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) เป็นหน่วยมิลลิเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในตารางแปลผลมาตรฐาน

ใน CLSI guideline รายงานผลเชิงคุณภาพเป็นไว (susceptible; S), ไวปานกลาง (intermediate; I) ดื้อ (resistant; R) ไม่ไว (nonsusceptible; NS) หรือ (susceptible-dose dependent (SDD)

ไว (susceptible; S) หมายถึงแบคทีเรียที่ทำการทดสอบถูกยับยั้ง การเจริญด้วยสารต้านจุลชีพอยู่ในระดับไม่เกินค่าจุดตัดความไวของยา และสามารถใช้ยาในปริมาณปกติเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งบ่งชี้ว่าน่าจะสามารถใช้ยาในการรักษาทางคลินิกได้

ไวปานกลาง (intermediate; I) หมายถึง แบคทีเรียที่ทำการทดสอบถูกยับยั้งการเจริญด้วยระดับของสารต้านจุลชีพในระดับสูงกว่าระดับที่บ่งชี้ว่าเชื้อมีความไวต่อยา แต่ต่ำกว่าระดับที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อต่อยา

ดื้อ (resistant; R) หมายถึงแบคทีเรียที่ทำการทดสอบถูกยับยั้งการเจริญด้วยสารต้านจุลชีพอยู่ในระดับสูงกว่าระดับของยาที่สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยในเนื้อเยื่อหรือสูงกว่าค่าจุดตัดความไวของยาและปริมาณยาที่ใช้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซึ่งบ่งชี้ว่าไม่ควรใช้ยาดังกล่าวในการรักษาทางคลินิก

ไม่ไว NS (nonsusceptible) หมายถึง แบคทีเรียที่ทำการทดสอบมีค่า MICs ที่สูงกว่าหรือขนาดของ inhibition zone แคบกว่าค่าจุดตัดความไว (breakpoint susceptible) ที่กำหนดในเชื้อที่การแปลผลเฉพาะที่ให้ผลไวต่อยา เนื่องด้วยอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยายังพบน้อยมากหรือไม่พบเลย

SDD (Susceptible dose dependent) หมายถึง แบคทีเรียที่ทำการทดสอบมีค่าจุดตัดความไว ที่ให้ผลไวต่อยาที่ทดสอบเมื่อใช้ในปริมาณที่แนะนำให้ใช้เพื่อการรักษาผู้ป่วย

1.1.2. ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการทดสอบวิธี disk diffusion method

การทดสอบความไวด้วยวิธี disk diffusion การแปลผลขึ้นอยู่กับขนาดของ inhibition zone ดังนั้น เราจึงควรทราบปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของ inhibition zone ซึ่งมีหลายปัจจัยดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (test medium) อาหารมาตรฐานสำหรับทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียคือ Mueller-Hinton agar (MHA) ที่มี pH 7.2-7.4 และมีการควบคุมปริมาณไอออนประจุบวก (cation) ได้แก่ แคลเซียม (Ca^{2+}) ไม่เกิน 25 mg/l และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไม่เกิน 12.5 mg/l และกำหนดให้อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไทมีนและไทมิดีน เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไทมีนและไทมิดีนจะมีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของซัลโฟนาไมด์และไตรเมโทพิม ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการกำหนดมาตรฐานความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 mm เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 ml ในจานอาหารที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 60 ml ในจานอาหารที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 mm ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อต้องเรียบและมีระดับสม่ำเสมอไม่เอียงลาดก่อนนำมาใช้ควรไว้ที่อุณหภูมิห้องและผึ่งผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้งก่อน

2. สารต้านจุลชีพ (antimicrobial disk) มีลักษณะเป็น disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm รายละเอียดบนแผ่นสารต้านจุลชีพประกอบด้วยชื่อย่อและปริมาณยา แหล่งที่มาของยาที่ใช้ทดสอบควรได้มาตรฐานและมีการควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการการเก็บรักษา disk ควรเก็บในกล่องที่มีสารดูดความชื้น (desiccator) ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อนำแผ่นสารต้านจุลชีพออกมาใช้แล้วสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C ก่อนนำมาใช้จะต้องวางที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนใช้งานเพื่อป้องกันการควบแน่นของไอน้ำ พบว่าการนำส่งและการเก็บสารต้านจุลชีพที่ไม่ถูกวิธีจะทำให้สารต้านจุลชีพเสื่อมคุณภาพก่อนถึงวันหมดอายุ การใช้ ในการทดสอบที่ใช้ disk ที่เสื่อมคุณภาพหรือหมดอายุ มีผลทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) เล็กกว่าความเป็นจริงทำให้การรายงานผลผิดพลาดได้

3. ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (inoculum size) การเตรียมแบคทีเรียสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

3.1. การเตรียมเชื้อด้วย วิธี broth culture method

- เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกัน 3 ถึง 5 โคโลนีโดยใช้ loop แตะส่วนบนของโคโลนี ใส่ในอาหารเพาะเชื้อ

เช่น tryptic soy broth หลอดละ 2 ml อบเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 2-5 ชั่วโมง วิธี broth culture method ไม่แนะนำให้ใช้ในการเตรียมเชื้อ *Staphylococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp. และ *N. gonorrhoeae* เพื่อทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธีนี้

3.2 การเตรียมเชื้อด้วย วิธี colony suspension

- ใช้เชื้อ isolated colony ซึ่งเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nonselective medium เช่น blood agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใส่ใน NSS หรือ Mueller-Hinton broth เพื่อใช้ปรับความขุ่น โดยวิธี colony suspension นี้สามารถใช้เตรียมเชื้อทั่วไป รวมทั้งเชื้อเจริญยาก เพื่อใช้ทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

นำเชื้อที่เตรียมมาปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard No.1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml การเทียบความขุ่นควรทำในที่ที่มีแสงสว่างเพียงพอโดยใช้กระดาษขาว ที่มีเส้นตรงทึบสีดำเป็นฉากหลังเทียบความขุ่นโดยดูจากความชัดของเส้นสีดำผ่านหลอดเชื้อ หากเชื้อมากเกินไปจะทำให้เห็นเส้นสีดำชัดเจนน้อยกว่าหลอด 0.5 McFarland standard No.1 ในกรณีนี้ให้เจือจางเชื้อด้วยการเติม NSS หรือ Mueller-Hinton broth เพิ่ม แต่ถ้าเป็น colony suspension แล้วเชื้อน้อยเกินไปให้เพิ่มเชื้อลงในหลอดหรือ ถ้าเป็น broth culture method เชื้อน้อยเกินไปแสดงว่าเชื้อที่ได้ไม่อยู่ในช่วง log phase ให้เริ่มต้นตั้งแต่การเตรียมเชื้อใหม่ หากใช้วิธีการเทียบความขุ่นอาจทำได้โดยวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จะได้ค่าดูดกลืนแสง (OD) ประมาณ 0.08-0.10

จำนวนแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ถ้าใช้แบคทีเรียจำนวนมากเกินไปจะทำให้ inhibition zone แคบ และถ้าใช้จำนวนแบคทีเรียน้อยเกินไปจะได้ inhibition zone กว้างกว่าความเป็นจริง

4. อุณหภูมิ (temperature) โดยทั่วไปควรอบเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 35 °C แต่เกณฑ์การยอมรับของเชื้อและยาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เช่น *Staphylococcus* spp. อบเพาะเลี้ยงที่ 35±2 °C และ *N. gonorrhoeae* 36±1 °C อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมมีผลต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งทำให้ความไวต่อยาเปลี่ยนแปลงไปได้

5. ระยะเวลาอบเพาะเชื้อ (incubation period) อาจแตกต่างกันในเชื้อและยาแต่ละชนิด และมีผลต่อการแปลผลความไวต่อยาได้ โดยทั่วไปควรอบเพาะเชื้อเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แต่เชื้อ *N.gonorrhoeae* อบที่ 20-24 ชั่วโมง

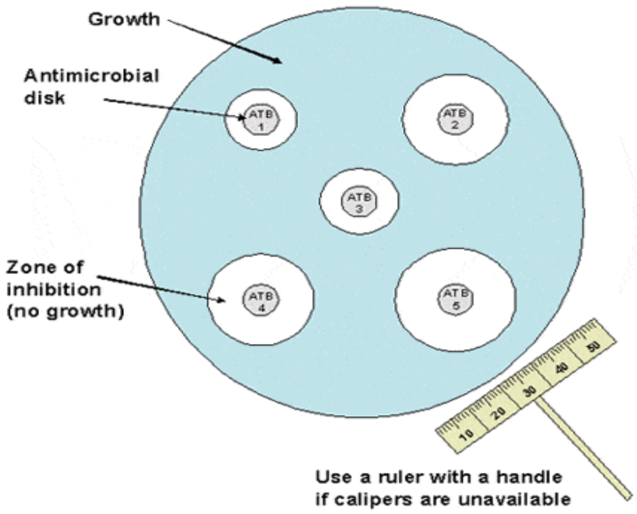
6. การควบคุมคุณภาพ โดยใช้เชื้อมาตรฐานดำเนินการควบคู่กับระบบ ซึ่งวิธีการทดสอบและการแปลผลเป็นไปโดยวิธีเดียวกัน หรือเป็นไปตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ CLSI ซึ่งผลการควบคุมคุณภาพต้องผ่าน ถึงจะดำเนินการรายงานผลการทดสอบได้ การทดสอบและการแปลผลนี้ใช้ตาม CLSI กำหนด

วิธีการทดสอบ

1. หลังจากเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland standard No.1 (suspension solution) แล้ว ให้เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยใช้ sterile swab size M จุ่มลงใน suspension solution หมุน swab หลายๆ ครั้ง เพื่อให้เชื้อซึมเข้าให้ทั่ว แตะ swab กับผิวด้านในของหลอดแล้วหมุนให้ swab พอหมาดๆ นำมาป้ายเป็น 3 ระนาบ ทำมุม 60 องศาในแต่ละครั้ง ให้เชื้อกระจายทั่วผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายรอบขอบด้านในของอาหารเพาะเชื้ออีกครั้งหนึ่ง
2. ใช้ forcep ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ คีบ disk มาวางบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปล่อยให้ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แต่ห้ามเกิน 15 นาที กดเบาๆ ให้แผ่น disk ติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าใช้จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร ไม่ควรวาง disk เกิน 5 ชนิด ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตรไม่ควรวาง disk เกิน 12 ชนิด

   สำหรับเชื้อ *S.pneumoniae, N. gonorrhoeae* และ *Haemophilus spp.* ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร ไม่ควรวาง disk เกิน 4 ชนิด ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ไม่ควรวาง disk เกิน 9 ชนิด

3. นำจานเพาะเชื้อที่ได้ อบเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (เกณฑ์การยอมรับของเชื้อและยาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน) ภายใน 15 นาที หลังจากวางแผ่นยาเสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยวางคว่ำให้ด้านที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ข้างบน
4. การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพในแต่ละครั้ง ควรทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานควบคู่ไปด้วยเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการทดสอบ
5. นำจานเพาะเชื้อที่อบเพาะเลี้ยงครบเวลามาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เป็นค่ามิลลิเมตรโดยใช้เครื่องมือวัดขนาดที่ได้มาตรฐาน vernier, calipers หรือไม้บรรทัด เราสามารถวัดขนาดของ inhibition zone จากด้านหน้าหรือด้านหลังจานเพาะเชื้อหากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อใส แต่ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมจะต้องวัดจากด้านหน้าของจานเพาะเชื้อถ้าเตรียมเชื้อได้ถูกต้อง เชื้อจะขึ้นอย่างสม่ำเสมอไม่มีช่องว่างระหว่างโคโลนี และขอบของ inhibition zone จะชัดเจน



รูปที่ 4.1 การทดสอบ Diffusion method

ที่มา: https://microbeonline.com/wp-content/uploads/2013/07/Muller-Hinton-Agar.gif.

