

รายงานความก้าวหน้าโครงการ การพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ
เดือนตุลาคม 2564-กันยายน 2565

(ภาษาไทย) การพัฒนาวิธีและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หายีนดื้อยา Mobile colistin resistance (MCR1 ถึง MCR10) ในสินค้าปศุสัตว์ โดยเทคนิค Real Time PCR

(ภาษาอังกฤษ) Method development and validation for colistin resistance (MCR1-MCR10) Genes by Real Time PCR technique

1. ชื่อโครงการ

ผู้รับผิดชอบโครงการ

1. นายพิเชษฐ์	กุ่มภาว	ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ
2. นางสาวสุภาพร	วงศ์ศรีไชย	ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ
3. นางสาวจรรยาลักษณ์	มาเอียด	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
4. นางกลอยใจ	พลเสนา	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
5. นายธารินทร์	ศรีวิโรจน์	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
6. นางสาวกิตติลักษณ์	ไม้เลี้ยง	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
7. นางสาวศรัญญา	โกตะการ	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
8. นางสาวกานต์ธิดา	สังธรรม	ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร

หลักการและความสำคัญ

ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial medicines) เป็นยาที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสุขภาพคนและสัตว์ และได้ถูกใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งในคนและในสัตว์ ทำให้เกิดประโยชน์ในหลาย ๆ ด้านเช่นด้านการแพทย์ การสาธารณสุข ความปลอดภัยอาหารและห่วงโซ่การผลิตอาหาร และเศรษฐกิจภาพรวมของประเทศ อย่างไรก็ตามการใช้ยาต้านจุลชีพทั้งในคน สัตว์ การปศุสัตว์ และภาคเกษตรกรรมมีมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มมีความทนต่อยาต้านจุลชีพ และเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial resistance) ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ในอดีตยาต้านจุลชีพที่เคยใช้ได้ดีแต่ปัจจุบันกลับใช้ไม่ได้ผล จึงส่งผลกระทบต่อด้านการแพทย์ การสาธารณสุข การปศุสัตว์ และภาคเกษตรกรรม ขณะเดียวกัน ไม่มีการวิจัยและพัฒนาหรือคิดค้นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรียดื้อยา สถานการณ์เช่นนี้ทำให้ทุกประเทศทั่วโลกกำลังเข้าสู่ยุคหลังยาปฏิชีวนะ (Post-antibiotic era) ที่การเจ็บป่วยจากเชื้อแบคทีเรียเพียงเล็กน้อยอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้

Colistin เป็นยาต้านจุลชีพที่จะมีผลกับเชื้อแกรมลบ เป็นยาในกลุ่ม polypeptide cationic มีกลไกการออกฤทธิ์ในการทำลายผนังเซลล์ โดยยาจะไปแย่งและขับแคลเซียม และแมกนีเซียมของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์แตกและตายในที่สุด นอกจากนี้ Colistin เป็นยาต้านจุลชีพที่ทำให้แบคทีเรียเป็นจากไวเป็นดื้อจุลชีพได้น้อย (วิชญธรมลธิชิตกุล, 2551) จึงมักนิยมใช้เป็นยาชนิดสุดท้ายในการรักษาเมื่อใช้ยาชนิดอื่นไม่ได้ผล แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Escherichia coli*, *Salmonella* บางสายพันธุ์มีความดื้อต่อยา Colistin ซึ่งลักษณะการดื้อยานี้ถูกควบคุมโดยยีน Mobile Colistin Resistance (MCR gene) ยีน MCR จะอยู่ใน Plasmid ของแบคทีเรีย และสามารถส่งถ่ายไปยังแบคทีเรียตัวอื่นได้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีน และส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา Colistin มีเพิ่มมากขึ้น จึงอาจส่งผลกระทบต่อตามที่กล่าวมาข้างต้น (Centers for Disease Control and Prevention, 2016) ดังนั้นการเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา Colistin จึงมีความสำคัญ ซึ่ง

No.	Antimicrobial	MIC breakpoint (µg/ml)
-----	---------------	-------------------------

อาจนำไปสู่การลดการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ดื้อยาต้านจุลชีพ

