

เปรียบเทียบ Disk Diffusion Method และ Modified Broth Disk Method ในการหาความไวของแบคทีเรียต่อยา (การศึกษาเบื้องต้น)

เกรียงศักดิ์ พูนสุข*
เกรียงศักดิ์ สายธนู*

A Comparative study of antibiotic susceptibility between disk diffusion method and modified broth disk method was undertaken. Sixty three strains of Pseudomonas aeruginosa and 25 strains of Aeromonas hydrophila were tested with 6 and 11 antimicrobial agents respectively. Both methods, gave the identical tested results of 5 antibiotics with Pseudomonas aeruginosa except tetracyclin given 0 % sensitivity by disk diffusion method but 92 % sensitivity by modified broth disk method. Out of the 11 antimicrobial agents tested, neomycin and sulfas did not give comparable results with Aeromonas hydrophila. From disk diffusion test, they were 100 % sensitive to neomycin and only 8 % sensitive were obtained by the other. The organisms were 48 %, 40 %, 44 %, 48 % and 60 % sensitive to sulphadiazine, sulphamerazine, sulphamethoxine, sulphathiazole and trimethoprim respectively by disk diffusion method and being 0 % sensitive to the tested sulfas by modified broth disk method.

* หน่วยจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบหาความไวของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยว่ามีความสำคัญมากในการรักษาผู้ช่วยการทราบผลการทดสอบเร็วเท่าใดยิ่งจะช่วยให้การรักษาได้ผลดียิ่งขึ้น ทั้งนี้เพราะหลาย ๆ โรคจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงมาก เช่น โรคติดเชื้อในกระแสโลหิต ช่องท้องอักเสบ โรคเยื่อหุ้มสมองหรือไขสันหลังอักเสบ เป็นต้น ดังนั้นการเลือกยาที่ถูกต้องและรวดเร็วจึงมีความสำคัญมาก ในการทดสอบหาความไวของยาต่อเชื้อตามห้องปฏิบัติการทั่วไปมักจะใช้ disk diffusion method⁽³⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายประหยัดแต่มีข้อเสียที่ต้องใช้เวลาในการทดสอบน้อยที่สุด เช่น Boyle และคณะ⁽⁵⁾ ได้ดัดแปลงวิธี disk diffusion ให้อ่านผลได้ภายใน 6.5 ชั่วโมง ในปีเดียวกัน wilkins และ Thiel⁽⁸⁾ ก็ได้ดัดแปลงวิธีการนี้ใหม่โดยใช้กระดาษยาแซ่ในอาหารเหลว แล้วจึงหยดเชื้อลงไปอ่านผลได้ภายใน 3 ชั่วโมง วิธีนี้เรียกว่า modified broth disk method

ซึ่งความแน่นอนก็ไม่ต่างกับวิธีอื่น ๆ ที่เคยใช้ แต่มีข้อดีกว่าคืออ่านผลได้เร็ว^(4, 7) จุดประสงค์ของรายงานเบื้องต้นนี้เพื่อที่จะยืนยันผลการทดสอบว่า disk diffusion method และ modified broth disk method จะให้ผลตรงกันจริงหรือไม่ โดยทดสอบกับ *Pseudomonas aeruginosa* กับ *Aeromonas hydrophila*.

วัสดุและวิธีการ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย *Staphylococcus aureus* จำนวน 63 เซกตรอน เป็นเชื้อที่แยกได้จากโรคติดเชื้อในคน *Enterobacteriaceae* *Shigella* จำนวน 25 เซกตรอน เป็นเชื้อที่แยกได้จากโรคต่าง ๆ ในปลา น้ำจืด เชื้อทั้งหมดได้ถูกเก็บไว้บน sugar free agar ในหลอดแก้วซึ่งจุกด้วยจุกไม้ก๊อกเก็บไว้ในตู้เย็น 4-6 เซลเซียส ก่อนการทดลองได้ทำการเพาะเชื้อบน blood agar เพื่อเพิ่มจำนวนและดูว่าเชื้อบริสุทธิ์หรือไม่ อาหารเลี้ยงเชื้อ การทดสอบตามวิธี disk diffusion ใช้ Muller Hinton Ager (Difco) ส่วนวิธี modified broth disk ใช้ Brain Heart Infusion Broth (Gibco) ส่วนกระดาษยา (antibiotic disk) เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จของ Difco เก็บไว้ในตู้เย็น 4-6 °ซ ชนิดของกระดาษยาที่ใช้ทดสอบและความเข้มข้นแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2.

