

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรค  
ด้วยวิธี broth microdilution

นายพิเชษฐ์ กุมภาว์ นางสาวสุภาพร วงศ์ศรีไชย นางสาวจรรยาลักษณ์ มาเอียด นางกลอยใจ พลเสนา  
นางสาวศรัญญา โกตะการ นางสาวกิตติลักษณ์ ไม้เลี้ยง นายธารินทร์ ศรีวิโรจน์

บทคัดย่อ

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ มีภารกิจเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านเชื้อดื้อยาในสินค้าปศุสัตว์ ตามโครงการควบคุม ป้องกัน และแก้ไขเชื้อดื้อยาในสัตว์ โดยทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth microdilution ใช้ชุดทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งอัตโนมัติร่วมกับเพลท Sensititre EU Surveillance EUVSEC3 plate (*Salmonella/E.coli* MIC panel) เพื่อเป็นการประเมิน Performance ของวิธีทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพทำให้เกิดความเชื่อมั่น ความถูกต้อง ความเที่ยงตรงของผลทดสอบ จึงต้องดำเนินการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method verification) โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของ CLSI : M52 (2015) ในการทดสอบครั้งนี้ใช้เชื้อในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. จำนวน 35 Isolates ทำการทดสอบเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Accuracy) โดยประเมิน Category agreement (CA) และ Essential agreement (EA) ด้วยวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์กับวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการอ้างอิง จากการทดสอบพบว่า ร้อยละของค่า CA และ EA ของยาแต่ละชนิดอยู่ในช่วง 94.3 - 100 และ 97.1 - 100 ตามลำดับ ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ (ไม่เกินร้อยละ 90) และการทดสอบหาค่า Precision (reproducibility) พบว่า Precision ของห้องปฏิบัติการของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์อยู่ที่ร้อยละ 100 ผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ (ไม่เกินร้อยละ 95) การทดสอบครั้งนี้มีการควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยใช้เชื้อ QC Strain พบว่าผลผ่านตามเกณฑ์การยอมรับเช่นกัน ดังนั้นจากผลทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรคเป้าหมายในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. โดยใช้ชุดทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งอัตโนมัติร่วมกับเพลท Sensititre EU Surveillance EUVSEC3 plate (*Salmonella/E.coli* MIC panel) ห้องปฏิบัติการของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ สามารถนำวิธีการทดสอบมาใช้เพื่อทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพของ เชื้อโรคเป้าหมายในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้

คำสำคัญ : Antimicrobial susceptibility testing, Non-fastidious Gram negative, MIC

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

**Verification of antimicrobial susceptibility testing for pathogens  
by broth microdilution method**

Pichet Koomba Supaporn Wongsrichai Jaroonluk Mareiad Kloyjai Ponsena  
Sarunya Kotakharn Kitilak Mailieng Tarin Srewiroj

**Abstract**

Bureau of Quality Control of Livestock Products (BQCLP) has a mission to be a reference laboratory for antimicrobial resistance in livestock products. According to the project to Surveillance of Antimicrobial resistance in animals. Using a semi-automated antimicrobial susceptibility test kit with the Sensititre EU Surveillance EUVSEC3 plate (*Salmonella/E.coli* MIC panel). Evaluation of the performance of antimicrobial susceptibility testing to ensure the confidence, accuracy and precision of the results. This test uses 35 isolations of non-fastidious gram negative *Escherichai coli* and *Salmonella* spp. for method accuracy by evaluating Category agreement (CA) and Essential agreement (EA) are  $\leq 90\%$  when compared to the Reference laboratory, which showed in the range of 94.3-100 and 97.1-100 respectively. The Precision (reproducibility) of the BQCLP laboratory were 100%, which passed of acceptable limit ( $\leq 95\%$ ). CLSI: M52 (2015) requires quality control testing by QC Strain, QC of BQCLP laboratory were 100% in range. From the verification results can be used to test for the antimicrobial susceptibility of target organism in non-fastidious gram negative group.

**Keywords:** Antimicrobial susceptibility testing, Non-fastidious Gram negative, MIC

---

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products,  
Department of Livestock Development

# รายงานความก้าวหน้าการพัฒนารูปแบบและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

รอบ 12 เดือน (ตุลาคม 2566 – กันยายน 2567)

## 1. ชื่อโครงการ

- (ภาษาไทย) การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรค ด้วยวิธี broth microdilution
- (ภาษาอังกฤษ) Verification of antimicrobial susceptibility testing for pathogens by broth microdilution method.

## ผู้รับผิดชอบโครงการ

- |                      |            |  |
|----------------------|------------|--|
| 1. นายพิเชษฐ์        | กุ่มภาว์   | ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ        |
| 2. นางสาวสุภาพร      | วงศ์ศรีไชย | ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ        |
| 3. นางสาวจรรยาฤกษ์   | มาเอียด    | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 4. นางกลอยใจ         | พลเสนา     | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 5. นางสาวศรัณญา      | โกตะคาร    | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 6. นางสาวกิตติลักษณ์ | ไม้เลี้ยง  | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 7. นายธารินทร์       | ศรีวิโรจน์ | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |

## หลักการ และความสำคัญ

ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial medicines) ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสุขภาพคนและสัตว์ เนื่องจากใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งในคนและสัตว์จึงมีความสำคัญด้านการแพทย์ การสาธารณสุข และความปลอดภัยอาหารในระดับนานาชาติ ในห่วงโซ่การผลิตอาหาร และเศรษฐกิจในภาพรวมของประเทศ การใช้ยาต้านจุลชีพทั้งในมนุษย์ สัตว์ และภาคเกษตรกรรมล้วนมีส่วนทำให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพมีมากขึ้น การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial resistance) ของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ยาต้านจุลชีพที่ในอดีตเคยใช้ได้ผลกลับใช้ไม่ได้ผลในปัจจุบัน ขณะเดียวกันอุตสาหกรรมยาทั่วโลก ไม่มีการวิจัยและพัฒนาหรือค้นคิดยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ เพื่อต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรียดื้อยา สถานการณ์เช่นนี้ทำให้ทุกประเทศทั่วโลกกำลังเข้าสู่ยุคหลังยาปฏิชีวนะ (post-antibiotic era) ที่การเจ็บป่วยจากการติดเชื้อแบคทีเรียเพียงเล็กน้อยอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต ภายใต้ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียได้ทวีความรุนแรงขึ้น และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

กรมปศุสัตว์ได้เล็งเห็นถึงประเด็นปัญหาการดื้อยานี้ จึงได้เตรียมความพร้อมให้เจ้าหน้าที่ได้มีความรู้ทั้งด้านทฤษฎี และด้านการปฏิบัติ ในการเฝ้าระวังการดื้อยาต้านจุลชีพ ในส่วนของเชื้อดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ซึ่งเป็นการบูรณาการการทำงานในทุกภาคส่วนของกรมปศุสัตว์ โดยการจัดทำระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาในสัตว์ทางห้องปฏิบัติการระดับชาติ วางมาตรการลดหรือชะลอการดื้อยาต่างๆ เช่น การเฝ้าระวังการใช้ยาต้านจุลชีพให้มีการใช้อย่างเหมาะสม ให้ความรู้ และสร้างความตระหนักแก่ผู้ประกอบการภาคปศุสัตว์เรื่องเชื้อดื้อยา วางมาตรการให้ลดการใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่จำเป็น รวมถึงความสอดคล้องกับแผนดำเนินการระดับโลกเรื่องการดื้อยาต้านจุลชีพ (Global Action Plan on Antimicrobial Resistance) ที่ประกอบด้วยความร่วมมือของหลายภาคส่วนที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ

ดังที่กล่าวข้างต้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จึงมีภารกิจเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านเชื้อดื้อยาในสินค้าปศุสัตว์ (The National reference laboratory for food safety) ดำเนินการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างสินค้าปศุสัตว์และสิ่งแวดล้อม ตามโครงการควบคุม ป้องกัน และแก้ไข

เชื้อดื้อยาในสัตว์ นับตั้งแต่ ปีงบประมาณ ๒๕๖๔ เป็นต้นมา โดยเป็นการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของยา แต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth microdilution โดยอาศัยหลักการของเครื่อง Sensititre system ซึ่งเป็นชุดทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งอัตโนมัติ เพลทที่ใช้มีลักษณะเป็น microtitre plate โดยในแต่ละ well จะมียาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ในความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องแบบ Two-fold dilution อ่านผลด้วยการวัดความขุ่น (visual read) โดยรายงานเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (MIC: Minimum inhibitory concentration)

## 2. วัตถุประสงค์

เพื่อทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรค ด้วยวิธี microbroth dilution โดยใช้วิธีการแบบกึ่งอัตโนมัติ

## 3. ขอบข่าย

ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรคเป้าหมายในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. จำนวน 35 Isolates โดยใช้ MIC Sensititre Plate ร่วมกับ Sensititre® system

## 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 ได้ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรคในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* spp.

4.2 สามารถใช้ข้อมูลเพื่อประเมิน Performance ของวิธีทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ก่อนนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อเป้าหมายในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* spp.

4.3 สามารถใช้ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรค เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการขอรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

## 5. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

5.1 System (ที่ใช้เปรียบเทียบ)

5.2 Incubator  $35\pm 1$  °C

5.3 SWIN

5.4 Nephelometer

5.5 Sensititre AIM

5.6 EUVSEC3 (*Salmonella/ E.coli* MIC panel)

5.7 Sterile distilled water

5.8 Cation adjusted Mueller-Hinton broth with TES

5.9 สารละลาย 0.5 McFarland Standard

5.10 Dosing heads

## 6. วิธีการดำเนินการ

6.1 กำหนดรายการ Panel ของ Sensititre Plate ที่ต้องการทดสอบ เพื่อกำหนดรายการ Antibiotics ที่ต้องทำการทดสอบ

6.2 ดำเนินการทดสอบเพื่อหาค่า Accuracy โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของ CLSI: M52 (2015) ดังนี้

6.2.1 เตรียม Culture ที่จะทำการทดสอบ โดยใช้ตัวอย่าง Clinical isolates อย่างน้อย 30 isolates/panel type โดย Culture ที่เลือกต้องมีคุณสมบัติดังนี้

- 1) เลือก isolates จากเชื้อที่ culture จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ตัวอย่างต่างชนิด หรือจาก stock ที่ตัวอย่างต่างชนิดกัน
- 2) เลือก isolates เชื้อที่มี Resistant Phenotype
- 3) เลือกเชื้อที่มีทั้งผลการทดสอบความไวของยาแต่ละชนิด Susceptible และ Non Susceptible
- 4) ถ้าใช้ตัวอย่าง QC strains ต้องใช้จำนวน < 50% ของ 30 isolates
- 5) ตัวอย่าง Clinical isolates ต้องมีอายุการเก็บเชื้อภายใน 7 วันและไม่แช่แข็ง
- 6) ถ้าใช้ตัวอย่าง Frozen isolate ต้องมีการ Subculture 2 ครั้งก่อนทำการทดสอบ

6.2.2 บันทึกรายการ Isolates ที่เลือกมาทำการทดสอบหาค่า Accuracy ลงในตารางที่ 1 (ผลการทดลอง)

6.2.3 Subculture stock isolates บน non selective media 2 ครั้ง ก่อนนำมาทดสอบ

6.2.4 ใช้ Fresh isolate อายุ 18-24 ชั่วโมง

6.2.5 ดำเนินการทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี Sensititre โดยใช้ inoculum เดียวกันในการทดสอบเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี

6.2.6 Check purity ของทุกๆ Inoculum

6.2.7 ทดสอบ QC strain ตามที่แนะนำโดย CLSI หรือบริษัทผู้ผลิต

6.2.8 เก็บ isolate ที่ทดสอบแล้วจนกระทั่งตรวจสอบเรียบร้อยแล้ว

6.2.9 บันทึกผลการทดสอบค่า S, I, R ลงในตารางบันทึกผล (ตารางที่ 1) เพื่อหาค่า Category agreement (CA) หรือการวัดความสอดคล้องกันของการแปลผล susceptible (S), intermediate (I) และ resistant (R) ของการทดสอบ Sensititre กับการทดสอบด้วยวิธีอื่น โดย

$$\% \text{ Category agreement} = \frac{N_{CA}}{N} \times 100$$

เมื่อ  $N_{CA}$  = จำนวน isolate ที่มีการแปลผลตรงกัน

$N$  = จำนวน isolate ทั้งหมดที่ทำการทดสอบ

6.2.10 บันทึกผลการทดสอบค่า MIC ลงในตารางบันทึกผล (ตารางที่ 2) เพื่อหาค่า Essential agreement (EA): การวัดความสอดคล้องกันของค่า MIC ที่แตกต่างกันไม่เกิน  $\pm 1$  dilution ของการทดสอบ Sensititre เทียบกับการทดสอบด้วยวิธีอื่น (ใช้สำหรับยาที่มีมากกว่าหรือเท่ากับ 4 dilution range) โดย

$$\% \text{ Essential agreement (EA)} = \frac{N_{EA} \times 100}{N}$$

เมื่อ  $N_{EA}$  = จำนวน isolate ที่มีความสอดคล้องกันของค่า MIC ที่แตกต่างกันไม่เกิน  $\pm 1$  Dilution

$N$  = จำนวน isolate ทั้งหมดที่ทำการทดสอบ

6.2.1.1 บันทึกค่า Category agreement (CA) และ Essential agreement (EA) ของ Antibiotics แต่ละชนิด ลงในตารางที่ 3 เพื่อประเมินผลการทดสอบหาค่า Accuracy

6.3 ดำเนินการทดสอบเพื่อหาค่า Precision (reproducibility) โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของ CLSI:M52 (2015) ดังนี้

6.3.1 เลือก Isolates จำนวน 5 Isolates

6.3.2 ทำการทดสอบแบบ Reproducibility โดยนำแต่ละ Isolates มาทำการเตรียม Inoculum จำนวน 3 ซ้ำ (Total 5 Isolates  $\times$  3 ซ้ำ = 15 ซ้ำ)

6.3.3 ทำการทดสอบหาค่า MIC ของทุก Inoculum ด้วยวิธี Sensititre โดยผลทดสอบที่มีค่า MIC แตกต่างกันไม่เกิน  $\pm 1$  doubling dilution นับเป็นผลที่เทียบเท่ากัน (equivalent results)

6.4 ทำการทดสอบ Quality Control ด้วยเชื้อ QC strain ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ

6.4.1 Gram Positive

1) *S.aureus* ATCC 29213

2) *E.faecalis* ATCC 29212

6.4.2 Gram negative

1) *E.coli* ATCC 25922

2) *P.aeruginosa* ATCC 27853

6.5 ประเมินผลและสรุปผลการทดสอบโดยใช้เกณฑ์การยอมรับดังนี้

Criteria	Acceptable Limit
Category agreement (CA)	$\geq 90 \%$
Essential agreement (EA)	$\geq 90 \%$
Precision (reproducibility)	$\geq 95 \%$
QC	In-range 100 %

## 7. ผลการทดลอง

7.1 ผลการทดสอบค่า S, I, R เพื่อหาค่า Category agreement (CA) หรือการวัดความสอดคล้องกันของการแปลผล susceptible (S), intermediate (I) และ resistant (R) ของการทดสอบ Sensititre กับการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิง ปรากฏดังตารางที่ 1

7.2 ผลการทดสอบค่า MIC เพื่อหาค่า Essential agreement (EA): การวัดความสอดคล้องกันของค่า MIC ที่แตกต่างกันไม่เกิน  $\pm 1$  dilution ของการทดสอบ Sensititre เทียบกับการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิง (ใช้สำหรับยาที่มีมากกว่าหรือเท่ากับ 4 dilution range) ปรากฏดังตารางที่ 2

7.3 ผลการประเมินการทดสอบหาค่า Accuracy โดยบันทึกค่า Category agreement (CA) และ Essential agreement (EA) ของ Antibiotics ปรากฏดังตารางที่ 3

7.4 ผลทำการทดสอบ Quality Control ด้วยเชื้อ QC strain ปรากฏดังตารางที่ 4

7.5 ผลดำเนินการทดสอบหาค่า Precision (reproducibility) โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของ CLSI: M52 (2015) ปรากฏดังตารางที่ 5

ตารางที่ 1 ตารางบันทึกผลการทดสอบค่า S, I, R เพื่อกำหนดค่า Category agreement (CA)

ตัวอย่างที่	เชื้อทดสอบ	Amikacin		Ampicillin		Azithromycin		Cefotaxime		Ceftazidime		Chloramphenicol		Ciprofloxacin		Colistin		Gentamicin		Meropenem		Nalidixic acid		Sulfamethoxazole		Tetracycline		Tigecycline		Trimethoprim	
		Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B
1	Salmo 01	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
2	Salmo 02	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	Salmo 03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	Salmo 04	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
5	Salmo 05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
6	Salmo 06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	I	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
7	Salmo 07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
8	Salmo 08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R
9	Salmo 09	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
10	Salmo 10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
11	Salmo 11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	Salmo 12	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R
13	Salmo 13	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R
14	Salmo 14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	Salmo 15	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
16	Salmo 16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	Salmo 17	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S

ตารางที่ 1 ตารางบันทึกผลการทดสอบค่า S, I, R เพื่อคำนวณหาค่า Category agreement (CA) (ต่อ)

ตัวอย่างที่	เชื้อทดสอบ	Amikacin		Ampicillin		Azithromycin		Cefotaxime		Ceftazidime		Chloramphenicol		Ciprofloxacin		Colistin		Gentamicin		Meropenem		Nalidixic acid		Sulfamethoxazole		Tetracycline		Tigecycline		Trimethoprim	
		Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B
18	Salmo 18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	
19	Salmo 19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
20	EC 01	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	
21	EC 02	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
22	EC 03	S	S	R	R	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
23	EC 04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
24	EC 05	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R		
25	EC 06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S		
26	EC 07	S	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
27	EC 08	S	S	R	R	S	S	R	R	R	I	S	S	R	R	I	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S		
28	EC 09	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
29	EC 10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S		
30	EC 11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
31	EC 12	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R		
32	EC 13	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S		
33	EC 14	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S		
34	EC 15	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R		
35	EC 16	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R		
n = 35		N <sub>CA</sub> = 34		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 33		N <sub>CA</sub> = 33		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 34		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 35		N <sub>CA</sub> = 35			
% CA		97.1		100		100		100		97.1		94.3		100		97.1		100		100		100		100		100		100			

หมายเหตุ : Lab A = Reference Laboratory, Lab B = ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและจุลชีววิทยา,    (เหลือง) = การแปลผลต่างกัน,    (แดง) = การแปลผลต่างกันแบบ Very major error

ตารางที่ 2 ตารางบันทึกผลการทดสอบค่า MIC เพื่อคำนวณหาค่า Essential agreement (EA)

ตัวอย่าง ที่	เชื้อทดสอบ	Amikacin		Ampicillin		Azithromycin		Cefotaxime		Ceftazidime		Chloramphenicol		Ciprofloxacin		Colistin		Gentamicin		Meropenem		Nalidixic acid		Sulfa methoxazole		Tetracycline	
		Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B
1	Salmo 01	<=4	<=4	>32	>32	<=2	8	<=0.25	<=0.25	0.5	0.5	<=8	<=8	0.5	0.5	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	8	8	128	64	>32	>32
2	Salmo 02	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	128	128	<=2	<=2
3	Salmo 03	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	0.5	0.5	<=8	<=8	0.03	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	256	256	<=2	<=2
4	Salmo 04	<=4	<=4	>32	>32	4	4	>4	>4	>8	>8	>64	>64	0.03	<=0.015	<=1	<=1	1	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	>32	>32
5	Salmo 05	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	0.5	<=8	<=8	0.12	0.12	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	>32	>32
6	Salmo 06	<=4	<=4	4	4	8	8	<=0.25	<=0.25	1	1	16	16	0.03	0.03	4	2	>16	>16	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	<=2	<=2
7	Salmo 07	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	64	64	>32	>32
8	Salmo 08	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	>32	>32
9	Salmo 09	<=4	<=4	>32	>32	4	4	<=0.25	<=0.25	1	1	<=8	<=8	4	8	<=1	<=1	>16	>16	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	>32	>32
10	Salmo 10	<=4	<=4	<=1	<=1	<=2	<=2	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	0.5	0.5	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	8	8	>512	>512	>32	>32
11	Salmo 11	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	0.5	0.5	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	32	32	<=2	<=2
12	Salmo 12	<=4	<=4	>32	>32	64	64	>4	>4	>8	>8	<=8	<=8	2	2	<=1	<=1	>16	>16	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	<=2	<=2
13	Salmo 13	<=4	<=4	>32	>32	>64	>64	<=0.25	<=0.25	0.5	0.5	<=8	<=8	0.03	0.03	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	>32	>32
14	Salmo 14	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	0.5	0.5	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	32	32	<=2	<=2
15	Salmo 15	<=4	<=4	>32	>32	4	4	<=0.25	<=0.25	1	1	<=8	<=8	>8	8	<=1	<=1	>16	>16	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	>32	>32
16	Salmo 16	<=4	<=4	2	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	0.5	0.5	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	32	32	<=2	<=2
17	Salmo 17	<=4	<=4	>32	>32	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	0.5	<=8	<=8	0.03	0.03	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	>32	>32
18	Salmo 18	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	256	512	<=2	<=2
19	Salmo 19	<=4	<=4	<=1	<=1	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	0.5	0.5	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	16	16	128	128	<=2	<=2
20	EC 01	<=4	<=4	>32	>32	16	16	>4	>4	2	1	<=8	64	>8	>8	<=1	<=1	>16	>16	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	>32	>32
21	EC 02	<=4	<=4	>32	>32	32	64	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	>64	>64	>8	>8	<=1	<=1	1	1	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	>32	>32
22	EC 03	<=4	<=4	>32	>32	4	8	>4	>4	4	8	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	1	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	32	16	<=2	<=2

ตารางที่ 2 ตารางบันทึกผลการทดสอบค่า MIC เพื่อคำนวณหาค่า Essential agreement (EA) (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	เชื้อทดสอบ	Amikacin		Ampicillin		Azithromycin		Cefotaxime		Ceftazidime		Chloramphenicol		Ciprofloxacin		Colistin		Gentamicin		Mero penem		Nalidixic acid		Sulfa methoxazole		Tetra cycline		Tigecycline		Trimethoprim	
		Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B	Lab A	Lab B
23	EC 04	<=4	<=4	2	2	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	1	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	<=8	16	<=2	<=2	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25
24	EC 05	<=4	<=4	>32	>32	>64	>64	>4	>4	1	1	64	>64	0.12	0.12	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	>32	>32	<=0.25	<=0.25	>16	>16
25	EC 06	<=4	<=4	4	4	4	8	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	1	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	512	4	<=2	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25
26	EC 07	<=4	8	>32	>32	8	8	>4	>4	>8	>8	>64	>64	>8	>8	<=1	<=1	2	2	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	512	>32	>32	<=0.25	<=0.25	>16	>16
27	EC 08	<=4	<=4	>32	>32	16	16	>4	>4	>8	8	<=8	<=8	2	1	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	>64	>64	32	32	<=2	<=2	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25
28	EC 09	<=4	<=4	>32	>32	16	16	>4	>4	>8	>8	>64	>64	>8	>8	4	4	>16	>16	1	1	>64	>64	>512	>512	>32	>32	<=0.25	0.5	>16	>16
29	EC 10	<=4	<=4	4	4	4	8	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	16	16	0.03	0.03	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	<=2	<=2	<=0.25	<=0.25	0.5	0.5
30	EC 11	<=4	<=4	2	2	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	32	32	<=2	<=2	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25
31	EC 12	<=4	<=4	>32	>32	64	64	>4	>4	>8	>8	<=8	<=8	>8	>8	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	>16	>16	>64	>64	>512	>512	>32	>32	<=0.25	<=0.25	>16	>16
32	EC 13	<=4	<=4	>32	>32	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	16	32	8	8	4	4	>16	>16	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	>32	>32	<=0.25	0.5	<=0.25	0.5
33	EC 14	<=4	<=4	>32	>32	4	4	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=8	<=8	<=0.015	<=0.015	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	<=2	<=2	<=0.25	<=0.25	<=0.25	0.5
34	EC 15	<=4	<=4	>32	>32	>64	>64	>4	>4	1	1	64	>64	0.25	0.25	<=1	<=1	<=0.5	<=0.5	<=0.03	<=0.03	<=4	<=4	>512	>512	>32	>32	<=0.25	<=0.25	>16	>16
35	EC 16	<=4	<=4	>32	>32	8	16	>4	>4	>8	>8	>64	>64	>8	>8	<=1	<=1	<=0.5	1	<=0.03	<=0.03	>64	>64	>512	>512	>32	>32	<=0.25	<=0.25	>16	>16
n= 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 34		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 34		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35		N <sub>EA</sub> = 35	
% EA		100		100		97.1		100		100		97.1		100		100		100		100		100		100		100		100		100	

หมายเหตุ : Lab A = Reference Laboratory, Lab B = ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและจุลชีววิทยา, (เหลือง) = ค่า MIC ที่แตกต่างกันไม่เกิน ±1 dilution, (แดง) = ค่า MIC ที่แตกต่างกันเกิน ±1 dilution

ตารางที่ 3 ตารางบันทึกผลการทดสอบค่า Category agreement (CA) และ Essential agreement (EA)

Panel : EUVSEC3 Panel	Reference Laboratory และ ห้องปฏิบัติการสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา			
	CA (%)	Interpret	EA (%)	Interpret
Amikacin	97.1	ผ่าน	100	ผ่าน
Ampicillin	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Azithromycin	100	ผ่าน	97.1	ผ่าน
Cefotaxime	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Ceftazidime	94.3	ผ่าน	100	ผ่าน
Chloramphenicol	94.3	ผ่าน	97.1	ผ่าน
Ciprofloxacin	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Colistin	97.1	ผ่าน	100	ผ่าน
Gentamicin	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Meropenem	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Nalidixic acid	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Sulfamethoxazole	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Tetracycline	100	ผ่าน	100	ผ่าน
Tigecycline	100	ผ่าน	100	ผ่าน

ตารางที่ 4 ตารางแสดงผลการทดสอบ Quality Control ด้วยเชื้อ QC strain

Panel : EUVSEC3 Panel	ค่า MIC ของ QC strain			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Amikacin	<=4	64	<=4	<=4
Ampicillin	8	<=1	<=1	>32
Azithromycin	4	<=2	<=2	>64
Cefotaxime	<=0.25	1	1	>4
Ceftazidime	<=0.25	2	8	2
Chloramphenicol	<=8	<=8	<=8	>64
Ciprofloxacin	<=0.015	0.25	0.5	0.25
Colistin	<=1	>16	>16	<=1
Gentamicin	<=0.5	4	<=0.5	1
Meropenem	<=0.03	4	<=0.03	0.25
Nalidixic acid	<=4	>64	32	64
Sulfamethoxazole	32	<=8	64	>512
Tetracycline	<=2	8	<=2	8
Tigecycline	<=0.25	<=0.25	<=0.25	4



## 8. ประเมินและสรุปผลการทดลอง

จากการประเมินหาค่าความสอดคล้องกันของการแปลผล (CA) และความสอดคล้องกันของค่า MIC ที่แตกต่างกันไม่เกิน  $\pm 1$  dilution (EA) ของห้องปฏิบัติการงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยากับ Reference laboratory พบว่าผลที่ได้มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (Acceptable Limit) และค่า Precision (reproducibility) ของห้องปฏิบัติการงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา พบว่าผลที่ได้มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (Acceptable Limit) นอกจากนี้ในการทดสอบต้องดำเนินการควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยใช้เชื้อ QC strain พบว่าผลผ่านตามเกณฑ์การยอมรับเช่นกัน ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตารางประเมินและสรุปผลการทดสอบ

Criteria	Acceptable Limit	Results (%)	ผลการประเมิน
Category agreement (CA)	$\geq 90$ %	94.3 - 100	ผ่าน
Essential agreement (EA)	$\geq 90$ %	97.1 - 100	ผ่าน
Precision (reproducibility)	$\geq 95$ %	100	ผ่าน
QC	In-range 100 %	100	ผ่าน

จากผลทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรคเป้าหมายในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. โดยใช้ Sentititre EU Surveillance EUVSEC3 (*Salmonella/ E.coli* MIC panel) สามารถนำมาใช้เพื่อทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อโรคเป้าหมายในกลุ่ม Non-fastidious Gram negative ได้

## 10. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการ และขอขอบคุณฝ่ายแบคทีเรียทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

Clinical and Laboratory standards institute. 2015. M52 Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing System. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, USA. 416 pages.

Clinical and Laboratory standards institute. 2024. CLSI M100<sup>TM</sup> Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, USA. 92 pages.

ISO 20776-2:2021. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices against reference broth micro-dilution. 2<sup>nd</sup> edition. Published by International Organization for Standardization on 2021-12.

จุฬาร ศรีหนา และคณะ, “โครงการ ควบคุม ป้องกัน และแก้ไขปัญหาเชื้อดื้อยาในสัตว์ ปังบประมาณ 2567”. หน้า 1-7.