การตรวจหาเชื้อมีความต้านจุลชีพในเบื้องต้น เชื้อแบคทีเรียจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารที่ผสมยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ แล้วสังเกตการเจริญของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นของยาและบันทึกเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับค่า Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) เพื่อดูว่าเชือนั้นมีความดื้อต่อยาต้านจุลชีพหรือไม่ ตามตารางที่ 1 และ 2

		S	I	R
1	Ampicillin	≤ 8	16	≥ 32
2	Cefotaxime	≤ 1	2	≥ 4
3	Ceftazidime	≤ 4	8	≥ 16
4	Chloramphenicol	≤ 8	16	≥ 32
5	Ciprofloxacin	≤ 0.25	0.5	≥ 1
6	Colistin	-	≤ 2	≥ 4
7	Gentamicin	≤ 4	8	≥ 16
8	Meropenem	≤ 1	2	≥ 4
9	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$
10	Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16
11	Tigecycline	≤ 0.5	-	≥ 1

ตารางที่ 1 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Escherichia coli*.

หมายเหตุ: S = Susceptible, I = Intermedia และ R = Resistant

ตารางที่ 2 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Salmonella* spp.

No.	Antimicrobial	MIC breakpoint (µg/ml)		
		S	I	R
1	Ampicillin	≤ 8	16	≥ 32
2	Cefotaxime	≤ 1	2	≥ 4
3	Ceftazidime	≤ 4	8	≥ 16
4	Chloramphenicol	≤ 8	16	≥ 32
5	Ciprofloxacin	≤ 0.0625	0.125-0.5	≥ 1
6	Colistin	-	≤ 2	≥ 4
7	Gentamicin	≤ 4	8	≥ 16
8	Meropenem	≤ 1	2	≥ 4
9	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≤ 2/38	-	≥ 4/76
10	Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16

หมายเหตุ: S = Susceptible, I = Intermedia และ R = Resistant

อย่างไรก็ตามการหาค่า MIC เป็นเพียงการตรวจลักษณะการแสดงออกของเชื้อเท่านั้น ทำให้รู้เพียงแค่ความสามารถในการต้านทานยาต้านจุลชีพของเชื้อแต่ไม่ได้ทำให้รู้ถึงการมียีนดื้อยา ในบางครั้งเชื้ออาจมียีนดื้อยาแต่ไม่ได้มีการแสดงออกของยีนในระหว่างการทดสอบ ทำให้เกิดความผิดพลาดในผลทดสอบ ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจหายีนดื้อยามากขึ้น ทำได้โดยการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณส่วนเฉพาะที่เป็นยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยจะใช้ DNA สายสั้น (Primer) ที่มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมาย (Target gene) และทำการเพิ่มปริมาณไปเรื่อย ๆ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ (PCR product) มาทำการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจล (Gel Electrophoresis) เพื่อทำการตรวจหายีนดื้อยา นอกจากนี้การทำ PCR ยังสามารถตรวจเช็คผลในสภาพจริงได้อีกด้วย (Real Time PCR) โดยจะใช้ Probe เป็นตัวตรวจวัด เมื่อ Primer จับกับ Target gene และมีการเพิ่มปริมาณแล้ว Probe จะทำการแสดงสัญญาณ ทำให้สามารถตรวจหายีนเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้การแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจล (Mackay, 2002) การนำเทคนิค PCR และ Real Time PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาด้านจุลชีพนั้น ถือว่าเป็นประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากมีความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถตรวจได้ในหลายตัวอย่างพร้อม ๆ กันโดยใช้เวลาอันรวดเร็ว และมีความแม่นยำ ดังนั้นการพัฒนานี้จึงมีการนำเทคนิค Real Time PCR มาใช้ในการตรวจหายีนดื้อยา Mobile colistin resistance (MCR1 ถึง MCR10) เพื่อเฝ้าระวังการกระจายตัวของเชื้อดื้อยาต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หายีนส์ดื้อยา Mobile colistin resistance (MCR1 ถึง MCR10) โดยเทคนิค Real Time PCR

3. ขอบข่าย

วิเคราะห์หายีนส์ดื้อยา Mobile colistin resistance (MCR1 ถึง MCR10) ของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) แล้ว

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ผลการพัฒนาวิธีและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หายีนส์ดื้อยา Mobile colistin resistance (MCR1 ถึง MCR10) ของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) แล้ว
2. นำผลการวิเคราะห์มาเป็นแนวทางการติดตามและเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา Mobile colistin resistance ของเชื้อ *Escherichia coli* ในสินค้าปศุสัตว์

