สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การพัฒนา Coagglutination kit เพื่อตรวจหาเชื้อกรุ๊ฟเอ บี ซี และจี สเตร๊ฟโตคอคไค จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง

Development of Coagglutination Kit for Rapid Identifying of Group A, B, C, and G Streptococci from Specimens Directly

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

นางสาว นิสา บุตรดา
นายบัญญัติ สุขศรีงาม
นางสุบัณฑิต เมฆขยาย

26 มี.ค. 2552
249161

เริ่มบริการ
31 มี.ค. 2552

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2537

ประกาศคุณูปการ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา ในส่วนของเงินงบประมาณ ประจำปี 2537 และได้รับความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือวิจัยและสถานที่สำหรับวิจัย จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา คณะผู้ดำเนินการวิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลชลบุรี จ. ชลบุรี และศูนย์สเตรฟโตคอคคัสแห่งชาติ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่าง และสิ่งส่งตรวจสำหรับทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณไพริน ตันประเสริฐ คุณธิดารัตน์ แดงประเสริฐ คุณวรนาฎ จงโยธา และคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมา

คณะผู้ดำเนินการวิจัยหวังว่ารายงานการวิจัยฉบับนี้จะเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาการตรวจหาเชื้อสเตรฟโตคอคคัส ให้มีประสิทธิภาพ และรวดเร็วยิ่งขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์กับผู้ป่วยต่อไป

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

30 พฤศจิกายน 2539

สารบัญ

บทที่		หน้า
1.	บทนำ	1
2.	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า	4
3.	วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	30
4.	ผลการทดลอง	36
5.	อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	47
	เอกสารอ้างอิง	52
	ภาคผนวก	57

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. extracellular product บางชนิดของ GAS	11
2. การจำแนก streptococci โดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึม	22
3. การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ โดยใช้วิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	36
4. การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ โดยแยกเชื้อบนอาหาร blood agar ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี CoA kit	37
5. การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ โดยตรง โดยวิธี CoA kit	38
6. เปรียบเทียบการจำแนกเชื้อ streptococci กรุ๊ฟต่าง ๆ จากสิ่งส่งตรวจโดยตรงด้วยวิธี CoA kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	39
7. เปรียบเทียบการจำแนกเชื้อ streptococci กรุ๊ฟต่าง ๆ โดยใช้วิธี blood agar ร่วมกับวิธี CoA kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	39
8. ความไวและความจำเพาะของวิธี blood agar ร่วมกับ CoA kit ในการจำแนก GAS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	40
9. ความไวและความจำเพาะของวิธี CoA kit ในการจำแนก GAS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	41
10. ความไวและความจำเพาะของวิธีการทดสอบความไวต่อยาเบซิทราซินในการจำแนก GAS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	42
11. ความไวและความจำเพาะของวิธี blood agar ร่วมกับ CoA kit ในการจำแนก GBS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	43
12. ความไวและความจำเพาะของวิธี CoA kit ในการจำแนก GBS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation	44
13. แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ของ group A streptococci 3 สายพันธุ์ และ group B streptococci จำนวน 2 สายพันธุ์	45
14. วิธีการคำนวณความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการทดสอบ	62
15. การแปลผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียโดยวิธี Kirby-Baver	63

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แสดงโครงสร้างระดับเซลล์ของ group A streptococci	7
2.	แสดงการจำแนก GBS ด้วยวิธี CAMP test	16
3.	ไดอะแกรมแสดงการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม beta-hemolytic streptococci	21

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาเชื้อสเตรฟโตคอคไคกรุ๊ฟเอ บี ซี และจี จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชลบุรี จำนวนทั้งสิ้น 312 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Coagglutination kit (CoA kit) โดยตรง พบเชื้อกรุ๊ฟเอ บี ซี และจี จำนวน 141 152 101 และ 80 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อตรวจหาเชื้อขั้นต้นบนอาหาร blood agar พบเชื้อจำนวน 32 ตัวอย่าง และนำมาจำแนกด้วยวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation (ใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 30 ชั่วโมง) พบเชื้อกรุ๊ฟเอ 3 ตัวอย่าง โดยพบ 2 ตัวอย่างจากเสมหะ และพบ 1 ตัวอย่างจากหนอง พบเชื้อกรุ๊ฟบี 2 ตัวอย่าง โดยพบจากปัสสาวะและช่องคลอด ไม่พบเชื้อกรุ๊ฟซี และจี และเมื่อนำเชื้อจาก blood agar ทั้ง 32 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยวิธี CoA kit (ใช้เวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง) พบเชื้อกรุ๊ฟเอ 5 ตัวอย่าง โดยพบ 2 ตัวอย่างจากหนอง และพบจากเสมหะ บาดแผล และช่องคลอดอย่างละ 1 ตัวอย่าง พบเชื้อกรุ๊ฟบี 4 ตัวอย่าง โดยพบ 2 ตัวอย่างจากปัสสาวะ และพบ 1 ตัวอย่างจากบาดแผล และช่องคลอด ไม่พบเชื้อกรุ๊ฟซี และจี เมื่อเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของการจำแนกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงด้วยวิธี CoA kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation พบว่ากรุ๊ฟเอ มีความไว 60 เปอร์เซ็นต์ มีความจำเพาะเพียง 55 เปอร์เซ็นต์ เกิด false-positive สูงถึง 45 เปอร์เซ็นต์ กรุ๊ฟบีมีความไว และความจำเพาะเพียง 66.7 และ 51.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบ false-positive 48.4 เปอร์เซ็นต์ แต่ความไว และความจำเพาะของกรุ๊ฟเอ จะเพิ่มเป็น 75 และ 93 เปอร์เซ็นต์ เกิด false-positive เพียง 7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความไว และความจำเพาะของกรุ๊ฟบี เพิ่มเป็น 100 และ 93 เปอร์เซ็นต์ เกิด false-positive 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกรุ๊ฟซี และจี มีความไว และความจำเพาะ สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้วิธี CoA kit ร่วมกับวิธี blood agar แล้วเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน การใช้วิธี CoA kit ตรวจหาเชื้อสเตรฟโตคอคไคจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง มีความไว และความจำเพาะต่ำ เนื่องจากเกิด cross-reaction ระหว่างแอนติซีรากรุ๊ฟต่าง ๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งส่งตรวจนั่นเอง ส่วนการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อกรุ๊ฟเอ และบี ที่จำแนกได้จากวิธีมาตรฐาน พบว่า เชื้อทั้งสองกรุ๊ฟไวต่อยา cephalothin และดื้อต่อยา penicillin G

บทที่ 1

บทนำ

Streptococci เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป จัดอยู่ในสกุล Streptococcus (Baron, 1982) ประกอบด้วยกรุ๊ฟต่างๆ ที่มีความสำคัญในทางการแพทย์และอุตสาหกรรม บางกรุ๊ฟเป็น saprophyte ที่พบในนมและผลิตภัณฑ์นม (Freeman, 1979) และเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ภาวะมลพิษในกระบวนการต่างๆ ทางอุตสาหกรรม (Baron, 1982) บางกรุ๊ฟเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (nomal flora) ในมนุษย์หรือสัตว์ หลายกรุ๊ฟเป็นสาเหตุในการเกิดโรคในมนุษย์ เช่น กรุ๊ฟเอ บี ซี และจี (Schuhardt, 1978) โดยกรุ๊ฟเอเป็นกรุ๊ฟที่มีบทบาทในการก่อโรคมากที่สุด (Moffet, 1980) โรคที่เกิดจากการติดเชื้อกรุ๊ฟเอได้แก่ ลำคออักเสบ (pharyngitis) ผิวหนังอักเสบ (impetigo) ไฟลามทุ่ง (erysipilas) ไข้ดำแดง (scarlet fever) ไข้รูมาห์ติก (rheumatic fever) และไตอักเสบ (glomerulonephritis) เป็นต้น โรคที่เกิดจากการติดเชื้อกรุ๊ฟบีได้แก่ ปอดบวม (pneumonia) โลหิตเป็นพิษ (septicemia) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) เป็นต้น ส่วนกรุ๊ฟซี และจีนั้นมีบทบาทในการก่อโรคที่คล้ายกับกรุ๊ฟเอแต่มีความรุนแรงน้อยกว่า (Braude และคณะ, 1982)

จากที่กล่าวข้างต้นจะเห็นว่า streptococci มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคที่รุนแรง ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทั้งในด้านแรงงาน และเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก เพื่อหลีกเลี่ยงความสูญเสียดังกล่าว จึงควรมีวิธีการตรวจสอบเชื้อที่สะดวก รวดเร็ว และเชื่อถือได้ เพื่อประกอบการวินิจฉัยของแพทย์ในการรักษา ป้องกัน และลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยติดเชื้อได้อย่างทันท่วงที วิธีการตรวจสอบเชื้อในห้องปฏิบัติการทางแบคทีเรียทำได้หลายวิธี อาทิเช่น วิธี Phadebact streptococcus test โดย Slifkin และคณะ (1982) วิธี Streptex kits โดย Wellstood (1982) วิธี Latex agglutination test โดย Miceika และคณะ (1985) วิธี Optical immunoassay technique โดย Harbect และคณะ (1993) และวิธี Coagglutination kits เป็นต้น โดยวิธีที่มีการศึกษากันมากที่สุดได้แก่ Coagglutination kits ซึ่งมีหลักการในการปฏิบัติคล้ายกัน แต่ต่างกันทางด้านเทคนิคการสกัดแอนติเจน และเทคนิคด้านอื่น ๆ ผู้ที่ศึกษาวิธีการนี้ เช่น El Kholy และคณะ (1978) Leland และคณะ (1978) Carlson และ McCarthy (1979) Engel และ Silfhout (1981) Slifkin และ Gil (1982) Gerber (1983) และสุบัณฑิต (2533) เป็นต้น เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวสูง ดังรายงานการวิจัยของสุบัณฑิต (2533) พบว่าวิธีนี้มีความไว 96.1 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะ 95.1 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสะดวก รวดเร็ว น่าเชื่อถือ ง่ายในการปฏิบัติและรายงานผล เสียค่าใช้จ่ายต่ำ และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง โดยใช้เวลาในการตรวจสอบเริ่มตั้งแต่การสกัดแอนติเจน แล้วทดสอบการเกิดปฏิกิริยา coagglutination กับ sensitized staphylococcal

suspension เพียง 30 นาที และด้วยเหตุผลดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงได้เลือกที่จะศึกษาและพัฒนาวิธี coagglutination kit ให้เหมาะสม สะดวก รวดเร็วในการตรวจสอบ และเชื่อถือได้มากขึ้น เพื่อช่วยควบคุม ป้องกัน และรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ Streptococci เพื่อใช้เป็นข้อมูลที่ช่วยให้แพทย์สามารถเลือกใช้ยาต้านจุลชีพได้อย่างเหมาะสมในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อใช้วิธี coagglutination kit ในการตรวจหาเชื้อ streptococci กรุ๊ฟเอ บี ซี และจี จากสิ่งส่งตรวจ คือ ปัสสาวะ หนอง เสมหะ ป้ายจากบาดแผล ป้ายจากช่องคลอด ป้ายจากตา ป้ายจากหู สาย cut down และแหล่งอื่น ๆ ได้โดยตรง ภายในเวลา 30 นาที โดยน้ำยาที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาถึงอุบัติการณ์การติดเชื้อ *Streptococcus* ในจังหวัดชลบุรี
3. เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างของแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ streptococci กรุ๊ฟเอ บี ซี และจี

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้าจำแนกได้ 4 ตอน คือ

1. รายละเอียดทั่วไปเกี่ยวกับ streptococci
2. รายละเอียดเกี่ยวกับ group A B C และ G streptococci
3. วิธีการจำแนกชนิดของ streptococci
4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบซีโรกรุ๊ฟของ streptococci

1. รายละเอียดทั่วไปเกี่ยวกับ streptococci

Streptococci จัดอยู่ในวงศ์ Streptococcaceae (Duguid และคณะ, 1960) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม หรือรูปไข่ เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.8-1.0 ไมโครเมตร มีการเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสาย เนื่องจากมีการแบ่งเซลล์ตามยาวในแนวเดียวกัน โดยขนาดของเซลล์ และความยาวของสายขึ้นอยู่กับสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่น เซลล์จะมีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-0.8 ไมโครเมตร ถ้าเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (anaerobic condition) หรือเซลล์จะเรียงตัวเป็นสายยาวถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เป็นต้น streptococci เป็นแบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างรงควัตถุ แต่สามารถสร้างแคปซูลได้ โคโลนีมีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ มัว ไม่ทึบหรือไม่โปร่งแสง (Freeman, 1979)

Streptococci ดำรงชีวิตแบบ aerobe หรือ facultative anaerobe และเจริญได้ดีขึ้นเมื่อมีคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ streptococci พวก pyogenic group อยู่ในช่วง 10-50 องศาเซลเซียส ส่วนพวกที่ก่อโรคในคนหรือสัตว์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียพวก mesophile อุณหภูมิที่เหมาะสมคือประมาณ 37 องศาเซลเซียส และในพวก lactic group ซึ่งเป็น streptococci ที่พบในนมและผลิตภัณฑ์นมจะเจริญได้ดีในช่วง 10-37 องศาเซลเซียส streptococci เจริญได้ไม่ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เช่น บน meat extract media ที่เตรียมจาก dehydrated products หรือ บน fresh meat infusion media แต่จะเจริญได้ดีถ้ามีการเพิ่มกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นแหล่งของพลังงาน และจะเจริญได้ดีขึ้นถ้ามีการเติมเลือดสดจากแกะหรือม้าลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5-10% เพราะในเลือดจะมีสารอาหารที่ streptococci ต้องการ และไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ (Freeman, 1979)

2. รายละเอียดเกี่ยวกับ group A B C และ G streptococci

group A streptococci (GAS)

สัณฐานวิทยา

group A streptococci (GAS) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลม (spherical) หรือรูปไข่ (ovoid) เซลล์ของ streptococci มีขนาดเล็กกว่า *staphylococci* (Sherris และคณะ, 1991) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ตั้งแต่ 0.5-1.0 ไมโครเมตร เซลล์มีลักษณะเรียงต่อกันเป็นสายมีความยาวแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ลักษณะพิเศษของเชื้อในกลุ่มนี้ คือมีผนังเซลล์ซึ่งมีความแข็งแกร่ง plasma membrane ชั้นในประกอบไปด้วย mesomal vesicles, cytoplasmic ribosomes และ nucleoid (Jokilk และคณะ, 1992) มีการแบ่งเซลล์ตามแนวยาวเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คุณสมบัติอื่น ๆ คือไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างรงควัตถุ (Braude และคณะ, 1992) และบางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลซึ่งมีสารเชิงซ้อนของโพลีแซคคาไรด์ หรือสาร hyaluronic acid เป็นองค์ประกอบได้ (Shirris และคณะ, 1986) สมาชิกของ streptococci ในกลุ่มนี้มี 1 สายพันธุ์ คือ *streptococcus pyogenes*

ลักษณะการเจริญ

GAS เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง ระบบสืบพันธุ์ และบาดแผล เป็นต้น (Freeman, 1985) การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเหลว (broth culture) และอาหารแข็ง เมื่อเจริญในอาหารเหลว เซลล์มีรูปกลมหรือรูปไข่เรียงต่อกันเป็นสายขนาดสั้นถึงปานกลางประมาณ 4-10 เซลล์ เชื้อจะมีการเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีเลือดเป็นองค์ประกอบ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 7.4-7.6 เชื้อมีการดำรงชีวิตแบบ facultative anaerobes ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อจึงควรเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ให้อยู่ในช่วง 2-10 เปอร์เซ็นต์ บ่มเป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจึงจะเจริญดี (Jokilk และคณะ, 1992) เมื่อเชื้อเจริญบน blood agar ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏคือโคโลนีมีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร กลม ขอบเรียบ ไม่มีสี โปร่งแสง ไม่สร้างรงควัตถุ และเกิดวงใสรอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร ที่เกิดจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยสมบูรณ์ เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า การเกิด beta-hemolysis (Jawetz และคณะ, 1989) การเกิดลักษณะดังกล่าวเนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ hemolysin 2 ชนิด คือ stretolysin S และ streptolysin O ออกมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การเกิด hemolysis จะปรากฏชัดเจนเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็น aerobic condition ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงต้องมีการเติมเลือดแกะหรือเลือดม้าลงไปในปริมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในเม็ดเลือดมีสารอาหารต่าง ๆ อันได้แก่ กรดอะมิโน วิตามิน และกลูโคสเพื่อเป็นแหล่ง

พลังงานสำหรับการเจริญ ซึ่งเชื้อไม่สามารถสังเคราะห์สารอาหารดังกล่าวขึ้นเองได้ การเลือกใช้เลือดแกะแทนการใช้เลือดมนุษย์เป็นวิธีการที่ดีกว่าเนื่องจากเลือดแกะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Haemophilus haemolyticus* ได้ซึ่งเชื้อดังกล่าวมีลักษณะโคโลนีคล้ายกับ GAS ทำให้เกิดความสับสนในการสังเกตได้ และในบางสายพันธุ์ของเชื้อ streptococci โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกเนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการสร้างสาร hyaluronic acid จึงพบแคปซูลในโคโลนีลักษณะดังกล่าวได้ (Shirris และคณะ, 1991)

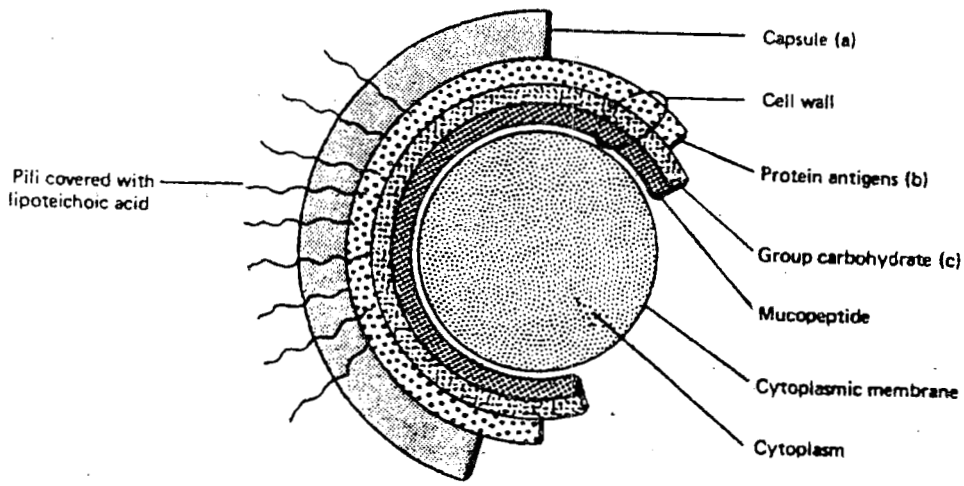
โครงสร้างระดับเซลล์ของ GAS

โครงสร้างระดับเซลล์ของ GAS มีดังนี้

1 แคปซูล เป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยสาร hyaluronic acid ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับในเนื้อเยื่อสัตว์ (Joklik และคณะ, 1992) บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ hyaluronidase ออกมาย่อยสลายแคปซูลของตนเองได้ ดังนั้นเซลล์ที่สร้างแคปซูลจึงไม่พบลักษณะที่ต่อกันเป็นสายยาวแต่จะพบอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ ลักษณะแคปซูลบนอาหารแข็งจะมีลักษณะเป็นเมือกหรือเป็นมันเงา โดยที่แคปซูลของ GAS ไม่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจน (Jawetz และคณะ, 1989)

2 ผนังเซลล์ มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน มีลักษณะแข็งเรียงตัวเป็นชั้นแต่ละชั้นประกอบด้วยสารโพลีเมอร์ของ N - acetylglucosamine - N - acetylmuramic acid หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า peptidoglycan (PPG) สารโพลิเมอร์ทั้งสองชนิดเชื่อมยึดกันด้วย peptide bridge เป็นลักษณะสามมิติ (Braude และคณะ, 1986) ซึ่งในโครงสร้างของผนังเซลล์ทั้งหมดจะพบ PPG ประมาณ 40-80% ของส่วนประกอบทั้งหมด

3 เซลล์เมมเบรน มี 3 ชั้นซึ่งมีความหนาประมาณ 75-90 อังสตรอม ประกอบไปด้วยไลโพโปรตีนซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากโครงสร้างอื่น เรียงตัวอยู่ในรูป L - form เซลล์เมมเบรนเชื่อมต่อกับส่วนของผนังเซลล์ที่เป็น hydrophobic ภายในชั้นของเซลล์เมมเบรน หรือบริเวณผิวหน้าเซลล์เมมเบรนอาจพบ lipoteichoic acid อยู่ด้วย ซึ่ง lipoteichoic acid คือสายของ polyglycerol phosphate หลาย ๆ ยูนิตมาเชื่อมต่อกันระหว่างน้ำตาล หรือน้ำตาลอะมิโน กับ glycolipid ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Braude และคณะ, 1982) โครงสร้างระดับเซลล์ของ GAS แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างระดับเซลล์ของ group A streptococci

(a) capsule

(b) cell wall

(c) group-specific carbohydrate

ที่มา : Jawetz และคณะ, 1989

โครงสร้างแอนติเจนของ group A streptococci

แอนติเจนของ GAS มีหลายชนิดดังนี้

1. โปรตีน มี 3 ชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนดังนี้คือ M T และ R แอนติเจน พบอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ของ GAS โดยแอนติเจน M เป็นชนิดที่มีบทบาทในการก่อโรคมากที่สุด (Braude และคณะ, 1982)

1.1 M-protein (Type-specific-M-protein) จะพบอยู่ในส่วนผิวเซลล์บริเวณที่เชื่อมต่อกับ fimbraiae (Davis และคณะ, 1990) เป็นส่วนที่สำคัญในการก่อโรค มีคุณสมบัติต้านทานการทำลายโดยเม็ดเลือดขาว (leukocytes) (Joklik และคณะ, 1992) สามารถใช้ M-protein ในการจำแนกชนิดของ GAS แสดงให้เห็นได้ด้วยวิธี agglutination หรือ precipitation ทำโดยนำ M-protein ทำปฏิกิริยากับ M-type specific sera วิธีดังกล่าวสามารถจำแนกกลุ่ม GAS ได้

ประมาณ 60 ไทป์ (Jawetz และคณะ, 1989) การสกัด M-protein ทำได้โดยการใช้กรดไฮโดรคลอริก ย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin หรือใช้ nonionic detergent คุณสมบัติอื่น ๆ ของ M-protein มีดังนี้คือ ทนต่อความร้อนและกรด ละลายได้ในแอลกอฮอล์ มีมวลโมเลกุลขนาด 40,000 มีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.3 (Braude และคณะ, 1982) โดยส่วนใหญ่จะพบ M-protein ในเชื้อที่มีโคโลนีลักษณะเป็นเมือก (mucoid) แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารธรรมดาหลาย ๆ ครั้งอาจสูญเสียการสร้าง M-protein ไปได้

1.2 T-protein มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนแต่ไม่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคซึ่งเป็นข้อแตกต่างจาก M-protein (Jawetz และคณะ, 1989) คุณสมบัติอื่น ๆ มีดังนี้คือ ไม่ทนต่อกรดและความร้อน แต่ทนต่อ proteolytic enzyme ได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ว่าเป็นชนิด M-type หรือ T-type (David และคณะ, 1990)

1.3 R-protein สามารถเกิดปฏิกิริยา agglutination แบบจำเพาะได้ (specific agglutination reaction) แต่ไม่มีคุณสมบัติเกี่ยวกับความรุนแรงของโรค บางชนิดถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pepsin หรือ trypsin เช่น R-protein ชนิด 3R และบางชนิดถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ pepsin เพียงอย่างเดียว เช่น R-protein ชนิด 28R นอกจากจะพบ R-protein ใน GAS แล้วยังพบได้ในบางสายพันธุ์ของ group B C G และ L streptococci อีกด้วย นอกจากนี้ R protein ยังมีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างกรุ๊ฟ (grouping) และชนิดของแอนติเจนซีรั่ม (typing antisera) ได้ ดังนั้นแอนติเจนชนิด R-protein จึงขาดคุณสมบัติในการจำแนก กล่าวคือไม่สามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการวิเคราะห์เชื้อได้ (Braude และคณะ, 1982)

2 Group-specific carbohydrate หรือ Group-specific C antigen สามารถจำแนกเชื้อ streptoccci ได้โดยอาศัยความแตกต่างของ C-carbohydrate antigen ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละกลุ่ม C-antigen จะอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ การสกัดทำได้โดยนำเซลล์มาทำให้เป็น suspension ในกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง pH 2 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นแล้วเก็บในหลอดคะปิลลารี แอนติเจนชนิดนี้พบได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย (David และคณะ, 1990)

3 Nucleoprotein มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีนหลาย ๆ ชนิด กับ seralogic specificity อีกจำนวนเล็กน้อย เรียกรวมกันว่า P substance การสกัดทำได้โดยใช้ด่างอ่อน (Jawetz และคณะ, 1989)

4 Capsular polysaccharide จัดเป็นแอนติเจนชนิดหนึ่งซึ่งเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคแต่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ M-protein โดยแคปซูลมีคุณสมบัติต้านทานการถูกกินโดยเม็ดเลือดขาว (Joklik และคณะ, 1992)

สารพิษ เอนไซม์ และ extracellular product อื่น ๆ ของ GAS

โรคต่าง ๆ ในมนุษย์ที่เกิดจากการติดเชื้อ GAS มีความรุนแรงของโรคต่างกัน ซึ่งนอกจาก M-protein และแคปซูลที่มีคุณสมบัติในการก่อโรคแล้วยังมีการสร้าง extracellular product อันได้แก่สารพิษและเอนไซม์หลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติในการก่อโรคได้เช่นกัน ดังนั้นสารพิษและเอนไซม์ทุกชนิดที่เชื้อกลุ่มนี้สร้างขึ้นจึงมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ยกเว้น streptolysin S การตรวจสอบสารพิษและเอนไซม์เหล่านี้ทำได้โดยใช้ gamma-globulin ของมนุษย์ หรือ rabbit sera hyperimmune สารดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติในการทำลายเนื้อเยื่อ และส่งผลถึงความรุนแรงของโรคด้วย (Braude และคณะ, 1982) นอกจากนี้ยังพบว่า GAS สามารถผลิต extracellular product ได้อย่างน้อยถึง 25 ชนิด ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคในคน ตัวอย่างของ extracellular product บางชนิดแสดงดังตารางที่ 1 และมีรายละเอียดดังนี้

1 Erythrogenic toxin เป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดผื่นแดงในผู้ป่วยที่เป็นโรคไข้ดำแดง สารพิษชนิดนี้มีลักษณะคล้ายกันกับสารพิษที่สร้างโดย *Corynebacterium diphtheriae* บทบาทของสารพิษชนิดนี้ไม่ปรากฏชัดเจน ซึ่งสารพิษชนิดดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน เมื่อร่างกายได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไปจะกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดี้ขึ้นต่อต้านแอนติเจนชนิดนี้ แต่ถ้าภายในร่างกายมี anti-toxin ชนิดนี้อยู่แล้ว จะเกิดการอักเสบในลำคอเท่านั้นโดยไม่มีผื่นขึ้น เนื่องจาก anti-toxin จะไปทำลายสารพิษให้หมดฤทธิ์ไป และนอกจากคุณสมบัติข้างต้นแล้วสารพิษชนิดนี้ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อกรด ด่างและเอนไซม์เปปซินได้ แต่ไม่ทนต่อความร้อน (Joklik และคณะ, 1992)

2 Proteinase มีคุณสมบัติในการทำลาย M-protein, streptolysin O และ streptokinase ได้ ถูกกระตุ้นได้ด้วยสารประกอบ sulfhydry และปล่อยออกจากเซลล์ในรูปของ inactive proteinase ที่เรียกว่า zymogen (David และคณะ, 1990) และจะอยู่ในรูปของ active proteinase ได้ด้วย ส่วนบทบาทในการก่อโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Braude และคณะ, 1982)

3 Nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Nicotinamide adenine dinucleotidase (Davis และคณะ, 1990) มีชื่อย่อว่า NADase หรือ NADG เอนไซม์ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลทั้งหมดประมาณ 25-30 กิโลดาลตัน ต้องการแคลเซียมและแมกนีเซียมจึงจะเกิด activity ที่ดี (Joklik และคณะ, 1992) คุณสมบัติของเอนไซม์ชนิดนี้คือสามารถทำลายเม็ดเลือดขาวได้ และพบได้ใน streptococci บางกลุ่มเท่านั้น คือ group A, C และ G (Braude และคณะ, 1982)

4 Streptokinase เป็นเอนไซม์ที่สามารถสร้างได้โดยเชื้อ Streptococci ในกลุ่ม beta-hemolytic มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า streptococcal fibrinolysin หรือ SK (Davis และคณะ,

1990) เอนไซม์ชนิดนี้ไม่สามารถทำงานได้โดยตรงแต่จะต้องเปลี่ยน plasminogen ให้กลายเป็น plasmin ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อเป็นบริเวณกว้าง (Braude และคณะ, 1982)

5 Streptodornase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Streptococcal deoxyribonuclease ความสำคัญของเอนไซม์ชนิดนี้คือจะไปทำให้หนอง เสมหะและสารคัดหลั่งต่าง ๆ มีความเหนียวลดลง เชื้อจึงมีการแพร่กระจายและลุกลามไปยังอวัยวะส่วนต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น (Jawetz และคณะ, 1989) เอนไซม์ชนิดนี้พบส่วนใหญ่ใน GAS

6 Hyaluronidas หรือ Spreading factor เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสาร hyaluronic acid ที่เป็นส่วนประกอบในแคปซูลของ streptococci (Davis และคณะ, 1990) ทำให้สารคัดหลั่งชนิดต่าง ๆ มีความเหนียวลดลง การติดเชื้อจึงมีการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว เอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนและมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด การตรวจสอบการติดเชื้อจากเอนไซม์ hyaluronidase นี้ทำได้โดยอาศัยแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะในซีรั่ม (Jawetz และคณะ, 1989)

7 Streptolysin หรือ Hemolysin streptococci หลาย group ด้วยกัน ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดสีแดงอันเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ streptolysin GAS มีลักษณะพิเศษคือเมื่อเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์จะเห็นเป็นวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งซึ่งมีเลือดเป็นองค์ประกอบเรียกลักษณะดังกล่าวว่าเกิด beta-hemolysis โดยลักษณะเช่นนี้เกิดจากเอนไซม์ streptolysin 2 ชนิดคือ (Jawetz และคณะ, 1989)

7.1 Streptolysin O (SLO) เป็นโปรตีนซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 60,000 เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนจะสูญเสียสภาพไป (Jawetz และคณะ, 1989) เป็นสารที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เมื่อเกิดปฏิกิริยา oxidation สารพิษชนิดนี้จะเสียสภาพไป แต่สามารถกลับสู่สภาพเดิมอย่างสมบูรณ์ได้ด้วย thiol หรือสาร reducing agent นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งได้ด้วยสาร cholesterol และสาร sterol อื่น ๆ ได้ เมื่อร่างกายได้รับสาร SLO จะกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10-14 วัน แต่ถ้าเกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันจะเป็นไปได้ช้าทั้งนี้เนื่องจากเกิดการยับยั้งโดย lipid ที่อยู่บริเวณผิวหนังนั่นเอง (Jokilk และคณะ, 1992)

7.2 Steptolysin S (SLS) ไม่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน สามารถคงสภาพอยู่ได้แม้สัมผัสกับออกซิเจน มีมวลโมเลกุลต่ำและเป็นอันตรายต่อเม็ดเลือดขาวชนิด leukocyte มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงและผนังเซลล์แตกได้แต่ถูกยับยั้งได้โดย phospholipid ทุกสายพันธุ์ของ GAS สามารถสร้าง SLS ได้ SLS จะถูกสร้างขึ้นในขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตหรืออยู่ในระยะพัก (Jokilk และคณะ, 1992)

ตารางที่ 1 Extracellular product บางชนิดของ GAS

extracellular product	stimulates production of inhibitory antibody
erythrogenic toxin (A B and C)	+
streptolysin O	+
streptolysin S	-
diphosphopyridine nucleotidase	+
streptokinases (A and B)	+
deoxyribonucleases (A B C and D)	+
hyaluronidase	+
proteinase	+
amylase	?
esterase	-

ที่มา : Davis และคณะ, 1990

โรคที่เกิดเนื่องจาก group A streptococci

โรคที่เกิดจาก GAS มี 2 แบบคือ เกิดเนื่องจากการติดเชื้อโดยตรงและเกิดตามหลังการติดเชื้อ (Sherris และคณะ, 1991) โดยพบว่า GAS หลายสายพันธุ์สามารถก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนบน และบริเวณผิวหนังของมนุษย์ (Jokilk และคณะ, 1992) รายละเอียด ของโรคต่าง ๆ มีดังนี้

1 โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ GAS โดยตรง (suppurative disease)

1.1 ลำคออักเสบ (streptococcal pharyngilis) GAS มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคนี้ โรคลำคออักเสบเป็นโรคที่พบได้ในบางช่วงอายุแต่จะพบได้บ่อยในเด็กที่มีอายุช่วง 5-15 ปี โดยจะมีอาการเจ็บคอ ครั่นเนื้อครั่นตัว อุณหภูมิอยู่ในช่วง 38.9-40 องศาเซลเซียส และมีอาการปวดหัวร่วมด้วย บริเวณที่มีการติดเชื้อคือบริเวณต่อมทอนซิล ลิ้นไก่ และเพดานอ่อน จะเห็นเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวมีการบวมแดงและมีเสมหะอยู่ด้วย อาการเช่นนี้จะหายไปภายใน 3-5 วัน หรือภายใน 1 สัปดาห์ ในบางครั้งพบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อไปยังอวัยวะส่วนอื่นทำให้เกิดการติดเชื้อในอวัยวะเหล่านั้นได้ เช่น ปอดบวม (pneumonia) การติดเชื้อในกระแสโลหิต

(bacteremia) ไข้สมองอักเสบ (meningitis) ไซนัสอักเสบ (sinusitis) เป็นต้น (Sherris และคณะ, 1991)

1.2 ผิวหนังอักเสบ (impetigo) การติดเชื้อจะเกิดบริเวณผิวหนังที่มีรอยถลอกหรือบริเวณที่ถูกแมลงกัด อาการเริ่มแรกสังเกตได้จากผิวหนังบริเวณนั้นจะมีตุ่มเล็กคล้ายสิวหรือหนอง และจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป จากนั้นตุ่มจะแตกออกกลายเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลอ่อนทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อโรคอย่างรวดเร็วเป็นบริเวณกว้าง โรคนี้พบได้ในเด็กช่วงอายุตั้งแต่ 2-5 ปี โดยพบการติดเชื้อบริเวณผิวหนังตามร่างกายโดยเฉพาะผิวหน้าและปลายมือ ปลายเท้า โรคผิวหนังอักเสบนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคไตอักเสบซึ่งเป็นโรคที่เกิดตามหลังการติดเชื้อ group A streptococci ในผู้ป่วยบางรายอาจพบว่าตุ่มหนองนั้นเกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* แต่ไม่พบบ่อยนัก ตุ่มหนองที่เกิดจาก *S. aureus* จะมีลักษณะที่แตกต่างกับตุ่มหนองที่เกิดจาก streptococci (Sherris และคณะ, 1991)