6. นำผลที่วัดได้มาเทียบกับค่าในตารางแปลผลมาตรฐานตามเกณฑ์ CLSI guideline โดยผลของเชื้อควบคุมต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้

เนื่องจาก CLSI guideline มีการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงข้อมูลการแปลผลและการรายงานผลให้ถูกต้องเป็นปัจจุบันเพื่อให้สอดคล้องกับการรักษาเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจากผู้ป่วยทุกปี ทำให้ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นจะต้องติดตามข้อมูลเหล่านี้เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

2. แบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative method)

เป็นการทดสอบที่ให้ผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยการผสมสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นจากสูงไปหาต่ำกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใส่เชื้อลงไป นำไปอบเพาะเชื้อข้ามคืนในตู้อบ 35 ℃ ทำการตรวจหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ เรียกว่า minimum inhibitory concentration (MIC) และในบางวิธีจะทราบค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียนั้นได้เรียกว่า minimum bactericidal concentration (MBC) การทดสอบความไวแบบปริมาณวิเคราะห์นี้มีขั้นตอนและวิธีการยุ่งยากกว่าแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์การทราบค่า MIC หรือ MBC เพื่อพิจารณาให้ปริมาณยาที่ถูกต้องเหมาะสมในการรักษา นอกจากนี้การทดสอบความไวแบบปริมาณวิเคราะห์ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ เพื่อดูค่า MIC ซึ่งค่า MIC ยิ่งน้อยจะแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของสารต้านจุลชีพนั้น

นอกจากนี้ยังใช้การหาค่า MIC เป็นการตรวจยืนยันการดื้อยาของแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถแปลผลการทดสอบจากวิธี disk diffusion ได้

สารต้านจุลชีพที่ทดสอบ

สารต้านจุลชีพที่นำมาทดสอบเป็นผงมาตรฐานอ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ (laboratory reference standard powder) ซึ่งต้องปราศจากสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพปนเปื้อน โดยซื้อจากบริษัทที่ผลิตยาหรือสารเคมีที่เชื่อถือได้ ซึ่งจะมีข้อมูลเกี่ยวกับส่วนประกอบของสารเคมี, การเก็บรักษา, ความคงตัว, ความแรง (potency), คุณสมบัติในการละลาย, วันหมดอายุ และข้อมูลอื่นๆ

การเลือกระดับความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่จะทดสอบนั้น ควรให้ครอบคลุมจุดตัด (cut off หรือ break point) ที่ใช้ในการแปลผล โดยทั่วไปนิยมเลือกความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพระหว่าง 0.125 ถึง 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายของผงยาต้านจุลชีพ ควรคำนวณปริมาณยาที่ต้องการชั่งจากค่า potency ที่บอกไว้ในฉลากข้างขวดยา ซึ่งนิยมบอกเป็นค่าไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

คำนวณน้ำหนักที่ต้องชั่ง ได้จากสูตรนี้

$$W = \frac{VxC}{P}$$

W = น้ำหนักของผงยาที่ต้องนำมาละลาย (เป็นมิลลิกรัม)

P = ค่า potency ของยา (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)

C = ความเข้มข้นของสารละลายยา (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)

V = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ (มิลลิลิตร)

Dilution method เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพเชิงปริมาณประกอบด้วยวิธี broth dilution, agar dilution และ E test

2.1 Broth dilution เป็นการเจือจางสารต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทำได้ 2 วิธี

2.1.1 Broth macrodilution method ทำการทดสอบในหลอดทดลอง ซึ่งมีวิธีการดังนี้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ broth dilution คือ cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) ที่มีการควบคุมพีเอช ปริมาณไอออนประจุบวก (cation) และไทมิดีน (thymidine) จากบริษัทผู้ผลิต ถ้าต้องการทดสอบเชื้อกลุ่มเจริญยากจะต้องเติมสารส่งเสริมการเจริญ หรือใช้อาหารชนิดที่ทำให้เชื้อเจริญได้ดี ปริมาณอาหารที่ใช้ในการทดสอบมีความแตกต่างกัน ทำให้จำแนกวิธี broth dilution ออกเป็น 2 วิธี คือ

Broth macrodilution (tube dilution) test วิธีนี้จะทำการทดสอบในหลอดทดลองขนาด 13 × 100 mm โดยใช้อาหารเหลวปริมาณ 1-2 ml ต่อหลอดทดลอง Broth microdilution test วิธีนี้จะทำการทดสอบในถาดหลุมพอลิสไทรีนขนาดเล็ก (polystyrene microtiter tray) ที่มีหลุมทดลอง 80-100 หลุม (ส่วนใหญ่ 96 หลุม) โดยใช้อาหารเหลวปริมาณ 0.1 ml/หลุม

การเตรียมสารต้านจุลชีพ

สารต้านจุลชีพ จะต้องเป็นผงสารต้านจุลชีพมาตรฐาน (standard powder) ที่มีความบริสุทธิ์ ไม่มีแป้ง หรือน้ำตาล หรือสารอื่นปนเปื้อน เตรียมสารต้านจุลชีพให้มีความเข้มข้นเป็น 40 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดที่ต้องการทดสอบเพื่อเป็น stock และเมื่อต้องการทดสอบให้ใช้ 1 ml ใส่ในหลอดที่ 1 และใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) pH 7.2-7.4 1 ml จากนั้นใช้สารต้านจุลชีพในหลอดที่ 1 ใส่ในหลอดที่ 2, 3, 4 หลอดละ 1 ml. และใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) pH 7.2-7.4 หลอดละ 1, 3, 7 ml ในหลอดที่ 2, 3, 4 ตามลำดับ จากนั้นใช้สารต้านจุลชีพหลอดที่ 4 แบ่งใส่ในหลอดที่ 5, 6, 7 หลอดละ 1 ml และใส่ CAMHB หลอดละ 1, 3, 7 ml ในหลอดที่ 5, 6, 7

ตามลำดับ จากนั้นใช้สารต้านจุลชีพหลอดที่ 7 แบ่งใส่ในหลอดที่ 8, 9, 10 หลอดละ 1 ml และใส่ CAMHB หลอดละ 1, 3, 7 ml ในหลอดที่ 8, 9, 10 ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของทุกหลอดเป็น 2 เท่า ซึ่งเมื่อเติมเชื้อที่เตรียมไว้จะทำให้เจือจางได้ความเข้มข้นตามต้องการ เช่น ตัวอย่างการเตรียมสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 128 µg/ml เป็นดังตาราง

ตารางที่ 4.1 การเตรียมสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 128 µg/ml โดยวิธี broth dilution

หลอดที่	Antimicrobial solution			ปริมาตร CAMHB	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)
	ความเข้มข้น (µg/ml)	Source	ปริมาตร		
1	5120	Stock	1	9	512
2	512	หลอดที่ 1	1	1	256
3	512	หลอดที่ 1	1	3	128
4	512	หลอดที่ 1	1	7	64
5	64	หลอดที่ 4	1	1	32
6	64	หลอดที่ 4	1	3	16
7	64	หลอดที่ 4	1	7	8
8	8	หลอดที่ 7	1	1	4
9	8	หลอดที่ 7	1	3	2
10	8	หลอดที่ 7	1	7	1

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรียได้จากทั้งวิธี colony suspensionและ วิธี broth culture method โดยนำแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้มาปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard No.1 แล้วนำมาเจือจาง 1:100 ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อจะได้แบคทีเรียจำนวนประมาณ 10^6 CFU/ml ควรทดสอบแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการทดสอบ

วิธีทดสอบ

นำสารต้านจุลชีพที่เตรียมไว้แล้วตามลำดับ (1-10) มาใส่ในหลอดปราศจากเชื้อหลอดที่ 1-10 หลอดละ 1 ml และ หลอดที่ 11, 12 ให้ใส่ CAMHB หลอดละ 1 ml จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้วในหลอดที่ 2-11 หลอดละ 1 ml นั้นคือ หลอดที่ 11 มีอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียจึงเป็นหลอดควบคุมผลบวก (positive control) หลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อ และหลอดที่ 1 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อและสารต้านจุลชีพ จึงเป็นหลอดควบคุมผลลบ (negative control) นำไปอบเพาะเลี้ยงที่ 35 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

- แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุม ควรมีค่า MIC อยู่ในช่วงที่มาตรฐานกำหนด จึงจะอ่านค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดที่ไม่ขุ่นจะไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ให้อ่านผลเป็นค่า MIC
- กรณีต้องการอ่านค่า MBC นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดที่ไม่ขุ่นทั้งหมดมาหลอดละ 10 µl เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้านจุลชีพ แล้วอบเพาะเลี้ยงที่ 35 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่แบคทีเรียไม่เจริญหรือเจริญน้อยกว่าร้อยละ 0.1 เป็นค่า MBC

2.1.2 Broth microdilution method เป็นวิธีหาค่า MIC และ MBC เหมือนกับ broth macrodilution method ต่างกันที่ภาชนะที่ใช้ในการทดสอบ และปริมาตรของเชื้อ ยา และอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้จะทดสอบในmicrotiter plates ทำให้ประหยัดปริมาณของสารต้านจุลชีพและปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งหลักการเตรียมสารต้านจุลชีพ การเตรียมแบคทีเรียที่จะทดสอบ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ การอบเพาะเชื้อ การอ่านและแปลผล ทำเช่นเดียวกับการทดสอบแบบ broth macrodilution method

2.2 Agar dilution method

เป็นการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพโดยเจือจางสารต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง แล้วเพาะแบคทีเรียบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจุดๆ โดยใช้เครื่องมือ inoculum replicating apparatus ซึ่งมี multipoint inoculator โดยหลักการทดสอบ agar dilution จะเหมือนกับ broth dilution แต่จะแตกต่างกันที่ขั้นตอนการผสมสารต้านจุลชีพความเข้มข้นต่างๆ รวมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวเป็นเนื้อเดียวกันก่อน รอให้อาหารแข็งก่อนที่จะเพาะเชื้อทดสอบลงไปโดยใช้เครื่องมือพิเศษภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ถ้าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพสามารถยับยั้งการเจริญได้จะไม่เห็นโคโลนีเจริญขึ้นมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่ยับยังการเจริญของเชื้อได้ (MIC) หน่วย µg/ml

การเตรียมสารต้านจุลชีพ

จะต้องทราบค่า potency ของสารต้านจุลชีพ คำนวณปริมาณผงมาตรฐานที่ต้องชั่งจากค่า potency, ความเข้มข้นสูงสุดที่ต้องการและปริมาตรของสารต้านจุลชีพที่ต้องการใช้ การคำนวณนี้จะต้องเตรียมสารต้านจุลชีพมีความเข้มข้นเป็น 40 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดที่ต้องการทดสอบ ในการเตรียมความเข้มข้นของสารตานจุลชีพทำโดยใช้ stock ปริมาตร 2, 1, 1 ml ใส่ในหลอดที่ 1, 2, 3 และใส่ตัวทำละลาย (diluent) ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้น้ำกลั่นในการเจือจาง ปริมาตรหลอดละ 2, 3, 7 ml ใส่ในหลอดที่ 1,