5. วัสดุอุปกรณ์

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- 5.1.1 Micropipette ขนาด 100-1000 μL , 10-100 μL , 2-20 μL และ 1-10 μL .
- 5.1.2 Micropipette tip ขนาด 1000 μL , 100 μL และ 20 μL
- 5.1.3 ตู้ชีวนิรภัย (Biological safety cabinets)
- 5.1.4 ห่วงถ่ายเชื้อ
- 5.1.5 เครื่อง Centrifuge
- 5.1.6 เครื่อง Mini Centrifuge
- 5.1.7 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. และ 0.2 ml.
- 5.1.8 เครื่อง Real time PCR
- 5.1.9 ตู้ PCR cabinet
- 5.1.10 PCR plate

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 น้ำยา SybrGreen 2x

5.2.2 Water PCR grade

5.2.3 DNA primer (Forward primer, Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน MCR 1-10)

5.2.4 Plate Count Agar (PCA)

5.2.5 น้ำบริสุทธิ์

6. วิธีดำเนินการ

6.1 การสกัด DNA

- 6.1.1 เลี้ยงเชื้อในอาหาร PCA และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 6.1.2 ดูดน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300 μl . ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เชี่ยเชื้อใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. ที่เติมน้ำบริสุทธิ์ไปแล้ว
- 6.1.3 นำ Microcentrifuge tube ที่มีการใส่เชื้อแล้วไปให้ความร้อนเพื่อให้เซลล์แตก
- 6.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 6.1.5 ทำการดูดส่วนใสใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. หลอดใหม่
- 6.1.6 เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทำการทดลอง

6.2 การตรวจหาชนิดยาด้วยวิธี Real Time PCR

- 6.2.1 ทำการเจือจาง Primer ด้วย Water PCR grade ให้ได้ความเข้มข้น 1:10
- 6.2.2 การทำ Master mix ตามตารางที่ 3
- 6.2.3 ทำการดูดแจก Master Mix ลงไปในหลุมของ PCR plate
- 6.2.4 ทำการดูด DNA sample ลงไป 2 μl

Reagent	Volume for 1 sample	Ex. Volume for 10 sample
SybrGreen 2x	10 μl	100 μl
Forward primer	0.5 μl	5 μl
Reverse primer	0.5 μl	5 μl
Water PCR grade	7 μl	70 μl
Total	18 μl	180 μl

6.2.5 นำ PCR plate เข้าเครื่อง Real Time PCR แล้วตั้งโปรแกรมเครื่องตามตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การเตรียม Master Mix

ตารางที่ 4 การตั้งค่าบนเครื่อง Real Time PCR

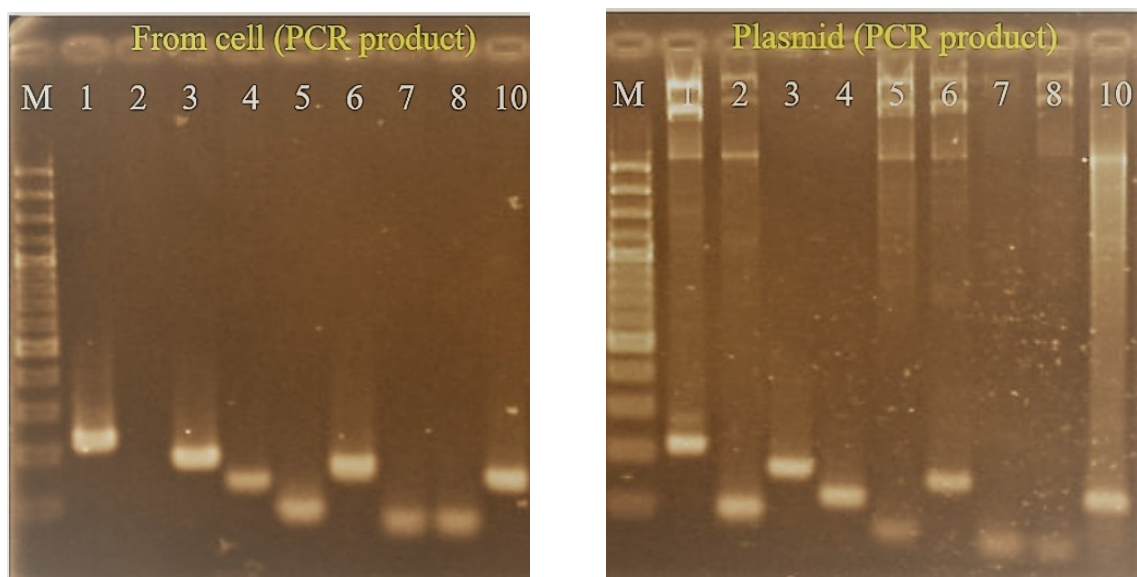
Program name	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (hh:mm:ss)	จำนวนรอบ
Pre-incubation	95	00:10:00	1
amplification	95	00:00:10	35