1.3 ไฟลามทุ่ง (esysipelas) เกิดจากการติดเชื้อ streptococci บริเวณผิวหนังแต่แตกต่างจาก impetigo คือลักษณะผิวหนังจะเป็นสีแดงไม่ปรากฏตุ่มหนอง แพร่กระจายตามผิวร่างกายโดยเฉพาะบริเวณหน้า แขน และมือ แต่มีขอบเขตแยกจากผิวหนังที่ไม่มีอาการติดเชื้ออย่างชัดเจน อาการอื่น ๆ ที่พบคือ มีไข้สูง อาเจียนและปวดศีรษะ ยาที่นำมาใช้รักษาโรคนี้คือยาเพนนิซิลลิน (Sherris และคณะ, 1991)

1.4 การติดเชื้อที่บาดแผล (wound and burn infections) เมื่อเกิดการติดเชื้อจะมีการแพร่กระจายของเชื้ออย่างรวดเร็วไปสู่บริเวณเนื้อเยื่ออื่นๆ ซึ่งเสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตเป็นพิษ และโลหิตเกิดการติดเชื้อ โดยเฉพาะบริเวณผิวหนังซึ่งผ่านการศัลยกรรมมีโอกาสติดเชื้อได้ดีกว่าบริเวณอื่น ๆ (Sherris และคณะ, 1991)

1.5 การติดเชื้อหลังคลอด (puerperal infection) การติดเชื้อเกิดบริเวณมดลูก อันเนื่องจาก GAS การแพร่กระจายของเชื้อเกิดโดยผ่านทางมือแพทย์หรือเครื่องมือแพทย์สู่เด็กแรกเกิด (Sherris และคณะ, 1991)

1.6 ไข้ cellulitis การติดเชื้อเกิดบริเวณผิวหนังและใต้ชั้นผิวหนัง อาการทั่วไปที่สังเกตได้คือเป็นไข้ หนาวสั่น และครั่นเนื้อครั่นตัว ลักษณะที่เห็นได้ชัดคือจะมีอาการผิวหนังบวมแดงและมีการอักเสบลุกลามไปรอบ ๆ อย่างรวดเร็ว ตำแหน่งที่มีโอกาสพบเชื้อมากที่สุดคือระหว่างรอยต่อของบาดแผลเข้าสู่ระบบน้ำเหลือง นอกจากจะเกิดการติดเชื้อโดย streptococci แล้วไข้ cellulitis ยังสามารถเกิดการติดเชื้อได้จาก staphylococci ได้อีกด้วย แต่การลุกลามและแพร่กระจายของเชื้อโรครวดเร็วมากและมีไข้สูง (Jokilk และคณะ, 1992)

1.7 ไข้ดำแดง (scarlet fever) ลักษณะอาการที่ปรากฏคือเกิดผื่นแดงบริเวณลำคอ ถ้าผู้ป่วยไม่เคยมีภูมิคุ้มกันมาก่อนต่อสารพิษ pyrogenic exotoxin จะเกิดผื่นแดงทั่วบริเวณลำตัว แต่ถ้าผู้ป่วยนั้นมีแอนติท็อกซินอยู่ภายในร่างกายก็จะเกิดการอักเสบในลำตอเพียงอย่างเดียวเท่านั้นเพราะแอนติท็อกซินนั้นจะไปทำลายสารพิษให้หมดไป นอกจากเกิดจุดแดงบริเวณลำตัวแล้ว บริเวณเพดานอ่อน เพดานแข็ง และลิ้นยังอาจปรากฏจุดแดงขึ้นได้ (Sherris และคณะ, 1991) จุดแดงเกิดเนื่องจากมีการสร้างสาร erythrogenic toxin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารพิษเข้าสู่กระแสเลือด เมื่อเลือดเกิดการไหลเวียนไปยังส่วนค่าง ๆ ของร่างกายทำให้เกิดจุดแดงปรากฏบนผิวหนังทั่วร่างกายได้ (Nesler และคณะ, 1995)

2 โรคที่เกิดตามหลังการติดเชื้อ (nonsuperative sequelae)

โรคเหล่านี้ได้แก่ ไข้รูห์มาติก โรคหัวใจรูห์มาติก และไตอักเสบอย่างเฉียบพลัน การเกิดโรคจะเกิดตามหลังการติดเชื้อ GAS โดยมีระยะแฝงของเชื้อประมาณ 1-4 สัปดาห์ รายละเอียดของโรคมีดังต่อไปนี้

2.1 ไข้รูห์มาติก (rheumatic fever) ลักษณะอาการคือเป็นไข้ และมีอาการอักเสบบริเวณข้อต่อ หัวใจ เนื้อเยื่อ และระบบประสาทส่วนกลาง อาการจะเกิดตามหลังการติดเชื้อในลำคอประมาณ 3 สัปดาห์ (Sherris และคณะ, 1991) กลไกการเกิดโรคมีสาเหตุมาจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างแอนติเจนของ GAS กับเนื้อเยื่อหัวใจ โดยแอนติเจนจะไปกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดี้ต่อเนื้อเยื่อหัวใจภายในร่างกายของผู้ป่วยนั้น การวินิจฉัยโรคอาศัยหลักการของ T. Duckett Jones (Jokilk และคณะ, 1992) ผู้ป่วยที่เคยเป็นโรคนี้มาแล้วสามารถเป็นซ้ำได้อีก ดังนั้นการรักษาจึงต้องใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานาน ยาที่ใช้ในการรักษาคือเพนนิซิลลิน (Sherris และคณะ, 1991)

2.2 โรคไตอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute glomerulonephritis) เป็นโรคที่เกิดตามหลังโรคลำคออักเสบหลังจากมีอาการ 1-2 สัปดาห์ และเกิดตามหลังการติดเชื้อที่บริเวณผิวหนังหลังจากมีอาการ 2-3 สัปดาห์ ซีโรไทป์ 12 เป็นชนิดที่พบได้บ่อยในการติดเชื้อบริเวณลำคอ ซีโรไทป์อื่นอาจพบได้บ้างได้แก่ ซีโรไทป์ 1, 2, 3, 4, 15, 49, 55, 57, 59, 60 และ 61 ในบางซีโรไทป์เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการทำให้ไตอักเสบ (nephritogenic) กลไกการเกิดโรคเกิดจากปฏิกิริยาข้ามระหว่างเนื้อเยื่อไตกับแอนติบอดี้ต่อ streptococci อยู่ในรูปของ antigen-antibody complex กับ complement ทำให้เกิดภาวะภูมิไวเกินของร่างกายที่มีต่อแอนติเจนของ GAS ชนิด cell mediated hypersensitivity ผู้ป่วยจะมีอาการสำคัญคือ ปัสสาวะเป็นเลือด และมีปริมาณน้อยลง ความดันโลหิตสูง (Jokilk และคณะ, 1992)

2.3 โรคหัวใจรูห์มาติก (rheumatie heart disease) เป็นโรคที่ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการตายและการพิการสูง โรคนี้ไม่มีการรักษาให้หายได้ มีผลให้ผู้ป่วยเป็นโรคหัวใจพิการและทำหน้าที่ผิดปกติไป สารพิษที่เกี่ยวข้องในการก่อโรคนี้คือ streptolysin

ระบาดวิทยาและการป้องกัน

โดยส่วนใหญ่แล้วมักพบว่า streptococci เป็นเชื้อประจำถิ่นสามารถพบได้ในร่างกายมนุษย์แต่สามารถก่อโรคขึ้นได้ต่อเมื่อเจ้าบ้านมีร่างกายอ่อนแอและเชื้ออยู่ในบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญ บริเวณที่พบว่ามีการติดเชื้อ GAS ได้บ่อย ได้แก่ ทางเดินหายใจ และบริเวณผิวหนัง การแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปได้หลายวิธี โดยถ้าติดเชื้อบริเวณลำคอจะแพร่กระจายได้โดยการไอหรือจาม ส่วนการติดเชื้อบริเวณผิวหนังจะมีการแพร่กระจายได้โดยเกิดจากการสัมผัสผู้ป่วยคนหนึ่งสู่ผู้อื่นได้ การควบคุมและป้องกันเชื้อ GAS ทำได้โดยการให้ยาเพนนิซิลลินติดต่อกันถึงแม้ว่าอาการจะบรรเทาแล้วก็ตาม และผู้ป่วยควรมีความระมัดระวังในการไอ จามและสัมผัส เพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อ (Jawetz และคณะ, 1989)

group B streptococci (GBS)

สัณฐานวิทยา

ได้แก่ *S. agalactiae* พบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ทั้งแบบ beta-hemolysin, alpha-hemolysin หรือ gramma-hemolysin (Duguid และคณะ, 1960) โดยสามารถแบ่งกรุ๊ฟบีจากโครงสร้าง polysaccharide antigen ได้เป็น 5 subtypes คือ Ia, Ib, Ic, II และ III (Duduid, 1960)

ระบาดวิทยาและการป้องกัน

GBS เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ตามช่องคลอด และมดลูกของหญิงปกติ ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ อาศัยอยู่ตามมดลูกของหญิงมีครรภ์ ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมารดาที่มีเชื้อนี้อยู่ขณะตั้งครรภ์จะสามารถถ่ายทอดเชื้อไปสู่ทารกขณะอยู่ในครรภ์หรือขณะคลอดได้ ทำให้ทารกมีโอกาสในการติดเชื้อสูง ซึ่งโรคติดเชื้อ GBS ในทารกแรกเกิดสามารถแบ่งได้ 2 ช่วงคือ

1. early-onset infection คือช่วงแรกเกิดถึง 7 วันหลังคลอด ทารกจะมีอาการอย่างเฉียบพลัน มีอาการหายใจไม่ออก และอาจเป็นปอดบวมได้ ทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 50-55 เปอร์เซ็นต์

2. late-onset infection คือช่วง 7 วันหลังคลอด ทารกจะมีอาการของเยื่อหุ้มสมองอักเสบและติดเชื้อในกระแสเลือด มีอัตราการตายน้อยกว่าช่วงแรกคือ 23 เปอร์เซ็นต์ (Duguid, 1960)

นอกจากนี้ GBS ยังอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการแท้ง การคลอดก่อนกำหนด การอักเสบของลิ้นหัวใจ ปอดบวม การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ข้อและกระดูกอักเสบ

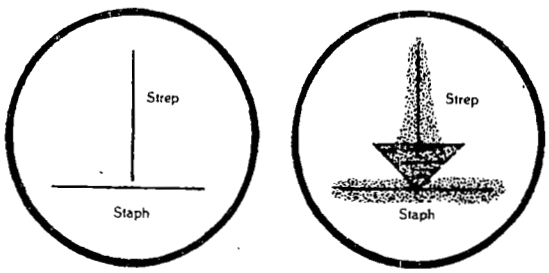
(Kirkegard และ Field, 1977) และเป็นสาเหตุทำให้ต่อมน้ำนม หรือเต้านมอักเสบในวัวอีกด้วย (Freeman, 1979)

การตรวจหาเชื้อ GBS ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียทั่วไปจะใช้วิธีทางชีวเคมี ซึ่งได้แก่ hippurate hydrolysis test เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการที่จะสลาย sodium hippurate หรือ hippuric acid โดยเอนไซม์ hippurate hydrolase หรือ hippuricase ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *S. agalactiae* สามารถสลาย hippurate ได้ จึงทำให้แยกออกจาก beta- hemolytic streptococci ซึ่งไม่สามารถสลาย hippurate ได้ โดยมีวิธีการคือ นำเชื้อที่ต้องการทดสอบจำนวนมากพอควร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายของ 1% sodium hippurate ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไป centrifuge 3,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใส 0.8 มิลลิลิตร แยกใส่หลอดที่ปราศจากเชื้ออีกหลอดหนึ่ง หยด ferric chloride reagent ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร อ่านผลการทดลอง โดยผลบวกจะเกิดตะกอนขึ้นจำนวนมากในเวลา 10 นาที ซึ่งตะกอนที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง feric chloride กับเบนโซอิค (benzoic acid) ที่ได้จากการย่อยสลาย sodium hippurate นั่นเอง (Balows และคณะ, 1991)

การทดสอบการสร้างรงควัตถุ (Pigment production test) GBS สามารถสร้างรงควัตถุสีแสด ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี peptone และแป้ง ในสภาวะไม่มีอากาศ หรือในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ซึ่งมีวิธีการคือ stap เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน pigment medium บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำมาอ่านผล โดยผลบวกจะเกิดสีแสดขึ้นในบริเวณที่ stap เชื้อลงไป (Balows และคณะ, 1991)

CAMP test เป็นการทดสอบความสามารถในการให้ CAMP factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่แพร่กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างรวดเร็ว และทนต่อความร้อน โดย CAMP factor นี้ สร้างจากแบคทีเรีย group B streptococci และสามารถทำปฏิกิริยาเสริมฤทธิ์กับ beta-toxin จาก *S. aureus* ซึ่งมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแกะ หรือเม็ดเลือดแดงวัวแตกอย่างรวดเร็ว (ไม่เกิดกับเม็ดเลือดแดงมนุษย์ ม้า หรือกระต่าย) โดยมีวิธีการคือ ใช้ไม้เขี่ยเชื้อ ขีดเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ให้ beta-toxin เป็นทางยาวตรงกึ่งกลางของ blood agar plate หลังจากนั้นขีดเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน blood agar โดยขีดเชื้อให้ตั้งฉากกับแนวของ *S. aureus* และขีดจากด้านนอกเข้าไปหาเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง อ่านผล ดังแสดงในภาพที่ 2

ส่วนการจำแนก GBS ในทาง serology จะใช้การทำให้ตกตะกอน (coagglutination test) ของ antisera กับ antigen หรือใช้วิธี counter immunoelectrophoresis เป็นต้น (Duguid, 1960)



A B

ภาพที่ 2 แสดงการจำแนก GBS ด้วยวิธี CAMP test

A คือผลลบ ไม่มีการทำลายเม็ดเลือดแดง หรือมีแต่ไม่เป็นรูปลูกศร

B คือผลบวก เกิดบริเวณที่มีการทำลายเม็ดเลือดแดงระหว่าง *S. aureus* กับเชื้อที่ทดสอบ เป็นรูปลูกศร ซึ่งหมายถึงว่า เชื้อทดสอบน่าจะเป็น group B beta-hemolysis *Streptococcus*

ที่มา : นันทนา, 2537

group C streptococci (GCS)

สัณฐานวิทยา

ลักษณะโคโลนีของ group C streptococci (GCS) มีลักษณะเหมือนกับ streptococci คือเมื่อเจริญบน blood agar โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ ทุกสายพันธุ์มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ beta-hemolysis นั่นคือ มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ซึ่งจะเป็นวงใสรอบโคโลนี ยกเว้น *Strepptococcus dysgalactiae* เท่านั้นที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ alpha-hemolysis ลักษณะเป็นวงสีเขียวน้ำตาลรอบ ๆ โคโลนี หรือไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเลย สมาชิกที่สำคัญของ GCS ได้แก่ *S. equisimiliis, S. zooepidemicus, S. equi* และ *S. dysgalactiae* (Jokilk และคณะ, 1992)

โครงสร้างแอนติเจน

1 Group - specific carbohydrate ประกอบด้วยสายโพลิเมอร์ของ L-rhamnose และ N-acetyl-D-galactosamine group - specific carbohydrate เป็น antigenic ที่สำคัญมีข้อแตกต่างจาก GAS คือตรงหมู่แทนที่ของ GCS จะประกอบด้วย N-acety-D-galactosamine แต่ GAS ประกอบด้วย N-acetryl-D-glucosamine ดังนั้น GCS จึงขาดคุณสมบัติในการก่อโรคไข้รูห์มาติกโดยขาด virulence factor ไป การเกิดโรคจึงไม่ค่อยรุนแรงมากนัก (Jokilk และคณะ, 1992)

2 streptokinase - streptodornase สารชนิดนี้มีคุณสมบัติคล้ายกับ GAS โดยสารพิษดังกล่าวสามารถสลาย thrombin และ fibrin เลือดจึงเกิดการแข็งตัวยากดังนั้นเชื้อจึงมีการแพร่กระจายได้ดีขึ้น

3 streptolysin O บทบาทการก่อโรคโดยสารดังกล่าวของ GCS ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด สารนี้ถูกยับยั้งได้โดยโคเลสเตอรอลและสารสเตอรอลอื่น ๆ (Jokilk และคณะ, 1992)

4 hyaluronic acid มีคุณสมบัติเป็น virulence factor และลักษณะในการก่อโรคเป็นเช่นเดียวกับ GAS (Braude และคณะ, 1982)

โรคที่เกิดเนื่องจาก GCS

GCS มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคทั้งในสัตว์และมนุษย์ สายพันธุ์ที่มีบทบาทก่อโรคในมนุษย์มากที่สุดคือ *S. equisimilis* ในคนปกติพบเชื้อนี้เป็นเป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ในทางเดินหายใจส่วนบนและสามารถแยกเชื้อจากสายพันธุ์ดังกล่าวได้จากม้า หมู วัว และมนุษย์ที่เป็นโรคโดยก่อโรคลำคออักเสบ โลหิตเป็นพิษหลังคลอด เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ กระแสเลือดที่มีการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ภาวะการอักเสบของไขกระดูก การเกิดฝีในสมอง การเป็นแผลหลังผ่าตัด และปอดบวม เป็นต้น แต่ไม่พบว่า GCS ก่อให้เกิดโรคไข้รูห์มาติก คออักเสบที่เกิดร่วมกับไตอักเสบอย่างเฉียบพลัน ในการรักษาใช้ยาต้านจุลชีพเช่นเดียวกับ GAS (Jokilk และคณะ, 1992)

Group G streptococci (GGS)

สัณฐานวิทยา และการก่อโรค

ได้แก่ *S. anginosus, S. milleri* และ *S. canis* สามารถสร้าง streptokinase ได้ แต่ streptokinase นั้น ไม่มีความสำคัญในทางอิมมูโนวิทยา (Freeman, 1979) จึงไม่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรค พบเป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่บริเวณลำคอ อวัยวะสืบพันธุ์ ระบบทางเดินอาหารและผิวหนัง แต่ในบางครั้ง GGS ก็อาจก่อโรคขึ้นได้เช่น เจ็บคอ คอหอยอักเสบ ลิ้นหัวใจอักเสบ เนื้อเยื่ออักเสบ ผิวหนังอักเสบรุนแรง มีหนอง ซึ่งพบมากเป็นอันดับสองรองจาก GAS รวมทั้งโรคติดเชื้อในกระดูกและข้อ ซึ่งบ่อยครั้งที่ไม่อาจรักษาได้ด้วยยาเพนนิซิลินเพียงอย่างเดียว ต้องมีการเพิ่มเจนตาไมซินด้วย นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคไฟลามทุ่ง ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดในผู้ใหญ่ที่มีอายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป (Libertin และคณะ, 1988)

การตรวจหาเชื้อ GGS ไม่สามารถทำได้โดยวิธีทางชีวเคมี ต้องอาศัยวิธีทาง serology เท่านั้น ซึ่งในขณะนี้ยังไม่มีวิธีใดถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย (Nimrat, 1991)

3. วิธีการจำแนกเชื้อ streptococci

streptococci เป็นเชื้อกลุ่มหนึ่งซึ่งสามารถก่อโรคได้ทั้งในสัตว์และในมนุษย์ ดังนั้นวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของ streptococci จึงมีประโยชน์มากในทางการแพทย์ การจำแนกชนิดของ streptococci นี้มีหลายวิธีโดยอาศัยคุณสมบัติดังนี้คือ ลักษณะสัณฐานวิทยา ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ ความจำเพาะทางเซรุ่มวิทยาต่อ group-specific substance และแอนติเจนอื่น ๆ ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์และอื่น ๆ (Jawetz และคณะ, 1989) แต่ในปัจจุบันนี้การตรวจสอบเชื้อในทางคลีนิกเพื่อทำให้สามารถทราบว่าผู้ป่วยนั้นมีการติดเชื้อเนื่องจาก streptococci สายพันธุ์ใดนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง จึงได้มีการพัฒนาวิธีการต่าง ๆ มากมายซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นวิธีการที่อาศัยหลักการตกตะกอน ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อกัน รายละเอียดในการจำแนกชนิด streptococci มีดังนี้

3.1 การจำแนกชนิดโดยอาศัยความแตกต่างในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar มี 3 แบบดังนี้

3.1.1 beta-hemolytic streptococci (β-hemolytic) เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ hemolysin ออกมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์บน blood agar จึงเห็นเป็นวงใสรอบ ๆ โคโลนี เชื้อที่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบนี้ได้ ได้แก่ *S. pyogenes, S. agalactiae,* group C และ G streptococci ทุกสายพันธุ์ และในบางสายพันธุ์ของ group D, E, F, H และ K-U streptococci (Jawetz และคณะ, 1989)

3.1.2 alpha-hemolytic streptococci (α-hemolytic) เชื้อมีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ รอบ ๆ โคโลนีมีลักษณะเป็นวงสีเขียวน้ำตาล ขนาดของวงเล็กกว่าในกลุ่ม β-hemolytic เชื้อที่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงลักษณะนี้ได้แก่ *S. viridans* และในบางสายพันธุ์ของ *S. dysgalactiac* (Jokilk และคณะ, 1992)

3.1.3 gamma-hemolytic streptococci (γ-hemolytic) เชื้อไม่มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้เลย บริเวณรอบ ๆ โคโลนีจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ (Sherris และคณะ, 1991)

3.2 การจำแนกชนิดโดยอาศัยปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี้ มีรายละเอียดดังนี้

3.2.1 วิธี Lancefield precipitation วิธีนี้อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนชนิด group-specific ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์กับแอนติบอดี้ ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันในตอนแรกต้องมีการสกัดแอนติเจนด้วยความร้อนตามวิธีของ Rantz และ Randall จากนั้นนำแอนติเจนที่สกัด

ได้มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี้ที่บรรจุอยู่ในหลอดคะปิลลารี ถ้ามีความจำเพาะต่อกันจะเกิดการตกตะกอนในรูป antigen - antibody complex

3.2.2 วิธี Fluorescent antibody วิธีนี้อาศัยหลักการให้แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี้ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แล้วนำมาส่องภายใต้กล้อง fluorescent microscope เพื่อดูการเรืองแสง วิธีนี้ให้ผลการจำแนกได้ถูกต้องแน่นอน ใช้เวลาเพียง 6 ชั่วโมง สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว

3.2.3 วิธีใช้ Packed identification kit เป็นวิธีการซึ่งพัฒนาขึ้นมาให้มีความสะดวกรวดเร็วในการตรวจสอบยิ่งขึ้น โดยอาศัยหลักการหลายหลักการ เช่น วิธี API 20 อาศัยหลักการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ วิธี Phadebact latex agglutination และวิธี Streplex อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี้

3.2.4 วิธี Coagglutination kit (CoA kit) เป็นวิธีทาง serology ในการจำแนกเชื้อ streptococci โดยมีหลักการคือ เคลือบ *Staphylococcus* สายพันธุ์ Cowan I ด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Streptococci* กรุ๊ฟ A, B, C, D, F หรือ G (Difco และ Wellcome) ซึ่งส่วน Fc ของแอนติบอดีเกาะอยู่กับเชื้อ *Staphylococcus* ซึ่งได้ผ่านขั้นตอนของ ฟอร์มัลดีไฮด์ และขบวนการให้ความร้อน ส่วน Fab ของแอนติบอดียื่นออกมาเพื่อจับกับแอนติเจน (Nimrat, 1991) สำหรับวิธีที่ใช้ในการสกัดแอนติเจน (C-carbohydrate group specific antigen) ออกมาจากเชื้อ *Streptococcus* มีหลายวิธีเช่น การสกัดโดยใช้ hydrochloric acid (Lancefield' s method) สกัดโดยใช้ formamide (Fuller' s method) สกัดโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *S. albus* สกัดโดยวิธี autoclaving หรือสกัดโดยการย่อยด้วย phage lysin แต่วิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปคือ วิธีของ Lancefield และ วิธี autoclaving (นรีกุล และคณะ, 2536)

3.3 การจำแนกชนิดโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี

เชื้อ strertococci แต่ละกลุ่มมีขบวนการเมตาบอลิซึมในการสร้างหรือสลายสารชนิดต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน จึงนำคุณสมบัติดังกล่าวมาใช้ในการจำแนก streptococci ชนิดต่าง ๆ ออกเป็นหมวดหมู่จนถึงระดับชนิด (species) เช่น การพิสูจน์เชื้อ GAS ใช้วิธี bacitracin susceptibility test และการพิสูจน์เชื้อ GBS ใช้วิธี hippurare hydrolysis และ Co-trimoxazole susceptibility test เป็นวิธีที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ group A และ B ส่วนเชื้อ GCS และ GGS นั้นไม่สามารถพิสูจน์ด้วยวิธีการทางชีวเคมีได้ต้องอาศัยวิธีทาง serology streptococci เท่านั้น

3.3.1 Bacitracin susceptibility test เป็นวิธีการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียชนิด β-hemolyticGAS โดยดูความสามารถในการถูกยับยั้งการเจริญและทวีจำนวนด้วย bacitracin การทดสอบทำโดยบ่มเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน blood agar โดยใช้ไม้พันสำลีป้ายเชื้อให้ทั่ว

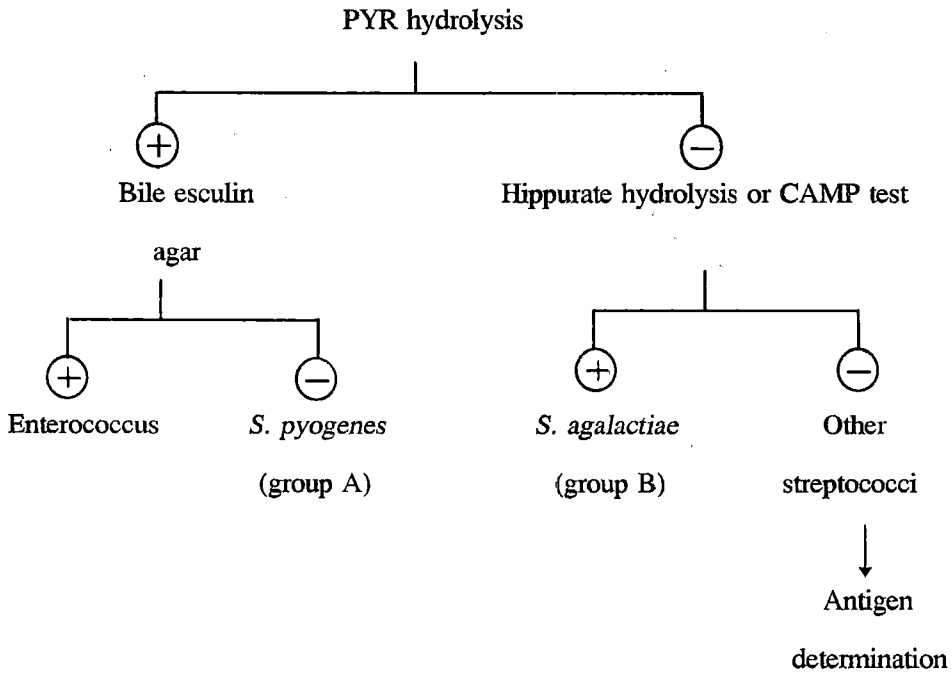
จานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อคีบ bacitracin disk วางบนอาหารเลี้ยงที่มีเชื้ออยู่ ใช้ปากคีบกดเบา ๆ เพื่อให้แผ่นยาติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล ถ้าเกิดบริเวณใสรอบแผ่น disk ที่วางลงไปจะกว้างเท่าใดก็ถือว่าเป็นผลบวก

3.3.2 Hippurate hydrolysis test เป็นวิธีทดสอบความสามารถของเชื้อในการที่จะสลาย sodium hippurate โดยเอนไซม์ hippurate hydrolase หรือ hippuricase ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม GBS โดยที่สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *S. agalactiac* สามารถสลาย hippurate ได้ จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกออกจาก β-hemolytic streptococci ซึ่งไม่สามารถสลาย hippurate ได้

3.3.3 Co-trimoxazole susceptibility test เป็นการทดสอบคุณสมบัติของ β- hemolytic GAS และ GBS โดยดูจากความสามารถในการถูกยับยั้งการเจริญ และการทวีจำนวนด้วย Co-trimoxazole (SXT) โดย SXT ประกอบไปด้วย sulfonamides, sulfamethoxazole (23.75 ไมโครกรัม/ดิสก์) และ trimethoprim (1.25 ไมโครกรัม/ดิสก์) ซึ่ง group A และ B ดื้อต่อ SXT แต่ non-group A หรือ non group B ชนิด β-hemolytic จะถูกยับยั้ง การอ่านผลนั้นถ้ามีบริเวณใสเกิดขึ้นให้ถือว่าเป็นผลบวก

3.3.4 PYR test เป็นวิธีการแยกเชื้อ streptococci เริ่มแรกก่อนการใช้วิธี bacitracin susceptibility test โดยสังเกตการ hydrolysis ของ L-pyrolidonyl-beta-naphthylamide ซึ่งแม่นยำมาก พบโดย Facklam และคณะ (1982) เมื่อเกิดการ hydrolysis ของ PYR จะสามารถตรวจสอบ beta-naphthylamine ที่ปล่อยออกมาอย่างอิสระโดยการใช้ PYR reagent (N, N-dimethylaminocinnamaldehyde) ที่มี detergent อยู่ด้วย หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญโดยตรง โคโลนีที่ให้ผลบวกจะเห็นสีแดงเชอร์รี่เกิดขึ้นภายใน 2 นาที ถ้ามีสีส้มจาง ๆ แสดงว่าเป็นผลลบ GAS และกลุ่ม enterococci ทุกสายพันธุ์จะให้ผลบวก วิธีการทดสอบนี้มีความจำเพาะสูงมาก

สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม β-hemoytic streptococci เป็นไปดังภาพที่ 3 และการจำแนก streptococci โดยอาศัยขบวนการเมตาบอลิซึมเป็นไปดังตารางที่ 2



ภาพที่ 3 ไดอะแกรมแสดงการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม beta-hemolytic streptococci

ที่มา : Finegold และ Ellen, 1986

ตารางที่ 2 การจำแนก streptococci โดยอาศัยขบวนการเมตาบอลิซึม

Streptococcus species	Hemolysis	Growth			Hydrolysis of			LPC group antigen
		10 C	45 C	6.5%NaCl	Hippurate	Arginine	Bile esculin	
*S. pyogenes**	β	−	−	−	−	+	−	A
S. agalactiae	β	−	−	−	+	+	−	B
S. zooepidemicus	β	−	−	−	−	+	−	C
S. equisimilis	β	−	−	−	−	+	−	C
S. equi	β	−	−	−	−	+	−	C
S. dysgalactiae	α	−	−	−	V	+	−	C
S. faecium	α, NH	+	+	+	V	+	+	D
S. faecalis	α β, NH	+	+	+	+	+	+	D
S. durans	α β, NH	+	+	+	V	+	+	D
S. avium	α, NH	−	+	+	−	−	+	D
S. bovis	NH	−	+	−	V	−	+	D
S. equinus	α	−	+	−	−	−	+	D
S. sanguis	α	−	−	−	−	+	−	H

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Streptococcus species	Hemolysis	Growth			Hydrolysis of			LPC group antigen
		10 C	45 C	6.5%NaCl	Hippurate	Arginine	Bile esculin	
S. anginosus	α	−	−	−	−	+	−	F,G
S. mitis	α	−	+	−	−	V	−	O,None
S. salivarius	α, NH	−	+	−	−	−	−	K, None
S. mutans	α, NH	−	−	−	−	−	−	None
S. milleri	α, NH	−	−	−	−	+	−	Varies
S. pneumoniae II	α	−	−	−	−	+	−	None
S. lactis	α, NH	−	−	−	−	+	−	None

* Susceptible to bacitracin

Produces CAMP factor

\+ positive ; − negative

V = variable hemolity ; NH = monhemolity

II = Bile soluble ; optochin sensitive

LPC = Lancefield precipitation

None = No reaction

Varies = Cross reaction

ที่มา : Freeman, 1985

2491961

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

4. รายงานการวิจัยเกี่ยวกับวิธีการตรวจสอบเชื้อ streptococci กรุฟต่าง ๆ

สุบัณฑิต (2533) ได้พัฒนาวิธี coagglutination kit ซึ่งใช้น้ำยาที่สามารถเตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียของโรงพยาบาลศิริราชที่ใช้สำหรับวินิจฉัย group A, B, C, D, F และ G streptococci ระยะเวลาที่ใช้ในการวินิจฉัยคือ 24 ชั่วโมง วิธี coagglutination kit ถูกนำมาเปรียบเทียบวิธี Lancefield precipitation และวิธีการชีวเคมีในการพิสูจน์เชื้อ streptococci หลักการของ coagglutination kit คือเคลือบเซลล์ของ *Staphylococcus* สายพันธุ์ Cowan I ด้วยแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ group A, B, C, D, F และ G streptococci โดยส่วน Fc ของแอนติบอดี้เกาะอยู่กับเชื้อ *Staphylococcus* ซึ่งได้ผ่านขั้นตอนของฟอร์มัลดีไฮด์และขบวนการความร้อน ส่วน Fabของแอนติบอดี้ยื่นออกมาเพื่อจับกับแอนติเจน การสกัดแอนติเจนใช้วิธี modified micronitrous acid ซึ่งใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า 20 นาที นับตั้งแต่ได้เชื้อจากจานเพาะเชื้อ coagglutination kit ที่พัฒนาขึ้นได้ผลดีพบว่ามีความไว 96.1% และความจำเพาะ 95.1% ส่วนความไวของวิธีทางชีวเคมีทั้ง 3 วิธี มีความไว 80.5% และความจำเพาะ 89.0% สำหรับวิธี bacitracin susceptibility, hippurate hydrolysis test และ bile esculin test มีความไวเท่ากับ 86.7%, 60% และ 90% และมีความจำเพาะเท่ากับ 97.8%, 100% และ 98.6% ตามลำดับ ดังนั้นวิธี coagglutination kit ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์เชื้อแทนวิธีการทางชีวเคมีดังกล่าวได้ โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถประหยัดค่าใช้จ่าย ทำการทดลองได้ง่าย รวดเร็วและสามารถเชื่อถือได้

Gunn และคณะ (1977) ศึกษาการใช้อาหาร sheep blood agar ที่มีการเติมยาต้านจุลชีพได้แก่ sulfamethoxazole 23.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ trimethoprim 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการใช้อาหาร sheep blood agar ที่ไม่มีการเติมยาต้านจุลชีพในการจำแนกเชื้อ group A และ B streptococci จากลำคอ พบว่าในอาหารที่มีการเติมยาต้านจุลชีพดังกล่าว เชื้อ group A และ B สามารถเจริญได้ดี แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อพวก normal flora รวมทั้งเชื้อ streptococci กลุ่ม viridans จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้จากลำคอ 700 ตัวอย่าง พบว่าในอาหารที่มีการเติมยาปฏิชีวนะสามารถจำแนก GAS ได้มากกว่า 42% และ GBS มากกว่า 49% ซึ่งมากกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ และการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ใช่ streptococci ในอาหารที่มีการเติมยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดคิดเป็น 83%

Slifkin และคณะ (1978) ใช้วิธี phadebact streptococcus test ในการจำแนกเชื้อ beta-hemolytic streptococci โดยใช้ระยะเวลาต่างกันคือ 4 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลกับวิธี Lancefield precipitation test วิธี phadebact streptococcus test ทำโดยสังเกตการตกตะกอนบนแผ่นสไลด์ระหว่างโคโลนีของเชื้อที่ได้จากจานเพาะเชื้อ กับ phadebact reagent จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อจำนวน 200 isolates เมื่อใช้เวลา 4 ชั่วโมงในการตรวจสอบ พบว่าให้ผลบวกเพียง 192

ตัวอย่าง แต่เมื่อใช้เวลา 24 ชั่วโมง ในการตรวจสอบให้ผลบวกทั้งหมด ต่อมา Slifkin และ Interval (1980) ใช้ phadebact streptococcus test reagent ร่วมกับการสกัดแอนติเจนด้วยวิธีต่าง ๆ คือ micronitrous acid extraction, autoclave และใช้ lysozyme ที่สกัดได้จากเชื้อ *Streptomyces albus* พบว่าใช้ micronitrous acid extraction เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่สุด กล่าวคือ เมื่อนำแอนติเจนที่สกัดได้มาทำการทดสอบด้วยวิธี coagglutination ให้ผลการทดสอบที่มีความจำเพาะมากที่สุด และต่อมา Slifkin และ Gil (1982) ใช้วิธีการสกัดแอนติเจนด้วยวิธี microtechnique ร่วมกับวิธี Phadebact coagglutination ในการตรวจสอบเชื้อ group A beta-hemolytic streptococci จาก swab ลำคอ จำนวน 373 ตัวอย่าง วิธีดังกล่าวให้ผลความน่าเชื่อถือ 96% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

El Kholy และคณะ (1978) ใช้วิธี microtechnique (modified nitrous acid extraction) ในการตรวจสอบตัวอย่างจำนวน 150 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยซึ่งมีอาการต่อมทอมซินอักเสบชนิดรุนแรง โดยการตรวจเชื้อ group A streptococci ในเวลา 30 นาที ผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ไม่พบว่าเกิด cross reaction จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธี nitrous acid extraction สามารถสกัด polysaccharide ได้มากกว่าวิธี Lancefield hot HCI และ Fuller formanide 3-4 เท่า การใช้วิธี microtechnique สกัดแอนติเจนจะให้แอนติเจนที่มีความเข้มข้นถึง 20 เท่า ต่อมา Gerber (1983) ใช้วิธี micronitrous acid extraction-coagglutination ในการตรวจหาเชื้อ streptococci ที่ก่อให้เกิดโรคลำคออักเสบ วิธีการดังกล่าวสามารถทำได้ในระดับคลีนิก วิธีการทำได้ง่าย รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย มีความไวคิดเป็น 78% และความจำเพาะคิดเป็น 98% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน blood agar

Stoner (1978) ใช้วิธี bacitracin susceptibility test และ coagglutination ในการจำแนกเชื้อ group A streptococci ขั้นต้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะใช้วิธี bacitracin ในการบ่งชี้ group A ซึ่งสังเกตได้จาก zone ที่เกิดขึ้นจะมีความกว้าง 10 มิลลิเมตร หรือมากกว่า ส่วนการใช้วิธี coagglutination ในการบ่งชี้ขั้นต้นนั้นให้ผลเช่นเดียวกับวิธี bacitracin แต่มีข้อจำกัดในการตรวจสอบเชื้อมากกว่า

Dykstra และคณะ (1979) ศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อ group A streptococci จาก swab ลำคอ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ selective media ได้แก่ blood agar ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ sulfamethoxazole และ trimethoprim ความเข้มข้น 23.75 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ nonselective media ได้แก่ blood agar นำอาหารแต่ละชนิดไปบ่มเพาะเชื้อในสภาวะมีอากาศ และไร้อากาศเปรียบเทียบกัน พบว่าในอาหาร blood agar ที่บ่มในสภาวะมีอากาศ พบ group A เพียง 63% ส่วนในสภาวะไร้อากาศพบ group A ถึง 98% ในอาหาร blood

agar ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะบ่มในสภาวะมีอากาศพบ group A 70% แต่เมื่อบ่มในสภาพไร้อากาศ พบ group A 84%

Carlson และ McCarthy (1979) ได้พัฒนาวิธี coagglutination ในการตรวจสอบเชื้อ streptococci เรียกชื่อวิธีนี้ว่า modified coagglutination procedure (MCAP) วิธีการทำโดยสกัดแอนติเจนจากเชื้อ โดยใช้ lysozyme ที่ได้จาก *Streptomyces albus* ทำการสกัดแอนติเจนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่น นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบกับ *Staphylococcus* สายพันธุ์ cowan I ที่เคลือบด้วยแอนติซีรั่มต่อ group A, B, C, D, F หรือ G streptococci บนแผ่นสไลด์แก้ว เพื่อดูการเกิด coagglutination ผลบวกจะเกิดภายใน 30 วินาที เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี Lancefield precipitation ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐาน พบว่าจากเชื้อจำนวน 102 สายพันธุ์ วิธี Lancefield precipitation ตรวจสอบเชื้อได้เพียง 100 สายพันธุ์ ส่วนวิธี MCAP ตรวจสอบเชื้อได้ทั้งหมด 102 สายพันธุ์ โดยค่าความถูกต้องในการตรวจสอบคิดเป็น 95.9%

Facklam และคณะ (1979) ใช้วิธีการพิสูจน์ขั้นต้น (presumptive identification) ในการพิสูจน์เชื้อ group A, B และ D streptococci อันได้แก่ ปฏิกิริยาการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic reaction) ความไวต่อยา bacitracin และยา sulfamethoxazole ผสมกับ trimethoprim ความเข้มข้น 1.25 และ 23.75 ไมโครกรัม การเกิดปฏิกิริยา CAMP บนอาหาร sheep blood trypticase soy agar, bile-esculin test และ 6.5% NaCl agar tolerance นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 2 สภาวะ คือ ใน candle jar และสภาวะปกติ เมื่อบ่มใน candle jar พบ group A 98.9% group B 95.3% non group A, B และ D แต่เป็นชนิด beta-hemolytic 100% group D enterococci 92.3% group D nonenterococci 100% และ viridans streptococci 92.8% และเมื่อบ่มในสภาวะปกติพบ group A 98.1% group B 98.6% non group A, B และ D แต่เป็นชนิด beta-hemolytic 99.2% group D entercocci 97.5% group D nonenterococci 97.6% และ viridans 92.4%

Baron และ Gates (1979) ใช้วิธี two-disk system ในการพิสูจน์เชื้อ group A beta-hemolytic streptococci จาก primary plate ที่มี trimethoprim-sulfamethoxazole ผสมอยู่ ช่วยให้เชื้อ group A เจริญได้แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม normal flora วิธีการทดลองทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร trypticase soy agar plates ซึ่งมีเลือดแกะ 5% ผสมอยู่ จากนั้นวาง disk ยา trimethoprim-sulfamethoxazole ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้ออยู่ และวาง diste ยา bacitracin ความเข้มข้น 0.04 unit ให้มีระยะห่างพอสมควร ตัวควบคุมที่ใช้ได้มาจากการนำ swab ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Todd-Hewitt broth จากนั้นนำเซลล์ของเชื้อมาทำการย้อมสีแล้วดูภายใต้กล้อง fluorescent microscope จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มเชื้อ overnight จะทราบผลบวกได้เพียง 75% ของตัวอย่างทั้งหมด 259 ตัวอย่าง และอีก 25% ต้องใช้เวลาในการบ่มนานกว่าจึงจะ

ทราบผล และเมื่อนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับวิธีการมาตรฐานคือ fluorescent antibody technique พบว่าให้ผลบวกคิดเป็น 91% ดังนั้นวิธี two-disk system จึงจัดเป็นวิธีที่มีความรวดเร็วในการตรวจสอบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (standard plate method) และประหยัดกว่าวิธี fluorescent antibody

Rose และคณะ (1980) ได้ทำการแยกเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ซึ่งเป็นเชื้อ group C pneumonia จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ ได้แก่ pleural fluid, empyema, sputum, transtracheal aspirates และเลือดจากผู้ป่วยในระยะที่มีการติดเชื้อและในระยะพักฟื้น จากนั้นนำมาจำแนก group ด้วยวิธี Lancefield precipitation พบว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* นั้นพบได้ในม้า ดังนั้นการตรวจพบเชื้อนี้ในคนก็สืบเนื่องมาจากคนได้รับเชื้อนี้จากม้านั่นเอง

Engel และ Silfhout (1981) ได้พัฒนาวิธี coagglutination kit ในการพิสูจน์เชื้อ group A, B, C และ G streptococci จำนวน 274 สายพันธุ์ จาก primary plate โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation พบว่า group A, B, C และ G มีความถูกต้อง 100% ส่วน group D และ F ไม่เกิดปฏิกิริยากับ reagent group D และ F

Edwards และคณะ (1982) ได้ทำการแยกเชื้อ group A streptococci จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยตรง ด้วยวิธี Streptex group A ควบคู่ไปกับวิธีมาตรฐานคือการเพาะเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารแข็ง การทดสอบความไวต่อยา bacitracin และวิธี Lancefield precipitation test พบว่าจาก จำนวน 53 ตัวอย่าง เกิดผลบวกในวิธี streptex group A และวิธีการมาตรฐานจำนวน 26 ตัวอย่าง เกิดผลบวกเฉพาะวิธีมาตรฐาน 5 ตัวอย่าง เกิดผลบวกเฉพาะวิธี streptex group A 3 ตัวอย่าง และเกิดผลลบทั้ง 2 วิธี 19 ตัวอย่าง

Otero และคณะ (1983) ตรวจหาเชื้อ streptococci จาก swab ลำคอผู้ป่วยโดยตรง วิธีการนี้ทำโดยนำไม้ swab จุ่มลงใน lytic extract ซึ่งได้จากเชื้อ *Streptomyces griseus* จากนั้นนำส่วน supernatant มาทดสอบการเกิด coagglutination พบว่าจากทั้งหมด 580 ตัวอย่าง เมื่อนำผลมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ให้ผลบวก 49 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 480 ตัวอย่าง และจากการทดลองนี้สรุปได้ว่าการตรวจสอบเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจควรทำภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากได้รับสิ่งส่งตรวจผลจึงจะเป็นที่เชื่อถือได้

Miller และคณะ (1984) ใช้วิธี Group A strep test kit ในการตรวจสอบเชื้อ group A streptococci โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจคือ swab ลำคอ จำนวน 147 ตัวอย่าง นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งและวิธี Lancefield serological grouping test พบว่าให้ผลลบ 121 ตัวอย่าง (98%) และให้ผลบวก 21 ตัวอย่าง (91%) โดยถ้าตัวอย่างใดมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 10 โคโลนี จะไม่นำมาตรวจสอบ วิธี Group A strep test kit เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการ

ปฏิบัติ อ่านผลง่าย มีความน่าเชื่อถือ ภายในระยะเวลา 65-70 วินาที จะสามารถทราบผลได้ พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์น้อยมาก หรือแทบไม่เกิดเลย

Carlson และคณะ (1985) ใช้อาหาร selective group A streptococcus agar (SSA) ซึ่งเป็น selective media ในการจำแนกเชื้อ group A beta-hemolytic (GABHS) เปรียบเทียบกับอาหาร sheep blood agar (SBA) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งเป็น swab ลำคอ จำนวน 1,116 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อ GABHS จำนวน 265 ตัวอย่าง และเมื่อใช้วิธี bacitracin disk susceptibility test ตรวจสอบเชื้อในอาหาร SSA และ SBA พบว่าเป็น GABHS 549 ตัวอย่าง คิดเป็น 81.4% และ 44.2% ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี coagglutination พบว่าเป็น GABHS จำนวน 120 ตัวอย่าง ข้อดีของอาหาร SSA คือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ normal respiratory flora ได้ และส่งเสริมการเจริญของเชื้อ GABHS ทำให้วิเคราะห์ผลได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

Chang และ Mohla (1985) ใช้วิธี 10-min latex agglutination test kit หรือ อีกชื่อหนึ่งว่า Culturette Brand Ten-Minute Group A Strep ID ในการตรวจสอบเชื้อ group A beta-hemolytic streptococcus จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากลำคอโดยตรง จำนวน 435 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธี latex agglutination ให้ผลบวก 90% และมีความจำเพาะ 99.2% และต่อมา Miccika และคณะ (1985) ได้ใช้วิธีการเดียวกันนี้ในการตรวจสอบเชื้อ group A streptococci จากสิ่งส่งตรวจจำนวนมากกว่า 800 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลความไว 92.4% และความจำเพาะ 92.8%

Lebrun และคณะ (1986) ทำการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและตรวจหาส่วน Fc receptor ของเชื้อ streptococci ชนิด beta-hemolytic จากการแยกเชื้อจำนวน 52 isolate จากลำคอ พบว่าเป็น *Streptococcus millen* 38 ชนิด และ *S. equisimills* 14 ชนิด การจำแนกเชื้อ *S. equisimilis* ออกจาก *S. millen* ทำได้โดยตรง ชนิดของแอนติเจนของเชื้อโดยการวัดขนาดของ zone ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร sheep blood agar ที่บ่มในสภาวะไร้อากาศและการตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี ได้แก่ Vogesum - Proseauer test ส่วนการตรวจหา Fc receptor ของเชื้อทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ *S. equisimilis* เป็นเชื้อที่พบได้ในผู้ป่วยโรคลำคออักเสบ จึงปรากฏส่วน Fc receptor สำหรับเชื้อ *S. milleri* นั้นแยกได้จากคนปกติจึงไม่ปรากฏส่วนของ receptor นี้

Hayden และคณะ (1992) ใช้วิธี latex agglutination ในการตรวจสอบเชื้อ group C beta-hemolytic streptococci ที่ได้มาจากการแยกเชื้อจาก swab ลำคอของนักศึกษาซึ่งมีอาการของโรคคอหอยอักเสบจำนวน 403 ราย พบว่าการตรวจสอบด้วยวิธีนี้มีความไวน้อยมากเพียง 34.4% แต่มีความจำเพาะสูง คิดเป็น 98.4% จึงได้มีการปรับปรุงวิธีการนี้ให้มีความไวมากขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนโคโลนีที่จะนำมาทดสอบ

Harbeck และคณะ (1993) ใช้วิธี optical immunoassay (strep A OIA) ซึ่งเป็น rapid method วิธีหนึ่งที่นำหลักการทางอิมมูโนวิทยามาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนชนิดคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ group A streptococci จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง โดยอาศัยหลักการเรืองแสงส่องผ่านแผ่นฟิล์มบาง ๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยตาเปล่า การศึกษาทำโดยนำสิ่งส่งตรวจจากลำคอจำนวน 1,275 ตัวอย่าง มาทำการตรวจหาแอนติเจนของ group A เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธี OIA ให้ผลบวกมากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบน selective agar, trypticase soy agar ผสมเม็ดเลือดแกะ หรือ enriched broth โดยมีความไว และความจำเพาะเป็น 97.4% และ 95.6% และพัฒนาต่อมาจนมีความไว และความจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 98.9% และ 98.6% วิธีการนี้ง่ายในการสังเกตผล อีกทั้งให้ความไว และความจำเพาะที่ยอมรับได้

Heiter และ Bourbeau (1993) ใช้วิธี Gen-Probe Group A Streptococci Direct Test (GP-ST) ซึ่งเป็นวิธีใหม่ โดยใช้ probe เป็น nucleic acid ในการพิสูจน์เชื้อ group A streptococci โดยตรงจาก swab ลำคอของผู้ป่วย เปรียบเทียบความไว และความจำเพาะกับวิธีการเลี้ยงเชื้อในblood agar และวิธี Test Pack Strep A Assay โดยทดสอบจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 1,103 ตัวอย่าง ให้ผลความไว และความจำเพาะดังนี้ วิธีการเลี้ยงเชื้อบน blood agar 99.5% และ 100% วิธี Test Pack Strep A Assay 76.3% และ 99.7% วิธี GP-ST 93.5% และ 99.7% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธี GP-ST มีประสิทธิภาพดี และสามารถนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อแทนการเพาะเลี้ยงเชื้อบน blood agar ได้

Steed และคณะ (1993) ใช้วิธี chemiluminescent DNA probe test ในการตรวจสอบ cRNA ของเชื้อ *Streptococcus pyogenes* จาก swab ลำคอโดยตรง จำนวน 277 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลกับวิธีการเลี้ยงเชื้อบน blood agar พบว่า เมื่อใช้วิธี DNA probe จะให้ผลบวกจำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อใช้ DNA probe ร่วมกับวิธีการเลี้ยงเชื้อบน blood agar ให้ผลบวก 57 ตัวอย่าง และเมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบน blood ager เพียงอย่างเดียวให้ผลบวก 8 ตัวอย่าง และเมื่อศึกษาความไว และความจำเพาะ ผลบวก และผลลบ ของวิธี DNA probe ให้ผลดังนี้คือ 90%, 98%, 93% และ 97% ตามลำดับ และยังพบว่ามีจำนวน 24 ตัวอย่าง ซึ่งไม่ใช่เชื้อ *S. pyogenes* เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี DNA probe ไม่สามารถทำได้ ดังนั้นวิธี chemilnuminescent DNA probe test จึงจัดว่าเป็นวิธีหนึ่งซึ่งมีความไว ความจำเพาะ และรวดเร็วในการตรวจสอบ *S. pyogenes*

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. สิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจที่นำมาศึกษา ได้แก่ ปัสสาวะ เสมหะ หนอง ป้ายจากบาดแผล ป้ายจากช่องคลอด และสาย cut down จากผู้ป่วยโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี จำนวนทั้งสิ้น 312 ตัวอย่าง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2538 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2538 รวมระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง 3 เดือน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อใช้สำหรับแยกเชื้อบริสุทธิ์

2.1.1 blood agar

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับเก็บเชื้อ

2.2.1 Stock- culture medium

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ Lancefield precipitation

2.3.1 Todd- Hewitt broth + Neopeptone 1.0%

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อใช้สำหรับทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพ

2.4.1 Tryptic soy broth

2.4.2 Mueller - Hinton blood agar

3. สารเคมี (ภาคผนวก ข)

3.1 สารเคมีสำหรับย้อมสีแกรม

3.1.1 crystal violet

3.1.2 gram's iodine

3.1.3 alcohol 95%

3.1.4 safranin

3.2 reagent สำหรับสกัดแอนติเจน

3.2.1 0.2 m. sodium nitrite

3.2.2 0.7 m. glacial acetic acid

3.2.3 0.25 m. sodium bicarbonate

3.3 0.5 m. phosphate buffer saline (PBS)

3.4 0.85% NaCl

3.5 3% hydrogen peroxide (H_2O_2)

4. Antiserum

antiserum ผลิตจากบริษัท Difco (Difco Laboratories Detroit Michigan USA.)

5. เชื้อแบคทีเรีย

Staphylococcus aureus Cowan I จากบริษัท Sigma Chemical

Streptococci กรุ๊ฟเอ บี ซี และจี, *S. aureus, E. coli* จากศูนย์ streptococci จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อมี 16 ชนิด ได้แก่

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)
6.1 Penicillin G (P)	10
6.2 Bacitracin (B)	10
6.3 Ampicillin (AM)	10
6.4 Trimethoprim- Sulfamethoxazon (SXT)	20
6.5 Erythromycin (E)	15
6.6 Gentamicin (GM)	10
6.7 Cephalothin (CR)	30
6.8 Cefotaxime (CXT)	30
6.9 Cefuroxime (CXM)	30
6.10 Tetracycline (TE)	30
6.11 Neomycin (N)	30
6.12 Chloramphenicol (C)	30
6.13 Streptomycin (S)	10
6.14 Kanamycin (K)	30
6.15 Colistin (CL)	10
6.16 Nalixilic acid (NA)	30

วิธีการทดลอง

นำสิ่งส่งตรวจมา 2 swab หรือแบ่งสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ ออกเป็น 2 ส่วน โดย swab ที่ 1 หรือส่วนที่ 1 สำหรับการแยกเชื้อบริสุทธิ์และ swab ที่ 2 หรือส่วนที่ 2 สำหรับการทดสอบวิธี coagglutination kit (CoA kit)

1. การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

นำสิ่งส่งตรวจมาเพาะเลี้ยงบน blood agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ใน candle jar นาน 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีของ streptococci จะมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ใส มี alpha, beta หรือ gramma hemolysin แล้วนำมาย้อมแกรมตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกเชื้อแกรมบวกรูปร่างกลม เรียงต่อกันเป็นสาย นำไปทดสอบ catalase test โดย streptococci จะให้ผลลบ นำเชื้อที่ได้มาทดสอบด้วยวิธี Lancefield precipitation test bacitracin susceptibility test และ coagglutination kit

2. วิธี coagglutination kit

ก่อนทำการทดลองตรวจหาซีโรไทป์ของ *Streptococcus* ด้วยวิธี coagglutination kit จะต้องทดลองหาวิธีการเคลือบ antiserum บน *S. aureus* Cowan I ที่เหมาะสมก่อนโดยดัดแปลงจากวิธีของ CarlSon และ McCarthy (1979) และหาชนิดของน้ำยาสกัด ความเข้มข้น อัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำยาสกัด และวิธีการสกัด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Srifuengfung และคณะ (1991) ในการทดลองจะเลือกตัวแทนของเชื้อกรุ๊ฟต่าง ๆ มาทดสอบกับน้ำยาที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ และเลือกที่เหมาะสมที่สุด หลังจากนั้นจึงนำมาทดสอบกับสิ่งส่งตรวจ วิธีการและสารสกัดที่จะกล่าวต่อไปนี้ผ่านการทดลองแล้วว่าเหมาะสมที่สุด

การเตรียม coagglutination kit

2.1 *S. aureus* Cowan I

2.2 การเคลือบ antiserum บน *S. aureus* Cowan I (Sensitized staphylococcal suspension) ดัดแปลงจากวิธีของ CarlSon และ McCarthy (1979)

เติม 10% (v/v) treated *S. aureus* Cowan I ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใน antiserum กรุ๊ฟ เอ บี ซี และจี 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ต่อมานำมาเจือจางด้วย PBS ให้มี sensitized staphylococcal suspension เข้มข้น 5% (v/v) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้

2.3 การเตรียมน้ำยา (reagent) สำหรับสกัดแอนติเจน ดัดแปลงจากวิธีของ Srifuengfung และคณะ (1991)

น้ำยาสำหรับสกัดแอนติเจนที่ให้ผลดีที่สุด คือ

ขวดที่ 1 0.2 M. Sodium nitrite

ขวดที่ 2 0.7 M. glacial acid

ขวดที่ 3 0.25 M. sodium bicarbonate

2.4 วิธีการสกัดแอนติแจนโดย micronitrous acid ดัดแปลงจากวิธีของ Srifuengfung และคณะ (1991)

นำสิ่งส่งตรวจส่วนที่ 2 ใส่หลอดแก้วที่มีน้ำยาจากขวดที่ 1 จำนวน 10 ไมโครลิตร ต่อมาหยดน้ำยาขวดที่ 2 จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกันตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อสกัดแอนติเจนจากเชื้อ เมื่อครบเวลาเติมน้ำยาขวดที่ 3 จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อหยุดปฏิกิริยาในการสกัดโดยน้ำยาขวดที่ 1 และ 2 จากนั้น บิด swab กับหลอดแก้วจน สารละลายออกจาก swab หมด เอา swab ทิ้งไป นำหลอดแก้วนั้นมาปั่นที่ ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จะได้ส่วนใสของ extracted antigen นำมาทำปฏิกิริยากับ sensitized staphylococcal suspension

2.5 วิธีการทดสอบโดย coagglutination kit

นำ sensitized staphylococcal suspension 1 loopful ผสมกับ extracted antigen จำนวน 1 looful บนสไลด์แก้ว เอียงสไลด์ไปมานาน 1-2 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาcoagglutination สังเกตผลในกล่องดำ ถ้าพบเป็นตะกอนสีขาว แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดผลบวก แต่ถ้าพบน้ำยาสีใส เหมือนเดิมแสดงว่าเกิดผลลบ โดยมี negative control คือ sensitized staphylococcal suspension ผสมกับ 0.85% NaCl

3. การทดสอบโดยวิธี Lancefield precipitation ดัดแปลงจากวิธีการของ Balow และคณะ (1991)

3.1 การเตรียมแอนติเจนโดยวิธีสกัดด้วยหม้อนึ่งความดัน

นำโคโลนีจาก blood agar plate เพาะลงใน Todd-Heitt broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำ broth ที่มีเชื้อเจริญ มาปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่มีความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เมื่อครบเวลา นำส่วนใสทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 3 ครั้ง นำ pellet cell มาทำเป็นสารละลายด้วย 0.85% NaCl จำนวน 0.5 มิลลิลิตร นำมา สกัดด้วยความร้อนในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสมาทดสอบด้วย specific antiserum กรุ๊ฟเอ บี ซี และจี ด้วยวิธี capillary precipitation test

3.2 การทดสอบโดยวิธี capillary precipitation

นำ capillary tube มาจุ่มใน specific antiserum ของ streptococci กรุ๊ฟเอ บี ซี และจี ให้สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้ทิชชูทำความสะอาดเพื่อมิให้ antiserum ติดอยู่ข้างหลอด capillary tube แล้วจุ่ม capillary tube ลงไปใน extracted antigen จากที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 ให้สูงขึ้นไปอีก 1 เซนติเมตร ใช้ทิชชูทำความสะอาดข้างหลอด แล้วนำ capillary tube ปักบนดินน้ำมันรอให้เกิดปฏิกิริยา นาน 10-30 นาที โดยสังเกตบริเวณรอยต่อ อ่านผลการทดลองในกล่องดำภายในเวลา 30 นาที

4. bacitracin susceptibility test

วิธีการทดสอบทำโดยนำโคโลนีเชื้อจากข้อ 1 ของ swab แรกหรือสิ่งส่งตรวจแรกมาเลี้ยงเชื้อบน blood agar โดย streak ให้ถี่ หรืออาจใช้ swab ป้ายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำแผ่นยาเบซิทราซินวางบนผิวหน้า blood agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ใน candle jar ถ้าเกิด inhibition zone รอบแผ่นยา จะกว้างเท่าใดก็ให้ถือเป็นผลบวก นั่นคือเชื้อที่นำมาทดสอบเป็น GAS แต่ถ้าไม่เกิด inhibition zone แสดงว่าให้ผลลบ

5. การใช้วิธี coagglutination kit ร่วมกับ blood agar

นำโคโลนีจาก blood agar จากข้อ 1 จำนวน 20 โคโลนี มาสกัดแอนติเจนตามข้อ 2.4 และทดสอบด้วยวิธี coagglutination kit ตามข้อ 2.5 เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีตรวจสอบจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง

6. การวิเคราะห์ความไวและความสามารถของวิธี CoA kit

การวิเคราะห์ความไวและความสามารถของวิธี CoA kit โดยเปรียบเทียบกับ วิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ตามภาคผนวก ค

7. การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ

7.1 เขี่ยเชื้อ streptococci 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงใน tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 4-5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2-5 ชั่วโมง

7.2 นำเชื้อมาปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ด้วย TSB

7.3 ใช้ swab ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อใน TSB และบิด swab กับข้างหลอดพอหมาด ๆ นำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton blood agar โดยป้ายเป็น 3 ระนาบ ทิ้งไว้นาน 3-5 นาที เพื่อให้เชื้อซึมลงสู่ผิวอาหาร

7.4 นำ antimicrobial disk วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton blood agar ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 มิลลิลิตร และให้ห่างพอที่จะไม่เกิด inhibition zone มาทับกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone บันทึกผลเป็นมิลลิเมตร นำไปแปลผลตามตารางภาคผนวกที่ 1 (ในภาคผนวก ค) สำหรับแปลผลความไวของเชื้อต่อยาชนิดต่าง ๆ

7.5 ในการทดสอบความไวต่อยาจะต้องมีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบทุกครั้ง โดยใช้เชื้อมาตรฐาน (reference strain) *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งทราบค่า MIC ของยาชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพทุกครั้งที่มีการทดสอบความไวของเชื้อ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS โดยวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

จากการใช้วิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนกซีโรกรุ๊ฟของเชื้อ streptococci จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ จากผู้ป่วยโรงพยาบาลชลบุรี จ. ชลบุรี จำนวนทั้งสิ้น 312 ตัวอย่าง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2538 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ.2538 รวมระยะเวลา 3 เดือน พบเชื้อที่มีลักษณะกลม ใส ขนาดเล็ก และสร้าง hemolysin เมื่อเจริญบนอาหาร blood agar ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมต่อกันเป็นสาย และไม่สร้างเอนไซม์ catalase จำนวน 32 สายพันธุ์ และจำแนกซีโรกรุ๊ฟด้วยวิธี Lancefield precipitation ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS จากสิ่งส่งตรวจต่างๆ โดยใช้วิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	จำนวนสิ่งส่งตรวจ	การจำแนกบน blood agar	จำนวนเชื้อ			
			GAS	GBS	GCS	GGS
ปัสสาวะ	121	4	0	1	0	0
หนอง	55	13	1	0	0	0
เสมหะ	91	6	2	0	0	0
ป้ายจากบาดแผล	17	6	0	0	0	0
สาย cut down	16	0	0	0	0	0
ป้ายจากช่องคลอด	9	3	0	1	0	0
ป้ายจากตา	2	0	0	0	0	0
ป้ายจากหู	1	0	0	0	0	0
รวม	312	32	3	2	0	0

จากการจำแนกเชื้อ streptococci จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 312 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี Lancefield precipitation พบเชื้อกรุ๊ฟเอ 3 ตัวอย่าง โดยพบ 2 ตัวอย่าง จากเสมหะ และพบ 1 ตัวอย่าง จากหนอง พบเชื้อกรุ๊ฟบี 2 ตัวอย่าง โดยพบจากปัสสาวะ และป้ายจากช่องคลอด ไม่พบเชื้อกรุ๊ฟซี และจี

2. การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS โดยแยกเชื้อบนอาหาร blood agar ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี coagglutination kit

ในการจำแนกซีโรกรุ๊ฟของเชื้อ streptococci จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร blood agar นาน 18 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะกลม ใส ขนาดเล็ก เกิด hemolysis ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมต่อกันเป็นสายและไม่สร้างเอนไซม์ catalase นำมาจำแนกซีโรกรุ๊ฟด้วยวิธี coagglutination kit ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS โดยแยกเชื้อบนอาหาร blood agar ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี coagglutination kit

ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	จำนวนสิ่งส่งตรวจ	การจำแนก	จำนวนเชื้อ			
		บน blood agar	GAS	GBS	GCS	GGS
ปัสสาวะ	121	4	0	2	0	0
หนอง	55	13	2	0	0	0
เสมหะ	91	6	1	0	0	0
ป้ายจากบาดแผล	17	6	1	1	0	0
สาย cut down	16	0	0	0	0	0
ป้ายจากช่องคลอด	9	3	1	1	0	0
ป้ายจากตา	2	0	0	0	0	0
ป้ายจากหู	1	0	0	0	0	0
รวม	312	32	5	4	0	0

จากการจำแนกเชื้อ streptococci จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 312 ตัวอย่าง ได้เชื้อที่มีลักษณะของ streptococci จำนวน 32 สายพันธุ์ เมื่อนำมาจำแนกซีโรกรุ๊ฟ ด้วยวิธี coagglutination kit พบเชื้อกรุ๊ฟเอทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง โดยพบ 2 ตัวอย่าง จากหนอง และพบจากเสมหะ บาดแผล และช่องคลอด อย่างละ 1 ตัวอย่าง พบเชื้อกรุ๊ฟบี 4 ตัวอย่าง โดยพบจากปัสสาวะ 2 ตัวอย่าง และพบจากบาดแผล และช่องคลอด อย่างละ 1 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อกรุ๊ฟซี และจี

3. การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ด้วยวิธี CoA kit

จากการจำแนกเชื้อ streptococci จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ โดยตรง โดยวิธี CoA kit ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การจำแนก GAS GBS GCS และ GGS จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ โดยตรง ด้วยวิธี CoA kit

ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	จำนวนสิ่งส่งตรวจ	จำนวนเชื้อ			
		GAS	GBS	GCS	GGS
ปัสสาวะ	121	5	76	18	25
หนอง	55	43	28	9	14
เสมหะ	91	78	33	72	29
ป้ายจากบาดแผล	17	14	7	2	3
สาย cut down	16	0	4	0	6
ป้ายจากช่องคลอด	9	1	4	0	2
ป้ายจากตา	2	0	0	0	1
ป้ายจากหู	1	0	0	0	0
รวม	312	141	152	101	80

จากการจำแนกเชื้อ streptococci จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 312 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี CoA kit พบ GAS 141 ตัวอย่าง โดยพบจากเสมหะมากที่สุด 78 ตัวอย่าง รองลงมาคือ หนอง บาดแผล ปัสสาวะ และ ช่องคลอดตามลำดับ สำหรับ GBS พบทั้งสิ้น 152 ตัวอย่าง โดยพบมากที่สุดจาก ปัสสาวะ รองลงมาคือ เสมหะ หนอง และ บาดแผล ตามลำดับ พบเชื้อในกลุ่ม GCS จำนวน 101 ตัวอย่าง พบมากที่สุดจากเสมหะ ส่วน GGS พบจำนวน 80 ตัวอย่าง จาก เสมหะ 29 ตัวอย่าง รองลงมาคือปัสสาวะ 25 ตัวอย่าง

4. เปรียบเทียบวิธีการจำแนกเชื้อ streptococci โดยวิธี Coagglutination kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

จากการศึกษาการจำแนกซีโรกรุ๊ฟของ streptococci จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 312 ตัวอย่าง โดยวิธี CoA kit ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กรณี กรณีแรกคือ คัดเลือกเชื้อ streptococci บนอาหาร blood agar ก่อนทดสอบด้วยวิธี CoA kit ผลการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation แสดงดังตารางที่ 6 กรณีที่ 2 จำแนกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ซึ่งใช้การสกัดแอนติเจนด้วยวิธี micronitrous acid extraction แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ sensitized staphylococcal suspension นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ให้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการจำแนกเชื้อ streptococci กรุ๊ฟต่าง ๆ จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ด้วยวิธี Coagglutination kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

Streptococcus group	Lancefield method	Coagglutination kit			%Agreement
	ผลบวกจริง	ผลบวกจริง	false-positive	false-negative	
A	3	141	138	2	2.13
B	2	152	150	1	1.32
C	0	101	101	0	0.00
G	0	80	80	0	0.00

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการจำแนกเชื้อ streptococci กรุ๊ฟต่าง ๆ โดยใช้วิธี blood agar ร่วมกับ Coagglutination kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

Streptococcus group	Lancefield method	Coagglutination kit			%Agreement
	ผลบวกจริง	ผลบวกจริง	false-positive	false-negative	
A	3	5	2	1	60.00
B	2	4	2	0	50.00
C	0	0	0	0	100.00
G	0	0	0	0	100.00

จากการจำแนกเชื้อ streptococci จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ด้วยวิธี CoA kit เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation พบว่าวิธี CoA kit มีความถูกต้องในการจำแนกต่ำมาก แต่เมื่อจำแนกเชื้อขั้นต้นบนอาหาร blood agar แล้วนำมาจำแนกด้วยวิธี CoA kit พบว่ามีความถูกต้องเพิ่มขึ้น โดย GAS มีความถูกต้อง 60% ขณะที่ GBS มีความถูกต้อง 50% ส่วน GCS และ GGS ถูกต้องถึง 100%

5. การเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะ

5.1 จากการเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี Coagglutination kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GAS

5.1.1 เปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี CoA kit (จากตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นมาก่อน) กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GAS แสดงผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ความไวและความจำเพาะของวิธี blood agar ร่วมกับ CoA kit ในการจำแนก GAS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

		Lancefield method		
		+	-	total
Coagglutination	+	3	2	5
kit	-	1	27	28
	total	4	29	33

Sensitivity	=	75.00%
Specificity	=	93.10%
False-positive	=	6.90%
False-negative	=	25.00%

จากการเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี blood agar ร่วมกับวิธี CoA kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GAS พบว่าวิธีนี้มีความไว และความจำเพาะเท่ากับ 75% และ 93% ตามลำดับ เกิด false-positive 6.9% และ false-negative 25%

5.1.2 เปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี CoA kit (จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง) กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GAS แสดงผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความไวและความจำเพาะของวิธี CoA kit ในการจำแนก GAS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