* ตามวิธี Modified Broth Disk ใช้ยา 1 หนึ่งต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิเมตร.

ตารางที่ 1 ชนิดของกระดาษยาและความเข้มข้นทั้งในกระดาษยาและในหลอด
ทดลองที่ใช้ทดสอบกับ ชูโคโมนาส แอร์จูโนซ่า

Antimicrobial	Labeled disk content	concentration per ml.
Gentamycin	10 μg	2 μg
Kanamycin	30 μg	6 μg
Neomycin	30 μg	6 μg
Polymyxin B	300 unit	60 unit
Tetracyclin	30 μg	6 μg
Tobramycin	10 μg	2 μg

ตารางที่ 2 ชนิดของกระดาษยาและความเข้มข้นทั้งในกระดาษยาและในหลอด
ทดลองที่ใช้ทดสอบกับ แอร์โรโมนาส ไฮโครฟีลา

Antimicrobial	Labeled disk content	Concentration per ml.
Chloramphenicol	30 μg	6 μg
Colistin	10 μg	2 μg
Neomycin	30 μg	6 μg
Nitrofurantoin	300 μg	60 μg
Polymyxin B	300 unit	60 unit
Tetracyclin	30 μg	6 μg
Sulphadiazine	300 μg	60 μg
Sulphamerazine	300 μg	60 μg
Sulphamethoxine	300 μg	60 μg
Sulphathiazole	300 μg	60 μg
Trimetho prim + Sulpha-methoxazole	1.25 + 23.75 μg	5 μg

วิธีการทดสอบ วิธี Disk diffusion ทำตาม Bauer และคณะ⁽³⁾ อ่านผลหลังการทดสอบ 18 ชั่วโมง ส่วนวิธี Modified broth disk ทำตาม Wilkins และ Thiel⁽⁸⁾ อ่านผลหลังการทดสอบ 3, 6 และ 18 ชั่วโมง

ผล

ผลการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อ

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบวิธี disk diffusion กับวิธี modified broth disk โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่ไวต่อยา

ชุกโตโมนาส แอร์รูจิโนซ่า ของทั้งสองวิธีให้ผลใกล้เคียงกัน ยกเว้น เตตราซัยคลิน ซึ่งตามวิธี disk diffusion เชื้อจะไวต่อยา 0% ส่วนวิธี modified broth disk เชื้อจะไวต่อยาถึง 92%, 87%, และ 84% เมื่ออ่านผลที่ 3, 6 และ 18 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 3) สำหรับผลการทดสอบเปรียบเทียบ

disk diffusion กับวิธี modified broth disk

Antimicrobial	Pseudomonas aeruginosa				Aeromonas hydrophila			
	Disk diff	Modified broth disk			Disk diff	Modified broth disk		
		3hrs	6hrs	18hrs		3hrs	6hrs	18hrs
Chloramphenical	—	—	—	—	100	100	100	92
Colymycin	—	—	—	—	100	100	100	80
Gentamycin	84	79	85	84	—	—	—	—
Kamamycin	0	4	4	4	—	—	—	—
Neomycin	44	44	38	22	100	8	12	4
Nitrofurantoin	—	—	—	—	100	100	100	84
Polymyxin B	100	100	93	75	100	100	100	84
Teracyclin	0	92	87	84	96	100	100	96
Tobramycin	84	74	78	78	—	—	—	—
Sulphadiazine	—	—	—	—	48	0	0	0
Sulphamerazine	—	—	—	—	40	0	0	0
Sulphamethoxine	—	—	—	—	44	0	0	0
Sulphathiazole	—	—	—	—	48	0	0	0
Trixmethoprim+	—	—	—	—	60	0	0	0
Su:pha-methoxazole	—	—	—	—	—	—	—	—

— Not tested

โดยใช้เชื้อ แอร์โรโมนาส ไฮโครฟีลา ปรากฏว่าได้ผลส่วนใหญ่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นนีโอมัยซินและกลุ่มซัลฟา ตามวิธี disk diffusion เชื้อจะไวต่อนีโอไมซิน 100% แต่ตามวิธี modified broth disk เชื้อจะไวต่อยา 8%, 12%, และ 4% เมื่ออ่านผลที่ 3, 6 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ และเชื้อจะไวต่อซัลฟาไดอาซีน, ซัลฟาเมอราซีน, ซัลฟาเมทอซอล, ซัลฟาไทโอาโซล และไตรเมโทพริมตามลำดับดังนี้ คือ 48%, 40%, 44%, 48% และ 60% ตามวิธี disk diffusion ส่วนผลของวิธี modified broth disk ปรากฏว่าเชื้อจะไวต่อยาซัลฟาทั้งหมด 0% ไม่ว่าจะอ่านผลที่ 3, 6 หรือ 18 ชั่วโมง

