



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางการแพทย์

จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การตรวจหาและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Enterococcus* spp.
ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในสุกร

Detection and Phenotypic Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci
in Pigs

نامผู้วิจัย

นายจักรพันธ์ พิมาน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์จันทิมา พุกษากร, ปร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อ่องอาจ เล่าหิวนิจ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Enterococcus* spp.

ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในสุกร

Detection and Phenotypic Characterization of
Vancomycin-Resistant Enterococci in Pigs

โดย

นายจักรพันธ์ พิมาน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)

พ.ศ. 2556

จักรพันธ์ พิมาน 2556: การตรวจหาและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่
ดื้อต่อยา vancomycin ในสุกร ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แพทย) สาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางการแพทย์ ภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์จันทิมา พุกษาร, ปร.ด. 157 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา
vancomycin (VRE) ในตัวอย่างอุจจาระที่ได้สุ่มเก็บจากลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร จากฟาร์ม
ในเขตภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 4 ฟาร์ม ตัวอย่างอุจจาระถูกสุ่มเก็บโดยวิธี rectal swab
ทั้งหมด 179 ตัวอย่าง ทำการคัดกรองเชื้อ VRE เบื้องต้นโดยใช้อาหาร bile-esculin azide agar ที่มี
ส่วนผสมของยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ทำการพิสูจน์เชื้อที่แยกได้ ใน
ระดับจีโนมและสปีชีส์ด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา
ต้านจุลชีพทำโดยวิธี disc diffusion technique และวิธี agar dilution technique ผลการศึกษาใน
ทั้งหมด 179 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยาปานกลาง (VIRE) มีค่า MICs ตั้งแต่ 8-16
ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในสุกร 43 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.02 โดยพบในลูกสุกรคิดเป็นร้อยละ
19.67 ในสุกรขุนร้อยละ 25 และในแม่พันธุ์สุกรร้อยละ 27.59 และสามารถแยกเชื้อ VIRE ได้รวม
ทั้งหมด 52 isolates อัตราการพบเชื้อ VIRE ในสุกรทุกช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพตัวอื่น โดย disc diffusion
technique พบว่าเชื้อ VIRE มีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline สูงที่สุด ร้อยละ 86.54 รองลงมาคือ ยา
erythromycin ร้อยละ 61.54, ยา ampicillin ร้อยละ 53.85, ยา chloramphenicol ร้อยละ 34.62, ยา
ciprofloxacin ร้อยละ 32.69, ยา gentamicin (ระดับสูง) ร้อยละ 15.38, ยา quinupristin-dalfopristin
ร้อยละ 13.46, ยา linezolid และ ยา streptomycin (ระดับสูง) ร้อยละ 11.54, ยา rifampin ร้อยละ
9.62, ยา fosfomycin ร้อยละ 3.8, ยา nitrofurantoin ร้อยละ 1.92 และไวต่อยา teicoplanin ทั้งหมด
นอกจากนี้มีการดื้อยากลุ่ม MLS_B ร้อยละ 90.38 (47 จาก 52 isolates) สปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ
E.gallinarum ร้อยละ 71.15 รองลงมา คือ *E. casseliflavus* ร้อยละ 21.15 และมีเชื้อที่ไม่สามารถ
ระบุสปีชีส์ได้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีร้อยละ 7.69 จากข้อมูลดังกล่าวบ่งบอกได้ว่า
สุกรเป็นแหล่งของการพบเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* ที่มีการดื้อยา vancomycin ใน
รูปแบบ VanC พิโนไทป์

Chakrabhandhu Pimarn 2013: Detection and Phenotypic Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci in Pigs. Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Mrs. Chantima Pruksakorn, Ph.D. 157 pages.

A cross-sectional study was performed to characterize vancomycin-resistant enterococci (VRE) in fecal samples of suckling pigs, fattening pigs and breeding sows from 4 farms of the Central Region, Thailand. A total of 179 rectal swabs were screened for VRE by plating on bile-esculin azide selective agars supplemented with 6 µg/ml vancomycin. All collective isolates were identified into the genus and species levels by biochemical tests. Antimicrobial susceptibility was tested by the disc diffusion and agar dilution techniques. Of the 179 samples, 43 samples were VIRE (24.02%) with MICs ranging from 8-16 µg/ml. VIRE were found in 12 of 61 (19.67%) suckling pigs, 15 of 60 (25%) fattening pigs and 16 of 58 (27.59%) breeding sows. There were no significant differences in prevalence of VIRE in each age group. Of 52 VIRE isolates, VIRE were resistant to tetracycline 86.54%, erythromycin 61.54%, ampicillin 53.85%, chloramphenicol 34.62%, ciprofloxacin 32.69%, gentamicin (high level) 15.38%, quinupristin-dalfopristin 13.46%, linezolid 11.54%, streptomycin (high level) 11.54%, rifampin 9.62%, fosfomycin 3.8% and nitrofurantoin 1.92%, respectively. All isolates were susceptible to teicoplanin. A total of 47 in 52 (90.38%) VIRE isolates were MLS_B phenotype. Among the VIRE strains, the prevalence of *Enterococcus gallinarum* was 71.15%, *E. casseliflavus* was 21.15% and unidentified species was 7.69%. In conclusion, pigs are reservoirs of vancomycin-resistant *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* VanC phenotype.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์ ดร.จันทิมา พุกยากร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไข

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ และคณะเทคนิคการสัตวแพทย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ และขอขอบคุณพ่อแม่ ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่ได้ช่วยเป็นกำลังใจในการศึกษาจนสำเร็จในครั้งนี้

จักรพันธ์ พิมาน

มกราคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	49
อุปกรณ์	49
วิธีการ	53
ผลและวิจารณ์	75
สรุปและข้อเสนอแนะ	97
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	99
ภาคผนวก	124
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	125
ภาคผนวก ข การเตรียมความเข้มข้นมาตรฐาน และความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้าน จุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MICs) จากการทดสอบความไวยา ของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์	138
ภาคผนวก ค เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน	144
ภาคผนวก ง ภาพแสดงลักษณะโคโลนี รูปร่างของเชื้อ VRE และ VIRE การยืนยัน ผลด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี และการทดสอบความไวยา ต้านจุลชีพ	146
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	157

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อสปีชีส์ของ <i>Enterococcus</i> spp.	10
2	ลักษณะการดื้อของยาในกลุ่ม glycopeptide ของเชื้อ enterococci ในรูปแบบต่างๆ	24
3	สรุปการดื้อยาด้านจุลชีพในเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp.	38
4	ฟาร์มตัวอย่าง แสดงขนาดของฟาร์ม ที่ตั้ง ช่วงอายุสุกรที่เก็บ และจำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละฟาร์ม	53
5	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp. ในแต่ละสปีชีส์	62
6	ฟาร์มตัวอย่าง แสดงขนาดของฟาร์ม ที่ตั้ง และยาที่ใช้ในช่วงอายุของสุกรในแต่ละฟาร์ม	75
7	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) และเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทำ disc diffusion technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี	78
8	จำนวน isolates ที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) และเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทำ disc diffusion technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี	79
9	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) และเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทำ agar dilution technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี	81
10	จำนวน isolates ที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) และเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทำ agar dilution technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี	82

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	สปีชีส์ของ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จาก 52 isolates แบ่งจำแนกตามรุ่นสุก	85
12	รูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE)	90
13	การดื้อยาด้านจุลชีพกลุ่ม MLS_B ของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จำนวน 52 isolates	91
14	จำนวนของยาด้านจุลชีพที่เชื้อดื้อยาและรูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE)	96
ตารางผนวกที่		
ข1	การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland Standards)	139
ข2	ความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc diffusion technique โดยวิธี Kirby-Bauer	140
ข3	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MICs) จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดยวิธี agar dilution technique	142
ค1	เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน	145

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การสร้าง peptidoglycan และกลไกการออกฤทธิ์ของยา vancomycin	20
2 การดื้อต่อยากลุ่ม glycopeptides ประเภท <i>vanA</i>	21
3 การดื้อต่อยากลุ่ม glycopeptides ประเภท <i>vanC</i>	23
4 รูปแบบสำหรับการวาง disc ยา clindamycin (DA) และ erythromycin (E)	70
5 เชื้อดื้อยา (resistance) หรือดื้อยาปานกลาง (intermediate) ต่อยาทั้ง E และ DA ซึ่งพบว่า inhibition zone ของ DA เป็นรูปตัว D	70
6 เชื้อดื้อยา (resistance) หรือดื้อยาปานกลาง (intermediate) ต่อยาทั้ง E และ DA แต่ inhibition zone ไม่เป็นรูปตัว D	71
ภาพผนวกที่	
ง1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin อายุ 24 ชั่วโมง บนอาหาร tryptic soy agar	147
ง2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร bile-esculin azide agar ที่ผสมยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ dilution 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ลักษณะโคโลนีมีสีน้ำตาล หรือดำ มีโซนสีดำ หรือสีน้ำตาลเข้มรอบๆ โคโลนี	147
ง3 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp. เมื่อย้อมสีแกรมและส่องดูด้วย กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	147
ง4 การทดสอบการเจริญเติบโตในความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 6.5% (6.5% salt broth test)	148
ง5 การทดสอบการเจริญเติบโตในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	148
ง6 ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) ของเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp.	149
ง7 การทดสอบการสลายสาร L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) ของเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp.	149

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง8 ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ leucine- β -naphthylamide (LAP)	150
ง9 การทดสอบการสลายสาร leucine- β -naphthylamide (LAP) ของเชื้อ <i>Enterococcus</i> spp.	150
ง10 ตัวอย่างการพิสูจน์เชื้อ <i>Enterococcus</i> spp. ในระดับสปีชีส์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (<i>E. faecalis</i>)	151
ง11 ตัวอย่างการพิสูจน์เชื้อ <i>Enterococcus</i> spp. ในระดับสปีชีส์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (<i>E. gallinarum</i>)	152
ง12 ตัวอย่างการพิสูจน์เชื้อ <i>Enterococcus</i> spp. ในระดับสปีชีส์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (<i>E. casseliflavus</i>)	153
ง13 การทดสอบการทนต่อ tellurite	154
ง14 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc-diffusion technique โดยวิธี Kirby-Bauer	155
ง15 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย double disc diffusion technique	155
ง16 เครื่อง microplanter ใช้ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดยวิธี agar dilution technique	156
ง17 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดย agar dilution technique ของเชื้อ VRE และ VIRE ที่แยกได้จากอุจจาระสุกร	156

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AAC	=	aminoglycoside acetyltransferase
AMP	=	ampicillin 10 microgram
ANT	=	aminoglycoside adenylyltransferase
APH	=	aminoglycoside phosphotransferase
ATCC	=	American Type Culture Collection
BHI	=	Brain-Heart Infusion
Bla ⁺	=	β -lactamase producing
C	=	chloramphenicol 30 microgram
CDC	=	Center for Disease Control and Prevention
CFU	=	Colony Forming Unit
CIP	=	ciprofloxacin 5 microgram
CLSI	=	Clinical and Laboratory Standard Institute
CN	=	gentamicin 120 microgram
DA	=	clindamycin 2 microgram
DNA	=	deoxyribonucleic acid
E	=	erythromycin 15 microgram
ECA	=	Enterococcosel TM agar
<i>erm</i>	=	erythromycin resistance methylase
<i>et al.</i>	=	and colleagues
F	=	nitrofurantoin 300 microgram
FOS	=	fosfomycin 50 microgram
GRE	=	glycopeptides resistant enterococci
HLGR	=	high-level gentamicin resistance
HLSR	=	high-level streptomycin resistance
I	=	intermediate resistance
LAP	=	leucine- β -naphthylamide
LAPase	=	leucine aminopeptidase
LZD	=	linezolid 15 microgram

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

MHA	=	Mueller Hinton agar
MICs	=	Minimal Inhibitory Concentrations
MLS _B	=	macrolides, lincosamides and streptogramins B
PBP	=	penicillin binding protein
PCR	=	polymerase chain reaction
PYR	=	L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide
PYRase	=	L-pyrrolidonyl arylamidase
QD	=	quinupristin-dalfopristin 15 microgram
RD	=	rifampin 5 microgram
RNA	=	ribonucleic acid
S	=	sensitive
S	=	streptomycin 300 microgram
sp.	=	specie
spp.	=	species
TE	=	tetracycline 30 microgram
UK	=	United Kingdom
USA	=	United State of America
UTI	=	urinary tract infection
VRE	=	vancomycin resistant enterococci

การตรวจหาและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในสุกร

Detection and Phenotypic Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Pigs