		Lancefield method		
		+	-	total
Coagglutination	+	3	138	141
kit	-	2	168	170
	total	5	306	311

Sensitivity = 60%

Specificity = 54.90%

False-positive = 45.09%

False-negative = 40%

จากการเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี CoA kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GAS พบว่าวิธีนี้มีความไว และความจำเพาะเท่ากับ 60% และ 54.9% ตามลำดับ เกิด false-positive 45.1% และ false-negative 40%

5.1.3 จากการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธีทางชีวเคมีได้แก่การทดสอบความไวต่อยาเบซิทราซิน (bacitracin susceptibility test) ในการจำแนก GAS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ผลแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ความไว และความจำเพาะของวิธีการทดสอบความไวต่อยาเบซิทราซินในการจำแนก GAS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

		Lancefield method		
		+	-	total
Bacitracin susceptibility	+	3	7	10
test	-	0	14	14
	total	3	21	24

Sensitivity = 100%

Specificity = 66.66%

False-positive = 33.33%

False-negative = 0%

จากการเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธีการทดสอบความไวต่อยาเบซิทราซิน กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GAS พบว่าวิธีนี้มีความไว และความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 66.66% ตามลำดับ เกิด false positive 33.33% และไม่เกิด false negative

5.2 จากการเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี Coagglutination kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GBS

5.2.1 เปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี CoA kit (ร่วมกับวิธี blood agar) กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GBS แสดงผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ความไวและความจำเพาะของวิธี blood agar ร่วมกับวิธี CoA kit ในการจำแนก GBS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

		Lancefield method		
		+	-	total
Coagglutination kit	+	2	2	4
	-	0	28	28
	total	2	30	32

Sensitivity = 100%

Specificity = 93.33%

False-positive = 6.66%

False-negative = 0%

จากการเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี blood agar ร่วมกับวิธี CoA kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GBS พบว่าวิธีนี้มีความไว และความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 93.33% ตามลำดับ เกิด false-positive 6.66 และ false-negative 0%

5.2.2 เปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี CoA kit จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ในการจำแนก GBS แสดงผลดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ความไวและความจำเพาะของวิธี CoA kit ในการจำแนก GBS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

		Lancefield method		
		+	-	total
Coagglutination	+	2	150	152
kit	-	1	160	161
	total	3	310	313

Sensitivity = 66.66%

Specificity = 51.61%

False-positive = 48.39%

False-negative = 33.33%

จากการเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี CoA kit กับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitationในการจำแนก GBS พบว่าวิธีนี้มีความไว และความจำเพาะเท่ากับ 66.66% และ 51.61% ตามลำดับ เกิด false-positive 48.39% และ false-negative 33.33%

6. การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ

จากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพจำนวน 16 ชนิด ของ GAS 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากหนอง 1 สายพันธุ์ และเสมหะ 2 สายพันธุ์ และ GBS 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากปัสสาวะ และช่องคลอด โดยวิธี Lancefield precipitation แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของ group A streptococci 3 สายพันธุ์ และ group B streptococci จำนวน 2 สายพันธุ์

ชนิดของยาต้านจุลชีพ	ความไวต่อยาต้านจุลชีพ				
	group A streptococci			group B streptococci	
	สายพันธุ์ที่ 1	2	3	สายพันธุ์ที่ 1	2
P	R	R	R	R	R
B	S	S	S	R	R
AM	I	R	R	R	R
SXT	R	R	R	S	S
E	R	I	R	I	S
GM	R	R	R	S	R
CR	S	S	S	S	S
CTX	S	S	S	I	I
TE	I	R	R	I	S
N	I	R	R	I	I
C	R	R	R	S	S
S	R	R	R	I	R
K	R	R	R	S	I
CL	R	R	R	I	I
NA	R	I	R	I	I
CXM	S	S	S	R	I

หมายเหตุ R : Resistant

S : Susceptible

I : Intermediate susceptible

จากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ 16 ชนิดของ GAS ที่จำแนกได้จากหนอง 1 สายพันธุ์ และเสมหะ 2 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจำแนกยาต้านจุลชีพตามการตอบสนองของจุลชีพออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่เชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพ (susceptible) มากที่สุด ได้แก่ bacitracin(B), cefuroxime (CXM), cefotaxime (CTX) และ cephalothin (CR) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพปานกลาง (intermediate) ได้แก่ tetracycline (TE), ampicillin (AM), nalidixic acid (NA), erythromycin (E) และ neomycin (N) กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพ (resistant) ได้แก่ colistin (C), gentamicin (GM), chloramphenicol (C) , kanamycin (K), streptomycin (S), penicillin (P) และ trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) ส่วน GBS สองสายพันธุ์ที่แยกได้จากปัสสาวะ และช่องคลอด พบว่าตอบสนองต่อยาต้านจุลชีพได้เหมือนกัน คือเชื้อมีความไวต่อ trimethoprim-sulfamethoxazole, cephalothin และ choramphenicol มีความไวปานกลางต่อ cetotaxim, neomycin, colistin และnalidixic acid และดื้อต่อยา penicillin G, bacitracin และ ampicillin

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

1. การจำแนก streptococci กรุ๊ฟเอ บี ซี และจีโดยวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

จากการจำแนก streptococci จากสิ่งส่งตรวจจำนวนทั้งหมด 312 ตัวอย่างโดยใช้วิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ซึ่งวิธีมาตรฐานนี้จะจำแนกเชื้อได้เมื่อสิ่งส่งตรวจผ่านการจำแนกขั้นต้นด้วยวิธี blood agar มาก่อน ใช้เวลาในการจำแนกเชื้อ streptococci ไม่ต่ำกว่า 30 ชั่วโมง จากการทดลองพบ GAS จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่ง 2 ตัวอย่างพบจากเสมหะ และอีก 1 ตัวอย่าง จากหนอง พบ GBS จำนวน 2 ตัวอย่าง จากปัสสาวะ และช่องคลอด ไม่พบ GCS และ GGS โดยทั่วไปแล้ว GAS เป็น streptococci ที่ก่อโรคในมนุษย์มากที่สุดโดยสามารถก่อโรคไฟลามทุ่ง ผิวหนังอักเสบมีตุ่มหนอง และลำคออักเสบ เป็นต้น ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวพบ GAS จากเสมหะเนื่องจากผู้ป่วยมีการอักเสบของลำคอและเยื่อบุลำคอเกิดขึ้น บริเวณต่อมทอนซิลมีอาการบวมแดง และมีเสมหะอยู่ด้วย ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบจึงพบ GAS ซึ่งตรงกับการรายงาน ของ Calrlson และคณะ(1985) และ Joklik และคณะ(1992) ส่วนบริเวณบาดแผลหรือตุ่ม หนองสามารถตรวจพบ GAS ได้เช่นกันซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของสุบัณฑิต (2533) ที่พบ GAS จากสิ่งส่งตรวจประเภทหนอง 56 ตัวอย่าง จากตัวอย่างหนองทั้งสิ้น 125 ตัวอย่าง คิดเป็น 44.8 % และจากการจำแนก GAS จากสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ๆ อันได้แก่ ปัสสาวะ ป้ายจากบาดแผล สาย cut down ป้ายจากช่องคลอด ป้ายจากตา และป้ายจากหู ไม่พบ GAS สำหรับ GBS พบ 2 ตัวอย่างจากปัสสาวะ และช่องคลอดซึ่งโดยปกติแล้ว GBS เป็นแบคทีเรียที่อาศัยตามช่องคลอด และมดลูกของหญิงปกติ และหญิงมีครรภ์ และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ข้อและกระดูกอักเสบในมนุษย์ (Kirkegard และField, 1977) ดังนั้นโอกาสที่พบ GBS จากสิ่งส่งตรวจดังกล่าวจึงเป็นไปได้สูง ในการทดลองนี้ไม่พบ GCS และ GGS เนื่องจากเชื้อทั้งสอง ซีโรกรุ๊ฟมีบทบาทในการก่อโรคในสัตว์มากกว่าในมนุษย์ สายพันธุ์ดังกล่าวได้แก่ *S. equi* ซึ่งก่อโรคในม้า และในบางสายพันธุ์ของ GCS สามารถก่อโรคทั้งในสัตว์และในมนุษย์ อันได้แก่ *S. equisimillis, S. zooepidemicus* และ *S. dysgalactiae* (Joklik และคณะ, 1992) แต่ความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่า GAS และจากการรายงานของ Hayden และคณะ (1992) กล่าวว่าในปัจจุบันพบการระบาดของ GCS โดยสามารถก่อโรคลำคออักเสบในเด็กเล็กได้ แต่พบน้อยมาก ขณะที่ GGS มักพบในผู้มีอายุสูงกว่า 50 ปีขึ้นไป (Libertin และคณะ, 1988)

2. การจำแนก streptococci โดยใช้วิธี Coagglutination kit (CoA kit)

จากการวิเคราะห์ streptococci จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ โดยตรง ด้วยวิธี CoA kit เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation พบว่าวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสอบ GAS เท่ากับ 60.0% และ 54.9% ตามลำดับ ส่วน GBS มีความไวเพียง 66.7% และมีความจำเพาะ 51.6% และตรวจพบ GCS และ GGS ถึง 101 และ 80 ตัวอย่าง ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้เพราะจากการทดลองเป็นการนำสิ่งส่งตรวจมาทดสอบโดยตรงซึ่งสิ่งส่งตรวจดังกล่าวย่อมมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ดังนั้นการเกิด cross-reaction ระหว่าง streptococci reagent หรือ antisera กรุ๊ฟต่าง ๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน อาจนำไปสู่การเกิด false-positive ได้ เพราะเมื่อทำการทดลองแยกเชื้อ streptococci ขั้นต้นในอาหาร blood agar ศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ พบเชื้อ streptococci เพียง 32 ตัวอย่าง และเมื่อนำมาจำแนกด้วยวิธี CoA kit เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation ให้ความไวและความจำเพาะต่อ GAS เป็น 75% และ 93% ตามลำดับ เกิด false-positive 6% และ false-negative 25% ส่วน GBS มีความไวสูงถึง 100 % และมีความจำเพาะ 93% พบ false-positive 6% ไม่พบ false-negative นอกจากนี้ยังให้ผลการจำแนก GCS และ GGS เช่นเดียวกับวิธีมาตรฐาน การใช้วิธี blood agar ร่วมกับ CoA kit นับว่าได้ผลดี และใช้เวลาในการตรวจสอบไม่เกิน 20 ชั่วโมง ในช่วงปี ค.ศ. 1978-1982 มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี CoA kit กับวิธีมาตราฐาน Lancefield precipitation จากรายงานของสุบัณฑิต (2533) กล่าวว่าวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะเป็น 96.1% และ 95.1% ตามลำดับ เกิด false-positive 4.9% และ false-negative 3.9% แต่จากการทดลองนี้มีความไวและความจำเพาะต่ำกว่า เกิด false-positive และ false-negative ในเปอร์เซ็นต์สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากวิธีการตรวจสอบนี้เน้นการตรวจสอบจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงหลังจากได้รับจากผู้ป่วย โดยมิได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์หรือเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อน เมื่อนำมาตรวจสอบอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ (cross reaction) กับเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น ซึ่งตรงกับการรายงานของ Carlson และ McCarthy (1979) ได้กล่าวว่า การเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ของเชื้ออาจเกิดขึ้นได้ เช่น การเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ระหว่าง รีเอจนต์ของ group D และ F Streptococci *S. pneumoniae* เกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ได้กับแอนติบอดี้กรุ๊ฟซี ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ทดลองนำเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนซึ่งอาจพบได้ในสิ่งส่งตรวจ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* มาทดสอบโดยวิธี CoA kit พบว่า *E. coli* ทำปฏิกิริยากับ antisera กรุ๊ฟบี และจี เกิดเป็น false-positive ขึ้นมาได้ สำหรับวิธีการแก้ปัญหานั้น Slifkin และ Interval (1980) กล่าวว่าอาจทำได้โดยก่อนที่จะทำการสกัดแอนติเจนโดยวิธี micronitrous extraction ต้องทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติขั้นต้นของเชื้อ

streptococci ก่อน จึงนำมาทดสอบด้วยวิธี CoA kit ได้ ดังนั้นในการทดสอบวิธี CoA kit จึงใช้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นในระดับคลีนิกเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม Stoner (1978) กล่าวว่าวิธี CoA kit นี้มีความสะดวด รวดเร็ว เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อในระดับคลีนิกเพื่อช่วยให้แพทย์วินิจฉัยอาการของผู้ป่วยและรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที เพราะฉะนั้น การใช้วิธี CoA kit ใน การตรวจสอบซีโรกรุ๊ฟของเชื้อ จึงสามารถทำได้แต่ต้องเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ในการทดลองครั้งนี้ยังได้จำแนก GAS โดยวิธีทางชีวเคมีคือทดสอบความไวต่อยาเบซิทราซิน ซึ่งจากการทดลองพบว่า GAS ให้ผลบวกกับการทดสอบความไวต่อยาเบซิทราซิน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Finegold และ Baron (1986) และรายงานของ Sherris และ คณะ (1991) กล่าวว่าประมาณ 99% ของสายพันธุ์ GAS เมื่อทดสอบความไวต่อเบซิทราซินจะให้ผลบวก ส่วน Joklik และคณะ (1992) กล่าวว่าวิธีนี้มีความถูกต้องในการตรวจสอบ GAS คิดเป็น 95% จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation พบว่าวิธีนี้มีความไว และความจำเพาะเป็น 100% และ 66.67% ตามลำดับ เกิด false-positive 33.33% ไม่เกิด false-negative ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Stoner (1978) ซึ่งพบว่าการใช้เบซิทราซินในการจำแนก GAS มีความจำเพาะสูงถึง 100% เช่นกัน และกล่าวว่าเบซิทราซิน สามารถใช้เป็นวิธีการทดสอบขั้นต้น (presumptive test) ในการจำแนก GAS ออกจาก β-hemolytic streptococci อื่นๆได้ แต่วิธีการดังกล่าวอาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้ โดยเมื่อทำการศึกษาเชื้อ Streptococci 1,161 สายพันธุ์ และใช้หลักเกณฑ์ในการอ่านผลคือ ถ้า clear zone มีความกว้าง 10 mm. หรือมากกว่านี้ถือว่าให้ผลบวก แสดงว่าเป็น GAS ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ให้ความจำเพาะสูง ทำให้อัตราการเกิด false-positive ลดลง ซึ่งดีกว่าวิธีการของ Maxted ซึ่งกล่าวไว้ว่าถ้าเกิด clear zone ความกว้างเท่าใดก็ได้ให้ถือเป็นผลบวกทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบความไวต่อยาเบซิทราซินนี้ ยังคงเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบ GAS ขั้นต้นในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากวิธีการอื่นๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบ GAS ได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว ยังมีอีกหลายวิธี อาทิ เช่น precipitin, immunofluorescence และ agglutination เป็นต้น (Sherris และคณะ, 1991) แต่วิธีการเหล่านี้ต้องอาศัยเครื่องมือ และอุปกรณ์จำเพาะ และมีวิธีการจำแนกที่ยุ่งยากกว่าการใช้วิธีเบซิทราซิน

3. การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของ GAS และ GBS

จากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ 16 ชนิด ของ GAS และ GBS พบว่าทั้ง GAS และ GBS ไวต่อยา cephalothin สูงสุด 100% รองลงมาคือ cefotaxim และ cefuroxime และดื้อต่อยา penicillin G, ampicillin และ gentamicin ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน

ของนรีกุล และคณะ (2526) โดยพบว่ายากลุ่ม penicillin เป็นยาชนิดแรกที่พบและใช้ในการรักษาโรคซึ่งมีการติดเชื้อในกลุ่ม streptococci แต่ในปัจจุบันพบว่าเชื้อมีการดื้อต่อยา penicillin อย่างมาก อย่างไรก็ตาม penicillin มักใช้เป็นทางเลือกแรกที่นำมาใช้รักษาผู้ป่วย เนื่องจากเป็นยาที่มีฤทธิ์คลอบคลุมในการรักษาโรคหลายชนิดอีกทั้งยังมีความเป็นพิษน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับยาชนิดอื่นๆ (Joklik และคณะ,1992) ดังนั้นโอกาสที่ GAS และ GBS จะดื้อต่อยาชนิดนี้จึงเป็นไปได้ การดื้อต่อยา penicillin เนื่องมาจากเชื้อมีความสามารถสร้างเอนไซม์ penicillinase ซึ่งสามารถทำลายคุณสมบัติของ penicillin ได้นั่นเอง (Collee และคณะ, 1989) ส่วน erythromycin และ cephalosporin ถูกใช้เป็นทางเลือกรองจากยา penicillin โดยแพทย์จะพิจารณาเมื่อผู้ป่วยมีอาการแพ้ยา penicillin ดังนั้นโอกาสที่ผู้ป่วยจะมีการดื้อต่อยานี้จึงเป็นไปได้สูง (Sherris และคณะ, 1991) นอกจากยา penicillin และ erythromycin แล้ว ยาชนิดอื่นที่อาจใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก streptococci ได้แก่ cephalosporin, tetracycline และ chloramphenicol ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อไวต่อยา cephalothin ได้สูงสุด 100%

สำหรับกลไกในการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไปเช่น ยาในกลุ่ม penicillin มีการออกฤทธิ์ที่บริเวณผนังเซลล์ โดยขัดขวางไม่ให้มีการสร้างผนังเซลล์หรือทำให้ผนังเซลล์มีความอ่อนแอเมื่อรวมกับแรงดันภายในเซลล์ทำให้เซลล์แตกได้ ดังนั้นเชื้อที่มีการดื้อต่อยานี้จะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ penicillinase หรือ β-lactamase ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายโครงสร้างของยาตรงตำแหน่ง beta-lactam ring ให้เป็น penicilloic acid ซึ่งเป็นโครงสร้างซึ่งไม่มีผลในการทำลายเชื้อ penicillinase ที่ได้จากแบคทีเรียแกรมบวกเป็นชนิดที่ถูกชักนำ ให้สร้างขึ้นได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของเชื้อซึ่งปริมาณที่สร้างขึ้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนแบคทีเรีย (พนิดา และมาลัย, 2525) สาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อโรคดื้อต่อยาต้านจุลชีพ อาจมีสาเหตุมาจาก ประการแรกการใช้ยาต้านจุลชีพไม่ถูกกับโรค ประการที่สองการใช้ยาในความเข้มข้นต่ำเกินกว่าที่จะทำลายหรือยับยั้งแบคทีเรีย ประการที่สามการใช้ยาไม่ถูกวิธี และประการสุดท้ายการใช้ยาที่ไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้นจึงต้องมีการคิดค้นยาชนิดใหม่ซึ่งมักมีราคาแพงกว่ามาใช้ในการรักษาโรคเดิม (นรีกุล และคณะ, 2526) ส่วน GCS และ GGS ตรวจไม่พบในการทดลองนี้จึงไม่สามารถบอกได้ว่าทั้งสองกรุ๊ฟมีแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพแตกต่างจาก GAS และ GBS อย่างไร จะเห็นได้ว่าการก่อโรคของ GAS และ GBS นั้นมีความรุนแรงมากขึ้นอันเนื่องมาจากสาเหตุการดื้อยาของเชื้อ ก่อให้เกิดโทษต่อมนุษย์ เกิดความสิ้นเปลืองและความสูญเสียด้านเศรษฐกิจอย่างมาก ดังนั้นก่อนที่จะมีการตัดสินใจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพจึงจำเป็นต่อคำนึงถึงความไวของเชื้อต่อยาจากผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ความสัมพันธ์ของเชื้อในระหว่างสายพันธุ์ คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของยา เช่น ความเป็นพิษ การแตกตัว การดูดซึม การขับถ่าย ผลการรักษาทาง

คลีนิก การดำเนินของโรค และภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นก่อนจะตัดสินใจเลือกยาเพื่อรักษาโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหา จึงควรทดสอบความไวของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนั้นๆ ต่อยาต้านจุลชีพเสียก่อนเพื่อที่จะเป็นประโยชน์ในการควบคุม ป้องกันรักษาโรคติดเชื้อจาก streptococci ได้อย่างถูกต้อง เหมาะสม ประหยัด และทันท่วงที รวมทั้งป้องกันไม่ให้เชื้อปรับตัวดื้อยาเพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองนี้ พบว่าปัญหาที่ทำให้การตรวจหา streptococci จากสิ่งส่งตรวจโดยตรงด้วยวิธี Coagglutination kit มีความไว และความจำเพาะต่ำ เนื่องจากเกิด cross-reaction ของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม Enterobacteria ซึ่งเป็น nornal flora ในร่างกายมนุษย์ วิธีการแก้ปัญหาที่ใช้ในการทดลองนี้คือแยกเชื้อขั้นต้น โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร blood agar และศึกษาลักษณะภายใต้กล้อง ก่อนทดสอบด้วยวิธี Coagglutination kit ซึ่งทำให้ความไว และความจำเพาะสูงขึ้น แต่ต้องใช้เวลานานถึง 18 ชั่วโมง วิธีการที่ควรศึกษาต่อไปคือ

- หาสภาวะ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเจริญของ streptococci ที่ใช้เวลาในการบ่มเชื้อสั้นที่สุด ก่อนทดสอบด้วยวิธี Coagglutination kit

- พัฒนาวิธีการสกัดแอนติเจน ชนิด และความเข้มข้นของน้ำยาสกัด ให้มีความไว และความจำเพาะต่อ streptococci มากขึ้น

2. ศึกษาวิธีการจำแนก streptococci โดยวิธีอื่น เช่น Optical immunoassay โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Lancefield precipitation

เอกสารอ้างอิง

นรีกุล สุระพัฒน์ และคณะ. **จุลชีววิทยาทางการแพทย์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ, สำนักพิมพ์กรุงเทพฯเวชสาร, 2526.

นันทนา อรุณฤกษ์. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์.** กรุงเทพมหานคร, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2537.

พนิดา ชัยเนตร และ มาลัย วรวิจิตร. **การใช้ห้องปฏิบัติการในการเลือกยารักษาโรคติดเชื้อ.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ, โรงพิมพ์พิฆเณศ, 2525.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. การพัฒนา coagglutination kit เพื่อตรวจหาซีโรกรุ๊ฟของเชื้อ streptococci. **รายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2533.

Balow, A. and others. **Manual of Clinical Microbiology.** 15th ed. Washington,DC., America Society for Microbiology, 1991.

Baron, E.J. and J.W. Gates. Primary plate identification of group A beta-hemolytic streptococci utilizing a two-disk technique. **J. Clin. Microbiol.** 10:80-84, 1979.

Benchetrit, L.C. and others. Carriage of S. agalactiae in women and neonates and distribution of serological type, a study in Brazil. **J. Clin. Microbial.** 15(5):787-790, 1982

Braude, A.I. and others. **Microbiology.** Philadelphia , J.B. Lippincott Company, 1982.

Braude, A.I. and others. **Microbiology.** Philadelphia , J.B. Lippincott Company, 1986.

Carlson, J.R. and L.R. McCarthy. Modified coagglutination procedure for the serological grouping of streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 9:329-332, 1979.

Carlson, J.R. and others. Improved recovery of group A beta-hemolytic streptococci with a new selective medium. **J. Clin. Microbiol.** 21:307-309, 1985.

Chang, M.J. and C. Mohla. Ten-minute detection of group A streptococci in pediatric throat swabs. **J. Clin. Microbiol.** 21:258-25, 1985.

Collee, J.G. and others. **Mackie & McCarthy Practical Medical Microbiology** 13th ed. Hong kong, Churchill Livingstone, 1989.

Creager, J.G. annd others. **Microbiology** USA.,Prentice-Hall,Inc., 1990.

Davis, B.D. and others. **Microbiology** 4th ed. Singapore,Harper & Row Publisher, 1990.

Duguid. J.P. and others. **Medical Microbiology**. Edinburge, Witer Enterprises (International) 1960.

Dykstra, M.A. and others. Comparison of media and techniques for detection of group A streptococci in throat swab specimens. **J. Clin. Microbiol.** 9:236-238, 1979.

Edward, E.A. and others. Diagnosis of group A streptococci infection directly from throat secretions. **J. Clin. Microbiol.** 15:481-483, 1982.

Engel, H.W.B. and A.V. Slifhout. Simplified coagglutination test for serological grouping of beta-hemolysis streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 14:252-255, 1981.

Facklam, R.R. and others. Presumptive identification of group A, B and D streptococci. **Appl. Microbiol.** 27:107-113, 1974.

Fenton, F.J. and M.H. Harper. Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewit broth for selective isolation of group B streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 9(2):167-169, 1979.

Finegold, S.M. and E.J. Baron. **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology** 7th ed. USA., The C.V. Mosby Company, 1986.

Freeman, B.A. **Textbook of Microbiology** 22nd ed. Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1985.

Gerber, M. Micronitrous acid extraction-coagglutination test for rapid diagnosis of streptococcal pharyngitis. **J. Clin. Microbiol.** 17:170-171, 1983.

Gunn, B.A. and others. Selective and enhanced recovery of group A and B streptococci from throat cultures with sheep blood agar containing sulfamethoxazole and trimethoprim. **J. Clin. Microbiol.** 5:650-655,1977.

Hamade, S. and others. Isolation and immunobiological classification of *S. sanguis* from human tooth surfaces. **J. Clin. Microbiol.** 12(2):243-249, 1980.

Harbeck, R.J. and others. Novel , rapid optical immunoassay technique for detection of group A streptococci from pharyngeal specimens comparison with standard culture methods. **J. Clin. Microbiol.** 31:839-844, 1993.

Hayden, G.F. and others. Latex agglutination testing directly from throat swabs for rapid detection of beta-hemolytic streptococci from lancefield serogroup C. **J. Clin. Microbiol.** 30:716-718,1992.

Heiter, B.J. and P.P. Bourbeau. Comparison of the gen-probe group A streptococcal antigen detection assay for diagnosis of streptococcal pharyngitis. **J. Clin. Microbiol.** 31:2070-2073, 1993.

Holbrook, W.P. and others. Penicillin tolerance among oral streptococci. **J. Med. Microbiol.** 27:12-17, 1988.

Ingram. D.L. and others. Detection of group B streptococci antigen in early-onset and late-onset group B streptococci disease with the wellxogen strep B latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.** 16(4):656-658, 1982.

Jawetz, E. and others. **Medical Microbiology** 18th ed. USA., Appleton & Lange,1989.

Jewes, L.A. and D. Jones. Rapid method for the detection of group B streptococci from human saurce. **J. App. Bacteriol.** 61:219-223, 1986.

Joklik, W.K. and others. **Zinsser Microbiology** 20th ed. USA., Appleton & Lange, 1992.

Kirkegard, M.K. and C.R. Field. Rapid slide coagglutination test for identifying and typing group B streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 6(3):266-270, 1977.

Koneman, E.W. and others. **Introduction to Diagnostic Microbiology.** Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1994.

Leland, D.S. and others. Method for rapid detection of group B streptococci by coagglutination. **J. Clin. Microbiol.** 7(4):323-326, 1978.

Miceika, B. G. and others. Detection of group A streptococcal antigen directly from throat swabs with a ten-minute latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.** 21:467-469, 1985.

Miller, J.M. and others. Evaluation of the detection group A strep test kit. **J. Clin. Microbiol.** 20:846-848, 1984.

Moffet, H.L. **Clinical Microbiology** 2nd ed. USA., J.B. Lippincott Company, 1980.

Nester, E.W. and others. **Microbiology.** USA., Wm. C. Brown Communication, Inc., 1995.

Nimrat, S. Development of coagglutination kit for rapid serogrouping of streptococci. Mahidol University, 1991.

Otero, J.R. and others. Rapid diagnosis of group A streptococcal antigen extracted directly from swabs by enzymatic procedure and used to detect pharyngitis. **J. Clin. Microbiol.** 18:318-320, 1983.

Patterson, M.J. and others. **Medical Microbiology.** California, Addison-Wesley Publishing Company,Inc., 1982.

Phillip, E.A. and others. Rapid tube CAMP test for identification of *S. agalactiae*(Lancefield Group B). **J. Clin. Microbiol.** 12(2):135-137, 1980.

Rosa, M. De La and others. Granada medium for detection and identification of group B streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 18(4)779-785, 1983.

Rose, H.D. and others. *Streptococcus zooedidemicus* (group C) pneumonia in a human. **J. Clin. Microbiol.** 11:76-78, 1980.

Schuhardt, V.T. **Pathogenic Microbiology.** Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1978.

Sherris, J.C. and others. **Medical Microbiology** 2nd ed. Singapore, Elsevier Publishing Co., Inc., 1991.

Slifkin, M. and G. Interval. Serogrouping single colonies of beta-hemolytic streptococci from primary throat culture plates with nitrous acid extraction and phadebact streptococcal reagents. **J. Clin. Microbiol.** 12:541-545, 1980.

Slifkin, M. and G.M. Gil. Serogrouping of beta-hemolytic streptococci from throat swabs with nitrous acid extraction and the phadebact streptococcus test. **J. Clin. Microbiol.** 15:187- 189, 1982.

Slifkin, M. and others. Direct-plate serological grouping of beta-hemolytic streptococci from primary isolation plates with the phadebact streptococcus test. **J. Clin. Microbiol.** 7:356-360, 1978.

Slifkin, M. and R. Cumbie. Serologrouping single colonies of beta-hemolytic streptococci with achromopeptidase extraction. **J. Clin. Microbiol.** 25:1555-1556, 1987.

Srifuengfung S. and others. Development of coagglutination kit for rapid serogrouping of streptococci. **J. Med. Tech. Assoc. Thailand.** 19(2):103-108, 1991.

Steed, L.L. and others. Rapid Detection of *Streptococcus pyogenes* in pediatric patient specimens by DNA probe. **J. Clin. Microbiol.** 31:2996-3000, 1993.

Stoner, R.A. Bacitracin and coagglutination for grouping of beta-hemolytic streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 7:463-466, 1978.

Tillman, P.C. and others. Group G streptococci epizootic in a Closed Cat Colony. **J. Clin. Microbiol.** 16(6):1057-1060, 1982.

Webb, B.J. and others. Comparison of slide coagglutination test and countercurrent immunoelectrophoresis for detection of group B streptococcal antigen in cerebrospinal fluid from infants with miningitis. **J. Clin. Microbiol.** 11(3):263-265, 1980

Wellstood, S. Evaluation of Phadebact and Streptex kits for rapid grouping of streptococci directly from blood cultures. **J. Clin. Microbiol.** 15:226-230, 1982.

Wetkowski, M.A. and others. Direct testing of blood cultures for detection of streptococcal antigens. **J. Clin. Microbio.** 16(1):86-91, 1982.

Wilkinson, H.W. CAMP-disk test for presumtive identification of group B streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 6(1):42-45, 1977.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Blood Agar (BA)

มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.4		

นำส่วนผสมทั้งหมด 23.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลอมให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดต่ำลงจนเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลซียส เติมเลือดลงไปในอัตราส่วน 8% โดยวิธี aseptic technique

2. Todd-Hewitt broth

มีส่วนประกอบดังนี้

Beef heart infusion	3.1	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Sodium chloride	2.0	กรัม
Disodium chloride	0.4	กรัม
Sodium carbonate	2.5	กรัม
pH 7.8		

นำส่วนผสมทั้งหมด 48.0 กรัมมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลอมให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Mueller- Hinton blood agar

มีส่วนประกอบดังนี้

Beef infusion from	300.0	กรัม
Casamino	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Bacto- agar	17.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมด 336 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.3 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดต่ำลงจนเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เติมเลือดลงไปในอัตราส่วน 8% โดยวิธี aseptic technique

4. Trypticase soy broth

มีส่วนประกอบดังนี้

Bacto- tryptone	17.0	กรัม
(Pancreatic digest of casein)		
Bacto- soytone	3.0	กรัม
(Papaic digest of soybean meat)		
Bacto- dextrose	2.5	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
pH 7.3		

นำส่วนผสมทั้งหมด 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลอมให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. Stock culture medium

มีส่วนประกอบดังนี้

Beff heart infusion, from	500.0	กรัม
Proteose peptone, Difco	10.0	กรัม
Bacto gelatin	10.0	กรัม
Bacto isoelectric casein	5.0	กรัม
Bacto dextrose	0.5	กรัม
Disodium phosphate	4.0	กรัม
Sodium citrate	3.0	กรัม
Bacto agar	7.5	กรัม
pH 7.2		

นำส่วนผสมทั้งหมด 540 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลอมให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. Phosphate buffer saline (PBS)

มีส่วนประกอบดังนี

$NaH_2PO_2.2H_2O$	17.9	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	68.9	กรัม
$Na_2H_3PO_4.H_2O$	15.86	กรัม
pH	7.0	

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Gram's crystal violet

มีส่วนประกอบดังนี้

สารละลายส่วนที่ 1	Crystal violet	2.0	กรัม
	Ethyl alcohol (95%)	20.0	กรัม
สารละลายส่วนที่ 2	Ammonium oxalate	0.8	กรัม
	น้ำกลั่น	80.0	กรัม

นำสารละลายทั้งสองส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปกรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนก่อนนำไปใช้

3. Gram's iodine

มีส่วนประกอบดังนี้

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

นำ KI ละลายในน้ำกลั่นจนหมด หลังจากนั้นจึงเติม Iodine

4. Safranin

มีส่วนประกอบดังนี้

Safranin O	10.0	กรัม
(2.5% solution in 95% ethyl alcohol)		
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

5. Alcohol 95% (สำหรับล้างสี)

มีส่วนประกอบดังนี้

Ethyl alcohol	98.0	มิลลิลิตร
Acetone	2.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

6. McFarland No. 0.5

มีส่วนประกอบดังนี้

0.048 M. $BaCl_2$	0.5	มิลลิลิตร
0.36 M. H_2SO_4	9.95	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้ากันแล้วเทใส่หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร

7. 0.85%NaCl

มีส่วนประกอบดังนี้

Sodium chloride	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมมาละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ค

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการทดลอง

<u>การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส</u> (catalase test)

หลักการ

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์คะตะเลสหรือไม่ โดยเอนไซม์คะตะเลสในแบคทีเรียจะสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นออกซิเจนและน้ำ ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

วิธีการ

ใช้แท่งแก้วหรือ loop เขี่ยเชื้อจุ่มลงใน 1 มิลลิลิตรของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดฟองก๊าซจำนวนมากขึ้นทันที

ผลลบ : ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

การคำนวณความไวและความจำเพาะของการทดสอบ

ตารางที่ 14 วิธีการคำนวณความไวและความจำเพาะของการทดสอบ

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)

$$\text{Sensitivity} = \frac{a}{a+c} \times 100 = w\%$$

$$\text{Specificity} = \frac{d}{b+d} \times 100 = x\%$$

$$\text{False- positive} = \frac{b}{b+d} \times 100 = y\%$$

$$\text{False- negative} = \frac{c}{a+c} \times 100 = z\%$$

ที่มา : Nimrat, 1991

การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ตารางที่ 15 การแปลผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียโดยวิธี Kirby-Baver

Antimicrobial	Zone Diameter Interpretive (mm)		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
1. P	≤11	12-21	≥22
2. B	8	9-12	≥13
3. AM	≤20	21-28	≥29
4. SXT	≤10	11-15	≥16
5. E	≤13	14-17	≥18
6. GM	≤12	13-14	≥15
7. CR	≤14	15-17	≥18
8. CTX	≤14	15-22	≥23
9. TE	≤14	15-18	≥19
10. N	≤12	13-16	≥17
11. C	≤12	13-17	≥18
12. S	≤11	12-14	≥15
13. K	≤13	14-17	≥18
14. CL	≤8	9-10	≥11
15. NA	≤13	14-18	≥19
16. CXM	<14	15-17	>18

ที่มา : พนิดา และมาลัย 2525