	60	00:00:15	
	72	00:00:30	
Melting curve	95	00:00:15	1
	60	00:01:00	
Cooling	40	00:00:30	1

8. ผลการทดลอง

8.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีนเป้าหมายด้วยวิธีการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า

ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีนเป้าหมาย โดยใช้ Positive control จากเชื้อ *E. coli* ที่มียีนดื้อยา Colistin และ Plasmid ที่มีการดัดต่อยีน MCR โดยใช้ Real Time PCR จากนั้นนำไปแยกชิ้น DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า



(ก)

(ข)

รูปที่ 1 ผลการทำ Gel electrophoresis ของ PCR Product ในการทดสอบความจำเพาะของ Primer ต่อยีนเป้าหมาย

หมายเหตุ: (ก) PCR Product จาก Positive control จากเชื้อ *E. coli* ที่มียีนดื้อยา Colistin

(ข) PCR Product จาก Plasmid ที่มีการดัดต่อยีน MCR

จากผลการรันเจล พบว่าปรากฏแถบ DNA บริเวณด้านล่างของแผ่นเจลและ PCR Product จากตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด (จากเชื้อ *E. coli* ที่มียีนดื้อยา Colistin และ จาก Plasmid ที่มีการดัดต่อยีน MCR) นั้นให้

ขนาดของ DNA ที่เท่า ๆ กัน และจากผลการทดสอบด้วยวิธี Real Time PCR ก่อนหน้านี้พบว่า กราฟมีลักษณะเป็นรูปตัว S (Sigmoid curve) ซึ่งเป็นลักษณะของการจับกันระหว่าง Primer กับยีนเป้าหมาย จึงแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของ Primer ต่อยีนเป้าหมาย

8.2 การตรวจหายีน MCR

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำ MIC มาทำการสุ่มเพื่อมาทำ Real Time PCR โดยในการสุ่ม จะทำการสุ่มจากเชื้อที่นำมาทำ MIC ทั้งหมด 3072 ตัวอย่าง (รายละเอียดจำนวนตัวอย่างตัวตารางที่ 5) สุ่มให้เหลือเพียง 200 ตัวอย่าง (รายละเอียดจำนวนการสุ่มตามตารางที่ 6)

	เนื้อไก่/โรงฆ่า	เนื้อหมู/โรงฆ่า	เนื้อไก่ /สถานที่จำหน่าย	เนื้อหมู /สถานที่จำหน่าย	รวม
สตส.	115	71	128	128	442
ศวพ. ชลบุรี	184	102	73	73	432
ศวพ. สุรินทร์	99	127	128	128	482
ศวพ. ขอนแก่น	65	85	129	129	408
ศวพ. ลำปาง	56	72	68	68	264
ศวพ. พิษณุโลก	64	118	72	72	326
ศวพ. ราชบุรี	134	141	61	61	397
ศวพ. นครศรีธรรมราช	51	52	109	109	321
รวม	768	768	768	768	3072
	เนื้อไก่/โรงฆ่า	เนื้อหมู/โรงฆ่า	เนื้อไก่ /สถานที่จำหน่าย	เนื้อหมู /สถานที่จำหน่าย	รวม

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเชื้อที่นำมาทำ MIC

สตส.	8	5	8	8	29
ศวพ. ชลบุรี	12	7	5	5	28
ศวพ. สุรินทร์	6	8	8	8	31
ศวพ. ขอนแก่น	4	6	9	9	27
ศวพ. ลำปาง	4	5	4	4	17
ศวพ. พิษณุโลก	4	8	5	5	21
ศวพ. ราชบุรี	9	9	4	4	26
ศวพ.					
นครศรีธรรมราช	3	3	7	7	21
รวม	50	50	50	50	200

