ปัจจัยดื้อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp. ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

Antimicrobial Resistance Factors of *Enterococcus* spp. in Songklanagarind Hospital

วราภรณ์ คงสุวรรณ

Waraporn Kongsuwan

Order Key 25258
BIB Key 169581

เลขหมู่ QC564.W7 T5
เลขทะเบียน 046 2542 ป
25 มิ.ย. 2542

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Microbiology

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยดื้อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp. ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ผู้เขียน นางสาววราภรณ์ คงสุวรรณ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(นพ. วิวิทย์ ศมศานติ์)

.....กรรมการ
(ดร. เมตตา องค์สกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(นพ. วิวิทย์ ศมศานติ์)

.....กรรมการ
(ดร.เมตตา องค์สกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันทนา เหรียญมงคล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยดื้อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp. ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ผู้เขียน นางสาววราภรณ์ คงสุวรรณ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

จากการศึกษา *Enterococcus* spp. จำนวน 97 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนเมษายน 2540 ถึงเดือนมกราคม 2541 จำแนกสปีชีส์โดยใช้แบบแผนทางชีวเคมีและสรีรวิทยา พบ *E. faecalis* มากที่สุด 86.06% รองลงมาคือ *E. faecium* 4.12%, *E. casseliflavus* 2.06%, *E. hirae* 1.03% และไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ 6.19% พบ hemolysis ทั้งชนิด α, β และ non-hemolysis บน human blood agar สิ่งส่งตรวจที่แยกได้ *Enterococcus* spp.มากที่สุดคือ ปัสสาวะ โดยพบจำนวน 44.33% รองลงมาคือ เนื้อเยื่อจากแผล และหนองอย่างละ 15.46% จากเลือด 6.19% และอื่นๆ พบน้อยกว่า 5%

เมื่อนำ *Enterococcus* spp. มาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาโดยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ไวต่อยากลุ่ม β-lactams โดยพบการดื้อยา ampicillin 4.12% เฉพาะใน *E. faecium* และไม่พบการดื้อยากลุ่ม glycopeptides เมื่อทดสอบการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงโดยวิธี agar screening พบการดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง 60.82% และ 46.39% ตามลำดับ

จากการศึกษาแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ 9 ชนิด และรูปแบบพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าใน *E., faecalis* มีแบบแผนการดื้อยา 6 แบบ ดื้อยาตั้งแต่ 1-4 ชนิด มีรูปแบบพลาสมิด 6 แบบ แยกแถบให้เห็นตั้งแต่ 1-4 แถบ และพบว่าแบบแผนการดื้อยาที่เหมือนกันอาจมีรูปแบบพลาสมิดที่ต่างกันได้มากกว่า 1 แบบ ใน *E. faecium* มีแบบแผนการดื้อยา 4 แบบ ดื้อยาตั้งแต่ 5-7 ชนิด มีรูปแบบพลาสมิด 4 แบบ แยกแถบให้เห็นตั้งแต่ 2-9 แถบ พบว่ารูปแบบของพลาสมิดในสายพันธุ์ที่ดื้อยา ampicillin ร่วมกับ gentamicin จะแยกแถบให้เห็น 5-9 แถบ

จากการใช้ชนิดของ hemolysis แบบแผนการดื้อยา การดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง ร่วมกับรูปแบบพลาสมิด เป็นแนวทางในการทำ typing สายพันธุ์ที่ดื้อยา พบสายพันธุ์ที่อาจมาจากสายพันธุ์เดียวกันระบาดในผู้ป่วยต่างแผนก โดยกระจายตามตำแหน่งต่างๆ ทั่วร่างกาย และพบว่าบางสายพันธุ์สามารถอยู่ทน (persist) ในโรงพยาบาลได้อย่างน้อย 2 เดือน

เมื่อศึกษาปัจจัยดื้อยา gentamicin ในระดับสูง (R-plasmid) โดยวิธี conjugation พบว่าตัวให้ คือ *E. faecalis* WK8 และ WK62 สามารถถ่ายทอดการดื้อยาให้ตัวรับ คือ *E. faecium* WK67 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลเดียวกัน มีความถี่ในการถ่ายทอดโดยวิธี filter mating $2.5X10^{-7}$ และ $2.75X10^{-7}$/donor ตามลำดับ และพบว่า transconjugants ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้รับการถ่ายทอดพลาสมิดขนาดประมาณ 23 kb

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ชนิดของ hemolysis แบบแผนการดื้อยา การดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง ร่วมกับรูปแบบพลาสมิด เป็นแนวทางในการติดตามการระบาดของสายพันธุ์ที่ดื้อยาได้ในระดับหนึ่ง และการเกิด conjugation ระหว่างสายพันธุ์ของ *Enterococcus* spp. ที่พบในโรงพยาบาล อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยาได้

Thesis Title Antimicrobial Resistance Factors of *Enterococcus* spp. in Songklanagarind Hospital

Author Miss Waraporn Kongsuwan

Major Program Microbiology

Academic Year 1999

Abstract

Ninety-seven strains of *Enterococcus* spp. were isolated from various clinical specimens of patients in Songklanagarind Hospital from April 1997 to January 1998. Species were identified by biochemical and physiological test schemes. The most common species was *E. faecalis* 86.06%, the second was *E. faecium* 4.2% and the others were *E. casseliflavus* 2.06%, *E. hirae* 1.05% and unclassified enterococci 6.19%. Three types of hemolysis on human blood agar, α, β and non-hemolysis were found among enterococcal isolates. The common specimens of enterococcal isolation were urine 44.33%, tissue from wound 15.46% as same as pus, blood 6.19% and the others less than 5%.

Their susceptibility to clinically relevant antimicrobials were determined using disk diffusion method. Most strains were susceptible to β-lactams. Ampicillin resistant enterococci were found to be 4.12%, especially in *E. faecium.* No glycopeptides resistant strain was found. When high-level resistance to aminoglycosides were studied by agar screening method, high-level gentamicin and streptomycin resistant enterococci were found to be 60.82% and 46.3%, respectively.

Antimicrobial resistance patterns of 9 antimicrobial agents and plasmid profiles were studied by agarose gel electrophoresis. In *E. faecalis,* there were 6 antimicrobial resistance patterns which each pattern was composed of 1-4 agents and 6 plasmid profiles which elucidated 1-4 plasmid bands on agarose gel. Each

antimicrobial resistance pattern of *E. faecalis* may contain more than one plasmid profile. In *E. faecium*, there were 4 antimicrobial resistance patterns which each pattern was composed of 5-7 agents and 4 plasmid profiles which elucidated 2-9 plasmid bands on agarose gel. The strains of *E. faecium* that resisted to ampicillin and gentamicin showed 5-9 plasmid bands.

When enterococcal strains were typed using hemolytic activity, antimicrobial resistance pattern, high-level gentamicin and streptomycin resistance and plasmid profile, the same epidemic strain was found in different wards and distributed in many sites on the host. Some enterococcal strains could persist at least 2 months in the hospital environment.

High-level gentamicin resistance factor (R-plasmid) was studied by conjugation. The results showed that donors, *E. faecalis* WK8 and WK62 could transfer their high-level gentamicin resistance to the recipient, *E. faecium* WK67, isolated from patient in the same hospital by filter mating with transfer frequency of $2.5X10^{-7}$ and $2.75X10^{-7}$/donor, respectively. Two strains of transconjugants recieved plasmid, with size about 23 kb.

The results obtained from this study indicate that hemolytic activity, antimicrobial resistance pattern, high-level aminoglycosides resistance and plasmid profile could be applied for typing strain in order to monitor epidemiology of *Enterococcus* spp. and evidence of interspecies conjugation among *Enterococcus* spp. may be the cause of dissemination of resistance genes.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาจากเหล่าคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ตลอดจนพี่ เพื่อนและน้อง ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์แก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้าจึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งต่อ นายแพทย์วิวิทย์ ศมศานติ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.เมตตา องค์สกุล กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาชี้แนะเกี่ยวกับการทำวิจัย การเขียน ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันทนา เหรียญมงคล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับการใช้สถานที่ และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่และน้องนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาตรีทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา นอกจากนี้ขอขอบคุณ คุณประสบสุข อินทรักษา และคุณจารุวรรณ บุญรัตน์ หัวหน้าตึกหออภิบาลผู้ป่วย 1 และ 2 โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตลอดจนพี่ เพื่อน และน้องพยาบาล ผู้ช่วยพยาบาล รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของหออภิบาลผู้ป่วยทุกท่านที่สนับสนุนให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งขอบคุณน้องๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

วราภรณ์ คงสุวรรณ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	44
2. วิธีการวิจัย	45
วัสดุอุปกรณ์	45
วิธีดำเนินการ	50
3. ผลการวิจัย	57
4. บทวิจารณ์	86
5. บทสรุป	99
บรรณานุกรม	103
ภาคผนวก	126
ประวัติผู้เขียน	135

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1	สปีชีส์ใน genus *Enterococcus*	4
2	ลักษณะทางด้าน phenotype ที่แตกต่างกันของเชื้อพวก facultative anaerobic, catalase-negative, gram-positive genera	6
3	คุณสมบัติต่างๆ ของ *Enterococcus* species	9
4	ลักษณะ phenotypes ของ atypical *Enterococcus* species และ *S. bovis* group	10
5	ลักษณะ phenotypes ของ glycopeptide-resistant enterococci	31
6	อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี เอนไซม์ ยาต้านจุลชีพ และบริษัทผู้ผลิต	46
7	*Enterococcus* spp. จำแนกตามชนิดของ hemolysis บน human blood agar	60
8	จำนวนชนิดของ *Enterococcus* spp. ที่แยกได้จำแนกตามสิ่งส่งตรวจ	61
9	จำนวนสายพันธุ์ที่ให้ hemolysis แต่ละชนิดของ *E. faecalis* จำแนกตามประเภทสิ่งส่งตรวจ	62
10	จำนวน enterococci ที่แยกเป็น pure และ mixed culture จำแนกตามประเภทของสิ่งส่งตรวจ	63
11	*Enterococcus* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วยแผนกต่างๆ	64
12	ความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp. จำนวน 97 สายพันธุ์ โดยวิธีวางแผ่นยามาตรฐาน	68
13	การดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูงของ *Enterococcus* spp. 97 สายพันธุ์ โดยวิธี agar screening	69
14	แบบแผนการดื้อยาของ *Enterococcus* spp. 95 สายพันธุ์ โดยวิธีแพร่ซึมโดยใช้แผ่นยามาตรฐาน	72

ตาราง หน้า

15 จำแนก non-hemolytic *E. faecalis* สายพันธุ์ที่มีแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ การดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง และรูปแบบพลาสมิดเหมือนกัน 79

16 ลักษณะ phenotypes และรูปแบบพลาสมิดของ donors, recipients และ transconjugants 82

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	โคโลนีของ enterococci บน human blood agar เกิด hemolysis ชนิดต่าง ๆ	58
2	โคโลนีของ enterococci บน bile esculin medium	59
3-5	รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* ใน 0.6% agarose gel	74-76
6	รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecium* ใน 0.6% agarose gel	77
7	รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* ซึ่งมีแบบแผนดื้อยา Pn-Gm-Sm-Cp หลังตัดย่อยด้วย *Eco*RI และ *Hind* III	80
8	การเจริญของ *E. faecalis* WK8 (donor) และ *E. faecalis* WK67 (recipient) บน BHIA ที่เติม arabinose	83
9	โคโลนีของ transconjugant บน BHIA ที่เติมน้ำตาล arabinose	83
10	รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* (donors), *E. faecium* (recipient) และ transconjugants ใน 0.7% agarose gel	84
11	รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* (donors), *E. faecium* (recipient) และ transconjugants ใน 0.7% agarose ที่ตัดย่อยด้วย *Eco*RI และ *Hind* III	85

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้น แม้ว่าจะมีการคิดค้นพัฒนายาต้านจุลชีพชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการรักษา แต่แบคทีเรียสามารถพัฒนาตัวเองและสร้างยีนดื้อยาชนิดนั้นๆ ได้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง enterococci ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปกลม อาศัยเป็น normal flora ในลำไส้ของคน แม้ว่ามีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ (Johnson, 1994) แต่ enterococci สามารถดื้อยาได้ทั้งแบบ intrinsic และ acquired ต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาได้เกือบทุกชนิด ทำให้กลายเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยพบบ่อยเป็นลำดับที่ 2 (Moellering, 1992) และพบการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะมากที่สุด มีรายงานการดื้อของ enterococci ต่อยา streptomycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycosides เป็นชนิดแรก ก่อนปี ค.ศ. 1960 ในโรงพยาบาล New York สหรัฐอเมริกา จากนั้นมีรายงานการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูง (high-level resistance) ในหลายโรงพยาบาลทั้งในอเมริกา ยุโรป และเอเชีย (Horodniceanu, *et al.*, 1979 ; Hoffmann and Moellering, 1987 ; Jones, *et al.*, 1995 ; Vandamme, *et al.*, 1996) ซึ่งต่อมามีรายงานถึงการดื้อยาในกลุ่ม β-lactams ในโรงพยาบาลหลายประเทศ (Rhinehart, *et al.*, 1990 ; Chirurgi, *et al.*, 1992 ; Murray, 1992 ; Lavery, *et al.*, 1997) รวมทั้งการดื้อยาในกลุ่ม glycopeptides ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในปัจจุบัน โดยพบการระบาดมากในโรงพยาบาลในสหรัฐอเมริกา (CDC, 1993) ปัจจุบันมีรายงานว่า เชื้อที่ดื้อยาต้านจุลชีพได้หลายชนิด (Multidrug Resistant Enterococci) ส่วนใหญ่เป็น *E. faecium* (Jones *et al.*, 1995 ; Vandamme *et al.*, 1996 ; Lavery, *et al.*, 1997)

นอกจาก enterococci เป็นแบคทีเรียที่สามารถพัฒนาตัวเองในการดื้อยาต้านจุลชีพแล้วยังพบว่ามีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของยีนดื้อยาด้วย โดยเป็นแหล่งกำเนิดของยีนดื้อยาหลายชนิดซึ่งพบได้ทั้งบนโครโมโซม พลาสมิด และ transposons

(Courvalin, 1994) และสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาให้แก่กันรวมทั้งให้แบคทีเรียอื่น (Ducet-Populaire, *et al.*, 1992 ; Noble, Virani and Cree, 1992 ; Clewell, 1993) นอกจากการถ่ายทอดยีนดื้อยา มีการถ่ายทอดยีน hemolysin ซึ่งเป็นปัจจัยความรุนแรง (virulence factor) (Libertin, Dumitru and Stein, 1992) และพบว่า enterococci อยู่ทนได้ในสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล สามารถติดต่อระหว่างผู้ป่วยโดยผ่านทางมือของบุคลากรโรงพยาบาล (Zervos, *et al.*, 1986 ; Rhinehart, *et al.*, 1990) นอกจากนี้พบว่า การได้รับยาต้านจุลชีพในการรักษามาก่อน การนอนรักษาในโรงพยาบาลนาน การได้รับการรักษาที่มีการใส่อุปกรณ์เครื่องมือเข้าไปในร่างกายหรือได้รับการใส่สายสวนต่างๆ ภาวะร่างกายที่อ่อนแอ ถือเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อดื้อยา (Zervos, *et al.*, 1986 ; Chenoweth, *et al.*, 1994 ; Leclercq and Courvalin, 1997)

สำหรับในประเทศไทยไม่เคยมีรายงานการจำแนกสปีชีส์ของ enterococci หรือศึกษาติดตามการระบาดของสายพันธุ์ที่ดื้อยา มีรายงานเฉพาะการดื้อยาของ enterococci ต่อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงในโรงพยาบาลรามาธิบดี ในช่วงปี พ.ศ. 2523 (Murray, Tsao and Panida, 1983) โดยพบการดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง 14% และ 35% ตามลำดับ และจากรายงานของโรงพยาบาลศิริราช การดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูงเพิ่มขึ้นเป็น 44.5% และ 76 % ตามลำดับ (วิษณุ และ สุรภี, 2533) สำหรับการดื้อยาในกลุ่ม βlactams และกลุ่ม glycopeptides มีการดื้อยาในเปอร์เซ็นต์ต่ำ จากรายงานประจำปีของโรงพยาบาลรามาธิบดีในปี พ.ศ. 2539 พบการดื้อยา ampicillin 14% และดื้อยา vancomycin 2% ส่วนการศึกษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ระหว่างปี พ.ศ. 2528-2529 (สุเทพ และ สินีนาฏ, 2531) เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลังเกี่ยวกับการติดเชื้อ enterococci ไม่ได้เน้นศึกษาการดื้อยา โดยเฉพาะกลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง

ในรายงานนี้ได้ศึกษา enterococci ที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของสปีชีส์ต่างๆ และศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละสายพันธุ์โดยอาศัยแบบแผนการดื้อยา รูปแบบพลาสมิด รวมทั้งศึกษาปัจจัยดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยา เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาติดตามการระบาดของ enterococci

การตรวจเอกสาร

1. *Enterococcus* species

จากการรวบรวมข้อมูลของ Murray (1990) เกี่ยวกับประวัติความเป็นมาของ *Enterococcus* species หรือ enterococci พบว่ามีรายงานครั้งแรกในประเทศฝรั่งเศสเมื่อปี ค.ศ. 1899 ในชื่อ "enterocoque" โดย Theircelin มีความหมายถึง แบคทีเรียกรัมบวก รูปกลม เรียงตัวคู่ ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ และในปีเดียวกันนี้ MacCallum และ Hashings ได้รายงานถึงแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบ (endocarditis) ในชื่อ *Micrococcus zymogenes* ซึ่งต่อมาพบว่าเป็น hemolytic enterococcus ในปี ค.ศ. 1906 Andrews และ Horder แยก streptococcus ได้จากผู้ป่วยโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบ และตั้งชื่อว่า *Streptococcus faecalis* ซึ่งเป็นชื่อที่รู้จักกันแพร่หลาย และในปี ค.ศ. 1919 Orla-Jensen พบ *Streptococcus faecium* อีกสิบกว่าปีต่อมา ในปี ค.ศ. 1937 Sherman ได้ให้คำจำกัดความของ enterococci ว่าเป็น streptococci ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 °C และ 45 °C เจริญได้ใน 6.5% NaCl broth และที่ pH 9.6 สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที สามารถ hydrolyze esculin ได้ ซึ่งคุณลักษณะนี้ได้นำมาใช้แยก enterococci จาก non-enterococcal streptococci จนถึงทุกวันนี้ และได้จัดกลุ่ม streptococci เป็น 4 กลุ่ม คือ pyogenic, viridans, lactic และ enterococcus การจัดแบ่งกลุ่มตามแบบแผนของ Sherman คล้ายกับการแบ่งกลุ่มของ Lancefield ในช่วงต้นคริสตศักราช 1930 ซึ่งเป็นการทดสอบปฏิกิริยากับ antisera group ต่างๆ โดยที่ enterococci สามารถทำปฏิกิริยากับ group D antisera ในขณะที่ pyogenic streptococci จะทำปฏิกิริยากับ group A,B,C,E,F หรือ G และ viridans streptococci ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ group ใดๆ ได้

ในปี ค.ศ. 1970 Kalina ได้พยายามแยก enterococcal streptococci ออกมาเป็น genus *Enterococcus* โดยใช้คุณลักษณะทางด้าน phenotypes และการจัดเรียงตัวของเซลล์ แต่ไม่ประสบความสำเร็จ (Kalina, 1970, quoted in Facklam and Sahm, 1995) หลังจากมีการศึกษาทางด้านโมเลกุลมากขึ้น ในปี ค.ศ. 1984 Schleifer และ Kilpper-Balz ได้ใช้เทคนิค DNA-DNA และ DNA-rRNA hybridization ของ 16S rRNA ช่วยในการจัดจำแนก พบว่า *S. faecalis* และ *S. faecium* มีความแตกต่างจาก streptococci group D

จึงถูกแยกมาเป็น genus ใหม่ ให้ชื่อว่า genus *Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984) การจำแนกโดยวิธีนี้เป็นที่ยอมรับและต่อมาได้จัด genus *Enterococcus* ไว้ใน Bergey's Manual เมื่อปี ค.ศ. 1984 ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีทั้งหมด 17 สปีชีส์ ดังตาราง 1

ตาราง 1 สปีชีส์ใน genus *Enterococcus*

สปีชีส์	ปี ค.ศ. ที่จำแนก
E. faecalis	1984
E. faecium	1984
E. avium	1984
E. casseliflavus	1984
E. durans	1984
E. gallinarum	1984
E. malodoratus	1984
E. hirae	1985
E. mundtii	1986
E. raffinosus	1989
E. solitarius[a]	1989
E. pseudoavium	1989
E. ceorum	1989
E. columbae	1990
E. saccharolyticus	1990
E. disper	1991
E. sulfureus	1991
E. seriolicida[a]	1991
E. flavescens	1992

[a]Probably does not belong to genus *Enterococcus.*

ที่มา : Facklam and Sahm, 1995, หน้า 309

1.1 **รูปร่างและคุณสมบัติของ** genus *Enterococcus*

แบคทีเรียใน genus *Enterococcus* เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปกลม เรียงตัวเดี่ยว คู่ หรือเป็นสายสั้นๆ บางครั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้น (agar) จะมีรูปร่างแบบ coccobacilli และเมื่อเลี้ยงใน Thioglycollate broth จะมีรูปร่างแบบรูปไข่ (oval) และเรียงตัวเป็นสาย บางสายพันธุ์สามารถเคลื่อนไหวโดยใช้ flagella และสร้างสารสีเหลือง (yellow pigment) เชื้อนี้จัดอยู่ในพวก facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 35 °C เกือบทุกสายพันธุ์เจริญได้ที่ 10 °C และ 45 °C ทุกสายพันธุ์เจริญใน 6.5% NaCl broth และสามารถ hydrolyze esculin ซึ่งมีเกลือน้ำดี 40% (bile esculin medium) และส่วนใหญ่สามารถ hydrolyze pyrrolidonyl-β-naphthylamide (PYR) ได้เหมือนกับ streptococci group A ยกเว้น *E. cecorum, E. columbae* และ *E. saccharolyticus* ทุกสายพันธุ์สามารถผลิต leucine aminopeptidase (LAP) enterococci จะไม่มี cytochrome enzyme และให้ผลลบในการทดสอบ catalase แต่บางครั้งพบว่าให้ผลบวกเทียม (pseudocatalase) ส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยากับ group D antisera มีบางสายพันธุ์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ group Q antisera เกือบทุกสายพันธุ์จะหมักแบบ homofermentative และไม่สร้างแก๊ส ให้กรดแลคติค ในการหมักน้ำตาล glucose เมื่อศึกษาปริมาณ G+C ของ DNA พบว่าอยู่ในช่วง 37-45 mol % (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984 ; Facklam and Collins, 1989 ; Facklam and Sahm, 1995) สามารถแยกเชื้อใน genus *Enterococcus* จากพวก catalase-negative, gram-positive cocci ได้ดังตาราง 2

ตาราง 2 ลักษณะทางด้าน phenotype ที่แตกต่างกันของเชื้อพวก facultative anaerobic, catalase-negative, gram-positive genera[a]

Genus	Cell arrangement	VAN	GAS	PYR	LAP	BE	NaCl	Growth at:		MOT	HEM
								10°C	45°C		
Enterococcus	ch	S[b]	−	+	+	+	+	+	+	V	α, β, n
Streptococcus	ch	S	−	−[c]	+	−[d]	−[e]	−	V	−	α, β, n
Globicatella	ch	S	−	+	−	−	+	−	−	−	α
Lactococcus	ch	S	−	+	+	+	V	+	−[f]	−	α, n
Vagococcus	ch	S	−	+	+	+	+	+	−	+	α, n
Leuconostoc	ch	R	+	−	−	V	V	+	V	−	α, n
Pediococcus	cl, T	R	−	−	+	+	V	−	+	−	α
Tetragenococcus	cl, T	S	−	−	+	+	+	−	+	−	α
Aerococcus	cl, T	S	−	+	−	V	+	−	+	−	α
Gemella	cl, T	S	−	+	V	−	−	−	−	−	α, n
Helcococcus	cl, T	S	−	+	−	+	+	−	−	−	α

[a]Abbreviation and symbols: ch, chain ; cl, clumps ; T, tetrads ; VAN, susceptibility to vancomycin (30-μg disk); GAS, gas produced from glucose in Mann, Rogosa, Sharpe Lactobacillus broth (MRS) ; PYR, production of pyrrolidonyl aryiamidase ; LAP, production of leucine aminopeptidase ; BE, reaction on bile-esculin medium ; NaCl, growth in broth containing 6.5% NaCl ; MOT, motile ; HEM, hemolysis on blood agar containing 5% sheep blood ; α, alpha-hemolysis ; β, beta-hemolysis ; n, no hemolysis ; S, susceptible ; R, resistance ; −, ≥ 5% negative reaction ; +, ≥95% positive reaction ; V, variable reaction.

[b]Some strains are vancomycin resistant but still show a small inhibition around the disk ; other strains grow right up to the disk and are vancomycin resistant under the defined criteria.

[c]Group A streptococci and nutritionally variant streptococci are PYR positive ; all others are negative.

[d]Of viridans streptococci, 5 to 10% are bile-esculin positive.

[e]Some beta-hemolytic streptococci grow in 6.5% NaCl broth.

[f]Some strains of lactococci grow very slow at 45°C.

ที่มา : Facklam and Sahm, 1995, หน้า 309

1.2 **การบ่งชี้สปีชีส์** (Species Identification)

ในการจำแนก enterococci การบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์เป็นสิ่งที่สำคัญ นอกจากมีประโยชน์ในด้านระบาดวิทยา เช่น ทำให้ทราบถึงการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของแต่ละสปีชีส์ การค้นพบสปีชีส์ใหม่ๆ เป็นต้น ยังมีประโยชน์ในการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของสปีชีส์ เนื่องจากพบว่าการดื้อยาต้านจุลชีพบางชนิดเป็นลักษณะเฉพาะของบางสปีชีส์

จากการรวบรวมข้อมูลของ Murray (1990) พบว่า ในการบ่งชี้สปีชีส์ของ Sherman เมื่อปี ค.ศ. 1937 อาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) และการย่อยโปรตีน (proteolysis) ช่วยในการบ่งชี้ และในขณะนั้นสปีชีส์ที่พบได้แก่ *S. faecalis*, *S. faecalis* var. *liquefacines*, *S. faecalis* var. *hemolyticus* และ *S. faecalis* var. *zymogenes* ซึ่งต่อมามีการศึกษาของ Deibel ในปี ค.ศ. 1964 พบว่าคุณสมบัติ proteolysis ไม่แน่นอนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามชนิดของอาหารที่ใช้ทดสอบ และพบว่าคุณสมบัติ hemolysis ในสายพันธุ์ของ *S. faecalis* มีการสูญหายได้ง่าย และในการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) พบว่าคุณสมบัติ hemolysis ถูกควบคุมโดยพลาสมิดและสามารถถ่ายทอดได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ ในปี ค.ศ. 1957 Graudal ใช้ลักษณะการเคลื่อนที่ (motile) ในการบ่งชี้และพบ enterococci ที่เคลื่อนที่ได้ คือ *S. faecium* subsp. *mobilis* ในปี ค. ศ. 1959 Hugh ได้ใช้คุณสมบัติการสร้างสารสีเหลืองบ่งชี้ และพบ enterococci ที่เคลื่อนที่และสามารถสร้างสารสีเหลืองได้ จึงให้ชื่อว่า *S. faecium* var. *casseliflavus* ในปี ค.ศ. 1967 Nowlan และ Deibel ใช้การทำปฏิกิริยากับ antisera group ต่างๆ และพบ *S. avium* ซึ่งแยกได้จากไก่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง Lancefield's group D และ group Q antisera

ในการศึกษาของ Facklam (1972) ได้ใช้แบบแผนการทดสอบทางด้านชีวเคมีและสรีรวิทยาหลายอย่างในการบ่งชี้สปีชีส์ เช่น การทำปฏิกิริยากับ tetrazolium การทนต่อ tellurite การย่อยแป้ง การสร้าง βhemolysis การสร้างกรดจาก esculin, lactose, sorbitol, sucrose, glycerol, mannitol, arabinose, raffinose เป็นต้น ซึ่งในขณะนั้น enterococci อยู่ในกลุ่มของ streptococci group D ต่อมา Schleifer และ Kilpper-Balz (1984) ใช้ nucleic acid ช่วยในการจัดจำแนก ร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและโครงสร้างของ peptidoglycan ทำให้สามารถแยก enterococci มาเป็น genus *Enterococcus*

และได้ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization ทดสอบยืนยันสปีชีส์ต่างๆ ใหม่ สปีชีส์ที่แยกโดยวิธีนี้ ได้แก่ *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. duran*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodolatus* และ *E. mundii* ซึ่งในช่วงนั้นมีการค้นพบสปีชีส์ใหม่ๆ ขึ้นมาอีก คือ *E. raffinosus*, *E. solitarius* และ *E. pseudoavium* ในปี ค.ศ. 1989 Facklam และ Collins จึงได้ปรับแบบแผนการทดสอบโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีใหม่ และเพิ่มคุณสมบัติอีก 3 อย่างคือ การใช้ pyruvate การใช้ arginine และ การให้กรดใน sorbose broth ร่วมกับวิธีเดิมของ Facklam 14 อย่าง (Facklam, 1972) และตรวจสอบยืนยันโดยวิธี DNA-DNA hybridization จากการศึกษาครั้งนั้นพบ enterococci 12 สปีชีส์ ที่แยกได้จากคนตามแบบแผนใหม่นี้ ซึ่งปัจจุบันแบบแผนของ Facklam และ Collins (1989) เป็นแบบแผนที่ใช้เป็นหลักในการบ่งชี้สปีชีส์ในหลายรายงาน (Gordon *et al.*, 1992 ; Gordts *et al.*, 1995 ; McNamara,King and Smyth, 1995 ; Vandamme *et al.*, 1996 ; Pegues *et al.*, 1997)

Facklam และ Sahm ได้ปรับแบบแผนการทดสอบแยกสปีชีส์โดยใช้คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและสรีรวิทยาไว้ล่าสุดใน Manual of Clinical Microbiology Six Edition ปี ค.ศ. 1995 และจัดแบ่งสปีชีส์เป็น 4 กลุ่ม ทั้งที่แยกได้จากคนและแหล่งอื่นๆ โดยใช้คุณสมบัติการสร้างกรดใน mannitol, sorbitol และ sorbose broth และความสามารถในการ hydrolyze arginine และในแต่ละกลุ่มใหญ่สามารถบ่งชี้สปีชีส์โดยใช้ปฏิกิริยาเฉพาะ เช่น ความสามารถในการสร้างกรดใน arabinose, raffinose sucrose และ ribose broth ความทนต่อ tellurite และการใช้ pyruvate ความสามารถในการเคลื่อนที่ การสร้างสารสีเหลือง ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 คุณสมบัติต่างๆ ของ *Enterococcus* species[a]

Species	MAN	SBL	SOR	ARG	ARA	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	RIB
Group I												
E.avium	+	+	+	—	+	—	—	—	—	+	+	+
E. malodolatus	+	+	+	—	—	+	—	—	—	+	+	+
E. raffinosus	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+	+
E. pseudoavium	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Group II												
E. faecalis	+	+	—	+	—	—	+	—	—	+.	+	+
E. faecium	+	—.	—	+	+	—	—	—	—	+.	—	+
E. casseliflavus	+	—.	—	+	+	+	—.	+	+	+	—.	+
E. mundii	+	—.	—	+	+	+	—	—	+	+	—	+
E. flavescens	+	—.	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—
E. gallinarum	+	—	—	+	+	+	—	+	—	+	—	+
Group III												
E. durans	—.	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	?
E. hirae	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+	—	?
E. dispar	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+	+	?
E. faecalis (var)	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	+	?
Group IV												
E. sulfureus	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	+

[a]Abbreviations and symbols : MAN, mannitol ; SBL, sorbitol ; SOR, sorbose ; ARG, arginine ; ARA, arabinose ; RAF, raffinose ; TEL, 0.04% tellurite ; MOT, motility ; PIG, pigmented ; SUC, sucrose ; PYU, pyruvate, RIB, ribose ; +, >90% positive ; —, <10% positive ; —. Or +., occasional exception (<3% of strains show aberrant reactions) ; ?, not tested, so results are unknown.

ที่มา : Facklam and Sham, 1995, หน้า 311

จากคุณลักษณะทางด้าน phenotypes ของ enterococci พบว่ามี 3 สปีชีส์ที่แตกต่างจาก typical enterococci ได้แก่ *E. saccharolyticus*, *E. cecorum* และ *E. columbae* เนื่องจากให้ PYR negative และบางสายพันธุ์เจริญได้ไม่ดีใน 6.5% NaCl เหมือนกับ *S. bovis* group ซึ่งทั้ง 3 สปีชีส์นี้พบในวัวหรือนก ไม่พบในคน (Devriese, *et al.*, 1990 ; Rodrigues and Collins, 1990 ; Facklam and Sahm, 1995) ดังตาราง 4

ตาราง 4 ลักษณะ phenotypes ของ atypical *Enterococus* species และ *S. bovis* group

Group or species	BE	NaCl	PYR	LAP	GAS	VAN	Growth at		ARG	MAN	SBL	SOR	RIB
							10°C	45°C					
Typical enterococci	+	+	+	+	−	S	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
E. saccharolyticus	+	+	−	+	−	S	+	+	−	+	+	+	+
E. cecorum	+	+[a]	−	+	−	S	+[a]	+	−	−	+	−	+
E. columbae	+	+[a]	−	+	−	S	+	+	−	−	−	−	+
S. bovis group	+	−	−	+	−	S	−	+	−	V	−	−	−

[a] Grows very slowly ; may require 7 to 10 days of incubation

ที่มา : Facklam and Sahm, 1995, หน้า 311

ในการบ่งชี้สปีชีส์โดยใช้แบบแผนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา มักมีปัญหาคือ ผลการทดสอบไม่ตรงตามแบบแผน เช่น ในการศึกษาของ Vincent และคณะ (1991) พบว่าในการบ่งชี้สปีชีส์ enterococci ที่ดื้อยา vancomycin ที่แยกได้ทางคลินิก พบ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ต่อยา vancomycin ที่สูงกว่าปกติที่พบในสปีชีส์นี้ จึงได้ศึกษาบ่งชี้สปีชีส์ใหม่โดยใช้วิธีวิเคราะห์รูปแบบ penicillin-binding protein (PBP profiles) และศึกษาความคล้ายคลึงของ DNA โดยใช้วิธี DNA-DNA hybridization พบว่ามีสปีชีส์ *E. gallinarum* บางสายพันธุ์ คือสปีชีส์ *E. casseliflavus* แต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีเหลือง และในการศึกษานี้พบ *E. casseliflavus* สายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งไม่

เคลื่อนที่ แต่มีรูปแบบของ PBP และ DNA เหมือน *E. casseliflavus* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกซึ่งเคลื่อนที่ และได้สรุปไว้ว่า คุณสมบัติการเคลื่อนที่ และการสร้างสารสี อาจเชื่อถือไม่ได้ในการใช้บ่งชี้สปีชีส์ของ 2 สปีชีส์นี้ และในการศึกษาของ Teixeira และคณะ (1995) แยกได้ *E. faecium* จากผู้ป่วยหลายสายพันธุ์ที่ให้ผลการทดสอบไม่ตรงตามแบบแผนทางชีวเคมี เช่น ไม่หมักน้ำตาล mannitol แต่หมักน้ำตาล raffinose และ sorbitol จึงได้บ่งชี้สปีชีส์โดยใช้วิธีศึกษาโปรตีนทั้งหมด (Whole-cell proteins) บน polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ร่วมกับการทำ DNA-DNA hybridization พบว่าทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลที่ตรงกันคือสายพันธุ์ที่แยกได้เหล่านั้นเป็นสปีชีส์ *E. faecium* จึงได้สรุปไว้ว่า *E. faecium* สามารถแสดงลักษณะ phenotype ทางชีวเคมีได้หลายอย่าง

ในการบ่งชี้สปีชีส์สามารถใช้วิธีศึกษาโปรตีนทั้งหมดบน PAGE เนื่องจากการมีโปรตีนที่เหมือนกันแสดงถึงการมี DNA ที่เหมือนกันมากด้วย เช่น ในการศึกษาของ Vandamme และคณะ (1996) ได้ใช้วิธีการนี้ในการทดสอบยืนยันร่วมกับวิธีการใช้เครื่องอัตโนมัติ (API rapid ID 32 STREP) และแบบแผนของ Facklam และ Collins และพบความแตกต่างในการบ่งชี้สปีชีส์ระหว่างแบบแผนของ Facklam และ Collins และวิธีการศึกษาโปรตีนทั้งหมด 3 สายพันธุ์ใน 25 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. avium* และ *E. pseudoavium*, *E. faecium*, *E. duran* และ *E. hirae* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่แยกความแตกต่างยากโดยใช้ลักษณะทาง phenotype ส่วนวิธีการใช้เครื่องอัตโนมัติ สามารถบ่งชี้สปีชีส์ได้ดี 88.6% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด 472 สายพันธุ์ โดยเฉพาะใน *E. faecalis* และ *E. faecium* เมื่อเทียบกับวิธีการใช้แบบแผนของ Facklam และ Collins และการศึกษาโปรตีนทั้งหมด และสามารถใช้โครงสร้างของ peptidoglycan ในการบ่งชี้สปีชีส์ เช่น *E. faecalis* มีส่วนประกอบของกรดอมิโนชนิด $Lys\text{-}Ala_{2\text{-}3}$ ส่วน *E. faecium* , *E. casseliflavus*, *E. avium* และ *E. duran* มีส่วนประกอบของกรดอมิโนชนิด Lys-D-Asp เป็นต้น (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984)

นอกจากนี้สามารถใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการบ่งชี้สปีชีส์ได้ เช่น การตรวจหา genotype ของยีนดื้อยา vancomycin โดยเพิ่มจำนวน (amplify) ยีนดื้อยาต่างๆ ซึ่งเป็นยีนที่เฉพาะกับสปีชีส์ มีการศึกษาของ Dutka-Malen, Evers และ Courvalin (1995) ได้ใช้วิธี PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *vanC-1* ในการบ่งชี้ *E. gallinarum*, *vanC-2* ในการบ่งชี้ *E. casseliflavus* , *vanC-3* ในการบ่งชี้ *E. flavescen*, $ddl_{E.\ faecalis}$

ในการบ่งชี้ *E. faecalis* และ $ddl_{E.\ faecium}$ ในการบ่งชี้ *E. faecium* และจากการศึกษาของ Tyrrell และคณะ (1997) ได้ใช้วิธี PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนระหว่าง 16S rRNA และ 23S rRNA (intergenic spacer) ในการบ่งชี้สปีชีส์ของ enterococci โดยเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่สามารถเชื่อถือได้

