

สำนักงานคณะกรรมการ
การอุดมศึกษา และ การวิจัย

อุบัติการณ์และแบบแผนความไวของ Group D Streptococci
ในจังหวัดชลบุรี

Incidence and Antibigram of Group D Streptococci
in Chonburi Province

ปัญหาทางจุลชีววิทยา

ของ

สารธรรม์ นันทถาวร

เสนอต่อภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

ตุลาคม 2537

ลิขสิทธิ์เป็นของภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต คณะอาจารย์จากภาควิชาจุลชีววิทยาได้
พิจารณาปัญหาทางจุลชีววิทยาระดับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นหนึ่งของการศึกษาตามหลัก
สูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ประธาน วันที่ 29 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2577
กรรมการ วันที่ เดือน พ.ศ.
กรรมการ วันที่ เดือน พ.ศ.
หัวหน้าภาควิชา วันที่ เดือน พ.ศ.

ประกาศคุณูปการ

ปัญหาทางจุลชีววิทยานับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือ ทั้งทางด้าน
ค่าปรึกษาและคำแนะนำเป็นอย่างดีจาก อาจารย์สุบัณฑิต เมฆธยาธ ประธานควบคุมปัญหา
ทางจุลชีววิทยา รองศาสตราจารย์ ปัญญัติ สุขศรีงาม ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่อง
ต่าง ๆ อาจารย์นันทนา อรุณฤกษ์ คณะกรรมการควบคุมปัญหาทางจุลชีววิทยา และอาจารย์
กอบฉาบ ตันสกุล ที่ได้ให้คำแนะนำและแนวทางในการศึกษาค้นคว้า ผู้เขียนขอขอบพระคุณเป็น
อย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณพสุรี พรหมปฎิมา โรงเรียนบาลสมัยแล้ว ณ ศรีราชา และคุณรัชนี บูรณชัย
และพี่ ๆ โรงเรียนบาลชลบท ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ รวมทั้งขอขอบคุณ
คุณศิริวัต ภัระทรงษ์ คุณปาริชาติ เหนเมศรีสกุล และคุณอนุสิทธิ์ เหนศรีสุรีย์ รวมทั้งเพื่อน ๆ และ
น้อง ๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาทางจุลชีววิทยานับนี้

ความดีของปัญหาทางจุลชีววิทยานับนี้ ขอมอบแต่ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ๆ ที่ได้ให้
กำลังใจ แรงกาย ความคิดและสนับสนุนทางด้านทางการเงินโดยตลอดมา รวมทั้งครูบา
อาจารย์ทุกท่านที่ได้สั่งสอนมา

สุวรรณณี วิณิชถาวร

บทคัดย่อ

จากการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงอุบัติการณ์การระบาดของ group D streptococci (GDS) ในจังหวัดชลบุรี โดยนำสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลชลบุรี และโรงพยาบาลสมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2536 ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2537 จำนวน 317 ตัวอย่าง มาทดสอบโดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ คือ bile esculin และ 6.5% NaCl พบ GDS 31 สายพันธุ์ Enterococci 27 สายพันธุ์ และ non-enterococci 4 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาทดสอบวิธี Lancefield precipitation ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบ GDS เพียง 12 สายพันธุ์ เนื่องจากเกิดผลบวกปลอม 19 สายพันธุ์ โดยทั้งหมดเป็น nongroup A,B,C,D,G streptococci ดังนั้น ความไวและความจำเพาะของวิธี bile esculin เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 29.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ได้แยกชนิดของ GDS ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *E. faecalis* ทั้งหมด และเมื่อทดสอบแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด พบว่า *E. faecalis* ทั้งหมดจะต่อต้าน ampicillin และ penicillin แต่เกือบทั้งหมดจะไวต่อ vancomycin

Abstract

The objective of this study was to investigate the incidences of group D streptococci (GDS) in Chonburi Province between October 1993 and May 1994 in samples collected from 317 patients in Chonburi Hospital and Samedan Sriracha Hospital by using bile esculin test, 6.5% NaCl test and Lancefield precipitation test. The result by bile esculin test, on GDS showed that 31 strains were positive to the test, but by Lancefield precipitation test showed positively in only 12 strains. The sensitivity and specificity of bile esculin test as compared with standard lancefield precipitation method were 100% and 29.69% respectively. However the results by biochemical test, on GDS were identified to be *E. faecalis*. The investigation indicated that GDS was susceptible to amphotericin but was resistant to ampicillin and penicillin.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1. บทนำ	1
2. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	3
3. วิธีสุ่มสุ่มและวิธีคำนวณการทดลอง	20
4. ผลการทดลอง	26
5. สรุปผล อภิปรายและข้อเสนอแนะ	34
บรรณานุกรม	40
ภาคผนวก	45

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1. ความแตกต่างทางชีวเคมีของ enterococci และ non-enterococci	4
2. การจำแนกทางชีวเคมีของ group D streptococci	5
3. การจำแนก group D streptococci โดยอาศัยการย่อยสลายเม็ทิลเอ็ดมอนด์ และคาร์ลโบค	8
4. การเกิดโรคของ group D streptococci	9
5. แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ group D streptococci	20
6. การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย group D streptococci	20
7. Group D streptococci: วัสดุสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ โดยผลการทดสอบด้วยวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl	27
8. Group D streptococci: วัสดุสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ โดยผลการทดสอบด้วยวิธี Lancefield precipitation	28
9. เปรียบเทียบผลการทดสอบ group D streptococci โดยอาศัยผลการทดสอบด้วยวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl กับวิธี Lancefield precipitation	29
10. การเปรียบเทียบความไวของแบคทีเรีย group D streptococci กับวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl กับวิธี Lancefield precipitation ของ group D streptococci	30
11. ตารางชนิดสีของ group D streptococci จำนวน 12 สายพันธุ์ โดยวิธีทางชีวเคมี	31
12. แบบแผนตารางไฟลอคอนิกซ์ของ group D streptococci	32
13. ตารางแผนผังชนิดของ group D streptococci โดยใช้วิธีทางชีวเคมี	33
14. ผลของวิธีวิธีการคำนวณความไวของแบคทีเรีย group D streptococci	34
15. ตารางฐานสำหรับแผนผังตารางไฟลอคอนิกซ์ของ group D streptococci วัสดุสิ่งส่งตรวจ 1	35

บัญชีภาพ

ภาพ	หน้า
1. แสดงการเกิดผลบวกเมื่อทดสอบ streptococci ด้วยวิธี Lancefield precipitation	68

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บทที่ 1

บทนำ

Group D streptococci (GDS) จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม streptococci โดย GDS เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและสภาวะแวดล้อม เชื้อกลุ่มนี้สามารถจำแนกได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่ม enterococci ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* และ *E. durans* มักพบตามลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ และกลุ่ม non-enterococci ได้แก่ *S. equinus* และ *S. bovis* วัตถุประสงค์ของการวิจัยของสัตว์ (Collee and others 1989) เชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากเป็นอันดับที่ 3 รองจาก *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ตามลำดับ (Ketchum 1988) โรคที่มักเกิดที่บริเวณกลุ่มของ enterococci คือ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Sherris 1991) เนื่องจาก enterococci จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ จึงออกมายังสิ่งแวดล้อมตามมูลสัตว์ได้ง่าย (Joklik and others 1988) ส่วนโรคอื่น ๆ ที่พบได้เช่น การอักเสบของเยื่อช่องคลอด การติดเชื้อในกระแสเลือด การอักเสบของลิ้นหัวใจ (Louie and others 1992) การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อที่เนื้อเยื่ออ่อน และการติดเชื้อในระบบหัวใจ เป็นต้น (Sherris 1991)

เนื่องจาก GDS เป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคได้มากมายดังกล่าวแล้ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงการรักษารักษาที่เกิดจาก GDS นี้ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยและรักษาในปัจจุบันนี้พบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพซึ่งเป็นยาประเภทเดียวกับที่ประเภชในการใช้กันอย่างกว้างขวาง และมีแนวโน้มว่าเป็นที่นิยมมากขึ้น ซึ่งบ่อยครั้งก็พบว่ามีการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้อง อันก่อให้เกิดปัญหาบางอย่างตามมาได้ที่สำคัญก็คือ การเกิดอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยา และการเกิดพิษจากพิษข้างเคียงของยา จึงทำให้มีการศึกษากลับมาพิจารณาการระบาดของเชื้อในกลุ่มนี้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยร่วมกับวิธีมาตรฐาน คือ วิธี Lancefield precipitation ซึ่งจะให้ผลได้อย่างถูกต้องและแน่นอน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ทางด้านระบาดวิทยา วัตถุประสงค์ให้ใช้ให้เก็บประเภชนี้ในทางการแพทย์และสาธารณสุขทางด้านการรักษาต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของ group D streptococci และชนิดของ group D streptococci ที่เกิดขึ้นในจังหวัดชลบุรี
 2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการทดสอบ group D streptococci โดยวิธีทางชีวเคมีร่วมกับวิธี Lancefield precipitation
 3. เพื่อศึกษาถึงชนิดของ group D streptococci
 4. เพื่อศึกษาถึงความไวของ group D streptococci ต่อยาต้านจุลชีพ
- จำนวน 11 ชนิด

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกัน ความคุม และรักษาโรคที่เกิดจาก group D streptococci
2. เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาที่ถูกต้องเหมาะสม สำหรับรักษาโรคที่เกิดจาก group D streptococci ได้อย่างรวดเร็ว
3. เพื่อทำให้ทราบวิธีการทางชีวเคมีในการทดสอบ group D streptococci ว่ามีความถูกต้องเพียงไร

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

ในการทดลองนี้ได้จำแนกเชื้อ group D streptococci จากสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ เช่น ปัสสาวะ อุจจาระ มีสสาระ ปัสสาวะ และอื่น ๆ จากโรงพยาบาลชลบุรี และโรงพยาบาลสมเด็จฯ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 17 ตัวอย่าง

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา จำนวนได้ออกเป็น 2 ตอน คือ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ group D streptococci
2. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาของ group D streptococci

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ group D streptococci

1.1 พื้นฐานวิทยาและสรีรวิทยา

GDS เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมอยู่เป็นคู่ (diplococci) หรือเป็นสายโซ่สั้น ๆ (short chains) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 ไมครอนเมตร หรืออาจมีขนาดต่าง ๆ ขึ้นไปตามสภาวะที่เลี้ยงเจริญ (Kingsbury and others 1990) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล (Collee and others 1989) จำนวนได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ enterococci และ non-enterococci ในกลุ่ม enterococci ได้แก่ *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. durans* ส่วนกลุ่ม non-enterococci ได้แก่ *S. equinus* และ *S. bovis* (Sherris 1991) และในปัจจุบันนี้อาจเรียก enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*) นี้ว่า fecal streptococci ก็ได้ (Boyd and Bryan 1991) ซึ่งกลุ่มของ enterococci นี้จะใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพทางด้านสุขาภิบาล โดยเฉพาะใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพอาหาร ซึ่งจะดีกว่าโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจาก enterococci สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ค่อนข้างกว้าง (Bingen and others 1991) ส่วนการจำแนกกลุ่ม enterococci และ non-enterococci นั้นจะอาศัยความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 6.5% NaCl ซึ่งพบว่า กลุ่ม enterococci สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 6.5% NaCl ได้ ส่วน non-enterococci ไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ยังพบว่า enterococci ผลิต penicillin แต่ non-enterococci จะไวต่อยาชนิดนี้ (Jensen and Wright 1989) สำหรับความแตกต่างทางด้านชีวเคมีของ enterococci และ non-enterococci แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างทางชีวเคมีของ enterococci และ non-enterococci

การทดสอบ	Enterococci	Non-enterococci
Bile esculin	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	-
Penicillin test	resistant	sensitive