2, และ 3 ตามลำดับ จากนั้นใช้สารต้านจุลชีพในหลอดที่ 3 ปริมาตร 2, 1, 1 ml ใส่ในหลอดที่ 4, 5, 6 และใส่ตัวทำละลายหลอดละ 2, 3, 7 ml ในหลอดที่ 4, 5, และ 6 ตามลำดับ จากนั้นใช้สารต้านจุลชีพในหลอดที่ 6 ปริมาตร 2, 1, 1 ml แบ่งใส่ในหลอดที่ 7, 8, 9 และใส่ตัวทำละลายหลอดละ 2, 3, 7 ml ในหลอดที่ 7, 8, และ 9 ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของทุกหลอดเป็น 10 เท่า ซึ่งเมื่อเติมเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่เตรียมไว้จะทำให้เจือจางได้ความเข้มข้นที่ต้องการ เช่น ตัวอย่างการเตรียมสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 128 µg/ml เป็นดังตาราง

ตารางที่ 4.2 การเตรียมสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 128 µg/mL โดยวิธี agar dilution

หลอดที่	Antimicrobial solution			ปริมาตร Diluent	ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1:10 ใน agar (µg/ml)
	ความเข้มข้น (µg/ml)	Source	ปริมาตร		
1	5120	Stock	2	2	256
2	5120	Stock	1	3	128
3	5120	Stock	1	7	64
4	640	หลอดที่ 3	2	2	32
5	640	หลอดที่ 3	1	3	16
6	640	หลอดที่ 3	1	7	8
7	80	หลอดที่ 6	2	2	4
8	80	หลอดที่ 6	1	3	2
9	80	หลอดที่ 6	1	7	1

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ คือ Mueller-Hinton agar โดยนำมาต้ม 121 °C 15 นาที ให้ละลายแล้วแบ่งใส่หลอด หลอดละ 18 ml นำไปนึ่งทำลายเชื้อ แล้วทำให้อุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 50 °C โดยแช่ใน water bath

นำยาที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้นมา 2 ml ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ และใช้ตัวทำละลาย 2 ml ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (positive control) ตั้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และตากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้ง

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อโดยวิธี direct colony หรือ broth culture method ให้ได้เชื้อที่ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard No.1 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml นำมาเจือจาง 1:10 ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อจะได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^7 CFU/ml เมื่อนำ multipoint inoculator มาแตะเชื้อนี้จะมีเชื้อติดมาประมาณ 1 µl ปริมาณเชื้อสุดท้ายที่อยู่บน agar dilution plate เท่ากับ 10^4 CFU/spot เมื่อปรับความขุ่นและเจือจางแล้วควรนำมาทดสอบภายใน 15 นาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการทดสอบ

นำแบคทีเรียที่เตรียมแล้วมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้านจุลชีพ โดยอาจใช้ลูปที่เทียบมาตรฐาน (calibrated loop) ปิเปตต์อัตโนมัติ หรือ inoculum replicating apparatus โดยนำแบคทีเรียมาใส่ในหลุมๆ ละ 500 µl จากนั้นนำ multipoint inoculator แตะเชื้อในหลุมแล้วนำไปแตะบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ปลายของ multipoint inoculator จะถ่ายโอนเชื้อมาได้ประมาณ 1 µl ทำให้ได้เชื้อในแต่ละจุดประมาณ 10^4-10^5 CFU ควรหยดเชื้อบนผิว agar ที่เป็น control plate ซึ่งไม่มียาต้านจุลชีพ ก่อน plate ที่มียาโดยเรียงจากยาเข้มข้นน้อยไปมาก นอกจากนี้ควรทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานควบคู่ไปด้วย เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

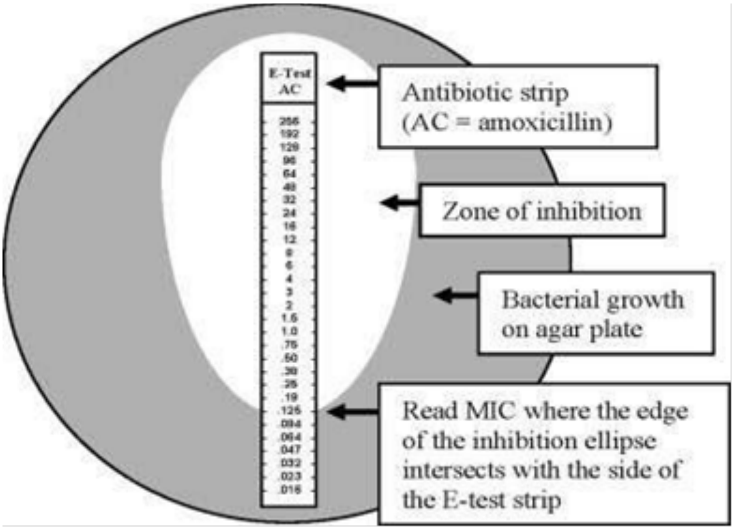
ของการทดสอบ เมื่อหยดเชื้อเสร็จแล้วควรวางจานเพาะเชื้อในระนาบให้หยดเชื้อแห้ง แล้วจึงคว่ำจานเพาะเชื้อ นำไปอบเพาะเลี้ยงที่ 35 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

การอ่านและแปลผล

อ่านค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่แบคทีเรียไม่เจริญเป็นค่า MIC โดยค่า MIC ที่ได้นี้จะมีความถูกต้องเชื่อถือได้ เมื่อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมได้ค่า MIC อยู่ในช่วงที่มาตรฐานกำหนด ค่า MIC ที่ได้สามารถนำไปแปลผลเป็นไว ไวปานกลาง ไม่ไว หรือดื้อ ได้จากตารางมาตรฐานที่กำหนดค่า cut off หรือ breakpoint

2.3 Epsilometer test (E test)

ได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบ MIC ให้สะดวกขึ้น ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยใช้หลักการแพร่กระจายของสารต้านจุลชีพ มีความสะดวกในการปฏิบัติเหมือนการทดสอบ disk diffusion method และรายงานผลเป็นค่า MIC เหมือนการทดสอบ broth หรือ agar dilution method โดยการใช้แถบพลาสติก (strip) ที่มีคุณสมบัติไม่ดูดซับน้ำขนาด 5×50 มิลลิเมตร โดยด้านหนึ่งเคลือบไว้ด้วยสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นลดลงอย่างต่อเนื่องจากความเข้มข้นมากไปหาน้อย อีกด้านหนึ่งมีตัวเลขและสเกลบอกค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ตำแหน่งต่างๆ (continuous concentration gradient) วางแถบสารต้านจุลชีพบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar ที่ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีเดียวกับการทดสอบ disk diffusion method แล้วนำ plates ไปอบเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ถ้าสารต้านจุลชีพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ จะเกิดวงใสรูปหยดน้ำ (inhibition ellipse zone) เนื่องจากความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพบนแถบไม่เท่ากันตลอดทั้งแถบ ลักษณะของ inhibition zone จึงไม่เป็นวงกลมแต่จะเป็นรูปหยดน้ำ โดยบริเวณที่มีสารต้านจุลชีพเข้มข้นสูงจะโค้งกว้าง และแคบลงตามความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ลดลง จุดความเข้มข้นน้อยที่สุดที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ตรงปลายรูปหยดน้ำดังรูป อ่านเป็นค่า MIC



รูปที่ 4.2 การทดสอบ Epsilometer test (E test)

ที่มา: https://pbs.twimg.com/media/CZYR9jLWAAANsqJ.jpg.

วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถ รายงานผลเป็นค่า MIC โดยเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ตัดขั้นตอนยุ่งยากในการเจือจางสารต้านจุลชีพ ประหยัดเวลาในการทดสอบ และสามารถนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั่วไปรวมทั้ง anaerobes และ Mycobacteria แต่มีข้อด้อยคือ ราคาแถบ E test ค่อนข้างแพง และความเข้มข้นที่สามารถวัดได้มีความจำกัดขึ้นอยู่กับแถบ E test ของแต่ละบริษัท

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Geneva: WHO document Production Services; 2013.
2. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Pensylvania: CLSI; 2019
3. World Health Organization (WHO). Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Geneva: World Health Organization; 2003.
4. มาลัย วรวิจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, สุรางค์ เดชศิริเลิศ, คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ธนาเพลส; 2557.
5. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M22 Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard. 3rd ed. Pensylvania: CLSI; 2004
6. เกษแก้ว เพียรทวีชัย, นิชา เจริญศรี, โชติชนะ วิไลลักขณา, วิทยาแบคทีเรียวินิจฉัย. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2552.
7. วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, พรทิพย์ พึ่งม่วง, สมหญิง งามอุรุเลิศ, สุมลรัตน์ ชูวงษ์วัฒนะ, การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2556.

บทที่ 5
การเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *N. gonorrhoeae*

นายพงศธร แสงประเสริฐ
ผศ. ดร. รัตนา ลาวัง

การเพาะเชื้อ (culture method)

วิธีการเพาะเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิง (reference method) ในการวินิจฉัยโรคหนองใน ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธีการอ่านผลจาก Gram stain แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจะค่อนข้างซับซ้อนกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เพราะเชื้อ *N. gonorrhoeae* เป็นเชื้อที่ต้องการอาหารพิเศษในการเจริญ และในบรรยากาศที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อต้องมีความชื้นเพียงพอ มีปริมาณ CO_2 (5-10%) อาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ดี เช่น chocolate agar ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ในการเพาะเชื้อจากตัวอย่างตรวจที่ปราศจากเชื้อ เช่น เลือด หรือใช้ subculture แต่ในกรณีที่ต้องการเพาะเลี้ยงเชื้อจากหนองหรือสารคัดหลั่งในผู้ป่วยที่มีเชื้อประจำถิ่น อาจจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารยับยั้งเชื้ออื่นๆ ก่อน เช่น Modified Thayer-Martin media (MTM), Bangrak I media (สูตรอาหารที่กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ปรับใช้) ซึ่งวิธีการเพาะเชื้อประกอบด้วยหลายขั้นตอน คือ

1. การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย

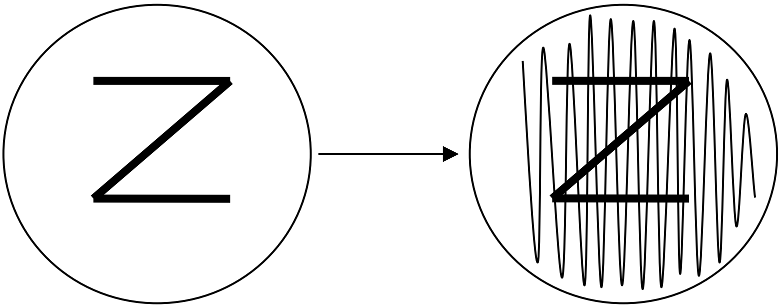
สามารถเก็บหนองหรือสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยชายและผู้ป่วยหญิง ได้จากท่อปัสสาวะ (urethra), ช่องคลอด (vagina), ปากมดลูก (endocervix), คอ (pharynx), ทวารหนัก (rectum), ฝี (abcess) และ เยื่อบุตา (conjunctival) เป็นต้น ขึ้นกับตำแหน่งที่มีความเสี่ยง โดยเก็บหนองหรือสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยแล้วป้ายลงบน MTM หรือ Bangrak I Media เป็นรูปตัว Z (รูปที่ 5.1) และนำส่งห้องปฏิบัติการทันที ในกรณีที่ไม่สามารถลงสิ่งส่งตรวจบน plate ได้โดยตรงให้ใช้ transport medium เช่น Stuart หรือ Amies และนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง ซึ่งสามารถเก็บรักษาสภาพในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 °C ได้ก่อนนำส่ง