คำนำ

เชื้อ enterococci เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และระบบปัสสาวะของมนุษย์และสัตว์ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ พืช ฟาร์มสัตว์ และอาหาร เป็นต้น อีกทั้งเชื้อ enterococci สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) และเจริญได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Teixeira *et al.*, 2007) เชื้อมีคุณสมบัติติดสีแกรมบวก รูปทรงกลม (gram-positive cocci) หรืออาจพบเซลล์เป็นแบบแท่งกลม (coccobacilli) มีการเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ เป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือเกาะกลุ่ม ในอดีตนั้นเชื้อ enterococci จัดอยู่ในยีสต์ *Streptococcus* และจัดอยู่ใน group D ตามระบบของ Lancefield จึงมีชื่อเรียกว่า enterococcal group D streptococci ต่อมาพบว่าคุณสมบัติหลายประการ ทั้งจากการจำแนกเชื้อตามลักษณะที่ตรวจพบได้ (phenotypic identification) และจากการจำแนกเชื้อตามลักษณะพันธุกรรม (genotypic identification) พบว่ามีความแตกต่างจาก streptococci อื่นๆ รวมถึง *Streptococcus bovis* ที่อยู่ใน group D streptococci เหมือนกัน และพบว่าลำดับของยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ *Vagococcus*, *Tetragenococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่า *Streptococcus* และ *Lactococcus* ซึ่งมีคุณสมบัติตามลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับ enterococcal group D streptococci ดังนั้นในปี ค.ศ. 1984 Schleifer และ Kilpper จึงมีการเสนอให้ย้ายเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาเป็นยีสต์ใหม่ที่มีชื่อว่า *Enterococcus* อย่างเป็นทางการ (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984)

นอกจากนี้เชื้อ enterococci เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลของผู้ป่วย (nosocomial infection) และการติดต่อจากผู้ป่วยผ่านทางสัมผัส ในการติดเชื้อนั้นสามารถเกิดได้จากเชื้อประจำถิ่นในตัวผู้ป่วย (endogenous infection) และการได้รับเชื้อจากภายนอก (exogenous infection) โรคติดเชื้อ enterococci ในคนแบ่ง

ออกเป็นระบบได้แก่ โรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) โรคติดเชื้อในช่องท้องและอุ้งเชิงกราน (intra abdominal and pelvic infection) เช่น โรคเยื่อช่องท้องอักเสบ (peritonitis) และโรคฝีหนองในช่องท้อง การติดเชื้อของบาดแผลและเนื้อเยื่ออ่อน (wound and soft tissue infection) เช่น โรคติดเชื้อของกระดูกและกล้ามเนื้อ (osteomyelitis) โรคลิ้นหัวใจอักเสบ (endocarditis) และการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) (ภัทรชัย, 2549; Poeta *et al.*, 2006) โรคติดเชื้อ enterococci ในสัตว์ ได้แก่ การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ในไก่ เต้านมอักเสบในโค (bovine mastitis) ลิ้นหัวใจอักเสบในโค และลูกแกะ การติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะในสุนัข (urinary tract infection) ซึ่งโรคในสัตว์ดังกล่าวส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อ *E. faecalis*, *E. faecium* และ *E. durans* (Quinn *et al.*, 1994)

โดยปกติแล้วเชื้อ enterococci มีการดื้อยาหลายชนิด และมีแบบแผนความไวต่อยาที่ไม่แน่นอน โดยทั่วไปแล้วเชื้อ enterococci มีการดื้อยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins และ monobactam โดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) ส่วนยาในกลุ่ม aminoglycosides เชื้อมีการดื้อยาในระดับต่ำ (low-level resistance) แต่ยาในกลุ่ม aminoglycosides ในปริมาณสูงเมื่อใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม β -lactams และ glycopeptides จะช่วยเสริมฤทธิ์ (synergism) กันในการรักษา ได้แก่ gentamicin และ streptomycin หากพบว่าเชื้อ enterococci ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides และยาในกลุ่ม β -lactams ยาหลักที่ใช้รักษาคือ ยาในกลุ่ม glycopeptides (ภัทรชัย, 2549) ดังนั้นปัญหาการดื้อยาที่สำคัญของ enterococci คือ มีการตรวจพบเชื้อ enterococci ที่ดื้อต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant enterococci) หรือเรียกสั้นๆ ว่า VRE ในปี พ.ศ. 2529 มีการตรวจพบ VRE ครั้งแรกที่ยุโรป จากฟาร์มที่ใช้ยาในกลุ่ม glycopeptides คือ avoparcin ต่อมาจึงมีประกาศห้ามใช้ยาในกลุ่ม glycopeptides โดยเด็ดขาดทั้งในสหภาพยุโรป และประเทศสหรัฐอเมริกา เนื่องจากสูตรโครงสร้างของยา avoparcin และ vancomycin คล้ายกันมาก ส่วนในประเทศไทยได้จัดยาในกลุ่มดังกล่าวเป็นรายการยาที่ใช้ นอกเหนือจากฉลากที่มีทะเบียนตำรับถูกต้อง (extra label use) หรือห้ามโดยเด็ดขาดในสัตว์ที่บริโภคเป็นอาหาร และในปี พ.ศ. 2531 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาได้รายงานว่าพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ VRE ครั้งแรก นอกจากนี้มีข้อมูลจากศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (CDC) ของสหรัฐอเมริกาว่ามีการติดเชื้อ VRE เพิ่มขึ้นสูงถึง 35 เท่าจากผู้ป่วยในโรงพยาบาล ในระหว่างปี ค.ศ. 1989-1993 (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545; ศศิธร, 2547; Center for Disease Control and Prevention [CDC], 1993; Zouain and Araj, 2001) และพบว่าการระบาดของเชื้อ VRE เกิดจากการใช้ยา vancomycin เพิ่มขึ้นในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแกรมบวกที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam และผู้ป่วยที่ติดเชื้อสายพันธุ์ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Shlaes, 1992) ดังนั้นปัญหา

การดื้อยาในกลุ่ม glycopeptides จึงมีผลกระทบต่อการรักษาผู้ป่วยอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ VRE ถ้ายาในกลุ่มนี้ไม่สามารถรักษาผู้ป่วยได้จึงจำเป็นต้องใช้ยา quinupristin/dalfopristin (Synercid) และ linezolid (Zyvox) ซึ่งมีราคาแพงใช้ในการรักษา

ในยุโรปมีรายงานการพบเชื้อ VRE ที่แยกจากสัตว์เศรษฐกิจและผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ แสดงให้เห็นว่าการพบเชื้อ VRE มีสาเหตุมาจากการใช้ยา avoparcin เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ โดยเฉพาะฟาร์มไก่และสุกร (Aarestrup, 1995; Bager *et al.*, 1997; Klare *et al.*, 1995) นอกจากนี้การพบเชื้อ VRE ในอุจจาระของสัตว์ที่เพิ่มขึ้นสามารถถ่ายทอดเชื้อ VRE จากสัตว์ไปสู่คนได้อีกด้วย (Wegener *et al.*, 1999) ในปี ค.ศ. 1997 ประเทศในเครือสหภาพยุโรป จึงได้ประกาศยกเลิกใช้ยา avoparcin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ ต่อมาหลังจากมีการห้ามใช้ยา avoparcin แล้วพบว่าในประเทศเดนมาร์กมีการพบเชื้อ *E. faecium* ที่ดื้อต่อยา vancomycin (VREM) ในตัวอย่างอุจจาระของสัตว์ปีกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 80% ในปี ค.ศ. 1995 เหลือเป็นน้อยกว่า 5% ในปี ค.ศ. 1998 เหมือนกับที่มีรายงานในประเทศเยอรมันพบว่าความชุกของเชื้อ VRE ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกลดลงจาก 100% ในปี ค.ศ. 1995 เป็น 25% ในปี ค.ศ. 1997 การลดลงของความชุกของเชื้อ VRE ในตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ที่มีสุขภาพดีจาก 12% ในปี ค.ศ. 1994 เป็น 3% ในปี ค.ศ. 1997 และความชุกของเชื้อ VRE ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกลดลงจาก 15% เหลือ 8% ในประเทศอิตาลี (Bager *et al.*, 1999; Klare *et al.*, 1999; Pontosti *et al.*, 1999)

อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบความชุกของเชื้อ VRE ในระดับสูงในฟาร์มสัตว์ (7.1-85%) หลังการยกเลิกใช้ยา avoparcin ในประเทศนอร์เวย์ กรีซ สหรัฐอเมริกา สเปน และได้หวัน (Aarestrup, 2000; Boerlin *et al.*, 2001; Borgen *et al.*, 2000; Donabedian *et al.*, 2010; Hammerum *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2000; Lauderdale *et al.*, 2007; Kotzamanidis *et al.*, 2009) ซึ่งหมายความว่ายังมีปัจจัยอื่นที่เป็นสาเหตุของการเกิดเชื้อ VRE นอกเหนือจากการใช้ยา avoparcin และพบว่า VRE มีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline หรือ ยา tylosin (กลุ่ม macrolides) ที่สูงร่วมด้วย จึงอนุมานได้ว่าการใช้ยาเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการคงอยู่ของเชื้อ VRE ในฟาร์มสัตว์ เนื่องจากพบว่าสายพันธุ์กรรมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม glycopeptides, ยาในกลุ่ม macrolides และยาในกลุ่ม tetracycline อยู่ใกล้กันมากบนพลาสมิดเดียวกัน (Aarestrup, 2000; Boerlin *et al.*, 2001; Hammerum *et al.*, 2004)

นอกจากเชื้อ VRE จะเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขแล้ว ยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2541 ได้พบผู้เสียชีวิตจากเชื้อ VRE ในประเทศญี่ปุ่น จึงเป็นทำให้กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย นำโดยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. Yasuyoshi Ike ตรวจแหล่งที่มาของเชื้อ VRE และสามารถแยกเชื้อ VRE ในเนื้อไก่นำเข้าจากประเทศอื่นๆ รวมทั้งประเทศไทย และพบการปนเปื้อนของ VRE ในเนื้อไก่ไทยถึง 20% (Ike *et al.*, 1999) ซึ่งทำให้เนื้อไก่จากประเทศไทย ถูกระงับการนำเข้า จึงมีผลกระทบต่อ การส่งออกเนื้อไก่ และผลิตภัณฑ์จากไก่อย่างมากมาในช่วงเวลานั้น (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545; ศศิธร, 2547)

ส่วนในฟาร์มสุกรนั้นพบว่ามีความชุกของ VRE เช่นกัน (Kotzamanidis *et al.*, 2009) แต่ไม่มีรายงานการศึกษา VRE ที่พบในสุกรในประเทศไทย ดังนั้นเป้าหมายของการศึกษานี้ คือ เพื่อสำรวจหาเชื้อ VRE จากฟาร์มสุกร ตัวอย่างเขตภาคกลาง ในกลุ่มอายุต่างๆ ได้แก่ ลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร เพื่อแยกสปีชีส์ของเชื้อ enterococci ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทดสอบความไวของเชื้อ VRE ต่อต้านจุลชีพ ด้วยการทดสอบความไวของเชื้อต่อต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc-diffusion technique และ double disc diffusion technique และการทดสอบความไวของเชื้อต่อต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดยใช้วิธี agar dilution technique และเพื่อเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ VRE ในสุกรในแต่ละกลุ่มอายุด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ VRE ในระดับสปีชีส์ที่เก็บตัวอย่างมาจาก
อุจจาระสุกรโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี
2. เพื่อทดสอบความไวของเชื้อ VRE ต่อยาต้านจุลชีพด้วยการทดสอบความไวของเชื้อ
ต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc diffusion technique โดยวิธี
Kirby-Bauer และ double disc diffusion technique รวมทั้งการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุล
ชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดยใช้วิธี agar dilution technique
3. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ VRE ในสุกรในแต่ละกลุ่มอายุด้วยการวิเคราะห์ทาง
สถิติ

การตรวจเอกสาร

เชื้อ *Enterococcus* spp.

1. คุณสมบัติและลักษณะของ *Enterococcus* spp.

เชื้อ enterococci เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และระบบปัสสาวะของมนุษย์และสัตว์ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ พืช ฟาร์มสัตว์ และอาหาร เป็นต้น อีกทั้งเชื้อ enterococci สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) และเจริญได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อมีคุณสมบัติติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม (gram-positive cocci) หรืออาจพบเซลล์เป็นแบบแท่งกลม (cocci bacilli) มีการเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ เป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือเกาะกลุ่ม จัดอยู่ใน group D antisera และบางสายพันธุ์อยู่ใน group Q antisera ไม่มี cytochrome enzymes ปัจจุบัน enterococci สายพันธุ์ใหม่ๆ ให้ผลลบเมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยากับ Lancefield group D antisera และสภาวะการเจริญเติบโตแตกต่างจากลักษณะของ *E. faecalis* และ *E. faecium* เช่น *E. columbae* และ *E. sulfereus* ให้ผลลบต่อ group D antisera และ *E. malodoratus* ให้ผลลบต่อการเจริญเติบโตที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นต้น (Manero and Blanch; 1999; Teixeira *et al.*, 2007) การจำแนกเชื้อตามลักษณะที่ตรวจพบได้ (phenotypic identification) ได้แก่ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งอุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อระดับ pH 9.6 ได้ สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 6.5 % รวมทั้งสามารถอยู่ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 30 นาที นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวแล้วยังมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่พบโดยทั่วไปของเชื้อ enterococci ได้แก่ ให้ผลลบจากการทดสอบ catalase (บางสปีชีส์อาจให้ผล catalase เทียม) สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 40% รวมถึงมีคุณสมบัติต่อการสลาย esculin ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถสลายสาร L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) โดยเอนไซม์ L-pyrrolidonyl arylamidase (PYRase) และสามารถสลาย leucine- β -naphthylamide (LAP) โดยการสร้าง leucine aminopeptidase (LAPase) ได้ (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984; Sherman, 1937; Teixeira *et al.*, 2007)

วิธีการทดสอบที่รวดเร็วได้แก่ การสลาย esculin, การทดสอบ urease, การดื้อต่อน้ำดี, การดื้อต่อ β -glucosidase และ β -glucuronidase และการทดสอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาล

mannitol, sorbose และ sorbital เป็นต้น (Teixeira *et al.*, 2007) นอกจากนี้เชื้อ enterococci ยังเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็น probiotics ได้อีกด้วย เช่น *Enterococcus faecium* KH24 (Bhardwaj *et al.*, 2010)

สำหรับการจัดอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของเชื้อ *Enterococcus* spp. มีลักษณะดังต่อไปนี้

Kingdom Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Lactobacillales

Family Enterococcaceae

Genus *Enterococcus*

2. ประวัติของเชื้อ *Enterococcus* spp.