ที่มา : Jensen and Wright 1983

GDS เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดหรือซีรัมผสมอยู่ จึงจัดเป็น fastidious organism คือ ต้องการสารอาหารหลาย ๆ อย่างในการเจริญ นอกจากนี้ยังเป็น facultative anaerobes ที่มีการเฟอร์เมนเตชันคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลคติกอีกด้วย (Kingsbury and others 1990) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดียิ่งขึ้นในที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าปกติ นอกจากนี้ยังเจริญได้ที่ 6.5% NaCl, 40% bile และ 0.1% methylene blue อีกด้วย (Sherris 1991) ส่วนโคโลนีบน blood agar จะมีขนาดเล็กประมาณ 0.5-2.0 มิลลิเมตร สีน้ำตาล ลักษณะกลม และมีสีขาว (Kingsbury and others 1990) ส่วนมากจะให้ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน sheep blood agar เป็นแบบ alpha hemolytic คือ มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้เป็นบางส่วนเห็นลักษณะรอบ ๆ โคโลนีตรงเชิงที่มีสีเขียวอ่อน และแบบ gamma hemolytic คือ ไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงรอบ ๆ โคโลนี แต่สำหรับ *S. faecalis* var. *zymogenes* ส่วนมากจะให้ผลเป็นแบบ beta hemolytic คือ มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์จะเห็นลักษณะรอบ ๆ โคโลนีมีขอบใส (Joklik and others 1988)

ลักษณะที่สำคัญของ GDS ทางชีวเคมี คือ ย่อยสลาย esculin ได้ บางสายพันธุ์สามารถย่อย mannitol และสร้างแก๊สออกมา บางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายเวลาสั้น และสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่ไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) (Collee and others 1989) สำหรับการจำแนกลักษณะทางชีวเคมีของ Group D streptococci แสดงได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การจำแนกทางชีวเคมีของ group D streptococci

Biochemical test	Group D streptococci	
	Enterococci	Non-enterococci
Hemolysis on human blood agar	α , β , none	α , none
Catalase	-	-
Bacitracin	-	-
Susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole	-	+
Hemolysis hippurate	-*	-
Bile esculin	+	+
Growth 6.5% NaCl	+	-
Bile solubility	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

- หมายเหตุ + positive reaction or susceptible
- negative reaction or resistant
- * exception occasionally occur

ที่มา : Koneman and others 1988

1.2 ถิ่นอาศัย

เชื้อซึ่งพบทั่วไปในธรรมชาติและสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ในอาหาร น้ำ
 ฟุนละออง เป็นต้น บางครั้งพบว่าเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในมนุษย์และสัตว์ เช่น
E. faecalis ซึ่งเป็นสมาชิกในกลุ่ม enterococci หรือที่เรียกว่า fecal
 streptococci ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์มากที่สุด มักอาศัยอยู่ในลำไส้
 ของมนุษย์มากกว่าลำไส้ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ แต่บางครั้งก็พบว่าอาจอาศัยในอุจจาระ
 หรือเป็นแบคทีเรียประจำปากด้วย ส่วน *S. bovis* และ *E. faecium* จะอาศัยอยู่ใน
 ลำไส้ของวัว ควายและสุกร แต่ลำไส้ของม้าจะมี *S. bovis*, *S. equinus* และ
E. faecium เป็นส่วนใหญ่ และ *S. axium* มักอาศัยอยู่ในลำไส้และกระเพาะของไก่
 (Collee and others 1988)

1.3 โครงสร้างของผนังเซลล์

GDS มีแอนติเจนที่ต่างจาก streptococci กลุ่มอื่น ๆ คือ GDS ไม่มี
 C-carbohydrate แต่จะมี group specific antigen เป็นกรดกลีเซอรอลไทรืออิก
 (glycerol teichoic acid) ที่ประกอบด้วย กลูโคส และ D-alanine ซึ่งแอนติเจน
 นี้จะรวมอยู่ในโซ่โพลีกลูคอสัมหรือเซลล์เมมเบรน ส่วน type specific antigen คือ
 รงเล็บผลคาริไตในผนังเซลล์ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง peptidoglycan
 ในผนังเซลล์ระหว่างเชื้อแต่ละชนิดใน GDS จะเป็นการเพิ่มเฉพาะในส่วนของเปปไทด์
 เช่น *E. faecalis* จะประกอบไปด้วย กรดกลูตามิก (glutamic acid) ไลซีน
 (lysine) และอลานีน (alanine) เท่านั้น ส่วน *E. faecium* และ *E. durans* จะ
 ประกอบไปด้วยกรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) และ *S. equinus* จะประกอบไป
 ด้วย ทรีโอนีน (threonine) (Joklik and others 1988)

1.4 ความทนทาย

GDS เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ สูงถึง 60 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที ซึ่งเป็นข้อแตกต่างจาก streptococci กลุ่มอื่น ๆ ด้วย นอกจากนี้ กลุ่ม enterococci มีสมบัติพิเศษคือ สามารถทนต่อสภาวะ- แวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี เช่น ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี และเจริญได้ทั้งสภาวะอุณหภูมิต่ำ และอุณหภูมิสูง คือ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส และใช้กลุ่มนี้ซึ่งต่อต้าน ยาต้านจุลชีพ กลุ่ม beta-lactam หลายชนิด เช่น penicillin vancomycin และ gentamicin แต่ถูกทำลายได้ง่ายด้วย daptomycin เพียงอย่างเดียวหรืออาจใช้ร่วมกับ ampicillin ด้วย (Bingen and others 1990) เชื้อกลุ่มนี้ยังทนต่อ pH ประมาณ 9.6 (Balows and others 1991) และเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือสูง (ประมาณ 0.5% , 0.1% methylene blue และ bile esculin agar ด้วย (Jawetz and others 1991)

1.5 Group D streptococci กับการเกิดโรค

GDS มีถิ่นอาศัยตามผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจส่วนบน ระบบทางเดิน ทางการและระบบสืบพันธุ์ ซึ่งโรคส่วนใหญ่แล้วการติดเชื้อจะมีสาเหตุมาจาก แบคทีเรีย ปรนจากกัน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อแบบได้เชื้อจากผู้ป่วยเอง (endogenous infection) ส่วนการติดเชื้อจากภายนอก (exogenous infection) นั้นพบว่ามี ความสำคัญน้อยกว่า (Joklik and others 1988) สำหรับชนิดที่พบว่าทำให้เกิดการติดเชื้อ ได้มากที่สุด คือ *E. faecalis* (Collee and others 1989) ทำให้เกิดการ ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ทางเดินน้ำดี การอักเสบของลิ้นหัวใจแบบถึงเฉียบพลัน (subacute-endocarditis) แผลติดเชื้อ การติดเชื้อในช่องท้อง ไส้ติ่งอักเสบ และ ริดสีดวง ๆ และเชื้อนี้มักเป็นการติดเชื้อร่วมในผู้ป่วยสูงอายุที่เป็นลิ้นหัวใจที่ถลอกแล้ว (Joklik and others 1988) ส่วน *S. bovis* เป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบของ ลิ้นหัวใจแบบเฉียบพลัน (Sherris 1991) และอาจทำให้เกิดเนื้องอกในระบบทางเดิน ทางการได้ (gastrointestinal tumors) สามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากเลือด และ ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเฉียบพลัน (acute infection) นอกจากนี้

ยังพบว่าเชื้อกลุ่มนี้พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะ (Joklik and others 1988)
สำหรับลักษณะการจำแนก group D streptococci โดยอาศัยการเกิดโรคและการย่อย
สลายเม็ดเลือดแดงดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 การจำแนก group D streptococci โดยอาศัยการย่อยสลาย
เม็ดเลือดแดงและการก่อโรค

Group	Common term	Hemolysis	Disease Associations	Main habitat
<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i>	Enterococci	α or non-hemolytic (rarely β)	Pyogenic urinary infection	Intestinal of man and animals
<i>S. bovis</i> <i>S. equinus</i>	Non-enterococci	α or non-hemolytic	Low virulence endocarditis	Feces of animals

หมายเหตุ D คือ group D streptococci

ที่มา : Collee and others 1989 and Sherris 1991

ตารางที่ 4 การเกิดโรคของ group D streptococci

Lance-field Group	ชนิด	การเกิด hemolysis (sheep blood)	ถิ่นอาศัย	การเกิดโรคในมนุษย์	การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ
D	Enterococcus		-Large	-Urinary tract infection	-Lancefield grouping
	<i>E. faecalis</i>	α	bowel	-Pelvic abscesses	-Bile esculin hydrolysis
	<i>E. faecium</i>	α		-Peritonitis	-0.5% NaCl tolerance
	<i>E. durans</i>			-Wound infection	-late agglutination
	Non-enterococcus				
	<i>S. bovis</i>	α, β		-Endocarditis	
<i>S. equinus</i>	α				

ที่มา : Koneman and others 1982

1.6 การรักษา

การรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก enterococci นั้นจะขึ้นอยู่กับตำแหน่งหรือบริเวณที่เกิดโรครวมถึงภาวะแทรกซ้อนในการเกิดโรค โดยส่วนมากแล้ว enterococci จะดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam เช่น aminoglycoside sulfonamides และ benzylpenicillin แต่จะไวต่อยา ampicillin และ amoxycillin ซึ่งใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ สำหรับ *E. faecalis* ที่เป็นสาเหตุของโรคลิ้นหัวใจอักเสบ รักษาได้โดยการใช้ penicillin ร่วมกับ aminoglycoside ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ (Collee and others 1989) ซึ่งในการใช้ยาร่วมกันนี้ พบว่ามีผลในการรักษา

คือว่าในการใช้ยาเดี่ยว ๆ ด้วย (Jawetz and others 1991) ส่วนผู้ป่วยที่แพ้ต่อ penicillin จะรักษาแทนได้โดยใช้การใช้ erythromycin สำหรับสายพันธุ์ของ non-enterococci ซึ่งได้แก่ *S. bovis* และ *S. equinus* จะถูกทำลายได้ง่ายโดย penicillin G จึงใช้ยานี้ในการรักษาได้ (Joklik and others 1988)

2. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาของ group D streptococci

Kaplan และคณะ (Kaplan and others 1988) รายงานการค้นพบ resistant enterococci ขณะที่มีการรักษาด้วย vancomycin โดยมาจากการรายงานของผู้ป่วยที่มีการทำ hemodialysis ที่มีการติดเชื้อชนิดขาดผล และโรคโลหิตเป็นพิษ โดย vancomycin-resistant enterococci ที่ทดสอบแล้วว่าเป็น *Enterococcus gallinarum* ซึ่งกลายพันธุ์ที่มีการรักษาด้วย vancomycin เชื้อชนิดนี้จะไวต่อ ampicillin, rifampin, teicoplanin และ daptomycin (LY 148032)

Facklam และ Collins (Facklam and Collins 1989) ได้มีการนำ streptococci 206 สายพันธุ์ ที่เก็บไว้ใน stock หรือนำมาพิสูจน์อีกครั้งหนึ่งโดยนำ 188 สายพันธุ์มาทดสอบ พบว่า 91 เปอร์เซ็นต์ เป็น enterococci อีก 9 สายพันธุ์ (4 เปอร์เซ็นต์) ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสายพันธุ์ใด และ 6 สายพันธุ์ (3 เปอร์เซ็นต์) ทดสอบได้ว่าเป็น *Leuconostoc* sp. อีก 3 สายพันธุ์ (1.5 เปอร์เซ็นต์) ได้เป็น *Lactococcus* sp. และชนิดของ enterococci ที่พบใหม่คือ *Enterococcus raffinosus* และ *E. solitarius* ซึ่งการใช้ DNA-DNA hybridization มาสนับสนุนว่าผลถูกต้องหรือไม่ โดยมีการทดสอบใหม่ใน 10 ชนิด จาก 12 ชนิดของ enterococci จาก 188 สายพันธุ์ทั้งหมด ซึ่งการพิสูจน์สายพันธุ์ขึ้นอยู่กับผลการทดลองของ 20 ลักษณะทางสรีรวิทยาของ enterococci