รูปที่ 5.1 แสดงลักษณะการ streak เป็นรูปตัว Z หนองหรือสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยแล้วป้ายลงบน MTM หรือ Bangrak I Media

2. วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *N. gonorrhoeae*

หลังจากได้ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ streak เป็นรูปตัว Z บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Thayer-Martin Media (MTM) หรือ Bangrak I Media (วิธีเตรียมดังภาคผนวก) ก่อนนำเข้าตู้ incubator ให้ cross streak อีกครั้งหนึ่ง (รูปที่ 5.2) เพื่อให้ตัวอย่างตรวจที่ป้ายลงบนอาหารกระจายตัวออกมา หลังจากนั้นนำเข้าตู้ CO_2 incubator (ตั้งอุณหภูมิ 36±1 °C และ CO_2 ที่ 5%) หากห้องปฏิบัติการไม่มีตู้ CO_2 incubator สามารถประยุกต์ใช้ candle jar แทนได้ โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

1. วาง plates ลงใน candle jar ให้เหลือพื้นที่ว่างพอที่จะวางเทียนลงไป
2. วางสำลีชุบน้ำหมาดๆ ลงไปในกระป๋อง (เพื่อให้มีความชื้นเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ *N. gonorrhoeae*) อาจบรรจุลงในขวดเพื่อป้องกันการ contaminate
3. จุดเทียนสีขาวในกระป๋องแล้วปิดฝาให้สนิท รอจนกว่าเทียนจะดับ การเผาไหม้ของเทียนจะทำให้บรรยากาศภายในกระป๋องมี CO_2 ประมาณ 3-5% (หากใช้เทียนสีอื่นๆ อาจทำให้เกิดควันพิษที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้ ต้องระวังอย่าให้เทียนล้มและเว้นระยะพอประมาณไม่วางชิดกับ plate มากเกินไปเพราะหาก plate ทำจากพลาสติกอาจจะไหม้ได้)
4. นำไปใส่ใน incubator ตั้งอุณหภูมิประมาณ 36 ± 1 °C (ปกติจะเพาะเชื้อ *N. gonorrhoeae* 24-48 ชั่วโมง)



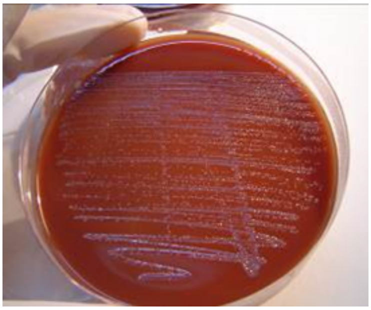
รูปที่ 5.2 แสดงลักษณะการ cross streak ให้เชื้อกระจายตัวจากตัว Z

3. การวินิจฉัยเชื้อ *N. gonorrhoeae*

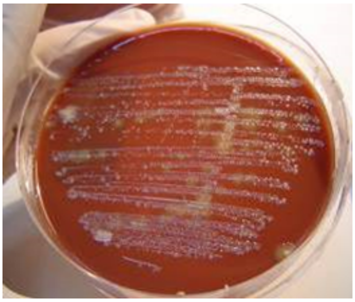
หลังจากเพาะเชื้อนาน 24-48 ชั่วโมงแล้ว สามารถนำเชื้อออกมาเพื่อการวินิจฉัยได้ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

3.1 สังเกตลักษณะโคโลนี

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* มักพบลักษณะ กลมนูน ขอบเรียบ สีน้ำตาลเทา เมื่อส่องดูภายใต้แสงไฟจะเห็นความวาวสะท้อนแสงได้ โคโลนีอาจมีหลายขนาด ตั้งแต่ขนาด 0.5-2 mm หากเกิน 24 ชั่วโมงแล้ว เมื่อใช้ loop เขี่ยจะพบว่าโคโลนีมีความเหนียว เมื่อพบโคโลนีสงสัยให้ subculture บน chocolate agar (CA) อีกครั้งจึงจะสามารถทดสอบในขั้นตอนต่อไปได้ ในกรณีสิ่งส่งตรวจที่ได้จากคอ (pharynx) และทวารหนัก (rectum) บางครั้งยาปฏิชีวนะที่ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถยับยั้งเชื้ออื่นได้หมด จะพบเชื้ออื่นปะปนอยู่กับเชื้อ *N. gonorrhoeae* จำนวนมากหรือบางครั้งขึ้นปกคลุมเชื้อ *N. gonorrhoeae* (รูปที่ 5.3) เนื่องจากทำให้การดูโคโลนียากขึ้น จึงจำเป็นต้อง subculture บน MTM ก่อน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ



ลักษณะโคโลนีเชื้อ *N. gonorrhoeae*
<u>ไม่มี</u>แบคทีเรียชนิดอื่นปน



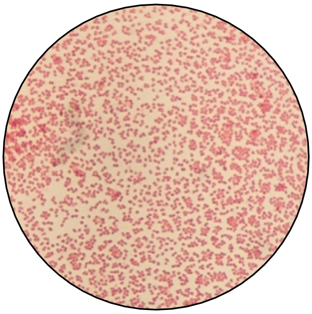
ลักษณะโคโลนีเชื้อ *N. gonorrhoeae*
<u>มี</u>แบคทีเรียชนิดอื่นปน

รูปที่ 5.3 แสดงลักษณะโคโลนีเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ไม่มีและมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นปน

<u>หมายเหตุ</u> : ในการอ่านผลเพาะเชื้อที่ได้จากผู้ป่วย ควรอ่านผลหลังจากเพาะเชื้อประมาณ 48 ชั่วโมง เพราะจะทำให้โคโลนีที่อ่านผล มีขนาดใหญ่ ง่ายต่อการแยกออกจากโคโลนีของแบคทีเรียตัวอื่นๆ และสามารถเลือกโคโลนีที่ต้องการมา subculture ได้ง่าย ลดการ contaminate จากเชื้อตัวอื่น (แต่ไม่ควรทิ้งไว้เกิน 48 ชม.) หากต้องการ subculture ให้ได้เชื้อ pure เพื่อเก็บ stock culture หรือเพื่อทดสอบอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เวลาเพาะเชื้อนานประมาณ 18-24 ชั่วโมง (หากเกิน 24 ชั่วโมง เชื้อจะตายบางส่วนไม่เหมาะแก่การนำมาทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ สังเกตได้จากเมื่อเขี่ยโคโลนีบน plate จะมีความหนืดมากกว่าปกติ เกาะกันเป็นก้อน และละลายในน้ำเกลือหรือสารละลายอื่นๆ ได้ยาก

3.2 Gram stain

ป้ายโคโลนีที่สงสัย (สีเทาน้ำตาล) บนสไลด์ที่หยดน้ำกลั่นไว้ แล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ รูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm ซึ่งสามารถทำให้เชื้อกระจายตัว และนำสไลด์ไป fix ก่อนนำมาย้อมแกรม (วิธีตามภาคผนวก) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x (oil field) จะพบลักษณะเป็นเชื้อแกรมลบ (ติดสีแดง) รูปร่างกลม อยู่กันเป็นคู่ (gram’s negative diplococci) ซึ่งจะเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในกลุ่มของ *Neisseria* spp. (รูปที่ 5.4)



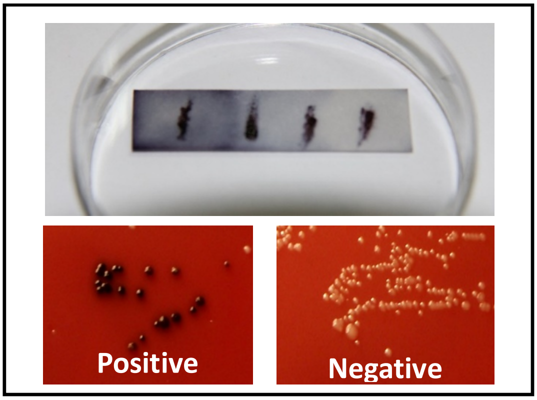
รูปที่ 5.4 แสดงลักษณะเชื้อในกลุ่ม *Neisseria* spp. เป็นแกรมลบ(ตัวเชื้อติดสีแดง) รูปร่างกลม อยู่กันเป็นคู่ๆ (gram negative diplococci) 100X

3.3 การทดสอบทางชีวเคมีเชื้อ *N. gonorrhoeae*

การทดสอบทางชีวเคมี หลายการทดสอบ (ตารางที่ 5.1) โดยมีการทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญ เช่น

3.3.1 Oxidase test

หากบน plate มีโคโลนีของเชื้อจำนวนมากสามารถหยดน้ำยา 1% oxidase ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ โดยตรง (วิธีเตรียมดังภาคผนวก) โคโลนีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มภายในเวลา 10 วินาที หากมีโคโลนีที่สงสัยในปริมาณน้อยให้แตะโคโลนีเชื้อมาป้ายบนกระดาษกรองที่ชุบน้ำยา 1% oxidase จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มภายในเวลา 10 วินาที เช่นกัน (รูปที่ 5.5) หากมีเชื้อเพียงโคโลนีเดียว ให้ subculture ไว้ก่อนเพื่อทดสอบในวันถัดไป

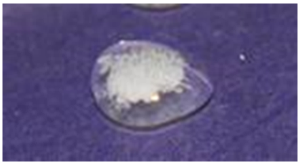


รูปที่ 5.5 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับน้ำยา 1% Oxidase

หมายเหตุ : ในกรณีที่ plate เพาะเชื้อ มีเชื้ออื่นๆ ขึ้นคลุมทั้ง plate ให้หยดน้ำยา 1% oxidase ลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของ plate หากครึ่งที่หยดน้ำยาลงไปมีอย่างน้อย 1 โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีดำ แสดงว่าใน plate อาจจะมีโคโลนีเชื้อ *N. gonorrhoeae* อยู่แต่ถูกเจริญทับด้วยเชื้อชนิดอื่น ให้ป้ายโคโลนีในด้านที่ไม่ได้หยดน้ำยา มาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อเพื่อทดสอบต่อไป

3.3.2 Superoxol test (30% H_2O_2)

ป้ายเชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาดแล้วหยดน้ำยา 30% H_2O_2 หรือ 3% H_2O_2 (catalase test) ลงไป สังเกตปฏิกิริยา หากเป็นเชื้อ *N. gonorrhoeae* จะพบว่าเกิดฟองอากาศปริมาณมากทันทีที่หยดน้ำยา (4+) หากเป็นเชื้อ *N. meningitidis* หรือ species อื่นๆ อาจจะพบว่าเกิดฟองอากาศช้าๆ เพียงเล็กน้อย (1+) (รูปที่ 5.6)

ปฏิกิริยา 1+	ปฏิกิริยา 4+
	

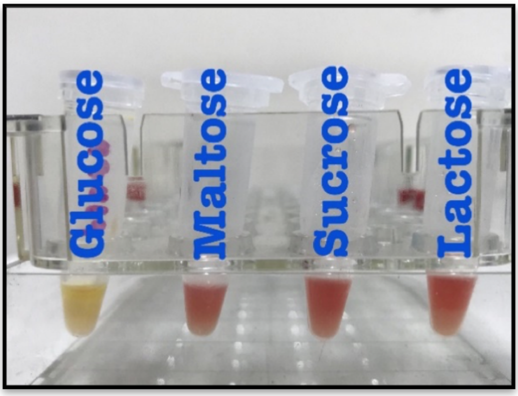
รูปที่ 5.6 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับ 30% H_2O_2