เชื้อ enterococci เดิมจัดอยู่ในจีนัส *Streptococcus* ชื่อแรกที่ใช้เรียกชื่อ คือ entérocoque มาจากรายงานงานวิจัยจากประเทศฝรั่งเศส ในปี ค.ศ. 1899 (Thiercelin, 1899) งานวิจัยต่อมาได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ enterococci สามารถสลายเมือกเลือดแดงได้ (Sherman, 1937) ในปี ค.ศ. 1906 Andrews และ Horder ได้ใช้ชื่อ *Streptococcus faecalis* (faecalis มาจากคำว่า faeces) จากเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคคลื่นหัวใจอักเสบ (Andrews and Horder 1906)

ในปี ค.ศ. 1919 Orla-Jensen ได้มีการบรรยายถึงสายพันธุ์ *S. glycerinaceus* และ *S. faecium* (Orla-Jensen, 1919) ต่อมาชื่อดังกล่าวได้เลิกใช้ และเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้มีการพิจารณาให้ใช้ชื่อว่า *S. faecalis* (Sherman, 1937)

ในปี ค.ศ. 1937 ได้ยอมรับคำว่า enterococcus ซึ่งหมายถึง เชื้อที่แตกต่างจากคำนิยามของ faecal streptococcus ซึ่งคำนิยามดังกล่าวมีความขัดแย้งกับ *S. faecalis* (Sherman, 1937) ได้มีการเสนอรายการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อซึ่งแยก streptococcus ไปเป็น 4 ประเภท ได้แก่ pyogenic, viridians, lactic และ enterococcus คำว่า enterococcus ได้ใช้กับจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งอุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

6.5% และสามารถทนต่อระดับ pH 9.6 ได้ รวมทั้งสามารถอยู่ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 30 นาที และความสามารถในการสลาย bile esculin ได้ (Sherman, 1937) ซึ่งรายการดังกล่าวมีการสอดคล้องกับทางชีวรั่ววิทยา ที่มีความแตกต่างของแอนติเจนที่อยู่บน โพลีแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์ นำไปสู่การแบ่งกลุ่มตามระบบ Lancefield ในช่วงทศวรรษที่ 30 พบว่าเชื้อ enterococci จัดอยู่ใน group D antisera ตามระบบของ Lancefield จึงมีชื่อเรียกว่า enterococcal group D streptococci ขณะที่ pyogenic streptococci จัดอยู่ใน group A, B, C, E, F หรือ G และพวกกลุ่ม viridians ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ ในการจำแนกกลุ่มของ enterococci ในระบบ Lancefield ทำได้หลายวิธี เช่น convention method, latex agglutination test และ slide coagglutination test สำหรับในเฉพาะ group D antisera นั้นสามารถแยกได้โดยวิธี latex agglutination test ซึ่งเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป เชื้อใน group D antisera นี้จะพบกรด glycerol teichoic ที่ประกอบด้วย D-alanine และ glucose ที่ผนังเซลล์ของเชื้อ (ภัทรชัย, 2549; Quinn *et al.*, 1994) ในช่วงเวลานั้นสปีชีส์ enterococci ที่รู้จักคือ *S. faecalis*, *S. zymogens*, *S. liquefaciens* และ *S. durans* ปฏิกริยาทางชีวเคมีพื้นฐานสำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ คือ การสลายเม็ดเลือดแดง และการย่อยโปรตีน บางงานวิจัยแสดงให้เห็นถึงการสลายเม็ดเลือดแดงที่พลาสมิดเป็นตัวกลาง และสามารถถ่ายทอดไปยังสายพันธุ์ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดงได้ (Ike *et al.*, 1987) แต่ถึงอย่างไรก็ตามการสลายเม็ดเลือดแดงไม่สามารถนำมาจัดกลุ่มได้ เพราะไม่มีความเสถียร เนื่องจากพบว่าเชื้อในสปีชีส์เดียวกัน อาจจะมีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกัน เช่น *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* และ *E. durans* มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงได้ทั้งสามรูปแบบ ได้แก่ ไม่มีการสลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolysis หรือ gamma hemolysis), การสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (complete hemolysis หรือ beta hemolysis) และการสลายเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ (partial hemolysis หรือ alpha hemolysis) (Quinn *et al.*, 1994)

งานวิจัยจำนวนหนึ่งในช่วงปี ค.ศ. 1940 และ 1950 แสดงถึง *S. faecium* ที่เคยมีรายงานโดย Orla-Jensen ในปี ค.ศ. 1919 ได้ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีที่แตกต่างจาก *S. faecalis* คือ การยับยั้งโดย potassium tellurite, ปฏิกริยาการ fermentation และการขาดความสามารถลด tetrazolium ไปเป็น formazan (Barnes, 1956; Deibel, 1964 and Hartman *et al.*, 1966)

ในปี ค.ศ. 1970 Kalina ได้เสนอให้ย้าย *S. faecalis* และ *S. faecium* ไปยังจีนัส *Enterococcus* (Kalina, 1970) แต่ไม่มีการยื่นข้อเสนอมให้เปลี่ยนแปลง ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 เมื่อมีการศึกษา DNA-DNA และ RNA-RNA hybridization และจากการจำแนกเชื้อตามลักษณะ

พันธุกรรม (genotypic identification) พบว่ามีความแตกต่างจาก streptococci อื่นๆ รวมถึง *Streptococcus bovis* ที่อยู่ใน group D streptococci เหมือนกัน และพบว่าลำดับของยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ *Vagococcus*, *Tetragenococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่า *Streptococcus* และ *Lactococcus* ซึ่งมีคุณสมบัติตามลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับ enterococcal group D streptococci ดังนั้น Scheleifer และ Klipper จึงมีการเสนอให้ย้ายเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาเป็น จินส์ใหม่ที่มีชื่อว่า *Enterococcus* อย่างเป็นทางการ (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984)

การจัดจินส์ใหม่ได้มีขึ้นในปี ค.ศ. 1984 ซึ่งประกอบด้วย *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* ต่อมาได้มีอีก 32 สปีชีส์ที่เข้ามาเป็นสมาชิกใหม่ของจินส์ โดยมีการศึกษาทาง chemotaxonomic และ phylogenetic studies (Dunne, 1996) นอกจากนี้มีหลักฐานการศึกษา ลำดับ 16S rRNA สมาชิกของจินส์มีรายชื่อตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายชื่อสปีชีส์ของ *Enterococcus* spp.

ชื่อสปีชีส์ในปัจจุบัน	การรายงานสปีชีส์	ชื่อในอดีต
<i>faecalis</i>	Schleifer and Kilpper-Balz (1984)	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>faecium</i>	Schleifer and Kilpper-Balz (1984)	<i>Streptococcus faeium</i>
<i>avium</i>	Collins <i>et al.</i> (1984)	<i>Streptococcus avium</i>
<i>casseliflavus</i>	Collins <i>et al.</i> (1984)	<i>Streptococcus casseliflavus</i>
<i>gallinarum</i>	Collins <i>et al.</i> (1984)	<i>Streptococcus gallinarum</i>
<i>durans</i>	Collins <i>et al.</i> (1984)	<i>Streptococcus durans</i>
<i>malodoratus</i>	Collins <i>et al.</i> (1984)	<i>Streptococcus faecalis</i> subsp. <i>malodoratus</i>
<i>hirae</i>	Farrow and Collins (1985)	-
<i>mundtii</i>	Collins <i>et al.</i> (1986)	-
<i>pseudoavium</i>	Collins <i>et al.</i> (1989)	-
<i>raffinosis</i>	Collins <i>et al.</i> (1989)	-
<i>solitaries</i>	Collins <i>et al.</i> (1989)	-
<i>cecorum</i>	Williams <i>et al.</i> (1989)	<i>Streptococcus cecorum</i>
<i>columbae</i>	Devriese <i>et al.</i> (1989)	-
<i>saccharolyticus</i>	Rodrigues and Collins (1990)	<i>Streptococcus</i> <i>saccharolyticus</i>
<i>sulfureus</i>	Martinez-Murcia and Collins (1991)	-
<i>dispar</i>	Collins <i>et al.</i> (1991)	-
<i>seriolicida</i>	Kusuda <i>et al.</i> (1991)	<i>Lactococcus garvieae</i>
<i>flavescens</i>	Pompei <i>et al.</i> (1992)	-
<i>asini</i>	De Vaux <i>et al.</i> (1998)	-
<i>haemoperoxidus</i>	Svec <i>et al.</i> (2001)	-
<i>ratti</i>	Teixeira <i>et al.</i> (2001)	-
<i>porcinus</i>	Teixeira <i>et al.</i> (2001)	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อสปีชีส์ในปัจจุบัน	การรายงานสปีชีส์	ชื่อในอดีต
<i>moraviensis</i>	Svec <i>et al.</i> (2001)	<i>Enterococcus villorum</i>
<i>gilvus</i>	Tyrrell <i>et al.</i> (2002)	-
<i>pallens</i>	Tyrrell <i>et al.</i> (2002)	-
<i>canis</i>	De Graef <i>et al.</i> (2003)	-
<i>phoeniculicola</i>	Law-Brown and Meyers (2003)	-
<i>italicus</i>	Fortina <i>et al.</i> (2004)	-
<i>hermannienseis</i>	Koort <i>et al.</i> (2004)	-

ที่มา: Ghidan (2007)

3. แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของเชื้อ *Enterococcus* spp.

เชื้อ enterococci อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เกือบทุกชนิด ตั้งแต่แมลงจนถึงมนุษย์ โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนกมีการพบเชื้อมาก จากการศึกษาจำนวนมากพบว่า ในผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีจากประเทศญี่ปุ่น เยอรมัน และแถบแอฟริกาใต้พบเชื้อ 97% (Benno *et al.*, 1986; Bergan *et al.*, 1986; Edlund *et al.*, 1987; Enzensberger *et al.*, 1987; Shah *et al.*, 1987) ในอุจจาระพบเชื้อ enterococci เป็นจำนวนมาก คือ 10^5 - 10^7 CFU/กรัม ซึ่งพบมากเป็นลำดับต้นๆ ของเชื้อที่พบในอุจจาระของมนุษย์ (Jett *et al.*, 1994) แสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อแกรมบวกรูปกลมที่มีอิทธิพลมากในอุจจาระ

เชื้อ enterococci เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ พืชผัก ฟาร์มสัตว์ แมลง สัตว์ปีก และอาหาร เป็นต้น การพบในแหล่งน้ำและพืชผักนั้นอาจเป็นเพราะมีการปนเปื้อนจากอุจจาระของสัตว์ หรือสิ่งปฏิกูล และสปีชีส์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็น *E. faecium* และ *E. faecalis* แต่ก็มีโอกาสพบในสปีชีส์อื่นๆ ด้วยเช่นกัน ส่วนแหล่งที่พบสปีชีส์ในกลุ่ม *E. avium* group (*E. avium*, *E. malodorantus*, *E. raffinosus* และ *E. pseudoavium*) ส่วนใหญ่ยังไม่ทราบในแหล่งที่มาที่ชัดเจนนัก (Devriese *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2007) นอกจากนี้เชื้อ enterococci ยัง

พบในช่องปากและช่องคลอดและสามารถเพิ่มจำนวนในช่องปากและช่องคลอดได้ (Huysck et al., 1998)

ความจำเพาะต่อโฮสต์ของเชื้อ *Enterococcus* spp. พบว่าเชื้อ *E. columbae* มีความจำเพาะต่อโฮสต์ที่เป็นนกพิราบ (Devriese et al., 1990) และ *E. asini* มีความจำเพาะต่อโฮสต์ที่เป็นลา (De Vaux et al., 1998) สปีชีส์ใหม่ๆ ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่พบ เช่น *E. villorum* เกี่ยวข้องกับโรคท้องร่วงในสุกร (Vancanneyt et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบในไก่ และนกพิราบอีกด้วย (Devriese et al., 2000)