Ruoff และคณะ (Ruoff and others 1990) ได้นำวิธีการทดสอบทางชีวเคมีและวิธีใหม่มาใช้ในการตรวจสอบชนิดของ enterococci จากสิ่งส่งตรวจ และจากการทดสอบทางชีวเคมีตามแบบของ Facklam และ Collins จะให้ผลการทดสอบที่พบว่ามีการทดสอบผิดพลาด lactose-negative *Enterococcus faecalis* เป็น

E. solitarius แต่ปัญหาที่ยังแก้ไขไม่ได้โดยการทดสอบโดยวิธีใหม่ แต่วิธีใหม่จะไม่แสดงชนิดของ enterococci ที่มีมากกว่านี้ได้ จากการทดสอบ enterococci 302 สายพันธุ์ ระบุว่า เป็น *E. faecalis* 87.1 เปอร์เซ็นต์ *E. faecium* 8.6 เปอร์เซ็นต์ *E. avium* 0.7 เปอร์เซ็นต์ *E. durans* 0.3 เปอร์เซ็นต์ *E. gallinarum* 1 เปอร์เซ็นต์ *E. casseliflavus* 1 เปอร์เซ็นต์ *E. hirae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ *E. raffinosus* 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งหมดนี้จะไม่มีการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และ 15.4 เปอร์เซ็นต์ จาก 235 สายพันธุ์ มี *E. gallinarum* 1 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ gentamicin ที่ความเข้มข้นสูง

Chirurgi และคณะ (Chirurgi and others 1991) ได้ศึกษาการดื้อ ampicillin ของ *Enterococcus* 14 สายพันธุ์ พบว่า 9 สายพันธุ์ (64.3 เปอร์เซ็นต์) ที่มีผลทดสอบแยกได้เป็น *E. raffinosus* จะมีค่า MIC > 16 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นที่มีการดื้อต่อ enterococci ที่ดื้อต่อ ampicillin และผู้ดื้อที่มีการดื้อต่อ *E. raffinosus* ที่มีลักษณะการดื้อต่อ ampicillin โดยผู้ป่วยเหล่านี้จะได้รับ การใช้สายสวน ได้จากการผ่าตัด หรือเป็นโรคอยู่ก่อนแล้ว เป็นต้น พบว่า จะไม่มีความแตกต่างกัน และจากการที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อมาก่อนและมีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ หรือผู้ป่วยที่มีอาการรักษาภายในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน ๆ จะเพิ่มสาเหตุที่สำคัญในการทำให้ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *E. raffinosus* ที่ดื้อต่อ ampicillin ได้มากขึ้นด้วย

Patterson และคณะ (Patterson and others 1991) ได้ศึกษา enterococci ที่สามารถผลิตเอนไซม์ β -lactamase (Bla^+) 3 สายพันธุ์ (100%) 7 สาย และจะมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกันกับ ลักษณะของ plasmid profile ลักษณะของขนาดสัมพันธ์กับการตัดด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease เหมือนกัน ซึ่ง 3 สายพันธุ์นี้ได้จาก West Haven Veterans Administration Medical Center in Connecticut จะมีชื่อต่าง ๆ กัน คือ WH 245, WE 257, WH 371 และจากการแยกเชื้อในเดือนกรกฎาคม ค.ศ. 1986 และเดือนมีนาคม ค.ศ. 1987 และศึกษาใน DNA ทั้งหมดโดยใช้เอนไซม์ SmaI ส่องผลสายในวิธี pulsed-field gel electrophoresis

พบว่าได้ DNA ขนาดใหญ่ และใน 3 สายพันธุ์จะมีลักษณะ chromosomal restriction endonuclease ที่คล้ายกันมาก นอกจากนี้ใน 3 สายพันธุ์แยกได้จากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ อีกทั้งยังมีลักษณะแตกต่างจาก enterococci ที่พบในท้องถิ่น ๆ อีกด้วย

Sahm และคณะ (Sahm and others 1991) ได้ศึกษาการดื้อยาของ *Enterococcus faecalis* ทั้งหมด 107 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อ gentamicin 58 สายพันธุ์ และ streptomycin 50 สายพันธุ์ ในระดับสูง ซึ่งมี 7 วิธีที่ใช้การทดสอบซึ่ง ได้แก่ standard agar screen plate, high-content disk diffusion, Remel (Leixa, Kans) EF Synergy Quad plates, standard microdilution panels, Pasco MIC Gram-Positive panels, MicroScan MIC Type 3 dry panels และวิธีสุดท้ายคือ Vitek-GPS-TA card ซึ่งพบว่า วิธี disk diffusion และ standard agar screen plate จะตรวจพบการดื้อต่อ gentamicin และ streptomycin ได้ผล 100 เปอร์เซ็นต์ และวิธี standard microdilution ได้ผล 98 เปอร์เซ็นต์และ 96 เปอร์เซ็นต์ วิธี Pasco panel ประมาณ 98 และ 96 เปอร์เซ็นต์ วิธี MicroScan panel ประมาณ 88 และ 89 เปอร์เซ็นต์ และวิธีสุดท้ายคือ Vitek GPS-TA card จะให้ผลการทดสอบประมาณ 98 และ 91 เปอร์เซ็นต์

Green และคณะ (Green and others 1991) ได้พบ vancomycin-resistant gram-positive cocci (VRGPC) จากผู้ป่วยเด็กที่มีการปลูกถ่ายตับ 49 ราย จากโรงพยาบาลเด็กสเปิร์ก สหรัฐอเมริกา โดยการตรวจจากอุจจาระ และพบการพัฒนาของโรคจากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำในหน่วยละอองฝอย เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับ VRGPC และสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อ vancomycin จะมีค่า MIC $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ จากการทดลองในผู้ป่วย 36 รายจากผู้ป่วย 49 ราย โดยดูผลการทดสอบที่ต่าง ๆ ของ enterococci 86 สายพันธุ์ จะพบ *Enterococcus gallinarum* (n=28) *E. casseliflavus* (n=14) *E. faecium* (n=9) *E. faecalis* (n=2) *E. mundtii* (n=2) และ *E. durans* (n=1) นอกจากนี้ยังมีการพบ *Lactobacillus confusus* (n=13) *Lactobacillus* spp. (n=12) และ *Pediococcus*

pentosaccus (n=4) ซึ่งการติดเชื้อของ VRGPC พบในผู้ป่วย 3 ราย คือ โรคทางเดิน
 ปัสสาวะอักเสบ 2 ราย โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 1 ราย และยังพบ *E. faecium*
 ก่อโรคร่วมด้วย ช่วงค่า MIC ของ vancomycin 8-32 µg/ml ของ enterococci
 ทั้งหมด และสำหรับ *Lactobacillus* และ *Fedococcus* จะมีค่า MIC > 128 µg/ml
 ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้จะต่อต้าน teicoplanin แต่จะไวต่อ daptomycin ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ
 จะไวทั้ง teicoplanin และ daptomycin และจากการศึกษาถึงเชื้อในอุจจาระจะพบ
 ในผู้ป่วยเด็กที่มีการปลูกถ่ายไตนั้น ก็พบว่ายังคงมีการติดเชื้อน้อยอยู่

Louie และคณะ (Louie and others 1992) ได้ศึกษา *Enterococcus*
faecium จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 103 สายพันธุ์จากประเทศแคนาดา โดยวิธี standard
 broth microdilution susceptibility เปรียบเทียบกับวิธี MicroScan Pos
 MIC Type 6 panels และวิธี AMS-Vitek Gram-Positive Susceptibility
 card ซึ่งพบว่า จาก *E. faecium* 103 สายพันธุ์ มี 4 สายพันธุ์จะมีความต้าน
 gentamicin ในระดับสูง (High-level gentamicin resistant ; HLGR)
 และ 30 สายพันธุ์จะมีความต้าน streptomycin ในระดับสูง (High-level
 streptomycin resistant; HLSR) และจาก 39 สายพันธุ์ (37 ใน HLGR และ 30
 ใน HLSR) จะถูกทดสอบโดยวิธี MicroScan และ AMS-Vitek system โดยวิธี
 AMS-Vitek card จะมีความไว 93 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ในการตรวจสอบ HLGR และ
 HLSR ตามลำดับ ส่วนวิธี MicroScan panel จะพัฒนาความไวในการตรวจสอบ HLGR
 (42-97 เปอร์เซ็นต์) และ HLSR (64-84 เปอร์เซ็นต์) และการต่อต้าน ampicillin
 (ค่า MIC \geq 16 µg/ml) พบ 28 ใน 103 สายพันธุ์ และมี 14 สายพันธุ์จะถูกตรวจสอบ
 โดยวิธี MicroScan panels และ 20 สายพันธุ์ จะตรวจสอบโดยวิธี AMS-Vitek card
 ซึ่งทุกสายพันธุ์จะไม่มีการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ด้วย

Wiley และคณะ (Wiley and others 1993) ได้นำ enterococci จำนวน
 374 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจมาทำการจำแนกและทดสอบความไวต่อ
 vancomycin ในการศึกษาได้มีการนำ vitek system มาใช้ในการจำแนกชนิดของ
 enterococci และการทดสอบความไวต่อ vancomycin โดยใช้ software

version 7.1 ร่วมกับการใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งในการจำแนกชนิดของเชื้อ จะใช้วิธีทางชีวเคมี และการตรวจสอบความไวต่อ vancomycin ของเชื้อจะใช้วิธี agar dilution ซึ่งจะให้ผลดังต่อไปนี้ (แสดงเป็นตัวเลขของเชื้อที่คล่อต่อ vancomycin/ จำนวนในแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ) พบ *Enterococcus faecium* 213/234, *E. faecalis* 9/112, *E. mundtii* 2/3, *E. durans* 0/1, *E. hirae* 0/1, *E. raffinosus* 0/1 และ *E. avium* 0/1 และพบ enterococci 10 ชนิดที่ vancomycin ขึ้นยั้งได้ในระดับปานกลาง ได้แก่ *E. faecium* 1 สายพันธุ์ *E. faecalis* 1 สายพันธุ์ *E. gallinarum* 6 สายพันธุ์ และ *E. casseliflavus* 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบโดยใช้ Vitek GPI card จะให้ผลในการจำแนก *E. faecium* ได้ถูกต้อง 98 เปอร์เซ็นต์ *E. faecalis* ถูกต้อง 99 เปอร์เซ็นต์ และมี enterococci 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้เป็นชนิดอื่น ๆ ส่วนวิธี GPS-TA card จะให้ผล ความไวในการวิเคราะห์ที่เชื้อมากถึง 98 เปอร์เซ็นต์ และมีความเฉพาะในการตรวจสอบการคล่อต่อ vancomycin ของเชื้อได้มากถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Chow และคณะ (Chow and others 1993) ได้ศึกษา DNA ของ *Enterococcus faecium* ที่คล่อต่อ vancomycin จำนวน 38 สายพันธุ์ซึ่ง แยกได้จาก 5 โรงพยาบาลใน 3 รัฐ ของประเทศสหรัฐอเมริกา คือ จากเมืองดีคาวิก รัฐอิลลินอยส์ เมืองดีการกอส รัฐมิชิแกน และเมืองดีกส์เบิร์ก รัฐเพนซิลวาเนีย โดย การแยกด้วย contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis และการวิเคราะห์หาลำดับ พบว่า มี 22 สายพันธุ์ โดย 1 สายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในผู้ป่วย จาก 3 โรงพยาบาลใน 2 รัฐ ซึ่งผลการทดลองนี้ได้สนับสนุนว่ามีลักษณะการคล่อต่อ vancomycin ของ *E. faecium* ได้กระจายอยู่ทั่วไป ภายในโรงพยาบาลและระหว่าง โรงพยาบาล