หมายเหตุ: ไม่ควรหยดน้ำยา 30% H_2O_2 ลงบน colony เชื้อโดยตรง เพราะเมื่อเกิดปฏิกิริยาแรง อาจเกิดฟองอากาศกระเด็นทำให้เชื้อในส่วนอื่นๆ ของ plate ตาย หรือเกิดการ contaminate ได้

3.3.3 Carbohydrate utilization test

วิธีนี้ใช้หลักการของความสามารถในการหมัก (ferment) น้ำตาลของเชื้อ ซึ่งสารละลายจะมีส่วนผสมของน้ำตาล โดยปกติจะทดสอบการใช้น้ำตาล glucose (G) maltose (M) sucrose (S) และ lactose (L) และมี phenol red เป็น indicator ถ้าเชื้อสามารถ ferment น้ำตาลชนิดนั้นได้ ทำให้สารละลาย pH เป็นกรด และเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยเชื้อ *N. gonorrhoeae* จะสามารถ ferment น้ำตาลกลูโคสได้เพียงตัวเดียว โดยการทดสอบอาจใช้ rapid micro carbohydrate test โดยการทดสอบจะใช้ sterile loop เขี่ยโคโลนีเชื้อมา 1 loop จาก chocolate agar

แบ่งใส่ในหลอดน้ำตาล G, M, S และ L เมื่อใส่เชื้อเสร็จแล้วสามารถนำเข้า incubator อุณหภูมิ 36±1°C ใช้เวลาเพียง 30 นาที-2 ชั่วโมง ก็สามารถอ่านผลได้ (รูปที่ 5.7) หรืออาจใช้การทดสอบ Cysteine trypticase agar (CTA) ที่มีน้ำตาล G, M, S และ L ความเข้มข้น 1-2% อยู่ ให้ใส่เชื้อในปริมาณมาก แล้วนำเข้า incubator อุณหภูมิ 36±1°C ใช้เวลา 24 ชั่วโมง ถึงอ่านผลได้ และแปลผลการทดสอบกับ CDC (ตารางที่ 1)



รูปที่ 5.7 แสดงผลการทดสอบการหมักน้ำตาลของเชื้อ *N. gonorrhoeae*

ตารางที่ 5.1 การทดสอบทางชีวเคมี ของเชื้อ *Neisseria* spp.

Species	Acid From*					Nitrate Reduction	Poly-saccharide from Sucrose	DNase	Superoxol	Pigment	Colistin Resistance
	G	M	S	F	L						
N. gonorrhoeae	+	-	-	-	-	-	-	-	Strong (4+) ("explosive")	-	R
N. gonorrhoeae subspecies kochii	+	-	-	-	-	-	-	-	Strong (4+)	-	R

Species	Acid From*					Nitrate Reduction	Poly-saccharide from Sucrose	DNase	Superoxol	Pigment	Colistin Resistance
	G	M	S	F	L						
N. meningitidis	+	+	-	-	-	-	-	-	Weak (1+) to strong (4+)	-	R
N. lactamica	+	+	-	-	+	-	-	-	Weak (1+) to strong (3+)	+	R
N. polysaccharea	+	+	-	-	-	-	+	-	Weak (1+) to strong (3+)	-	(R)
N. cinerea	-	-	-	-	-	-	-	-	Weak (2+)	-	(R)
N. flavescens	-	-	-	-	-	-	+	-	Weak (2+)	+	S
N. mucosa	+	+	+	+	-	+	+	-	Weak (2+)	d	S
N. subflava biovar subflava	+	+	-	-	-	-	-	-	Weak (2+)	+	S
N. subflava biovar flava	+	+	-	+	-	-	-	-	Weak (2+)	+	S
N. subflava biovar perflava	+	+	+	+	-	-	+	-	Weak (2+)	+	(R)
N. sicca	+	+	+	+	-	-	+	-	Weak (2+)	-	S
N. elongata	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	S
M. catarrhalis	-	-	-	-	-	+	-	+	Weak (1+) to Strong (3+ to 4+)	-	(R)
K. denitrificans	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	R

*Acid From ; G = Glucose, M = Maltose, S = Sucrose, F = Fructose และ L = Lactose

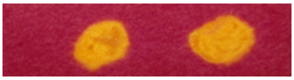
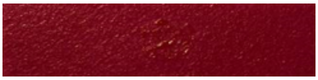
ที่มา http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/biochemical.htm

4. การทดสอบ β-lactamase test เชื้อ *N. gonorrhoeae*

การทดสอบการดื้อต่อยา penicillin โดยเกิดจากกลไกการสร้างเอนไซม์ β-lactamase มาทำลายโครงสร้างของยา penicillin โดยการดื้อต่อยา penicillin ในเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยกลไกนี้เกิดขึ้นจากยีนที่อยู่บน พลาสมิด ทำได้หลายวิธี เช่น

4.1 Acidimetric method

หลักการคือ enzyme penicillinase จะย่อย penicillin เป็น peniciloic acid (กรด) ทดสอบโดยการหยดน้ำยา bromocresol purple (BCP) ลงบนกระดาษกรอง แล้วป้ายโคโลนีของเชื้อลงบนกระดาษกรอง หากสีของกระดาษบริเวณที่ป้ายเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (รูปที่ 5.8) แสดงว่าเชื้อนี้ สร้างเอนไซม์ β-lactamase เป็น strain ชนิดที่เรียกว่า penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (PPNG)

β -lactamase Positive	β -lactamase Negative
	

รูปที่ 5.8 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับน้ำยา bromocresol purple (BCP)

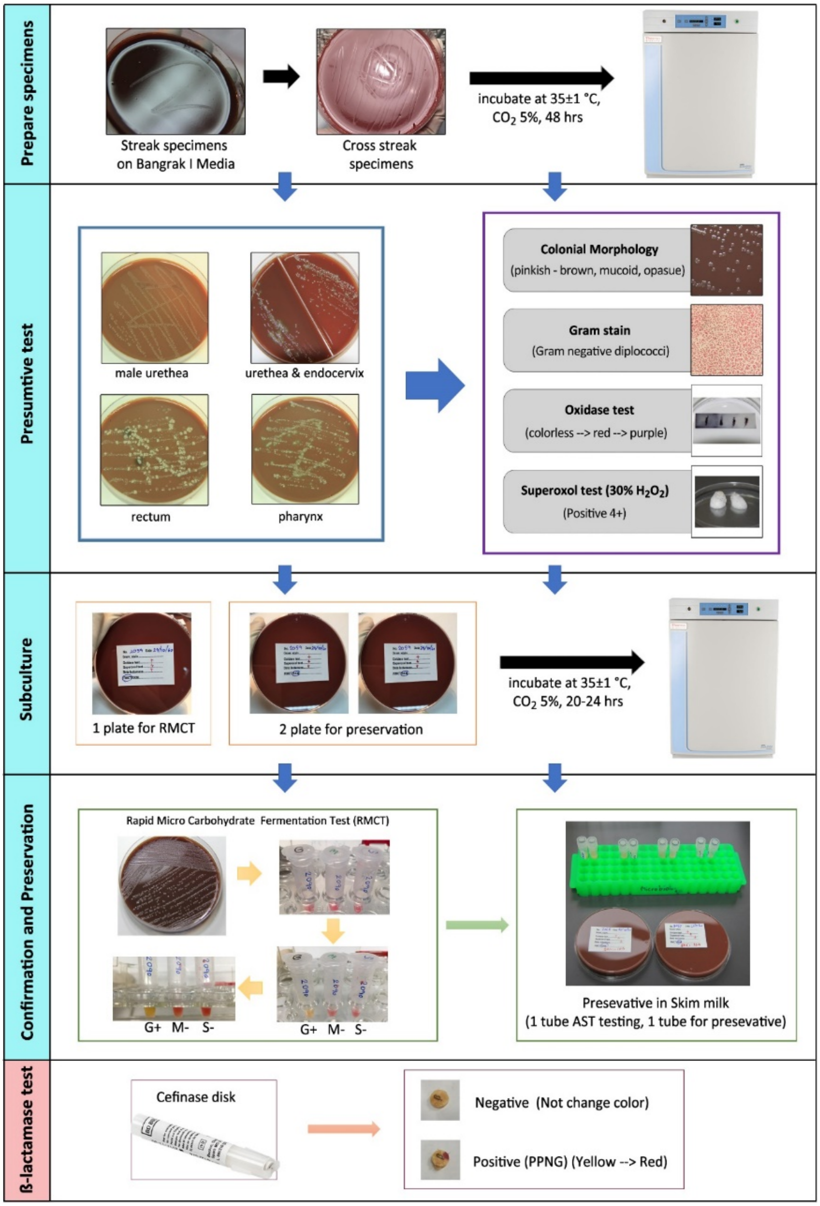
4.2 ทดสอบโดยวิธี chromogenic cephalosporin

การทดสอบโดยใช้น้ำยา nitrocefin solution หรือ cefinase disk® (มียา nitrocefin อยู่) ทำโดยการป้ายโคโลนีของเชื้อลงบนแผ่น disk หากเชื้อสร้างเอนไซม์ β-lactamase จะย่อยสลาย nitrocefin เปลี่ยนเป็นสีแดง (รูปที่ 5.9) แสดงว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* เป็น strain ที่ดื้อต่อยา penicillin ชนิด PPNG

รูปที่ 5.9 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* กับ cefinase disk®

5. การควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อ

เนื่องด้วยวิธีการเพาะเชื้อประกอบด้วยหลายขั้นตอน จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพในทุกขั้นตอน ทั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อ การย้อมสี และการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม ใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ดังภาคผนวก ส่วนการควบคุมคุณภาพในการผลิตน้ำยาทดสอบทางชีวเคมี จะใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน คือ *N. gonorrhoeae* ATCC 43069



รูปที่ 5.10 แสดงขั้นตอนการเพาะเชื้อและยืนยันเชื้อ *N. gonorrhoeae*

การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *N. gonorrhoeae*

การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีการดำเนินการหลายขั้นตอน คือ

1. การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ได้หลังจากการวินิจฉัยหรือที่ subculture มาจาก Storage Stock ที่จะทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nonselective medium เช่น chocolate agar โดยอบเพาะเลี้ยงที่ 36±1 °C ใน 5-10% CO_2 หรือ candle jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้น นำโคโลนีที่ได้มาละลายลงใน Muller Hinton broth เทียบความขุ่นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland No.1 หากวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 640 nm จะได้ค่า absorbance เท่ากับ 0.15

2. สารต้านจุลชีพ

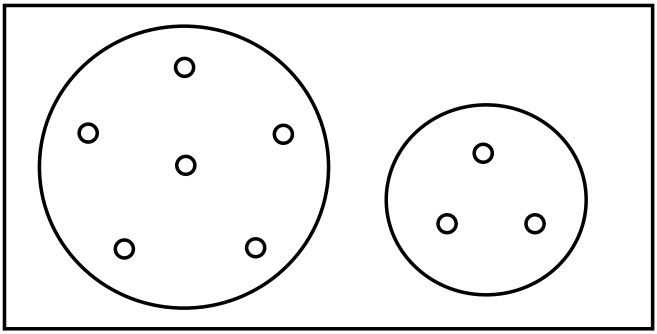
สารต้านจุลชีพ ที่แนะนำให้ใช้ทดสอบกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ตามเกณฑ์ CLSI คือ