ตารางที่ 6 จำนวนการสุ่มตัวอย่างเพื่อนำมาทำ Real Time PCR

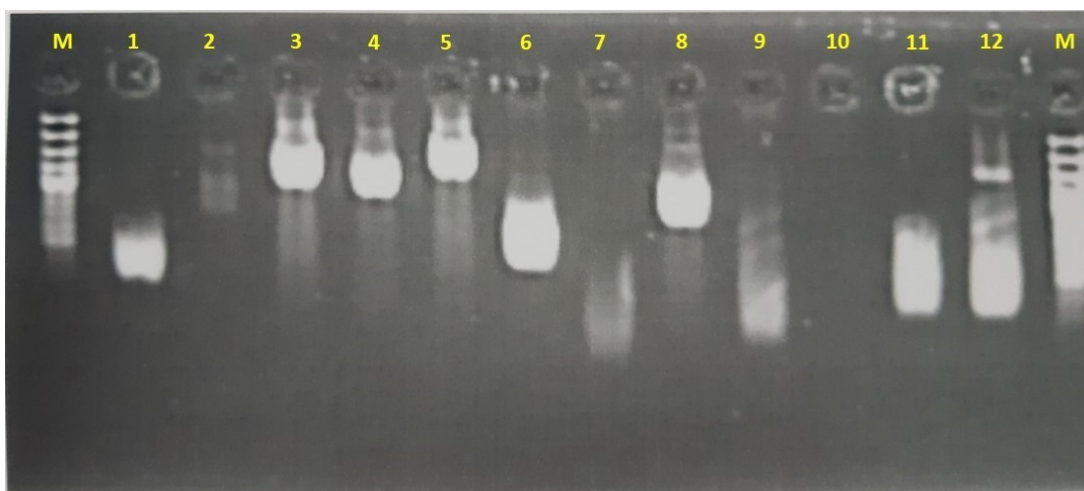
จากทดสอบการดื้อต่อยา Colistin ด้วยวิธี MIC พบว่า มีเชื้ออยู่ 3 ตัว ได้แก่ PCT-SM-SL-640021, UTI-SM-SL-640004 และ LEI-SM-BU-640007 ที่สามารถทนต่อยา Colistin ได้ โดยมีค่า MIC ของยาเท่ากับ 8 mg/ml และเมื่อนำมาทำการตรวจหายีนด้วยวิธี Real Time PCR พบว่า UTI-SM-SL-640004 มียีน MCR 1 ในขณะที่ LEI-SM-BU-640007 พบยีน MCR 1 และ MCR 3 แต่อย่างไรก็ตาม PCT-SM-SL-640021 ไม่พบยีนใดเลย (ตารางที่ 7) และเมื่อนำทั้ง 3 ตัวอย่าง ไปทำการทดสอบด้วยวิธี conventional PCR พบว่า UTI-SM-SL-640004 มีแถบ DNA ขึ้นในตำแหน่งเดียวกับ Positive control ของ MCR 1 ในขณะที่ LEI-SM-BU-640007 ขึ้นในตำแหน่งเดียวกับ Positive control ของ MCR 1 และ MCR 3 แต่ PCT-SM-SL-640021 ไม่พบแถบยีนใดเลย (รูปที่ 2)

จากการทดสอบด้วยวิธี Real Time PCR เทียบกับวิธี conventional PCR จะเห็นว่าได้ผลที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธี PCR ทั้ง 2 วิธี กับการหาค่า MIC จะพบว่า UTI-SM-SL-640004 และ LEI-SM-BU-640007 มีความดื้อต่อยา Colistin ในการทดสอบ MIC และมียีน MCR ในการตรวจด้วยวิธี PCR ในขณะที่ PCT-SM-SL-640021 พบว่ามีความดื้อต่อยา Colistin ในการทดสอบ MIC แต่เมื่อนำมาตรวจหายีนด้วยวิธี PCR ไม่พบยีนใดเลย นั่นอาจเป็นเพราะว่า ยีน MCR ของ PCT-SM-SL-640021 อาจอยู่ในโครโมโซมไม่ได้อยู่ในพลาสมิด