Boyle และคณะ (Boyle and others 1993) ได้รายงานการระบาดและ ลักษณะ genotype ของ vancomycin-resistant enterococci (VRE) ที่ระบาด ในโรงพยาบาล โดยพบ VRE จำนวน 213 รายจากผู้ป่วย 2,812 รายภายใน 36 เดือน ในปี ค.ศ. 1990 พบ *Enterococcus faecium* ที่ไวต่อ vancomycin ในอัตรา

ประมาณ 85.7 เปอร์เซ็นต์ ในปี ค.ศ. 1991 อัตราของ *E. faecium* ที่ไวต่อ vancomycin ในอัตรา 61.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปี ค.ศ. 1992 อัตราของ *E. faecium* ที่ไวต่อ vancomycin ลดลงประมาณ 28.8 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าการต่อต้าน vancomycin เพิ่มขึ้น ส่วน *E. faecalis* ที่ไวต่อ vancomycin พบในอัตรา 97 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่าง 115 สายพันธุ์มาทดสอบโดยใช้ MicroScan MIC Combo-6 panels ร่วมกับวิธี agar dilution พบว่าสามารถแบ่งการต่อต้าน vancomycin ได้เป็นระดับต่าง ๆ คือ ระดับสูง ประมาณ 92.8 เปอร์เซ็นต์ ระดับปานกลาง 4.3 เปอร์เซ็นต์ และระดับต่ำ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลักษณะ genotype ของ VRE จำนวน 32 สายพันธุ์ ได้นำมาทดสอบโดยวิธี field-inversion gel electrophoresis พบรูปแบบของ restriction endonuclease ที่ต่าง ๆ กัน 19 รูปแบบ และใน 9 รูปแบบจะมีความสัมพันธ์กับ quinolone ร่วมกับ French และคณะ (French and others 1993) ได้ศึกษาลักษณะของ *Enterococcus faecium* ที่ดื้อ vancomycin และ ampicillin จำนวน 60 สายพันธุ์ และได้วัดค่าความไวของ novobiocin ในการเพาะเลี้ยงเชื้อใน Mueller-Hinton broth พบว่าทั้ง 60 สายพันธุ์ถูกยับยั้งด้วย novobiocin ที่ความเข้มข้น $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ และ 40 สายพันธุ์จะถูกยับยั้งด้วย novobiocin ที่ความเข้มข้น $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ ค่า MIC มีค่า 8-16 เท่า ที่สูงกว่าใน 50% serum ต่อมาเมื่อศึกษาถึง killing reaction ของ novobiocin สามารถฆ่าเชื้อได้ 2-log unit ในเวลา 24 ชั่วโมง การใช้สารร่วมกันของ novobiocin และ fluoroquinolone พบว่าสารทั้งสองชนิดจะมีฤทธิ์เสริมกันในการฆ่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไวต่อ quinolone ทั้งใน broth หรือ 50% serum ส่วน gentamicin และ novobiocin จะไม่มีฤทธิ์เสริมต่อกัน แต่ rifampin และ doxycycline จะมีฤทธิ์ต้านกัน

Landman และคณะ (Landman and others 1993) ได้ศึกษา enterococci ที่เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล พบว่า enterococci ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันในโรงพยาบาลจะมีมากขึ้น โรคแรกพบจากหลักฐานของการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *Enterococcus faecium* ที่มีการดื้อต่อ ampicillin, vancomycin และ gentamicin ในระดับ

สูง ยังไม่มีวิธีที่เฉพาะสมในการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจาก enterococci ที่ดื้อต่อยา โดยจะศึกษาถึงเวลาที่ใช้ในการฆ่า ซึ่งจะทดสอบกับยาปฏิชีวนะ ที่ได้ผลหลาย ๆ ชนิดร่วมกัน กับ enterococci ที่ดื้อต่อยาหลาย ๆ ชนิด จำนวน 15 สายพันธุ์ ไม่มีชนิดที่ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้เดี่ยว ๆ แต่การใช้ ampicillin ร่วมกับ ciprofloxacin จะใช้ทำลายแบคทีเรียได้ 12 สายพันธุ์ โดย ciprofloxacin มีค่า MIC \leq 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ส่วนการใช้ ciprofloxacin ร่วมกับ novobiocin จะมีผลต่อสายพันธุ์เหล่านี้ด้วย แต่การไม่ใช้ยาร่วมกันก็สามารถทำลาย enterococci ได้ 3 สายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อ ciprofloxacin ระดับสูง จากการใช้ยาร่วมกันนั้นพบว่า จะมีความสำคัญต่อการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงดื้อต่อยาในอนาคตด้วย

Gold และคณะ (Gold and others 1992) ได้ศึกษาขึ้นที่มีขนาดความยาว 620 bp ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการดื้อต่อ vancomycin ในระดับสูงของ *Enterococcus faecalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และ *E. faecalis* ซึ่งคงมีความไวต่อ teicoplanin ซึ่งขึ้นกับความคล้ายคลึงกับส่วนของ *van B* และบางส่วนเหมือนกัน *van A* แต่เหนือกับ *van C* เล็กน้อย การพิสูจน์ DNA ได้มาจากการสังเคราะห์จากปฏิกิริยา polymerase chain reaction-amplified gene fragment โดยการใช้ไพรเมอร์กับ DNA ที่จำเพาะต่อ *E. faecium* และ *E. faecalis* มาทำ genomic DNA ของทั้งสองเชื้อจะมีการดื้อต่อ vancomycin (MIC 8-512 $\mu\text{g}/\text{ml}$) แต่จะไวต่อ teicoplanin เมื่อมีการทำให้เสียสมบัติของการดื้อต่อ vancomycin ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับ gene probe โดยไม่สามารถจะไฮบริดได้กับ DNA ของเชื้อนี้ได้ การที่ DNA มีการไฮบริดได้กับ probe นี้จะเป็นการถ่ายทอดลักษณะการดื้อต่อ vancomycin ไปสู่สายพันธุ์ที่ไวต่อการรับ ซึ่งการสูญเสียสมบัติหรือการถ่ายทอดลักษณะการดื้อต่อ vancomycin จะเกี่ยวข้องกับการสูญเสียหรือการมีของผลารวม

Lavoie และคณะ (Lavoie and others 1993) ได้ศึกษาการเพิ่มของ enterococci การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ β -lactamase และการเกิดการดื้อต่อ aminoglycoside ผู้เขียนทำให้มีความยุ่งยากในการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจาก enterococci ซึ่งมีความซับซ้อนในการ

รักษาโรคที่รุนแรงโดยการให้ยาร่วมกัน โดยทดสอบกับกระด้างที่เป็นโรค aortic valve endocarditis ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของยาหลาย ๆ ชนิดทั้งแบบที่ใช้เดี่ยวและร่วมกันกับการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *Enterococcus faecalis* ที่ลื้อต่อยาหลาย ๆ ชนิด ในกระด้างตัวเม็ยพันธุ์ New zealand white โดยนำมาทำให้มีการติดเชื้อ *E. faecalis* ที่สร้าง β -lactamase และลื้อต่อ gentamicin หรือเชื้อที่ไม่มีการผลิต เอนไซม์ β -lactamase สายพันธุ์ที่ไวต่อ aminoglycoside ซึ่งมีการลื้อเชื้อเข้าไปประมาณ ค่า mean \log_{10} CFU/g ของ vegetation จะถูกนำมาทดสอบ พบว่าการใช้ยาที่ดีที่สุดคือ การใช้ ampicillin-sulbactam ปริมาณยา 200 mg/kg น้ำหนักของร่างกาย ต่อวัน, ampicillin-sulbactam ปริมาณสูง 400 mg/kg น้ำหนักของร่างกายต่อวัน และ vancomycin 150 mg/kg น้ำหนักของร่างกายต่อวัน ซึ่งได้ผลการทดลองที่เขียนเป็น 2.27, 2.76 และ 2.87 \log_{10} CFU/g ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกันกับสายพันธุ์ที่ใช้ ampicillin-sulbactam และ vancomycin เพียงอย่างเดียวได้เท่ากับในอัตราที่ลดลงของแบคทีเรียใน vegetation การเพิ่ม gentamicin จะไม่มีผลต่ออัตราการตายในกระด้างที่ถูกลื้อด้วยเชื้อที่ลื้อต่อ aminoglycoside ในแต่ละสายจะรักษาติดต่อกันใน 3 หรือ 7 วัน โดยจะไม่มีการใช้ gentamicin ร่วมด้วยโดยการให้ยาโรคในกระด้างที่ถูกลื้อด้วยเชื้อสายพันธุ์ที่ลื้อต่อ aminoglycoside

Clark และคณะ (Clark and others 1992) ได้วิเคราะห์ enterococci ที่ยกลักษณะการลื้อต่อ glycopeptide จำนวน 105 สายพันธุ์ จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากโรงพยาบาล 21 แห่งใน 14 รัฐของประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 1988 ถึงเดือนกรกฎาคม ค.ศ. 1990 ซึ่งมี *Enterococcus faecium* 82 สายพันธุ์, *E. faecalis* 8 สายพันธุ์, *E. gallinarum* 3 สายพันธุ์, *E. casseliflavus* 3 สายพันธุ์, *E. raffinosus* 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* spp. 6 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ทั้งหมดจะลื้อเข้ากลุ่มตามลักษณะการลื้อต่อ glycopeptide โดยอาศัยค่า MIC (i) 70 Van A (Vm) MIC \geq 64 μ g/ml : Teico [Tei] MIC 16- \geq 128 μ g/ml (ii) 20 Van B (Vm) MIC, 16-1024 μ g/ml : Tei MIC \leq 2 μ g/ml (iii) 3 Van C (Vm) MIC, 4-16 μ g/ml : Tei MIC, \leq 2 μ g/ml

ใน *E. gallinarum* และ (iv) *E. casseliflavus* 3 สายพันธุ์ *E. raffinosus* 1 สายพันธุ์ ค่า MIC 4-16 $\mu\text{g/ml}$: Tei MIC $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ซึ่ง 101 สายพันธุ์ จะมีลักษณะ Van A 1030 bp , Van B 433 bp , Van C 796 bp และ 99 สายพันธุ์ จะถูกทดสอบด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อยืนยันผล และเมื่อทำปฏิกิริยาได้กับ gene probe Van A gene จะพบใน *E. raffinosus* ที่มีค่า Van MIC 16 $\mu\text{g/ml}$ และ Tei MIC 1 $\mu\text{g/ml}$ โดย Van A gene จะอยู่ที่ตำแหน่ง 34- หรือ 60-kb plasmid การตรวจสอบด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis จะแสดงความเหมือนของ enterococci ในโรงพยาบาลและระหว่างโรงพยาบาลในสหรัฐอเมริกาด้วยกลายวิเคราะห์จากผลสำเนา