- Penicillins ได้แก่ penicillin
- Cephalosporins ได้แก่ ceftriaxone และ cefixime
- Tetracyclines ได้แก่ tetracycline
- Fluoroquinolones ได้แก่ ciprofloxacin
- Aminocyclitols ได้แก่ spectinomycin
- Macrolide ได้แก่ azithromycin

3. วิธีการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

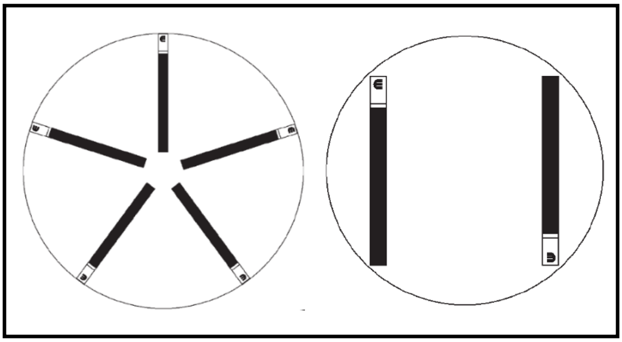
มีวิธีการทดสอบได้ทั้งแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ เช่น disk diffusion method และแบบปริมาณวิเคราะห์ เช่น agar dilution method และ Epsilometer test (E test) โดยวิธี E test เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายกว่าวิธี agar dilution

3.1 แบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ เช่น disk diffusion method ทดสอบโดยใช้ sterile swab จุ่มลงใน suspension solution (เชื้อ) ที่ปรับความขุ่นแล้ว หมุน swab หลายๆ ครั้ง เพื่อให้เชื้อซึมเข้าให้ทั่ว แตะ swab กับผิวด้านในของหลอดแล้วหมุนให้ swab พอหมาดๆ นำมาป้ายเป็น 3 ระนาบ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด GC agar base + 1% defined growth supplement แล้วนำ disk วางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ห้ามทิ้งไว้เกิน 15 นาที) ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm ไม่ควรวาง disk เกิน 4 ชนิด ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 mm ไม่ควรวาง disk เกิน 9 ชนิด (รูปที่ 5.11) แล้วนำไป incubate ที่ 36±1°C 5% CO_2 เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone แล้วแปลผลตามเกณฑ์ของ CLSI (ตารางที่ 5.2)



รูปที่ 5.11 รูปแบบการวาง disk บนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm และ 150 mm

3.2 แบบปริมาณวิเคราะห์ โดยวิธี E test ทดสอบโดยการใช้เชื้อและการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด GC agar base + 1% defined growth supplement เช่นเดียวกับวิธี disk diffusion method แล้วนำแผ่น E test ที่มีคุณสมบัติไม่ดูดซับน้ำ ขนาด 5×50 mm โดยด้านหนึ่งเคลือบไว้ด้วยสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นลดลงอย่างต่อเนื่องจากความเข้มข้นมากไปหาน้อย อีกด้านหนึ่งมีตัวเลขและสเกลบอกค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ตำแหน่งต่างๆ (continuous concentration gradient) วางบนผิวหน้าของอาหารเพาะเชื้อ (รูปที่ 5.12) ห้ามทิ้งไว้เกิน 15 นาที แล้วนำไปอบเพาะเลี้ยงที่ 36±1°C 5% CO_2 เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และอ่านค่า MIC จากจุดความเข้มข้นน้อยที่สุดที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ตรงปลายรูปหยดน้ำ แล้วแปลผลตามเกณฑ์ของ CLSI (ตารางที่ 5.2)



รูปที่ 5.12 รูปแบบการวาง E test บนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm และ 150 mm

3.3. แบบปริมาณวิเคราะห์โดยวิธี agar dilution method วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิง (reference method) ทดสอบโดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ จากนั้น นำเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เตรียมไว้มาใส่ในหลุมๆ ละ 500 µl จากนั้นนำ multipoint inoculator แตะเชื้อในหลุมแล้วนำไปแตะบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ปลายของ multipoint inoculators จะถ่ายโอนเชื้อมาได้ประมาณ 1 µl ทำให้ได้เชื้อในแต่ละจุดประมาณ 10^4-10^5 CFU การเพาะเชื้อนี้ควร

เริ่มจากเพาะเชื้อในจานอาหารที่ไม่มีสารต้านจุลชีพก่อน เพื่อตรวจสอบความมีชีวิต (viability) และความบริสุทธิ์ (pure culture) ของเชื้อที่ทดสอบ ตามด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีสารต้านจุลชีพเข้มข้นน้อยที่สุดไปยังจานเพาะเชื้อที่มีสารต้านจุลชีพเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับ แล้วนำไปแล้วนำไปอบเพาะเลี้ยงที่ 36±1°C 5% CO_2 เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และอ่านค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพน้อยที่สุดที่แบคทีเรียไม่เจริญเป็นค่า MIC แล้วแปลผลตามเกณฑ์ของ CLSI (ตารางที่ 5.2)

ตารางที่ 5.2 ตารางแปลผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *N. gonorrhoeae* (CLSI guideline 2019 M100)

Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Break-points, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/ml		
		S	I	R	S	I	R
Penicillin	10 units	≥47	27-46	≤26	≤0.06	0.12-1	≥2
Tetracycline	30 µg	≥38	31-37	≤30	≤0.25	0.5-1	≥2
Spectinomycin	100 µg	≥18	15-17	≤14	≤32	64	≥128
Ceftriaxone*	30 µg	≥35	-	-	≤0.25	-	-
Cefixime*	5 µg	≥31	-	-	≤0.25	-	-
Ciprofloxacin	5 µg	≥41	28-40	≤27	≤0.06	0.12-0.5	≥1
Azithromycin**	-	-	-	-	≤1	-	-

หมายเหตุ :

*Ceftriaxone และ cefixime เป็นยาที่พบการดื้อยาน้อยมาก หากทดสอบ disk diffution แล้วพบว่าได้ขนาด zone ของยา ceftriaxone และ cefixime น้อยกว่า 35 และ 31 ตามลำดับ หรือค่า MIC มากกว่า 0.25 ให้ตรวจซ้ำ ถ้าเหมือนเดิมให้รายงานเป็น Nonsusceptible (NS) แล้วส่งเชื้อมาเก็บไว้ยังส่วนกลาง เพื่อทำการตรวจสอบ/วิจัยต่อไป (ทั้งนี้ในประเทศไทยยังไม่เคยพบการรายงานการเริ่มดื้อยา “NS” ของยาดังกล่าวมาก่อน)

**Azithromycin ใช้แปลผลเมื่อขนาดยาที่ใช้รักษาคือ 1 g และรักษาร่วมกับยาตัวอื่น เช่น ceftriaxone

4. การควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

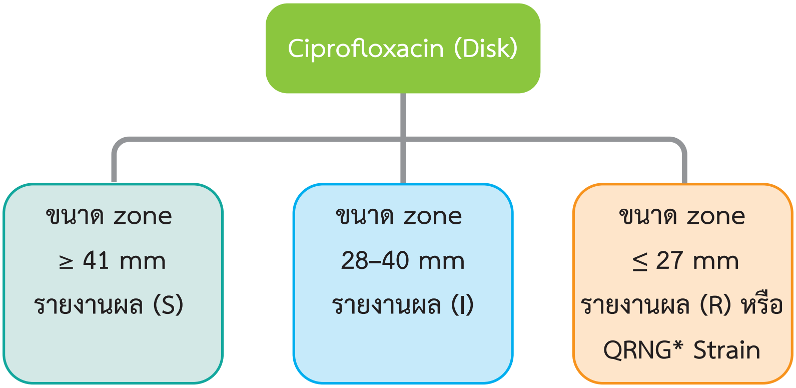
การควบคุมคุณภาพในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ GC agar base +1% defined growth supplement และการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพจะใช้เชื้อสายพันธุ์ มาตรฐาน ดังภาคผนวก

5. การรายงานผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

เมื่อแปลผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ แล้ว สามารถรายงานผลการทดสอบสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดได้ ดังนี้

5.1 การแปลและรายงานผลต่อยากลุ่ม quinolone

การดื้อยากลุ่ม quinolone เช่น ciprofloxacin นั้นมักดื้อยาโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซม ซึ่งสามารถทดสอบได้โดยการวาง disk เพื่อหา resistant strain หรือ quinolone-resistant *N. gonorrhoeae* (QRNG) ได้โดยอาจจะไม่ต้องทดสอบหาค่า MIC แปลผลการทดสอบดังแสดง



รูปที่ 5.13 ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา ciprofloxacin ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ชนิด disk

5.2 การแปลและรายงานผลต่อยา penicillin

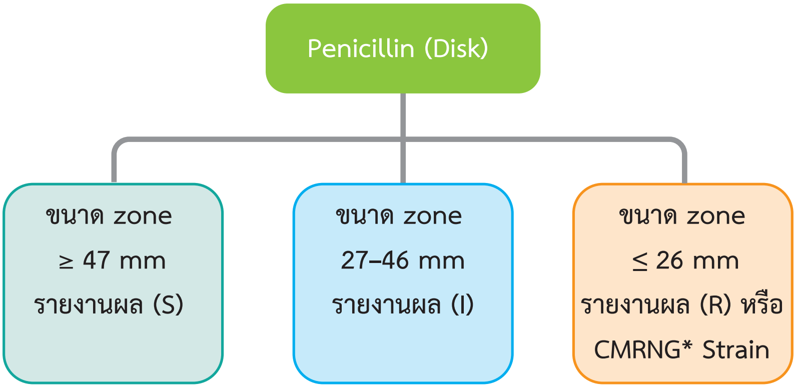
กลไกการดื้อยา penicillin ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* นั้น พบเป็นการดื้อยาโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด หรือที่เรียกกันว่า penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (PPNG strain) ซึ่งหากเชื้อมียีนดื้อยานี้อยู่บนพลาสมิดจะสามารถผลิตเอนไซม์ β-lactamase ทำลายโครงสร้างของยา penicillin ทำให้ยา Penicillin ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ การตรวจเอนไซม์นี้ทำได้ง่ายโดยทดสอบกับ BCP reagent หรือ nitrocefin test โดย BCP reagent มีส่วนผสมของยา penicillin อยู่ หากเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์มาทำลายโครงสร้างของยา penicillin ได้ จะทำให้เกิดกรด เปลี่ยนสี indicator ทำให้กลายเป็นสีเหลือง

ในกรณีที่ผลการทดสอบ β-lactamase positive

- ให้รายงานเป็น resistance ชนิด PPNG (penicillinase producing *N. gonorrhoeae*) ดื้อยา penicillin โดยมียีนอยู่บนพลาสมิด

ในกรณีที่ผลการทดสอบ β-lactamase negative ให้นำมาทดสอบการดื้อยาต่อด้วย penicillin disk diffusion เพื่อตรวจว่า เชื้อ non penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (non PPNG) ให้ผลการทดสอบต่อยา penicillin ซึ่งแปลผลเป็นดังนี้

- ขนาด zone ≥ 47 mm ให้รายงานผล susceptible
- ขนาด zone 27-46 mm ให้รายงานผล intermediate
- ขนาด zone ≤ 26 mm ให้รายงานผล resistant หรือ chromosomally-mediated *N. gonorrhoeae* (CMRNG) การดื้อยา penicillin โดยมียีนอยู่บนโครโมโซม