สปีชีส์ที่พบมากในปศุสัตว์ ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* และ *E. durans* สปีชีส์อื่นๆ ก็มีโอกาพบได้เช่นกัน (Devriese et al., 1987) บางสปีชีส์ที่พบอาจขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ เช่น *E. cecorum* ในสัตว์ปีกที่มีอายุมาก ในไก่ การ colonize ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ขึ้นอยู่กับอายุของไก่ โดยทั่วไปไก่ที่อายุ 1 วันมีความชุกของ *E. faecalis* สูง อย่างไรก็ตาม *E. faecalis* อาจถูกแทนที่ด้วยสปีชีส์ในกลุ่ม *E. faecium* group (ส่วนใหญ่เป็น *E. faecalis*, *E. hirae* และ *E. durans*) (Devriese et al., 1991; Kaukas et al., 1987) สปีชีส์ต่อมาที่แทนที่คือ *E. cecorum* ที่อายุ 12 สัปดาห์ (Devriese et al., 1991) *E. durans* และ *E. hirae* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้เล็ก แต่ไม่พบในกระเพาะพัก และไส้ติ่ง (Devriese et al., 1991) ส่วน *E. avium* พบในอุจจาระของมนุษย์ (Guthof, 1995) และพบในอุจจาระไก่ด้วยเช่นกัน (Nowlan and Deibel, 1967) สปีชีส์อื่นๆ ที่พบในไก่ ได้แก่ *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* และ *E. mundtii* (Devriese et al., 1987; Devriese et al., 1991) ในโค พบว่าการ colonize ของเชื้อขึ้นอยู่กับอายุ ลูกโคก่อนเลี้ยงเอื้องเชื้อ *Enterococcus* spp. เป็นเชื้อประจำถิ่นส่วนใหญ่ประกอบด้วยสปีชีส์ *E. faecalis*, *E. faecium* และ *E. avium* ต่อมาถูกแทนที่ด้วย *E. cecorum* ในอุจจาระของแม่โคนม แทบจะไม่พบเชื้อ *Enterococcus* spp. เลย เชื้อประจำถิ่นส่วนใหญ่คือ *Streptococcus bovis* (Devriese et al., 1992, Devriese et al., 1998) *Enterococcus* spp. พบในต่อมทอนซิลของลูกโคก่อนเลี้ยงเอื้อง และพบเชื้อ *Streptococcus* spp. ในต่อมทอนซิลของโคที่มีอายุมาก เชื้อ *E. faecalis* เป็นสปีชีส์ที่พบมากที่สุด ในต่อมทอนซิลของโคโตเต็มวัย และลูกโคก่อนเลี้ยงเอื้อง สปีชีส์ที่พบบ่อยรองลงมาคือ *E. raffinosus* (Cruz Colque et al., 1993) นอกจากนี้ยังพบสปีชีส์อื่นๆ ได้แก่ *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus* และ *E. pseudoavium* ซึ่งพบน้อยมาก (Cruz Colque et al., 1993; Devriese et al., 1987; Devriese et al., 1992) มีบางรายงานในสุกรพบว่าเชื้อ *Enterococcus* spp. เป็นเชื้อประจำถิ่นของสุกร ในการเก็บตัวอย่างมักเก็บที่ต่อมทอนซิล ลำไส้ และอุจจาระ และพบว่ามีการพบเชื้อในลำไส้มากกว่าพบในต่อมทอนซิล และอุจจาระ สปีชีส์ที่พบมาก

ในลำไส้คือ *E. faecalis* ขณะที่ *E. faecium* พบมากที่สุดในการอุจจาระ อย่างไรก็ตามสปีชีส์ใหม่ๆ พบน้อย ส่วนสปีชีส์อื่นๆ ที่พบได้แก่ *E. hirae*, *E. cerorum* และมีการพบกลุ่ม *E. avium* group น้อยมาก (Devriese et al., 1987; Devriese et al., 1994) การศึกษาในสุนัขและแมวพบเชื้อ *E. faecalis* มากที่สุดที่ทวารหนัก และต่อมทอนซิล ส่วนสปีชีส์ในกลุ่ม *E. faecium* group (ส่วนมากเป็น *E. faecium* และ *E. hirae*) พบน้อยลง สปีชีส์อื่นๆ ที่พบได้บ้างได้แก่ *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. durans*, *E. cecorum* และ *E. gallinarum* พบสปีชีส์ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* และ *E. mundtii* ในม้า (Devriese et al., 1987; Thal et al, 1995)

เชื้อ enterococci เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้สูง เช่น สามารถทนต่อความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที โดยเชื้อ *E. faecium* มีความทนต่อความร้อนมากกว่าเชื้อ *E. faecalis* แต่ถ้าใช้ความร้อนถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จะสามารถทำลายเชื้อได้หมดสิ้น ถ้าเชื้อมีปริมาณน้อยกว่า 10^5 CFU/มิลลิลิตร สามารถถูกทำลายได้ที่ความร้อน 71 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (ศศิธร, 2547; Teixeira et al., 2007)

4. การติดเชื้อ *Enterococcus* spp.

4.1 การติดเชื้อ *Enterococcus* spp. ในมนุษย์

เชื้อ enterococci เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) การติดต่อผู้ป่วยโดยผ่านการสัมผัส และสามารถก่อโรคติดเชื้อนอกโรงพยาบาล (community-acquired infection) ในการติดเชื้อนั้นสามารถเกิดจากเชื้อประจำถิ่นในตัวผู้ป่วย (endogenous infection) และการได้รับเชื้อจากภายนอก (exogenous infection) *E. faecalis* เป็นสาเหตุเกือบ 80% ที่ติดเชื้อในมนุษย์ รองลงมาคือ *E. faecium* ส่วนสปีชีส์อื่นๆ ที่พบว่ามีการก่อโรคในคน ได้แก่ *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. durans*, *E. molodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium* และ *E. solitaries* (Huycke et al., 1998) จำนวน *E. faecium* ที่มีชีวิตในอุจจาระของมนุษย์โดยเฉลี่ยพบน้อยกว่า *E. faecalis* 100 เท่า (Noble, 1978) การมีจำนวนมากของ *E. faecalis* จึงเป็นสปีชีส์ที่มีความรุนแรงมากกว่า *E. faecium* ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงมีรายงานใน *E. faecalis* เป็นจำนวนมาก บางการศึกษาได้รายงานว่า *E. faecium* พบบ่อยมากกว่า *E. faecalis* (Mederski-Samoraj and Murray, 1983)

ปัจจัยเสี่ยงหลักของการติดเชื้อ enterococci ที่คือต่อยา vancomycin คือการใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง เช่น third-generation cephalosporins และยาปฏิชีวนะอื่นๆ ที่มีกิจกรรมในการต่อต้านพวก anaerobes รวมถึง ยา metronidazole, ยา imipenem และ ยา clindamycin (Amin, 1999; Grainnager and Ragette, 1992; Livornese *et al.*, 1992) ซึ่งสามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตของ enterococci ในลำไส้ ปัจจัยอื่นๆ ของการติดเชื้อ ได้แก่ การพักอยู่ในโรงพยาบาลเป็นเวลานานๆ การมีอาการป่วยที่รุนแรง การผ่าตัดหน้าท้อง และการปนเปื้อนของอุปกรณ์เครื่องมือ หรือสิ่งแวดล้อมภายนอก (Amin, 1999; Grainnager and Ragette, 1992; Livornese *et al.*, 1992)

การติดเชื้อของ enterococci ที่พบมากที่สุด ได้แก่ โรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection), โรคติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (septicemia), โรคลิ้นหัวใจอักเสบ (endocarditis) และโรคติดเชื้อในช่องท้อง (intra-abdominal infections)

4.1.1 โรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection; UTIs)

เป็นโรคติดเชื้อ enterococci ที่พบมากที่สุดและส่วนมากเป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล การติดเชื้อของ enterococci ในทางเดินปัสสาวะมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1906 ในไม่กี่ปีที่ผ่านมาพบว่า UTIs ที่เกิดจาก enterococci ได้เกิดขึ้นอีกครั้ง ในบางการศึกษาได้รายงานถึงการติดเชื้อ enterococci ของทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลอยู่ในลำดับที่ 2 (Morrison and Wenzel, 1986) การเพิ่มขึ้นของการติดเชื้อของ enterococci ในทางเดินปัสสาวะมีความเป็นไปได้จากการใช้สายสวนทางเดินปัสสาวะเพิ่มขึ้น และการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง เช่น cephalosporins (Felmingham *et al.*, 1992) กระเพาะปัสสาวะ ไต และต่อมลูกหมาก มักจะเป็นตำแหน่งที่มีการติดเชื้อบ่อยๆ โดยเฉพาะกับผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะ หรือมีการใช้สายสวนทางเดินปัสสาวะ (Jett *et al.*, 1994) นอกจากจะก่อให้เกิดกระเพาะปัสสาวะอักเสบแล้ว เชื้อสามารถลุกลามทำให้เกิดไตอักเสบ และฝีหนองในไตได้ (ภัทรชัย, 2549)

4.1.2 โรคติดเชื้อ enterococci ในกระแสเลือด (Enterococcal septicemia)

โรคติดเชื้อ enterococci ในกระแสเลือดมักพบมากกว่าโรคลิ้นหัวใจอักเสบ (endocarditis) (Garrison et al., 1982; Wells and Graevenitz, 1980) ผู้ป่วยที่พักรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาล และมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือการได้รับยาต้านจุลชีพเป็นเวลานานๆ อีกทั้งทารกที่คลอดก่อนกำหนดมีอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อ enterococci ในกระแสเลือดเพิ่มมากขึ้นและมีอัตราการตายที่สูงขึ้น (Graninger and Ragette, 1992; Gullberg et al., 1989; Schaberg et al., 1991; Awada et al., 1992) ในการติดเชื้อมักพบว่าเป็นการติดเชื้อผสมร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ข้อมูลจากการควบคุมดูแลการติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1986 และ 1997 พบว่า enterococci อยู่ในลำดับที่ 3 ของการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดในโรงพยาบาลซึ่งคิดเป็น 12.8% ของตัวอย่างทั้งหมด (Jarvis et al., 1997) จากข้อมูลศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (CDC) ของสหรัฐอเมริกาพบว่าระหว่างปี ค.ศ. 2006 และ ค.ศ. 2007 เชื้อ enterococci อยู่ในลำดับที่ 2 ของการติดเชื้อในกระแสเลือด คิดเป็น *E. faecalis* 5.5%, *E. faecium* 8.2% และสปีชีส์อื่นๆ 2.3% นอกจากนี้พบว่า *E. faecium* 78.9% คือตัวยา vancomycin, *E. faecalis* 7.5% คือตัวยา vancomycin และสปีชีส์อื่นๆ อีก 37% ที่คือตัวยา vancomycin (Hidron et al., 2008) ได้มีการแสดงความคิดเห็นว่า enterococci สามารถย้ายข้ามไปยังเยื่อลำไส้และนำไปสู่การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดซึ่งไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าแหล่งที่มาของเชื้อมาจากไหน (Wells, 1990) นอกจากนี้การติดเชื้อ enterococci ในกระแสเลือดจากหลายๆ กรณีสามารถระบุถึงแหล่งที่มาได้ เช่น ภายในเส้นเลือดดำหนอง การติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ ช่องท้อง และการปนเปื้อนจากอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น สายสวนที่ใส่เข้าสู่เส้นเลือด (ภัทรชัย, 2549) ในบางกรณีอาจทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนที่มีความรุนแรงได้ เช่น โรคลิ้นหัวใจอักเสบและโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (ภัทรชัย, 2549) อีกทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างเป็นปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ enterococci ในกระแสเลือด ซึ่งนำไปสู่การเจริญเติบโตของเชื้อมากเกินไปในลำไส้ได้ (Amin, 1999; Livornese, 1992)

4.1.3 โรคลิ้นหัวใจอักเสบ (Endocarditis)

Enterococci เป็นสาเหตุประมาณ 5 ถึง 15% ของโรคลิ้นหัวใจอักเสบที่เกิดจากแบคทีเรียโดย *E. faecalis* พบมากที่สุด อย่างไรก็ตามสปีชีส์อื่นๆ ก็สามารถเป็นสาเหตุของโรคได้เช่นกัน (Moellering et al., 1974; Scheld and Mandell, 1984) บางรายงาน enterococci อาจเป็นสาเหตุได้ 5 ถึง 20% (Megran, 1992) มักก่อโรคชนิดกึ่งเฉียบพลัน ในผู้ที่มีลิ้นหัวใจผิดปกติหรือใส่

ลิ้นหัวใจเทียม และสามารถก่อโรคได้ในลิ้นหัวใจปกติ รวมทั้งผู้เสพยาเสพติดโดยการฉีดเข้าสู่เส้นเลือด (ภัทรชัย 2549) ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคได้วินิจฉัยโรคลิ้นหัวใจอักเสบที่ได้จากผู้ป่วย และสามารถแยกเชื้อ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* และ *E. raffinosus* ได้ (Facklam and Collins, 1989) enterococci เป็นลำดับที่ 3 ของการเป็นสาเหตุของโรคลิ้นหัวใจอักเสบ รองจาก streptococci และ *Staphylococcus aureus* (Megran, 1992)

4.1.4 โรคติดเชื้อในช่องท้องและอุ้งเชิงกราน (Intra-abdominal and pelvic infections)

โรคติดเชื้อในช่องท้องและอุ้งเชิงกราน เช่น โรคฝีหนองในช่องท้อง และโรคเยื่อช่องท้องอักเสบ (peritonitis) โดยเฉพาะการได้รับอุบัติเหตุลำไส้ทะลุ (ภัทรชัย 2549) การพบการติดเชื้อในช่องท้องหรือเนื้อเยื่ออ่อนที่สาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ enterococci เพียงอย่างเดียวมีน้อยมาก (Jett *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามในการติดเชื้อที่รวมกันกับเชื้ออื่นๆ เช่น พวก anaerobe ที่ไม่มีความรุนแรง การติดเชื้อจะมีความรุนแรงมากขึ้น (Onderdonk *et al.*, 1976) การเสริมฤทธิ์กันระหว่าง enterococci และ anaerobes ช่วยก่อความรุนแรงได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามกลไกนี้ก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก (Onderdonk *et al.*, 1976; Brook, 1988; Hite *et al.*, 1949) บางงานวิจัยพบว่าการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม anaerobe เช่น *Bacteroides fragilis* ทำให้บทบาทของการก่อโรคของเชื้อ enterococci ไม่ชัดเจน (Nichols and Muzik, 1992)

4.1.5 การติดเชื้อของบาดแผลและเนื้อเยื่ออ่อน (Wound and soft tissue infection)

มีสาเหตุมาจากการสัมผัสโดยตรงกับเชื้อประจำถิ่นของผู้ป่วย มักมีการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย เมื่อมีการติดเชื้อลุกลามเป็นสาเหตุให้เกิดโรคแทรกซ้อน เช่น โรคกระดูกและกล้ามเนื้อ (osteomyelitis) และการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดได้ (ภัทรชัย, 2549) เชื้อ enterococci ยังแยกได้จากแผลไฟไหม้ และจากอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น สายสวนที่เข้าสู่เส้นเลือดได้อีกด้วย

4.1.6 การติดเชื้อ enterococci ตำแหน่งอื่นๆ

การติดเชื้อ enterococci ในโรงพยาบาล มีรายงานในผู้ป่วยที่เปลี่ยนอวัยวะ เช่น ไต และตับ (Warren, 1988) และยังพบว่าการติดเชื้อที่ตำแหน่งอื่นๆ อีก เช่น ระบบประสาทส่วนกลาง ปอด หู และตา แต่พบน้อยมาก (Jett *et al.*, 1994)

4.2 การติดเชื้อ *Enterococcus* spp. ในสัตว์

เชื้อ enterococci เป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ enterococci ในกระแสเลือด ในไก่ โรคเอดส์ในหมู่ออกเสบในโค โรคลิ้นหัวใจอักเสบในวัว ควาย และลูกแกะ และโรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะในสุนัข โดยเชื้อ enterococci เหล่านี้ จัดอยู่ใน group D antisera ตามระบบของ Lancefield ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium* และ *E. durans* และอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์หลายๆ ชนิด (Quinn *et al.*, 1994)

5. การดื้อยาต้านจุลชีพใน *Enterococcus* spp.

เชื้อ enterococci มีการดื้อยาปฏิชีวนะสูง และมีแบบแผนการไวต่อยาปฏิชีวนะที่ไม่แน่นอน ในช่วงเวลาไม่กี่ปีที่ผ่านมาพบว่าการอุบัติใหม่ของการดื้อยาของเชื้อ enterococci ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดอย่างรวดเร็ว *E. faecium* มีอัตราการดื้อยาสูงกว่า *E. faecalis* นอกจากนี้พบว่า *E. faecalis* เป็นจุลชีพก่อโรคในโรงพยาบาลที่เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในมนุษย์ รองลงมาคือ *E. faecium* (Huycke *et al.*, 1998, Teixeira *et al.*, 2007) เชื้อ enterococci ดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติหลายชนิด (intrinsic resistance) เช่น ยากลุ่ม pencillinase-resistant penicillins, ยากลุ่ม glycopeptides, ยากลุ่ม aminoglycosides, ยากลุ่ม cephalosporins, ยา monobactam ยากลุ่ม anti-staphylococcal penicillins และ ยา clindamycin (ภัทรชัย, 2549; Gray and Pedler, 1992; Murray, 1998) และสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นมาภายหลัง (acquired resistance) เนื่องจากการแลกเปลี่ยนพลาสมิด และ conjugative transposons (Clewel, 1981; Clewel and Gawron-Burke, 1986) ได้แก่ ยา chloramphenicol, ยากลุ่ม tetracyclines, ยากลุ่ม macrolides และการดื้อยาในความเข้มข้นของยา ระดับสูงต่อยา clindamycin เป็นต้น (ภัทรชัย 2549; Murray, 1998) ส่วนยา trimethoprim-sulphamethoxazole เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เชื้อ enterococci ให้ผลไวต่อยา แต่ยา

ใช้ไม่ได้ผลทางคลินิก (*in vivo*) (Grayson *et al.*, 1990) เนื่องจากความสามารถของเชื้อ enterococci ในการสังเคราะห์ exogenous folates จากสิ่งแวดล้อม (Zevos and Schaberg, 1985)

5.1 ยากลุ่ม penicillins เป็นกลุ่มยาที่ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ชื่อยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ (Chambers, 2000; Murray, 1992) ได้แก่

ก. ยาที่สกัดจากธรรมชาติ ได้แก่ ยา penicillin G (benzylpenicillin) และ ยา penicillin V (phenoxymethyl penicillin)

ข. ยาสังเคราะห์

1) Penicillinase-resistant penicillin (PRP) ได้แก่ ยา methicillin, ยา nafcillin และ กลุ่ม isoxazolyl penicillins เช่น ยา oxacillin, ยา cloxacillin และยา dicloxacillin

2) Extended-spectrum penicillin

2.1) Aminopenicillin เช่น ยา ampicillin, ยา amoxicillin, ยา bacampicillin และ ยา pivampicillin

2.2) Carboxypenicillin เช่น ยา ticarcillin และ ยา carbenicillin

2.3) Ureidopenicillin เช่น ยา piperacillin, ยา azlocillin และ ยา mezlocillin

5.1.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม penicillins ยา penicillins ออกฤทธิ์ยับยั้ง penicillin-binding protein (PBP) โดยการสลายพันธะ amide ของวงแหวน β -lactam ได้เป็น penicilloyl เพื่อจับตัวกับ PBP เกิดเป็น penicilloyl-PBP (acyl-enzyme intermediate) (ภัทรชัย, 2549) ยาออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ในช่วงที่แบคทีเรียกำลังเจริญเติบโตและยังไม่มี การสร้างผนังเซลล์ที่แข็งแรง ยาไปรวมกับเอนไซม์ transpeptidase ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้จึงทำให้ไม่เกิดการเชื่อมต่อกัน (cross-linkage) ระหว่างสาย peptidoglycan 2 สาย ทำให้แบคทีเรียตายเนื่องจากไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ (ภัทรชัย, 2549; Murray, 1992)

5.1.2 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม penicillins ในแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในเชื้อแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding protein (PBP) ในเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides* และ *B. fragilis* การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ใน *Escherichia coli* และ *P. aeruginosa* และการขับยาออกจากเซลล์ (ภัทรชัย, 2549; Murray, 1992)

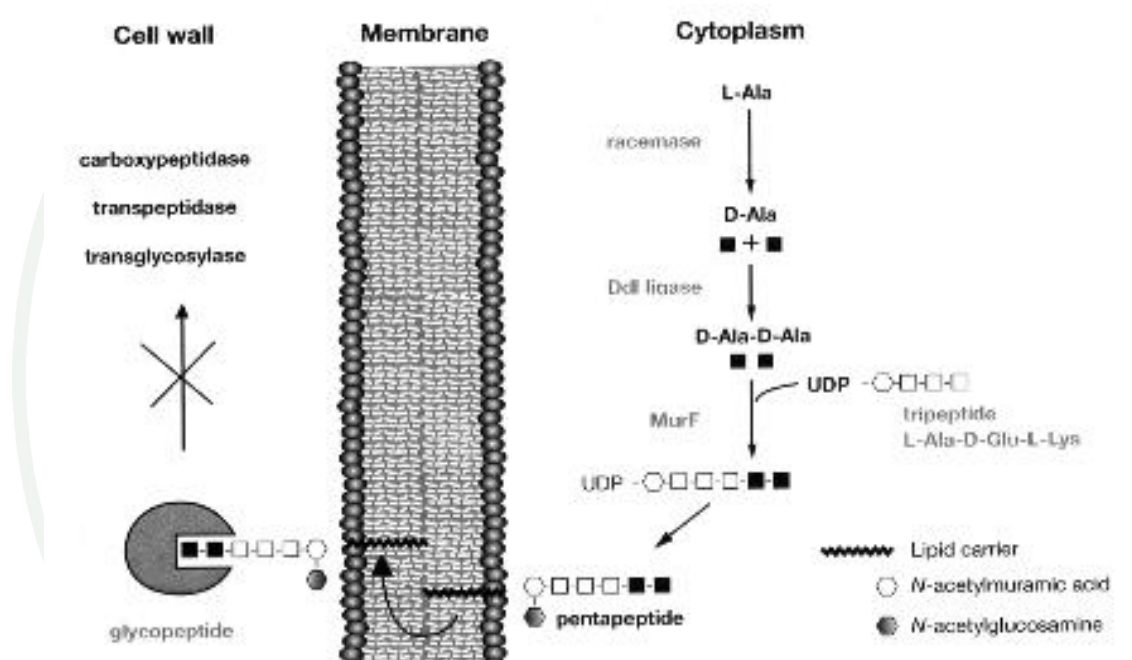
5.1.3 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม penicillins ใน *Enterococcus* spp.

5.1.3.1 การสร้างเอนไซม์ β -lactamase มีการพบได้น้อยใน *Enterococcus* spp. บางสายพันธุ์ ควบคุมโดยยีนบนพลาสมิด การสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของ *E. faecalis* (Bla⁺) มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 (Murray and Mederski-Samoraj, 1983) เอนไซม์ penicillinase ใน enterococci มีความคล้ายคลึงกันกับ เอนไซม์ penicillinase ใน staphylococci type A และดื้อต่อยา penicillin ยา ampicillin และยา ureidopenicillins (Murray, 1992) การสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของ *Enterococcus* spp. ไม่สามารถสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ข้างนอกเซลล์ได้ (Murray and Mederski-Samoraj, 1983) การคงอยู่ของเอนไซม์ β -lactamase ขึ้นอยู่กับเซลล์ เนื่องจากความล้มเหลวเมื่อแยกออกจาก signal peptide sequence ของตัวเอง หรือการจับของเอนไซม์กับส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ (Murray, 1992)

5.1.3.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding protein (PBP) กลายพันธุ์เปลี่ยนไปจากปกติ เรียกว่า PBP5 การดื้อยาในระดับสูงของ *E. faecium* เกิดจากการเพิ่มปริมาณการสร้าง PBP5 (Zorzi et al., 1993) ค่า MICs ของ *E. faecalis* อยู่ในช่วง 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ค่า MICs ของ *E. faecium* สูงกว่า เนื่องจาก PBP ของ *E. faecium* มีความสามารถในการจับกับยาได้ต่ำมากกว่า PBP ของ *E. faecalis* (Huycke, 1998; Murray, 1998) ส่วนค่า MICs ของ *E. faecium* อยู่ในช่วง 8-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Murray, 1992)

5.2 ยาในกลุ่ม glycopeptides เป็นกลุ่มยาที่ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ชื่อยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ยา vancomycin, ยา teicoplanin และ ยา avoparcin

5.2.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม glycopeptides ยาออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ด้วยการจับกับส่วน D-alanine-D-alanine ที่ปลายของสาย pentapeptide ที่เป็นโครงสร้างต้นกำเนิดของ peptidoglycan ในการจับตัวของยา vancomycin และยาในกลุ่ม glycopeptides อื่นๆ นั้นทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ transglycosylase ทำให้ไม่สามารถนำโมเลกุลต้นกำเนิดไปสร้างสาย peptidoglycan (ภัทรชัย, 2549; Courvalin, 2006; Gholizadeh and Courvalin, 2000, Neu *et al.*, 1990) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การสร้าง peptidoglycan และกลไกการออกฤทธิ์ของยา vancomycin

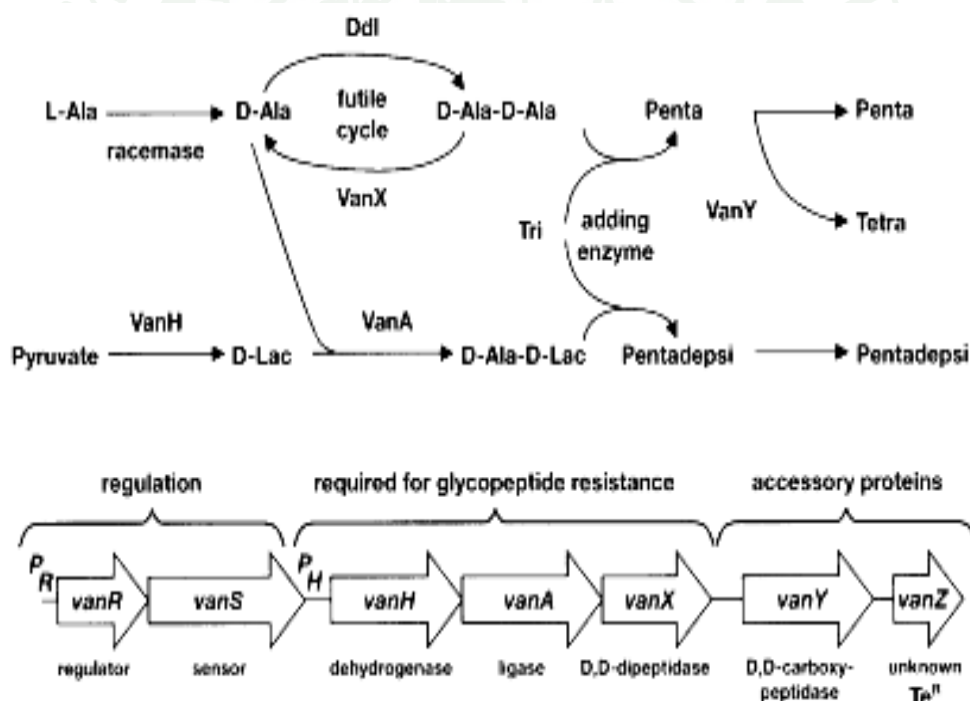
ที่มา: Courvalin (2006)

5.2.2 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม glycopeptides ในแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ เชื้อแกรมบวกทั้ง aerobe และ anaerobe โดยส่วนใหญ่เชื้อเปลี่ยน D-alanine-D-alanine เป็น D-alanine-D-lactate ทำให้ยาไม่สามารถจับได้ปกติ จึงทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ได้ตามปกติ (Werner, 2012)

5.2.3 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม glycopeptides ใน *Enterococcus* spp. กลไกการดื้อยา vancomycin ของ enterococci จะกำหนดโดยกลุ่มยีนต่างๆ แบ่งออกเป็น 9 กลุ่มตามยีนที่กำหนดการ

ดื้อยา ได้แก่ ยีน *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* และ *vanN* เป็นการดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง (acquired resistance) และยีน *vanC* เป็นการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) (Werner, 2012; Werner *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010)

5.2.3.1 ยีน *vanA* เป็นการดื้อทั้งยา vancomycin และ ยา teicoplanin ในความเข้มข้นของยาระดับสูง คือมีค่า MICs ต่อยา vancomycin 16-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MICs ต่อยา teicoplanin 4-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Leclercq *et al.*, 1988; Werner *et al.*, 2008) operon นี้มีความเกี่ยวข้องกับ transposon Tn1546 และบรรจุยีนควบคุม 2 ยีน (*vanR* และ *vanS*) ยีนดื้อยา 3 ยีน (*vanH*, *vanA* และ *vanX*) และ accessory genes 2 ยีน (*vanY* และ *vanZ*) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การดื้อต่อกำหนดกลุ่ม glycopeptides ประเภท *vanA*

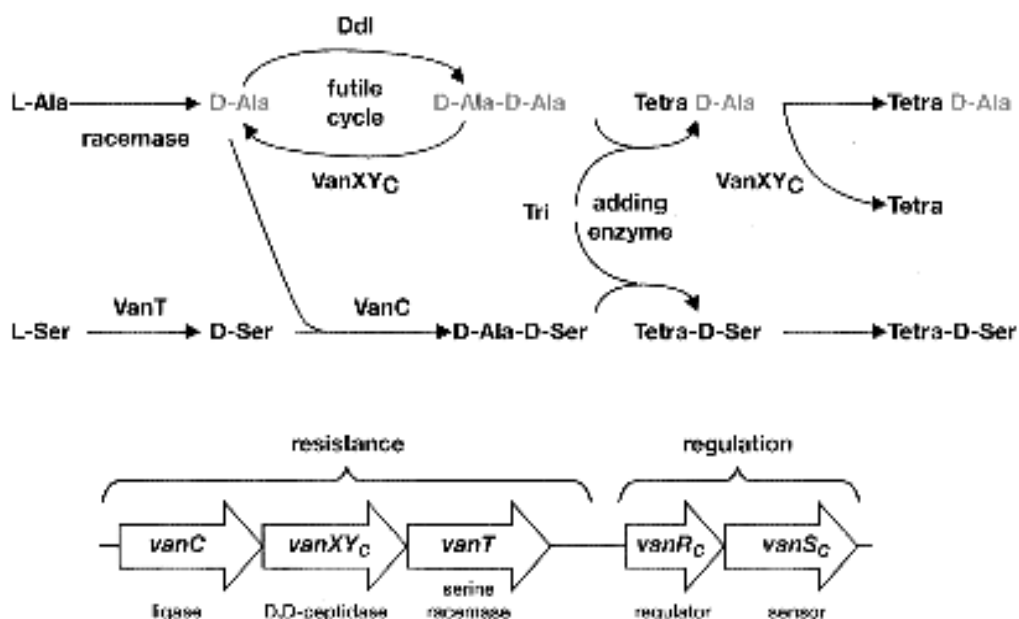
ที่มา: Courvalin (2006)

กลุ่มยีนเหล่านี้มีความจำเป็นในการดื้อต่อกำหนดกลุ่ม glycopeptides การดื้อยานี้จะมีการแสดงออกของ D-lactate dehydrogenase (*vanH*), D-alanine-D-lactate ligase (*vanA*)

และ dipeptidase (*vanX*) (Hasman *et al.*, 2006) VanR และ VanS ทำงานร่วมกันโดยรับสัญญาณการกระตุ้นเมื่อเซลล์ของแบคทีเรียได้มีการสัมผัสกับยาในกลุ่ม glycopeptides ต่อมาส่งสัญญาณมากระตุ้นการแสดงออกของ *vanHAX* operon ทำให้กระตุ้นการสร้าง VanH, VanA และ VanX หน้าที่ของ VanH คือ สร้าง D-lactate จาก pyruvate ควบคุมโดยยีน *vanH* หน้าที่ของ VanA คือเป็นเอนไซม์ ligase ช่วยเชื่อมโมเลกุล D-alanine และ D-lactate ทำให้เกิด D-alanine-D-lactate ควบคุมโดยยีน *vanA* หน้าที่ของ VanX คือ เป็นเอนไซม์ dipeptidase ที่สามารถย่อยสลายโมเลกุล D-alanine-D-alanine อย่างจำเพาะ จึงทำให้ D-alanine-D-alanine ลดลง และ D-alanine-D-lactate เพิ่มขึ้นเข้าแทนที่ในโครงสร้างสารต้นกำเนิด peptidoglycan ควบคุมโดยยีน *vanX* ทำให้ความไวต่อยาในกลุ่ม glycopeptides ลดลง กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะการดื้อยานี้อยู่บนโครโมโซม พลาสมิด และ transposon Tn1546 (Sood *et al.*, 2008)

5.2.3.2 ยีน *vanB* เป็นการดื้อยาเฉพาะยา vancomycin โดยมีค่า MICs ประมาณ 4-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยังไวต่อยา teicoplanin โดยมีค่า MICs อยู่ระหว่าง 0.5-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Werner *et al.*, 2008) โดยการแสดงออกของการดื้อยาจากการกระตุ้นโดยยา vancomycin เพียงอย่างเดียว เมื่อเซลล์ของเชื้อได้สัมผัสกับยา vancomycin ทำให้เกิดการกระตุ้นการดื้อต่อยาข้ามกับยา teicoplanin ตามมาด้วย โดย VanB มีหน้าที่เป็นเอนไซม์ ligase สร้าง D-alanine-D-lactate กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะการดื้อยานี้อยู่บนโครโมโซม พลาสมิด และบางสายพันธุ์อยู่บน composite transposon Tn1547 และสามารถถ่ายทอดไปสู่เซลล์อื่นๆ ได้ด้วยการ conjugation (ภัทรชัย, 2549; Werner *et al.*, 2008)

5.2.3.3 ยีน *vanC* เป็นการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance หรือ natural resistance) พบว่ามีทั้งการดื้อยาที่เกิดขึ้นตลอดเวลาโดยไม่มีการถูกกระตุ้นด้วยยา (constitutive resistance) และบางสายพันธุ์มีการถูกกระตุ้นด้วยยาดื้อ (inducible resistance) ควบคุมโดยยีนบนโครโมโซม *vanC* มีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ ligase สำหรับการสร้าง D-alanine-D-serine แทนที่ D-alanine-D-alanine (Werner, 2012) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การดื้อต่อยากลุ่ม glycopeptides ประเภท *vanC*

ที่มา: Courvalin (2006)

ยีน *vanC* มีการดื้อต่อยา vancomycin ในระดับต่ำโดยมีค่า MICs ประมาณ 2-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และไวต่อยา teicoplanin โดยมีค่า MICs ของยา teicoplanin อยู่ระหว่าง 0.5-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบใน *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* (Werner, 2012)

5.1.3.4 ยีน *van* อื่นๆ ที่มีการดื้อต่อยา vancomycin และ teicoplanin ในระดับปานกลางถึงต่ำ ได้แก่ *vanE*, *vanG*, *vanL* และ *vanN* เป็นต้น ส่วน *vanD* เป็นยีนที่ดื้อต่อยา vancomycin ในระดับปานกลางถึงสูง คือ มีค่า MICs อยู่ระหว่าง 16-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร บางรายงานอาจพบถึง 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และยีน *vanM* เป็นยีนที่มีการดื้อต่อยา vancomycin ในความเข้มข้นของยาระดับสูงคือ มีค่า MICs มากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Werner, 2012; Werner *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010) ข้อมูลและรายละเอียดต่างๆ ของแต่ละยีน *van* ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะการดื้อของยาในกลุ่ม glycopeptide ของเชื้อ enterococci ในรูปแบบต่างๆ

	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง (Acquired resistance)								การดื้อยาโดยธรรมชาติ (Intrinsic resistance)
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanM	VanN	VanC
ฟิโนไทป์	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanM	VanN	VanC
ยีนที่สร้างเอนไซม์ ligase	<i>vanA</i>	<i>vanB^I</i>	<i>vanD^I</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG^I</i>	<i>vanL</i>	<i>vanM</i>	<i>vanN</i>	<i>vanC</i>
การแสดงออก	inducible	inducible	constitutive	inducible	inducible	inducible	inducible	?	constitutive /inducible
ค่า MICs ของเชื้อที่ดื้อต่อ ยา vancomycin (µg/ml)	16-1000	4-32 (-1024)	16-512 (-1000)	8-32	12-16	8	>256	16	2-32
ค่า MICs ของเชื้อที่ดื้อต่อ ยา teicoplanin (µg/ml)	(4-)16-512	0.5-1 (-8)	0.5-64 (-256)	0.5	0.5	S	0.75/96	S	0.5-1
Transposon	Tn1546	Tn1547, Tn1549, Tn3382					IS1216 like element		
ตำแหน่งที่ยีนดื้อยาอยู่	พลาสมิด/ โครโมโซม	พลาสมิด/ โครโมโซม	โครโมโซม	โครโมโซม	โครโมโซม	โครโมโซม	พลาสมิด	?	โครโมโซม

ตารางที่ 2 (ต่อ)

	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง (Acquired resistance)								การดื้อยาโดยธรรมชาติ (Intrinsic resistance)
ฟิโนไทป์	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanM	VanN	VanC
การถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วย วิธี conjugation	+/-	+/-	-	-	+	-	+	?	-
โมเลกุลที่สร้าง	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D- Lac	D-Ala- D-Ser	D-Ala-D- Ser	D-Ala-D- Ser	D-Ala-D- Lac	D-Ala-D- Ser	D-Ala-D-Ser
สปีชีส์ที่พบ	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>
	<i>E. durans</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. raffinosus</i>
	<i>E. avium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>
Subtype ของยีน	-	vanB1-3	vanD1-5	-	vanG1-2	-	-	-	vanC1-vanC2/3

ที่มา: Werner (2012)

5.3 ยา Fosfomycin

5.3.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Fosfomycin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pyruvyl transferase เอนไซม์ชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง uridine diphosphate-*N*-acetylmuramic (UDP-NAM) ของขบวนการสร้าง peptidoglycan (กัทรัชชัย, 2549)

5.3.2 กลไกการดื้อยาของยา Fosfomycin ยังไม่ทราบแน่ชัด

5.4 ยากลุ่ม quinolones เป็นกลุ่มยาที่ขัดขวางหรือยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย ชื่อยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ (Gilbert *et al.*, 2002; Wolfson and Hooper, 1985) ได้แก่

ก Narrow spectrum (first generation) เช่น ยา nalidixic acid, ยา oxolinic acid และ ยา cinoxacin

ข Broad spectrum (second generation) ยากลุ่ม fluoroquinolones เช่น ยา ciprofloxacin, ยา enoxacin, fleroxacin, ยา levofloxacin, ยา lomefloxacin, ยา norfloxacin, ยา ofloxacin, ยา pefloxacin และ ยา rufloxacin

ค Expanded spectrum (third generation) ยากลุ่ม fluoroquinolones เช่น ยา gatifloxacin, ยา grepafloxacin, ยา sparfloxacin, ยา tosufloxacin, ยา clinafloxacin, ยา moxifloxacin และ ยา trovafloxacin

5.4.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม quinolones ยากลุ่ม quinolones มีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ DNA gyrase หรือ DNA topoisomerase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งตัวของ DNA ทำให้ยาเข้าจับตัวและยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมและมีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อและยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase IV ซึ่งมีหน้าที่ในการแยกโครโมโซมลูกทั้ง 2 โครโมโซม แต่กลไกไม่ทราบแน่ชัด (กัทรัชชัย, 2549; Drlica and Zhao, 1997; Gilbert *et al.*, 2002; Wolfson and Hooper, 1985)