Sample No.	Gene Detected
------------	---------------

PLK-CM-SL-640004	ND
Sample No	Gene Detected
NSN-CM-SL-640002	ND
29201/65 UTI-CM-SL-640005	ND
39199/65 TAK-CM-SL-640005	ND
37821/65 PCT-SM-SL-640021	MCR 1
39202/65 UTI-SM-SL-640004	ND
27326/65 PNB-SM-SL-640008	MCR 3
37796/65 KPT-SM-SL-640003	ND
37330/65 STI-SM-SL-640001	MCR 3
37882/65 UTI-SM-SL-640005	ND
PCT-SM-SL-640009	ND
PLK-SM-SL-640013	ND
NSN-CM-BU-640001	ND
UTI-CM-BU-640003	ND
LEI-SM-BU-640007	MCR1, MCR3

8.3 การตรวจหายีน MCR 1-10 ด้วยวิธี Real Time PCR เทียบกับ Conventional PCR



รูปที่ 2 ผลการตรวจหายีน MCR 1-10 ด้วยวิธี Conventional PCR

หมายเหตุ: M = Marker, 1 = Positive control MCR 1, 2 = Positive control MCR 2,
3 = Positive control MCR 3, 4 = Positive control MCR 4, 5 = Positive control MCR 5,
6 = Positive control MCR 6, 7 = Positive control MCR 7, 8 = Positive control MCR 8,
9 = Positive control MCR 9, 10 = PCT-SM-SL-640021, 11 = UTI-SM-SL-640004,
12 = LEI-SM-BU-640007

จากการทดสอบดังกล่าวจะเห็นว่าทั้ง Primer และ PCR Condition ที่ใช้นั้นมีความจำเพาะกับตัวอย่างที่ยื่นเป้าหมาย ดังนั้นอาจนำ Primer และ PCR Condition ที่ใช้ดังกล่าวไปในการตรวจตรวจอย่างได้จริง อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการในขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาการทดสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อให้ได้ผลการศึกษาดังกล่าวมีความถูกต้องต่อไป

ตารางที่ 8 แผนการดำเนินงาน

[illegible]

ตารางที่ 7 (ต่อ) แผนการดำเนินงาน

รายการ	ต.ค. 64	พ.ย 64	ธ.ค. 64	ม.ค. 65	ก.พ. 65	มี.ค. 65	เม.ย. 65	พ.ค. 65	มิ.ย. 65	ก.ค. 65	ส.ค. 65	ก.ย. 65
รับตัวอย่างเชื้อ												
จัดหาเชื้อและ ยีนที่จะใช้เป็น Positive control												
ทดสอบ ความจำเพาะ ของ Primer ต่อยีน เป้าหมาย												
ทดสอบความ ไวต่อยาต้าน จุลชีพด้วยการ หาวิธี Broth Dilution (หาค่า MIC)												
ทำการ ตรวจหายีนส์ที่ แสดงความดื้อ ต่อยาปฏิชีวนะ												
สรุปวิธีการ ทดสอบ												

รายการ	ต.ค. 64	พ.ย 64	ธ.ค. 64	ม.ค. 65	ก.พ. 65	มี.ค. 65	เม.ย. 65	พ.ค. 65	มิ.ย. 65	ก.ค. 65	ส.ค. 65	ก.ย. 65
เข้าร่วมการ ทดสอบความ ชำนาญ/ เปรียบเทียบ ผลระหว่าง ห้องปฏิบัติการ			↔							↔		
ประเมินผล การดำเนินงาน ตามไตรมาส/ ส่ง ความก้าวหน้า	←											→
สรุปผลการ ดำเนินงาน ตามตัวชี้วัด ของแผน บริการ วิเคราะห์ ทดสอบ												↔

ตารางที่ 7 (ต่อ) แผนการดำเนินงาน

บรรณานุกรม

- วิชญ์ ธรรมลิขิตกุล. (2551). โคลิสติน:ยาต้านจุลชีพสำหรับรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา. *Siriraj Medical Bulletin*, 1(3), 152-158.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016). Newly Reported Gene, mcr-1, Threatens Last-Resort Antibiotics. Retrieved October 14 2021. from <https://www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/stories/gene-reported-mcr.html>.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.