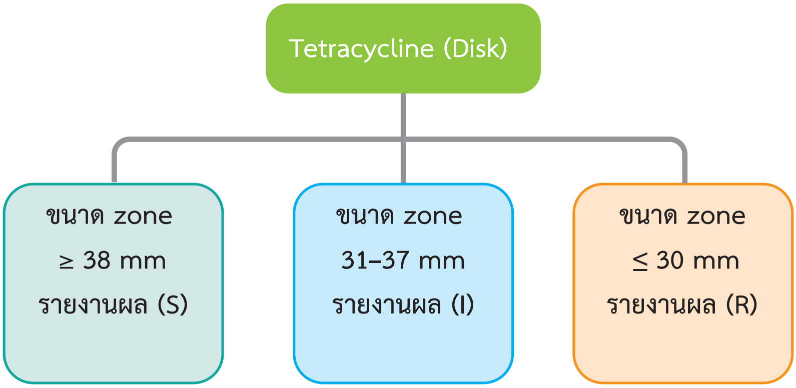


รูปที่ 5.14 ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา penicillin ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ชนิด disk

5.3 การแปลและรายงานผลต่อยา tetracycline

5.3.1 ทดสอบด้วยวิธี disk diffusion สามารถแปลและรายงานผลการทดสอบดังนี้

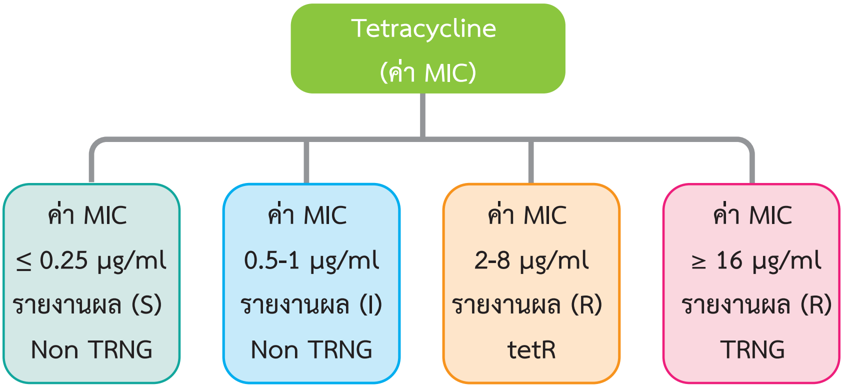
- ขนาด zone ≥ 38 mm ให้รายงานผล susceptible
- ขนาด zone 31-37 mm ให้รายงานผล intermediate
- ขนาด zone ≤ 30 mm ให้รายงานผล resistant แต่ถ้าขนาด zone < 19 mm สงสัย TRNG (high-level tetracycline-resistant *N. gonorrhoeae)* ต้องทดสอบหาค่า MIC เพื่อการยืนยัน



รูปที่ 5.15 ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา tetracycline ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ชนิด disk

5.3.2 ในกรณีที่ทดสอบด้วยวิธี แบบปริมาณวิเคราะห์ สามารถแปลผลการทดสอบดังนี้ (หาค่า MIC) สามารถแปลและรายงานผลการทดสอบหาค่า MIC ดังนี้

- ค่า MIC ≤ 0.25 μg/ml ให้รายงานผล susceptible (เป็น non TRNG ด้วย)
- ค่า MIC 0.5-1 μg/ml ให้รายงานผล intermediate (เป็น non TRNG ด้วย)
- ค่า MIC 2-8 μg/ml รายงานผล resistant หรือ TetR (low-level tetracycline-resistant N. gonorrhoeae) ซึ่งเชื้อ ดื้อยา tetracycline ในความเข้มข้นต่ำ โดยมียีนควบคุมอยู่บนโครโมโซม (เป็น non TRNG ด้วย)
- ค่า MIC ≥ 16 μg/ml รายงานผล resistant หรือ TRNG (high-level tetracycline-resistant *N. gonorrhoeae*) ซึ่งเชื้อดื้อยา tetracycline ในความเข้มข้นสูงโดยมียีนควบคุมอยู่บนพลาสมิด



รูปที่ 5.16 ผังการแปลผลการทดสอบความไวต่อยา tetracycline ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ตามค่า MIC

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Geneva: WHO document Production Services; 2013.
2. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Pensylvania: CLSI; 2019
3. World Health Organization (WHO). Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Geneva: World Health Organization; 2003.
4. มาลัย วรวิจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, สุรางค์ เดชศิริเลิศ, คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ธนาเพลส; 2557.
5. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M22 Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard. 3rd ed. Pensylvania: CLSI; 2004
6. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Division of STD Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention. 2017 [updated 2017 Mar 31; cited 2019 May 27]. Identification of N. gonorrhoeae and Related Species; [about 1 screens]. Available from: https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/biochemical.htm
7. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Division of STD Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention. 2017 [updated 2017 Mar 31; cited 2019 May 27]. Characteristics of N. gonorrhoeae and Related Species of Human Origin ; [about 1 screens]. Available from: https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm

ภาคผนวก

นางสาวพรทิพย์ เผ่าผาง
ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

การเก็บรักษาเชื้อ *N. gonorrhoeae*

วิธีการเก็บรักษาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ให้มีชีวิตยืนยาวและอยู่ได้นาน เพื่อใช้สำหรับอ้างอิง หรือเพื่อเก็บไว้ศึกษา มีวิธีการเก็บที่นิยมใช้กันดังนี้

1. การเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่แข็ง (freezing)
2. การเก็บรักษาเชื้อใน chocolate agar slant
3. การเก็บรักษาเชื้อในสภาพแห้งสภาวะสูญญากาศ (lyophilized)

1. การเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่แข็ง (freezing)

ใช้ Sterile loop เก็บเชื้อ *N. gonorrhoeae* จาก chocolate agar ที่เพาะไว้นาน 18-24 ชั่วโมง ใส่ใน cryoprotective nutritive broth ผสมกับ 15-20% glycerol[1] หรือ 10% skim milk ผสมกับ 10% glycerol จำนวน 1 ml ในหลอดเก็บสารแช่แข็ง (cryogenic tube) ขนาด 2 ml สามารถเก็บในตู้เย็น -20 °C ไว้ได้นาน 2 สัปดาห์ ถ้าต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานให้เก็บที่ -70 °C หรือเก็บใส่ในถัง liquid nitrogen (-196 °C)[1,2] ทั้งนี้จะต้องวัดปริมาตรของ liquid nitrogen อยู่เสมอ ไม่ควรเปิดถังบ่อย และต้องเติม liquid nitrogen เมื่อมีปริมาณเหลือครึ่งถัง

2. การเก็บรักษาเชื้อใน chocolate agar slant

เพาะเชื้อ *N. gonorrhoeae* บน chocolate agar slant ที่บรรจุในหลอด เก็บเข้าตู้อบเพาะเชื้อ 36±1°C ใน CO_2 5-10% นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญแล้วค่อยๆ เท sterile liquid paraffin ลงในหลอดให้ท่วมเชื้อ เก็บเข้าตู้อบเชื้อ 36±1°C ใน CO_2 5-10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นาน 5 วัน เมื่อต้องการใช้เชื้อที่เก็บไว้ ให้นำ sterile loop เขี่ยเชื้อในหลอดและนำไปเพาะบน chocolate agar เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง[2]

3. การเก็บรักษาเชื้อในสภาพแห้งสภาวะสูญญากาศ (lyophilized)

การเก็บเชื้อโดยวิธีนี้ เครื่องมืออุปกรณ์ และน้ำยาที่ใช้กับเครื่องมีราคาแพง และมีวิธีการทำหลายขั้นตอน แต่เป็นวิธีการที่เก็บเชื้อได้เป็นระยะเวลานานหลายปี โดยใช้วิธีการแช่แข็งเชื้อและนำไปทำให้แห้งในสภาวะสูญญากาศ โดยใช้เครื่อง lyophilizer[3] เชื้อที่เก็บโดยวิธีนี้สามารถเก็บหลอดหรือขวดที่ใส่เชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ แต่ควรเก็บไว้ในตู้แช่ 4-10 °C เมื่อจะนำมาใช้ให้เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เช่น tryptic soy broth แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเข้าตู้เพาะเชื้อ วิธีนี้เหมาะสำหรับการขนส่งเชื้อไปยังที่ห่างไกล[1] มีรายงานการศึกษาพบว่าวิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้นานถึง 6 ปี[4]

วิธีการส่งเชื้อเพื่อยืนยันผลการทดสอบที่กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

การส่งเชื้อ *N. gonorrhoeae* เพื่อมายืนยันผลการวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์นั้น สามารถช่วยในการยืนยันผลการเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ หากพบเชื้อที่มีค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ตามค่าที่ส่วนกลางกำหนด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า MIC ที่กำหนดไว้สำหรับการส่งเชื้อเพื่อยืนยันผลการทดสอบ[4]

ยาต้านจุลชีพ	ค่า MIC ที่กำหนด (μg/ml)
Ceftriaxone	> 0.25
Cefixime	> 0.25
Azithromycin	> 1

ให้นำส่งมายังห้องปฏิบัติการกลาง เพื่อช่วยตรวจยืนยันซ้ำและนำมาเป็นเชื้อที่ใช้ในการวิจัยต่อไป

ขั้นตอนการส่งเชื้อเพื่อยืนยันที่ส่วนกลาง

↓

ปิดรอยต่อของภาชนะที่ใส่ตัวอย่าง*
ที่จะนำส่งให้แน่น เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

↓

ตัวอย่างไม่แช่แข็ง: บรรจุตัวอย่างลงกล่อง ใส่วัสดุกันกระแทกให้เต็มกล่อง เพื่อป้องกันการเคลื่อนที่ของตัวอย่างและต้องส่งให้ถึงปลายทางภายใน 2 วัน

ตัวอย่างแช่แข็ง: บรรจุตัวอย่างลงในกล่องโฟม ใส่น้ำแข็งแห้ง ให้ปริมาณเหมาะสมกับจำนวนตัวอย่าง ขนาดของกล่อง และระยะเวลาในการขนส่ง

หมายเหตุ * : ลักษณะตัวอย่างที่ส่ง

- ตัวอย่างเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เพาะบน chocolate agar plate (เชื้ออายุประมาณ 18-24 ชม.) สามารถส่งได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ต้องส่งเป็นพัสดุภัณฑ์ด่วนที่ถึงปลายทางภายใน 1-2 วัน[5]
- ตัวอย่างที่เพาะบน chocolate agar slant (เชื้ออายุประมาณ 18-24 ชม.) ให้เททับเชื้อด้วย sterile liquid paraffin จนท่วม slant (ไม่ต้องแช่เย็น) แต่ต้องส่งให้ถึงปลายทางภายใน 5 วัน[2]
- ตัวอย่างแช่แข็ง เช่น เชื้อที่บรรจุใน skim milk เป็นต้น ต้องใส่น้ำแข็งแห้งให้พอเหมาะ[1,5]

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Bangrak I medium

ส่วนประกอบ	GC agar base (OXOID™)	36 g
	2% Hemoglobin solution (w/v)	500 ml
	Bangrak enrichment	5 ml
	25% Dextrose	5 ml
	ACLT inhibitor	10 ml
	Distilled water	480 ml

วิธีเตรียม

1. ชั่ง GC agar base 36 g และเติมน้ำกลั่น 480 ml ใน erlenmeyer flask ขนาด 2000 ml
2. เตรียม 2% hemoglobin solution โดย ชั่ง hemoglobin 10 g และเติมน้ำกลั่น 500 ml ใน erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml ละลาย hemoglobin ด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที
3. นำส่วนประกอบในข้อ 1 และ 2 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที[1] เมื่อเสร็จแล้ว นำไปแช่ใน water bath ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50-55 °C[6]
4. ผสม Bangrak enrichment และ 25% Dextrose ให้เข้ากัน จากนั้นเติมลงใน GC agar base
5. เติม 1% ACLT inhibitor ลงใน GC agar base แล้วผสมให้เข้ากัน
6. เติม 2% hemoglobin solution ลงใน GC agar base ผสมให้เข้ากัน เทลงใน sterile petri dish ประมาณ 15-20 ml/plate[1] โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

7. ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และบรรจุใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท ก่อนจะนำไปเก็บที่ 2-8°C[6]

หมายเหตุ: ห้องปฏิบัติการสามารถใช้ Modified Thayer-Martin medium แทน Bangrak I medium ได้

2. Chocolate agar

ส่วนประกอบ	GC agar base (OXOID™)	36 g
	2% Hemoglobin solution (w/v)	500 ml
	Bangrak enrichment	5 ml
	25% Dextrose	5 ml
	Distilled water	490 ml

วิธีเตรียม

1. ชั่ง GC agar base 36 g และเติมน้ำกลั่น 490 ml ใน erlenmeyer flask ขนาด 2000 ml
2. เตรียม 2% hemoglobin solution โดยชั่ง hemoglobin 10 g และเติมน้ำกลั่น 500 ml ใน erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml ละลาย hemoglobin ด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที
3. นำส่วนประกอบในข้อ 1 และ 2 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที[1] เมื่อเสร็จแล้ว นำไปแช่ใน water bath ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50-55 °C[6]
4. ผสม Bangrak enrichment และ 25% dextrose ให้เข้ากัน จากนั้นเติมลงใน GC agar base

5. เติม 2% hemoglobin solution ลงใน GC agar base ผสมให้เข้ากัน เทลงใน sterile petri dish ประมาณ 15-20 ml/plate[1] โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
6. ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และบรรจุใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท ก่อนจะนำไปเก็บที่ 2-8°C[6]

3. GC agar

ส่วนประกอบ	GC agar base (OXOID™)	36 g
	Bangrak enrichment	5 ml
	25% Dextrose	5 ml
	Distilled water	990 ml

วิธีเตรียม

1. ชั่ง GC agar base 36 g และเติมน้ำกลั่น 990 ml ใน erlenmeyer flask ขนาด 2000 ml
2. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที[1] เมื่อเสร็จแล้ว นำไปแช่ใน water bath ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50-55 °C[6]
3. ผสม Bangrak enrichment และ 25% dextrose ให้เข้ากัน จากนั้นเติมลงใน GC agar base
4. ตวงอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 20-25 ml เทลงใน sterile petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm หรือ ปริมาตร 60 ml สำหรับ petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 mm[2] โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
5. ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และบรรจุใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท ก่อนจะนำไปเก็บที่ 2-8°C[6]

หมายเหตุ: อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเพลทสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 เดือน[6]

การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การทดสอบการปราศจากเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดก่อนใช้ต้องนำมาทดสอบสภาวะปราศจากเชื้อ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมา 5% ของจำนวนอาหารที่เตรียม บ่มที่ตู้ incubator 36±1°C นาน 18-24 ชั่วโมง[5] ส่วนอาหารที่เหลือเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C โดยคว่ำหน้าอาหารลงและทดสอบคุณภาพอาหารก่อนนำไปใช้[6]

2. การทดสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นการทดสอบคุณสมบัติของอาหารแต่ละชนิด โดยใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน เมื่อห้องปฏิบัติการเตรียมอาหารเพาะเชื้อเสร็จแล้ว ต้องทำการควบคุมคุณภาพ โดยดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารแต่ละชนิดนั้น โดยใช้ทั้งเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และสายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต มาทำการทดสอบแต่ละครั้ง[5] สำหรับเชื้อที่ใช้ควบคุมการทดสอบค่าความไวต่อยาต้านจุลชีพ ต้องให้ผลการทดสอบอยู่ในช่วงที่กำหนดตามมาตรฐาน เช่น Clinical and laboratory standards institute (CLSI) โดยเชื้อที่ใช้ในการทดสอบอาหารแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2 [1,6,7]

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อที่ใช้และผลการควบคุมคุณภาพภายในของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	เชื้อที่ใช้ทดสอบ	ATCC No.	ผลการทดสอบ
Bangrak I medium	*N. gonorrhoeae* *Staphylococcus epidermidis* *Proteus mirabilis* *Candida albicans*	43069 12228 43071 10231	เชื้อเจริญ เชื้อไม่เจริญ เชื้อไม่เจริญ เชื้อไม่เจริญ
Chocolate agar	*N. gonorrhoeae* *Haemophilus influenzae*	43069 10211	เชื้อเจริญ เชื้อเจริญ
GC agar	*N. gonorrhoeae*	49226	เชื้อเจริญและค่าความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อมาตรฐานอยู่ในช่วงที่กำหนด

วิธีการเตรียมน้ำยาต่างๆ

1. 1% Oxidase test

1. ชั่งสาร N, N-dimethylaniline 0.3 g ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 125 ml
2. เติมน้ำกลั่น 30 ml ผสมให้ส่วนผสมเข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลาประมาณ 10 นาที
3. นำกระดาษฟอยด์ห่อรอบๆ erlenmeyer flask และปิดฝาไว้เพื่อป้องกันแสง
4. ติดฉลาก ล็อต วันที่ผลิต วันหมดอายุและเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C มีอายุการเก็บ 2 สัปดาห์

2. 10% Skim milk with 10% glycerol

1. ชั่ง skim milk (Oxoid™) 10 g ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 ml
2. เติมน้ำ 90 ml ผสมส่วนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 10 นาที
3. เติม glycerol ลงไป 10 ml และคนต่อไปอีกประมาณ 10 นาที
4. บรรจุ skim milk ปริมาตร 1 ml ในหลอดเก็บสารแช่แข็ง ใส่ลงกล่องแล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 5 นาที[8]
5. เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานประมาณ 2 เดือน[6]

3. Mueller-Hinton broth

1. ชั่ง Mueller-Hinton broth base (BBL^{TM}) 11 g เทลง erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml
2. เติมน้ำกลั่น 500 ml ใส่ magnetic bar วางบนเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 10 นาที
3. บรรจุใส่หลอดแก้วมีฝาเกลียว (screw cap tube) หลอดละ 2.5 ml ปิดจุกให้แน่น
4. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 116-121°C เป็นเวลา 10-15 นาที[9]
5. ติดฉลาก ล็อตที่ผลิต วันที่ผลิต วันหมดอายุ และเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C มีอายุการเก็บนาน 2 เดือน[6]

การเตรียม McFarland Standard

McFarland standard เป็นมาตรฐานที่ใช้เทียบความขุ่นของ bacteria ซึ่งเป็น สารละลายที่ประกอบด้วย 1.175% $BaCl_2$ (barium chloride) และ 1% H_2SO_4 (sulfuric acid) เมื่อผสมกันแล้วจะเกิดตะกอนของ $BaSO_4$ (Barium sulfate) ทำให้ solution ขุ่นตามลำดับ ตั้งแต่ number 1-10 โดยการเพิ่มอัตราส่วนของ $BaCl_2$ ในส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 3 จากนั้นทำการแบ่งใส่หลอดแก้ว ปิดฝาหลอดด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหย McFarland standard สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานถึง 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 22-25 °C ในสภาวะที่ไม่มีแสง และก่อนการใช้ในแต่ละครั้งควร นำหลอด McFarland standard มาผสมเพื่อให้ตะกอน barium sulfate ที่อยู่ก้นหลอดกระจายตัวในสารละลาย[1]

ตารางที่ 3 การเตรียม McFarland standard และจำนวนแบคทีเรียเปรียบเทียบกับความขุ่นของ McFarland standard หมายเลขต่างๆ[1]

McFarland standard Number	Barium chloride dehydrate (1.175%) (ml)	Sulfuric acid (1%) (ml)	จำนวนแบคทีเรีย (10^8 CFU/ml)
0.5	0.5	99.5	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

การย้อมสีแกรม (Gram stain)

การย้อมแกรมเป็นวิธีการที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โดยอาศัยรูปร่าง ขนาด การเรียงตัว และการติดสีแกรม ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคหนองในจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงได้อย่างรวดเร็ว การย้อมสีด้วยวิธีการที่ถูกต้องจึงมีความสำคัญอย่างมากในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae*[6] โดยมีขั้นตอนดังนี้

วิธีการย้อมสีแกรม[6]

1. Smear เชื้อหรือสิ่งส่งตรวจลงบนสไลด์ให้กระจายตัวแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
2. Fix สไลด์ด้วยความร้อนโดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งและปล่อยให้สไลด์เย็นก่อนนำไปย้อมสี
3. หยด working crystal violet solution ลงบนสไลด์ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีแล้วล้างน้ำสะอาด
4. หยด Gram's iodine บน slide ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีแล้วล้างน้ำสะอาด
5. Decolorize ด้วย acetone alcohol แล้วล้างน้ำสะอาดทันที
6. ย้อมทับด้วย safranin 30 วินาที ล้างน้ำสะอาดแล้วผึ่งให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 10x10 เท่า จากนั้นดูรายละเอียดด้วยกำลังขยาย 10x100 เท่า

การควบคุมคุณภาพของสีแกรม

การควบคุมคุณภาพของสีย้อมควรทดสอบสีย้อมกับเชื้อที่ให้ผลบวกและเชื้อที่ให้ผลลบ สัปดาห์ละหนึ่งครั้งและทุกครั้งเมื่อมีการจัดซื้อสีย้อมใหม่หรือเตรียมสีใหม่[5] โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบและผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4[5,6]

ตารางที่ 4 แสดงเชื้อที่ใช้และผลการควบคุมของสีย้อมแกรม

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	ATCC No.	ผลการทดสอบ
Escherichia coli	25922	Gram-negative bacilli
Staphylococcus aureus หรือ	25923	Gram-positive cocci
Staphylococcus epidermidis	12228	

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization (WHO). Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Geneva: World Health Organization; 2003.
2. World Health Organization (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Geneva: WHO Document Production Services; 2013.
3. รวิวรรณ อาจสำอาง. การเก็บรักษาเชื้ออ้างอิง (Maintenance and Preservation of reference cultures). [ออนไลน์]. 2555 [เข้าถึงเมื่อ 16 มีนาคม 2555] เข้าถึงได้จาก: http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_N_YmZm_reference_culturer.pdf
4. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimocrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Pensylvania: CLSI; 2019.
5. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น; 2560.
6. มาลัย วรวิจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, สุรางค์ เดชศิริเลิศ, คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ธนาเพลส; 2557.
7. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M22 Quality Control for Commercially Prepared Microbiological culture media; Approved Standard. 3rd ed. Pensylvania: CLSI; 2004.
8. Bridson EY. The OXOID manual. 9th ed. Hampshire: OXOID Limited; 2006.
9. Zimbro MJ, Power DA. Difco & BBL manual: manual of microbiological culture media. 2nd ed. Sparks, MD: Becton Dickinson and Co.; 2009.