5.4.2 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม quinolones ในแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ DNA gyrase และ DNA topoisomerase IV ในเชื้อแกรมลบส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และเชื้อแกรมบวกเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *parC* และอาจพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ร่วมด้วย การลดการผ่านเข้าสู่เซลล์ในเชื้อแกรมลบ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ และการขับยาออกนอกเซลล์โดยวิธี efflux ใน *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *S. pneumoniae* (ภัทรชัย, 2549; Amin *et al.*, 1999; Hooper, 2000a, 2000b)

5.4.3 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม quinolones ใน *Enterococcus* spp. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV เป็นกลไกสำคัญในการดื้อยาของกลุ่ม quinolones มีการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์หนึ่งหรือทั้ง 2 เอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ ยาจึงไม่สามารถจับตัวกับตำแหน่งเป้าหมายได้ ส่วนใหญ่มีการกลายพันธุ์ของยีน *parC* และในบางครั้งพบการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* ร่วมด้วย (ภัทรชัย, 2549; Amin *et al.*, 1999; Kanematsu *et al.*, 1998, Tankovic *et al.*, 1996)

5.5 ยา Nitrofurantoin เป็นสารสังเคราะห์ในกลุ่ม nitrofuran (Hooper, 2000a, 2000b)

5.5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Nitrofurantoin ยังไม่ทราบแน่ชัด อาจจะเกี่ยวกับการยับยั้งการสร้างโปรตีน และทำให้ DNA เสียหายได้ (ภัทรชัย, 2549; Hooper, 2000a, 2000b)

5.5.2 กลไกการดื้อยาของยา Nitrofurantoin การยับยั้งเอนไซม์ nitrofuran reductase จากการกลายพันธุ์ของยีน *recA* (Hooper, 2000a, 2000b)

5.6 ยาในกลุ่ม aminoglycosides เป็นกลุ่มยาที่ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ชื่อยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ (Gilbert *et al.*, 2002; Kadurugamuwa *et al.*, 1993) ได้แก่

ก ยาที่สกัดจากธรรมชาติ

1) ยาที่สกัดได้จากเชื้อ *Micromonospora* เช่น ยา gentamicin และ ยา sisomicin

2) ยาที่สกัดได้จากเชื้อ *Streptomyces* เช่น ยา streptomycin, ยา neomycin, ยา kanamycin, tobramycin และ ยา paromomycin

ข ยาสังเคราะห์ เช่น ยา amikacin และ ยา netilmicin

5.6.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม aminoglycosides ยาผ่านชั้นผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากยามีประจุบวกเหมือนกับ แคตเชียม และแมกนีเซียมจึงเข้าแทนที่อะตอมประจุบวกในชั้นผนังเซลล์ แล้วจับกับโมเลกุลประจุลบ ทำให้ยาผ่านเข้าเซลล์เพิ่มขึ้น และยาจับตัวกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซมแบบถาวร ทำให้ไรโบโซมทำงานผิดปกติ และไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ (Gilbert *et al.*, 2002; Kadurugamuwa *et al.*, 1993)

5.6.2 กลไกการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ในแบคทีเรียทั่วไป แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ การดื้อยาโดยธรรมชาติ ได้แก่ การลดความสามารถของยาในการเข้าสู่เซลล์ ในเชื้อกลุ่ม anaerobe และ facultative anaerobe และการดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น aminoglycoside acetyltransferase (AAC) ในแฟมิลี Enterobacteriaceae, aminoglycoside adenyltransferase หรือ aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANT) และ aminoglycoside phosphotransferase (APH) ในเชื้อแกรมลบ และแกรมบวก, การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ในเชื้อกลุ่ม anaerobe และ facultative anaerobe และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไรโบโซม ในเชื้อ *N. gonorrhoeae*, *M. tuberculosis* และ *P. aeruginosa* (ภัทรชัย, 2549; Costa *et al.*, 1993)

5.6.3 กลไกการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ใน *Enterococcus* spp. การดื้อยาโดยธรรมชาติ ได้แก่ การลดความสามารถของยาในการเข้าสู่เซลล์ มีผลต่อการดื้อยาข้ามไปสู่ยาอื่นในกลุ่มนี้ทั้งหมด เชื้อ *Enterococcus faecium* ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides ในระดับต่ำโดยธรรมชาติเนื่องจากการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase ชนิด AAC(6')-I นอกเหนือไปจากการลดความสามารถของยาในการเข้าสู่เซลล์ (ภัทรชัย, 2549; Costa *et al.*, 1993) และการดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง ได้แก่

5.6.3.1 การสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยาในกลุ่ม aminoglycosides (aminoglycoside modifying enzymes) เป็นกลไกที่พบบ่อยที่สุด พบขึ้นที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ที่ทำให้ถ่ายทอดไปสู่เซลล์อื่นได้ พบว่าการสร้างเอนไซม์ส่วนมากเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา เอนไซม์ที่ยับยั้งยาในกลุ่ม aminoglycosides ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ได้แก่ เอนไซม์ aminoglycoside acetyltransferase (AAC) ชนิด AAC(6')-I ซึ่งเป็นเอนไซม์ออกฤทธิ์ทำปฏิกิริยา acetylation กับหมู่อะมิโน (-NH₂) ของยา ที่ตำแหน่ง AAC(6') หรือหมู่อะมิโนในตำแหน่งที่ 6' ซึ่ง AAC(6')-I เป็นการดื้อต่อยา tobramycin, netilmicin, amikacin และ kanamycin เอนไซม์ aminoglycoside adenylyltransferase หรือ aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANT) ชนิด 6-adenylyltransferase ทำปฏิกิริยา adenylation กับหมู่ hydroxyl (-OH) ของยาที่ทำให้ดื้อต่อยา streptomycin พบทั้ง *E. faecalis* และ *E. faecium* คุณสมบัติของการดื้อยา เช่น ANT(2'')-I ดื้อต่อยา gentamicin, tobramycin และ kanamycin นอกจากนี้ ANT(4') ดื้อต่อยา amikacin, tobramycin และ kanamycin ANT(3'')/9) ดื้อต่อยา streptomycin และ spectinomycin และ ANT(9) ดื้อต่อยา streptomycin และ เอนไซม์ aminoglycoside phosphotransferase (APH) ชนิด APH(3') และ APH(2'') ทำปฏิกิริยา phosphorylation กับหมู่ hydroxyl (-OH) ของยา ทำให้ดื้อต่อยา amikacin นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์สองชนิดร่วมกัน เรียกว่า bifunctional enzyme เช่น 2'-phosphotransferase/ 6'-acetyltransferase หรือ AAC(6')-Ie มีคุณสมบัติของ AAC(6')-I และ APH(2'') ผสมกัน ปกติแล้ว AAC(6')-I ทำให้ดื้อต่อยาหลายชนิด ยกเว้น gentamicin ส่วนเอนไซม์ APH(2'') ดื้อต่อยา gentamicin ดังนั้น AAC(6')-Ie ดื้อต่อยา gentamicin ในระดับสูง และดื้อต่อยา aminoglycosides อื่นๆ ยกเว้น streptomycin เอนไซม์ชนิดนี้พบบ่อยที่สุดสำหรับแกรมบวกที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides เชื้อที่ดื้อต่อยา gentamicin พบว่าดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides อื่นๆ ด้วย ยกเว้นยา streptomycin ถ้าเชื้อไวต่อยา gentamicin ไม่ได้บอกถึงว่าเชื้อจะไวต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides อื่นๆ (ภัทรชัย, 2549, Gray and Pedler, 1992; Miller *et al.*, 1997; Morrison, 2002; Shaw *et al.* 1993)

5.6.3.2 การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุล หรือประจุไฟฟ้าในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความต่างของประจุ (ภัทรชัย, 2549)

5.6.3.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไรโบโซมจากการกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่ยากลุ่ม aminoglycosides ออกฤทธิ์ ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เช่น ในเชื้อ *E. faecalis* (ภัทรชัย, 2549; Finken *et al.*, 1993) ในการดื้อต่อยา streptomycin ในความเข้มข้นของยาระดับสูงอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ ribosomal protein S12 (Elipoulos *et al.*, 1994)

5.7 ยากลุ่ม tetracyclines เป็นกลุ่มยาที่ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ชื่อยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ (ภัทรชัย กิริติสิน, 2549; Cauwerts, *et al.* 2007) ได้แก่

ก. กลุ่มระยะการออกฤทธิ์สั้น (short-acting) เช่น ยา chlortetracycline, ยา oxytetracycline และ ยา tetracycline

ข. กลุ่มระยะการออกฤทธิ์ปานกลาง (intermediate-acting) เช่น ยา demeclocycline และ ยา methacycline

ค. กลุ่มระยะการออกฤทธิ์ยาว (long-acting) เช่น ยา doxycycline และ ยา minocycline

5.7.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม tetracyclines ยาจับตัวกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซมแบบชั่วคราว (reversible) ทำให้มีผลต่อการรวมตัวของ rRNA กับไรโบโซม ทำให้กรดอะมิโนไม่สามารถแปลรหัสเป็นสายโปรตีนได้ (ภัทรชัย, 2549; Chopra *et al.* 1992)

5.7.2 กลไกการดื้อยากลุ่ม tetracyclines ในแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ ในแฟมิลี Enterobacteriaceae การขับยาออกนอกเซลล์โดยวิธี efflux ในเชื้อแกรมบวก และแกรมลบ และการป้องกันการออกฤทธิ์ของยาโดยวิธี ribosome protection ในเชื้อแกรมบวก และแกรมลบ (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2005)

5.7.3 กลไกการดื้อยากลุ่ม tetracyclines ใน *Enterococcus* spp.

5.7.3.1 การป้องกันการออกฤทธิ์ของยาโดยวิธี ribosome protection ด้วยการสร้างโปรตีนซึ่งช่วยไม่ให้ยาเข้าจับตัวหรือออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเป้าหมายบนไรโบโซม โปรตีนที่ทำ

หน้านี้ สำหรับ *Enterococcus* spp. ได้แก่ TetO, TetM, TetL และ TetS เป็นต้น ควบคุมการทำงานของยีน *tet* ที่อยู่บนพลาสมิดและโครโมโซม และไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่นอน (ภัทรชัย, 2549; Cauwerts *et al.* 2007; Huys *et al.*, 2004; Taylor and Chau, 1996)

5.7.3.2 การขับยาออกนอกเซลล์โดยวิธี efflux โดยใช้พลังงาน อาศัยการทำงานของโปรตีนกลุ่ม Tet เช่น TetL ในเยื่อหุ้มเซลล์ ถูกควบคุมโดยยีน *tetL* อยู่บนพลาสมิด การแสดงออกของยีนเป็นผลมาจากการกระตุ้นเมื่อสัมผัสกับยา (ภัทรชัย, 2549, Cauwerts *et al.* 2007)

5.8 ยากลุ่ม macrolides เป็นกลุ่มยาที่ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ชื่อยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ (Rice *et al.*, 2003) ได้แก่

ก. วงแหวนที่มีคาร์บอน 14 อะตอม เช่น ยา clarithromycin, ยา erythromycin, ยา roxithromycin

ข. วงแหวนที่มีคาร์บอน 15 อะตอม เช่น ยา azithromycin

ค. วงแหวนที่มีคาร์บอน 16 อะตอม

5.8.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม macrolides ยาจับตัวกับ 23S rRNA แบบชั่วคราว ซึ่งเป็นส่วนประกอบของหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม เป็นสาเหตุทำให้เกิดการยับยั้งขบวนการ elongation ระหว่างการสร้างโปรตีน จึงเป็นการยับยั้งและขัดขวางการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ (ภัทรชัย, 2549; Gilbert, 2002; Vannuffel and Cocito, 1996)

5.8.2 กลไกการคือยากลุ่ม macrolides ในแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไรโบโซมในเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ การสร้างเอนไซม์ทำลายยาในเชื้อแกรมลบ และการขับยาออกนอกเซลล์โดยวิธี efflux ในเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ ในการคือยากลุ่ม macrolides สามารถคือยาข้ามไปยังกลุ่ม lincosamides และ ยา streptogramin B ได้ เรียกว่าลักษณะการคือแบบนี้ว่า MLS_B เนื่องจากยาทั้งสามกลุ่มมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ยาเดียวกัน คือ 23S rRNA ถึงแม้ว่ายาทั้งสามชนิดจะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันก็ตาม (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003)

5.8.3 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม macrolides ใน *Enterococcus* spp. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไรโบโซม เชื้อสร้างเอนไซม์ rRNA methylase โดยยีน *erm* (erythromycin resistance methylase) พบได้ทั้งบนพลาสมิดและโครโมโซม เอนไซม์ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl โดยขบวนการ methylation ที่เบส adenine ในตำแหน่งจำเพาะของ 23S rRNA มีผลทำให้ไรโบโซมเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และเกิดการดื้อยา การแสดงออกของยีน *erm* เกิดตลอดเวลา (constitutive) และถูกกระตุ้นเมื่อสัมผัสพิษยา (inducible) (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003)

5.9 ยาในกลุ่ม lincosamides เป็นกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ทั้งยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือฆ่าเชื้อ ชื่อยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ยา lincomycin และ clindamycin (Rice *et al.*, 2003)

5.9.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม lincosamides ยาได้จับตัวกับหน่วยย่อย 23S rRNA บน 50S ของไรโบโซม และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptidyltransferase ทำให้การสร้างโปรตีนผิดปกติ (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003)

5.9.2 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม lincosamides ในแบคทีเรียทั่วไป และใน *Enterococcus* spp. คือ การสร้างเอนไซม์ rRNA methylase ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl โดยขบวนการ methylation ที่เบส adenine ในตำแหน่ง 23S rRNA บน 50S ของไรโบโซม โดยเอนไซม์นี้ถูกควบคุมโดยยีน *erm* บนพลาสมิด (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003)

5.10 ยาในกลุ่ม streptogramins เป็นกลุ่มยาที่ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ยาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามโครงสร้าง (Rice *et al.*, 2003)

ก. streptogramin A มีโครงสร้างหลัก คือ polyunsaturated macrolactone

1) pristinamycin II_A

2) pristinamycin II_B

ข. streptogramin B มีโครงสร้างหลัก คือ cyclic hexadepsipeptide

1) pristinamycin I_A

2) pristinamycin I_C

ยาที่ใช้ในปัจจุบัน คือ quinupristin/dalfopristin มาจากส่วนผสมของ pristinamycin I_A (quinupristin) และ pristinamycin II_B (dalfopristin) ในอัตราส่วน 30:70

5.10.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม streptogramins ข้ามผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยขบวนการ passive diffusion และจับตัวอย่างถาวรกับหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม การจับตัวของ streptogramin A (dalfopristin) บนไรโบโซมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไรโบโซม ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจับตัวของ streptogramin B (quinupristin) กับไรโบโซม streptogramin A ยับยั้งการสร้างเปปไทด์ในขั้นตอน elongation ของสายโพรตีนในระหว่างขบวนการแปลรหัส และ streptogramin B ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptidyltransferase ทำให้สายโพรตีนที่สร้างอย่างไม่สมบูรณ์หลุดออกจากไรโบโซมก่อนกำหนด (ภัทรชัย, 2549; Fekety, 2000; Vannuffel and Cocito, 1996)

5.10.2 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม streptogramins ในแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ต้านยาในเชื้อ *Staphylococcus* spp. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ และการขับยาออกนอกเซลล์โดยวิธี efflux (ภัทรชัย, 2549)

5.10.3 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม streptogramins ใน *Enterococcus* spp.

5.10.3.1 การสร้างเอนไซม์ต้านยา เช่น acetyltransferase และ streptogramin A acetylase ต้านยา streptogramin A โดยยีน *vatD* และ *vatE* และ streptogramin B hydrolase ต้านยา streptogramin B (ภัทรชัย, 2549; Allignet *et al.*, 1996; Rice *et al.*, 2003)

5.10.3.2 เปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา เช่น การเติมหมู่ methyl โดยปฏิกิริยา methylation ที่ตำแหน่งจำเพาะของ 23S rRNA บนหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม ทำให้ดื้อต่อยา streptogramin B แต่ไม่มีผลดื้อต่อยา streptogramin A ยีนที่ดื้อต่อยาอยู่บนโครโมโซม หรือพลาสมิด (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003)

5.10.3.3 การยับยาดอกนอกเซลล์โดยวิธี efflux (ภัทรชัย, 2549)

5.11 ยากลุ่ม oxazolidinones เป็นยากลุ่มใหม่ที่เป็นสารสังเคราะห์ ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ linezolid ยามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแกรมบวกส่วนใหญ่ และฆ่าเชื้อ *S. pneumonia* (Donowitz, 2000; Ford *et al.*, 1997)

5.11.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม oxazolidinones ยาขัดขวางการรวมตัวของหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซมกับสาย mRNA ทำให้การเริ่มต้นการแปลรหัสไม่ได้ เป็นการยับยั้งการสร้างโปรตีน (ภัทรชัย, 2549; Shinabarger *et al.*, 1997)

5.11.2 กลไกการดื้อยาของยากลุ่ม oxazolidinones ยังไม่พบกลไกการดื้อยาที่ชัดเจน (ภัทรชัย, 2549)

5.12 ยา chloramphenicol (ยากลุ่ม phenicols) เป็นยาที่ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย (ภัทรชัย, 2549)

5.12.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยา chloramphenicol โดยยา chloramphenicol ยับยั้งขบวนการสร้างโปรตีนของเซลล์ ยาเข้าจับตัวชั่วคราวกับเอนไซม์ peptidyltransferase ซึ่งเป็นส่วนประกอบของหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม หน้าที่ของเอนไซม์ peptidyltransferase คือ การสร้างเปปไทด์ระหว่างขบวนการ transpeptidation สำหรับการสร้างสายโปรตีน ดังนั้นโปรตีนที่สร้างจึงถูกยับยั้ง (ภัทรชัย, 2549; Gilbert *et al.* 2002)

5.12.2 กลไกการดื้อยา chloramphenicol ในแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยาในแกรมบวกและแกรมลบ และการลดความสามารถของยาในการผ่านเข้าเซลล์ในเชื้อแกรมลบ เช่น *H. influenza*, *P. aeruginosa* และ *Salmonella* ในการดื้อยา chloramphenicol ส่วนใหญ่เป็นการดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง (ภัทรชัย, 2549 ; Opal *et al.*, 2000)

5.12.3 กลไกการดื้อยา chloramphenicol ใน *Enterococcus* spp. การสร้างเอนไซม์ทำลายยา คือ การสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ทำให้ยา chloramphenicol หมดฤทธิ์ เกิดจากการควบคุมของยีน *cat* มีการเติมหมู่ acyl ที่ได้จาก acyl

coenzyme A เข้าตำแหน่งของหมู่ hydroxyl (-OH) ในโครงสร้างของยาโดยขบวนการ acetylation ยามีหมู่คาร์บอน 2 หมู่ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 CAT เติมหมู่ acyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เกิดเป็นสาร 3-acetoxy-chloramphenicol แล้วหมู่ acyl ถูกย้ายต่อไปยังคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 เกิดเป็น 1-acetoxy-chloramphenicol แล้วเติมหมู่ acyl ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 อีกครั้งเกิดเป็น 1,3 diacetoxy-chloramphenicol ยาที่ถูกเติมหมู่ acyl ไม่ว่าตำแหน่งใด หรือทั้งสองตำแหน่งไม่สามารถเข้าจับกับเป้าหมายการออกฤทธิ์บนหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม ต่อการยับยั้งการสร้างโปรตีน ยีน *cat* มักพบบนพลาสมิดทำให้เกิดการแพร่กระจายการดื้อยาได้ง่าย ในแกรมบวกมีการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นจากการสัมผัสยา (ภัทรชัย, 2549; Murray and Shaw, 1997; Opal *et al.*, 2000)

5.13 ยากลุ่ม rifamycins ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ rifampin (rifampin) เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ได้จากยา rifamycin B และยา rifabutin เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ได้จากยา rifamycin S (ภัทรชัย, 2549)

5.13.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม rifamycins ยาเข้าจับกับหน่วยย่อยเบต้า (β -subunit) ของเอนไซม์ RNA polymerase และยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ RNA polymerase ในการสร้าง RNA โดยเฉพาะในขบวนการถอดรหัส ในระหว่างการสร้างสาย mRNA ต่อมาการทำหน้าที่ของเซลล์ผิดปกติและตายในที่สุด (ภัทรชัย, 2549) และยามีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ enterococci (Morris *et al.*, 1993)

5.13.2 กลไกการดื้อยาของยากลุ่ม rifamycins เกิดจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ RNA polymerase กลายพันธุ์ ทำให้ยาไม่สามารถจับตัว จึงไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003)

5.14 ยากลุ่ม sulfa และยา trimethoprim เป็นกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์แบบแข่งขัน (competitive antagonism) หรือขัดขวางการสร้าง metabolites ที่จำเป็นต่อแบคทีเรีย ชื่อยาที่อยู่ในกลุ่มนี้ นิยมใช้ยา sulfamethoxazole (SMX) ร่วมกับ ยา trimethoprim (TMP) อัตราส่วน 5:1 รู้จักกันในชื่อยา co-trimoxazole (ภัทรชัย, 2549)

5.14.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม sulfa และยา trimethoprim ยา sulfonamides และ TMP ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดโฟลิก ยากลุ่ม sulfonamides ทั้งหมดมีโครงสร้างคล้ายกับกรด *para*-aminobenzoic (PABA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นใน

การสร้างกรดโฟลิก ในภาวะปกติ PABA ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ dihydropteroate synthetase (DHPS) ได้สาร dihydropteroate (DHP) ต่อมาถูกเปลี่ยนเป็น dihydrofolate (DHF) และ tetrahydrofolate (THF) ตามลำดับ สาร THF หรือกรดโฟลิก ถูกนำไปใช้ในการสร้างกรดนิวคลีอิกต่อไปในเซลล์ ยากลุ่ม sulfonamides เข้าแทนที่ PABA ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ DHPS ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง DHP ส่วนยา TMP มีโครงสร้างคล้ายกับ pyrimidine และออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) ซึ่งมีหน้าที่ในการเปลี่ยนสาร DHF ไปเป็น THF ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าทั้งสองออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการสร้างสารโฟลิก (ภัทรชัย, 2549; Zinner and Mayer, 2000)

5.14.2 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม sulfa และยา trimethoprim ในแบคทีเรียทั่วไป การดื้อยาโดยธรรมชาติ ได้แก่ การลดความสามารถของยาในการผ่านเข้าสู่เซลล์ใน *P. aeruginosa* การลดความไวของเอนไซม์ในขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดโฟลิกใน *Neisseria*, *Clostridium*, *Brucella*, *Bacteroides*, *Moraxella catarrhalis* และ *Nocardia* และ การนำกรดโฟลิกจากภายนอกเข้ามาใช้ใน *Lactobacillus* การดื้อยาที่เกิดขึ้นในภายหลัง ได้แก่ การกลายพันธุ์ของยีน *folA* บนโครโมโซมทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR และการกลายพันธุ์ที่ทำให้การสร้าง PABA เพิ่มขึ้นในเชื้อแกรมลบบางสปีชีส์ เช่น *Klebsiella pneumoniae* และ *E. cloacae* และการได้รับยีนดื้อยาจากพลาสมิดที่มียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR ในแกรมลบแฟมิลี Enterobacteriaceae และแกรมบวกบางชนิด เช่น *Staphylococcus* และ *Listeria monocytogenes* (ภัทรชัย, 2549)

5.14.3 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม sulfa และยา trimethoprim ใน *Enterococcus* spp.

5.14.3.1 การดื้อยาโดยธรรมชาติ ได้แก่ การนำกรดโฟลิกจากภายนอกเข้ามาใช้ โดยนำโฟลิกจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาใช้ภายในเซลล์โดยตรง ทำให้เชื้อไม่ต้องการสร้างกรดโฟลิกภายในเซลล์จึงไม่มีเป้าหมายสำหรับการออกฤทธิ์ยา (ภัทรชัย, 2549)

5.14.3.2 การดื้อยาที่เกิดขึ้นในภายหลัง

5.14.3.2.1 การกลายพันธุ์ของยีน *folA* บนโครโมโซมทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปและดื้อยาดื้อยา trimethoprim พบว่าการกลายพันธุ์ทำให้ลดการผลิต porin ที่เป็นช่องทางผ่านเข้าออกสาร มีผลทำให้ลดการผ่าน

ของยาเข้าสู่เซลล์ ทำให้เกิดการดื้อยา trimethoprim และดื้อข้ามไปยังกลุ่มยา quinolones และ chloramphenicol การกลายพันธุ์ที่ทำให้สารสร้าง PABA เพิ่มขึ้น ทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดโฟลิกสูงขึ้นต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ DHPS มีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา sulfonamides การดื้อยา sulfonamides ยังมีผลจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHPS ทำให้ DHPS มีความไวต่ำในการเข้าทำปฏิกิริยากับยา sulfonamides (ภัทรชัย, 2549; Opal *et al.*, 2000; Zinner and Mayer, 2000)

5.14.3.2.2 การได้รับยีนดื้อยา การดื้อยา trimethoprim เกิดจากได้รับพลาสมิดที่มียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR ที่มีความไวต่ำต่อการถูกยับยั้งการทำโดยยา trimethoprim พบเอนไซม์กลุ่มนี้ได้หลายชนิด ได้แก่ DHFR type I ควบคุมโดยยีน *dhfr-I* และทำให้ดื้อต่อยา trimethoprim ในความเข้มข้นของยาระดับสูง และพบเอนไซม์ DHFR ชนิดความไวต่ำต่อยา trimethoprim ได้ 2 ชนิด คือ ชนิด S1 DHFR (ควบคุมโดยยีน *dhfA*) และ S2 DHFR (ควบคุมโดยยีน *dhfD*) (ภัทรชัย, 2549; Opal *et al.*, 2000; Zinner and Mayer, 2000)

กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพ รูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพ และยีนดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ *