

ภาคผนวก

ตาราง ก คุณสมบัติของแบคทีเรียกลุ่ม EHEC ที่ได้จาก Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University ประเทศญี่ปุ่น

	Strain No.	Serotype	Stx	Origin	Other features*
STEC	RIMD0509952	O157:H7	Stx1+Stx 2	human	
STEC	RIMD05091055	O26:H11	Stx1	human	espP, hlyA, eaeA
STEC	RIMD05091056	O111:NM	Stx1	human	espP, hlyA, cacA
STEC	RIMD05091078	O157:H7	Stx1+Stx 2	human	No examined
STEC	RIMD05091083	O157:H7	Stx 2	human	No examined
STEC	RIMD05091556	O22	Stx 2	bovine	(eaeA-)

*identified by PCR amplification

Minimal inhibitory concentration

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ หน่วยที่ใช้ทั่วไป คือ $\mu\text{g/ml}$ ค่า MIC นี้สามารถนำไปใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่ง ๆ ต่อยาสมุนไพรหลาย ๆ ชนิดหรือความไวของเชื้อหลายชนิดต่อยาหนึ่ง ๆ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC นั้นควรทำการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นลดลงทุกสองเท่า (serial 2-fold dilution) ไปเรื่อย ๆ ตามความต้องการ

Minimal bactericidal concentration

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถทำลายหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

McFarland standard

ใช้สำหรับปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ปริมาณตามความต้องการที่จะใช้ทดสอบวิธีเตรียมน

นำ H_2SO_4 1% 0.5 ml ผสมกับ $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.175% 99.5 ml ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตะกอนขาวขุ่นของ BaSO_4

ตาราง ข ส่วนผสมของ 0.048 M BaCl₂ (1.175% w/v BaCl₂·2H₂O) และ 0.36 NH₂SO₄ (1% v/v H₂SO₄) เพื่อเตรียม BaSO₄ standard หรือ McFarland standard หมายเลขต่าง ๆ

Tube no.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
H ₂ SO ₄ (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density (x10 ⁸ /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ตาราง ค Hydrophobicity ของแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับสารสกัดนันทรีด้วยน้ำเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในน้ำกลั่น

เชื้อ (จำนวน)	Hydrophobicity					
	ความเข้มข้นเท่ากับ MIC			ความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC		
	คงเดิม	เพิ่ม	ลด	คงเดิม	เพิ่ม	ลด
EHEC (6)	2	4	0	2	4	0
EPEC (1)	0	1	0	0	1	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (1)	0	1	0	0	1	0

ตาราง ง Hydrophobicity ของแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับ DMSO เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในน้ำกลั่น

เชื้อ (จำนวน)	Hydrophobicity					
	ความเข้มข้นเท่ากับ MIC			ความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC		
	คงเดิม	เพิ่ม	ลด	คงเดิม	เพิ่ม	ลด
EHEC (6)	2	0	4	2	0	4
EPEC (1)	0	0	1	0	0	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (1)	0	0	1	0	0	1

ตาราง จ Hydrophobicity ของแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับสารสกัด
 นนทรีย์ด้วยเอทานอลเปรียบเทียบกับชุดควบคุมใน DMSO

เชื้อ (จำนวน)	Hydrophobicity					
	ความเข้มข้นเท่ากับ MIC			ความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC		
	คงเดิม	เพิ่ม	ลด	คงเดิม	เพิ่ม	ลด
EHEC (6)	0	6	0	1	5	0
EPEC (1)	1	0	0	1	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (1)	1	0	0	1	0	0

Potassium phosphate buffer 0.04 M pH 6.8

ส่วนประกอบ	KH_2PO_4 0.2 M	50 ml
	NaOH 0.2 M	22.4 ml
	Distilled water	127.6 ml

วิธีเตรียม นำ KH_2PO_4 0.2 M และ NaOH 0.2 M มาผสมรวมกันแล้วเติมน้ำให้
 ครบปริมาตรตามต้องการ ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 นำสารที่ได้ไปเจือจาง
 ในอัตราส่วน 1:5 จะได้ phosphate buffer pH 6.8 ที่มีความเข้มข้น
 0.04 M