วิจารณ์

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับความไวของยาตัววิธี modified broth disk จะเห็นว่าการอ่านผลสามารถกระทำได้หลังการทดสอบ 3 ชั่วโมง และค่าใกล้เคียงกับวิธี disk diffusion มาก ยกเว้นยาบางชนิดที่ให้ผลขัดแย้งกันมาก ซึ่งในกรณีนี้ควรศึกษาสาเหตุและผลต่อไป วิธี modified broth disk มีข้อดีอีกประการหนึ่งคือสามารถที่จะทดสอบกับ

ความเข้มข้นของยาที่สูงขึ้นได้ตามต้องการเพียงแต่เพิ่มกระดาษยาลงไป สำหรับวิธี disk diffusion ถึงแม้ว่าจะมีผู้คัดแปลงจนสามารถอ่านผลได้ภายใน 6 ชั่วโมง⁽⁵⁾ ก็เป็นวิธีที่ไม่สะดวกสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป เป็นที่น่าสังเกตว่าการทดสอบยาพวกซัลฟาโดยวิธี broth disk จะไม่ได้ผลเลย แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้ก็ให้ผลคล้ายกับปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในวิธี disk diffusion ซึ่งมักจะมีการเจริญเติบโตของเชื้อบ้างเล็กน้อยรอบๆ กระดาษยาทำให้เกิด unclear zone และในการอ่านผลก็วัดรอบนอกของ unclear zone⁽⁶⁾ ดังนั้นการทดสอบยาพวกซัลฟาควรใช้วิธี disk diffusion หนึ่งเมื่อพิจารณาข้อดีข้อเสียประกอบกับผลของการทดสอบครั้งหนึ่งของทั้งสองวิธีแล้ว จึงเห็นสมควรนำเอาวิธี modified broth disk ไปใช้ในกรณีที่ต้องการผลทดสอบเร็ว (ภายในชั่วโมงหลังรับตัวอย่าง) และในขณะเดียวกันก็ควรกำหนดการทดสอบตามวิธี disk diffusion ประกอบภายหลังเพื่อความแน่นอน เนื่องจากว่าข้อมูลในการวิจัยครั้งนี้ยังมีน้อยเพราะได้เปรียบเทียบโดยใช้เชื้อเพียง 2 ชนิดเท่านั้น และผลที่ได้หลายประการยังไม่อาจแปลความได้

อย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรจะมีการทดสอบเปรียบเทียบวิธีทั้งสองนี้ให้มากขึ้น โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่าง ๆ ในประเทศไทยเพื่อหาข้อสรุปว่าวิธี modified broth disk จะมีความแน่นอนมาก

น้อยแค่ไหนและจะสามารถนำไปใช้โดยไม่ต้องทดสอบซ้ำด้วยวิธี disk diffusion ได้หรือไม่ ก่อนที่จะหาข้อยุติได้แน่นอนว่าวิธีทดสอบใดจะมีผลดีในแง่ปฏิบัติอย่างไร

อ้างอิง

1. Barry, A.L. and G.D. Fay, The amount of agar in antimicrobial disk susceptibility test plates. *Amer J. Clin. Pathol.* 59, 196-198, 1973.
2. Bartlet, R.C. and M.F. Mazens. Effect of plate size and location of disk on zone diameter in the disk antimicrobial susceptibility test. *Appl. Microbiol.* 22, 372-376. 1971.
3. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and N, Truck. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. pathol.* 45, 453-496. 1966.
4. Blezevic, D.J, Evaluation of the modified broth disk method for determining antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 721-233. 1975
5. Boyle, V.J., M.E. Fancher and R.W. Ross. Rapid, Modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disk. *Antimicrob. Agents Chemothre.* 3, 418-424. 1973.
6. Brown, D.J.F. and D. Kothari. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing pathogenic bacteria: II A field trial of four disk diffusion methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 4, 27-38. 1978.
7. Stalons, D.R. and C. Thornsberry. Broth dilution method for determining the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 51-21. 1975.
8. Wilkins, T.D. and T. Thiel. Modified broth disk for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother* 3. 350-356. 1973.