โดยทั่วไปตามห้องปฏิบัติการนิยมเพาะเลี้ยง enterococci บน tryptic soy agar หรือ brain heart infusion หรือ blood agar base ที่มีเลือดแกะ 5% หรือเติมเลือดสัตว์ชนิดอื่นในปริมาณ 5% *E. faecalis* บางสายพันธุ์ จะให้ β-hemolysis บน agar base ซึ่งเติมเลือดกระต่ายหรือเลือดม้า แต่ไม่ให้ β-hemolysis บน agar base ชนิดเดียวกันเมื่อเติมเลือดแกะ (Facklam and Sahm, 1995) จากการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) พบว่าเมื่อใช้เลือดม้าจะได้ hemolysis 31% ในขณะที่พบ hemolysis 60% เมื่อใช้เลือดคนหรือเลือดกระต่าย นอกจากนี้พบว่าเลือดคนให้ hemolysis หลังเพาะเลี้ยง 1 คืน ซึ่งเร็วกว่าการใช้เลือดกระต่ายที่ต้องสังเกต hemolysis หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อ 2-3 วัน สามารถเลี้ยง enterococci ได้ที่อุณหภูมิ 35-37 °C และไม่จำเป็นต้องเลี้ยงในที่มี CO_2 แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีกว่าในสภาพที่มี CO_2 สูง

ในการขนส่ง enterococci สามารถใช้ transport medium เกือบทุกชนิด หรือใช้ swab ที่แห้ง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงภายใน 1 ชั่วโมง การเก็บรักษาเชื้อใช้วิธี lyophilization หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70°C ได้หลายปี และสามารถเก็บบนอาหารวุ้นในหลอดที่อุณหภูมิ 4°C ได้หลายเดือน (Facklam and Sahm,1995)

1.3 Typing methods

เนื่องจาก enterococci ได้กลายเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงได้ เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือดและเยื่อบุหัวใจอักเสบและโดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานถึงการระบาดของ enterococci ที่ดื้อยาต้านจุลชีพต่างๆ เพิ่มมากขึ้น การทำ typing หรือการแยกชนิดสายพันธุ์ของกลุ่มเชื้อในสปีชีส์ต่างๆ จึงมีความจำเป็น เช่น กรณีของการเพิ่มขึ้นของเชื้อในสปีชีส์เดียวกันที่ก่อโรคติดเชื้อในกลุ่มผู้ป่วย กรณีที่ต้องการแยกความแตกต่างระหว่างการติดเชื้อที่กลับเป็นซ้ำจากสายพันธุ์เดิม (relapsing same strain) และการติดเชื้อจากเชื้อสายพันธุ์ใหม่ (reinfection) กรณีที่แยกได้เชื้อสปีชีส์เดิมในผู้ป่วยคนเดียวกันหลายๆ ครั้ง หรือกรณีที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาทั้ง

ในโรงพยาบาลและระหว่างโรงพยาบาล ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการศึกษาระบาดวิทยา และการควบคุมการติดเชื้อ ในการทำ typing มีวิธีการที่ใช้ศึกษา 2 วิธีใหญ่ๆ คือ phenotypic techniques และ genotypic techniques

1.3.1 Phenotypic techniques เป็นการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยใช้คุณลักษณะที่แสดงออกของเชื้อ ได้แก่ biochemical reaction profiles, hemolytic activity, antimicrobial resistance pattern, bacteriocin typing, phage typing, และ serological characterization ซึ่งวิธีการที่สามารถทำได้ง่ายที่สุดคือ biochemical reaction profiles, hemolytic activity และ antimicrobial resistance patterns แต่เป็นวิธีที่แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้น้อย ส่วนวิธี bacteriocin typing, phage typing, และ serological characterization เป็นวิธีการที่ทำได้ค่อนข้างยากกว่า และแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้น้อยเช่นเดียวกัน phenotypic techniques มักใช้เวลานานในการศึกษา ไม่คุ้มกับค่าใช้จ่าย อาจเกิดการแปลผลที่ผิดพลาดได้ (Facklam and Sahm, 1995) มีการคิดค้นวิธี biochemical fingerprinting ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ ซึ่งวิธีนี้เป็นการทำ biotyping โดยใช้การทดสอบคุณสมบัติการหมักน้ำตาล 23 ชนิดในเครื่องอัตโนมัติ และอ่านค่าโดยการวัด kinetics ของปฏิกิริยาทางชีวเคมี ทำให้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้มากขึ้นแปลผลง่ายและใช้เวลาน้อยกว่า 8 ชั่วโมง สามารถใช้วิธีการนี้ในการ screen สายพันธุ์จำนวนมากครั้งละ 200 สายพันธุ์ก่อนที่จะใช้วิธีทาง genotypic techniques (Kuhn, *et al.*, 1995)

1.3.2 Genotypic techniques เป็นการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยใช้ความแตกต่างของ DNA ของพลาสมิดหรือโครโมโซม การทำ plasmid analysis เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบ (plasmid profiles) เป็นวิธีแรกที่ใช้ DNA ศึกษาการระบาด มีข้อดีคือ ทำได้ง่ายและแปลผลง่าย แต่มีข้อเสียคือ ในสายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิด หรือมี 1-2 พลาสมิด จะแยกความแตกต่างยาก จึงใช้วิธีการตัดย่อยพลาสมิดเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบหรือ Restriction Endonuclease Analysis (REA) ของพลาสมิด ซึ่งช่วยให้แยกความแตกต่างได้มากขึ้น เช่น ในการศึกษาของ Chirurgi และคณะ (1992) ได้ศึกษาการแพร่ระบาดของ enterococcus ที่ดื้อยา ampicillin ที่ไม่สร้าง βlactamase โดยใช้เอนไซม์ตัดย่อย 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Hind* III เปรียบเทียบกับพลาสมิดที่ไม่ตัดย่อย พบว่ามีทั้งที่มีรูปแบบบน agarose gel ที่

เหมือนกันไม่ว่าจะตัดด้วยเอนไซม์ชนิดใดและเหมือนกับที่ไม่ใช้เอนไซม์ตัดย่อย และมีรูปแบบที่แตกต่างกันระหว่างใช้เอนไซม์ 2 ชนิด แม้ว่าจะมีรูปแบบที่ไม่ใช้เอนไซม์ตัดเหมือนกัน ซึ่งเหมือนกับการศึกษาของ Sexton และคณะ (1993) ที่พบว่า REA ของพลาสมิดจะแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ดีกว่าพลาสมิดที่ไม่ตัดย่อย เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพลาสมิดเป็น mobile extrachromosomal element สามารถสูญหาย หรือได้รับมาใหม่ หรืออาจมี transposon แทรกบนพลาสมิดหรือหลุดออกได้ นอกจากนี้พลาสมิดมีหลายแบบ ได้แก่ supercoiled, linear และ opened-circular จะเคลื่อนที่บน agarose gel ได้ต่างกัน และในขั้นตอนการเตรียมพลาสมิดที่ต่างกันจะให้จำนวนแถบที่ไม่เท่ากันได้ ทำให้ความถูกต้องแม่นยำลดลง มีการศึกษาของ Straut และคณะ (1997) ซึ่งศึกษาการระบาดของ *E. faecalis* ที่ดื้อยา gentamicin ในระดับสูง ในประเทศโรมาเนีย พบว่าชนิดของการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) แบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ (antibiotype) MIC ของยา gentamicin และรูปแบบพลาสมิดเป็นวิธีที่แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ในระดับหนึ่ง ควรเปรียบเทียบรูปแบบของโครโมโซมร่วมด้วย

ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยการเปรียบเทียบรูปแบบ DNA ของโครโมโซมโดยใช้ REA สามารถแยกขนาด DNA ได้หลายวิธี ได้แก่ วิธี Contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis (CHEF) ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียคือ มีแถบ DNA จำนวนมากและซ้อนกัน และในกรณีที่ REA ตัดได้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่ ≥25 kb มักแยกไม่ออกบน agarose gel อาจเกิดการฉีกขาดหรือเกิดการย้วยของ DNA ในระหว่างการเคลื่อนได้ แต่ก็มีการนำมาใช้ในหลายการศึกษา (Donabedian, *et al.*, 1992 ; Chow, *et al.*, 1993 ; Boyce, *et al.*, 1994) วิธีการใช้กระแสไฟฟ้าเป็นช่วงๆ หรือวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) เป็นวิธีที่สามารถแยกขนาด DNA ได้ตั้งแต่ 10-800 kb ไม่ทำให้เกิดการฉีกขาดหรือย้วยของ DNA แปลผลและแยกความแตกต่างง่าย แต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลาในการเตรียม DNA นาน 2-4 วัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ใส่บัฟเฟอร์และเอนไซม์ทั้งหมดลงใน agarose gel และต้องใช้เครื่องมืออุปกรณ์เฉพาะซึ่งมีราคาแพง อย่างไรก็ตามมีการใช้ PFGE ในการศึกษา typing ของ enterococci ในสหรัฐอเมริกาและในยุโรป (Murray *et al.*, 1992 ; Well *et al.*, 1992 ; Handwerger *et al.*, 1993 ; Endtz *et al.*, 1997 ; Lavery *et al.*, 1997 ; Straut *et al.*, 1997) หรือใช้วิธี field inversion gel electrophoresis ในการแยกชิ้น

ส่วน DNA ของโครโมโซม ซึ่งสามารถใช้ electrophoresis chamber ธรรมดาได้ โดยใช้กระแสไฟฟ้ากลับไปมา และใช้เวลาในการทำประมาณ 40 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PFGE ในการทำ typing พบว่าวิธี field inversion gel electrophoresis เป็นวิธีที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้โดยให้ผลที่คล้ายกับวิธี PFGE และเป็นวิธีที่สามารถแยก DNA ขนาด 50-200 kb ได้ดี ส่วนวิธี PFGE สามารถแยกขนาด DNA มากกว่า 250 kb ได้ดีกว่า (Green, *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ในการทำ typing มีการใช้วิธี restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) ร่วมกับการทำ southern blot ซึ่งต้องใช้ probe ที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ดีมาตรวจจับ เช่น อาจทำ RFLPs ของ insertion sequence (IS), transposons หรือ ribosome ซึ่งเป็นการทำ ribotyping สามารถแปลผลได้ง่าย แต่การทำ ribotyping เป็นวิธีที่แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ไม่ดี เนื่องจาก ribosomal RNA มี conserve sequence ซึ่งพบเหมือนกันในแต่ละสปีชีส์ จึงเหมาะที่จะใช้บ่งชี้สปีชีส์มากกว่าใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ เช่น ในการศึกษาของ Bingen และคณะ (1991) ได้ทำ typing ของ VRE 16 สายพันธุ์ จากผู้ป่วยเด็ก 15 คน ในปารีส ประเทศฝรั่งเศส โดยใช้วิธี RFLPs ของ DNA ทั้งหมดร่วมกับ ribotyping พบว่า ribotyping แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้น้อยกว่าการทำ RFLPs ของ DNA และได้มีการประยุกต์ใช้ PCR ในการทำ typing โดยการตัดย่อย DNA แล้วใช้เทคนิค PCR มา amplify ส่วนของ DNA ที่ต้องการศึกษา แต่ทั้งนี้จะต้องระวังในเรื่องของ false-positive จากการปนเปื้อน DNA เป้าหมาย และอาจยุ่งยากในการหา primer และ template (Endtz, *et al.*, 1997)

1.4 แหล่งที่พบเชื้อ

Enterococci อยู่เป็น normal flora ในลำไส้ของคนปกติ และบริเวณ genitourinary tract (Facklam and Sahm, 1995) จากการศึกษาของ Noble (1978) ได้ตรวจอุจจาระของทารกแรกเกิดอายุ 6 ถึง 7 วัน ในโรงพยาบาล จำนวน 21 คน ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ จำนวน 10 คน และผู้ใหญ่ปกติ จำนวน 29 คน พบว่าในทารกพบเฉพาะ *E. faecalis* 48% ไม่พบ *E. faecium* และสปีชีส์อื่นๆ ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ พบ *E. faecalis* 80%, *E. faecium* 30% และ *E. avium* 10% ส่วนในผู้ใหญ่ปกติพบ *E. faecalis* 48.2%, *E. faecium* 41.3% และ *E. avium* 6.9% และจากการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) ได้แยก

enterococci จากอุจจาระของนักศึกษาแพทย์ที่มีสุขภาพสมบูรณ์ จำนวน 100 คน พบ *E. faecium* มากที่สุด 84%, *E. faecalis* 23% และ *E. avium* 8%

ในทางคลินิก *Enterococcus* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่ประมาณ 80-90% เป็น *E. faecalis* รองลงมาคือ *E. faecium* ประมาณ 5-10% และสปีชีส์อื่นๆ ซึ่งพบน้อย ได้แก่ *E. raffinosus, E. casseliflavus, E. avium , E. gallinarum, E. mundtii , E. flavescens, E. durans , E. hirae* และ *E. faecalis* variant strains (Gordon, *et al.*, 1992 ; Facklam and Sahm, 1995 ; Ike, Hashimoto and Clewell, 1987 ; Vandamme, *et al.*, 1996 ; Moellering, 1992 ; McNamara, King and Smyth, 1995 ; Facklam and Collin, 1989) สามารถแยก enterococci ได้จากหลายตำแหน่งของร่างกาย ที่พบมากที่สุด คือ ทางเดินปัสสาวะ ซึ่งแยกเชื้อได้ประมาณ 50-60% ของจำนวนเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด รองลงมาคือ จากแผลประมาณ 10-20% ในกระแสเลือดประมาณ 2-10% และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งพบน้อย เช่น ทางเดินน้ำดี ในช่องท้อง ทางเดินหายใจ ช่องไขสันหลัง ช่องคลอด เป็นต้น (Ike, Hashimoto and Clewell, 1987 ; Gordon *et al.*, 1992 ; MacNamara, King and Smyth, 1995) ในการศึกษาของ Gordon และคณะ (1992) ในสหรัฐอเมริกา พบว่าไม่มีความแตกต่างของการกระจายระหว่างสปีชีส์กับตำแหน่งที่พบ (site) อย่างมีนัยสำคัญ และในการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) ในประเทศญี่ปุ่น ได้จำแนกสปีชีส์กับตำแหน่งที่พบ โดยพบว่าสามารถพบ *E. faecalis* ได้ทุกประเภทของสิ่งส่งตรวจซึ่งมาจากเกือบทุกตำแหน่งของร่างกาย และพบ *E. faecium* ได้จากสิ่งส่งตรวจหลายๆ ประเภทจากหลายตำแหน่งของร่างกายเช่นกัน และสำหรับสปีชีส์อื่นๆ ไม่ได้กล่าวถึง

นอกจากนี้สามารถพบเชื้อนี้ได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปในโรงพยาบาล เช่น ราวเตียง โต๊ะข้างเตียง ท่อช่วยหายใจ เครื่องวัดความดัน ผ้าพันสำหรับวัดความดัน หูฟัง เครื่องวัดออกซิเจนในเนื้อเยื่อ เครื่องวัดอุณหภูมิของร่างกายโดยใช้ไฟฟ้า เครื่องตรวจน้ำตาลในเลือด และบริเวณผิวของอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ เป็นต้น (Livorness, *et al.*, 1992 ; Boyce, *et al.*, 1994 ; Edmond, *et al.*, 1995 ; Wade, 1995) มีการศึกษาของ Wade, Desai และ Casewell (1991) พบว่า *E. faecium* ที่ดื้อยา vancomycin สามารถอยู่ทนบนมือได้นาน 30 นาที และการล้างมือด้วยน้ำสบู่ธรรมดาไม่สามารถทำลายเชื้อได้ ต้องใช้น้ำยา chlorhexidine digluconate หรือ povidone-iodine จึงจะสามารถทำลายเชื้อนี้ได้

มีรายงานการพบ enterococci ได้จากแหล่งอื่นนอกจากคน เช่น ในสัตว์ต่างๆ มีรายงานการพบ *E. columbae* ในลำไส้ของนกพิราบ (Devriese, *et al.*, 1990) พบ *E. seriolicida* ในปลา (Kusuda, *et al.*, 1991) พบ *E. saccharolyticus* ในลำไส้วัว (Rodrigues and Collins, 1990) เป็นต้น และสามารถพบ enterococci ได้ในเนื้อหมูและเนื้อวัวบด (Klein, Pack and Reuter, 1998) ในดิน (Kibbey, Hagedorn and McCoy, 1978) และในน้ำทิ้ง (Facklam and Sahm, 1995)

1.5 การทำให้เกิดโรค

Enterococci เป็นแบคทีเรียที่อยู่เป็น normal flora บริเวณลำไส้และ genitourinary tract สามารถก่อโรคติดเชื้อในคนได้ โดยการติดเชื้อจะเป็นแบบ endogenous และ exogenous การติดเชื้อแบบ endogenous เกิดโดยเชื้อซึ่งเกาะบริเวณ epithelium ของลำไส้จะลุกล้ำผ่าน mucosa เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ ตับ ม้าม และเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต (Johnson, 1994) การติดเชื้อแบบนี้มักพบในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ ได้รับยากดภูมิต้านทาน ผู้ป่วยที่ได้รับอุบัติเหตุและได้รับการผ่าตัดบริเวณลำไส้ มีการศึกษาของ Well และ Erlandsen (1991) ได้ทำการศึกษาในหนูโดยใช้วิธีของ immunofluorescent และแสดงให้เห็นว่า *E. faecalis* สามารถเคลื่อนย้าย (translocate) และลุกล้ำจากลำไส้เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ ตับ และม้ามได้ ส่วนการติดเชื้อแบบ exogenous เป็นการติดเชื้อจากผู้ป่วยคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่งจากการสัมผัส ซึ่งเชื้ออาจอยู่บริเวณผิวหนัง อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ หรือผ่านทางมือของบุคลากรทางแพทย์และพยาบาล มีการศึกษาของ Rhinehart และคณะ (1990) พบว่าบนมือของพยาบาลและในอุจจาระมี enterococci สปีชีส์เดียวกันและดื้อยาเหมือนกันกับสายพันธุ์ที่ระบาดในผู้ป่วย เช่นเดียวกับการศึกษาอื่นๆ ที่พบการติดเชื้อในลักษณะนี้ (Well, *et al.*, 1992 ; Rubin, *et al.*, 1992) และมีการศึกษาของ Beezhold และคณะ (1997) พบว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ enterococci ที่ดื้อยา vancomycin (Vancomycin Resistance Enterococci, VRE) ในกระแสเลือด สามารถพบ VRE ได้จากผิวหนังที่บริเวณข้อพับที่แขนและขาหนีบ 86% และจากอุจจาระ 100% เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ติดเชื้ออื่นในกระแสเลือด ซึ่งพบ VRE ที่ผิวหนัง 23% และจากอุจจาระ 37% และได้สรุปไว้ว่า enterococci ที่อยู่บริเวณผิวหนังอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ โดยการใส่สายสวนหลอดเลือด

Enterococci จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ เมื่อเทียบกับ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pyogenes* พบว่า enterococci มี 50%Lethal dose (LD_{50}) ต่อสัตว์ทดลองค่อนข้างสูง (Moellering, 1992) ปัจจัยความรุนแรง (virulence factor) ของ enterococci มียีนที่ควบคุมการสร้างอยู่บนพลาสมิด และมักพบยีนซึ่งควบคุมการดื้อยาร่วมด้วย สามารถถ่ายทอดได้โดยระบบ pheromone (Clewell, 1993) ปัจจัยความรุนแรงของ enterococci มี 3 ชนิด คือ

1.5.1 Cytolysin หรือ hemolysin ควบคุมการสร้างโดย pheromone plasmid ขนาดใหญ่ประมาณ 60-70 Kb เช่น pAD1, $pAM_{\gamma}1$, pOB_1, pJH2 เป็นต้น (Clewell, 1993) จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นโดย Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) พบว่า enterococci ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิด hemolysis ถึง 55% และพบเฉพาะใน *E. faecalis* ในขณะที่เชื้อที่แยกจากอุจจาระคนปกติพบ hemolysis 17% และสันนิษฐานว่า hemolysis อาจทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อนี้ได้ โดยพบสายพันธุ์ที่มี hemolysis ในปัสสาวะ 50% ในหนอง 70% จากช่องคลอด 50% เสมหะ 85% ในน้ำดี 2 สายพันธุ์ เลือด 1 สายพันธุ์ จากจำนวน hemolytic *E. faecalis* 58 สายพันธุ์ (60%) Libertin, Dumitru และ Stein (1992) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ hemolysis กับการเกิดพยาธิสภาพของโรค พบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ให้ hemolysis ซึ่งมีทั้งหมด 24 สายพันธุ์ (20%) พบในกระแสเลือด 40% ในปัสสาวะ 25% แผล 23% ส่วนจากช่องคลอดและเสมหะไม่พบสายพันธุ์ที่ให้ hemolysis แต่อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่ไม่ให้ hemolysis สามารถก่อโรคได้เช่นกัน

มีการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่านอกจากการแตกของเม็ดเลือดแดงแล้ว hemolysin สามารถทำให้เกิดการแตกของ PMN และ macrophages ทำให้ขบวนการ phagocytosis ลดลง (Miyazaki, *et al.*, 1993) และพบว่า hemolysin จะหมดฤทธิ์อย่างรวดเร็วเมื่อหลั่งออกจากเซลล์ (Libertin, Dumitru and Stein, 1992) และพบว่าจะต้องอาศัยคอมพลีเมนต์และแอนติบอดีจึงจะทำลาย enterococci ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า hemolysin เป็นปัจจัยความรุนแรงที่มีผลให้เกิดโรคติดเชื้อในช่องท้อง (peritonitis) ในหนู (Dupont, *et al.*, 1998) และโพรงตาอักเสบ (endophthalmitis) ในกระต่าย (Jett, *et al.*, 1992) นอกจากนี้ hemolysin มักแสดงออกร่วม

กับ bacteriocin เนื่องจากมียีนที่ควบคุมการสร้างอยู่บนพลาสมิดเดียวกัน (Clewell, 1993 ; Libertin, Dumitru and Stein, 1992)

1.5.2 Aggregation substance เป็นสารพวกโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายขนอยู่บริเวณผิวเซลล์ ทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ (clumping) โดยมียีนที่ควบคุมการสร้างอยู่บน pheromone plasmid ในการถ่ายโอนพลาสมิดโดยขบวนการ conjugation ตัวรับ (recipient cell) จะหลั่ง pheromone ไปกระตุ้นให้ตัวให้ (donor cell) ซึ่งมีพลาสมิดที่จำเพาะกับ pheromone นั้นสร้าง aggregation substance ต่อ receptor หรือ enterococcal binding substance (EBS) ซึ่งอยู่ที่เซลล์ตัวรับ และพบว่า lipoteichoic acid เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ EBS ทำให้เกิดการจับคู่กันระหว่างเซลล์ของตัวให้และตัวรับ นอกจากนี้ยังพบว่า aggregation substance ประกอบด้วย amino acid motif Arg-Gly-Asp-Ser ซึ่งคล้ายกับ fibronectin ในเซลล์ของ eukaryote จึงสามารถเกาะยึดกับเซลล์ของ eukaryote โดยผ่านทาง eukaryotic receptors ซึ่งเรียกว่า integrins

Kreft และคณะ (1992) แสดงให้เห็นว่า *E. faecalis* สายพันธุ์ที่มี pheromone plasmid สามารถเกาะยึดกับเซลล์เพาะเลี้ยงของท่อไตได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์และวิธี enzyme-linked immunosorbent assay นอกจากนี้พบว่าการสร้าง adhesin หรือ aggregation substance สามารถชักนำด้วยสารบางอย่างในซีรั่ม และได้สรุปไว้ว่า aggregation substance อาจเป็นปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค Olmsted และคณะ (1994) แสดงให้เห็นว่า *E. faecalis* ที่สร้าง aggregation substance สามารถเกาะยึดเซลล์เพาะเลี้ยงของเยื่อบุลำไส้และสามารถลุกล้ำเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากการศึกษาของ Schlievert และคณะ (1998) พบว่า aggregation substance และ EBS ของ *E. faecalis* เป็นสาเหตุให้เกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบในกระต่าย โดยมีพยาธิสภาพทำให้ลิ้นหัวใจโต และมีผลให้ม้ามโต (spleen enlargement) และเกิดภาวะน้ำท่วมปอด (lung congestion)

1.5.3 Gelatinase เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น extracellular metalloendopeptidase สามารถ hydrolyze พวก collagen, gelatin และเปปไทด์ขนาดเล็ก ทำให้เพิ่มการแพร่กระจายของเชื้อ (bacterial dissemination) มีการศึกษาคุณสมบัตินี้ของ *E. faecalis* มากในทางทันตกรรม (Hase and Finkelstein, 1993)

จากการรวบรวมข้อมูลของ Johnson (1994) พบว่า enterococci จะเกาะยึดกับเซลล์ของ eukaryote โดยการสร้าง adhesin ที่จำเพาะ ซึ่งมีการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากทางเดินปัสสาวะ มีการสร้าง adhesin ชนิด D-glucose และ D-mannose ส่วน *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบมีการสร้าง adhesin ชนิด D-galactose และ L-fucose และพบว่า *E. faecalis* ที่เจริญในซีรั่มมีโปรตีนซึ่งเป็นแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีของผู้ป่วยที่เป็นโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบ

Enterococci ทำให้เกิด platelet aggregation และเพิ่มการสร้าง fibrin ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อลิ้นหัวใจและกล้ามเนื้อหัวใจ จากการศึกษาพบว่า *E. faecalis, E. faecium* และ *E. avium* ที่แยกได้จากผู้ป่วยสามารถทำให้เกิด platelet aggregation และทำให้มีการหลั่งของ serotonin (Usui, *et.al.*, 1991) มีการทดลองในกระต่ายซึ่งเป็นโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบจาก enterococci พบว่ามีการสร้าง tissue factor ไปจับกับ clotting factor VIIa ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด และมีการสร้าง fibrin ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อหัวใจ (Drake, Rodger and Sande, 1984)

1.6 โรคติดเชื้อที่เกิดจาก Enterococci

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา enterococci ได้กลายเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในโรงพยาบาล ซึ่งจากข้อมูลของ National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) ของสหรัฐอเมริกา ในช่วงปี 1986-1989 ได้จัดให้ enterococci เป็นเชื้อก่อโรคลำดับที่ 2 ของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) รองจาก *E. coli* (Moellering, 1992) สามารถทำให้เกิดโรคต่างๆ สรุปได้ดังนี้

1.6.1 โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection) พบได้บ่อยที่สุดของโรคติดเชื้อ enterococci จากการรายงานของ CDC ในปี ค.ศ. 1984 (CDC, 1986, quoted in Murray, 1990) พบเชื้อนี้เป็นลำดับที่ 3 ของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และพบ 14.7% ในช่วงปี ค.ศ. 1990-1992 พบ enterococci เป็นสาเหตุ 16% และ พบเป็นลำดับที่ 2 รองจาก *E. coli* (Herwaldt and Wenzel, 1995) โดยมักเกิดในผู้ป่วยที่มีการใส่สายสวนปัสสาวะหรือมีการใช้เครื่องมือต่างๆใส่ในทางเดินปัสสาวะเพื่อตรวจรักษา และในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะ (Murray, 1990) มีการศึกษาในผู้หญิงอายุน้อยที่มีสุขภาพดีและไม่เคยใส่สายสวนปัสสาวะหรือใส่เครื่องมือในทาง

Central Library
Prince of Songkhla University

เดินปัสสาวะมาก่อน และไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างของทางเดินปัสสาวะ รวมทั้งไม่มีโรคติดเชื้อใดๆ พบว่า enterococci เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะน้อยกว่า 5% (Stamey, 1980, quoted in Murray, 1990) จากการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) พบว่าสปีชีส์ที่พบในปัสสาวะคือ *E. faecalis* และ *E. faecium* โดยพบ *E. faecalis* ประมาณ 96% ส่วน *E. faecium* พบประมาณ 4% ของ enterococci ที่พบในปัสสาวะทั้งหมด และจากการศึกษาของ Gordon และคณะ (1992) สามารถแยกเชื้อนี้จากปัสสาวะ 57.0% จากเชื้อทั้งหมด 705 สายพันธุ์ แต่ไม่มีข้อมูลของสปีชีส์ที่พบ และในจำนวนนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ 84 % โดยให้ผลการเพาะเลี้ยงมากกว่า 10^5 CFU/ml 75% และได้รับการใส่สายสวนปัสสาวะใน 48 ชั่วโมงก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อ 43%

1.6.2 **โรคติดเชื้อบริเวณแผล** (Wound infection) โดยเฉพาะแผลในช่องท้องหรืออุ้งเชิงกราน (Intraabdominal หรือ pelvic wound infection) พบรองลงมาจากโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (Moellering, 1992) เป็นการติดเชื้อแบบ endogenous จากเชื้อในลำไส้ มักเกิดการติดเชื้อร่วมกับกลุ่ม enterobacteria และ anaerobes พบว่าการรักษาอาจไม่ได้ผลถ้าให้ยาต้านจุลชีพไม่ครอบคลุม enterococci มีการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยฉีดเฉพาะ enterococci เข้าไปในช่องท้องพบว่าไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อ แต่ถ้าฉีดร่วมกับเชื้ออื่นจะทำให้เกิดแผลฝีหนองได้ (Onderdonk, *et al.*, 1976) แต่มีรายงานถึงการเกิดการติดเชื้อในช่องท้องที่มีสาเหตุจากเชื้อนี้โดยเฉพาะ เช่น ในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการรักษาโดยการสวนล้างช่องท้อง (peritoneal dialysis) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปีกมดลูกอักเสบเฉียบพลัน และผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดมดลูก (Murray, 1990)

1.6.3 **โรคติดเชื้อในกระแสเลือด** (Bacteremia) จากการสำรวจข้อมูลของ Surveillance and Control of Pathogens of Epidermiologic Importance (SCOPE) ในช่วงปี ค.ศ. 1995-1996 ซึ่งสำรวจจากศูนย์การแพทย์ 48 แห่ง ในสหรัฐอเมริกา พบว่า enterococci เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นลำดับที่ 3 รองจาก coagulase-negative staphylococci และ *S. aureus* (Linden, 1998) โดยมักเกิดกับผู้สูงอายุซึ่งมีโรคเดิมที่รุนแรงอยู่แล้ว หรือในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะและได้รับยากดภูมิต้านทาน ผู้ป่วยที่ต้องพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานและได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ แหล่งของการติดเชื้อมักเริ่มจากการติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ ช่องท้อง

ทางเดินน้ำดี และการคาสายสวนหลอดเลือดดำหรือแดง (Murray, 1990 ; Facklam and Sahm, 1995) ผู้ป่วยที่มีเชื้อนี้ในกระแสเลือดอาจเกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบได้ พบว่า enterococci เป็นสาเหตุของการเกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบ 5-20% ของเยื่อบุหัวใจอักเสบที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยมีเชื้อที่พบบ่อยคือ *E. faecalis* (Megran, 1992)

1.6.4 **โรคติดเชื้อของทางเดินหายใจ** (Respiratory tract infection) **และระบบประสาทส่วนกลาง** (Central nervous system) พบได้น้อยมาก (Facklam and Sahm, 1995) อาจทำให้เกิดปอดอักเสบหรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกเกิด ผู้ป่วยที่ผ่าตัดระบบประสาท และเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ รักษาตัวในโรงพยาบาลนาน ได้รับการใส่สายในระบบประสาท ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพนาน เป็นต้น (Murray, 1990)

2. **การดื้อยาต้านจุลชีพของ** enterococci

ปัจจุบัน enterococci ได้กลายเป็นปัญหาสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เนื่องจากสามารถดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาได้ทุกชนิด ได้แก่ ยาในกลุ่ม aminoglycosides กลุ่ม β lactams และกลุ่ม glycopeptides enterococci มีการสร้างกลไกในการดื้อยาหลายแบบ ปัจจัยที่มีผลต่อการดื้อยาต้านจุลชีพที่สำคัญคือ ความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาต่างๆ ให้แก่กัน รวมทั้งแบคทีเรียกรัมบวกต่างสกุลและแบคทีเรียกรัมลบ นอกจากนี้การได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเป็นจำนวนมากถือเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่มีผลต่อการดื้อยาต้านจุลชีพของ enterococci ได้เช่นเดียวกัน

2.1 **อุบัติการการดื้อยาต้านจุลชีพของ** enterococci

2.1.1 **การดื้อยาในกลุ่ม** aminoglycosides enterococci มีการดื้อยาในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มแรก จากการรวบรวมข้อมูลของ Hoffmann และ Moellering (1987) พบว่ามีรายงานของการดื้อยา streptomycin ครั้งแรกก่อนปี ค.ศ. 1960 พบในสายพันธุ์ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบ ที่โรงพยาบาล New York ในสหรัฐอเมริกา มีค่า MIC 50 μg/ml ในปี ค.ศ. 1970 พบว่ามีการดื้อยา streptomycin ในระดับสูง (High Level Streptomycin Resistance, HLSR) ใน *E. faecalis* ซึ่งแยกได้จากกระแสเลือด โดยให้ค่า MIC >2,000 μg/ml และพบประมาณ 30-40% ของ enterococci ที่แยกได้ ทำให้การใช้ยานี้ลดลง และหันมาใช้ยา gentamicin มากขึ้น ในช่วงปี ค.ศ. 1979 มีรายงานถึงการดื้อยา gentamicin ในระดับสูง (High Level Gentamicin Resistance, HLGR) ใน *E. faecalis*

ครั้งแรกในประเทศฝรั่งเศส โดยให้ค่า MIC >16,000 μg/ml (Horodniceanu, *et al.*, 1979) หลังจากนั้นมีรายงานการระบาดในโรงพยาบาลหลายแห่งในอเมริกา เช่น Ann Arbor, Sacramento, San Diego, Houston, Philadelphia และ Boston และมีรายงานพบการดื้อยา gentamicin ในระดับสูงอีกหลายประเทศ เช่น ประเทศไทย ญี่ปุ่น อิตาลี่ ชิลี และอังกฤษ

ในสหรัฐอเมริกาอุบัติการของการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงเพิ่มมากขึ้นและพบได้ในหลายสปีชีส์ จากการสำรวจโดย Jones และคณะ (1995) จากศูนย์การแพทย์ 97 แห่ง ทั่วประเทศ พบว่า *E. faecalis* มีการดื้อยา HLGR 26.0%, HLSR 31.5% *E. faecium* มีการดื้อยา HLGR 30.8%, HLSR 55.7% และในสปีชีส์อื่นๆ มีการดื้อยา HLGR 27.5%, HLSR 35% โดยใช้ค่า MIC ของยา gentamicin และยา streptomycin >500 μg/ml และ $\geq$2,000 μg/ml ตามลำดับ โดยวิธี agar dilution และพบความไวต่อยา ciprofloxacin 25% ศึกษาจาก enterococci ทั้งหมด 1,936 สายพันธุ์

ในแถบยุโรป จากการศึกษาของ Vandamme และคณะ (1996) ซึ่งสำรวจความไวต่อยาต้านจุลชีพของ enterococci ทั่วประเทศเบลเยี่ยม พบว่า *E. faecalis* มีการดื้อยา HLGR 9.2%, HLSR 51.4% *E. faecium* มีการดื้อยา HLGR 9.2%, HLSR 53.5% และพบ *E. avium* มีการดื้อยา HLSR 2 สายพันธุ์ โดยใช้ค่า MIC ของยา gentamicin และยา streptomycin >500 μg/ml และ $\geq$2,000 μg/ml ตามลำดับ โดยวิธี agar dilution นอกจากนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูงกับการดื้อยา ciprofloxacin โดยพบการดื้อยา ciprofloxacin 11.4% ศึกษาจาก enterococci ทั้งหมด 472 สายพันธุ์ และจากการสำรวจในประเทศไอร์แลนด์ โดย McNamara, King และ Smyth (1995) พบว่า *E. faecalis* มีการดื้อยา HLGR 4%, HLSR 20% *E. faecium* มีการดื้อยา HLGR 24%, HLSR 42% *E. hirae* มีการดื้อยา HLGR 34%, HLSR 55% และสปีชีส์อื่นๆ มีการดื้อยา HLGR 18%, HLSR 34% โดยใช้ค่า MIC ของยาทั้ง 2 ชนิด $\geq$1,000 μg/ml โดยวิธี agar dilution และพบการดื้อยา ciprofloxacin 2% ศึกษาจาก enterococci ทั้งหมด 1,005 สายพันธุ์

ในประเทศไทยมีรายงานการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูงเมื่อประมาณ 10 กว่าปีก่อน โดย Murray, Tsao และ Panida (1983) ซึ่งศึกษา enterococci ที่แยกได้จากผู้ป่วย

ของโรงพยาบาลรามาธิบดีจำนวน 125 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2523 พบว่ามีการดื้อยา streptomycin, kanamycin, gentamicin และ tobramycin ในระดับสูงจำนวน 50%, 35%, 14% และ 12% ตามลำดับ โดยใช้ MIC ของยากลุ่มนี้ >2,000 μg/ml และมีการศึกษาของ วิษณุ ธรรมลิขิตกุล และสุรภี พฤกษชาติ (2533) ในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างปี พ.ศ. 2528-2531 พบ enterococci ดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง 44.5% และ 76% ตามลำดับ โดยใช้ค่า MIC ของยาทั้ง 2 ชนิด $\geq$ 2,000 μg/ml และพบการดื้อยา ciprofloxacin 17% แต่ให้ผลไวปานกลาง 75% จากเชื้อที่ศึกษาทั้งหมด 200 สายพันธุ์ ส่วนในการศึกษาของสุเทพ จารุรัตนศิริกุล และสินีนาฏ กาลเนาวกุล (2531) ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่างปี พ.ศ. 2528-2529 ไม่ได้ทำการศึกษาการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูง แต่พบการดื้อต่อยา gentamicin 80% ซึ่งทดสอบโดยวิธีแพร่ซึมโดยใช้แผ่นยา gentamicin ขนาดมาตรฐาน (10 μg)

2.1.2 **การดื้อยาในกลุ่ม** βlactams จากการรวบรวมข้อมูลของ Murray (1992) พบว่า ในปี ค.ศ. 1983 มีรายงานการดื้อยา penicillin ใน *E. faecalis* HH22 ที่สร้างเอนไซม์ βlactamase ได้เป็นครั้งแรก โดย Murray ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงพยาบาล Houston ในสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1981 และต่อมาในปี ค.ศ. 1987 มีรายงานถึง *E. faecalis* ที่สร้าง βlactamase ได้เช่นเดียวกัน ในโรงพยาบาล Philadelphia ซึ่งแยกได้เมื่อปี ค.ศ. 1983 และหลังจากนั้นพบการระบาดทั่วสหรัฐอเมริกา โดยพบการระบาดเป็นทั้งในโรงพยาบาลเดียวกันและระหว่างโรงพยาบาล นอกจากนี้ในช่วงปี ค.ศ.1989 มีรายงานการระบาดในประเทศเลบานอนและอาร์เจนตินา Rhinehart และคณะ (1990) ได้รายงานถึง *E. faecalis* ที่สร้าง βlactamase และดื้อยา HLGR ร่วมด้วย และพบการระบาดในโรงพยาบาล Boston และมีรายงานการระบาดของ *E. faecalis* ที่ดื้อยาในลักษณะเดียวกันในโรงพยาบาลทหารผ่านศึก (Well, *et al.*, 1992) Coudron , Markowitz และ Wong (1992) ได้รายงานถึง *E. faecium* ที่สร้าง βlactamase ได้เช่นกัน และพบร่วมกับการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง ซึ่งแยกได้จากโรงพยาบาลทหารผ่านศึก ต่อมามีรายงานการระบาดของ enterococci ที่ดื้อยา ampicillin โดยที่ไม่สร้าง βlactamase ใน *E. faecium* ในโรงพยาบาล Veteran Affairs โดยพบ 9% ของจำนวนเชื้อทั้งหมด (Chirurgi, *et al.*, 1992) และนอกจากนี้มีรายงานการดื้อยาในลักษณะนี้ในสปีชีส์อื่น

ได้แก่ *E. raffinosus, E. gallinarum* และ *E. duran* ซึ่งแยกได้จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในสหรัฐอเมริกา (Boyce, *et al.*, 1992) และจากการสำรวจของ Jones และคณะ (1995) จากศูนย์การแพทย์ 97 แห่ง ทั่วสหรัฐอเมริกา พบว่า enterococci ที่ศึกษา 1,936 สายพันธุ์ มีการดื้อยา ampicillin 12% ส่วนใหญ่พบใน *E. faecium* และมีการสร้าง β-lactamase 0.2% แต่ไม่มีข้อมูลของสปีชีส์ที่สร้าง

จากการสำรวจในแถบยุโรป เช่น ในประเทศเบลเยี่ยมโดย Vandamme และคณะ (1996) พบเฉพาะ *E. faecium* ที่ดื้อยา ampicillin 2.1% และไม่มีการสร้าง β-lactamase ในการสำรวจในประเทศไอร์แลนด์ โดย McNamara, King และ Smyth (1995) พบการดื้อยา peniciilin และ ampicillin จำนวน 17% และ 16% ตามลำดับ จากจำนวน enterococci ทั้งหมด 1,005 สายพันธุ์ โดยพบ *E. faecalis* ดื้อยา penicillin และ ampicillin จำนวน 10% และ 8% ตามลำดับ พบ *E. faecium* ดื้อยา penicillin และ ampicillin จำนวน 63% และ 62% ตามลำดับ พบ *E. hirae* ดื้อยา penicillin และ ampicillin จำนวน 55% เท่ากัน และพบในสปีชีส์อื่น ได้แก่ *E. gallinarum, E. duran, E. casseliflavus, E. raffinosus, E. avium* และ *E mundtii* โดยพบการดื้อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ 37% เท่ากัน ซึ่งพบเชื้อดื้อยานี้ในกระแสเลือด จำนวน 34% ของตัวอย่างเชื้อในกระแสเลือดทั้งหมด 26 สายพันธุ์ และจากการสำรวจครั้งนี้ไม่พบการสร้าง β-lactamase เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lavery และคณะ (1997) ซึ่งศึกษาในโรงพยาบาล Dublin ในประเทศอังกฤษ และพบการดื้อยา ampicillin ของ enterococci ที่แยกจากกระแสเลือดในปี ค.ศ. 1993 มีจำนวน 51% จากเชื้อที่แยกได้ 63 สายพันธุ์ และที่แยกได้จากแหล่งอื่นพบการดื้อยานี้ 13% จากเชื้อทั้งหมด 230 สายพันธุ์ และได้กล่าวไว้ว่าในยุโรปไม่พบรายงานของการดื้อยากลุ่มนี้โดยการสร้าง β-lactamase

ในประเทศไทย จากการศึกษาของวิษณุ ธรรมลิขิตกุล และสุรภี พฤกษชาติ (2533) ในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างปี พ.ศ. 2528-2531 โดยศึกษาจากเชื้อทั้งหมด 200 สายพันธุ์ พบ enterococci ที่ดื้อยา ampicillin 3% และไม่พบการสร้าง β-lactamase และจากการรายงานของโรงพยาบาลรามาธิบดีในปี พ.ศ. 2539 พบ enterococci ที่ดื้อยา ampicillin 14% จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 300 สายพันธุ์ และไม่มีรายงานการศึกษาการสร้าง β-lactamase ส่วนการศึกษาของสุเทพ จารุรัตนศิริกุล และสินีนาฏ กาลเนาวกุล (2531)

ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่างปี พ.ศ. 2528-2529 พบการดื้อยา ampicillin 7% และไม่มีรายงานการศึกษาการสร้าง β-lactamase เช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาในประเทศไทยไม่มีรายงานการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อดื้อยา

2.1.3 **การดื้อยากลุ่ม** glycopeptides การดื้อยา vancomycin ของ enterococci ที่แยกได้ทางคลินิกก่อนปี ค.ศ. 1986 พบน้อยมาก หลังจากมีการนำยา vancomycin ซึ่งได้ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นกลับมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยลำไส้อักเสบ (pseudomembranous colitis) ในยุโรปในปี ค.ศ. 1984 พบว่าในปี ค.ศ.1988 Leclercq และคณะ ได้รายงานถึง *E. faecium* ที่ดื้อยา vancomycin และ teicoplanin ซึ่งแยกได้ทางคลินิกในยุโรปเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1986 และแสดงให้เห็นว่ามียีนดื้อยาอยู่บนพลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดได้ (Leclercq, *et al.*, 1988) ในสหรัฐอเมริกาพบอุบัติการ VRE เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.3% ในปี ค.ศ. 1989 เป็น 7.9% ในปี ค.ศ. 1993 (CDC, 1993, quoted in Coque, *et al.*, 1996) มักพบการระบาดในหอผู้ป่วยหนัก หอผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะ หอผู้ป่วยโรคเลือดและมะเร็ง และพบการระบาดทั้งในโรงพยาบาลเดียวกันและระหว่างโรงพยาบาลจากเมืองหนึ่งไปยังอีกเมืองหนึ่ง (Chow, *et al.*, 1993) ซึ่งแตกต่างจากในยุโรปที่พบการระบาดของ VRE ในชุมชน (community acquired) มากกว่าในโรงพยาบาล ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการใช้ยา avoparcin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม glycopeptides ผสมในอาหารสัตว์และถ่ายทอดมาสู่คนโดยระบบห่วงโซ่อาหาร (Cars, 1997 ; Klein, Pack and Reuter, 1998)

จากการสำรวจของ Jones และคณะ (1995) จากศูนย์การแพทย์ 97 แห่งทั่วสหรัฐอเมริกา พบ enterococci จำนวนทั้งหมด 1,936 สายพันธุ์ มีการดื้อยา vancomycin และ teicoplanin จำนวน 5.6% และ 3.2% ตามลำดับ พบมากใน *E. faecium* โดยมีการดื้อยาทั้ง 2 ชนิด 21.9% และ 16% ตามลำดับ ใน *E. faecalis* มีการดื้อยา 2% และ 0.1% ตามลำดับ และในสปีชีส์อื่นมีการดื้อยา 7% และ 6% ตามลำดับ

การศึกษาในโรงพยาบาล Dublin ในประเทศอังกฤษโดย Lavery และคณะ (1997) พบการดื้อยา vancomycin และ teicoplanin ในปี ค.ศ. 1993 จำนวน 2% เท่ากัน จากจำนวนเชื้อ 36 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบการระบาดของ Multidrug Resistant Enterococci (MRE) ใน *E.faecium* ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1994 จากการสำรวจในโรงพยาบาล

ทั่วประเทศเบลเยี่ยมโดย Vandamme และคณะ (1996) พบเฉพาะ *E. faecium* ที่ดื้อยา vancomycin และ teicoplanin มีจำนวน 1.5% เท่ากัน และพบว่าใน *E. faecium* จะพบการดื้อยาหลายๆ ชนิด จากเชื้อที่ศึกษา 472 สายพันธุ์ จากการสำรวจในโรงพยาบาลในประเทศไอร์แลนด์ โดย McNamara, King และ Smyth (1995) จากจำนวน enterococci ทั้งหมด 1,005 สายพันธุ์ พบว่ามีการดื้อยาเฉพาะยา vancomycin 2 % โดยพบใน *E. faecalis* 1%, *E. faecium* 2% และสปีชีส์อื่น 21%

สำหรับข้อมูลในประเทศไทย จากการศึกษาของ วิษณุ ธรรมลิขิตกุล และสุรภี พฤกษชาติ (2533) ในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างปี พ.ศ. 2528-2531 ไม่พบ VRE จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 200 สายพันธุ์ จากรายงานของโรงพยาบาลรามาธิบดี ในปี พ.ศ. 2539 พบ VRE 2% จากจำนวนเชื้อประมาณ 300 สายพันธุ์ โดยวิธีแพร่ซึมโดยใช้แผ่นยามาตรฐาน (disk diffusion) ส่วนการศึกษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์โดยสุเทพ จารุรัตนศิริกุล และสินีนาฏ กาลเนาวกุล (2531) ไม่ได้ทำการศึกษาการดื้อยานี้

2.2 **ชนิดและกลไกการดื้อยาของ** enterococci

การดื้อยาต้านจุลชีพของ enterococci แบ่งได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ การดื้อยาแบบ intrinsic หรือ endogenous ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสปีชีส์ หรือ genus กลไกในการดื้อยามักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมายที่ยาออกฤทธิ์หรือการเปลี่ยนแปลง permeability ซึ่งจะมีผลต่อการซึมผ่านของยา การดื้อยาแบบนี้มักเกิดจากการที่เชื้อพยายามที่จะปรับตัวเพื่อการอยู่รอดโดยเฉพาะเมื่อมีการใช้ยาต้านจุลชีพจำนวนมาก และอาจไม่พบการดื้อยาแบบนี้หากไม่ได้มีการใช้ยานั้นมาก่อน และการดื้อยาแบบ acquired หรือ exogenous การดื้อยาแบบนี้อาจเกิดจากการ mutation ของยีนหรือเกิดจากการได้รับยีนใหม่ในตำแหน่งของโครโมโซมหรือพลาสมิดโดยได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อยาจากเชื้อตัวอื่นโดยวิธี conjugation หรือ transformation ซึ่งเป็นลักษณะของ horizontal transmission การดื้อยาแบบนี้จะ stable มากกว่าแบบ intrinsic แม้ว่าจะไม่มี antibiotic selection กลไกในการดื้อยาส่วนใหญ่เป็นการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (Murray, 1990 ; Leclercq, 1997 ; Facklam and Sahm, 1995) ชนิดและกลไกการดื้อยาของ enterococci ต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 3 กลุ่ม มีดังนี้

2.2.1 กลุ่ม aminoglycosides โดยทั่วไปมักพบการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับต่ำ (low level) ให้ค่า MIC 8-250 μg/ml เนื่องจากเชื้อใน genus นี้มีคุณสมบัติของเซลล์เมมเบรนที่อาจทำให้ยากลุ่มนี้ผ่านเข้าเซลล์ไม่ดี (active transport inefficient) ซึ่งกลไกแบบนี้เป็นการดื้อยาชนิด intrinsic การใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับการใช้ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ (cell wall active agents) ได้แก่กลุ่ม penicillins หรือ vancomycin เพื่อทำลายผนังเซลล์ก่อนจะทำให้ยากลุ่มนี้ซึมผ่านเซลล์ได้ดีขึ้น (Leclercg, 1997 ; Murray, 1990) สำหรับการดื้อยาโดยให้ค่า MIC $\geq$1,000 μg/ml เป็นการดื้อยาในระดับสูง มีกลไกการดื้อยาโดยสร้าง modifying enzyme มาทำลายยาคล้ายกับ staphylococci ได้แก่ aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(6′), ANT(4′)], aminoglycoside phosphotransferase [APH(3′), APH(2″)] และ aminoglycoside acetyltransferase [AAC(6′)] และพบว่าการดื้อยา gentamicin ในระดับสูงมักสร้าง bifunctional enzyme คือ APH(2″)-AAC(6′) หรือ trifunctional enzyme คือ APH(2″)-AAC(6′) + APH(3′) โดยมียีนที่ควบคุมการสร้างอยู่บน transposons และสามารถถ่ายทอดได้ ได้แก่ Tn*4001*, Tn*4031* และ *Tn5281* ซึ่งมีขนาดประมาณ 5 kb และมักแทรกอยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่สุดหรือขนาดรองลงมา คือ ขนาด 32 ถึง 90 kb (Zervos, *et al.*, 1986 ; Sahm and Gilmore, 1994 ; Straut, Cespedes, and Horaud, 1996 ; Straut, *et al.*, 1997) และ Tn*924* ซึ่งมีขนาดใหญ่ประมาณ 27 kb แต่ในส่วนของยีนดื้อยาจะมีขนาดประมาณ 5 kb เช่นกันและมักแทรกอยู่บนโครโมโซม (Thal, *et al.*, 1994) และพบการสร้างเอนไซม์ AAC(6′)-Ii โดยยีน *aac6′-Ii* บนโครโมโซม ซึ่งพบเฉพาะใน *E. faecium* (Wright and Ladak, 1997) จากการรวบรวมข้อมูลของ Leclercq และคณะ (1992) และ Leclercq (1997) พบว่าหากมีการดื้อยา gentamicin ในระดับสูงมักพบการดื้อยา aminoglycosides อื่นๆ ในระดับสูงด้วย ได้แก่ ยา kanamycin, tobramycin, amikacin และ netilmicin ต่างจากแบคทีเรียพวก Enterobacteriaceae ที่พบการดื้อยากลุ่มนี้หลายชนิดยกเว้น amikacin ซึ่งยังพบน้อย ทั้งนี้เนื่องจากมีการสร้างเอนไซม์ชนิด AAC(6′)-I น้อย ดังนั้นจึงสามารถใช้ amikacin เป็นยาต้านจุลชีพหลังสุดในการรักษาได้ (Miller, *et al.*, 1997)

นอกจากนี้มีกลไกการดื้อยาโดยการเปลี่ยนแปลงของ ribosome เป้าหมาย ซึ่งเกิดจากการ mutation ของยีนบนโครโมโซม พบในการดื้อยา streptomycin (Leclercq,

1997) เช่นในการศึกษาของ Thal และคณะ (1993) พบว่า *E. faecalis* มีการดื้อยา gentamicin ในระดับสูงแต่ไม่พบการดื้อยา streptomycin ในระดับสูงร่วมด้วย สำหรับการดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงของ enterococci ทำให้การใช้ยากลุ่มนี้เสริมฤทธิ์กับยากลุ่ม β-lactams และ glycopeptides ไม่ได้ผล สามารถพบได้ในหลายๆ สปีชีส์ เช่น *E. faecalis, E. faecium, E. gallinarum, E. casseliflavus, E. raffinosus, E. avium* (Straut, Cespedes and Horaud, 1996 ; Chow, *et al.*, 1997 ; Tsai, *et al.*, 1998)

2.2.2 กลุ่ม *β*lactams ใน *E. faecium* มักพบการดื้อยากลุ่มนี้ชนิด intrinsic มากกว่าในสปีชีส์อื่น โดยพบค่า MIC ต่อยาในกลุ่ม penicillins มากกว่า streptococci 10-100 เท่า อาจเนื่องจากการสร้าง penicillin-binding proteins ชนิดที่จับกับยาได้น้อยลง (low-affinity PBPs) (Murray, 1990) จากการรวบรวมข้อมูลของ Leclercq (1997) พบว่า *E. faecium* มีการสร้าง PBPs ชนิด PBP5 และให้ค่า MIC ในช่วง 8 *μ*g/ml ถึง >512 *μ*g/ml และจากการศึกษาของ Carias และคณะ (1998) พบ *E. faecium* ดื้อยา ampicillin ซึ่งควบคุมโดยยีน *pbp5* อยู่บน large conjugative chromosome element สามารถถ่ายทอดได้ ใน *E. faecalis* มักมีการดื้อยาชนิด acquired โดยสร้างเอนไซม์ *β*lactamase ชนิด constitutive penicillinase มาทำลายยา มียีนที่ควบคุมการสร้างคล้ายกับยีน *blaZ* ของ *S. aureus* ซึ่งใน *S. aureus* จะสร้างชนิด inducible *β*lactamase type A (Zscheck and Murray, 1993) จากการรวบรวมข้อมูลของ Murray (1992) พบว่าสามารถพบยีนดื้อยาที่ควบคุมการสร้าง *β*lactamase บนพลาสมิด และสามารถถ่ายทอดได้โดยระบบ pheromone ในการศึกษาของ Rice และ Carias (1998) พบ *E. faecalis* สร้าง *β*lactamase โดยมียีนควบคุมการสร้างบน transposons ซึ่งแทรกบนโครโมโซม คือ Tn*5385* และสามารถถ่ายทอดได้ การดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์มาทำลายยาพบน้อยใน *E. faecium* (Leclercq, 1997)

2.2.3 กลุ่ม glycopeptides การดื้อยากลุ่มนี้เกิดจากการสังเคราะห์ modified precursors ที่จับกับยาน้อยลง สามารถใช้ลักษณะของ phenotype บ่งบอกถึง genotype ได้ และแบ่งการดื้อยากลุ่มนี้เป็น 4 phenotype ดังตาราง 5

การดื้อยาแบบ phenotype VAN A ให้ค่า MIC ที่ดื้อต่อยา vancomycin และ teicoplanin ในขนาดสูง ซึ่งเป็นการดื้อยาชนิด acquired มีกลไกการดื้อยาโดยการ

สังเคราะห์ modified precursors ในการสร้าง peptidoglycan จาก D-alanyl-D-alanine เป็น D-alanine-D-lactate ทำให้ยา vancomycin และยา teicoplanin จับได้น้อยลง จากการศึกษาใน *E. faecium* BM4147 ซึ่งมีการดื้อยาแบบ phenotype VAN A พบกลุ่มยีน *vanA* อยู่บน Tn*1546* มีขนาด 10.8 kb ประกอบด้วยยีนซึ่งเป็น polypeptide 7 กลุ่ม ทำงานร่วมกันในการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์ modified precursors ได้แก่ กลุ่ม VanR และ VanS ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนดื้อยา กลุ่ม VanH, VanA และ VanX ทำให้เกิดการดื้อยา กลุ่ม VanY และ VanZ เป็น accessory protein (Arthur, *et al.*, 1993 ; Arthur and Courvalin, 1993) มีการศึกษาของ Clark และคณะ (1993) พบยีน *vanA* บนพลาสมิดขนาด 34 kb และ 60 kb ในการศึกษาของ Handwerger และ Skoble (1995) พบยีนดื้อยานี้บน Tn*5482* ซึ่งประกอบด้วย Tn*1546* และ IS*1251* สามารถถ่ายทอดจากโครโมโซมของสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่งได้ และมีการศึกษาของ Heaton และคณะ (1996) พบว่ายีน *vanA* อยู่บน Tn*1546* ซึ่งเป็น transposon ที่อยู่บนพลาสมิดที่ถ่ายทอดได้ขนาด 41,55 และ 92 kb สามารถพบการดื้อยาแบบนี้ได้ในหลายสปีชีส์

การดื้อยาแบบ phenotype VAN B ให้ค่า MIC ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในขนาดต่ำถึงขนาดสูง (4-1,024 mg/L) และไวต่อยา teicoplanin เป็นการดื้อยาแบบ acquired ควบคุมโดยกลุ่มยีน *vanB* ซึ่งคล้ายกับกลุ่มยีน *vanA* อยู่บน large conjugative chromosomal element ขนาด 90-250 kb ซึ่งประกอบด้วย Tn*1547* และ IS*256* หรืออยู่บนพลาสมิด และสามารถ induce ด้วยยา vancomycin ส่วนยา teicoplanin ไม่สามารถ induce ได้ (Quintiliani and Courvalin, 1996 ; Quintiliani, Evers, and Courvalin, 1993) มีการศึกษาของ Carias และคณะ (1998) พบ *E. faecium* มีกลุ่มยีน *vanB* อยู่บน Tn*5382* ขนาด 27 kb ซึ่งจะอยู่บน large conjugative chromosomal element ขนาด 130-160 kb และมียีน *pbp*5 อยู่ด้วยทำให้เกิดการดื้อทั้งยา vancomycin และ high-level ampicillin ซึ่งพบระบาดทางตะวันออกเฉียงเหนือของรัฐ Ohio มีการศึกษาของ Hayden และคณะ (Hayden, *et al.*, 1993, quoted in Leclercq and Courvalin, 1997) พบว่า phenotype นี้อาจเกิด cross-reaction ระหว่าง teicoplanin และ vancomycin สามารถคัดเลือกโดยใช้ยา teicoplanin ได้ พบการดื้อยาแบบนี้ได้ใน *E. faecium* และ *E. faecalis*

การดื้อยาแบบ phenotype VAN D มีการดื้อยาโดยให้ค่า MIC ต่อยาทั้ง 2 ชนิดในขนาดต่ำ พบได้ใน *E. faecium* และ *E. faecalis* ซึ่งการดื้อยาแบบ VAN D เพิ่งพบเมื่อไม่นานมานี้ (Perrichon, Reynold and Courvalin, 1996, quoted in Leclercq and Courvalin, 1997) การศึกษาและรายละเอียดมีน้อย

การดื้อยาแบบ phenotype VAN C ให้ค่า MIC ต่อยา vancomycin 4-32 μg/ml และไวต่อยา teicoplanin มักเป็นการดื้อยาชนิด intrinsic มียีนที่ควบคุมการดื้อยาอยู่บนโครโมโซม ทำหน้าที่สังเคราะห์ peptidoglycan precusors D-alanine-D-serine ทำให้ยา vancomycin จับได้น้อยลง และพบจำเพาะต่อสปีชีส์ คือ ใน *E. gallinarum* พบยีน *vanC1* ใน *E. casseliflavus* และ *E. flavescens* พบยีน *vanC2* (Leclercq and Courvalin, 1997)

ตาราง 5 ลักษณะ phenotypes ของ glycopeptide-resistant enterococci

Phenotype, species	MIC (mg/L)		Transferable Resistance
	Vancomycin	Teicoplanin	
VAN A*			
E. faecium			
E. faecalis			
E. avium			
E. duran			
E. hirae	64->1,000	16-512	Yes
E. mundii			
E. raffinosus			
E. gallinarum			
E. casseliflavus			
VAN B**			
E. faecium	4-1,024	0.25-2	Yes
E. faecalis			
VAN D			
E. faecium	16-64	2-4	NT
E. faecalis			
VAN C			
E. gallinarum			
E. casseliflavus	2-32	0.12-2	No
E. flavescens			

หมายเหตุ : NT= not test, * Also detect in *Arcanobacterium haemolyticum* and *Cellulomonas turbata*, ** Also detect in *Streptococcus bovis*.

ที่มา : Leclercq and Courvalin, 1997,หน้า 547.

2.2.4 Multidrug Resistant Enterococci (MRE) Enterococci สามารถดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาได้หลายชนิด โดยเฉพาะใน *E. faecium* ซึ่งมีการดื้อทั้งยากลุ่ม β-lactams กลุ่ม glycopeptides และกลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง (Handwerger, *et al.*, 1993 ; Boyce , *et al.*, 1994 ; Montecalvo, *et al.*, 1994 ; Jones, 1995 ; Vandamme, 1996 ; Lavery, 1997) ซึ่ง Leclercq (1997) ได้สรุปไว้ว่า *E. faecium* สามารถสร้างกลไกการดื้อยาได้ทั้งแบบ intrinsic และ acquired ต่อยาที่ใช้รักษามากกว่าสปีชีส์อื่น โดยเฉพาะยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ และเปรียบเสมือนแหล่งสะสมของยีนดื้อยาต่างๆ สามารถพบยีนดื้อยาได้ทั้งบนโครโมโซม พลาสมิด และ transposons มีการศึกษาของ Carias และคณะ (1998) พบ *E. faecium* มียีนดื้อยา *vanB* อยู่บน large conjugative chromosomal element เดียวกับยีน *pbp*5 ซึ่งดื้อยา ampicillin นอกจากนี้พบว่า *E. faecium* ที่ดื้อยาหลายชนิด สามารถอยู่ทนในโรงพยาบาลได้นานกว่า 6 เดือน (Handwergwer, *et al.*, 1993) ทำให้มีโอกาสแพร่ระบาดของสายพันธุ์ที่ดื้อยาได้มากยิ่งขึ้น

2.3 **ปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการดื้อยาของ** enterococci

ปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการดื้อยาของ enterococci อาจเป็นผลมาจากการได้รับยาต้านจุลชีพในการรักษามาก่อนทำให้เกิด antibiotic selection มีการเพิ่มสัดส่วนของเชื้อดื้อยา หรืออาจเกิดจากการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาจากผู้ป่วยคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่ง เป็นต้น ได้แบ่งการศึกษาปัจจัยเสี่ยงตามการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides, β-lactams และ glycopeptides ดังนี้

มีการศึกษาของ Zervos และคณะ (1986) ในแผนกผู้ป่วยระยะเฉียบพลันของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย Michigan สหรัฐอเมริกา พบว่าปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ *E. faecalis* ที่ดื้อยา HLGR ได้แก่ การได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพมาก่อน โดยเฉพาะ cephalosporins และ aminoglycosides การได้รับยาต้านจุลชีพเพื่อป้องกันการติดเชื้อในระหว่างผ่าตัด การได้รับการผ่าตัดมาก่อน และการอยู่โรงพยาบาลนาน นอกจากนี้ได้ใช้ plasmid analysis ศึกษาการระบาดพบว่า การติดเชื้อสามารถเกิดได้แบบ exogenous โดยพบสายพันธุ์ในผู้ป่วย มีรูปแบบพลาสมิดที่ตัดย่อยเหมือนกับที่พบในสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล เช่น ลูกบิดประตู และพื้นห้อง ซึ่งเหมือนกับการระบาดของ MRSA (Methicillin

Resistant *Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียกรัมลบรูปแท่งที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multiantibiotic-resistant gram-negative bacilli)

จากการศึกษาแบบ prospective ของ Chenoweth และคณะ (1994) ในแผนกผู้ป่วยระยะเรื้อรังของโรงพยาบาล Ann Arbor Veterans Affairs ในสหรัฐอเมริกา พบว่า enterococci ที่ดื้อยา HLGR มักพบ colonize ร่วมกับ MRSA และพบ colonize บริเวณแผล ผู้ป่วยที่ได้รับการใส่สายสวนปัสสาวะ ผู้ป่วยไตวาย ผู้ป่วยที่มีสุขภาพอ่อนแอ ผู้ป่วยที่มี albumin ต่ำ เมื่อศึกษาถึงการอยู่ทน (persistance) และการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยานี้ โดยใช้รูปแบบพลาสมิดที่ตัดย่อยร่วมกับรูปแบบโครโมโซมที่ตัดย่อย พบว่าสายพันธุ์จะเปลี่ยนไปเป็นช่วงๆ บางสายพันธุ์สามารถอยู่ทนได้อย่างน้อย 4 เดือน และบางสายพันธุ์อยู่ทนได้นานกว่า 1 ปี ซึ่งแตกต่างจาก MRSA ที่พบการอยู่ทนของสายพันธุ์เดิมตลอด และพบว่าผู้ป่วยที่นอนรักษาตัวในห้องเดียวกันจำนวน 2 คน ที่ติดเชื้อดื้อยา HLGR สายพันธุ์เดียวกัน จากผู้ป่วยที่ศึกษาทั้งหมด 120 คน จึงสรุปว่า cross infection ระหว่างผู้ป่วยด้วยกันไม่ใช่สาเหตุหลักของการแพร่ระบาดของ HLGR ที่ศึกษาในครั้งนี้ และในการศึกษาของ Vandamme และคณะ (1996) พบความสัมพันธ์ของการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูงกับการดื้อยา ciprofloxacin เช่นเดียวกับการรวบรวมข้อมูลของ Leclercq (1997) และได้สรุปว่าอาจเป็นไปได้ที่การดื้อยากลุ่มนี้จะถูกคัดเลือกโดยการใช้ยาอื่นในการรักษา

มีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงต่อการดื้อยา ampicillin โดย Weinstein และคณะ (1996) ซึ่งเป็นการศึกษาแบบ prospective พบว่ามีความสัมพันธ์กับการได้ยาต้านจุลชีพในการรักษามากกว่า 3 ชนิดมาก่อน โดยเฉพาะยา third-generation cephalosporins การใช้ยาอย่างไม่มีเหตุผล การได้รับการใส่สายในทางเดินอาหาร (enteral tube feeding) ทั้งนี้ยังไม่ทราบกลไกแต่อาจมีความสัมพันธ์กับการใช้ยาต้านจุลชีพพวก broad-spectrum และอาจมีการเปลี่ยนแปลงของ gastrointestinal flora หรืออาจเป็นเหมือนตัวเชื่อมระหว่างพาหะบนมือของบุคลากรโรงพยาบาลหรือจากสิ่งแวดล้อมไปสู่ผู้ป่วยได้ และในการศึกษาของ Sexton และคณะ (1993) พบว่าการรักษาตัวในโรงพยาบาลมาก่อน การได้รับยา third-generation cephalosporins และ clindamycin ในการรักษาเป็นปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อดื้อยานี้ และนอกจากนี้อาจติดเชื้อดื้อยาโดยผ่านทางมือของบุคลากรโรงพยาบาล เช่นในการศึกษาของ Rhinehart และคณะ (1990) ซึ่งพบ *E. faecalis* ที่ดื้อยาโดยการสร้าง β-

lactamase ร่วมกับการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides บนมือของบุคลากรโรงพยาบาลและเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่พบในผู้ป่วย

ในการดื้อยา vancomycin Leclercq และ Courvalin (1997) ได้รวบรวมข้อมูลและสรุปไว้ว่า ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อดื้อยานี้ที่สำคัญคือ การได้รับยา vancomycin และ third-generation cephalosporins ในการรักษามาก่อน โดยเฉพาะการใช้ยา vancomycin ซึ่งพบมากในสหรัฐอเมริกาและพบการระบาดของเชื้อดื้อยานี้ในโรงพยาบาลมากด้วย จากข้อมูลของ IMS International พบว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 1984-1996 ในสหรัฐอเมริกามีการใช้ยานี้มากทั้งรูปยาฉีดและยากินโดยใช้เพิ่มขึ้น 10 เท่า และมีปริมาณการใช้มากกว่าในยุโรป 10-200 เท่า แต่ในยุโรปก็พบการใช้ยานี้เพิ่มขึ้น 5-10 เท่า ส่วนใหญ่ใช้ในรูปยาฉีด และพบการระบาดในโรงพยาบาลน้อยกว่าในสหรัฐอเมริกา (Jarratt and Shutt, 1998) และปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ ได้แก่ การได้รับยา metronidazole, clindamycin และ imipenem ในการรักษา ทั้งนี้อาจเนื่องจากยานี้ใช้รักษาพวก anaerobes ในลำไส้ ซึ่งส่งผลให้ enterococci สามารถ colonize และเกิดการติดเชื้อได้มากขึ้น และควรระวังอาจเกิดการคัดเลือกเชื้อดื้อยานี้จากการใช้ยาที่รักษาแบคทีเรียอื่น นอกจากนี้มักพบการติดเชื้อในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคที่รุนแรง ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยโรคเลือด ผู้ป่วยโรคไตวาย และผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิต้านทานต่ำ (immunocompromised) การได้รับการทำหัตถการโดยใส่สายสวนทางหลอดเลือดต่างๆ โดยสามารถติดเชื้อดื้อยาได้ทั้ง endogenous จากเชื้อในลำไส้ของผู้ป่วยเองหรือแบบ exogenous โดยผ่านทางมือของบุคลากรโรงพยาบาลและสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล ซึ่งสามารถพบพาหะได้ในอุจจาระของบุคลากรโรงพยาบาล

2.4 การรักษาโรคติดเชื้อ Enterococci

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา อุบัติการของโรคติดเชื้อ enterococci ในโรงพยาบาลมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น การรักษาทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากเชื้อนี้มีการดื้อยาทั้งแบบ intrinsic และ แบบ acquired ต่อยาที่ใช้รักษา ซึ่งได้แก่ยากลุ่ม aminoglycosides, β-lactams และ glycopeptides มีหลายการศึกษาที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการรักษาโรคติดเชื้อนี้ ซึ่ง Landman และ Quale (1997) ได้สรุปการรักษาโรคติดเชื้อ enterococci ไว้ดังนี้คือ

ในการรักษาโรคติดเชื้อนี้ส่วนใหญ่ยาพวก penicillin, ampicillin, vancomycin และ teicoplanin ยาจะออกฤทธิ์เป็นแบบยับยั้งเชื้อ (bacteriostatic) เนื่องจากให้ค่า

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ที่มากกว่า MIC หลายเท่า ในรายที่มีการติดเชื้อที่รุนแรง (severe enterococcal infection หรือ deep seated infection) ควรใช้ยาที่ให้ผลรวมแบบฆ่าเชื้อ (bactericidal) ดังนั้นในการรักษาจึงมีการใช้ยาดังกล่าวร่วมกับยา gentamicin หรือ streptomycin เพื่อให้เกิดผลเสริมฤทธิ์ แต่ในกรณีที่มีการดื้อยา first line agents เหล่านี้ จะทำให้ผลในการฆ่าเชื้อลดลง ดังนั้นในการรักษาโรคจาก enterococci ที่ดื้อยาต้านจุลชีพ จึงมีแนวทางดังนี้

2.4.1 ในการรักษาโรคจาก enterococci ที่ดื้อยา ให้พิจารณาถึงความจำเป็นเฉพาะราย ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่จำเป็นที่จะต้องรักษา เช่น การติดเชื้อของแผลผ่าตัด และของทางเดินปัสสาวะ มักหายเองโดยไม่ต้องใช้ยารักษา และพบว่าในรายที่มีการติดเชื้อนี้ในกระแสเลือดสามารถหายเองได้โดยไม่ต้องรักษา ซึ่งในกรณีเช่นนี้ต้องทำการเพาะเชื้อในกระแสเลือดเป็นระยะ และควรเอาสายสวนต่างๆ ที่ไม่จำเป็นออก

2.4.2 ในรายที่มีการติดเชื้อที่รุนแรงควรทำการทดสอบความไวต่อยา ampicillin และควรทดสอบเอนไซม์ β-lactamase ด้วย ทดสอบความไวต่อยา vancomycin ยา streptomycin และ gentamicin ในระดับสูง โดยเฉพาะในกรณีของ *E. faecium* ซึ่งจะดื้อต่อ first-line agents ในระดับที่สูง ควรทำการทดสอบความไวต่อยา teicoplanin, novobiocin, quinolones, chloramphenicol, doxycycline, nitrofurantoin และ quinupristin/dalfopristin ซึ่งเป็นยากลุ่ม streptogramin แบบฉีดตัวใหม่ เพิ่งนำมาใช้ในการรักษาและอยู่ในช่วงของการศึกษา

2.4.3 ในการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษา ต้องดูว่าควรจะใช้ยาพวกที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ เช่น การรักษาโรคติดเชื้อนี้ของทางเดินปัสสาวะ การให้ยา ampicillin, tetracycline, novobiocin, quinolone ก็ได้ผลแล้ว โดยให้อย่างเดียวหรืออาจให้ร่วมกัน (combine drug) ก็ได้ ในรายที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด อาจให้ยาเหล่านี้หรือให้ยา quinupristin/dalfopristin

2.4.4 ในรายที่เกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบและการติดเชื้อที่อื่นที่รุนแรงขึ้น ซึ่งเกิดจาก MRE ควรใช้ยาพวกที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อรักษา และควรทำ time-kill ร่วมด้วย ซึ่งมีแนวทางในการรักษาคือ กรณีที่ไม่มีการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง ให้รักษาด้วยยากลุ่มนี้ร่วมกับ teicoplanin, vancomycin ร่วมกับ ampicillin และ vancomycin ร่วมกับ

ciprofloxacin และ rifampin กรณีที่มีการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง ให้รักษาด้วยยา teicoplanin , novobiocin ร่วมกับ quinolone, ampicillin ร่วมกับ quinolone, ceftriaxone ร่วมกับ fosfomycin ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ตัวใหม่ โดยออกฤทธิ์ตรงขั้นตอนแรกในการสร้างผนังเซลล์ และในการรักษาโรคติดเชื้อ enterococci ควรตระหนักไว้ด้วยว่า ผลการทดสอบในหลอดทดลอง (in-vitro) ไม่ได้หมายถึงว่าจะใช้รักษาผู้ป่วยได้สำเร็จ

2.5 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ในการศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพของ enterococci มีการใช้วิธีในการทดสอบความไวต่อยาหลายวิธี ส่วนใหญ่มักใช้วิธี disk diffusion และการหาค่า MIC ตามวิธีของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1993) ซึ่งได้ปรับปรุงใหม่ เนื่องจากในการทดสอบความไวต่อยา vancomycin ค่า zone diameter ของวิธี disk diffusion เดิม จะให้ค่าแปลผลที่แตกต่างกับวิธี MIC จึงได้มีการศึกษาและกำหนดค่า zone diameter ใหม่ดังตารางในภาคผนวก และสำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบ NCCLS แนะนำให้ใช้ Mueller Hinton และให้เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับยา vancomycin ให้อ่านผล 24 ชั่วโมง เนื่องจากยาแพร่ซึมผ่านวุ้นช้า ในการศึกษาอาหารที่ใช้ทดสอบว่าควรเติมเลือดหรือไม่ ซึ่งจากการศึกษาของ Sahm และ Torres (1988) มีการเปรียบเทียบการใช้อาหาร Dextrose Phosphase Agar, Brain Heart Infusion, Mueller Hinton ที่เติม 5% sheep blood, TSA ที่เติม 5% sheep blood และใช้ปริมาณเชื้อขนาดต่างๆ พบว่าสามารถใช้ได้ผลทุกอาหาร และในการศึกษาของ Swenson, Hill และ Thornsberry (1989) ได้เปรียบเทียบ MHA ที่เติมเลือดและที่ไม่เติมเลือด ในการหาค่า MIC พบว่าให้ผลเหมือนกัน 86.8% ศึกษาจากเชื้อ 53 สายพันธุ์ และได้เปรียบเทียบวิธี disk diffusion พบว่าให้ zone diameter ที่ต่างกัน 1 mm 90.4% ต่างกันไม่เกิน 2 mm 98% และต่างกันไม่เกิน 3 mm 100% นอกจากนี้มีการศึกษาโดยใช้เครื่องอัตโนมัติในการทดสอบความไว เช่น Iwen และคณะ (1996) พบว่า MicroScan panel สามารถใช้ในการทดสอบให้ผลที่ถูกต้องเชื่อถือได้ อีกทั้งยังสามารถบ่งชี้สปีชีส์ได้ Baker และ Tenover (1996) พบว่า Alamar colorimetric broth microdilution สามารถใช้ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพได้ถูกต้อง 99% และเป็นวิธีที่อ่านผลง่าย หรือในการทดสอบความไวต่อยาอาจใช้ E-test ซึ่งเป็นวิธีที่รวม disk diffusion และ agar dilution ใช้ง่าย สะดวก และเชื่อถือได้ แต่ข้อเสียคือ

ราคาแพง (Schulz and Sahm, 1993) และอาจให้ผลที่ผิดพลาด เนื่องจากการวางแผ่นทดสอบที่ไม่ถูกต้อง (Hamilton-Miller, Shah, and Yam, 1995) ในกรณีที่มีการดื้อยากลุ่ม β-lactams อาจทดสอบหา β-lactamase ร่วมด้วยโดยใช้แผ่น nitrocefin ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก (Jones, *et al.*, 1995)

นอกจากนี้มีการศึกษาเพื่อหาเชื้อดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง โดยส่วนใหญ่ใช้วิธี screen แยกเชื้อที่ดื้อยา เช่น จากการศึกษาของ Mollering, Wennersten และ Medrek (1971, quoted in Murray, 1990) โดยการ streak เชื้อลงบนอาหารที่เติมยา 2,000 mg/L ในปัจจุบันใช้วิธี broth dilution, agar dilution หรือ high disk content diffusion ซึ่ง Swenson, Hindler และ Peterson (1995) สรุปไว้ว่า การใช้วิธี screen แบบ agar dilution หรือ broth dilution อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดคือ Brain Heart Infusion (BHI) สำหรับวิธี agar dilution แนะนำให้ใช้ยา gentamicin 500 μg/ml ยา streptomycin 2,000 μg/ml และใช้เชื้อ $1X10^6$ CFU/spot จะให้ผลดีที่สุด แต่ถ้าใช้วิธี broth dilution ให้ใช้ยา gentamicin 500 μg/ml ยา streptomycin 1,000 μg/ml และใช้เชื้อ $5X10^5$ CFU/spot ส่วนวิธี disk diffusion ให้ใช้ MHA โดยวางแผ่นยา gentamicin ขนาด 120 μg และยา streptomycin ขนาด 300 μg แต่พบว่าแปลผลไม่ได้หากขนาด clear zone อยู่ในช่วง 7-9 mm ซึ่งจะต้องทดสอบซ้ำด้วยวิธี broth หรือ agar dilution และนอกจากนี้ได้สรุปการ screen VRE คือใช้วิธี agar dilution อาหารที่ใช้ทดสอบคือ BHIA และใช้เชื้อ 10^5-10^6 CFU/spot และใช้ความเข้มข้นของยา vancomycin 6 μg/ml

3. การถ่ายทอดยีนดื้อยาของ enterococci

การถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียโดยทั่วไปมี 3 วิธีคือ transformation, transduction และ conjugation ทั้ง 3 วิธีนี้เป็นการถ่ายทอดยีนดื้อยาแบบ horizontal ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการถ่ายทอดยีนดื้อยาของ enterococci โดยวิธี transformation และ transduction (Murray, 1990) สำหรับวิธี conjugation เป็นการถ่ายทอดยีนที่มีการกล่าวถึงมากใน enterococci โดยมีการแลกเปลี่ยนของพลาสมิด conjugative transposon และ gene transfer elements อื่นๆ ระหว่าง enterococci ด้วยกัน หรือระหว่าง enterococci กับ

แบคทีเรียกรัมบวกสกุลอื่นหรือแบคทีเรียกรัมลบ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยา และมีผลต่อการเพิ่มของอุบัติการของการดื้อยาในที่สุด

การถ่ายทอดพลาสมิดโดยวิธี conjugation ในแบคทีเรียกรัมบวกพบครั้งแรกโดย Tomura และคณะ ในปี ค.ศ. 1973 ใน *E. faecalis* ซึ่งเป็นการถ่ายทอดคุณสมบัติ hemolysin และ/หรือbacteriocin ในช่วงปี ค.ศ. 1974 Jacob และ Hobbs พบการถ่ายทอด R-plasmid (pJH1) และ hemolysin-bacteriocin plasmid (pJH2) ใน *E. faecalis* ซึ่งแยกได้ทางคลินิก โดยวิธี broth mating (Tomura, *et al.*, 1973 ; Jacob and Hobbs, 1974) และต่อมาพบการถ่ายทอดพลาสมิดในลักษณะที่คล้ายกันนี้ในสายพันธุ์อื่นอีก การถ่ายทอดใน *E. faecalis* เหมือน conjugation ของ *E. coli* คือจะต้องมีการเกาะกันของเซลล์ตัวให้และตัวรับ (direct contact) แต่ *E. faecalis* ไม่มี sex pili ที่ตัวให้ใช้ในการยึดเกาะกับตัวรับเหมือน *E. coli* และความถี่ในการถ่ายทอดของ *E. faecalis* จะสูงถึง 10^{-2} /donor ในอาหารเหลว (broth) และพบว่าสามารถถ่ายทอดได้ดีใน solid surface ด้วย เช่น filter membrane

จากการรวบรวมข้อมูลของ Courvalin (1994) มียีนดื้อยาส่วนใหญ่ที่พบครั้งแรกใน enterococci และ streptococci สามารถแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียกรัมลบ เช่น *Escherichia coli, Klebseilla pueumoniae, Campylobacter coli* ตัวอย่างของยีนดื้อยาเหล่านั้นได้แก่ *aphA*-3 ซึ่งเป็นยีนที่ดื้อยา amikacin และ kanamycin, *aadE* ซึ่งเป็นยีนที่ดื้อยา streptomycin, ยีน *ermB* ดื้อยา macrolides-lincosamide-streptogramin, ยีน *tetM* หรือ *tetO* ซึ่งดื้อยา tetracycline, minocycline เป็นต้น ดังนั้น enterococci จึงเปรียบเสมือนรังสะสมของยีนดื้อยา

การถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยวิธี conjugation ของ enterococci มีการถ่ายทอด 3 ระบบ คือ ระบบ pheromone หรือ narrow-host range ระบบ broad-host range และระบบ conjugative transposon ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1 การถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยระบบ pheromone

ในปี 1978 และ 1979 มีการศึกษาในห้องทดลองของ Clewell (Dunny, Brown, and Clewell, 1978 ; Dunny, *et al.*, 1979, quoted in Dunny, 1991) พบว่ามีการจับกลุ่ม (clumping) ระหว่างตัวให้และตัวรับเมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงผสมกัน และพบว่าเซลล์ตัวให้

จะหลั่ง sex pheromone ซึ่งเป็น hydrophobic peptides ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยกรดอมิโน 7 ถึง 8 ตัว กระตุ้นให้ตัวรับสังเคราะห์ adhesins ที่ผิวเซลล์หรือที่เรียกว่า aggregation substance จับกับ binding site ของตัวรับ ซึ่งพบว่า binding site คล้ายกับ lipoteichoic acid ของ Lancefiled group D antigen บริเวณผนังเซลล์ของพวก enterococci และ streptococci group D มีการศึกษาโดยการทำ mutation ให้เป็นส่วนประกอบของ fatty acid แทน พบว่ามีการเกิดการเกาะกลุ่มได้ไม่ดี และมีการศึกษาพบว่า chelating agent เช่น EDTA สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ ส่วน phosphate และ divalent cation ส่งเสริมให้เกิดการเกาะกลุ่ม

มีการศึกษาอีกมากมายในเวลาต่อมาเกี่ยวกับการหลั่ง hydrophobic peptides ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำของ *E. faecalis* เช่น มีการหลั่งในระหว่างการเจริญปกติ และพบว่าตัวรับ 1 เซลล์ อาจผลิต sex pheromone ได้ถึง 5 ชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งมีความจำเพาะกับพลาสมิดที่จะถ่ายทอดของตัวให้ และตัวให้ก็จะมีพลาสมิดที่ตอบสนองต่อ pheromone มากกว่า 1 ชนิดเช่นเดียวกัน และบางพลาสมิดสามารถสร้างสารยับยั้ง pheromone ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ pheromone และทำงานในลักษณะ competitive inhibitors (Clewell, 1993 ; Dunny, 1991)

ในการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยระบบ pheromone-responding plasmid หรือ narrow-host range ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่สามารถพบใน enterococci และแบคทีเรียที่ใกล้ชิดกัน เช่น streptococci พลาสมิดที่ถ่ายทอด (pheromone plasmid) มักมีขนาดใหญ่มากกว่า 25 kb ถ่ายทอดได้ดีในอาหารเหลว มีความถี่ในการถ่ายทอดสูงประมาณ 10^{-2} มีการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการดื้อยา, hemolysin, bacteriocin และทนต่อแสงอุลตร้าไวโอเลต ตัวอย่างของ pheromone plasmid ได้แก่ pAD1, pCF10, pBEM10, pJH2, pAM323, pAM324, pHKK เป็นต้น มีขนาดตั้งแต่ 53-70 kb ซึ่งจะมียีนดื้อยา tetracycline, penicillin, gentamicin, kanamycin, tobramycin, erythromycin และ vancomycin

มีการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา gentamicin ในระดับสูงโดยระบบ pheromone ในประเทศญี่ปุ่นโดย Shiojima และคณะ (1997) จาก *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกประมาณ 100 สายพันธุ์ ซึ่งมีการดื้อยาอื่นร่วมด้วย ได้แก่ erythromycin, tetracycline, streptomycin และ chloramphenicol โดยคัดเลือกตัวให้เฉพาะสายพันธุ์ที่

ตอบสนองต่อ pheromone โดยดูจากการเกาะกลุ่มของเซลล์กับ culture filtrate ของ plasmid free *E. faecalis* FA2-2 ซึ่งพบประมาณ 60% ของสายพันธุ์ที่ศึกษาทั้งหมด จากนั้นสุ่มมาศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยใช้ *E. faecalis* FA2-2 เป็นตัวรับ จำนวน 48 สายพันธุ์ โดยวิธี broth mating พบว่ามี 8 สายพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา gentamicin โดยระบบ pheromone ได้ ด้วยความถี่ประมาณ 10^{-2}-10^{-1}/donor และพบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ตอบสนองต่อ pheromone ชนิดเดียวกัน และพลาสมิดส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 64-98 kb เมื่อศึกษายีนที่ควบคุมการตอบสนองต่อ pheromone โดยวิธี Southern hybridization พบว่าอยู่บนพลาสมิดเดียวกับพลาสมิดที่ควบคุมการดื้อยา นอกจากนี้ยังพบว่าพลาสมิดที่ควบคุมการสร้าง pheromone สามารถ mobilize พลาสมิดอื่นได้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยาได้มากขึ้น เช่น pHKK 703 สามารถ mobilize pHKK 702 ซึ่งมี Tn*1546* ที่มียีนดื้อยา vancomycin (Heaton, *et al.*, 1996)

3.2 **การถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยระบบ** Broad-host range

Enterococci สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยวิธี conjugation ให้แบคทีเรียกรัมบวกต่างสกุลและแบคทีเรียกรัมลบ โดยผ่านทางระบบ broad-host range ซึ่งจากการรวบรวมข้อมูลของ Courvalin (1994) พบว่ามียีนดื้อยาหลายชนิดที่พบครั้งแรกใน enterococci มาก่อน และต่อมาพบในแบคทีเรียอื่นๆ พลาสมิดที่พบว่าเป็น broad-host range เช่น pAMβ1 ซึ่งเจอครั้งแรกใน *E. faecalis* มียีนดื้อยา *ermAM* และมีขนาด 26.5 Kb ในการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยระบบนี้เนื่องจาก enterococci ไม่มี sex pili เหมือนในแบคทีเรียกรัมลบที่จะใช้ในการถ่ายทอดพวก broad-host range plasmid การถ่ายทอดโดยระบบนี้จะต้องมีการสัมผัสโดยตรงระหว่างตัวให้และตัวรับ ซึ่งแตกต่างจากระบบ pheromone คือสามารถเกิดได้ดีบน solid surface เช่น nitrocellulose filter และมีความถี่ในการถ่ายทอดต่ำประมาณ 10^{-6}–10^{-3} การถ่ายทอดโดยวิธีนี้ขึ้นกับชนิดของพลาสมิดที่สามารถแสดงออกได้ในตัวรับและ genotype ของคู่ที่ถ่ายทอด มักมีขนาดเล็กประมาณ 15-20 kb สำหรับวิธีการถ่ายทอดยังไม่ทราบชัดเจนแต่มีสมมติฐานว่าอาจเกิดจากการถ่ายทอดผ่านทาง cytoplasmic bridge ซึ่งสร้างโดยเฉพาะ หรืออาจเกิดจาก cell fusion (Macrina and Archer, 1993) มีการศึกษาพบว่าในของแข็งกึ่งเหลวโดยการเติม 10-40% polyethylene glycol (PEG) ใน liquid mating mixtures จะเพิ่มความถี่ในการถ่ายทอดเป็น 10^{-5}-10^{-4}

และไม่พบการถ่ายทอดถ้าใช้ PEG น้อยกว่า 10% และพบว่าถ้าใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อผ่านทางแผ่นกรองระหว่างการ mating สามารถเพิ่มความถี่ได้ 10 เท่า (Taketomo, Sasaki, and Sasaki, 1989)

มีการศึกษาของ Trieu-Cuot, Carlier และ Courvalin (1988) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดพลาสมิด pAT 191 ขนาด 32.5 kb ซึ่งเป็นพลาสมิดผสมระหว่างพลาสมิด pAT 190 ที่มียีนดื้อยา *erm, aph-3* และ *bla* และพลาสมิด pAMβ1 ที่มียีน *tra* ซึ่งเป็นยีนทำให้เกิดการถ่ายทอด โดยถ่ายทอดจาก *E. faecalis* BM 4110 ไปให้ *Escherichia coli* K802 :: Tn*10* ในหลอดทดลอง โดยวิธี filter mating บน nitrocellulose membrane filter ขนาด 0.45 μm โดยใช้อัตราส่วนตัวให้ต่อตัวรับ 20:1 ผลการศึกษาพบว่าสามารถถ่ายทอดได้และมีความถี่ในการถ่ายทอด $5X10^{-9}$/donor และมีการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยานี้ในทางเดินอาหารของหนูโดย Doucet-Populaire และคณะ (1992) พบว่า *E. faecalis* สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาให้แบคทีเรียกรัมลบ คือ *Escherichia coli* ในทางเดินอาหารของหนูได้โดยมีความถี่ในการถ่ายทอด $3X10^{-9}$/donor และมีการศึกษาของ Noble, Virani และ Cree (1992) พบการถ่ายทอดยีนดื้อยา vancomycin จาก *E. faecalis* ไปให้แบคทีเรียกรัมบวกต่างสกุลคือ *S. aureus* ได้ด้วยความถี่ 10^{-6}/donor บนผิวหนังของหนู

3.3 การถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยระบบ conjugative transposon

Conjugative transposons เป็นยีนหรือหน่วยพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนที่เองได้จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง โดยมีการสัมผัสกันโดยตรงของเซลล์ตัวให้และเซลล์ตัวรับ ซึ่งเป็นวิธีการของการ conjugation ถูกพบครั้งแรกเมื่อประมาณ 10 กว่าปีก่อนใน *E. faecalis* คือ Tn*916* (Franke and Clewell, 1981) conjugative transposons มี 2 ชนิดคือ conjugative chromosomal-borne transposon เป็นชนิดที่แทรกบนโครโมโซม และ conjugative plasmid-borne transposon เป็นชนิดที่แทรกบนพลาสมิด ขนาดที่พบมีตั้งแต่ 15 ถึงมากกว่า 150 kb ซึ่งพบว่า transposon ขนาดใหญ่ หรือ complex transposon มักแทรกบนโครโมโซม การถ่ายทอดโดยวิธีนี้เกิดได้ดีบนอาหารแข็ง ใช้เวลาในการสัมผัสนานและมีความถี่ในการถ่ายทอดประมาณ 10^{-8}-10^{-5}/ donor (Clewell and Flannagan, 1993) สำหรับกลไกในการถ่ายทอด Dunny (1991) ได้สรุปไว้ว่า มีการใช้กระบวนการของ transposition และ conjugation คือ มีการหลุดออกของ transposon จากแหล่งที่อยู่เดิม

แล้วเปลี่ยนรูปเป็น non-replicative circular หรือเรียกว่า intermediate transposon จากนั้นจะมีการถ่ายทอดตัวเองจากตัวให้ไปยังตัวรับ โดยที่มีการหลอมรวมกันของเซลล์ แล้วมีการแทรกของ intermediate transposon โดยเข้าไปแทรกบนพลาสมิดหรือโครโมโซม

conjugative transposon ถือเป็น broad-host range เนื่องจากพบว่าส่วนใหญ่สามารถถ่ายทอดได้ทั้งในแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบ เช่น Tn*916* ซึ่งพบครั้งแรกใน *E. faecalis* มียีนดื้อยา tetracycline ต่อมาพบได้ในแบคทีเรียกรัมลบพวก anaerobes เช่น *Fusobacterium nucleatum* และในแบคทีเรียกรัมบวก เช่น *Peptostreptococcus anaerobius* จากการรวบรวมข้อมูลของ Clewell และ Flannagan (1993) พบ conjugative transposon ใน enterococci ได้แก่ Tn*918*, Tn*920*, Tn*925* มีขนาด 16-23 kb พบใน *E. faecalis* มียีน *tetM* และ Tn*5031,5032, 5033* พบใน *E. faecium* มีขนาด 16.5 kb และมียีน *tetM* เช่นเดียวกัน จากการศึกษาของ Quintiliani และ Courvalin (1996) พบ Tn*1547* และ IS 256 เป็น conjugative chromosomal element ขนาดใหญ่ 90-250 kb และมีกลุ่มยีน *vanB* ส่วน Carias และคณะ (1988) พบ Tn*5382* ขนาด 27 kb อยู่บน conjugative chromosomal element ขนาดใหญ่ 130-150 kb ใน *E. faecium* มียีน *vanB* และ *pbp* 5 นอกจากนี้พบว่า conjugative transposon สามารถที่จะ mobilize พลาสมิดอื่นได้ด้วย เช่น Tn*916* (Salyer, Shoemaker, and Stevens, 1995) ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของยีนดื้อยาได้มากยิ่งขึ้น

จากการศึกษาของ Rice และ Carias (1998) พบว่า Tn*5385* เป็น conjugative chromosomal-borne transposon ขนาดใหญ่ 65 kb และมียีนดื้อยาหลายชนิดได้แก่ erythromycin, gentamicin, mercuric chloride, streptomycin, tetracycline, minocycline และ penicillin ซึ่งสร้าง β-lactamase ประกอบด้วยส่วนที่คล้ายกับ Tn*552* และ IS 257 ของ *S. aureus* และ broad-host range Tn*5381*, Tn*4001* และ Tn *917* ของ enterococci Tn*5385* สามารถถ่ายทอดไปยัง *E. faecalis* JH2-7 และ OG1XRE ซึ่งดื้อยา rifampin และ fusidic acid ได้ ความถี่ในการถ่ายทอดต่ำ 10^{-9}/recipient บนอาหารแข็ง ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแพร่กระจายยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียต่างสกุลโดยยีนซึ่งอยู่บน broad-host range transposon

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาจำแนก *Enterococcus* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
2. เพื่อศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp. ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพและรูปแบบพลาสมิดของ *Enterococcus* spp.
4. เพื่อศึกษาแนวทางในการทำ typing ของสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp.
5. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดปัจจัยดื้อยา (R-plasmid) ของ *Enterococcus* spp. โดยวิธี conjugation

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. ชนิดของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีดังนี้

1.1 *Enterococcus* spp. จำนวน 97 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกชนิดต่างๆ ของผู้ป่วยขั้นต้นโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนเมษายน 2540 ถึงมกราคม 2541

1.2 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

1.3 *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.4 *Escherichia coli* DH5$\alpha F'$ ได้จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. วัสดุ

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี เอนไซม์ และยาต้านจุลชีพ ดังตาราง 6

ตาราง 6 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี เอนไซม์ ยาต้านจุลชีพ และบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี เอนไซม์ ยาต้านจุลชีพ	บริษัทผู้ผลิต
1. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ	
Arabinose	Difco
Bacto-agar	Difco
Bile esculin medium	Difco
Blood (human)	คลังเลือดของโรงพยาบาล
Brain Heart Infusion (BHI)	Difco
Glucose	Fluka
L-Arginine	Merck
MacConkey agar	Difco
Mannitol	Difco
Motility medium	Difco
Moeller's decarboxylase broth	Difco
Mueller Hinton Broth (MHB)	Difco
Potassium tellurite	Fluka
Sodium pyruvate	Merck
Raffinose	Fluka
Ribose	Difco
Simmon citrate agar	Difco
Sorbitol	Difco
Sorbose	Difco
Sucrose	Merck
Tryptic Soy Agar (TSA)	Difco

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี เอนไซม์ ยาต้านจุลชีพ	บริษัทผู้ผลิต
2. **สารเคมี**	
Absolute ethanol	Merck
Agarose gel	Sigma
Barium chloride	Merck
Boric acid	Merck
Chloroform	Merck
Ethidium bromide	Sigma
Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	Sigma
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Merck
Hydrochloric acid	Merck
Methanol	Merck
Phenol	Gruppo
Sodium acetate	Merck
Sodium chloride	Carlo Erba
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma
Sodium hydroxide	Merck
Sulfuric acid	Merck
Tris (hydroxy methylaminomethane)	Sigma
3. **เอนไซม์**	
*Eco*RI	GIBCO BRL
Hind III	GIBCO BRL
Lysozyme	Sigma
RnaseA	Sigma

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี เอนไซม์ ยาต้านจุลชีพ	บริษัทผู้ผลิต
4. ยาต้านจุลชีพ	
แผ่นยาต้านจุลชีพมาตรฐาน 9 ชนิด	Oxoid
Ampicillin (10 μg)	
Ciprofloxacin (5 μg)	
Fosfomycin (50 μg)	
Gentamicin (10 μg)	
Imipenem (10 μg)	
Penicillin (10 unit)	
Streptomycin (10 μg)	
Teicoplanin (30 μg)	
Vancomycin (30 μg)	
ยาต้านจุลชีพในรูปยาผงและยาน้ำสำหรับฉีด 6 ชนิด	
Ampicillin	Sigma
Gentamicin	Lek
Streptomycin	Sigma
Teicoplanin	Gruppo Lepetit S.p.A. Milan, Italy
Vancomycin	Fujisawa USA. Inc.

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. แผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 μm
2. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 5 และ 10 ml
3. เข็มฉีดยาขนาด 20 G
4. ถุงมือ disposable
5. เครื่องแก้วสำหรับใช้วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
6. Automatic pipet ขนาด 1-10 μl, 10-100 μl, 100-1000 μl พร้อม tips
7. หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml

8. Multipoints inoculator
9. Vernier caliper
10. เครื่องเขย่าหลอด (เครื่องเขย่าหลอด) , Scientific Industries Inc.,USA.
11. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave), Tomy Seiko Co.Ltd., Japan
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator), Heraeus GmbH, Germany
13. เครื่องหมุนเหวี่ยง (eppendorf centrifuge), Brinkman Instruments Inc., USA.
14. เครื่องชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ, Harvard Trip balance 2 kg., OHAUS
15. เครื่องชั่งสารแบบละเอียด (electronic balance), Sartorius, Germany
16. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter), Mettler-Toledo Ltd., England
17. เครื่องกวนสารละลายพร้อมแผ่นให้ความร้อน (strirring heating plate), Thermolyne Barnstead Thermolyne Cooperation, USA.
18. เครื่องหมุนเวียนน้ำควบคุมอุณหภูมิ (เครื่องหมุนเวียนน้ำควบคุมอุณหภูมิ), Eyela Tokyo Rikakikai Co.Ltd.,Japan
19. เครื่องแยกสารละลายโดยใช้ไฟฟ้า (electrophoresis unit), GNA-100, Pharmacia, Sweden
20. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply), Pharmacia LKB, Sweden
21. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar airflow cabinet), Forma Scientific Inc., USA.
22. กล้องจุลทรรศน์ (microscope), Olympus CH-2
23. กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์ (polaroid camera), DS 34, Spectronics Coorporation,USA.
24. UV transilluminator, UVP, USA.
25. ตู้เย็นเก็บเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 4 °C , Sanyo, Japan
26. ตู้แช่เก็บเชื้อ เอนไซม์ ยาต้านจุลชีพ และพลาสมิดอุณหภูมิ –20 °C , Sanyo, Japan
27. Cooling bath (methanol bath), Fits Systems, Stone Ridge, USA.
28. ตู้อบเครื่องแก้ว (hot-air oven), Heraeus GmbH, Germany
29. โหลดูดความชื้น (dessicator), Pyrex,USA.

วิธีดำเนินการ

1. การจำแนก enterococci ที่แยกได้จากผู้ป่วย

ในการศึกษาเพื่อจำแนก enterococci 97 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกชนิดต่างๆ เช่น ปัสสาวะ หนอง เลือด น้ำดี เนื้อเยื่อ น้ำจากช่องท้อง เป็นต้น จากผู้ป่วย 1 คนต่อ 1 ตัวอย่าง โดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนเมษายน 2541 ถึง มกราคม 2542 ซึ่งกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาเป็นผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ทั้งสิ้น และได้แบ่งการศึกษาเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1.1 ศึกษาคุณสมบัติโดยทั่วไปของ genus *Enterococcus*

โดยนำ enterococci ที่แยกโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในขั้นต้น มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ genus *Enterococcus* เพื่อยืนยัน อีกครั้งตามแบบแผนซึ่งสรุปโดย Facklam และ Sahm (1995) ดังนี้

นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงบน blood agar 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบคุณสมบัติโดยใช้เชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆ 2-3 โคโลนี streak บน bile esculin medium จุ่มใน 6.5% NaCl broth และ 1% glucose broth นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C อ่านผล 24-72 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 °C และ 45 °C ให้เพาะเลี้ยงเชื้อบน blood agar แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อตั้งอุณหภูมิตามที่ต้องการ อ่านผลเมื่อครบ 1, 2, 3 และ 7 วัน ส่วนการย้อมสีกรัม ทำโดยใช้เชื้อบน blood agar มาย้อมแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แปลผลการทดสอบทั้งหมดตามตาราง 2 ในบทที่ 1

1.2 การจำแนกสปีชีส์ของ *Enterococcus* spp.

โดยนำเชื้อที่ทดสอบยืนยัน Genus *Enterococcus* แล้ว มาศึกษาเพื่อจำแนกสปีชีส์ โดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาตามแบบแผนซึ่งสรุปโดย Facklam และ Sham (1995) ดังนี้

นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงบน blood agar 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นใช้เชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆ ทำการทดสอบในอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งเตรียมตามวิธีในภาคผนวก โดยทดสอบการหมักน้ำตาลใน 1% mannitol, sorbitol, sorbose, arabinose, raffinose, sucrose, และribose broth ทดสอบการใช้กรดอะมิโนใน 1% arginine broth ทดสอบการใช้ pyruvate ใน 1% puruvate broth ทดสอบการเจริญบน 0.04% tellurite

blood agar ทดสอบการสร้างสารสีบน TSA และทดสอบการเคลื่อนที่ ใน motility medium นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C ยกเว้นการทดสอบการเคลื่อนที่ ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C อ่านผลเมื่อครบ 1, 2, 3 และ 7 วัน แปลผลตามตาราง 3 ในบทที่ 1

1.3 **ศึกษาทางด้านข้อมูลของผู้ป่วย และแหล่งที่พบเชื้อ**

โดยการเก็บข้อมูลย้อนหลังในแฟ้มประวัติผู้ป่วย เช่น ข้อมูลด้าน อายุ เพศ โรค จำนวนครั้งที่นอนโรงพยาบาล หอผู้ป่วย ชนิดสิ่งส่งตรวจ ระบบหรืออวัยวะที่แยกเชื้อได้ ประวัติการใส่สายสวนปัสสาวะ ประวัติการได้รับยาต้านจุลชีพมาก่อน จากนั้นนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม SPSS-PC และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้สถิติร้อยละ

2. การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ซึมโดยใช้แผ่นยามาตรฐาน (Disk Diffusion)

ทดสอบตามวิธีมาตรฐานของ NCCLS (1993)

โดยนำ enterococci มาทำการเพาะเลี้ยงบน blood agar 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 35 °C นานครั้งละ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนี จำนวน 4-5 โคโลนี นำมาใส่ในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเหลว BHI ประมาณ 3-4 ml แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่กำลังเจริญในระยะ log phase จากนั้นปรับปริมาณเชื้อด้วย BHI ให้ได้เชื้อ 1.5 X 10^8 CFU/ml โดยเทียบความขุ่นกับ 0.5 MacFarland standard และใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแล้ว streak บน MHA ให้เชื้อกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ นำแผ่นยามาตรฐาน 9 ชนิด คือ ampicillin, penicillin, gentamicin, streptomycin, vancomycin, teicoplanin, imipenem, fosfomycin และ ciprofloxacin วางบน MHA โดยวางแผ่นยาแต่ละแผ่นห่างกัน 15-20 mm แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง สำหรับยา vancomycin และ teicoplanin ให้บ่มนานประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยใช้ vernier caliper วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นยาแต่ละชนิด แล้วนำไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐานในภาคผนวก

3. การศึกษาเพื่อแยก enterococci ที่ดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงและดื้อยา vancomycin โดยวิธี agar screening

ทดสอบโดยวิธี aminoglycoside agar dilution และ vancomycin agar dilution ดัดแปลงจากของ Swenson, Hindler และ Peterson (1995) และประยุกต์ใช้ multipoints inoculator ขนาด 0.001-0.003 ml/spot ในการหยดเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ ซึ่งสามารถหยดได้ครั้งละ 21 สายพันธุ์ต่อจาน

โดยนำ enterococci มาเพาะเลี้ยงและปรับเชื้อให้ได้ 0.5 MacFarland standard เช่นเดียวกับข้อ 2. จากนั้นใช้ automatic pipet ดูดเชื้อที่เตรียมไว้แต่ละหลอด ใส่ในหลุมของ multipoints inoculator ประมาณ 300 μl ต่อหลุม จำนวน 19 หลุม และใช้ *E. faecalis* ATCC 29212 เป็น susceptible control 1 หลุม ใช้ BHI เป็น control อีก 1 หลุม รวมทั้งหมด 21 หลุม จากนั้นใช้ multipoint inoculator จุ่มเชื้อในหลุมแตะบนผิวของอาหารซึ่งผสมยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้คือ ยา gentamicin 500 μg/ml และ 1,000 μg/ml ยา streptomycin 2,000 μg/ml ยา vancomycin 6 μg/ml (เตรียมตามวิธีการในภาคผนวก) จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 CFU/spot สำหรับจานซึ่งไม่เติมยาต้านจุลชีพอีก 2 จาน ให้แบ่งทำในช่วงเริ่มแรกและช่วงสุดท้าย นำจานทั้งหมดไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 24-48 ชั่วโมง อ่านผลเมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยดูโคโลนีที่ขึ้นบนตำแหน่งที่แตะเชื้อ ถ้ามีมากกว่า 1 โคโลนี ให้อ่านผลเป็นบวก แต่สำหรับยา streptomycin ถ้าให้ผลลบให้บ่มเชื้อไว้ต่อจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผลใหม่

4. การศึกษาความไวต่อยา vancomycin และ teicoplanin โดยวิธี MIC

ใช้วิธี agar dilution โดยทดสอบตามวิธีมาตรฐานของ NCCLS (1993) โดยประยุกต์ใช้ multipoints inoculator ขนาด 0.001-0.003 ml/spot ในการหยดเชื้อ

โดยนำ enterococci มาเตรียมเชื้อและปรับเชื้อให้ได้ 0.5 MacFarland standard เช่นเดียวกับข้อ 2 จากนั้นเจือจางใน 0.9% NSS ในอัตราส่วน 1:10 ใช้ automatic pipet ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่หลุม และใช้อาหารซึ่งผสมยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้คือ ยา vancomycin และ teicoplanin เตรียมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 μg/ml (เตรียมตามวิธีการในภาคผนวก) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3 โดยเริ่มจากความเข้มข้นของยาต่ำสุดไปหาความเข้มข้นสูงสุด จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ

10^4 CFU/spot จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 35 °C นาน 24 ชั่วโมง การอ่านและแปลผล โดยสังเกตดูโคโลนีที่ขึ้นบนตำแหน่งที่แตะเชื้อในแต่ละความเข้มข้น ให้อ่านความเข้นข้นน้อยที่สุดของสารต้านจุลชีพที่ไม่มีเชื้อขึ้นเลยหรือขึ้นจำนวนน้อยมากประมาณ 1-3 โคโลนี หรือขึ้นแบบจางๆ เห็นไม่ชัด และค่า MIC ของ *E. faecalis* ATCC 29212 ซึ่งใช้เป็น susceptible control ควรอยู่ในช่วงต่อไปนี้คือ MIC ของยา vancomycin 1-4 μg/ml และยา teicoplanin 0.06-0.25 μg/ml นำค่าที่ได้จากการอ่านไปเทียบกับตารางมาตรฐานของ MIC Breakpoint ในภาคผนวก

5. **การศึกษารูปแบบพลาสมิดโดยวิธี** agarose gel electrophoresis

5.1 **การสกัดพลาสมิด**

ใช้วิธี alkaline extraction โดยดัดแปลงจากวิธีของ Birnboim และ Doly (1979) และ Weaver และ Clewell (1988)

โดยนำ enterococci ซึ่งเพาะเลี้ยงบน blood agar 1 คืน มาเลี้ยงใน BHI จำนวน 3 ml ที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 1.5 ml ลงในหลอด eppendorf นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วเติม solution I ซึ่งเติม lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 mg/ml จำนวน 100 μl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอด แล้วนำไปแช่ในเครื่องหมุนเวียนน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม solution II จำนวน 200 μl เขย่าให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 6 ครั้ง นำไปแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติม solution III จำนวน 150 μl เขย่าให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 6 ครั้ง นำไปแช่น้ำแข็งอีกครั้งนาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่ในหลอด eppendorf อันใหม่ 500 μl เติม phenol : chloroform (1:1) จำนวน 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอด นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 15 นาที จากนั้นใช้ pasteur pipet ดูดส่วนใสส่วนบนใส่ eppendorf อันใหม่ เติม cold absolute ethanol จำนวน 1 ml ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอด นำไปแช่ใน methanol bath นาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง เติม 70% ethanol alcohol จำนวน 1 ml ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอด จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในโหลดูดความชื้นประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม TE บัฟเฟอร์ จำนวน 20

μl และ RnaseA (2 mg/ml) จำนวน 2 μl เคาะบนพื้นโต๊ะ แล้วนำไปแช่ในเครื่องหมุนเวียนน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C

การตัดย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hind* III ทำได้ดังนี้ ใช้พลาสมิดจำนวน 8 μl เติมบัฟเฟอร์เฉพาะของเอนไซม์ชนิดนั้น จำนวน 1 μl และเติมเอนไซม์จำนวน 1 μl จากนั้นนำไปแช่ในเครื่องหมุนเวียนน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 3-4 ชั่วโมง

5.2 **การเตรียม** agarose gel

เตรียม 0.6% agarose gel จำนวน 50 ml โดยชั่ง agarose gel 0.3 g (สำหรับ 0.7% agarose gel ชั่ง agarose gel 0.35 g) เติมน้ำกลั่น 40 ml และ electrophoresis บัฟเฟอร์ 5X จำนวน 10 ml เขย่าให้เข้ากัน นำเข้าตู้อบ microwave ประมาณ 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 60 °C นำไปเทลงในถาดใส่เจล (gel) ซึ่งปิดหัวท้ายด้วยเทปกาวและวางหวี (comb) ขนาด 8 หลุม ไว้ก่อนแล้ว ตั้งทิ้งให้เจลแข็ง ประมาณ 20 นาที ดึงเทปกาวที่ปิดออก จากนั้นวางถาดเจล ลงใน electrophoresis chamber ซึ่งมี electrophoresis บัฟเฟอร์ อยู่ประมาณ 400 ml โดยเตรียมจาก electrophoresis บัฟเฟอร์ 5X จำนวน 80 ml ผสมกับน้ำกลั่น 320 ml บัฟเฟอร์ที่อยู่ใน chamber จะท่วมเจลเล็กน้อย จากนั้นค่อยๆ ดึงหวีออกตรงๆ

5.3 **การแยกพลาสมิดโดยวิธี** agarose gel electrophoresis

ใช้ automatic pipet ดูดพลาสมิดที่ต้องการศึกษา จำนวน 10 μl และเติม loading dye 2 μl ผสมให้เข้ากันแล้วดูดใส่หลุมเจล โดยมีอยู่ 1หลุมให้หยอดตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน คือ λDNA ที่ตัดด้วย *Hind* III จำนวน 1 μl จากนั้นปิดฝาครอบและเสียบขั้วลบทางด้านบนของหลุมเจล ตั้งเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) ควบคุมที่ 70 โวลท์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ปิดเครื่องแล้วค่อยๆ นำถาดที่มีเจลขึ้นจากบัฟเฟอร์ นำเจลไปย้อมในถาดที่บรรจุ electrophoresis บัฟเฟอร์ ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 μg/ml นาน 30 นาที หลังจากนั้นช้อนแผ่นเจลขึ้นมา จุ่มลงในถาดล้างสี 5 นาที แล้วนำเจลไปส่องใต้แสง UV ที่ 254 nm บน UV transilluminator จะเห็นแถบสีของพลาสมิดแยกตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล ถ่ายรูปเจลภายใต้แสง UV โดยใช้กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์

6. การศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยวิธี conjugation

6.1 การถ่ายทอดยีนดื้อยา gentamicin ระหว่าง *Enterococcus* spp.