การคำนวณการเตรียม KH_2PO_4 0.2 M และ NaOH 0.2 M คือ

- เตรียม KH_2PO_4 0.2 M โดย KH_2PO_4 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 136.09 g/mol

ประกอบด้วย	KH_2PO_4	27.218 g
	Distilled water	1000 ml

- เตรียม NaOH 0.2 M โดย NaOH มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 40 g/mol

ประกอบด้วย	NaOH	8 g
	Distilled water	1000 ml

สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

ในการทดลองจะต้องใช้ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 3.0 M โดยใช้ phosphate buffer 0.04 M pH 6.8 เป็นตัวทำละลาย

- เตรียมสารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 M โดย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 132.14 g/mol

ประกอบด้วย	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	396.42	g
	Phosphate buffer	1000	ml

- เตรียม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 M โดยทำการเจือจางจาก 3.0 M ในอัตราส่วน 1:2

- เตรียม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 M โดยทำการเจือจางจาก 3.0 M ในอัตราส่วน 1:3

- เตรียม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M โดยทำการเจือจางจาก 1.0 M ในอัตราส่วน 1:2

- เตรียม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 M โดยทำการเจือจางจาก 1.0 M ในอัตราส่วน 1:10

Mueller-Hinton agar (MHA)

ส่วนประกอบ	Beef extract	300.0	g
	Casamino acids technical	17.5	g
	Starch	1.5	g
	Agar	12.0	g
	Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 38.0 g ค่อน้ำกลั่น 1000 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Mueller-Hinton broth (MHB)

ส่วนประกอบ	Beef extract	300.0	g
	Bacto casamino acids technical	17.5	g
	Bacto soluble starch	1.5	g
	Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 21 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนด้วย magnetic stirrer ใช้ความร้อนน้อยๆ ให้ส่วนผสมเข้ากันดี แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient agar (NA)

ส่วนประกอบ	Peptones from meat	5.0	g
	Meat extract	3.0	g
	Agar	3.0	g
	Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 20 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate พร้อมทั้งคนด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Tryptic soy broth (TSB)

ส่วนประกอบ	Pancreatic digest of casein	17.0	g
	Enzymatic digest of soybean meal	3.0	g
	Dextrose	2.5	g
	Sodium chloride	5.0	g
	Dipotassium phosphate	2.5	g
	Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 30 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนด้วย magnetic stirrer ให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Sorbitol-MacConkey agar (SMAC)

ส่วนประกอบ	Peptone	20	g
	Sorbitol	10	g
	Bilesalt No. 3	1.5	g
	Sodium chloride	5	g
	Neutral red	0.03	g
	Crystal violet	0.001	g
	Agar	15	g
	Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 25.8 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนด้วย magnetic stirrer ให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ตาราง ๓ ตารางมาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ (Lorian, 1996)

Antimicrobial agent	Disc content (µg)	Zone diameter nearest whole (mm)			Approximate MIC correlates (µg/ml)	
		Resistant	Intermediate	Susceptible	Resistant	Susceptible
Amikacin	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16
Ampicillin	10	≤11	12-13	≥14	≥32	≤8
Cephalothin	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤10
Chloramphenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥25	≤12.5
Gentamicin	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
Kanamycin	30	≤13	14-17	≥18	≥25	≤6
Nalidixic acid*	30	≤13	14-18	≥19	≥32	≤12
Tetracycline	30	≤14	15-18	≥19	≥12	≤4

* ciprofloxacin และ norfloxacin เป็นยาในกลุ่มเดียวกับ nalidixic acid ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม quinolones จึงแปลผลเช่นเดียวกัน