Montecalvo และคณะ (Montecalvo and others 1994) ได้ศึกษาถึงระบาดวิทยาของโรคโลหิตเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Enterococcus faecium* ที่ดื้อต่อ vancomycin (MIC $\geq 256 \mu\text{g/ml}$), ampicillin (MIC $\geq 64 \mu\text{g/ml}$) และ gentamicin หรือ streptomycin (MIC $\geq 2000 \mu\text{g/ml}$) ในระดับสูงจากผู้ป่วย ในเดือนมิถุนายน ค.ศ.1991 ถึงเดือนพฤษภาคม ค.ศ.1992 โดยเริ่มมีการพบเชื้อจากการเพาะเชื้อจากอุจจาระและรอบกวารหนัก ตั้งแต่เดือนกันยายน ค.ศ.1991 ระหว่างเดือนมิถุนายน ค.ศ. 1991 และพฤษภาคม ค.ศ.1992 จะพบเชื้อในอุจจาระจากผู้ป่วย 7 รายที่เป็นโรคโลหิตเป็นพิษ และ 22 รายเป็นเฉพาะสองเชื้อนี้ จากการทดสอบหา van A gene โดยใช้ PCR และ gene probe พบว่าทุกสายพันธุ์มี gene van A ผู้ป่วยโรคโลหิตเป็นพิษทั้งหมดจะพบ *E. faecium* ในอุจจาระและรอบกวารหนัก โดยการทดสอบแยกจากอุจจาระซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการแยกจากเลือดและตรวจสอบโดยวิธี pulsed-field gel electrophoresis ผลการใช้ยาของ ampicillin และ aminoglycoside จะใช้ไม่ได้ผลในผู้ป่วย 4 ราย จากการทำ blood culture ผู้ป่วย 5 ราย (71 เปอร์เซ็นต์) จะให้ผลลบกับการทำ blood culture และในผู้ป่วยนี้ 4 รายจะเสียชีวิต จากการหา multiple logistic regression analysis พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมากที่สุดกับอัตราการเสียชีวิตเพิ่มขึ้นในแต่ละวัน จากผู้ป่วยที่เป็นโรคโลหิตเป็นพิษกับผู้ป่วยที่เป็นเฉพาะ (P=0.013) การที่มี *E. faecium* ที่ดื้อต่อ

vancomycin ampicillin และ aminoglycoside ในระดับสูงมาก จึงจำเป็นที่ต้อง
เน้นถึงความสำคัญในการทดสอบความไวทุกสายพันธุ์ของเชื้อในผู้ป่วย นอกจากนี้การใช้
ยาระยะเวลานานจะทำให้ผู้ป่วยมีเชื้อในทางเดินอาหารพัฒนาไปเป็นโรคลิเทียมเป็นพิษได้ด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. สิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจที่นำมาศึกษาได้แก่ ป้ายฉลากคอกหนอง ปัสสาวะ เสมหะ ป้ายมดลูก และบาดแผลต่าง ๆ เป็นต้น วัตถุประสงค์จากผู้ป่วยโรงพยาบาลชลบุรี และโรงพยาบาลสมเด็จพระราชาธิบดี จังหวัดชลบุรี จำนวน 217 ตัวอย่าง ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างรวมเป็นเวลา ๓ เดือน เริ่มตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2536 ถึง เดือนพฤษภาคม 2537

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการแยกเชื้อแบคทีเรีย

2.1.1 Blood agar

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับตรวจทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

2.2.1 Pigment medium

2.2.2 Sodium hippurate broth

2.2.3 Bile esculin agar

2.2.4 Blood agar

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อ

2.3.1 Stock culture medium

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบ Lancefield precipitation

2.4.1 Todd-Hewitt broth

2.4.2 Neopeptone

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับตรวจทดสอบความไวต่อธาตุกำมะถัน

2.5.1 Tryptic soy broth (TSB)

2.5.2 Mueller-Hinton blood agar

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการจำแนกชนิดของ group D streptococci

2.6.1 Mannitol

2.6.2 Lactose

2.6.3 Sorbitol

3. สารเคมี

3.1 6.5% NaCl

3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์

3.3 0.85% NaCl

4. Antiserum

Antiserum ต่อเชื้อ group A, B, C, D และ G streptococci ผลิตจากบริษัท Difco (Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA)

5. สารต้านจุลชีพ

5.1 สารต้านจุลชีพที่ใช้มี 12 ชนิด ได้แก่

5.1.1	Ampicillin	ความเข้มข้น	10	ไมโครกรัม
5.1.2	Bacitracin	ความเข้มข้น	0.40	ไมโครกรัม
5.1.3	Cefotaxime	ความเข้มข้น	30	ไมโครกรัม
5.1.4	Cefuroxime	ความเข้มข้น	30	ไมโครกรัม
5.1.5	Cephalothin	ความเข้มข้น	30	ไมโครกรัม
5.1.6	Chloramphenicol	ความเข้มข้น	30	ไมโครกรัม
5.1.7	Ciprofloxacin	ความเข้มข้น	5	ไมโครกรัม
5.1.8	Erythromycin	ความเข้มข้น	15	ไมโครกรัม
5.1.9	Gentamicin	ความเข้มข้น	10	ไมโครกรัม
5.1.10	Penicillin G	ความเข้มข้น	10	ไมโครกรัม
5.1.11	Trimethoprim- sulfamethoxazole	ความเข้มข้น	1.25	ไมโครกรัม
5.1.12	Vancomycin	ความเข้มข้น	30	ไมโครกรัม

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

นำสิ่งส่งตรวจมาเพาะเลี้ยงเชื้อบน blood agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใน candle jar นาน 18 - 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีของ streptococci ที่มีลักษณะกลมขนาดเล็ก และสังเกตลักษณะ hemolysis นานาข้อม สีแกม เล็กเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง เรียงต่อกันเป็นสาย แล้วนำไปทดสอบ เอนไซม์คตะเลส สำหรับ streptococci ให้ผลลบ และนำไปทดสอบต่อไป

2. การทดสอบทางชีวเคมี

นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาทดสอบวิธีทางชีวเคมี เพื่อจำแนก group ด้วยการทำสอบ bacitracin susceptibility test, hippurate hydrolysis test, pigment production test, bile esculin test และ 6.5% NaCl tolerance test โดย group D streptococci ให้ผลบวกกับการทดสอบ bile esculin test ส่วน streptococci group อื่น ๆ จะให้ผลลบ สำหรับการจำแนกเป็น enterococci และ non-enterococci จะอาศัยการทดสอบ 6.5% NaCl tolerance test โดย enterococci ให้ผลบวก และ non-enterococci ให้ผลลบ

2.1 การทดสอบ bacitracin susceptibility test

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบ streak เป็น 2 ขีดบน blood agar ใส่ bacitracin disk วางลงบนรอย streak นี้อย่างละ 1 เพื่อให้เห็นขนาดยับยั้งการ เติบโต บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ใน candle jar แล้วนำมาอ่านผลถ้าให้ผลบวก มี inhibition zone รอบแผ่นยา

2.2 การทดสอบ hippurate hydrolysis test

stab เชื้อที่ต้องการทดสอบใน sodium hippurate medium โดยใส่เชื้อ จำนวนมาก เหย้าให้เชื้อกระจายและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ 5,000 รอบ/นาที แล้วดูดส่วนใส 0.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อหยด ferric chloride reagent 0.2 มิลลิลิตร ทั้ง 2 ข้างพบการเกิดตะกอนชั้นสีแดงขาว เกิดผลบวก

2.3 การทดสอบการสร้างรงควัตถุ (pigment production test)

stab เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ pigment medium บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล โดยผลบวกเกิดรงควัตถุสีแดงเกิดขึ้นในบริเวณที่ใส่เชื้อ

2.4 การทดสอบ bile esculin test

stab เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ bile esculin medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล โดยผลบวกเกิดสีน้ำตาลบริเวณที่ใส่เชื้อลงไปหรือทั้งหลอด

2.5 การทดสอบ 6.5% NaCl tolerance test

stab เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน 6.5% NaCl บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล โดยผลบวกจะมีเชื้อเจริญทำให้อาหารขุ่นและ เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเหลือง สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีของ streptococci แสดงได้ถึง ตารางที่ ๖

ตารางที่ ๖ แสดงการทดสอบทางชีวเคมีของ group D streptococci

การทดสอบทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Bacitracin susceptibility test	-
Hippurate hydrolysis test	-
Pigment production test	-
Bile esculin test	+
6.5% NaCl tolerance test	±

ปช
ศ 8950
2537
น.5

00140

3. การทดสอบโดยวิธี Lancefield precipitation

3.1 การเตรียมแอนติเจนโดย extract ด้วยวิธีใช้หม้อหุงความดัน (autoclave)
(Balows and others 1991)

3.1.1 นำโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยงใน Todd-Hewitt broth
บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.1.2 นำ broth ที่มีเชื้อเจริญมาปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่มีความเร็ว
5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำส่วนที่ตกและนำ pellet ล้างด้วย
0.85% NaCl 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายนำ pellet cell มาละลายด้วย 0.5
มิลลิลิตร ของ 0.85% NaCl

3.1.3 นำเซลล์ที่ได้มาสกัดแอนติเจนโดยวิธีใช้หม้อหุงความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น ปั่นด้วยเครื่อง
centrifuge ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที

3.1.4 นำส่วนที่สกัดด้วย specific antiserum group A,B,C,D และ G
streptococci ด้วย capillary precipitation test

3.2 การทดสอบโดยวิธี capillary precipitation

3.2.1 นำ capillary tube รุ่มใน specific antiserum group D ให้มีความ
สูง 1 เซนติเมตร แล้วล้างความสะอาดเพื่อไม่ให้มี antiserum ที่ติดค้าง
capillary tube แล้วนำไปรุ่มลงในส่วนที่สกัดของ extracted antigen
ในข้อ 3.1 ให้มีความสูง 1 เซนติเมตรเช่นกันและนำ capillary tube ปิด
บนลิ้นน้ำมัน สังเกตการเกิดปฏิกิริยา นาน 10 - 30 นาที โดยปฏิกิริยาจะเกิดที่
รอยต่อระหว่าง antiserum และ extracted antigen

3.2.2 ส่วนผลในหลอดคำภาสในเวลา 30 นาที ถ้าให้ผลบวกจะเกิดแถบสีดาวซ้อน
บริเวณรอยต่อระหว่าง antiserum และ extracted antigen ดังภาพที่ 1
ในภาคผนวก ง

สำหรับการทดสอบ antigen ของ group A,B,C,D และ G ก็ใช้วิธีเดียวกัน แต่ใช้
specific antiserum เฉพาะกลุ่ม

4. การทดสอบจำแนกชนิดของ group D streptococci

โดยการทดสอบ mannitol, sorbitol และ lactose

stab เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยผลบวกเกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ที่อยู่ในอาหารจากสีแดงเป็น สีเหลือง หรือเกิดผลผลิตเป็นกรดและแก๊ส โดยแก๊สดูได้จากรอยแตกหรือฟองแก๊สตามรอย แทงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ

5.1 การเตรียม streptococci suspension (Koneman and others 1988)

5.1.1 นำ streptococci มาเพาะเลี้ยงใน tryptic soy broth บ่มเชื้อที่

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 - 5 ชั่วโมง

5.1.2 นำไปเปรียบเทียบกับความเข้มข้น McFarland No. 0.5 และปรับให้มีความเข้มข้น

ใกล้เคียงกันมากที่สุดด้วย broth หรือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

5.2 วิธีทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี Kirby - Bauer (Koneman and others 1988)

นำ sterile swab ชุบใน tryptic soy broth จากข้อ 5.1 ไปเกลี่ย

บน blood agar 3 ระบายแล้วตั้งทิ้งไว้ นาน 3-5 นาที นำแผ่น disk ยาต้านจุลชีพที่มี

ความเข้มข้นมาตรฐานวางบนรอย streak นี้ ๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

นาน 24 ชั่วโมง ใน candle jar แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition

zone โดยใช้หน่วยเป็นมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังตารางที่ 15 ในภาคผนวก ง

การควบคุมคุณภาพ

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ จะต้องมีการควบคุมคุณภาพในการ

ทดสอบทุกครั้งโดยใช้เชื้อมาตรฐาน (reference strain) ซึ่งการทดสอบนี้ใช้

Staphylococcus aureus ATCC 25923 ซึ่งทราบขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของ

inhibition zone ของยาแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ดังตารางที่ 15 ใน

ภาคผนวก ง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการนำสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ ได้แก่ บาดแผล ป้ายลำคอ ป้ายมดลูก หนอง
เส้มหะ และ ปัสสาวะ เป็นต้น ซึ่งได้จากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลชลบุรี และโรงพยาบาล
สมเด็จพระศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 317 ตัวอย่างมาทดสอบโดยวิธีต่าง ๆ จะได้ผล
การทดลองดังนี้

1. การทดสอบทางชีวเคมีขั้นแรกเพื่อใช้จำแนก group D streptococci

จากการศึกษาปฏิบัติการของ streptococci ที่จำแนกได้จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ
จากผู้ป่วย 317 ราย มาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อใช้จำแนก group D streptococci
ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การทดสอบทางชีวเคมีขั้นแรกเพื่อใช้จำแนก group D streptococci

การทดสอบ	Group D streptococci
Catalase	-
Hemolysis on blood agar	X
Bile esculin	+
6.5% NaCl	±

หมายเหตุ X คือ ไม่เกิด hemolysis

2. การทดสอบด้วยวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl

จากการศึกษาปฏิบัติการของ streptococci ที่จำแนกได้จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ จากผู้ป่วย 317 ราย ด้วยวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 Group D streptococci จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ โดยทำการทดสอบด้วยวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl

ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	จำนวน สิ่งส่งตรวจ	Streptococci			% Group D จาก ตัวอย่างทั้งหมด	
		Group D		Nongroup D	Enterococci	Non-enterococci
		Enterococci	Non-enterococci			
ปัสสาวะ	287	27	4	2	8.52	1.26
ปัสสาวะคอก	11	-	-	10	-	-
ปัสสาวะจากมดลูก	8	-	-	-	-	-
เสมหะ	7	-	-	1	-	-
หนอง	6	-	-	-	-	-
รวม	317	27	4	13	8.52	1.26

จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 317 ตัวอย่าง เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl พบ streptococci 44 สายพันธุ์ และพบ group D streptococci 31 สายพันธุ์ และ nongroup D streptococci 13 สายพันธุ์

3. การทดสอบโดยวิธี Lancefield precipitation

เมื่อนำ streptococci ที่จำแนกได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Lancefield precipitation ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 Group D streptococci จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ โดยนำมาทดสอบด้วยวิธี Lancefield precipitation

ชนิดของ สิ่งส่งตรวจ	จำนวน สิ่งส่งตรวจ	Streptococci		% Group D จากตัวอย่างทั้งหมด		
		Group D		Nongroup D		
		Entero- cocci	Non-entero- cocci	Entero- cocci	Non-entero- cocci	
ปัสสาวะ	287	12	-	1	3.78	-
ป้ายลำคอ	11	-	-	6	-	-
ป้ายจากมดลูก	6	-	-	-	-	-
เสมหะ	7	-	-	1	-	-
หนอง	6	-	-	-	-	-
รวม	317	12	-	8	3.78	-

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่า เมื่อนำ streptococci ที่จำแนกได้ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Lancefield precipitation พบ group D streptococci 12 สายพันธุ์ nongroup D streptococci 8 สายพันธุ์

4. การเปรียบเทียบวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl กับวิธี Lancefield precipitation

เมื่อนำ group D streptococci ที่ได้โดยวิธีทางชีวเคมี มาเปรียบเทียบกับวิธี Lancefield precipitation ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการทดสอบ group D streptococci โดยการทดสอบ bile esculin และ 6.5% NaCl กับวิธี Lancefield precipitation

Streptococci	Lancefield precipitation test	Bile esculin			% Agreement
		จำนวนถูกต้อง	ผลบวกปลอม	ผลลบปลอม	
Group D	12	31	19	-	38.71
Nongroup D	8	13	3	-	61.53

จากตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่า การทดสอบ bile esculin โดยการทดสอบ bile esculin กับวิธี Lancefield precipitation ในการจำแนก group D streptococci ที่ถูกต้องคิดเป็น 38.71 เปอร์เซ็นต์ และการจำแนก nongroup D streptococci ให้ผลถูกต้องคิดเป็น 61.53 เปอร์เซ็นต์

5. การเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี bile esculin และ 6.5%

NaCl

จากการทดสอบการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี bile esculin และ 6.5% NaCl กับวิธี Lancefield precipitation ของ group D streptococci ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี bile esculin และ 6.5%

NaCl กับวิธี Lancefield precipitation ของ group D streptococci

การทดสอบ		Lancefield precipitation		รวม
		Positive	Negative	
Bile esculin	Positive	12	19	31
	Negative	0	8	8
รวม		12	27	39

ความไว = $12/12 \times 100 = 100$

ความจำเพาะ = $8/27 \times 100 = 29.6\%$

ผลบวกปลอม = $19/27 \times 100 = 70.3\%$

ผลลบปลอม = $0/12 \times 100 = 0$

จากตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าการทดสอบด้วย bile esculin และ 6.5% NaCl เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Lancefield precipitation ของ group D streptococci พบว่า มีความไวเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ความจำเพาะเท่ากับ 29.63 เปอร์เซ็นต์ ผลบวกปลอม 70.37 เปอร์เซ็นต์ และ ผลลบปลอม 0 เปอร์เซ็นต์

6. การทดสอบจำแนกชนิดของ group D streptococci

เมื่อนำ group D streptococci ทำการจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวเคมี ดังแสดงในตารางที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง 13 ในภาคผนวก ก

ตารางที่ 11 การจำแนกชนิดของ group D streptococci จำนวน 12 สายพันธุ์ โดยวิธีทางชีวเคมี

การทดสอบทางชีวเคมี	Group D streptococci
Bile esculin	+
6.5% NaCl	+
Sorbitol	+
Mannitol	+
Lactose	+

จากตารางที่ 11 เมื่อนำ group D streptococci จำนวน 12 สายพันธุ์ มาจำแนกชนิด โดยทำการทดสอบทางชีวเคมี พบว่า group D streptococci ทั้ง 12 สายพันธุ์ เป็น *E. faecalis* ทั้งหมด

จากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด ดังตารางที่ 12 พบว่า group D streptococci จะไวต่อยา ampicillin และ penicillin มากที่สุด แต่เกือบทั้งหมดจะมีความไวต่อยา vancomycin มากที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาลักษณะการสังเคราะห์ของ group D streptococci และชนิดของ group D streptococci ที่เกิดขึ้นในจังหวัดชลบุรี
2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการทดสอบ group D streptococci โดยวิธีทางชีวเคมี ร่วมกับวิธี Lancefield precipitation
3. เพื่อศึกษาลักษณะชนิดของ group D streptococci
4. เพื่อศึกษาลักษณะความไวต่อสาร group D streptococci ต่อธาตุต้านจุลชีพ จำนวน 11 ชนิด

ชนิด

วิธีดำเนินการทดลอง

1. สิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เสมหะ หนองแผล ป้ายลำคอ ป้ายมดลูก หนอง และใส่สำมะโน ที่เก็บจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชลบุรี และโรงพยาบาลสมเด็จพระเจ้าตากสินมหาราช จังหวัดชลบุรี

2. วิธีดำเนินการทดลอง

นำสิ่งส่งตรวจที่ได้มาจำแนกเชื้อให้บริสุทธิ์ แล้วทดสอบทางชีวเคมีกับ bile esculin 6.5% NaCl และวิธี Lancefield precipitation เพื่อใช้ในการจำแนก group D streptococci จากนั้นจำแนกชนิดของ group D streptococci แล้วนำเชื้อที่ได้มาทดสอบแบบแผนความไวต่อธาตุต้านจุลชีพ 11 ชนิด

สรุปผลการทดลอง

จากการนำสิ่งส่งตรวจชนิดมาแยกเชื้อ GDS โดยวิธีมาตรฐาน พบ 12 สายพันธุ์ จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 317 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากปัสสาวะทั้งหมดคิดเป็น 3.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบการพิสูจน์เชื้อ GDS โดยวิธีทางชีวเคมี คือ การทดสอบ bile esculin พบ GDS จำนวน 31 สายพันธุ์ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation พบผลบวกจริงเพียง 12 สายพันธุ์ และเกิดผลบวกปลอมถึง 19 สายพันธุ์ สามารถสรุปได้ว่า วิธี bile esculin มีค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ 29.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งถือได้ว่าวิธีการนี้มีความถูกต้องปานกลาง จึงควรระมัดระวังในการนำวิธีนี้มาใช้ในทางปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อที่ได้มาจากรหัสชนิดโดยวิธีทางชีวเคมีทั้ง 12 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *E. faecalis* ทั้งหมด และเมื่อนำมาทดสอบแบบแผนความไวต่อสารต้านจุลชีพ 11 ชนิด พบว่า GDS จะต่อต้าน ampicillin และ penicillin แต่เกือบทั้งหมดจะมีความไวต่อ vancomycin

อภิปรายผลการทดลอง

1. การพิสูจน์เชื้อ GDS ด้วยวิธีทางชีวเคมีและวิธี Lancefield precipitation

จากการจำแนก streptococci จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด 317 ตัวอย่าง พบ streptococci ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ (13.88 เปอร์เซ็นต์) จำแนกเป็น GDS 31 สายพันธุ์ (9.78 เปอร์เซ็นต์) และ non GDS 13 สายพันธุ์ ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Soyletir และ Ener (Soyletir and Ener 1989) ที่ได้จำแนก beta hemolytic streptococci จากสิ่งส่งตรวจ โดยพบ GDS มากที่สุดจากปัสสาวะ (73.7 เปอร์เซ็นต์) และ GAS มากที่สุดจากจ้ำคอ (71.9 เปอร์เซ็นต์) และพบ GBS จากปัสสาวะ (21.1 เปอร์เซ็นต์) และสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ๆ (22.7 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งจากการทดลองนี้พบ GDS จากสิ่งส่งตรวจประเภทปัสสาวะทั้งหมด ล้วนเนื่องมาจากเชื้อในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ (Collee and others 1989) และเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะด้วย (Louie and others 1992)

ในปัจจุบันนี้พบว่าได้มีการนำยาต้านจุลชีพมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในช่องว่าง โดยมี การนำ ampicillin และ amoxyicillin มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ และจากการทดลองนี้พบว่า GDS ทุกสายพันธุ์จะดื้อต่อ ampicillin ดังนั้นควรระมัดระวังในการเลือกใช้ยาในกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเก็บสิ่งส่งตรวจประเภทปัสสาวะคือ เมื่อเก็บสิ่งส่งตรวจแล้วควรส่งห้องปฏิบัติการทันที และควรทำภายในช่วงเวลาไม่เกิน 1-2 ชั่วโมงหลังการเก็บแต่ถ้าหากนานเกิน 2 ชั่วโมงจะแก้ไขโดยอาจเก็บสิ่งส่งตรวจไว้ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) ค้างคืนได้ ภาชนะที่ใช้ในการเก็บควรเป็นภาชนะปลอดเชื้อ มีฝาปิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างขนส่ง และนอกจากนี้การเก็บปัสสาวะเพื่อเพาะเชื้อที่มีปัญหา มาก เนื่องจากบริเวณทางเดินปัสสาวะส่วนปลายมีแบคทีเรียประจำถิ่นอาศัยอยู่ หากไม่ทำความสะอาดทางเดินปัสสาวะส่วนปลายให้สะอาดก่อนเก็บ ก็จะทำให้เชื้อเหล่านี้มีโอกาสปนเปื้อนแก่ปัสสาวะที่ต้องการตรวจ ทำให้ไม่สามารถแปลผลการวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (นิพนทนา 2537)

ส่วนการนำ GDS ให้ผลบวกกับการทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด 31 สายพันธุ์ มาทดสอบกับวิธี Lancefield precipitation พบว่าให้ผลบวกกับ antiserum ที่จำเพาะต่อ GDS 12 สายพันธุ์ ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการทดสอบทางชีวเคมีให้ผลบวกปลอมถึง 70.37 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการทดสอบทางชีวเคมีอาจมีข้อผิดพลาดระหว่างการทดสอบได้ อีกทั้งการทดสอบทางชีวเคมีนี้เป็นแนวทางในการจำแนกแบคทีเรียอย่างคร่าว ๆ เท่านั้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงยึดผลตามวิธี Lancefield precipitation เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการจำแนกเชื้อกลุ่ม streptococci ได้ถูกต้องถึง 95-100 เปอร์เซ็นต์ (Koneman and others 1988) อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีนี้ก็ คือ เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก และใช้เวลานานกว่าวิธีอื่น ๆ (Balows and others 1991)