โดยวิธี broth mating และ membrane filter mating ดัดแปลงจาก Petts และคณะ (1997)

เลี้ยง enterococci สายพันธุ์ตัวให้และสายพันธุ์ตัวรับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI 1 คืน ที่อุณหภูมิ 35 °C แล้วนำมาเจือจางใน BHI ในอัตราส่วน 1:100 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิต (viable count) จากนั้นเลี้ยงสายพันธุ์ตัวให้ผสมกับสายพันธุ์ตัวรับ โดยใช้อัตราส่วน 3 อัตราส่วนดังนี้คือ 0.05 ml ต่อ 0.5 ml (1:10), 0.25 ml ต่อ 0.25 ml (1:1) และอัตราส่วน 0.5 ml ต่อ 0.05 ml (10:1) ใน BHI 4.5 ml สำหรับวิธี broth mating ให้นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 4 ชั่วโมง และ 1 คืน ส่วนวิธี membrane filter mating ให้นำส่วนผสมมากรองบนแผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 μm จากนั้นวางแผ่นกรองบน blood agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C 1 คืน หลังจากนั้นนำแผ่นกรองมาล้างเซลล์ใน BHI จำนวน 2 ml เขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอด ดูดส่วนผสมมา 0.2 ml ละเลงบน selective medium คือ BHIA ซึ่งเติม arabinose 2% และยา gentamicin 500 μg/ml ampicillin 16 μg/ml สำหรับวิธี broth mating ดูดส่วนผสมที่เลี้ยงไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง และ 1 คืน จำนวน 0.2 ml มาละเลงบน selective medium เช่นเดียวกับวิธี filter mating ตรวจสอบ transconjugants ที่ขึ้นบน selective medium ซึ่งจะให้โคโลนีสีเหลืองบนอาหารสีม่วง จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติ hemolysis และสกัดพลาสมิดเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบระหว่างตัวให้ ตัวรับ และ transconjugants

6.2 การถ่ายทอดยีนดื้อยา gentamicin ระหว่าง *Enterococcus* spp. กับ *E. coli* DH5αF′ และ *E. coli* ATCC 25922

โดยวิธี broth mating และ membrane filter mating ดัดแปลงจาก Trieu-Cuot, Carlier และ Courvalin (1988)

เลี้ยง enterococci สายพันธุ์ตัวให้ และ *E. coli* สายพันธุ์ตัวรับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI 1 คืนที่อุณหภูมิ 35 °C นำมาเจือจางและนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตเช่นเดียวกับข้อ 6.1 จากนั้นเลี้ยง enterococci ผสมกับสายพันธุ์ตัวรับ ในอัตราส่วน 1:10, 1:1 และ 10:1 เช่นเดียวกับข้อ 6.1 สำหรับวิธี broth mating นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 4 ชั่วโมง และ 1 คืน ส่วนวิธี filter mating นำส่วนผสมมากรองบนแผ่นกรองขนาด 0.45 μm จากนั้นวางแผ่น

กรองบน BHIA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C 1 คืน หลังจากนั้นนำแผ่นกรองมาล้างเซลล์ใน BHI จำนวน 2 ml เขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอด ดูดส่วนผสมมา 0.2 ml ละเลงบน selective medium คือ Simmon citrate agar ซึ่งเติม arabinose 2% และเติมยา gentamicin 8 μg/ml ส่วนวิธี broth mating เมื่อเลี้ยงส่วนผสมครบ 4 ชั่วโมง และ 1 คืน นำมาละเลงบน selective medium เช่นเดียวกับวิธี filter mating ตรวจสอบว่ามี transconjugants เกิดขึ้นหรือไม่ โดยจะให้โคโลนีสีเหลืองบนอาหารสีเขียว นำโคโลนีที่ได้มายืนยันคุณสมบัติของ *E. coli* บน MacConkey agar และทดสอบการดื้อยา gentamicin ในระดับสูง และสกัดพลาสมิดเปรียบเทียบรูปแบบ

สำหรับการคำนวณหาความถี่ของการถ่ายทอด สามารถคำนวนได้ดังนี้

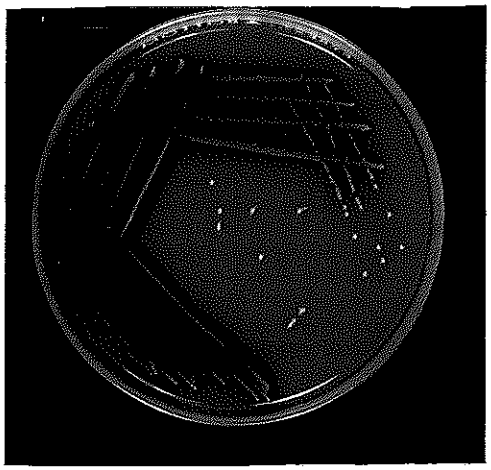
$$\text{ความถี่ของการถ่ายทอด} = \frac{\text{จำนวนของ transconjugants}}{\text{จำนวนของตัวให้}}$$

บทที่ 3

ผลการวิจัย

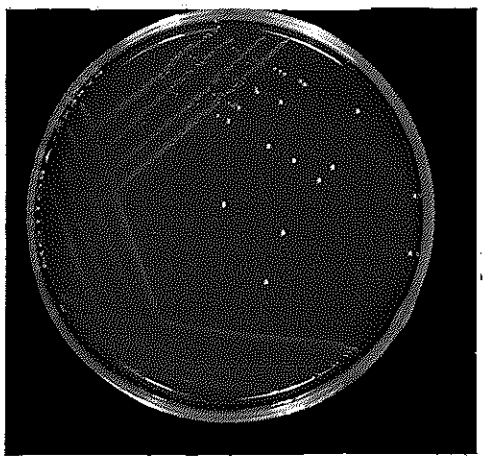
1. ผลการจำแนก *Enterococcus* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วย

จากการนำ enterococci จำนวน 97 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกชนิดต่างๆ ของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในช่วงเดือนเมษายน 2540 ถึงเดือนมกราคม 2541 มาศึกษาจำแนกถึงระดับสปีชีส์ โดยใช้วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามแบบแผนของ Facklam และ Sahm (1995) โดยนำมาย้อมสีกรัม ทดสอบคุณสมบัติการ hydrolyze esculin บน bile esculin agar การเจริญใน 6.5%NaCl broth การเจริญที่อุณหภูมิ 10 °C และ 45 °C การสร้างแก๊ส ใน 1% glucose broth ทดสอบคุณสมบัติ hemolysis บน human blood agar คุณสมบัติการใช้น้ำตาลต่างๆ การใช้ arginine และ pyruvate ทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ การเจริญบน tellurite blood agar และการสร้างสารสี พบว่า enterococci ที่นำมาศึกษา สามารถจำแนกได้ 4 สปีชีส์ โดยจำแนกได้ *Enterococcus faecalis* มากที่สุด จำนวน 84 สายพันธุ์ (86.60%) รองลงมาคือ *Enterococcus faecium* จำนวน 4 สายพันธุ์ (4.12%), *Enterococcus casseliflavus* จำนวน 2 สายพันธุ์ (2.06%) และ *Enterococcus hirae* จำนวน 1 สายพันธุ์ (1.03%) และที่ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้ (unclassified enterococci) โดยวิธีการนี้อีก 6 สายพันธุ์ (6.19%) ซึ่งสามารถจำแนกไว้ใน group II (ตามตาราง 3) โดยพบ enterocicci ที่เคลื่อนที่ได้ 4 สายพันธุ์ และให้สารสีเหลือง 1 สายพันธุ์ สามารถทนต่อ tellurite ได้และให้ผลการทดสอบใกล้เคียง *Enterococcus faecalis* มากที่สุด อีก 1 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบใกล้เคียง *E. casseliflavus* มากที่สุด แต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่ ซึ่งจากการเพาะเลี้ยง enterococci บน blood agar พบว่าเชื้อเจริญเป็นโคโลนีที่มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 mm มีสีเทาขาว โคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ และสามารถให้ hemolysis บน human blood agar ได้ทั้งชนิด α, β และ non-hemolysis ดังภาพประกอบ 1 ส่วนลักษณะโคโลนีของ enterococci เมื่อเพาะเลี้ยงบน bile esculin agar จะให้โคโลนีสีดำ ดังภาพประกอบ 2



ก. α-hemolysis

ข. β-hemolysis



ค. non-hemolysis

ภาพประกอบ 1 โคโลนีของ enterococci บน human blood agar
เกิด hemoysis ชนิดต่างๆ

ภาพประกอบ 2 โคโลนีของ enterococci บน bile esculin medium

สำหรับผลการศึกษาคุณสมบัติ hemolysis บน human blood agar พบว่า เชื้อที่นำมาศึกษาทั้ง 97 ตัวอย่างให้โคโลนีชนิด β-hemolysis จำนวน 24 สายพันธุ์ (24.74%) และ α-hemolysis จำนวน 7 สายพันธุ์ (7.22%) นอกจากนี้ส่วนใหญ่เป็น non-hemolysis ซึ่งพบจำนวน 66 สายพันธุ์ (68.04%) และได้จำแนกตามสปีชีส์ต่างๆ ดังตาราง 7 โดยพบว่า β-hemolysis จะพบเฉพาะใน *E. faecalis* เท่านั้น ส่วน α-hemolysis และ non-hemolysis สามารถพบในสปีชีส์อื่นๆ ด้วย และพบว่าใน *E. faecium* และ *E. hirae* จะพบเฉพาะชนิด non-hemolysis ส่วน *E. casseliflavus* จะพบเฉพาะชนิด α-hemolysis

ตาราง 7 *Enterococcus* spp. **จำแนกตามชนิดของ** hemolysis **บน** human blood agar

สปีชีส์	**จำนวนสายพันธุ์**			**รวม**
	α-hemolysis	βhemolysis	Non-hemolysis	
E. faecalis	1	24	59	84
E. faecium	-	-	4	4
E. casseliflavus	2	-	-	2
E. hirae	-	-	1	1
Unclassified enterococci	4	-	2	6
รวม (%)	7(7.22)	24(24.74)	66(68.04)	97(100)

จากการเก็บข้อมูลแหล่งของ enterococci ที่นำมาศึกษาจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกชนิดต่างๆ พบว่า *E. faecalis* ซึ่งมีทั้งหมด 84 สายพันธุ์ สามารถแยกได้จากทุกสิ่งส่งตรวจและพบมากที่สุดในปัสสาวะ โดยพบจำนวน 42 สายพันธุ์ (50%) รองลงมาคือเนื้อเยื่อจากแผล พบจำนวน 13 สายพันธุ์ (15.47%) หนอง 11 สายพันธุ์ (13.10%) น้ำดี 5 สายพันธุ์ (5.95%) สารคัดหลั่งจากช่องคลอด 4 สายพันธุ์ (4.76%) เลือด 3 สายพันธุ์ (3.57%) น้ำจากการสวนล้างช่องท้อง 2 สายพันธุ์ (2.38%) นอกจากนี้สามารถแยกได้จากสิ่งส่งตรวจประเภทน้ำจากช่องไขสันหลัง น้ำจากช่องท้อง น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด และน้ำจากการล้างท่อหลอดลม อย่างละ 1 สายพันธุ์ สำหรับ *E. faecium* ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 4 สายพันธุ์ พบว่าแยกได้จากหนอง 1 สายพันธุ์ เลือด 1 สายพันธุ์ และจากน้ำไขสันหลัง 2 สายพันธุ์

ส่วน *E. casseliflavus* 2 สายพันธุ์ แยกได้จากหนองและเลือดอย่างละ 1 สายพันธุ์ และ *E. hirae* ซึ่งพบ 1 สายพันธุ์ แยกได้จากน้ำในช่องท้อง ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 จำนวนชนิดของ *Enterococcus* spp. ที่แยกได้จำแนกตามประเภทสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจ	จำนวนชนิดของสายพันธุ์ (%)					รวม
	E. faecalis	*E. faecium*	*E. casseliflavus*	*E. hirae*	Unclassified enterococci	
ปัสสาวะ	42 (50.00)	-	-	-	1	43
เนื้อเยื่อจากแผล	13 (15.47)	-	-	-	2	15
หนอง	11 (13.10)	1	1	-	2	15
เลือด	3 (3.57)	1	1	-	1	6
น้ำดี	5 (5.59)	-	-	-	-	5
สารคัดหลั่งจากช่องคลอด	4 (4.76)	-	-	-	-	4
น้ำจากช่องไขสันหลัง	1 (1.19)	2	-	-	-	3
น้ำจากการสวนล้างช่องท้อง	2 (2.38)	-	-	-	-	2
น้ำจากช่องท้อง	1 (1.19)	-	-	1	-	2
น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด	1 (1.19)	-	-	-	-	1
น้ำจากการล้างท่อหลอดลม	1 (1.19)	-	-	-	-	1
รวม (%)	84(100)	4	2	1	6	97

และเมื่อนำคุณสมบัติ hemolysis ของ *E. faecalis* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบมากที่สุด และให้ hemolysis บน human blood agar ทั้ง 3 ชนิด โดยนำมาจัดจำแนกตามประเภทสิ่งส่งตรวจ พบว่า *E. faecalis* 84 สายพันธุ์ ให้ β-hemolysis 24 สายพันธุ์ (28.57%) ส่วนใหญ่แยกได้จากปัสสาวะ โดยแยกได้จำนวน 13 สายพันธุ์ (15.48%) รองลงมาคือ เนื้อเยื่อจากแผล จำนวน 6 สายพันธุ์ (7.14%) แยกได้จากหนอง จำนวน 3 สายพันธุ์ (3.57%) จากน้ำดี จำนวน 1 สายพันธุ์ (1.19%) น้ำจากช่องไขสันหลัง จำนวน 1 สายพันธุ์ (1.19%) และ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ให้ α-hemolysis ซึ่งมีเพียง 1 สายพันธุ์ แยกได้จาก

เนื้อเยื่อจากแผล และไม่พบ hemolysis ทั้ง 2 ชนิดนี้จาก *E. faecalis* ที่แยกได้จากเลือด จากสิ่งส่งตรวจพวกสารคัดหลั่งจากช่องคลอด น้ำจากช่องท้อง น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด น้ำจากการล้างท่อหลอดลม สำหรับสายพันธุ์ที่ให้ non-hemolysis ซึ่งมีจำนวน 59 สายพันธุ์ (70.24%) แยกได้จากทุกสิ่งส่งตรวจ โดยแยกได้จากปัสสาวะมากที่สุด จำนวน 29 สายพันธุ์ (34.52%) รองลงมาคือ หนอง จำนวน 8 สายพันธุ์ (9.52%) เนื้อเยื่อจากแผล จำนวน 6 สายพันธุ์ (7.14%) และอื่นๆ ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 จำนวนสายพันธุ์ที่ให้ hemolysis แต่ละชนิดของ *E. faecalis* จำแนกตามประเภทสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจ	จำนวนสายพันธุ์ที่ให้ hemolysis (%)			รวม(%)
	α-hemolysis	βhemolysis	Non-hemolysis	
ปัสสาวะ	-	13 (15.48)	29 (34.52)	42 (50.00)
เนื้อเยื่อจากแผล	1 (1.19)	6 (7.14)	6 (7.14)	13 (15.47)
หนอง	-	3 (3.57)	8 (9.52)	11 (13.10)
เลือด	-	-	3 (3.57)	3 (3.57)
น้ำดี	-	1 (1.19)	4 (4.76)	5 (5.59)
สารคัดหลั่งจากช่องคลอด	-	-	4 (4.76)	4 (4.76)
น้ำจากช่องไขสันหลัง	-	1 (1.19)	-	1 (1.19)
น้ำจากการสวนล้างช่องท้อง	-	-	2 (2.38)	2 (2.38)
น้ำจากช่องท้อง	-	-	1 (1.19)	1 (1.19)
น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด	-	-	1 (1.19)	1 (1.19)
น้ำจากการล้างท่อหลอดลม	-	-	1 (1.19)	1 (1.19)
รวม (%)	1 (1.19)	24 (28.57)	59 (70.24)	84 (100)

จากการเก็บข้อมูลในแฟ้มประวัติผู้ป่วย พบว่าในการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดมีทั้งที่แยกได้ enterococci เพียงชนิดเดียว (pure culture) และที่แยกได้ร่วมกับเชื้ออื่น (mixed culture) ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 จำนวน enterococci ที่แยกได้เป็น pure และ mixed culture จำแนกตามประเภทของสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจ	จำนวนสายพันธุ์ (%)		รวม (%)
	pure culture	mixed culture	
ปัสสาวะ	12	31	43
เนื้อเยื่อจากแผล	3	12	15
หนอง	1	14	15
เลือด	2	4	6
น้ำดี	1	4	5
สารคัดหลั่งจากช่องคลอด	-	4	4
น้ำจากช่องไขสันหลัง	2	1	3
น้ำจากการสวนล้างช่องท้อง	2	-	2
น้ำจากช่องท้อง	1	1	2
น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด	-	1	1
น้ำจากการล้างท่อหลอดลม	1	-	1
รวม	25(25.77)	72(74.23)	97(100)

จากตารางพบว่า enterococci ที่แยกได้เป็น pure culture มีจำนวน 25 สายพันธุ์ (25.77%) และเป็น mixed culture มีจำนวน 72 สายพันธุ์ (74.23%) มีเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากน้ำจากการสวนล้างช่องท้อง และน้ำจากการล้างท่อหลอดลมเท่านั้นที่แยกได้ pure culture อย่างเดียว สำหรับ pure culture ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจประเภท เลือด น้ำจากช่องไขสันหลัง น้ำดี เนื้อเยื่อจากแผล หนอง น้ำจากการสวนล้างช่องท้อง น้ำจากช่องท้อง น้ำจากการล้างท่อหลอดลม พบน้อยประมาณสิ่งส่งตรวจละ 1-2 สายพันธุ์ ส่วน pure culture ที่แยกได้จากปัสสาวะพบมากที่สุด จำนวน 12 สายพันธุ์ คิดเป็น 12.37% ของจำนวน enterococci ทั้งหมด และคิดเป็น 27.91% ของตัวอย่างปัสสาวะ ขณะที่แยกได้เชื้ออื่นร่วม (mixed culture) 72.09% โดยพบ enterococci เป็นเชื้อเด่น (predominant) 80.65% และจากการเก็บข้อมูลพบว่า mixed culture ส่วนใหญ่เป็นพวก *Escherichia coli* มากที่สุด โดยพบจำนวน 19.59% รองลงมาคือ *Staphylococcus epidermidis* 15.46%, *Staphylococcus aureus* 13.40%, *Klebsiella pueumoniae* 8.25%, *Pseudomonas aeruginosa* 8.25%, *Acinetobacter baumannii* 6.19%, *Enterobacter cloacae* 6.19%,

Corynebacterium spp. 5.16% ตามลำดับ และอื่นๆ ซึ่งพบน้อยกว่า 5% ได้แก่ *Proteus mirabilis, Morganella morganii* และ *Gardnerella vaginalis* ซึ่ง mixed culture ที่พบส่วนใหญ่จะพบร่วม 1 ถึง 2 ชนิด และที่พบในปัสสาวะมากที่สุด คือ *E. coli* จำนวน 19.35% สำหรับ mixed culture ที่พบในเนื้อเยื่อจากแผล หนอง และน้ำดี ได้แก่ *E. coli, S. aureus, S. epidermidis, P. aeruginosa, K. pueumoniae* และ *E. cloacae* เป็นต้น ส่วนในเลือด mixed culture ที่พบ ได้แก่ *A. baumannii, K. pueumoniae* และ *S. epidermidis*

จากการเก็บข้อมูลแหล่งของ enterococci ที่แยกได้จากแผนกผู้ป่วยต่างๆ พบว่าแผนกผู้ป่วยที่ส่งสิ่งส่งตรวจซึ่งแยกได้ enterococci มากที่สุดคือ แผนกอายุรกรรม 28.87% รองลงมาคือ แผนกศัลยกรรม 26.80% แผนกกุมารเวชกรรม 11.34% แผนกสูติ-นรีเวช 11.33% หออภิบาลผู้ป่วย (ICU) 9.28% และแผนกอื่นๆ ซึ่งได้จัดจำแนก *Enterococcus* spp. ต่างๆ ที่พบในแต่ละแผนกผู้ป่วยดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ***Enterococcus*** **spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วยแผนกต่างๆ**

แผนกผู้ป่วย	จำนวนสายพันธุ์					รวม
	E. faecalis	*E. faecium*	*E. casseliflavus*	*E. hirae*	Unclassified enterococci	
อายุรกรรม	27	-	1	-	-	28
ศัลยกรรม	21	1	1	-	3	26
กุมารเวชกรรม	9	2	-	-	-	11
สูติ-นรีเวช	10	-	-	-	1	11
หออภิบาลผู้ป่วย	7	-	-	1	1	9
ศัลย์ประสาท	4	1	-	-	-	5
อุบัติเหตุ	3	-	-	-	-	3
ไฟไหม้และน้ำ-ร้อนลวก	2	-	-	-	-	2
หู คอ จมูก	1	-	-	-	-	1
ออร์โธปิดิกส์	-	-	-	-	1	1
รวม	84	4	2	1	6	97

จากตารางพบ *E. faecalis* มากที่สุดในแผนกอายุรกรรม 27 สายพันธุ์ รองลงมาคือแผนกศัลยกรรม 21 สายพันธุ์ แผนกสูติ-นรีเวช 10 สายพันธุ์ แผนกกุมารเวชกรรม 9 สายพันธุ์ ICU 7 สายพันธุ์ และแผนกอื่นๆ ยกเว้นแผนกออร์โธปิดิกส์ สำหรับ *E. faecium* 4 สายพันธุ์ พบในแผนกกุมารเวชกรรม 2 สายพันธุ์ แผนกศัลยกรรม 1 สายพันธุ์ และแผนกศัลย์ประสาท 1 สายพันธุ์ ส่วน *E. casseliflavus* 2 สายพันธุ์ พบในแผนกอายุรกรรมและศัลยกรรมอย่างละ 1 สายพันธุ์ และ *E. hirae* ซึ่งมี 1 สายพันธุ์ พบในหออภิบาลผู้ป่วย (ICU)

จากการศึกษาโดยการเก็บข้อมูลย้อนหลังในแฟ้มประวัติผู้ป่วยทั้งหมด 97 คน พบว่าเป็นผู้ป่วยเพศชาย 47 คน (48.45%) เพศหญิง 50 คน (51.55%) โดยพบในช่วงอายุตั้งแต่ 23 วัน ถึง 101 ปี อายุเฉลี่ยเท่ากับ 43.03 ปี และพบมากที่สุดในกลุ่มผู้สูงอายุ คือ พบช่วงอายุมากกว่า 60 ปี จำนวน 25 คน (25.77%) โดยพบในช่วงอายุ 71-80 ปี จำนวน 11 คน (11.34%) รองลงมาคือ ช่วงอายุ 41-50 ปี และ 51-60 ปี โดยพบจำนวน 14 คนเท่ากัน (14.43%) และพบว่าในช่วงอายุน้อยกว่า 3 ขวบ พบจำนวน 10 คน (10.31%) ส่วนในช่วงวัยเด็กและวัยรุ่นซึ่งมีอายุตั้งแต่ 3 ขวบถึง 20 ปี จะพบน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยพบอายุ 3-10 ขวบ 2.06% อายุ 11-20 ปี 7.22% สามารถแยก enterococci ได้จากกลุ่มผู้ป่วยภูมิต้านทานต่ำ เช่น โรคมะเร็ง โรคเลือด โรคเบาหวาน โรคไต โรคตับ เป็นต้น จำนวน 64 คน (66.67%)

ในกลุ่มผู้ป่วยที่แยก enterococci ได้จากปัสสาวะจำนวน 43 คน พบเป็นผู้ป่วยเพศหญิง 21 คน เพศชาย 22 คน โดยพบมากที่สุดในกลุ่มอายุมากกว่า 60 ปี จำนวน 22 คน (51.16%) รองลงมาคือช่วงอายุต่ำกว่า 3 ขวบ พบจำนวน 7 คน (16.28%) ทั้งนี้เป็นกลุ่มที่มีภาวะภูมิต้านทานต่ำ จำนวน 26 คน (60.47%) ได้รับการใส่สายสวนปัสสาวะจำนวน 15 คน (53.57%) ผู้ป่วยที่มีผลการเพาะเลี้ยง enterococci $\geq 10^5$ CFU/ml. มีจำนวน 28 คน (65.17%) และมีผลการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ชนิดเดียว (pure culture) 10^4 และ 10^3 CFU/ml มีจำนวน 3 และ 2 คน ตามลำดับ ในกลุ่มผู้ป่วยที่แยก enterococci ได้จากเนื้อเยื่อและหนองจากแผล ซึ่งพบว่ามักเป็นประเภทแผลกดทับ (bed sore) แผลผ่าตัด แผลอุบัติเหตุต่างๆ เป็นต้น และได้จากแผลในช่องท้อง น้ำดี และน้ำในช่องท้อง เนื่องจากผู้ป่วยได้รับบาดเจ็บ

ในช่องท้องจากอุบัติเหตุ ได้รับการผ่าตัดทางเดินน้ำดี ไส้ติ่งแตก ได้รับการสวนล้างช่องท้องในผู้ป่วยไตวาย เป็นต้น

ในกลุ่มผู้ป่วยที่แยก enterococci ได้จากกระแสเลือด 6 คน เป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคเลือด 5 คน โรคมะเร็งตับ 1 คน ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพชนิดฉีดทุกคนซึ่งต้องมีการคาสายสวนหลอดเลือด ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด 1 คน เป็นผู้ป่วยที่มีอาการหนักและเข้ารักษาในหออภิบาลผู้ป่วย 2 คน ซึ่งมักได้รับการรักษาที่ต้องใส่ท่อช่วยหายใจ สายสวนหลอดเลือดดำใหญ่ สายสวนปัสสาวะ และผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อนี้ในกระแสเลือดมีระยะเวลานอนในโรงพยาบาลนาน 14 วัน จากข้อมูลในแฟ้มผู้ป่วยไม่ได้ระบุชัดว่ามีผู้ป่วยเป็นโรค endocarditis จากการติดเชื้อนี้ในกระแสเลือด และในผู้ป่วยที่แยกเชื้อนี้ได้จากน้ำไขสันหลังพบในผู้ป่วยทารกอายุ 2 เดือน ซึ่งป่วยเป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และพบในผู้ป่วยที่ได้รับอุบัติเหตุบริเวณศีรษะและได้รับการผ่าตัดใส่สายในโพรงสมอง

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับประวัติของการได้รับยาต้านจุลชีพในการรักษามาก่อนที่จะแยกได้ enterococci ที่นำมาศึกษา พบว่าผู้ป่วยได้รับยากลุ่ม cephalosporins มาก่อนมีมากที่สุดคือ 47 คน (48.45%) โดยเฉพาะรุ่นที่ 3 รองลงมาคือกลุ่ม penicillins จำนวน 37 คน (38.14%) และยาในกลุ่ม aminoglycosides จำนวน 35 คน (36.08%) ซึ่งส่วนใหญ่ได้รับยา gentamicin มาก่อน สำหรับยาในกลุ่ม quinolones มีจำนวน 13 คน (13.40%) ยาที่ใช้ในกลุ่มนี้ได้แก่ norfloxacin, ciprofloxacin และ ofloxacin และพบว่ามีผู้ป่วยเพียง 1 คน เคยได้รับการรักษาด้วยยา vancomycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม glycopeptides มาก่อน ส่วนยาต้านจุลชีพอื่นๆ ที่ผู้ป่วยเคยได้รับส่วนใหญ่เป็นยา metronidazole 26.04% รองลงมาคือ imipenem 6.25% และ co-trimoxazole 6.25% สำหรับยา fosfomycin มีประวัติการได้รับมาก่อน 2.08%

2. ผลการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของ enterococci

2.1 ผลการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้แผ่นยามาตรฐาน (disk diffusion)

จากการนำ enterococci 97 ตัวอย่าง มาศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้แผ่นยามาตรฐาน 9 ชนิด คือ ampicilin, penicillin, gentamicin, streptomycin, vancomycin, teicoplanin, imipenem, fosfomycin และ ciprofloxacin พบว่า *E. faecalis* ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 84 สายพันธุ์ มีความไวต่อยา ampicillin และ penicillin 100% และ 94%

ตามลำดับ แต่ใน *E. faecium* ซึ่งมีจำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าดื้อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ทุกสายพันธุ์ ส่วนในสปีชีส์อื่นๆ เช่น *E. casseliflavus, E. hirae* และ unclassified enterococci พบว่ามีความไวต่อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ทุกสายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 12

ในการศึกษาความไวต่อยา gentamicin และ streptomycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycosides พบว่า enterococci ส่วนใหญ่มีความไวต่อยาต่ำ โดยพบว่า *E. faecalis* ไวต่อยา gentamicin และ streptomycin 17% และ 1% ตามลำดับ ใน *E. faecium* พบว่าไวต่อยา gentamicin 2 สายพันธุ์ และดื้อต่อยา streptomycin ทุกสายพันธุ์ ส่วน *E. casseliflavus* และ *E. hirae* พบว่าทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ สำหรับ unclassified enterococci ซึ่งมีจำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่ามีความไวต่อยา gentamicin 4 สายพันธุ์ และดื้อยา streptomycin ทุกสายพันธุ์

และสำหรับผลการศึกษาความไวต่อยา vancomycin และ teicoplanin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม glycopeptides ไม่พบ enterococci ที่ดื้อต่อยา vancomycin หรือ VRE และดื้อต่อยา teicoplanin โดยวิธี disk diffusion ซึ่งพบว่า *E. faecalis* ให้ผลการทดสอบอยู่ในช่วงไวปานกลางต่อยา vancomycin และ teicoplanin 30% และ 1% ตามลำดับ และมีความไวต่อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ 70% และ 99% ตามลำดับ ใน *E. faecium* พบว่าทุกสายพันธุ์ไวต่อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ เช่นเดียวกับในสปีชีส์ อื่นๆ

นอกจากนี้ในการศึกษาความไวต่อยา imipenem, fosfomycin และ ciprofloxacin พบว่า enterococci ส่วนใหญ่ มีความไวต่อยา fosfomycin และ imipenem ยกเว้นใน *E. faecium* ซึ่งพบว่ามีความไวต่อยาทั้ง 2 ชนิดนี้เพียง 1 สายพันธุ์ สำหรับยา ciprofloxacin พบว่า *E. faecalis* มีความไว 25% ใน *E. faecium* และ *E. casseliflavus* พบว่าดื้อต่อยานี้ทุกสายพันธุ์ ส่วน *E. hirae* และ unclassilfied enterococci พบว่าส่วนใหญ่ไวต่อยานี้

ตาราง 12 ความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp. จำนวน 97 สายพันธุ์ โดยวิธีวางแผ่นยามาตรฐาน

สปีชีส์ (จำนวน)	จำนวนสายพันธุ์ (%)								
	Am	Pn	Gm	Sm	Vm	Tec	Fm	Im	Cp
E. faecalis (84)									
S	84 (100)	79 (94)	14 (17)	1 (1)	59 (70)	83 (99)	79 (94)	83 (99)	21 (25)
I	0	0	10 (12)	0	25 (30)	1 (1)	5 (6)	0	21 (25)
R	0	5 (6)	60 (71)	83 (99)	0	0	0	1 (1)	31 (37)
E. faecium (4)									
S	0	0	2	0	4	4	1	0	0
I	0	0	0	0	0	0	1	0	1
R	4	4	2	4	0	0	2	4	3
E. casseliflavus (2)									
S	2	2	0	0	2	2	2	1	0
I	0	0	1	0	0	0	0	0	0
R	0	0	1	2	0	0	0	1	2
E. hirae (1)									
S	1	1	0	0	1	1	0	1	1
I	0	0	1	0	0	0	1	0	0
R	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Unclassified enterococci (6)									
S	6	6	4	0	6	6	4	6	4
I	0	0	1	1	0	0	1	0	2
R	0	0	1	5	0	0	1	0	0

หมายเหตุ : Am = Ampicillin, Pn = Penicillin, Gm= Gentamicin, Vm= Vancomycin, Tec = Teicoplanin, Fm = Fosfomycin, Im = Imipenem, Cp = Ciprofloxacin, S = Susceptible, I = Intermediate, R = Resistant

สรุปได้ว่า การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 9 ชนิด โดยวิธีแพร่ซึมโดยใช้แผ่นยามาตรฐาน enterococci ส่วนใหญ่มีความไวต่อยาพวกที่ออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ เช่น กลุ่ม β-lactams (ampicillin, penicillin และ imipenem) กลุ่ม glycopeptides (vancomycin และ teicoplanin) และยา fosfomycin ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดหนึ่งที่ออกฤทธิ์ในขั้นตอนแรกของการสร้างผนังเซลล์ แต่พบว่ามีความไวต่ำต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides (gentamicin และ streptomycin) และยากลุ่ม quinolones (ciprofloxacin)

2.2 **ผลการแยก** enterococci **ที่ดื้อยากลุ่ม** aminoglycosides **ในระดับสูงโดยวิธี** agar screening

จากการนำ enterococci ทั้ง 97 ตัวอย่าง มาศึกษาแยกเชื้อที่ดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง โดย screen แยกการดื้อยา gentamicin ในระดับสูง (HLGR) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 และ 1,000 μg/ml ใน BHIA พบเชื้อเจริญที่ความเข้มข้น 500 μg/ml 59 สายพันธุ์ (60.82%) และเจริญที่ความเข้มข้น 1,000 μg/ml 30 สายพันธุ์ (30.93%) ส่วนผลการ screen แยกการดื้อยา streptomycin ในระดับสูง (HLSR) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2,000 μg/ml พบเชื้อเจริญ 45 สายพันธุ์ (46.39%) และได้จำแนกผลการ screen การดื้อยาในระดับสูงตามสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของยา gentamicin 500 μg/ml และยา streptomycin 2,000 μg/ml ดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 การดื้อยา gentamicin **และ** streptomycin **ในระดับสูงของ** *Enterococcus* spp. 97 **สายพันธุ์ โดยวิธี** agar screening

สปีชีส์ (จำนวนทั้งหมด)	**จำนวนสายพันธุ์ที่ดื้อยา (%)**		
	Gentamicin ($\geq$ 500 μg/ml)	Streptomycin ($\geq$ 2,000 μg/ml)	Gentamicin& Streptomycin
E. faecalis (84)	56/84 (66.67)	40/84 (47.62)	32/84 (38.10)
E. faecium (4)	2	3	2
E. casseliflavus (2)	0	1	0
E. hirae (1)	1	0	0
Unclassified enterococci (6)	0	1	0
รวม (97)	59/97 (60.82)	45/97 (46.39)	34/97 (35.05)

จากตาราง enterococci ที่ดื้อยา gentamicin ในระดับสูง พบใน *E. faecalis* จำนวน 56 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 66.67% ของ *E. faecalis* ทั้งหมด 84 สายพันธุ์ และพบ β-hemolytic *E. faecalis* ดื้อยา gentamicin ในระดับสูง 18 สายพันธุ์ คิดเป็น 75% จากจำนวน β-hemolytic *E. faecalis* ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ รองลงมาคือ *E. faecium* พบ 2 ใน 4 สายพันธุ์ และ *E. hirae* พบ 1 สายพันธุ์ การดื้อยา streptomycin ในระดับสูง พบใน *E. faecalis* 40 สายพันธุ์ คิดเป็น 47.62% จากจำนวน *E. faecalis* ทั้งหมด รองลงมาคือ *E. faecium* พบ 3 ใน 4 สายพันธุ์ *E. casseliflavus* พบ 1 ใน 2 สายพันธุ์ และ unclassified enterococci พบ 1 ใน 6 สายพันธุ์ และสำหรับ enterococci ที่ดื้อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ในระดับสูงร่วมกัน พบใน *E. faecalis* 32 สายพันธุ์ คิดเป็น 38.10% ของจำนวน *E. faecalis* ทั้งหมด และพบใน *E. faecium* 2 สายพันธุ์ จากจำนวน 4 สายพันธุ์

2.3 ผลการแยก enterococci ที่ดื้อยา vancomycin โดยวิธี agar screening และผลการศึกษา MIC ของยา vancomycin และ teicoplanin โดยวิธี agar dilution

จากการนำ enterococci 97 ตัวอย่าง มาศึกษาแยก VRE โดยวิธี agar screening ที่ความเข้มข้นของยา vancomycin 6 μg/ml พบเชื้อเจริญที่ความเข้มข้นนี้ จำนวน 4 สายพันธุ์ (4.12%) ซึ่งเป็น *E. faecalis* ทั้งหมด และพบว่า VRE ที่แยกโดยวิธีนี้ให้ค่าไวปานกลางต่อยา vancomycin เมื่อทดสอบโดยวิธี disk diffusion ทั้ง 4 สายพันธุ์

จากการนำ enterococci ที่ทดสอบความไวต่อยา vancomycin และ teicoplanin แล้วให้ผลไวปานกลางโดยวิธี disk diffusion (เนื่องจากไม่พบสายพันธุ์ที่ดื้อยาโดยวิธีนี้) จำนวน 26 สายพันธุ์ และนำ VRE ที่แยกโดยวิธี agar screening ซึ่งเจริญที่ความเข้มข้นของยา vancomycin 6 μg/ml จำนวน 4 สายพันธุ์ รวมทั้งนำเชื้อที่ให้ผลไวต่อยาทั้ง 2 ชนิด โดยวิธี disk diffusion อีก 27 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 53 สายพันธุ์ มาศึกษา MIC ของยา vancomycin และ teicoplanin โดยวิธี agar dilution พบว่าค่า MIC ของยา vancomycin อยู่ในช่วง 1-4 μg/ml ค่า MIC ของยา teicoplanin อยู่ในช่วง 0.5-4 μg/ml ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงไวสำหรับ MIC ของ VRE ที่แยกได้โดยวิธี agar screening 4 สายพันธุ์ มีค่า MIC ของยา vancomycin 4 μg/ml จำนวน 3 สายพันธุ์ และ 2 μg/ml จำนวน 1 สายพันธุ์ นั่นคือ ผลจากการศึกษา MIC ไม่พบสายพันธุ์ที่ดื้อยา vancomycin และ teicoplanin

3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนการดื้อยาและรูปแบบพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis

จากผลการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ 9 ชนิด ได้นำเฉพาะผลที่ดื้อยา มาจัดแบบแผนของการดื้อยาแยกตามสปีชีส์ ต่างๆ ดังตาราง 14

จากตารางพบว่า *E. faecalis* มีแบบแผนการดื้อยาทั้งหมด 6 แบบแผน โดยดื้อยาตั้งแต่ 1 ถึง 4 ชนิด ทั้งนี้พบแบบแผน Gm-Sm มากที่สุดจำนวน 35 สายพันธุ์ รองลงมาคือแบบแผน Gm-Sm-Cp พบจำนวน 20 สายพันธุ์ และแบบแผน Sm พบจำนวน 16 สายพันธุ์ ใน *E. faecium* ทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่ามีการดื้อยา 5 ถึง 7 ชนิด โดยเฉพาะยา ampicillin จะพบการดื้อเฉพาะในสปีชีส์นี้เท่านั้น ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ให้แบบแผนการดื้อยาที่แตกต่างกันไป คือ Am-Pn-Sm-Fm-Im-Cp, Am-Pn-Gm-Sm-Im, Am-Pn-Sm-Fm-Im-Cp และ Am-Pn-Sm-Im-Cp ใน *E. casseliflavus* ซึ่งมี 2 สายพันธุ์ พบแบบแผนการดื้อยา 2 แบบแผน คือ Sm-Im-Cp และ Gm-Sm-Cp ใน *E. hirae* ซึ่งมี 1 สายพันธุ์ พบการดื้อยา Sm เพียงชนิดเดียว ส่วนใน unclassified enterococci 6 สายพันธุ์ พบแบบแผนการดื้อยา 3 แบบ คือ แบบแผน Gm-Sm และ Sm-Fm พบอย่างละ 1 สายพันธุ์ แบบแผน Sm พบ 3 สายพันธุ์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาที่ใช้ทดสอบ 2 สายพันธุ์ คือ *E. faecalis* 1 สายพันธุ์ และ unclassified enterococci 1 สายพันธุ์

ตาราง 14 แบบแผนการดื้อยาของ *Enterococcus* spp. 95 สายพันธุ์ โดยวิธีแพร่ซึมโดยใช้แผ่นยามาตรฐาน

Enterococcus spp.	แบบแผนการดื้อยา	จำนวน
E. faecalis (84)*	Pn-Gm-Sm-Cp	5
	Gm-Sm-Cp	20
	Gm-Sm	35
	Sm-Im	1
	Sm-Cp	6
	Sm	16
E. faecium (4)	Am-Pn-Gm-Sm-Fm-Im-Cp	1
	Am-Pn-Gm-Sm-Im	1
	Am-Pn-Sm-Fm-Im-Cp	1
	Am-Pn-Sm-Im-Cp	1
E. casseliflavus (2)	Sm-Im-Cp	1
	Gm-Sm-Cp	1
E. hirae (1)	Sm	1
Unclassified (6)*	Gm-Sm	1
	Sm-Fm	1
	Sm	3

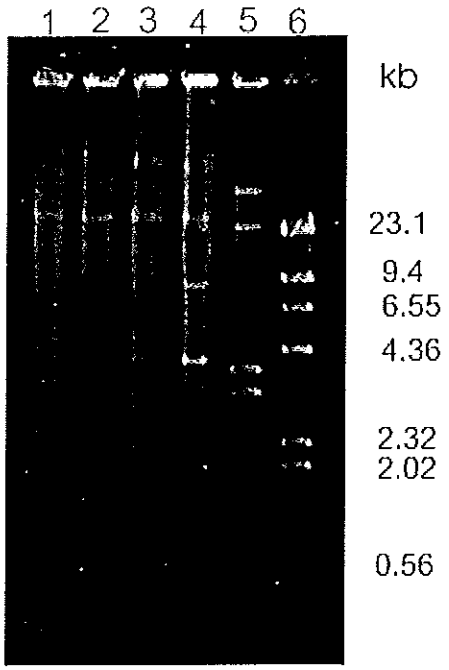
หมายเหตุ : Am = Ampicillin, Pn = Penicillin, Gm = Gentamicin, Sm = Streptomycin, Fm = Fosfomycin, Im = Imipenem, Cp = Ciprofloxacin

*รวมไม่ดื้อยาที่ใช้ทดสอบ 1 สายพันธุ์

จากการสกัดพลาสมิดของ enterococci ตามแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพของแต่ละสปีชีส์ พบว่าพลาสมิดที่สกัดได้มีหลายรูปแบบ บางรูปแบบพบเหมือนกันหลายสายพันธุ์ ใน *E. faecalis* ซึ่งมีแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ 6 แบบแผน มีรูปแบบพลาสมิดที่สกัดได้ 6 แบบ มีแถบพลาสมิดตั้งแต่ 1 ถึง 4 แถบ และไม่พบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างรูปแบบพลาสมิดและแบบแผนการดื้อยา แต่พบว่าในแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพเดียวกันอาจมีรูปแบบพลาสมิดได้หลายรูปแบบ ดังภาพประกอบ 3-5 ในแบบแผนการดื้อยาที่พบมากที่สุด คือ Gm-Sm พบรูปแบบพลาสมิด 2 รูปแบบ คือ มีแถบพลาสมิดเพียง 1 แถบที่ขนาดประมาณ 23 kb หรือ 9 kb (ภาพประกอบ 4) และในแบบแผนการดื้อยา Gm-Sm-Cp ซึ่งพบรองลงมา พบรูปแบบพลาสมิด 4 รูปแบบ คือ รูปแบบที่มีแถบพลาสมิด 1 แถบที่ขนาดประมาณ 23 kb รูปแบบที่มีแถบพลาสมิด 2 แถบ ที่ขนาดประมาณ 50 และ 23 kb รูปแบบที่มีแถบพลาสมิด 4 แถบ ที่ขนาดประมาณ 50,23,9, และ 4 kb รูปแบบพลาสมิดที่มีแถบพลาสมิด 4 แถบ ที่ขนาดประมาณ 40,23,4 และ 3 kb (ภาพประกอบ 3) เป็นต้น เมื่อเทียบแถบพลาสมิดที่สกัดได้กับขนาดของ λ*Hind* III และสำหรับสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบทั้ง 9 ชนิด ซึ่งมี 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์มาตรฐาน *E. faecalis* ATCC 25912 พบว่าไม่มีพลาสมิด แยกให้เห็น (ภาพประกอบ 5)

จากการศึกษารูปแบบพลาสมิด ของ *E. faecium* จำนวน 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีแบบแผนการดื้อยา 4 แบบ และเป็นแบบแผนที่มีการดื้อยาหลายชนิด พบว่ามีรูปแบบพลาสมิด 4 รูปแบบที่แตกต่างกัน โดยแยกแถบให้เห็นตั้งแต่ 2-9 แถบ ซึ่งมีขนาดให้เห็นตั้งแต่ ประมาณ 1 kb ถึง ประมาณ 50 kb (เมื่อเทียบกับ λ*Hind* III) จากการสังเกตพบว่าในสายพันธุ์ที่ดื้อยา ampicillin และ gentamicin มีแถบพลาสมิด 5-9 แถบ ดังภาพประกอบ 6

สำหรับสปีชีส์อื่นคือ *E. casseliflavus*, *E. hirae* และ unclassified enterococci ที่ดื้อยา พบว่าไม่มีพลาสมิดแยกให้เห็น

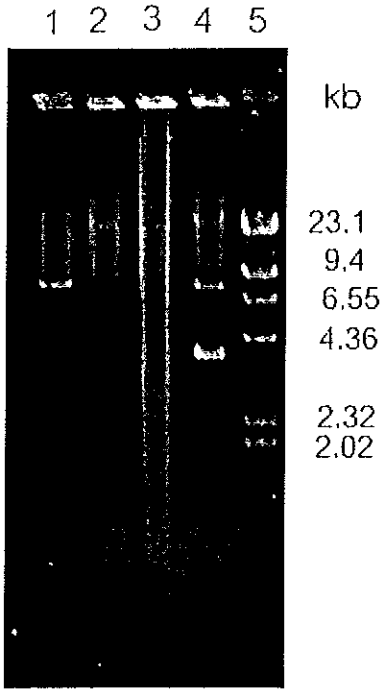


ภาพประกอบ 3 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* ใน 0.6% agarose gel

ช่องที่ 1 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Pn-Gm-Sm-Cp

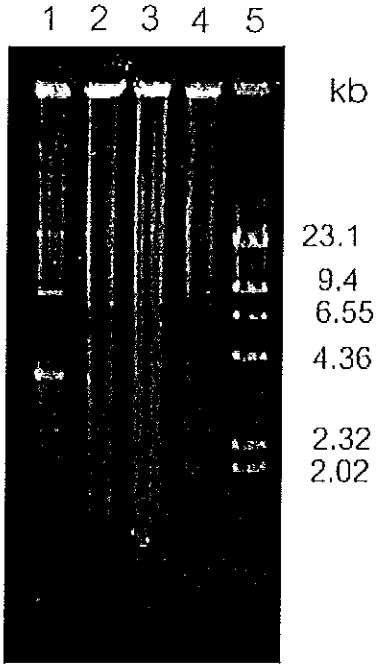
ช่องที่ 2-5 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Gm-Sm-Cp

ช่องที่ 6 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λHind III



ภาพประกอบ 4 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* ใน 0.6% agarose gel

ช่องที่ 1-2 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Gm-Sm
ช่องที่ 3 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Sm-Im
ช่องที่ 4 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Sm-Cp
ช่องที่ 5 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λHind III



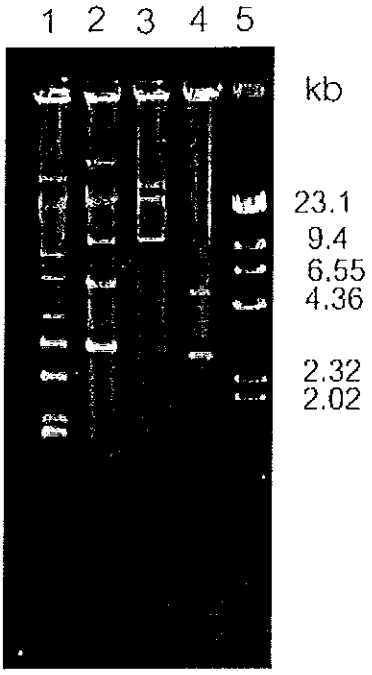
ภาพประกอบ 5 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* ใน 0.6% agarose gel

ช่องที่ 1-2 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Sm

ช่องที่ 3 รูปแบบพลาสมิดของสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยา

ช่องที่ 4 รูปแบบพลาสมิดของ *E.faecalis* ATCC 29212

ช่องที่ 5 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λHind III



ภาพประกอบ 6 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecium* ใน 0.6% agarose gel

ช่องที่ 1 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Am-Pn-Gm-Sm-Fm-Im-Cp

ช่องที่ 2 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Am-Pn-Gm-Sm-Im

ช่องที่ 3 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Am-Pn-Sm-Fm-Im-Cp

ช่องที่ 4 รูปแบบพลาสมิดของแบบแผนดื้อยา Am-Pn-Sm-Im-Cp

ช่องที่ 5 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λHind III

4. ผลการศึกษาแนวทางการทำ typing ของสายพันธุ์ที่ดื้อยา

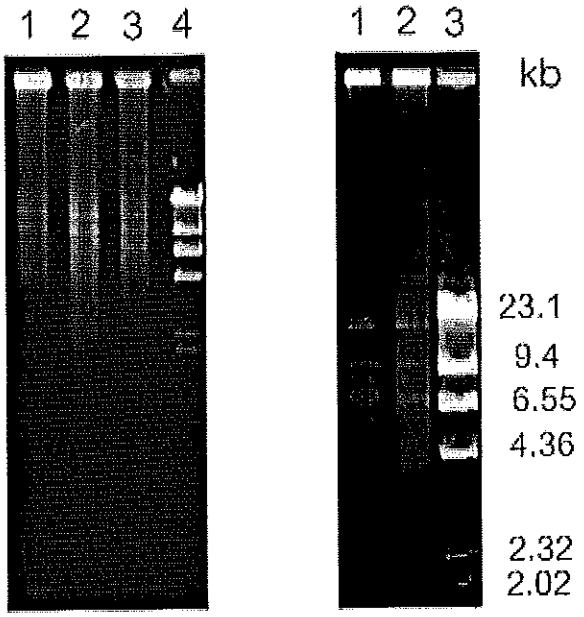
จากผลการศึกษาใน *E. faecalis* พบกลุ่มเชื้อที่มีรูปแบบพลาสมิดและมีแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพเหมือนกันหลายกลุ่ม ดังนั้นจึงได้นำผลการศึกษาชนิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง แบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี disk diffusion การดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง และรูปแบบพลาสมิด มาใช้เป็นแนวทางในการทำ typing สายพันธุ์ที่ดื้อยา เพื่อศึกษาติดตามการระบาดของสายพันธุ์ เช่น ใน non-hemolytic *E. faecalis* WK27 และ WK112 พบว่ามีแบบแผนการดื้อยา Gm-Sm-Cp และดื้อยา HLGR เหมือนกัน รวมทั้งมีรูปแบบพลาสมิดชนิด 4 แถบ คือ 40, 23, 4, 3 kb เหมือนกัน ดังภาพประกอบ 3 ในช่องที่ 4 ซึ่งแสดงว่า 2 สายพันธุ์นี้อาจเป็นสายพันธุ์เดียวกัน และพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยในหอผู้ป่วยเดียวกัน คือ หอผู้ป่วยศัลยกรรมชาย 1 (ศช.1) แม้ว่ามีระยะเวลาห่างกันประมาณ 2 เดือน ดังแสดงในตาราง 15 และใน non-hemolytic *E. faecalis* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ WK1, WK8, WK62 และ WK85 ซึ่งพบว่ามีแบบแผนการดื้อยา Pn-Gm-Sm-Cp และมีการดื้อยา HLGR และ HLSR เหมือนกัน และพบว่ามีรูปแบบพลาสมิดชนิด 1 แถบเหมือนกัน คือ 23 kb ดังภาพประกอบ 3 ในช่องที่ 1 และจากรูปแบบพลาสมิดที่มี 1 แถบ ทำให้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ไม่ได้ จึงได้นำพลาสมิดของ *E. faecalis* ทั้ง 4 สายพันธุ์ มาตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าให้รูปแบบที่เหมือนกัน ดังภาพประกอบ 7 โดยในภาพ 7 ก. เป็นสายพันธุ์ WK1, 62 และ 85 เมื่อตัดย่อยด้วย *Eco*RI ส่วนภาพ 7 ข. เป็นสายพันธุ์ WK8 และ 62 เมื่อตัดย่อยด้วย *Hind* III แสดงว่า *E. faecalis* ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้อาจเป็นสายพันธุ์เดียวกัน และพบว่า *E. faecalis* ทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าวแยกได้จากผู้ป่วยต่างหอผู้ป่วยกัน คือ หอผู้ป่วยอายุรกรรมหญิง (อญ.) หออภิบาลผู้ป่วย (ICU) หอผู้ป่วยอุบัติเหตุ และหอผู้ป่วยพิเศษอายุรกรรม-ศัลยกรรม (พิเศษ MS) และพบว่า 3 ใน 4 สายพันธุ์แยกได้จากปัสสาวะ ส่วนอีก 1 สายพันธุ์แยกได้จากเนื้อเยื่อจากแผล และช่วงเวลาที่แยกเชื้อมีระยะเวลาห่างกัน 2 เดือน ดังตาราง 15 เมื่อเก็บข้อมูลในแฟ้มประวัติพบว่ามีผู้ป่วยที่แยกได้สายพันธุ์ WK85 (No.85) เคยนอนรักษาตัวในหอผู้ป่วยเดียวกับผู้ป่วยที่แยกได้สายพันธุ์ WK1 (No.1) โดยนอนรักษาตัวนาน 18 วันก่อนส่งสิ่งส่งตรวจ และเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะเหมือนกัน โดยผู้ป่วย No.1 ส่งตรวจปัสสาวะขณะที่ใส่สายสวนปัสสาวะ (urinary catheter) และให้ผลการเพาะเชื้อ

มากกว่า 10^5 CFU/ml ส่วนผู้ป่วย No.85 ส่งตรวจปัสสาวะช่วงกลางของการขับถ่าย (Mid Stream Urine, MSU) และให้ผลการเพาะเชื้อ $7X10^4$ CFU/ml นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยทั้ง 4 คน จะมีระยะเวลาที่นอนรักษาตัวในโรงพยาบาลนาน 18-46 วัน ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่นอนรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นครั้งแรก ยกเว้นผู้ป่วย No.1 ซึ่งนอนรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นครั้งที่ 4 แต่มีระยะเวลาที่ห่างจากครั้งหลังสุดเกิน 1 ปี

ตาราง 15 จำแนก non-hemolytic *E. faecalis* สายพันธุ์ที่มีแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง และรูปแบบพลาสมิดเหมือนกัน

สายพันธุ์	หอผู้ป่วย*	สิ่งส่งตรวจ	วันที่	Hly	แบบแผนดื้อยา	HLGR	HLSR	รูปแบบพลาสมิด
WK27	ศช.1	urine cath	25/6/40	non	Gm-Sm-Cp	+	-	40,23,4,3
WK112	ศช.1	MSU	5/9/40	non	Gm-Sm-Cp	+	-	40,23,4,3
WK1	อญ.	urine cath	11/5/40	non	Pn-Gm-Sm-Cp	+	+	23
WK8	ICU	tissue	10/5/40	non	Pn-Gm-Sm-Cp	+	+	23
WK62	อุบัติเหตุ	urine cath	15/7/40	non	Pn-Gm-Sm-Cp	+	+	23
WK85	พิเศษ MS	MSU	14/7/40	non	Pn-Gm-Sm-Cp	+	+	23

หมายเหตุ : Hly = Hemolysis , HLGR = High Level Gentamicin Resistance,
HLSR = High Level Streptomycin Resistance, MUS = Mid Stream Urine
* ศช.1 = ศัลยกรรมชาย 1, อญ. = อายุรกรรมหญิง, ICU = หออภิบาลผู้ป่วย,
พิเศษ MS = พิเศษอายุรกรรม-ศัลยกรรม



ก. ข.

ภาพประกอบ 7 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* ซึ่งมีแบบแผนดื้อยา Pn-Gm-Sm-Cp หลังตัดย่อยด้วย *Eco*RI ภาพ ก. และ *Hind* III ภาพ ข.

ภาพ ก. ช่องที่ 1 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* WK1

ช่องที่ 2 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* WK62

ช่องที่ 3 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* WK85

ช่องที่ 4 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λ *Hind* III

ภาพ ข. ช่องที่ 1 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* WK8

ช่องที่ 2 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* WK62

ช่องที่ 3 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λ *Hind* III

5. **ผลการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยวิธี** conjugation

5.1 ผลการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา gentamicin **ระหว่าง** *Enterococcus* spp.

จากการ mating โดยใช้ตัวให้ คือ *E. faecalis* จำนวน 10 สายพันธุ์ และตัวรับ คือ *E. faecium* 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะ phenotypes และรูปแบบพลาสมิด ดังแสดงในตาราง 16 พบว่ามีตัวให้เพียง 2 สายพันธุ์ ที่สามารถถ่ายทอดการดื้อยา gentamicin ได้คือ ระหว่าง *E. faecalis* WK8 และ *E. faecalis* WK62 สามารถถ่ายทอดให้กับ *E. faecium* WK67 ได้เฉพาะวิธี filter mating โดยมีอัตราส่วนตัวให้ต่อตัวรับ 1 ต่อ 10 ซึ่งมีความถี่ในการถ่ายทอด $2.5X10^{-7}$/donor และ $2.75X10^{-7}$/donor ตามลำดับ และให้โคโลนีสีเหลืองเหมือนตัวรับ ดังภาพประกอบ 8 และ 9 และพบว่าสามารถถ่ายทอดการดื้อยา gentamicin ในระดับสูงได้โดยให้ค่า MIC >500 μg/ml เมื่อนำมาศึกษารูปแบบพลาสมิด พบรูปแบบที่คล้ายกับตัวรับ และมีแถบพลาสมิดที่ตรงกับขนาดประมาณ 23 kb เพิ่มขึ้นมา ดังภาพประกอบ 10 และเมื่อตัดย่อยด้วย *Eco*RI และ *Hind* III พบว่าแถบพลาสมิดซึ่งมีขนาดประมาณ 23 kb ที่พบในตัวให้ทั้ง 2 สายพันธุ์ และ transconjugants สามารถตัดย่อยได้ และให้รูปแบบที่มีส่วนคล้ายกัน ส่วนสายพันธุ์ตัวให้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถตัดย่อยพลาสมิดได้ ดังภาพประกอบ 11 ก. และ 11 ข. ตามลำดับ

5.2 ผลการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา gentamicin **ระหว่าง** *Enterococcus* spp. **กับ** *Escherichia coli* DH5αF$'$ **และ** *Escherichia coli* ATCC 25922

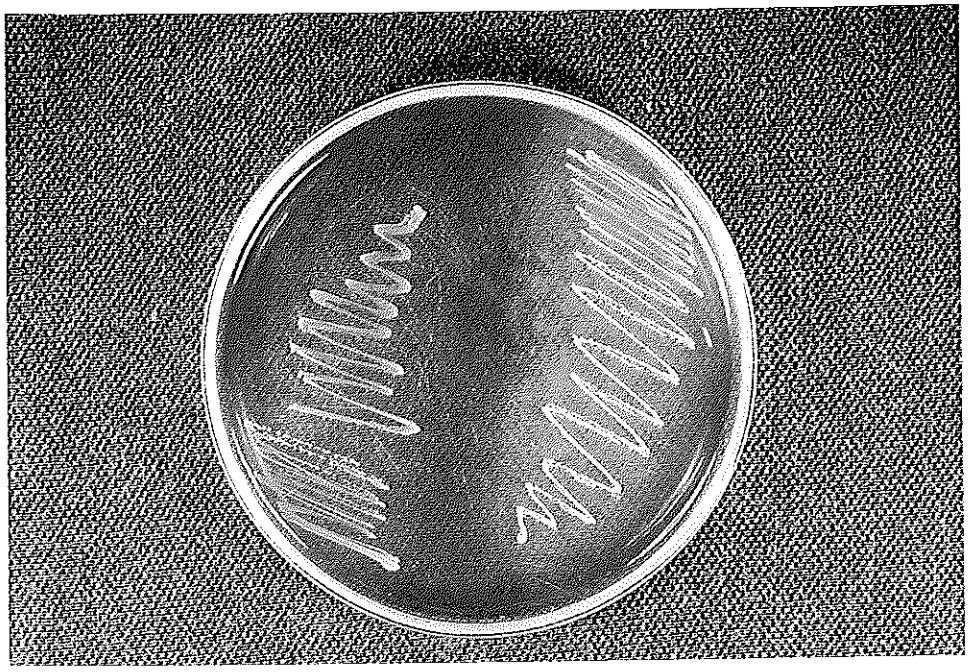
จากการ mating โดยใช้ตัวให้ คือ *E. faecalis* 10 สายพันธุ์ และตัวรับ คือ *E. coli* DH5αF$'$ และ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งมีลักษณะ phenotypes ดังแสดงในตาราง 16 พบว่าไม่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยา gentamicin ให้กับ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ทั้งวิธี filter และ broth mating

ตาราง 16 ลักษณะ phenotypes และรูปแบบพลาสมิดของ donors, recipients และ transconjugants

สปีชีส์	แบบแผนการดื้อยา*	HLGR	การหมักน้ำตาล Arabinose	Hemolysis	รูปแบบพลาสมิด
Donors					
E. faecalis WK99	Gm-Sm	+	—	Non	23
E. faecalis WK69	Gm-Sm	+	—	Non	23
E. faecalis WK37	Gm-Sm	+	—	Non	9
E. faecalis WK46	Gm-Sm	+	—	Non	23
E. faecalis WK92	Gm-Sm-Cp	+	—	β	50,23
E. faecalis WK77	Gm-Sm-Cp	+	—	β	50,23,9,4
E. faecalis WK43	Gm-Sm-Cp	+	—	Non	50,23
E. faecalis WK5	Gm-Sm-Cp	+	—	Non	23
E. faecalis WK62	Pn-Gm-Sm-Cp	+	—	Non	23
E. faecalis WK8	Pn-Gm-Sm-Cp	+	—	Non	23
Recipients					
E. faecium WK65	Am-Pn-Sm-Fm-Im-Cp	—	+	Non	30,23,9
E. faecium WK67	Am-Pn-Sm-Im-Cp	—	+	Non	5,3
Escherichia coli DH5αF′	Pn	—	+	ND	50,23
Escherichia coli ATCC 25922	Pn-Fm	—	+	ND	50,23,6.5, 2.3,1
Transconjugants					
E. faecium WK8/67	Am-Pn-Gm-Sm-Im-Cp	+	+	Non	23,5,3
E. faecium WK62/67	Am-Pn-Gm-Sm-Im	+	+	Non	23,5,3

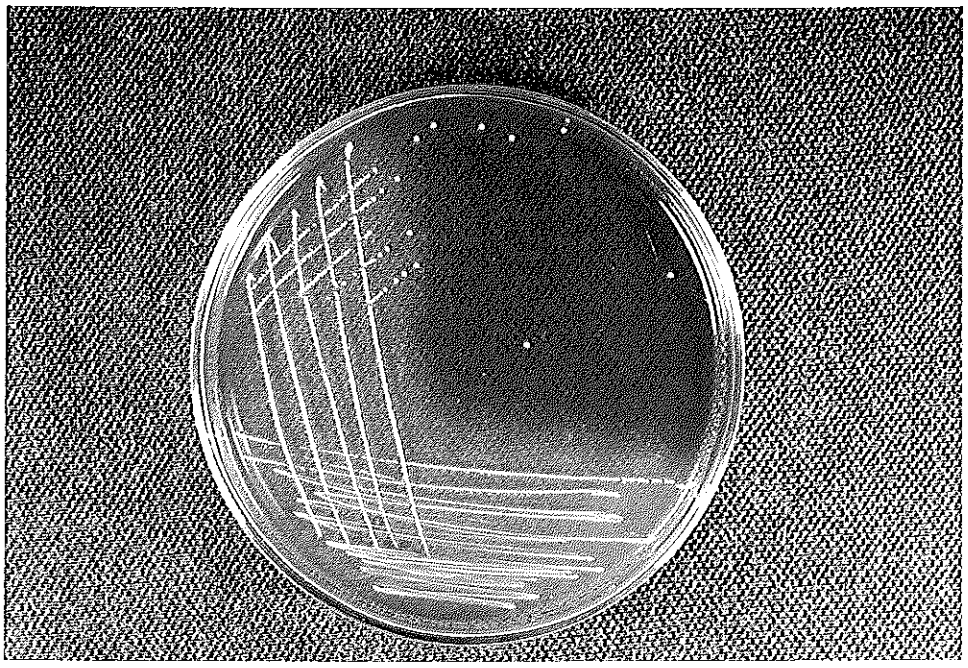
หมายเหตุ : HLGR = High-Level Gentamicin Resistance, ND = not detect

*วิธี disk diffusion

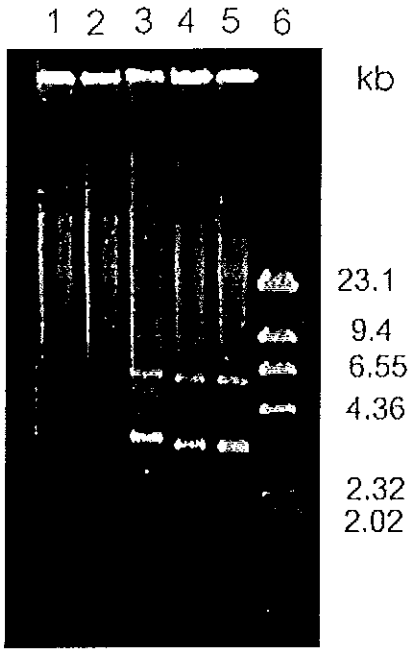


Donor Recipient

ภาพประกอบ 8 การเจริญของ *E. faecalis* WK 8 (donor) และ *E. faecium* WK 67 (recipient) บน BHIA ที่เติม arabinose



ภาพประกอบ 9 โคโลนีของ transconjugant บน BHIA ที่เติมน้ำตาล arabinose



ภาพประกอบ 10 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* (donor), *E. faecium* (recipient) และ transconjugants ใน 0.7% agarose gel

ช่องที่ 1 *E. faecalis* WK8 (donor)

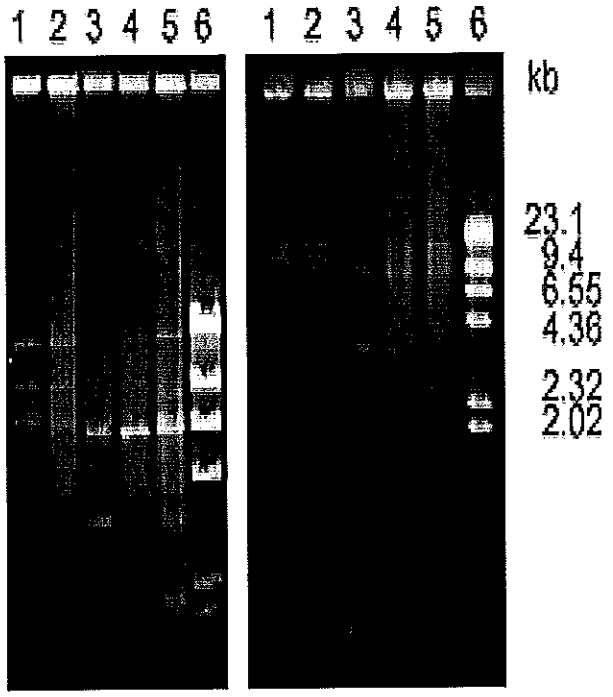
ช่องที่ 2 *E. faecalis* WK62 (donor)

ช่องที่ 3 *E. faecium* WK67 (recipient)

ช่องที่ 4 transconjugant WK8/67

ช่องที่ 5 transconjugant WK62/67

ช่องที่ 6 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λHind III



ก. ข.

ภาพประกอบ 11 รูปแบบพลาสมิดของ *E. faecalis* (donors), *E. faecium* (recipient) และ transconjugants ใน 0.7% agarose ที่ตัดย่อยด้วย *Eco*RI ภาพ ก. และตัดย่อยด้วย *Hind* III ภาพ ข.

ช่องที่ 1 *E. faecalis* WK8 (donor)

ช่องที่ 2 *E. faecalis* WK62 (donor)

ช่องที่ 3 *E. faecium* WK67 (recipient)

ช่องที่ 4 transconjugant WK8/67

ช่องที่ 5 transconjugant WK62/67

ช่องที่ 6 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน λ *Hind* III

บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. การศึกษาจำแนก *Enterococcus* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วย

จากผลการศึกษาจำแนกสปีชีส์ของ enterococci โดยใช้คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและสรีรวิทยา พบว่าสามารถจำแนกได้ *E. faecalis* มากที่สุด 86.60% รองลงมาคือ *E. faecium* 4.12%, *E. casseliflavus* 2.06%, *E. hirae* 1.03% และไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้ 6.19% ซึ่งในการศึกษาจำแนกสปีชีส์ของ enterococci ที่แยกได้จากผู้ป่วยไม่พบรายงานในประเทศไทยมาก่อน โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการจำแนกต้องทดสอบคุณสมบัติอย่างน้อย 10 การทดสอบ จึงอาจไม่เหมาะกับการปฏิบัติเป็นงานประจำในโรงพยาบาล และแม้ว่าสามารถใช้เครื่องอัตโนมัติในการจำแนกสปีชีส์ แต่ต้องคำนึงถึงความจำเป็นและประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วย สำหรับผลการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลคล้ายกับการศึกษาอื่นซึ่งพบ *E. faecalis* 80-90% รองลงมาคือ *E. faecium* 5-10% และพบน้อยกว่า 5 % ในสปีชีส์อื่นๆ นอกจากนี้พบว่าสปีชีส์ที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีรายงานการก่อโรคในคนมาก่อนทั้งสิ้น (Facklam and Collin, 1989 ; Ike, Hashimoto and Clewell, 1987 ; Gordon, *et al.*, 1992 ; McNamara, King and Smyth, 1995 ; Vandamme, *et al.*, 1996) ซึ่งต่างจากคนปกติที่มีสุขภาพสมบูรณ์จะพบ *E. faecium* ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง 40-80% ส่วน *E. faecalis* พบ 20-40% (Noble, 1978 ; Ike, Hashimoto and Clewell, 1987)

สำหรับ enterococci ที่ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้เนื่องจากให้ผลการทดสอบไม่ตรงตามแบบแผน ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ได้ และบางสายพันธุ์ให้สารสีเหลือง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มักเป็นปัญหาในการบ่งชี้ (Vincent, *et al.*, 1991) นอกจากนี้การใช้แบบแผนทางชีวเคมีและสรีรวิทยาแปลผลจากลักษณะที่แสดงออกทาง phenotypes อาจให้ผลที่ไม่แน่นอน (Teiweira, *et al.*, 1995) จึงต้องอาศัยการศึกษาโครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ที่ซับซ้อนและละเอียดขึ้น เช่น การเชื่อมต่อของกรดอะมิโนใน peptidoglycan แบบแผนโปรตีนทั้งหมดของเซลล์หรือศึกษาแบบแผนของ PBP โดยวิธี PAGE นอกจากนี้อาจศึกษาความคล้ายคลึงของ DNA และ RNA โดยการทำ hybridization และอาจประยุกต์ใช้

วิธี PCR ในการศึกษา (Schliefer and Kilpper-Balz, 1984 ; Vincent, *et al.*, 1991 ; Teixeira, *et al.*, 1995 ; Vandamme, *et al.*, 1996 ; Dutka-Malen, Evers and Courvalin, 1995 ; Tyrrell, *et al.*, 1997)

จากผลการศึกษาคุณสมบัติ hemolysis บน human blood agar พบ β-hemolysis 24.74% และ α-hemolysis 7.22% โดยสายพันธุ์ที่ให้ β-hemolysis เป็น *E. faecalis* ทั้งหมด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) ที่พบ hemolysis 55% เฉพาะใน *E. faecalis* ทั้งนี้อาจเนื่องจาก hemolysin ถูกควบคุมโดยยีนซึ่งอยู่บนพลาสมิดที่ถ่ายทอดโดยระบบ pheromone (Clewell, 1993) โดยพบ β-hemolytic *E. faecalis* จากเนื้อเยื่อจากแผล 46.15% ปัสสาวะ 30.95% หนอง 27.27% น้ำดี 20% น้ำไขสันหลัง 1 สายพันธุ์ และไม่พบในเลือดคล้ายกับการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) ที่พบในเลือด 1 สายพันธุ์ และพบมากในเสมหะ หนอง ปัสสาวะ สารคัดหลั่งจากช่องคลอด 50-80% แตกต่างจากการศึกษาของ Libertin, Dumitru และ Stein (1992) ซึ่งพบ hemolytic *E. faecalis* 20% โดยพบมากในเลือด 40% ปัสสาวะและแผลประมาณ 20% ไม่พบในเสมหะและสารคัดหลั่งจากช่องคลอด hemolysin อาจมีส่วนทำให้เกิดโรคติดเชื้อในคนได้ เนื่องจากมีรายงานว่า hemolysin เป็นปัจจัยความรุนแรงที่มีผลให้เกิดการติดเชื้อในช่องท้องของหนู (Dupont, *et al.*, 1998) และโพรงตาอักเสบในกระต่าย (Jett, *et al.*, 1992) การศึกษา hemolysis ในครั้งนี้ได้ใช้เลือดคนเนื่องจากมีข้อดีคือสามารถให้ hemolysis ได้เร็วและให้ผลบวกมากกว่าเลือดสัตว์อื่น (Ike, Hashimoto and Clewell, 1987 ; Facklam and Sahm, 1995 ; Libertin, Dumitru and Stein, 1992) แต่ข้อเสียของเลือดคนคือ อาจมีการตกค้างของยาต้านจุลชีพหรือสารอื่น

จากการจำแนกข้อมูลแหล่งที่พบ พบว่าแยกเชื้อได้จากปัสสาวะมากที่สุด 44.43% รองลงมาคือ เนื้อเยื่อจากแผลและหนอง 15.46% เท่ากัน แยกได้จากเลือด 6.19% น้ำดี 5.15% และอื่นๆ ซึ่งพบน้อยกว่า 5% ได้แก่สารคัดหลั่งจากช่องคลอด น้ำจากช่องไขสันหลัง น้ำจากการสวนล้างช่องท้อง น้ำจากช่องท้อง น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด และน้ำจากการล้างท่อหลอดลม ซึ่งให้ผลคล้ายกับการศึกษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์จากข้อมูลปี พ.ศ. 2528-2529 (สุเทพ และ สินีนาฏ, 2531) และการศึกษาอื่น (Ike, Hashimoto and Clewell 1987 ; Gordon, 1992 ; McNamara, King and Smyth, 1995) โดยแยก enterococci ได้

จากปัสสาวะประมาณ 50-60% รองลงมาคือ จากแผลประมาณ 10-20% เลือดประมาณ 2-10% และอื่นๆ ซึ่งพบน้อย ในการศึกษานี้พบการกระจายของสปีชีส์ทั่วร่างกายเช่นเดียวกับการศึกษาอื่น (Gordon, *et al.*, 1992 ; Ike, Hashimoto and Clewell, 1987)

โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะเป็นโรคที่พบบ่อยเป็นอันดับที่ 1 ของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) โดยมีรายงานพบ enterococci เป็นสาเหตุลำดับที่ 2 รองจาก *E. coli* (Herwaldt and Wenzel, 1995) ในการศึกษานี้พบการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะมากที่สุดในกลุ่มผู้สูงอายุมากกว่า 60 ปี จำนวน 51.16% รองลงมาคือ พบในเด็กอายุต่ำกว่า 3 ขวบ จำนวน 16.28% โดยพบในผู้ป่วยเพศหญิงใกล้เคียงกับเพศชาย ทั้งนี้อาจขึ้นกับสภาพร่างกายที่อ่อนแอและมีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ และพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะมีภาวะภูมิต้านทานต่ำ 60.47% และได้รับการใส่สายสวนปัสสาวะ 53.57% ซึ่งมีอัตราใกล้เคียงกับการศึกษาของ Gordon และคณะ (1992) ที่พบผู้ป่วยได้รับการใส่สายสวนปัสสาวะ 43% เนื่องจาก enterococci เป็น normal flora ของลำไส้และบริเวณช่องคลอด จึงอาจเกิดการปนเปื้อนเข้าไปในทางเดินปัสสาวะได้ง่าย และการศึกษานี้พบผู้ป่วยเด็กที่มีความผิดปกติของท่อปัสสาวะ 1 ราย ซึ่งตรงกับการรายงานของ Murray (1990) ที่พบการติดเชื้อนี้ในผู้ป่วยเด็กแบบนี้ สำหรับสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *E. faecalis* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ike, Hashimoto และ Clewell (1987) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสร้าง pheromone ทำให้เกิด aggregation ต่อท่อไต (Kreft, *et al.*, 1992) หรือแบคทีเรียอาจสร้าง adhesin เพื่อช่วยในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุของทางเดินปัสสาวะ (Johnson, 1994)

จากการศึกษานี้แม้ว่าจะให้ผลการเพาะเชื้อที่พบเฉพาะ enterococci อย่างเดียว (pure culture) ในปัสสาวะเพียง 28% แต่ก็พบ enterococci เป็นเชื้อเด่น ถึง 80.65% และพบมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะตามเกณฑ์ของ CDC ปี ค.ศ. 1988 (Garner, *et al.*, 1988) 76.79% ของตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด ส่วนในตัวอย่างที่แยกได้ mixed culture พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะอาจเกิดจากเชื้ออื่นด้วย เช่น *E.coli* ซึ่งพบร่วมกับ enterococci ในรายงานนี้ถึง 19.35% และคล้ายกับการรวบรวมข้อมูลของ Murray (1990) ที่พบ *E. coli* ร่วมกับ enterococci ในปัสสาวะมากที่สุด 15-36% อาจเนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อจากลำไส้

ในการศึกษานี้พบการติดเชื้อ enterococci บริเวณแผลต่างๆ เช่น แผลกดทับ แผลจากอุบัติเหตุ แผลผ่าตัด และแผลในช่องท้อง รองจากทางเดินปัสสาวะ ซึ่งอาจเป็นการติดเชื้อแบบ endogenous โดยเชื้อจากลำไส้ในกรณีมีการบาดเจ็บของช่องท้องจากอุบัติเหตุไส้ติ่งแตก และจากการผ่าตัดทางเดินน้ำดี เป็นต้น หรืออาจเป็นการติดเชื้อแบบ exogenous จากผู้ป่วยอื่นโดยเฉพาะแผลภายนอก การติดเชื้อส่วนใหญ่พบเป็น mixed culture (83.78%) โดยมักพบร่วมกับ *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, S. epidermidis, K. pneumoniae* และ *E. cloacae* เป็นต้น และไม่มีรายงานการติดเชื้อ anaerobes ร่วม อาจเนื่องจากไม่มีการส่งตรวจและเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงยาก เช่นการรายงานของ Moellering (1992) ที่พบการติดเชื้อ enterococci ร่วมกับกลุ่ม enterobacteria และ anaerobes

ส่วนการติดเชื้อ enterococci ในกระแสเลือดในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลือดเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดและยาต้านจุลชีพ และมีอาการรุนแรงซึ่งได้รับการรักษาที่ต้องใส่ท่อช่วยหายใจ สายสวนหลอดเลือดดำใหญ่ สายสวนปัสสาวะ และมีระยะเวลานอนในโรงพยาบาลนาน เช่นเดียวกับรายงานของ Linden (1998) และ Murray (1990) และจากข้อมูลในแฟ้มผู้ป่วยไม่ได้ระบุชัดว่าผู้ป่วยเป็นโรค endocarditis ซึ่งอาจพบได้จากการติดเชื้อนี้ในกระแสเลือด (Megran, 1992)

นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อระบบประสาทส่วนกลางจาก enterococci โดยทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกเกิดอายุ 2 เดือน และพบในผู้ป่วยที่ได้รับอุบัติเหตุบริเวณศีรษะและได้รับการผ่าตัดใส่สายในโพรงสมอง เช่นเดียวกับการรายงานของ Murray (1990)

2. การศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp.

ในการศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพของ enterococci ครั้งนี้ พบการระบาดของ enterococci ที่ดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูง โดยพบ HLGR 60.82% และพบ HLSR 46.39% ซึ่งการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูงไม่เคยมีรายงานในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์มาก่อน แต่มีรายงานในโรงพยาบาลรามาธิบดี โดย Murray, Tsao และ Panida (1983) ซึ่งขณะนั้นพบ HLGR 14% และ HLSR 50% และในโรงพยาบาลศิริราช โดยวิษณุ ธรรมลิขิตกุล และสุรภี พฤกษชาติ (2533) โดยพบ HLGR 44.5% และ HLSR 76% และ

เมื่อเทียบกับการศึกษาจากแหล่งอื่น เช่น ในสหรัฐอเมริกาพบการดื้อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ในระดับสูงประมาณ 20 % (Jones, *et al.*, 1995) ในแถบยุโรปพบ HLGR 7-9% และ HLSR 20-50% (McNamara, King and Smyth, 1995 ; Vandamme, *et al.*, 1996) ซึ่งในการศึกษานี้มีเปอร์เซ็นต์ของการดื้อยากลุ่มนี้ที่สูงกว่าโดยเฉพาะการดื้อยา gentamicin ในระดับสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการใช้ยา gentamicin ในการรักษามากขึ้น ทำให้เกิด selective pressure หรืออาจเนื่องจากปัจจุบันมีการกำหนดค่า MIC ที่ต่ำลง คือ >500 μg/ml จากเดิมที่เคยใช้ความเข้มข้นของยา $\geq$2,000 μg/ml จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบเชื้อดื้อยานี้มากกว่าการศึกษาก่อน ส่วนการดื้อยา streptomycin ในระดับสูงในการศึกษานี้มีเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงกว่าการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้ อาจเนื่องจากมีการใช้ยา streptomycin ที่ลดลง ทั้งนี้เมื่อศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพ พบว่าการศึกษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ครั้งนี้มีการใช้ยากลุ่ม aminoglycosides ในการรักษามาก่อน 36.08% โดยเฉพาะยา gentamicin และไม่พบการใช้ยา streptomycin ในการรักษา ส่วนการใช้ยากลุ่ม cephalosporin พบการใช้ยามาก่อน 48.45% โดยเฉพาะ cephalosporin รุ่นที่ 3 ซึ่งอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides (Zervos, *et al.*, 1986) ในการศึกษาอื่นที่กล่าวมาไม่ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณการได้รับยาต้านจุลชีพมาก่อน นอกจากนี้พบว่าอาจมีความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงกับการดื้อยา ciprofloxacin เนื่องจากพบการดื้อยา ciprofloxacin 37.11% ซึ่งพบในเปอร์เซ็นต์ที่สูงรองจากยากลุ่ม aminoglycosides เช่นเดียวกับการศึกษาของ Vandamme และคณะ (1996) ซึ่งพบความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยากลุ่มนี้ในระดับสูงกับการดื้อยา ciprofloxacin โดยพบการดื้อยา ciprofloxacin 11.4% ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ที่น้อยกว่าการศึกษานี้และพบว่ามีการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงน้อยกว่าในการศึกษานี้ด้วย หรืออาจเป็นไปได้ที่เชื้อดื้อยากลุ่มนี้จะถูกคัดเลือกโดยการใช้ยา ciprofloxacin (Leclercq, 1997)

ในการศึกษานี้พบการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงได้ในทุกสปีชีส์ เนื่องจากเป็นการดื้อยาแบบ acquired ไม่มีสปีชีส์เฉพาะ ซึ่งตรงกับรายงานอื่นๆ (Gordon, *et al.*, 1992 ; Sahm and Gilmore, 1994 ; Jones, *et al.*, 1995 ; McNamara, *et al.*,1995 ; Straut, Cespedes, and Horaud, 1996 ; Vandamme, *et al.*, 1996 ; Tsai, *et al.*, 1998)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ทดสอบยากลุ่ม aminoglycosides เฉพาะ gentamicin และ streptomycin เนื่องจากส่วนใหญ่ถ้าดื้อยา gentamicin ในระดับสูง มักพบการดื้อยา aminoglycosides อื่นด้วย ยกเว้น streptomycin ที่มีกลไกการดื้อยาที่ต่างกันออกไป (Leclercq, 1997 ; Leclercq, *et al.*, 1992) และจากการศึกษาพบเชื้อดื้อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ในระดับสูงร่วมกัน 35.05% และพบการดื้อยาชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่า ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากมีกลไกการดื้อยาที่ต่างกันและมียีนที่ควบคุมการดื้อยาต่างกัน เช่น การศึกษาของ Thal และคณะ (1993) พบ *E. faecalis* ที่ดื้อยา gentamicin ในระดับสูงแต่ไม่พบการดื้อยา streptomycin ในระดับสูงร่วม

ในการศึกษาครั้งนี้พบ enterococci ดื้อยาในกลุ่ม β-lactams ในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำ โดยพบเชื้อดื้อยา ampicillin 4.12%, penicillin 9.27% และ imipenem 6.18% ส่วนใหญ่พบใน *E. faecium* โดยเฉพาะการดื้อยา ampicillin ไม่พบในสปีชีส์อื่น ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาใกล้เคียงกับการศึกษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (สุเทพ และ สินีนาฏ, 2531) และโรงพยาบาลศิริราช (วิษณุ และ สุรภี, 2533) แต่ไม่ได้จำแนกสปีชีส์ที่ดื้อยา ซึ่งอาจเป็นสปีชีส์ *E. faecium* เช่นเดียวกับการศึกษาในสหรัฐอเมริกาและยุโรปที่พบ enterococci ดื้อยา ampicillin 2-17% และดื้อยา penicillin 3-16% และพบมากใน *E. faecium* โดยพบการดื้อยาทั้ง 2 ชนิดนี้อย่างละ 50-60% และพบมากในกระแสเลือด (Jones, *et al.*, 1995 ; Vandamme, *et al.*, 1996 ; McNamara, King, and Smyth, 1995) จากการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยากลุ่ม cephalosporins มาก่อนมากที่สุด 48.45% โดยเฉพาะพวก cephalosporin รุ่นที่ 3 และได้ยากลุ่ม penicillins มาก่อน 38.14% ส่วนยา imipenem ได้รับมาก่อน 6.25% และได้รับยา metronidazole 26.04% ทั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงระยะเวลาที่ได้รับยาและอาจจะเป็นไปได้ที่ได้ยาไม่นาน ซึ่ง Weinstein และคณะ (1996) พบว่าการได้รับยาเหล่านี้ในการรักษามาก่อนมีความสัมพันธ์กับการดื้อยากลุ่ม β-lactams อย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบ enterococci ที่ดื้อยากลุ่มนี้น้อย สามารถใช้ยา ampicillin และ penicillin เป็น first-line drug ในการรักษาโรคติดเชื้อนี้ได้ ยกเว้นกรณีที่มีการติดเชื้อ *E. faecium* อาจใช้รักษาไม่ได้ผล

จากการศึกษาการดื้อยากลุ่ม glycopeptides ไม่พบการดื้อยาแบบ phenotype VAN A และ VAN D แต่อาจดื้อยาแบบ phenotype VAN B หรือ VAN C ได้ เนื่องจากให้ค่า

MIC ของยา vancomycin อยู่ในช่วง 1-4 μg/ml และค่า MIC ของยา teicoplanin อยู่ในช่วง 0.5-4 μg/ml ซึ่งเป็นค่าต่ำกว่าที่พบใน phenotype VAN A และ VAN D (Leclercq and Courvalin, 1997) และค่า MIC ของยา vancomycin 4 μg/ml ซึ่งพบใน *E. faecalis* จำนวน 4 สายพันธุ์ อาจดื้อยาแบบ phenotype VAN B ได้ (Quintiliani and Evers, 1993 ; Leclercq and Courvalin, 1997) โดยมีกลุ่มยีน *vanB* ควบคุมการดื้อยาและอยู่บน large conjugative chromosomal element สามารถถ่ายทอดได้และอาจเกิดการแพร่ระบาดต่อไปได้ และค่า MIC ที่พบอาจดื้อยาแบบ phenotype VAN C ได้ โดยอาจพบในสปีชีส์ *E. casseliflavus* จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่จำเพาะของการดื้อยา phenotype นี้ (Leclercq and Courvalin, 1997)

ในการศึกษานี้ไม่พบ VRE โดยวิธี disk diffusion และการทดสอบ MIC และถึงแม้ว่าผลจากการ screen จะพบเชื้อที่สามารถเจริญที่ความเข้มข้น 6 μg/ml จำนวน 4 สายพันธุ์ แต่เมื่อทดสอบ MIC ตามวิธีมาตรฐานของ NCCLS ให้ค่าที่ไวต่อยาคือ 2-4 μg/ml ทั้งนี้อาจเป็นไปได้เนื่องจากการ screen VRE ใช้ปริมาณเชื้อที่มากกว่า 10-100 เท่า และอาหารที่ใช้ทดสอบมีสารอาหารที่ทำให้เชื้อเจริญได้ดีกว่าวิธีการทดสอบ MIC แต่อย่างไรก็ตาม Swenson และคณะ (1994) ได้ศึกษาวิธี screen VRE ควบคู่กับการศึกษายีนดื้อยาโดยวิธี PCR และใช้ probe ในการยืนยันและรับรองว่าวิธีการ screen VRE เป็นวิธีที่เชื่อถือได้ สำหรับผลการทดสอบการดื้อยา vancomycin โดยวิธี disk diffusion อาจเกิดความผิดพลาดในการวัด zone diameter ได้ง่าย เนื่องจาก enterococci บน MHA มีโคโลนีที่เล็กและใส ซึ่งค่า zone diameter ที่ต่างกันเพียง 1 mm อาจให้ผลในอีกช่วงค่าได้ เช่น การศึกษาของ Gordts และคณะ (1995) พบว่าผล disk diffusion ให้ค่าดื้อต่อยา vancomycin แต่ค่า MIC อยู่ในช่วงไวปานกลาง (8 μg/ml) หรือผล disk diffusion อยู่ในช่วงไว (susceptible) แต่พบ MIC อยู่ในช่วงดื้อได้เช่นกัน

มีการศึกษาในประเทศไทยโดยวิษณุ ธรรมลิขิตกุล และสุรภี พฤกษชาติ (2533) ในโรงพยาบาลศิริราช ไม่พบ VRE จากการศึกษานี้โดยวิธี disk diffusion ส่วนการศึกษาของ สุเทพ จารุรัตนศิริกุล และ สินีนาฏ กาลเนาวกุล (2531) ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ไม่มีรายงานการศึกษาการดื้อยานี้ แต่จากรายงานประจำปีของโรงพยาบาลรามาธิบดี ในปี พ.ศ. 2539 พบ VRE 2% สำหรับในสหรัฐอเมริกาพบการระบาดของ VRE มากใน

โรงพยาบาล และพบว่าในช่วงปี ค.ศ. 1989-1993 พบเพิ่มสูงขึ้นจาก 0.3% เป็น 7% (CDC, 1993) ส่วนในยุโรปพบน้อยในโรงพยาบาล คือพบ 1-2% (McNamara, King, and Smyth, 1995 ; Vandamme, *et al.*, 1996 ; Marches, *et al.*, 1997 ; Lavery, *et al.*, 1997) ทั้งนี้จากข้อมูลของ IMS international (Jarratt and Shutt, 1998) ได้รวบรวมข้อมูลปริมาณการใช้ยา vancomycin ในช่วงตั้งแต่ปี ค.ศ. 1984-1996 พบว่าในอเมริกามีการใช้ยานี้มากทั้งในรูปยาฉีดและยากิน และใช้มากกว่าในแถบยุโรป 10-200 เท่า แต่ในยุโรปก็พบว่ามีการใช้ยาเพิ่มขึ้นจากปี ค.ศ. 1984 5-10 เท่า ส่วนใหญ่ใช้ในรูปยาฉีด และในการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยที่ศึกษา 97 คน เคยได้รับยา vancomycin เพียง 1 คน เท่านั้น

จากการศึกษาการดื้อยา fosfomycin ซึ่งเป็นยาพวกที่ออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ตัวใหม่ที่ออกฤทธิ์ตรงขั้นตอนแรกในการสร้างผนังเซลล์ พบเชื้อดื้อยานี้ 3.09% ใน *E. faecium* เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นยา fosfomycin สามารถเลือกใช้เป็น alternative drug ร่วมกับยา ceftriaxone ในการรักษาโรค endocarditis จาก enterococci หรือการติดเชื้อนี้ที่รุนแรงอื่นๆ ซึ่งเกิดจาก MRE ที่มีการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงได้

ในการศึกษานี้พบว่า *E. faecium* ส่วนใหญ่มีการดื้อยาที่ใช้ทดสอบมากชนิดกว่าในสปีชีส์อื่น โดยเฉพาะยา ampicillin หรือยาที่ออกกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์อื่น เช่นเดียวกับรายงานอื่นๆ (Montecalvo, *et al.*, 1994 ; Jones, *et al.*, 1995 ; Vandamme, *et al.*, 1996 ; Lavery, *et al.*, 1997) อาจเนื่องจาก *E. faecium* มีความสามารถในการสร้างกลไกการดื้อยาได้หลายอย่างทั้งแบบ intrinsic และ acquired โดยอาจมียีนที่ควบคุมการดื้อยาหลายชนิดอยู่ร่วมกันบนพลาสมิดหรือบน conjugative chromosomal element หรือบน transposons และเปรียบเสมือนแหล่งสะสมของยีนดื้อยา (Leclercq, 1997 ; Carias, *et al.*, 1998) หรืออาจมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างจากสปีชีส์อื่นซึ่งอาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา ทำให้สามารถดื้อยาแบบ intrinsic ต่อยาพวกที่ออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ (Chirurgi, *et al.*, 1992 ; Lavery, *et al.*, 1997)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพกับรูปแบบพลาสมิด

จากการนำพลาสมิดที่สกัดได้มาเปรียบเทียบรูปแบบบน agarose gel พบว่าใน *E. faecalis* พลาสมิดแยกแถบให้เห็นตั้งแต่ 1-4 แถบ โดยพบการดื้อยา 1-4 ชนิด และมีแบบ

แผนการดื้อยา gentamicin และ streptomycin มากที่สุด จำนวนแถบพลาสมิดที่พบสอดคล้องกับรายงานอื่นที่แยกแถบให้เห็นตั้งแต่ 1-4 แถบ และมีการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides เช่นเดียวกัน (Zervos, *et al.*, 1986 ; Straut, *et al.*, 1997) และพบว่า *E. faecalis* ที่มีการดื้อยา HLGR ในการศึกษานี้มีขนาดพลาสมิดที่อาจมีส่วนสัมพันธ์กับการดื้อยา (R-plasmid) ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่สุดหรือขนาดรองลงมาโดยมีแถบตรงกับขนาดประมาณ 23 และ 50 kb เมื่อเทียบกับ λ-*Hind* III โดยเปรียบเทียบขนาดกับรายงานอื่นซึ่งพบว่าการดื้อยา HLGR อยู่บนพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่สุดหรือขนาดรองลงมาคือขนาดประมาณ 32-90 kb (Zervos, *et al.*, 1986 ; Sahm and Gilmore, 1994 ; Straut, Cespedes and Horaud, 1996 ; Straut, *et al.*, 1997) และพบว่าใน *E. faecalis* ที่มีแบบแผนการดื้อยาเหมือนกันอาจมีรูปแบบพลาสมิดที่ต่างกันได้มากกว่า 1 แบบ เนื่องจากยีนดื้อยาไม่ได้อยู่เฉพาะบนพลาสมิดแต่อาจอยู่บนโครโมโซมหรือบน transposons และพลาสมิดที่แสดงบน agarose gel อาจไม่ใช่พลาสมิดที่ดื้อยาอย่างเดียว แต่อาจเป็น pheromone plasmid ที่ควบคุมการสร้าง hemolysin, bacteriocin หรือการทนแสงอุลตร้าไวโอเลต เป็นต้น และในการศึกษานี้พบ *β*-hemolytic *E. faecalis* ที่สกัดพลาสมิดได้มีแถบพลาสมิดขนาด 23 และ 50 kb ทุกสายพันธุ์ และอาจเป็นพลาสมิดที่ควบคุมการสร้าง hemolysin ดังเช่นในรายงานของ Clewell (1993) ที่พบว่า hemolysin มียีนที่ควบคุมอยู่บน pheromone plasmid ที่มีขนาด 50-70 kb หรือ hemolysin อาจมีความสัมพันธ์กับการดื้อยา HLGR โดยอาจมียีนควบคุมอยู่บนพลาสมิดเดียวกับการดื้อยา HLGR เนื่องจากพบว่าสายพันธุ์ที่ให้ *β*-hemolysis มีการดื้อยา HLGR ร่วมด้วย 75% นอกจากนี้พบกลุ่มเชื้อที่มีแบบแผนการดื้อยาเหมือนกันและมีรูปแบบพลาสมิดเหมือนกัน รวมทั้งให้ hemolysis ชนิดเดียวกัน อาจเป็น *E. faecalis* สายพันธุ์เดียวกัน โดยเฉพาะกลุ่มที่มีแถบพลาสมิดหลายแถบ

เทคนิคในการสกัดพลาสมิดของ enterococci ก็มีความสำคัญเนื่องจากพบปัญหาคือมี enterococci หลายสายพันธุ์ที่ไม่พบพลาสมิด ซึ่งอาจเกิดจากสกัดพลาสมิดไม่ได้หรือไม่มีพลาสมิด ทั้งนี้เนื่องจาก enterococci เป็นแบคทีเรียกรัมบวกมีผนังเซลล์หนาจึงทำให้เซลล์แตกยากกว่าแบคทีเรียกรัมลบ มีการศึกษาที่ต้องเติม lysozyme ในสารละลายมากกว่าความเข้มข้นที่ใช้กับ *Escherichia coli* 5-50 เท่า และขนาดสูงสุดที่ใช้คือ 100 mg/ml (Lavery, *et al.*, 1997 ; Petts, Noble and Howell, 1997 ; Weaver and Clewell,

1988) นอกจากนี้ในการสกัดแต่ละครั้ง บางสายพันธุ์ให้รูปแบบที่ต่างกันบน agarose gel ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการสูญหายหรือได้รับใหม่ ทำให้ได้ yield ของพลาสมิดไม่แน่นอน รวมทั้งแถบพลาสมิดอาจมีได้หลายรูปแบบ คือ supercoil, linear และ open-circular ซึ่งมีการเคลื่อนที่บน agarose gel ได้ระยะทางต่างกัน ทำให้มีผลต่อการเปรียบเทียบรูปแบบพลาสมิดได้ (Chenoweth, *et al.*, 1994)

ใน *E. faecium* พบว่ามีรูปแบบพลาสมิด 4 รูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละแบบแผนการดื้อยา โดยมีจำนวนแถบพลาสมิดและจำนวนชนิดยาที่ดื้อมากกว่า *E. faecalis* คือ มีการดื้อยา 5-7 ชนิด และพบแถบพลาสมิดได้ตั้งแต่ 2-9 แถบ เช่นเดียวกับรายงานอื่นที่มีแถบพลามิด 5-8 แถบ และมีการดื้อยาหลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่ม βlactams รวมทั้งในกลุ่ม aminoglycosides หรือ glycopeptides (Boyce, *et al.*, 1992 ; Chirurgi, *et al.*, 1992 ; Lavery, *et al.*, 1997) และเป็นที่น่าสังเกตว่า *E. faecium* สายพันธุ์ที่มีการดื้อยา ampicillin และ gentamicin ในการศึกษานี้มีจำนวนแถบพลาสมิดหลายแถบ เช่นเดียวกับรายงานที่กล่าวมา ซึ่งพลาสมิดที่พบบางชนิดอาจไม่มียีนที่ทำลายยาโดยตรง แต่อาจช่วยเสริมให้เชื้อทนในสภาพแวดล้อมที่มียาได้ นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบในสปีชีส์ *E. faecalis* , unclassified enterococci และ *E. faecalis* ATCC 25912 จะไม่มีพลาสมิดแยกให้เห็น

4. การศึกษาแนวทางการทำ typing ของสายพันธุ์ที่ดื้อยา

จากการศึกษาในครั้งนี้พบ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ให้ non-hemolysis แบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ และการดื้อยา HLGR และ HLSR เหมือนกัน และมีรูปแบบพลาสมิดหลายแถบเหมือนกัน เช่น *E. faecalis* WK27 เหมือนกับ *E. faecalis* WK112 จึงควรจะมาจากสายพันธุ์เดียวกัน หรือ *E. faecalis* WK1, 8, 62, และ 85 มี phenotype และมีรูปแบบพลาสมิดที่ตัดย่อยเหมือนกัน จึงควรจะมาจากสายพันธุ์เดียวกัน ดังตาราง 15 และเป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดได้ทั่วโรงพยาบาล แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่ดื้อยา HLGR ที่ศึกษาในครั้งนี้อาจแพร่ระบาดการดื้อยานี้แบบ exogenous ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zervos และคณะ (1986) โดยอาจผ่านทางมือของบุคลากรโรงพยาบาลที่หมุนเวียนดูแลรักษาผู้ป่วยทั่วโรงพยาบาลหรืออาจเกิดจากการย้ายเข้าและออกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาไปยังหอผู้ป่วยต่างๆ

จากการศึกษานี้พบว่าสายพันธุ์ที่อาจเป็นสายพันธุ์เดียวกัน แยกได้จากสิ่งส่งตรวจปัสสาวะและเนื้อเยื่อจากแผล แสดงให้เห็นว่ามีการระบาดของสายพันธุ์ในหลายตำแหน่งของร่างกายได้ เช่นเดียวกับรายงานอื่นซึ่งพบสายพันธุ์ที่เหมือนกันได้ทั้งปัสสาวะ เลือด และน้ำจากการสวนล้างช่องท้อง (Handwerger, *et al.*, 1993) และในการศึกษานี้พบการอยู่ทนของ *E. faecalis* ที่ดื้อยา HLGR บางสายพันธุ์ อย่างน้อยประมาณ 2 เดือน เป็นการยืนยันว่า enterococci เป็นเชื้อที่อยู่ทนในโรงพยาบาล ดังเช่นในการศึกษาของ Zervos และคณะ (1986) ที่พบสายพันธุ์ *E. faecalis* ที่ดื้อยา HLGR อยู่ทนได้มากกว่า 2 เดือนเช่นเดียวกัน แต่ Chenoweth และคณะ (1994) พบสายพันธุ์ที่อยู่ทนได้ถึง 1 ปี ทำให้เชื้อมีโอกาสแพร่ระบาดกระจายการดื้อยาได้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น ได้รับการใส่สายสวนปัสสาวะ นอนรักษาตัวในโรงพยาบาลนาน หรือนอนรักษาตัวในโรงพยาบาลหลายๆ ครั้ง

ในการศึกษาแนวทางการทำ typing ของสายพันธุ์เพื่อติดตามการระบาดของสายพันธุ์ที่ดื้อยาครั้งนี้โดยใช้ phenotypic techniques คือ ชนิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง แบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ การดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ยุ่งยากหรือมีราคาแพง และสามารถทำในโรงพยาบาลทั่วไปในประเทศไทยได้ และในการใช้ phenotypic technique ร่วมกันหลายๆ อย่าง ทำให้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม phenotypic techniques แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ไม่ละเอียดพอ (Straut, *et al.*,1997) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ genotypic techniques ในการจำแนกสายพันธุ์ร่วมด้วย โดยการทำ plasmid analysis ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้โดยเฉพาะรูปแบบพลาสมิดที่ให้แถบหลายแถบ ส่วนสายพันธุ์ที่ให้พลาสมิด 1 แถบ ซึ่งมีมากกว่า 50% จึงใช้วิธี restriction endonuclease analysis (REA) ของพลาสมิดนั้น โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hind* III ทำให้ได้แถบ DNA หลายแถบและสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับรายงานอื่น (Sexton, *et al.*, 1993 ; Chirurgi, *et al.*, 1992) แต่พบข้อเสียคือ พลาสมิดเป็น mobile extrachromosomal element สามารถเกิด rearrangement และถ่ายทอดได้ จึงมีหลายการศึกษาที่นิยมใช้การทำ chromosome analysis ร่วมด้วย (Chow, *et al.*, 1993 ; Boyce, *et al.*, 1994 ; Straut, *et al.*, 1997) และถึงแม้ว่าจะจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ดีขึ้น แต่มีข้อเสียคือ ได้แถบ DNA มากเกิน

ไป และบางแถบซ้อนกันทำให้แปลผลยาก อีกทั้งเทคนิคการทำค่อนข้างยากและต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่มีราคาแพง ส่วนการใช้ ribotyping เพื่อศึกษาติดตามการระบาดของสายพันธุ์ พบว่าไม่มีประโยชน์เพราะเป็นวิธีการที่จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้น้อย เนื่องจาก ribosomal RNA มี conserve sequence ซึ่งเหมือนกันในแต่ละสปีชีส์ จึงเป็นลักษณะที่ควรใช้บ่งชี้สปีชีส์ไม่ใช่สายพันธุ์ (Bingen, *et al.*, 1991)

5. การศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา

จากผลการศึกษาการถ่ายทอดการดื้อยา HLGR โดยวิธี conjugation ระหว่างสปีชีส์ (interspecies) ของ enterococci ในครั้งนี้ ตัวให้ คือ *E. faecalis* และตัวรับ คือ *E. faecium* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลทั้งคู่ พบว่าสามารถถ่ายทอดการดื้อยา ได้ด้วยความถี่ 10^{-7}/ donor โดยวิธี filter mating แตกต่างจากการศึกษาของ Sahm และ Gilmore (1994) ที่ใช้ตัวให้ คือ *E. faecium* และตัวรับ คือ *E. faecalis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ มีความถี่ในการถ่ายทอดสูงกว่า คือ 10^{-5}-10^{-3}/donor ทั้งนี้อาจใช้กลไกการถ่ายทอดคนละระบบ ซึ่งในระบบที่เลียนแบบธรรมชาติในการศึกษานี้อาจใช้ระบบของ conjugative transposons มากกว่าระบบ pheromone เนื่องจากมีความถี่ในการถ่ายทอดที่ต่ำและเกิดใน filter mating หรืออาจถ่ายทอดการดื้อยาได้แต่มี incompatibility กับพลาสมิดเดิม ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ *E. faecium* WK65 เป็นตัวรับอีกสายพันธุ์หนึ่ง แต่ไม่พบการถ่ายทอด อาจเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดมากกว่า *E. faecium* WK67 ที่เป็นตัวรับได้สำเร็จ คล้ายกับการใช้สายพันธุ์ตัวรับห้องปฏิบัติการซึ่งมีการดื้อยาในระดับโครโมโซมและไม่มีพลาสมิด เช่นเดียวกัน ในสายพันธุ์ตัวให้ที่มีพลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดได้น้อยกว่า โอกาสที่จะเกิด incompatibility กับพลาสมิดของตัวรับน้อยกว่า ดังนั้นจึงมีโอกาสถ่ายทอดการดื้อยาได้สำเร็จมากกว่า

ส่วนผลการศึกษารูปแบบพลาสมิดของ transconjugants เทียบกับตัวให้และตัวรับ พบว่า transconjugants ซึ่งถ่ายทอดการดื้อยา HLGR มาได้ 2 สายพันธุ์ คือ *E. faecium* WK8/67 และ *E. faecium* WK62/67 มีพลาสมิดที่มีแถบตรงกับขนาดประมาณ 23 kb ที่พบในตัวให้เพิ่มขึ้นมา และมีรูปแบบอื่นเหมือนกับตัวรับทั้งคู่ แสดงว่าพลาสมิดขนาดดังกล่าวอาจเป็น R-plasmid ที่มียีนดื้อยา HLGR อย่างไรก็ตามพบว่าในสายพันธุ์อื่น เช่น *E. faecalis* WK37 มีการดื้อยา HLGR แต่พบพลาสมิดเฉพาะขนาด 9 kb ดังตาราง 16

นอกจากนี้พบว่ามีสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดขนาดประมาณ 23 kb แต่ไม่มีการดื้อยา HLGR แสดงให้เห็นว่าปัจจัยดื้อยา HLGR อาจอยู่บน transposons และอาจพบแทรกบนพลาสมิดหรือโครโมโซมได้ (Thal, *et al.*, 1994 ; Straut, Cespedes and Horaus, 1996 ; Straut, *et al.*, 1997 ; Rice and Carias, 1998) และไม่จำเป็นว่าพลาสมิดที่มีขนาดเท่ากันต้องเป็นพลาสมิดที่มียีนดื้อยา HLGR ดังเช่นในการศึกษานี้

เมื่อศึกษารูปแบบพลาสมิดระหว่างตัวให้ ตัวรับ และ transconjugants โดยใช้เอนไซม์ตัดย่อย 2 ชนิด พบว่า transconjugants ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้รูปแบบพลาสมิดที่ตัดย่อยต่างกันทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์ โดยมีส่วนที่คล้ายกับตัวให้และตัวรับ ซึ่งพบว่าแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพของ transconjugants ทั้ง 2 สายพันธุ์ ให้ผลของการดื้อยาส่วนใหญ่เหมือนกันยกเว้นยา ciprofloxacin แสดงอาจเกิด mutation หรือมี deletion ของยีนดื้อยา ciprofloxacin หรือมี insertion ของ genetic element อื่นๆ ที่อาจมีผลให้เกิดการหลุดของยีนดื้อยา ciprofloxacin และเนื่องจาก *E. faecalis* WK8 และ *E. faecalis* WK62 อาจเป็นสายพันธุ์เดียวกันและสามารถถ่ายทอดการดื้อยาได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่ใช้เป็นตัวให้ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่สายพันธุ์นี้มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายยีนดื้อยาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

บทที่ 5

บทสรุป

1. จากการจำแนก *Enterococcus* spp. 97 ตัวอย่าง ซึ่งแยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนเมษายน 2540 ถึง เดือนมกราคม 2541 จำแนกโดยใช้แบบแผนทางชีวเคมีและสรีรวิทยา พบ *E. faecalis* มากที่สุดจำนวน 84 สายพันธุ์ (86.06%) รองลงมาคือ *E. faecium* จำนวน 4 สายพันธุ์ (4.12%), *E. casseliflavus* จำนวน 2 สายพันธุ์ (2.06%), *E. hirae* จำนวน 1 สายพันธุ์ (1.03%) และไม่สามารถจำแนกได้ (unclassified enterococci) จำนวน 6 สายพันธุ์ (6.19%) และพบ hemolysis ทั้งชนิด α, β และ non-hemolysis บน human blood agar จำนวน 7.22%, 24.74% และ 68.04% ตามลำดับ และ hemolysis อาจมีความสัมพันธ์กับสปีชีส์ ความรุนแรงของโรค และการดื้อยาต้านจุลชีพ สามารถแยก *Enterococcus* spp. ได้จากปัสสาวะมากที่สุดจำนวน 43 สายพันธุ์ (44.33%) รองลงมาคือ เนื้อเยื่อจากแผล และหนอง จำนวน 15 สายพันธุ์ (15.46%) เท่ากัน แยกได้จากเลือดจำนวน 6 สายพันธุ์ (6.19%) และอื่นๆ ซึ่งพบน้อยกว่า 5% ได้แก่ น้ำดี สารคัดหลั่งจากช่องคลอด น้ำจากช่องไขสันหลัง น้ำจากการสวนล้างช่องท้อง น้ำจากช่องท้อง น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด และน้ำจากการล้างท่อหลอดลม โดยมีการกระจายของสปีชีส์ทั่วร่างกาย เชื้อที่แยกได้ร่วมมากที่สุดคือ *Escherichia coli* รองลงมาคือ *S. epidermidis* และ *S. aureus* ในกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาพบว่ามีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ enterococci โดยเฉพาะในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งพบในกลุ่มผู้สูงอายุมากกว่า 60 ปี และกลุ่มเด็กอายุต่ำกว่า 3 ขวบ มากกว่ากลุ่มอายุอื่น ทั้งนี้มีภาวะภูมิต้านทานต่ำ 60.47% และมีการใส่สายสวนปัสสาวะ 53.57%

2. จากการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* spp. โดยวิธี agar screening พบการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides มากที่สุด โดยพบการดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง 60.82% และ 46.39% ตามลำดับ และพบได้ทุกสปีชีส์ แต่พบการดื้อยากลุ่ม β-lactams ในเปอร์เซ็นต์ต่ำ โดยพบการดื้อยา ampicillin, penicillin และ imipenem โดยวิธี disk diffusion 4.12%, 9.27% และ 6.19% ตามลำดับ

และพบการดื้อยา ampicillin เฉพาะใน *E. faecium* ไม่พบการดื้อยากลุ่ม glycopeptides ทั้งโดยวิธี disk diffusion และ โดยการทดสอบ MIC แต่พบ VRE โดยวิธี agar screening ใน *E. faecalis* 4 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบการดื้อยา ciprofloxacin 37.11% และ fosfomycin 3.09% โดยวิธี disk diffusion และพบว่า *E. faecium* มีการดื้อยาต้านจุลชีพมากชนิดกว่าในสปีชีส์อื่น พบผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพในการรักษามาก่อนในกลุ่ม cephalosporins มากที่สุด 48.45% โดยเฉพาะรุ่นที่ 3 รองลงมาคือกลุ่ม penicllins 38.14% และกลุ่ม aminoglycosides 36.08% ส่วนยา vancomycin ได้รับมาก่อนเพียง 0.97%

3. จากการศึกษาความสัมพันธ์ของแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ 9 ชนิด โดยวิธี disk diffusion ได้แก่ยา ampicillin, penicillin, gentamicin, streptomycin, vancomycin, teicoplanin, imipenem, fosfomycin และ ciprofloxacin และรูปแบบพลาสมิดบน agarose gel electrophoresis พบว่า *E. faecalis* มีแบบแผนการดื้อยา 6 แบบ โดยมีการดื้อยา 1 ถึง 4 ชนิด และพบแบบแผนการดื้อยา gentamicin และ streptomycin มากที่สุด พบรูปแบบพลาสมิดที่สกัดได้ 6 แบบ แยกแถบพลาสมิดให้เห็น 1 ถึง 4 แถบ โดยมีแถบพลาสมิดตรงกับขนาดตั้งแต่ 3 ถึง 50 kb เมื่อเทียบกับ λ-*Hind* III และรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ มีแถบพลาสมิด 1 แถบ ที่ขนาดประมาณ 23 kb โดยพบว่าแบบแผนการดื้อยาที่เหมือนกันมีรูปแบบพลาสมิดที่ต่างกันได้มากกว่า 1 แบบ และพบพลาสมิดที่อาจมีส่วนสัมพันธ์กับการดื้อยา gentamicin ในระดับสูงหรือสร้าง hemolysin คือ ขนาด 23 ถึง 50 kb ใน *E. faecium* มีแบบแผนการดื้อยา 4 แบบ โดยมีการดื้อยา 5-7 ชนิด และพบรูปแบบพลาสมิด 4 แบบ แยกแถบพลาสมิดให้เห็น 2 ถึง 9 แถบ มีขนาดที่ตรงกับขนาดของ λ-*Hind* III ตั้งแต่ 1 ถึง 50 kb และพบสายพันธุ์ที่ดื้อยา ampicilin และ gentamicin มีจำนวนแถบพลาสมิด 5-9 แถบ ส่วนใน *E. casseliflavus*, *E. hirae* และ unclassified enterococci รวมทั้ง *E. faecalis* ที่ไม่มีการดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบจะไม่มีพลาสมิดแยกให้เห็น

4. จากการศึกษาแนวทางในการทำ typing สายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านจุลชีพ พบว่าสามารถใช้ชนิดของ hemolysis แบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพ การดื้อยา gentamicin และ streptomycin ในระดับสูง ร่วมกับรูปแบบพลาสมิด ในการจำแนกสายพันธุ์และติดตามการระบาดของสายพันธุ์ โดยพบสายพันธุ์ที่อาจเป็นสายพันธุ์เดียวกันระบาดในผู้ป่วยต่างแผนก

โดยกระจายตามตำแหน่งต่างๆ ทั่วร่างกาย และพบบางสายพันธุ์สามารถอยู่ทนในโรงพยาบาลได้อย่างน้อย 2 เดือน

5. จากการศึกษาการถ่ายทอดการดื้อยา gentamicin ในระดับสูง โดยวิธี conjugation ระหว่างสปีชีส์ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย สามารถถ่ายทอดการดื้อยาได้ 2 คู่ โดยพบว่า *E. faecalis* WK8 และ *E. faecalis* WK62 สามารถใช้เป็นตัวให้ ถ่ายทอดการดื้อยาไปให้ตัวรับ *E. faecium* WK67 โดยวิธี filter mating มีความถี่ในการถ่ายทอด $2.5X10^{-7}$ และ $2.75X10^{-7}$/donor ตามลำดับ พบว่า transconjugants ให้รูปแบบพลาสมิดที่มีแถบพลาสมิดที่ตรงกับขนาดประมาณ 23 kb ของ λ-*Hind* III เพิ่มขึ้นมาทั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงว่าอาจเป็นพลาสมิดที่มีส่วนสัมพันธ์กับการดื้อยา gentamicin ในระดับสูง (R-plasmid) และไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยานี้ระหว่าง *E. faecalis* กับ *Escherichia coli* แสดงให้เห็นว่า enterococci สามารถแพร่กระจายยีนดื้อยาโดยวิธี conjugation ได้ โดยเฉพาะในระหว่างสปีชีส์

ข้อเสนอแนะสำหรับทำการศึกษาครั้งต่อไป

1. จากการศึกษาแนวทางในการทำ typing สายพันธุ์ อาจนำวิธีการศึกษาในครั้งนี้ใช้ติดตามการแพร่ระบาดของสายพันธุ์ที่ดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ในระดับสูงแบบ exogenus acquired ระหว่างผู้ป่วยกับผู้ป่วย บุคลากรโรงพยาบาล อุปกรณ์เครื่องมือแพทย์ สิ่งแวดล้อมต่างๆ ในโรงพยาบาล ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการควบคุมการแพร่ระบาดต่อไป

2. จากการศึกษาแนวทางในการทำ typing สายพันธุ์ อาจทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของโครโมโซมร่วมด้วย เพื่อให้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ละเอียดมากขึ้น โดยอาจใช้วิธี Pulse-field gel electrophoresis (PFGE)

3. จากการศึกษาพบพลาสมิดตรงกับขนาดประมาณ 23 kb เมื่อเทียบกับ λ*Hind* III ซึ่งอาจมีส่วนสัมพันธ์กับการดื้อยา gentamicin ในระดับสูง ดังนั้นจึงอาจทำการศึกษาพิสูจน์โดยนำ probe ของยีนดื้อยานี้มาตรวจจับ และใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization

4. จากการศึกษาพบ *Enterococcus* spp. ที่ให้ค่า MIC ของยา vancomycin 4 μg/ml และไวต่อยา teicoplanin ซึ่งอาจตรงกับ phenotype VAN B โดยมียีน *vanB* ควบคุมการดื้อยาอยู่บนส่วนของโครโมโซมขนาดใหญ่และสามารถถ่ายทอดได้ ดังนั้นอาจนำเชื้อเหล่านี้

มาศึกษาต่อ โดยใช้วิธี PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *vanB* ร่วมกับการทำ DNA-DNA hybridization โดยศึกษาทั้ง genome

บรรณานุกรม

มหิดล, มหาวิทยาลัย. คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี, ภาควิชาพยาธิวิทยา. 2541. รายงานความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาลรามาธิบดี ประจำปี 2539. วารสารโรคติดเชื้อและยาต้านจุลชีพ. 15 (มกราคม-เมษายน).