2. การจำแนกชนิดของ group D streptococci

จากการนำ GDS ที่ให้ผลบวกกับวิธี Lancefield precipitation จำนวน 12 สายพันธุ์ มาจำแนกชนิดพบว่า GDS เป็น *E. faecalis* ทั้งหมด สอดคล้องกับรายงานของ Ruoff และคณะ (Ruoff and others 1990) ที่ได้จำแนก streptococci จากสิ่งส่งตรวจ 302 ตัวอย่าง พบ *E. faecalis* 87.1 เปอร์เซ็นต์ *E. faecium* 8.6 เปอร์เซ็นต์ *E. durans* 0.3 เปอร์เซ็นต์ *E. avium* 0.7 เปอร์เซ็นต์ และ *E. gallinarum* 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่า สิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่เมื่อจำแนกแล้วได้ *E. faecalis* ถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ และ *E. faecium* 5-10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *E. avium*, *E. raffinosus* และ *E. casseliflavus* จะพบน้อยมาก (Balows and others 1991) และจากการทดลองนี้พบว่า GDS เป็น *E. faecalis* ทั้งหมด อาจเนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มีถิ่นอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ และทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ซึ่งยาที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะคือ ampicillin และ amoxycillin แต่ในการทดลองนี้พบว่า GDS ต่อดื้อยาต่อ ampicillin และ penicillin จึงทำให้การรักษาใช้ไม่ได้ผล จึงอาจเกิดการระบาดของเชื้อกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้นก็เป็นได้

3. การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ

จากการนำเชื้อที่จำแนกได้ว่าเป็น GDS จำนวน 12 สายพันธุ์ มาทำแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า เชื้อทั้ง 12 สายพันธุ์ จะติดต่อ ampicillin และ penicillin มากที่สุด แต่เกือบทั้งหมดจะไวต่อ vancomycin สอดคล้องกับรายงานของ Louie และคณะ (Louie and others 1992) พบว่า enterococci จะเป็นเชื้อก่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรง และจะติดต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น polymycin, lincosamides, trimethoprim-sulfamethoxazole และ ampicillin ในระดับสูง และจากรายงานของ Landman (Landman and others 1993) พบว่า enterococci ต่อดัง penicillin เช่นเดียวกับกัน โดยจะพบว่ายาในกลุ่ม penicillin เป็นยาที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ยกรวม enterococci ซึ่งจากการทดลองพบว่า GDS ต่อดัง penicillin และ ampicillin ทั้ง 12 สายพันธุ์ โดยกลไกการต่อยามีด้วยกันอยู่ 2 กลไก คือ การทำลายฤทธิ์ของยาด้วยเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา การลดการผ่านเข้าของยา และการเพิ่มปริมาณการผลิตสารและเอนไซม์เพื่อต้านฤทธิ์ยา (Jaketz and others 1991) และจากการทดลองพบว่า การต่อดัง ampicillin และ penicillin ของ *E. faecalis* นี้จะจัดอยู่ในกลไกที่แรก คือ การทำลายฤทธิ์ของยาด้วยเอนไซม์ ซึ่งเนื่องมาจากยาในกลุ่ม penicillin นี้จะมีการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่สามารถย่อยสลายส่วน β -lactam ring ของยาได้ผลิตภัณฑ์ คือ penicilloic acid ที่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ส่วน ampicillin จัดเข้าในกลไกนี้เช่นเดียวกันเนื่องจากเป็นยาในกลุ่ม penicillin ด้วยเพียงแต่มีการเติมในส่วนของ acyl side chain เข้าไปใน 6-APA โดย 6-APA (6-aminopenicillanic acid) นี้จะเป็นโครงสร้างพื้นฐานของยาในกลุ่ม β -lactamthaizolidine แต่ในปัจจุบันนี้ได้มีการใช้ยาต้านจุลชีพ หรือสารยับยั้งอื่นที่ป้องกันการผลิตหรือสามารถจับกับเอนไซม์นี้ได้ อย่างแน่นอนหากจะทำให้เป็นการส่งเสริมให้ยาในกลุ่ม penicillin แสดงฤทธิ์ได้ ตัวอย่างยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ β -lactamase นี้จะให้ร่วมกับ hydrolyzable penicillin เช่น chloramphenicol และตัวอย่างสารที่จับกับเอนไซม์ได้ เช่น cloxacillin, clavulanic acid เป็นต้น (พาลีณ 2532) และจากการทดลองที่พบว่า

GDS เกือบทั้งหมดจะไวต่อ vancomycin ซึ่งโดยส่วนมากแล้ว enterococci จะไวต่อ vancomycin และมีบางสายพันธุ์ที่ไม่แสดง clear zone เกิดขึ้นเลย จึงแสดงให้เห็นว่า น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ของ enterococci จะไวต่อ vancomycin (Balows and others 1991) และนอกจากนี้ตามปกติแล้วเชื้อในกลุ่ม enterococci จะสามารถถูกทำลายได้โดยใช้ยาต้านจุลชีพ 2 ชนิดที่ทำงานแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergism) โดยอาศัยยาในกลุ่ม beta lactam ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycoside ด้วย (มาลิน 2532)

จากข้อมูลในการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการจำแนก GDS ด้วยวิธี bile esculin นั้นมีความถูกต้องปานกลาง ดังนั้นจึงควรมีความระมัดระวังและควรปรับปรุงให้วิธีนี้มีความถูกต้องที่มากขึ้น และหากใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ บางครั้งอาจต้องใช้ยานานกว่าหนึ่งชนิด เช่น ในกรณีที่มีการติดเชื้อหลายชนิด ซึ่งมีความไวต่างกัน หรือในผู้ป่วยอาการหนักที่ไม่รู้แน่ชัดว่าเกิดจากเชื้ออะไร เพื่อป้องกันการดื้อยาหรือลดขนาดของยาเพื่อไม่ให้เกิดพิษซ้ำนั้น ก็ควรใช้ยาร่วมกันในการเสริมฤทธิ์กัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงยาที่สามารถนำมาใช้ร่วมกันในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อกลุ่มนี้ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาถึงปริมาณความเข้มข้นของยาต่ำสุด (Minimal Inhibition Concentration) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่ม GDS เช่น การใช้ penicillin ร่วมกับ aminoglycoside เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชต่อไป
2. ควรศึกษาวิธีการทดสอบอื่น ๆ ที่สามารถให้ผลถูกต้องและรวดเร็ว เช่น coagulatin kit เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บรรณานุกรม

เนืงทททอ รุรพดกษ. การจําแนกแบคทีเรียกลุ่มแอสโตรปัส. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ไอเดียนส์ตีร์,
2537.

มาลีน จุลศิริ. ยาด้านจุลชีพความรู้นิฐานและประยุกต์. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์,
มหาวิทยาลัยมหิดล, 2532.

Balow , A. and others. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed.
Washington D.C., American Society for Microbiology, 1991.

Becton Dickinson and Company. Zone Diameter Interpretive Chart.
U.S.A., 1990.

Bingen , E. and others. Bactericidal activity of vancomycin,
daptomycin, ampicillin and aminoglycosides against
vancomycin-resistant *E. faecium*. J. Antimicrob. Chemother.
26:619-626, 1990.

Boyd , R.F. and H.G. Bryan. Basic Medical Microbiology. 4th ed.
Boston, Little Brown and Company, 1991.

Boyle , J.F. and others. Epidemiologic Analysis and Genotypic
Characterization of a Nosocomial Outbreak of Vancomycin-
Resistant Enterococci. J. of Clin. Microbiol. 31:1280-1285 ,
1994.

Chirurgi , W.A. and others. Ampicillin-Resistant *Enterococcus*
raffinosis Isolated from Human Infection by a Conventional Test
Scheme. J. of Clin. Microbiol. 27:731-734.1991.

Chow , J.W. and others . Clonal Spread of Vancomycin-Resistant
Enterococcus faecium between Patients in Three Hospital in Two-
States. J. of Clin. Microbiol. 31:1009-1011,1993.

Clark , N.C. and others. Characterization of Glycopeptide Enterococci
from U.S. Hospital. J. Antimicrob. Chemother. 37:2311-2317,1993.

- Collee , J.G. and others. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology. 13th ed. Singapore, Longman Singapore Publisher (Pte) Ltd., 1989.
- Facklam , R. R. and M. D. Collins. Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Human Infections by a Conventional Test Scheme. J. of Clin. Microbiol. 27: 731-734, 1983.
- French , Pamela and others. In Vitro Activity of Novobiocin against Multiresistant Strains of *Enterococcus faecium*. J. of Antimicrob. Chemother. 37:2736-2739, 1995.
- Gold , H.S. and others. A Gene Conferring Resistance to Vancomycin but Not Teicoplanin in Isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Demonstrates Homology with vanB, vanA and vanC Genes of Enterococci. J. Antimicrob. Chemother. 37:1604-1609, 1996.
- Green , Michael and others. Recovery of Vancomycin-Resistant Gram-Positive Cocci from Pediatric Liver Transplant Recipients. J. of Clin. Microbiol. 29:2503-2506, 1991.
- Jawetz , Ernest and others. Medical Microbiology. New Jersey, Prentice- Hall International Inc., 1991.
- Jensen , M.M. and D.A. Wright. Introduction to Microbiology for Health Science. 2nd ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1989.
- Joklik , W.K. and others. Minner Microbiology. California, Appleton & Lange, 1988.
- Kaplan , A.H. and others. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. J. of Clin. Microbiol. 26:1216-1218, 1988.

- Ketchum , P.A. Microbiology ; Concepts and Applications. Singapore, John Wiley and Sons, 1988.
- Kingsbury , D.T. and others. Microbiology. Pennsylvania, Harwal Publishing Company, 1990.
- Koneman , E. W. and others. Color Atlas and textbook of diagnostic Microbiology. 3rd ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1988.
- Landman , David and others. Novel Antibiotic Regimens against *Enterococcus faecium* Resistant to Ampicillin, Vancomycin and Gentamicin. J. Antimicrob. Chemother. 27:1904-1908, 1991.
- Lavoie , S.R. and others. Comparison of Ampicillin-Sulbactam with Vancomycin for Treatment of Experimental Endocarditis Due to a β -Lactamase-Producing, Highly Gentamicin-Resistant Isolate of *Enterococcus faecalis*. J. Antimicrob. Chemother. 27:1, 147-1451, 1991
- Louie , M. and others. Susceptibility Testing of Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J. of Clin. Microbiol. 30: 41-45 ,1992.
- Montecalvo , M.A. and others. Outbreak of Vancomycin-, Ampicillin-, and Aminoglycoside-Resistant *Enterococcus faecium* Bacteremia in Adult Oncology Unit. J. Antimicrob. Chemother. 33:1362-1367, 1994.
- Vinrat , Subuntith. Development of Coagglutination Kit for Rapid Serogrouping of Streptococci. Thesis for the Degree of Master of Science (Microbiology), Mahidol University , 1991.
- Patterson , J.E. and others. Epidemiology of an Endemic Strain of β -lactamase-Producing *Enterococcus faecalis* . J. of Clin Microbiol. 29:2513-2516, 1991.

Ruoff , K. L. and others. Species Identities of Enterococcus Isolated from Clinical Specimens. J. of Clin. Microbiol. 28: 435-437, 1990.

Sahn , D.F. and others. Factor Influencing Determination of High-Level Aminoglycoside Resistance in *Enterococcus faecalis* .J. of Clin. Microbiol. 30:41-45,1992.

Sherris , J.C. Medical Microbiology An Introduction to Infection Disease. 2nd ed. Singapore, Elsevier Publishing, 1991.

Soyletir , G and B. Ener. Serotyping of beta hemolytic streptococci and their distribution in clinical specimens. Mikrobiyol Bul. 23:190-198, 1989.

Killey , B.M. and others. Identification and Characterization of Multiple Species of Vancomycin-Resistant Enterococci, Including an Evaluation of Vittek Software Version 7.1. J. of Clin. Microbiol. 31:2777-2779, 1993.

มหาวิทยาลัยบูรพา

ภาคผนวก

Burapha University

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Blood agar (BA) มีสูตรดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.0

นำส่วนผสมทั้งหมด 23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย ผ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมเลือดลงไป อัตราส่วน 8 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี aseptic technique

2. Nutrient agar (NA) มีสูตรดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.4

นำส่วนผสมทั้งหมด 23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย ผ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Pigment medium มีสูตรดังนี้

GC agar base	3.6	กรัม
Proteose peptone	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

pH 7.2 ± 0.2

นำส่วนผสมทั้งหมด 4.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอม
ให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในรูปของ deep medium

4. Bile esculin agar มีสูตรดังนี้

Bacto beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Esculin	1.9	กรัม
Bacto oxgall	10.0	กรัม
Ferric citrate	0.5	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม

pH 6.6 ± 0.2

นำส่วนผสมทั้งหมด 64.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หลอม
ให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
นาน 15 นาที

5. Sodium hippurate มีสูตรดังนี้

Heart infusion broth (Difco)	25.0	กรัม
Sodium hippurate	10.00	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมด 35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หลอม
ให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
นาน 15 นาที

6. 6.54 NaCl มีสูตรดังนี้

Phenol red broth base (Difco)	1.5	กรัม
-------------------------------	-----	------

ประกอไปด้วย

Peptone 140	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Phenol red	0.018	กรัม
Dextrose	0.5	กรัม
Sodium chloride	6.0	กรัม
Beef extract	0.1	กรัม

pH 7.4

นำส่วนผสมทั้งหมด 8.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย นำเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. Todd-Hewitt broth มีสูตรดังนี้

Beef heart infusion	8.1	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Sodium chloride	2.0	กรัม
Disodium phosphate	0.4	กรัม
Sodium carbonate	2.5	กรัม

pH 7.8 ± 0.2

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร หลอมจนละลาย นำเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. Tryptic soy broth มีสูตรดังนี้

Bacto Tryptone	17.50	กรัม
Bacto Soytone	3.00	กรัม
Bacto Dextrose	2.50	กรัม

Dipotassium phosphate	2.50	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม

pH 7.3

นำส่วนผสมทั้งหมด 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร หลอมจนละลาย
ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน
15 นาที

9. Mueller-Hinton Agar มีสูตรดังนี้

Beef infusion	300.00	กรัม
Acid hydrolysate of casein	17.50	กรัม
Strach	1.50	กรัม
Agar	17.50	กรัม

pH 7.3 ± 0.1

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร หลอมจนละลาย ฆ่าเชื้อใน
หม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้ง
ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่นลงไป 7
เปอร์เซ็นต์

10. Stock culture medium มีสูตรดังนี้

Beef heart , infusion form	100.00	กรัม
Proteose peptone	10.00	กรัม
Bacto isoelectric casein	5.00	กรัม
Bacto gelatin	10.00	กรัม
Bacto dextrose	0.50	กรัม
Disodium phosphate	4.00	กรัม
Sodium citrate	3.00	กรัม
Agar	7.50	กรัม

pH 7.0

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร หลอมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่หลอดละ 2 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11. PR Mannitol/ PR Sorbitol/ PR Lactose มีสูตรดังนี้

Phenol red broth base (Difco)	1.60	กรัม
-------------------------------	------	------

ประกอบด้วย

Proteose peptone No.3	17.00	กรัม
-----------------------	-------	------

Bacto-Beef extract	1.00	กรัม
--------------------	------	------

Sodium chloride	5.00	กรัม
-----------------	------	------

Agar	0.5	กรัม
------	-----	------

Mannitol/Sorbitol/Lactose	1.0	กรัม
---------------------------	-----	------

pH 7.4

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลอมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา

ภาคผนวก ๓

Burapha University

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Gram 's crystal violet มีสูตรดังนี้

สารละลาย A

Crystal violet	2	กรัม
Ethyl alcohol (95%)	20	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

นำสารละลาย A และ B ผสมกัน นำไปกรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนออก

ก่อนนำไปใช้

2. Gram 's iodine มีสูตรดังนี้

Iodine	1	กรัม
Potassium iodine	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

3. Gram 's safranin มีสูตรดังนี้

Safranin	10	มิลลิลิตร
(2.5% solution in 95% ethyl alcohol)		
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. Gram 's alcohol มีสูตรดังนี้

Ethyl alcohol	98	มิลลิลิตร
Acetone	2	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองก่อนนำไปใช้

5. Hydrogenperoxide (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์

สำหรับทดสอบเอนไซม์ catalase

6. Ferric chloride reagent มีสูตรดังนี้

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 12 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร เติม 2% aqueous

HCl

(เตรียมโดยใส่ 5.4 มิลลิลิตร Conc.HCl (37%) ในน้ำ 94.6 มิลลิลิตร)

7. McFarland No.0.5 มีสูตรดังนี้

$BaCl_2$ 0.048 M. 0.5 มิลลิลิตร

H_2SO_4 0.26 M. 99.5 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองก่อนนำไปใช้

8. 0.85% NaCl มีสูตรดังนี้

Sodium chloride 0.85 กรัม

น้ำกลั่น 100.00 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ขวดเข้าด้วยกัน ใส่เชื้อในหม้อหนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา

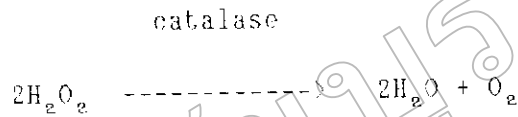
ภาคผนวก ค

Burapha University

การทดสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

หลักการ : เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์ catalase หรือไม่ โดยเอนไซม์ catalase ในแบคทีเรียจะไฮโดรไลซ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นออกซิเจนและน้ำ ดังสมการ



วิธีการ : ใช้ loop เขี่ยเชื้อและลงบนสไลด์ หยดน้ำยาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บริเวณที่มีเชื้อ

ผลบวก : เกิดฟองก๊าซจำนวนมากทันที

2. Bacitracin susceptibility test

หลักการ : เป็นการทดสอบสมบัติเฉพาะของเชื้อที่ถูกลยับยั้งการเจริญด้วยยาปฏิชีวนะ bacitracin

วิธีการ :

1. ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน blood agar โดย streak ทา bacitracin disc ลงบน blood agar และกดเบา ๆ เพื่อให้แผ่นยาติดกับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ใน candle jar นานาก่อนผล

ผลบวก : มี inhibition zone รอบแผ่นยา

3. Hippurate hydrolysis test

หลักการ : เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อยสลาย sodium hippurate (hippuric acid) ให้เป็น benzoic acid และ glycine ได้หรือไม่ โดยการใช้เอนไซม์ hippurate hydrolase หรือ hippuricase

วิธีการ :

1. ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลองและเขย่าให้เชื้อกระจายตัวจนได้ suspension ที่เข้มข้น ปั้นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
2. นำไป centrifuge 5,000 รอบ/นาที คัดส่วนใส 0.8 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง หยด ferric chloride reagent 0.2 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำม่อ่านผล

ผลบวก : เกิดตะกอนขุ่นจำนวนมาก

4. การทดสอบการสร้างรงควัตถุโดย group B streptococci

หลักการ : เชื้อ group B streptococci จะสามารถสร้างรงควัตถุสีแดงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี peptone และเบ้ง ต้องอยู่ในสภาวะ anaerobic หรือ microaerophilic

วิธีการ :

stab เชื้อที่ต้องการทดสอบ stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปั้นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล

ผลบวก : เกิดรงควัตถุสีแดงขึ้นบริเวณที่ใส่เชื้อลงไป

5. การทดสอบ bile esculin

หลักการ : เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อย่อยสลาย esculin ให้เป็น esculetin และ glucose ซึ่ง esculetin จะ

ทำปฏิกิริยากับ ferric ion ในอาหารแล้วเกิดตะกอนสีดำของ phenolic iron complex นอกจากนี้การทดสอบนี้ยังเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในสภาพทนต่อ bile 10 - 40 % ด้วย

วิธีการ :

ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน bile esculin medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล

ผลบวก : เกิดสีดำบริเวณที่เชื้อเจริญหรือทั่วทั้งหลอด

6. การทดสอบความทนทานต่อ 6.5% NaCl (6.5% Sodium Chloride Tolerance Test)

หลักการ : เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อที่ทนต่อ 6.5% NaCl

วิธีการ :

ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน 6.5% NaCl บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล

ผลบวก : มีเชื้อเจริญในหลอด อ่านการอ่าน และเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

7. การทดสอบการสร้างกรดและแก๊สจากคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol, Sorbitol และ Lactose

หลักการ : แบคทีเรียสามารถย่อยสลายประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น glucose , lactose , mannitol และ sorbitol เป็นดีเอกซ์โทสหรือในสภาพเป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย จะทำให้ผลผลิตเป็นกรดและแก๊ส

วิธีการ :

ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล

ผลบวก : เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 13 การจำแนกชนิดของ group D streptococci โดยวิธีทางชีวเคมี

การทดสอบ ชีวเคมี	Group D streptococci				
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. equinus</i>
ESB+					
esculin	+	-	+	+	+
0.5% NaCl	+	+	+	-	-
Sorbitol	-	+	-	+	-
Mannitol	+	+	-	±	-
Lactose	+	-	+	+	-

ที่มา : Joklik and others 1988

ตารางที่ 14 แสดงวิธีการคำนวณความไวและความจำเพาะของการทดสอบ

Test		Standard method		Total
		Positive	Negative	
Test method	Positive	a	b	a + b
	Negative	c	d	c + d
Total		a + c	b + d	(a + b + c + d)

- ความไว = $a / (a + c)$
- ความจำเพาะ = $d / (b + d)$
- ผลบวกปลอม = $b / (b + d)$
- ผลลบปลอม = $c / (a + c)$

ที่มา : Nimrat, 1991

ตารางที่ 15 มาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของ group D streptococci ต่อสารชนิดต่าง ๆ

Antimicrobial agent	Disc content, μg	Zone diameter (mm)				Control zone <i>S. aureus</i> ATCC 25923
		Resistant	Intermediate	Moderately susceptible	Susceptible	
Ampicillin	10	≤ 20	-	-	≥ 29	27-35
Cefaclor	30	≤ 14	-	15-22	≥ 23	25-31
Cefuroxime	30	≤ 14	-	17-17	≥ 18	27-35
Cephalexin	30	≤ 14	-	15-17	≥ 18	29-37
Chloramphenicol	30	≤ 22	17-17	-	≥ 18	16-28
Ciprofloxacin	5	≤ 15	-	18-20	≥ 21	22-30
Clindamycin	2	≤ 14	17-20	-	≥ 21	24-30
Erythromycin	15	≤ 12	14-12	-	≥ 23	23-30
Gentamicin	10	≤ 12	11-13	-	≥ 15	19-27
Oxacillin	1	≤ 10	11-12	-	≥ 13	18-24
Penicillin G	10	≤ 28	-	-	≥ 29	26-37
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25	≤ 10	-	11-15	≥ 16	24-32
Vancomycin	30	≤ 7	11-11	-	≥ 12	15-19

Source : Becton Dickinson and Company 1990



ภาพที่ 1 แสดงการเกิดตะกอนเมื่อกดสาร streptococci ด้วยวิธี Lancefield precipitation

ที่มา : Boyd and Bryan 1931