วิษณุ ธรรมลิขิตกุล และ สุรภี พฤกษชาติวุฒิ. 2533. ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ enterococci ที่แยกได้ในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างปี พ.ศ. 2528-2531. วารสารโรคติดเชื้อและยาต้านจุลชีพ. 7 : 193-196.

สุเทพ จารุรัตนศิริกุล และ สินีนาฏ กาลเนาวกุล. 2531. การติดเชื้อ enterococci ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์. สงขลานครินทร์เวชสาร. 6 :129-135.

Acar, J. and Goldstein, F.W. 1996. Disk susceptibility test. *In* Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed.pp. 15-17. Lorian, V. editor. Williams & Wilkins : Baltimore.

Arthur, M. and Courvalin, P. 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 37 : 1563-1571.

Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F. and Courvalin, P. 1993. Characterization of Tn*1546*, a Tn*3* – related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM 4147. J Bacteriol. 175 : 117-127.

Baker, C.N. and Tenover, F.C. 1996. Evaluation of Alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci. J Clin Microbiol. 34 : 2654-2659.

Beezhold, D.W., Slaughter, S., Hayden, M.K., Matushek, M., Nathan, C., Trenholme, G.M. and Weinstein, R.A. 1997. Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. Clin Infect Dis. 24 : 704-706.

Bingen, E.H., Denmur, E., Lambert-Zechovsky, N.Y. and Elion. J. 1991. Evidence for the genetic unrelatedness of nosocomial vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains in a pediatric hospital. J Clin Microbiol. 29 : 1888-1892.

Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7 : 1513-1523.

Boyce, J.M., Opal, S.M., Chow, J.W., Zervos, M.J., Potter-Bynoe, G., Sherman, C.B., Romulo, R.L., Fortna, S. and Medeiros, A.A. 1994. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable *vanB* class vancomycin resistance. J Clin Microbiol. 32 : 1148-1153.

Boyce, J.M., Opal, S.M., Potter-Bynoe, G., LAForge, R.G., Zervos, M.J., Furtado, G., Victor, G. and Medeiros, A.A. 1992. Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 36 : 1032-1039.

Carias, L., Rudin, S.D., Donskey, C.J. and Rice, L.B. 1998. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn*5392*) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. J Bacteriol. 180 : 4426-4434.

Cars, O. 1997. Colonization and infection with resistant gram-positive cocci epidemiology and risk factors. Drugs. 54(Suppl. 6) : 4-10.

CDC. 1986. National nosocomial infection surveillance, 1984. Morbid Mortal Weekly Rep. 35(Special Suppl I) : 17SS-29SS, quoted in Murray, B.E. 1990. The life and times of the enterococcus. Clin Microbiol Rev. 3 : 46-65.

CDC. 1993. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. Morbid Mortal Weekly Rep. 42 : 597-599, quoted in Coque, T.M., Tomayko, J.F., Ricke, S.C., Okhyusen, P.C. and Murray, B.E. 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 40 : 2605-2609.

Chenoweth, C.E., Bradley, S.F., Terpenning, M.S., Zarins, L.T., Ramsey, M.A., Schaberg, D.R. and Kanffman, C.A. 1994. Colonization and transmission of high-level gentamicin-resistant enterococci in a long-term care facility. Infect Control Hosp Epidemiol. 15 : 703-709.

Chirurgi, V.A., Oster, S.E., Goldberg, A.A. and McCabe, R.E. 1992. Nosocomial acquisition of β-lactamase-negative, ampicillin-resistant enterococcus. Arch Intern Med. 152 : 1457-1461.

Chow, J.W., Kuritza, A., Shlaes, D.M., Green, M., Sahm, D.F. and Zervos, M.J. 1993. Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. J Clin Microbiol. 31 : 1609-1611.

Chow, J.W., Zervos, M.J., Lerner, S.A., Thal, L.A., Donabedian, S.M., Jaworski, D.D., Tsai, S., Shaw, K.J. and Clewell, D.B. 1997. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. Antimicrob Agents Chemother. 41 : 511-514.

Clark, N.C., Cooksey, R.C., Hill, B.C., Swenson, J.M. and Tenover, F.C. 1993. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 37 : 2311-2317.

Clewell, D.B. 1993. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. *In* Bacterial Conjugation. pp. 349-367. Clewell,D.B., editor. Plenum : New York.

Clewell, D.B. and Flannagan, S.E. 1993. The conjugation transposons of gram-positive bacteria. *In* Bacterial Conjugation. pp. 369-393. Clewell,D.B., editor. Plenum : New York.

Coque, T.M., Tomayko, J.F., Ricke, S.C., Okhyusen, P.C. and Murray, B.E. 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 40 : 2605-2609.

Coudron, P.E., Markowitz, S.M. and Wong, E.S. 1992. Isolation of a β-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium.* Antimicrob Agents Chemother. 36 : 1125-1126.

Courvalin, P. 1994. Transfer of antibiotic resistance gene between gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 38 : 1447-1451.

Devriese, L.A., Ceyssens, K., Rodrignes, U.M. and Collins, M.D. 1990. *Enterococcus columbae,* a species from pigeon intestines. FEMS Microbiol Lett. 71 : 247-252.

Devriese, L.A., Pot, B., Kersters, K., Lauwers, S. and Haesebrouck, F. 1996. Acidification of methyl-α-D-glucopyranoside : a useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecalis.* J Clin Microbiol. 34 : 2607-2608.

Donabedian, S.M., Chow, J.W., Boyce, J.M., McCabe, R.E., Markowitz, S.M., Coudron, P.E., Kuritza, A., Pierson, C.L. and Zervos, M.J. 1992. Molecular typing of ampicillin-resistant, non-β-lactamase-producing *Enterococcus faecium* isolates from diverse geographic areas. J Clin Microbiol. 30 : 2757-2761.

Doucet-Populaire, F., Trieu-Cuot, P., Andremout, A. and Courvalin, P. 1992. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. Amtimicrob Agents Chemother. 36 : 502-504.

Drake, T.A., Rodgers, G. M. and Sande, M.A. 1984. Tissue factor is a major stimulus for vegetation in enterococcal endocarditis in rabbits. J Clin Invest. 73 : 1750-1753.

Dunny, G.M. 1991. Mating interaction in gram-positive bacteria. *In* Microbial Cell-Cell Interaction. pp. 9-33. Dworkin, M., editor. ASM press : Washington, DC.

Dunny, G.M., Brown, B.L. and Clewell, D.B. 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus facecalis* : evidence for a bacterial sex pheromone. Proc Natl Acad Sci USA. 75 : 3479-3483.

Dunny, G.M., Craig, R.A., Carron, R.L. and Clewell, D.B. 1979. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis* : production of multiple pheromones by recipients. Plasmid. 2 : 454-465, quoted in Dunny, G.M. 1991. Mating interaction in gram-positive bacteria. *In* Microbial Cell-Cell Interaction. pp. 9-33. Dworkin, M., editor. ASM press : Washington, DC.

Dupont, H., Montravers, P., Mohler, J. and Carbon, C. 1998. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. Infect Immun. 66 : 2570-2575.

Dutka-Malen, S., Evers, S. and Courvalin, P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol. 33 : 24-27.

Edmond, M.B., Ober, J.F., Weinbaum, D.L., Pfaller, M.A., Hwang, T., Sanford, M.D. and Wenzel, R.P. 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia : risk factors for infection. Clin Infect Dis. 20 : 1126-1133.

Endtz, H.P., Braak, N.V.D., Belkum, A.V., Kluytmans, J.A.J.W., Koeleman, J.G.M., Spanjaard, L., Voss, A., Weersink, A.J.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M.E., Buiting, A.G.M., Duin, A.V. and Verbrugh, H.A. 1997. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. J Clin Microbiol. 35 : 3026-3031.

Facklam, R.R. 1972. Recognition of group D *Streptococcal* species of human original by biochemical and physiological tests. Appl Microbiol. 23 : 1131-1139.

Facklam, R.R. and Collins, M.D. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol. 27 : 731-734.

Facklam, R.R. and Sahm, D.F. 1995. Enterocooous. *In* Manual of Clinical Microbiology, 6thed. pp. 308-314. Murray, P.R. editor in chief. ASM press : Washington, DC.

Franke, A.E. and Clewell, D.B. 1981. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn*916*) in *Streptococcus faecalis* that is capable "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. J Bacteriol. 145 : 494-502.

Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Horan, T.C. and Hughes, J.M. 1988. CDC definitions for nosocomial infection, 1988. Am J Infect Cont. 16 : 128-140.

Gordon, S., Swenson, J.M., Hill, B.C., Pigott, N.E., Facklam, R.R., Cooksey, R.C., Thornsberry, C., Enterococcus Study Group, Jarvis, W.R. and Tenover, F.C. 1992. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. J Clin Microbiol. 30 : 2373-2378.

Gordts, B., Landuyt, H.V., Iven, M., Vandamme, P. and Goossens, H. 1995. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. J Clin Microbiol. 33 : 2842-2846.

Green, M., Barbadora, K., Donabedian, S. and Zervos, M.J. 1995. Comparison of field inversion gel electrophoresis with contour-clamped homogenus electric field electrophoresis as a typing method for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 33 : 1554-1557.

Handwerger, S., Raucher, B., Altarac, D., Monka, J., Marchione, S., Singh, K. V., Murray, B. E., Wolff, J. and Walters, B. 1993. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. Clin Infect Dis. 16 : 750-755.

Handwerger, S. and Skoble, J. 1995. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 39 : 2446-2453.

Hamilton-Miller, J. M. T., Shah, S. and Yam, T-S. 1995. Errors arising from incorrect orientation of E-test Strips. J Clin Microbiol. 33 : 1966-1967.

Hase, C. C. and Finkelstein, R. A. 1993. Bacterial extracellular zinc-contaning metalloproteases. Microbiol Rev. 57 : 823-837.

Hayden, M.K., Trenholme, G.M., Schultz, J.E. and Sahm, D.F. 1993. In vivo development of teicoplanin resistance in a VANB *Enterococcus faecium* isolate. J Infect Dis. 167 : 1224-1227, quoted in Leclercq, R. and Courvalin, P. 1997. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis. 24 : 545-556.

Heaton, M. P., Discotto, L. F., Pucci, M, J. and Handwerger, S. 1996. Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. Gene. 171 : 9-17.

Herwaldt, L. A. and Wenzel, R. P. 1995. Dynamics of hospital-acquired infection. *In* Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. pp. Murray, P. R. editor in chief. ASM press : Washington, DC.

Hoffmann, S. A. and Moellering, Jr., R. C. 1987. The enterococcus : "putting the bug in our ears". Ann Intern Med. 106 : 757-761.

Horodniceanu, T., Bougueleret, L., EL-Solh, N., Bieth, G. and Delbos, F. 1979. High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. zymogenes. Antimicrob Agents Chemother. 16 : 686-689.

Ike, Y., Hashimoto, H. and Clewell, D.B. 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infection. J Clin Microbiol. 25 : 1524-1528.

Iwen, P.C., Kelly, D.M., Linder, J. and Hinrichs, S.H. 1996. Revised approach for identification and detection of ampicillin and vancomycin resistance in *Enterococcus* species by using Microscan panels. J Clin Microbiol. 34 : 1779-1783.

Jacob, A.E. and Hobbs, S.J. 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. J Bacteriol. 117 : 360-372.

Jarratt, B. and Shutt, J. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 42 : 1303-1304.

Jett, B.D., Jensen, H.G., Nordquist, R.E. and Gilmore, M.S. 1992. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. Infect Immun. 60 : 2445-2452.

Johnson, A.P. 1994. Reviews : the pathogenicity of enterococci. J Antimicrob Chemother. 33 : 1083-1089.

Jones, R.N., Sader, H.S., Erwin, M.E., Anderson, S.C. and the Enterococcus study group. 1995. Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates. I. prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States. Diagn Microbiol Infect Dis. 21 : 85-93.

Kalina, A.P. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. Int J Syst Bacteriol. 20 : 185-189, quoted in Facklam, R.R. and Sahm, D.F. 1995. Enterococcus. *In* Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. pp. 308. Murray, P.R. editor in chief. ASM press : Washington, DC.

Kibbey, H.J., Hagedorn, C. and McCoy, E.L. 1972. Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. Appl Environ Microbiol. 35 : 711-717.

Klein, G., Pack, A. and Reuter, G. 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. Appl Environ Microbiol. 64 : 1825-1830.

Kreft, B., Marre, R., Schramm, U. and Wirth, R. 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect Immun. 60 : 25-30.

Kuhn, I., Burman, L.G., Haeggman, S., Tullus, K. and Murray, B.E. 1995. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidermiological typing of enterococci. J Clin Microbiol. 33 : 2812-2817.

Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, J.L. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int J Syst Bacteriol. 41 : 406-409.

Landman, D. and Quale, J.M. 1997. Management of infections due to resistant enterococci : a review of therapeutic options. J Antimicrob Chemother. 40 : 161-170.

Lavery, A., Rossney, A.S., Morrison, D., Power, A. and Keane, C.T. 1997. Incidence and detection of multi-drug-resistant enterococci in Dublin hospitals. J Med Microbiol. 46 : 150-156.

Leclercq, R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. Clin Infect Dis. 24(Suppl I) : S80-84.

Leclercq, R. and Courvalin, P. 1997. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis. 24 : 545-556.

Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J. and Courvalin, P. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium.* N Engl J Med. 319 : 157-161.

Leclercq, R., Dutka-Malen, S., Brisson-Noel, A., Molinas, C., Derlot, E., Arthur, M., Duval, J. and Courvalin, P. 1992. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. Clin Infect Dis. 15 : 495-501.

Libertin, C.R., Dumitru, R. and Stein, D.S. 1992. The hemolysin/bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. Diagn Microbiol Infect Dis. 15 : 115-120.

Linden, P.K. 1998. Clinical implications of nosocomial gram-positive bacteremia and superimposed antimicrobial resistance. Am J Med. 104(5A): 24S-33S.

Livornese, L.L., Dias, S., Samel, C. Romanowski, B., Taylor, S., May, P., Pitsakis, P., Woods, G., Kaye, D., Levison, M.E. and Johnson, C.C. 1992. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. Ann Intern Med. 117 : 112-116.

Macrina, F.L. and Archer, G.L. 1993. Conjugation and broad host range plasmids in streptococci and staphylococci. *In* Bacterial Conjugation pp. 33-329. Clewell, D.B., editor. Plenum : New York.

McNamara, E.B., King, E.M. and Smyth, E.G. 1995. A survey of antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus* spp. from Irish hospital. J Antimicrob Chemother. 35 : 185-189.

Megran, D.W. 1992. Enterococcal endocarditis. Clin Infect Dis. 15 : 63-71.

Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Hare, R.S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shales, D., Shimizu, K., and the Aminoglycoside Resistance Study Groups. 1997. The most frequent aminoglycoside resistance machanism-changes with

time and geographic area : a reflection of aminoglycoside usage patterns? Clin Infect Dis. 24(suppl I) : S46-S62.

Miyazaki, S., Ohno, A., Kobayashi, I., Uji. T., Yamaguchi, K. and Goto, S. 1993. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. Microbiol Immunol. 37 : 265-270.

Moellering, Jr., R.C.,Wennersten, C. and Medrek, T. 1971. Prevalence of high-level resistance to aminoglycosides in clinical isolates of enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 335-340, quoted in Murray, B.E. 1990. The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev. 3 : 46-65.

Moellering, Jr., R.C. 1992. Emergence of enterococcus as a significant pathogen. Clin Infect Dis. 14 : 1173-1178.

Montecalvo, M.A., Horowitz, H., Gedris, C., Carbonaro, C., Tenover, F.C., Issah, A., Cook, P. and Wormster, G.P. 1994. Outbreak of vancomycin-, anpicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. Antimicrob Agents Chemother. 38 : 1363-1367.

Murray, B.E. 1990. The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev. 3 : 46-65.

Murray, B.E. 1992. βlactamase-producing enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 36 : 2355-2359.

Murray, B.E., Lopardo, H.A., Rubeglio, E.A., Frosolono, M. and Singh, K.V. 1992. Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, β-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. Antimicrob Agents Chemother. 36 : 230-232.

Murray, B.E., Tsoa, J. and Panida, J. 1983. Enterococci from Bangkok, Thailand, with high-level resistance to currently available aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother. 23 : 799-802.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, Pa.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, Pa.

Noble, C.J. 1978. Carriage of group D streptococci in the human bowel. J Clin Pathol. 31 : 1182-1186.

Noble, W.C., Virani, Z. and Cree, R.G.A. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 93 : 195-198.

Olmsted, S.B., Dunny, G.M., Erlandsen, S.L. and Wells, C.L. 1994. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augment its internalization by cultured intestinal epithelial cells. J Infect Dis. 170 : 1549-1556.

Onderdonk, A.B., Bartlett, J.G., Lonie, T., Sullivan-Seigler, N. and Gorbach, S.L. 1976. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. Infect Immun. 13 : 22-26.

Pegues, D.A., Pegues, C.F., Hibberd, P.L., Ford, D.S. and Hooper, D.C. 1997. Emergence and dissemination of a highly vancomycin-resistant *vanA* strain of *Enterococcus faecium* at a large teaching hospital. J Clin Microbiol. 35 : 1565-1570.

Petts, D.N., Noble, W.C. and Howell, S.A. 1997. Potential for gene transfer among enterococci from a single patient and the possibility of confounding typing results. J Clin Microbiol. 35 : 1722-1727.

Perrichon, B., Reynolds, P.E. and Courvalin, P. 1996. A glycopeptide-resistant VAND *Enterococcus faecium.* *In* Program and abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (New Orleans). ASM press : Washington, DC., quoted in Leclercq, R. and Courvalin, P. 1997. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis. 24 : 545-556.

Quintiliani, Jr.,R. and Courvalin, P. 1996. Characterzation of Tn*1547*, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. Gene. 172:1-8.

Quintiliani, Jr.,R., Evers, S. and Courvalin, P. 1993. The *vanB* gene confers various level of self-transferable resistance to vancomycin in entercocci. J Infect Dis. 167:1220-1223.

Rhinehart, E., Smith, N.E., Gorss, E., Freeman, J., Eliopoulos, G.M., Moellering, Jr.,R.C. and Goldmann, D.A. 1990. Rapid dissemination of β-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant-toddler surgical ward. N Engl J Med. 323 : 1814-1818.

Rice, L.B. and Carias, L.L. 1998. Transfer of Tn*5385*, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol. 180:714-721.

Rodrigues, U. and Collins, M.D. 1990. Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. FEMS Microbiol Lett. 71 : 231-234.

Rubin, L. G., Tucci, V., Cercenado, E., Eliopoulos, G. and Isenberg, H. D. 1992. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in hospitalized children. Infect Control Hosp Epidemiol. 13 : 700-705.

Sahm, D.F. and Gilmore, M.S. 1994. Transferability and genetic relatedness of high-level gentamicin resistance among enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 38 : 1194-1196.

Sahm, D.F. and Torres, C. 1988. Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol. 26 : 250-256.

Salyer, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M. and Li, L. 1995. Conjugative transposons : an unusal and diverse of integrated gene transfer elements. Microbiol Rev. 59 : 579-590.

Schleifer, K.H. and Kilpper-Balz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 34 : 31-34.

Schlievert, P.M., Gahr, P.J., Assimacopoulos, A.P., Dinges, M.M., Stoehr, J.A., Harmala, J.W., Hirt, H. and Dunny, G.M. 1998. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. Infect Immun. 66 : 218-223.

Schulz, J.E. and Sahm, D.F. 1993. Reliability of the E-test for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* spp. J Clin Microbiol. 31 : 3336-3339.

Sexton, D.J., Harrell, L.J., Thorpe, J.J., Hunt, D.L. and Reller, L.B. 1993. A case-control study of nosocomial ampicillin-resistant enterococcal infection and colonization at a university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 14 : 629-635.

Shiojima, M., Tomita, H., Tanimoto, K., Fujimoto, S. and Ike, Y. 1997. High-level plasmid-mediated gentamicin resistance and pheromone response of plasmids present in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 41 : 702-705.

Stamey, T.A. 1980. Pathogenesis and treatment of urinary tract infection, p. 128. The Williams & Wilkins Co. : Baltimore, quoted in Murray, B.E. 1990. The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev. 3 : 46-65.

Straut, M., Cespedes, G.de., Delbos, F. and Horaund, T. 1997. Molecular typing of *Enterococcus faecalis* strains resistant to high levels of gentamicin and isolated Romania. J Antimicrob Chemother. 39 : 483-491.

Straut, M., Cespedes, G.de. and Horaud, T. 1996. Plasmid-borne high-level resistance to gentamicin in *Enterococcus hirae, Enterococcus avium*, and *Enterococcus raffinosus*. Antimicrob Agents Chemother. 38 : 1194-1196.

Swenson, J.M., Clark, N.C., Ferraro, M.J., Sahm, D.F., Doern, G., Pfaller, M.A., Barth-Reller, L., Weinstein, M.P., Zabransky, R.J. and Tenover, F.C. 1994. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microb. 32 : 1700-1704.

Swenson. J.M., Hill, B.C. and Thornsberry, C. 1989. Problem with the disk diffusion test for detection of vancomycin resistance in enterococci. J Clin Microbiol. 27 : 2140-2142.

Swenson, J.M., Hindler, J.A. and Peterson, L.R. 1995. Special tests for detecting antibacterial resistance. *In* Manual of Clinical Microbiology 6thed. pp 1356-1367. Murray, P.R. editor in chief. ASM press : Washington, D. C.

Taketomo, N., Sasaki, Y. and Sasaki, T. 1989. A new method for conjugal transfer of plasmid pAMβ1 to *Lactobacillus plantarum* using polyethylene glycol. Agric Biol Chem. 53 : 3333-3334.

Teixeira, L.M., Facklam, R.R., Steigerwalt, A.G., Pigott, N.E., Merquior, V.L.C. and Brenner, D.J. 1995. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. J Clin Microbiol. 33 : 1520-1523.

Thal, L.A., Chow, J.W., Clewell, D.B. and Zervos, M.J. 1994. Tn*924*, a chromosome-borne transposon encoding high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 38 : 1152-1156.

Thal, L.A., Chow, J.W., Petterson, J.E., Perri, M.B., Donabedian, S., Clewell, D.B. and Zervos, M.J. 1993. Molecular characterization of highly gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates lacking high-level streptomycin resistance. Antimicrob Agents Chemother. 37 : 134-137.

Tomura, T., Hirano, T., Ito, T. and Yoshioka, M. 1973. Transmission of bacteriocinogenicity by conjugation in group D streptococci. Japan J Microbiol. 17 : 445-452.

Trieu-Cuot, P., Carlier, C. and Courvalin, P. 1988. Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli.* J Bacteriol. 170 : 4388-4391.

Tsai, S.F., Zervos, M.J., Clewell, D.B., Donabedian, S.M., Sahm, D.F. and Chow, J.W. 1998. A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(2″)-Id,* in *Enterococcus* spp. Antimicrob Agents Chemother. 42 : 1229-1232.

Tyrrel, G.J., Bethune, R.N., Willey, B. and Low, D.E. 1997. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. J Clin Microbiol. 35 : 1054-1060.

Usui, Y., Ichiman, Y., Suganuma, M. and Yoshida, K. 1991. Platelet aggregation by strains of enterococci. Microbiol Immunol. 35 : 933-942.

Vandamme, P., Vercauteren, E., Lammens, C., Pensart, N., Ieven, M., Pot, B., Leclercq, R. and Goossens, H. 1996. Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. J Clin Microbiol. 34 : 2572-2576.

Vincent, S., Knight, R.G., Green, M., Sahm, D.F. and Shlaes, D.M. 1991. Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. J Clin Microbiol. 29 : 2335-2337.

Wade, J.J. 1995. The emergence of *Enterococcus faecium* resistant to glycopeptides and other standard agents-a preliminary report. J Hosp Infect. 30(Supplement) : 483-493.

Wade, J.J., Desai, N. and Casewell, M.W. 1991. Hygienic hand disinfection for the removal of epidemic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and gentamicin-resistant *Enterobacter cloacae.* J Hosp Infect. 18 : 211-218.

Weaver, K.E. and Clewell, D.B. 1988. Regulation of the pAD1 sex pheromone response in *Enterococcus faecalis* : construction and characterization of *lacZ* transcriptional fusions in a key control region of the plasmid. J Bacteriol. 170 : 4343-4352.

Weinstein, J.W., Roe, M., Towns, M., Sanders, L., Thorpe, J.J., Corey, R. and Sexton, D.J. 1996. Resistant enterococci : a prospective study of prevalence, incidence, and factors associated with colonization in a university hospital. Infect Control Hosp Epidermiol. 17 : 36-41.

Wells, C.L. and Erlandsen, S.L. 1991. Localization of translocating *Escherichia coli, Proteus mirabilis, and Enterococcus faecalis* within cecal and colonic tissues of monoassocoated mice. Infect Immun. 59 : 4693-4697.

Wells, V.D., Wong, E.S., Murray, B.E., Coudron, P.E., Williams, D.S. and Markowitz, S.M. 1992. Infectious due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis.* Ann Intern Med. 116 : 285-292.

Wright, G.D. and Ladak, P. 1997. Overexpression and Characterization of the chromosomal aminoglycoside 6′-*N*-Acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 41 : 956-960.

Zervos, M.J., Dembinski, S., Mikesell, T. and Schaberg, D.R. 1986. High-level resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* : risk factors and evidence for exogenous acquisition of infection. J Infect Dis. 153 : 1075-1083.

Zscheck, K.K. and Murray, B.E. 1993. Gene involed in the regulation of β-lactamase production in enterococci and staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 37 : 1966-1970.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำตาล และสารที่ใช้จำแนก genus และสปีชีส์ของ enterococci

การเตรียม blood agar

เตรียมโดยการชั่ง tryptic soy agar จำนวน 8 g ละลายในน้ำกลั่น 190 ml นำไปต้มและทำให้ปราศจากเชื้อโดยเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 45-50°C เติมเลือดคน (human blood) ปริมาตร 10 ml เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือด 5% เทอาหารเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 20 ml ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C 1 คืน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8°C ได้นานประมาณ 2 สัปดาห์

การเตรียม tryptic soy agar

เตรียมโดยการชั่ง tryptic soy agar จำนวน 8 g ละลายในน้ำกลั่น 200 ml นำไปต้มและคนให้เข้ากันดี นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที วางทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 60°C จากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

การเตรียม bile esculin medium

เตรียมโดยการชั่ง blie esculin medium 11.4 g เติมน้ำกลั่น 200 ml นำไปต้มและเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ 121°C 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15นาที วางทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 60°Cจากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

การเตรียม 0.04% blood agar tellurite

เตรียม blood agar ซึ่งเสริม blood 5% จำนวน 195 ml ชั่ง tellurite 0.08 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ 121°C 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นวางไว้ให้เย็นแล้วเทผสมกับ blood agar ที่เตรียมไว้เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำมาเทลงในจานเพาะเชื้อ

การเตรียม motility medium

เตรียมโดยชั่ง motility medium 2 g เติมน้ำกลั่น 100 ml นำไปต้มและคนให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13/100 mm ประมาณหลอดละ 4 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดันไอน้ำที่ 121°C 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม 6.5% NaCl broth

เตรียมโดยชั่ง Brain Heart Infusion broth (BHIB) 3.7 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เติม NaCl 6.5 g คนให้เข้ากันแล้วดูดใส่หลอดทดลอง 13/100 mm หลอดละ 3 ml จากนั้นนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม Carbohydrate fermentation broth

เตรียมโดยชั่ง BHIB 3.7 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เติม carbohydrate 1 g ลงไป คนให้เข้ากัน แล้วเติม bromocresol purple ซึ่งเตรียมไว้ก่อนแล้ว ลงไป 0.1 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นดูดใส่หลอดทดลองขนาด 13/100 mm หลอดละ 3 ml แล้วนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 °C นาน 10 นาที

สำหรับน้ำตาล sorbose, arabinose, raffinose, ribose ถ้าเตรียมโดยวิธีนี้จะสลายตัวได้ง่ายเนื่องจากใช้ความร้อนสูง จึงเตรียมเป็น stock เก็บไว้ดังนี้คือ ชั่งน้ำตาล 10 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml นำมากรองผ่านแผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.22 μm เก็บไว้ในหลอดฝาเกลียวปราศจากเชื้อ เมื่อจะใช้ให้ดูดมา 1 ml เติมลงใน BHIB 99 ml ซึ่งมี indicator คือ bromocresol purple 0.1 ml ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว จากนั้นดูดใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อขนาด 13/100 mm หลอดละ 3 ml

การเตรียม bromocresol purple

เตรียมโดยชั่ง bromocresol purple 1.6 g ละลายด้วย 95% ethanol alcohol 100 ml ใส่ขวดหุ้มด้วยกระดาษฟรอยด์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 1% arginine broth

เตรียมโดยชั่ง Moeller's decarboxylase broth base 1.05 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml เติม arginine 1 g ลงไปคนให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH ประมาณ 6.0± 0.2 จะได้สารละลายสีเขียว จากนั้นดูดใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 13/100 mm หลอดละ 3 ml แล้วนำไป

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม 1% pyruvate broth

เตรียมโดยชั่ง BHIB 3.7 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เติม pyruvate 1 g ลงไป คนให้เข้ากัน เติม bromocresol purple 0.1 ml เขย่าให้เข้ากัน ดูดใส่หลอดทดลองขนาด 13/100 mm หลอดละ 3 ml แล้วนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 °C นาน 10 นาที

การเตรียม 1% glucose broth

เตรียมเช่นเดียวกับ carbohydrate fermentation broth แต่ให้ใช้หลอดขนาด 16/150 mm แทน โดยใส่สารละลายหลอดละ 8 ml พร้อมทั้งใส่หลอดดักแก๊ส ก่อนนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ

ภาคผนวก ข. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สาร และยาต้านจุลชีพสำหรับทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธีการต่างๆ

การเตรียม Mueller Hinton agar (MHA)

เตรียมโดยชั่ง Mueller Hinton broth 21 g, Bacto agar 15 g เติมน้ำกลั่น 1 L นำไปต้มและคนให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.3 $\pm$ 0.1 นำมาแบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25X150 mm หลอดละ 25 ml แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นวางไว้จนได้อุณหภูมิประมาณ 60 ^{o}C แล้วนำแต่ละหลอดมาเทใส่จานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้

การเตรียม Brain Heart Infusion broth (BHIB)

เตรียมโดยชั่ง Brain Heart Infusion 3.7 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ

การเตรียม Brain Heart Infusion agar (BHIA)

เตรียมโดยชั่ง Brain Heart Infusion 37 g, Bacto agar 15 g เติมน้ำกลั่น 1 L นำไปต้ม คนให้เข้ากัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ

การเตรียม 0.5 MacFarland standard

เตรียมจาก 1% sulfuric acid 99.5 ml ผสมกับ 1.175% barium chloride 0.5 ml จากนั้นใส่หลอดฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่ง 0.5 MacFarland standard มีปริมาณเชื้อ 1.5X10^{8} CFU/ml

การเตรียม stock และ working solution **สำหรับทดสอบโดยวิธี** agar screening

ยา vancomycin

เตรียมเป็น stock solution โดยชั่งยาในรูปยาผงใสในขวดฝาเกลียวขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 3 mg ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 3 ml แบ่งเก็บในหลอดฝาเกลียวปราศจากเชื้อหลอดละ 1 ml จะได้ stock solution 1 mg/ml นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C สามารถเก็บได้ประมาณ 3 เดือน และเมื่อนำมาใช้แล้วไม่ควรนำกลับไปเก็บไว้ใช้ครั้งต่อไปอีก

การเตรียม working solution โดยใช้ automatic pipet ดูดยาจาก stock solution ซึ่งตั้งไว้ให้ละลายแล้วจำนวน 400 μl ใส่ใน flask ซึ่งมี BHIA จำนวน 99.6 ml ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ และตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45-50 ^{o}C และดูดยาอีก 600 μl ใส่ใน flask อีก flask ซึ่งมี BHIA จำนวน 99.4 ml เช่นกัน จากนั้นเขย่าเบาๆ ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อประมาณจานละ 20 ml จะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 4 μg/ml และ 6 μg/ml ตามลำดับ

ยา streptomycin

เตรียมเป็น stock solution โดยชั่งยาในรูปยาผงใส่ในขวดฝาเกลียวขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อจำนวน 1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 5 ml แบ่งเก็บในหลอดฝาเกลียวปราศจากเชื้อหลอดละ 1 ml จะได้ stock solution 200 mg/ml เก็บในตู้เย็นเช่นเดียวกับยา vancomycin

เตรียมเป็น working solution โดยใช้ automatic pipet ดูดยา stock จำนวน 1 ml ใส่ใน flask ซึ่งมี BHIA จำนวน 99 ml ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อและตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45-50 ^{o}C เขย่าเบาๆ ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20 ml จะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2,000 μg/ml

ยา gentamicin

เป็นยาซึ่งอยู่ในรูปยาน้ำสำหรับฉีด มีขนาด 4 mg/ml และมีขวดละ 8 mg สามารถนำมาใช้ได้ทันที เตรียมโดยใช้ automatic pipet ดูดยามาจำนวน 1 ml ใส่ใน flask ซึ่งมี BHIA จำนวน 79 ml จะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 500 μg/ml และดูดยาจำนวน 2 ml ใส่ใน flask ซึ่งมี BHIA จำนวน 78 ml จะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 μg/ml

การเตรียม stock และ working solution สำหรับทดสอบค่า MIC

ยา vancomycin

เตรียมเป็น stock solution โดยชั่งยาในรูปยาผงใส่ในขวดขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อจำนวน 3.2 mg ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 ml แบ่งเก็บในหลอดฝาเกลียวขนาดเล็กปราศจากเชื้อหลอดละ 0.5 ml จำนวน 4 หลอด จะได้ stock solution 1.6 mg/ml

เตรียมเป็น working solution โดยเจือจางยาจาก stock solution 1:10 จะได้ working solution 160 μg/ml ทำโดยนำ stock solution มา 0.5 ml เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 4.5 ml จากนั้นใช้ pipet ที่ปราศจากเชื้อดูด working solution ที่เตรียมไว้ 3 ml

ใส่ 1 ml ลงใน flask ซึ่งมี MHA จำนวน 99 ml ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อและตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 ^{o}C ที่เหลืออีก 2 ml ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ml ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นใช้ pipet อันใหม่ดูดยาจากหลอดที่เจือจางไว้ 3 ml ใส่ 1 ml ลงใน flask ซึ่งมี MHA จำนวน 99 ml ทำเช่นเดียวกันจนครบ 7 dilution ดังนี้คือ 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 μg/ml

ยา teicoplanin

เตรียม stock solution และ working solution เช่นเดียวกับยา vancomycin

ภาคผนวก ค. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด และสำหรับทำ agarose gel electrophoresis

การเตรียม Solution I

เตรียมโดยชั่ง glucose 0.99 g (50 mM), EDTA 0.37 g (10 mM) และ Tris 0.3 g (25mM) เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 ml ปรับให้ได้ pH 8.0 ด้วย NaOH นำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

การเตรียม Solution II

เตรียมโดยชั่ง NaOH pellet 0.6 g (0.3 M), SDS 3 g (3% w/v) เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 ml จะได้ pH ประมาณ 13 ควรเตรียมใหม่ๆ และนำมาใช้ทันที

การเตรียม Solution III

เตรียมโดยชั่ง sodium acetate 24.6 g (3M) เติมน้ำกลั่น และเติม glacial acetic acid จนกระทั่งได้ pH 4.8 โดยมีปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม phenol : chloroform (1:1)

เตรียมโดยผสม phenol และ chloroform ปริมาตรเท่าๆ กัน แล้วเติม 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 เขย่าแรงๆ ให้ผสมกัน ปล่อยให้แยกชั้นดูดชั้นบนออกทิ้งไป สกัดซ้ำด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 อีก 2-3 ครั้ง เติม 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 ให้ท่วมผิวสารละลาย เก็บในขวดสีเข้มที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

การเตรียม TE บัฟเฟอร์

เตรียมโดยผสม 50 mM Tris-HCl pH 8 และ 1 mM EDTA pH 8 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม Rnase A

เตรียมโดยชั่ง Rnase A 100 mg และละลายในสารละลายปริมาตร 10 ml ที่มี 10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 15 mM NaCl ผสมอยู่ในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่ eppendorf เก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{o}C เอนไซม์นี้จะยังคงทำงานได้ดี แม้จะผ่านการทำ freeze-thaw หลายๆ ครั้ง

การเตรียม electrophoresis **บัฟเฟอร์** (TBE 5X)

เตรียมโดยชั่ง Tris 54 g, boric acid 27.5 g และเติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) จำนวน 20 ml (ซึ่งเตรียมโดยชั่ง EDTA 14.61 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ปรับให้ได้ pH 8.0 ด้วย NaOH pellet) จากนั้นผสมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 L เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม Ethidium bromide (5 mg/ml)

เตรียมโดยชั่ง Ethidium bromide 0.5 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนให้ผสมกันโดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารละลาย (ใช้เวลาหลายชั่วโมง) เก็บใส่ขวดสีชา หรือหุ้มด้วยกระดาษฟรอยด์เนื่องจากไวต่อแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะใช้ให้นำมาเจือจางในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 μg/ml

การเตรียม loading dye (5 mg/ml)

0.25% Bromophenol blue

0.25% Xylene cyanol

15% Ficoll type 400

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ง. ตารางมาตรฐานสำหรับสำหรับแปลผลความไวของ *Enterococcus* spp. ต่อยาต้านจุลชีพ

Antimicrobial Agent	Disk content (μg)	Zone Diameter (nearest whole mm)			MIC Breakpoint (μg/ml)	
		Resistant	Intermediate	Susceptible	Resistant	Susceptible
Ampicillin	10	≤ 16		≥ 17	≥ 16	
Penicillin	10 units	≤ 14		≥ 15	≥ 16	
Gentamicin	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Streptomycin	10	≤ 11	12-14	≥ 15	*	*
Vancomycin**	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 4
Teicoplanin**	30	≤ 10	11-13	≥ 14	≥ 32	≤ 8
Fosfomycin	50	≤ 11	12-14	≥ 15		
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Ciprofloxacin	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≥ 1

หมายเหตุ *MIC โดยวิธี broth microdilution ค่าดื้อ ≥ 1,000 μg/ml
และวิธี agar dilution ให้ค่า ≥ 2,000 μg/ml
**ควรอ่านผล 24 ช.ม. และใช้ transmitted light

ที่มา : Acar, J. and Goldstein, F.W., 1996, หน้า 15-17.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววราภรณ์ คงสุวรรณ

วัน เดือน ปีเกิด 22 พฤศจิกายน 2510

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (พยาบาลและผดุงครรภ์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2532

ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ปีการศึกษา 2540-2541

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

พยาบาลระดับ 6 ฝ่ายบริการพยาบาล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา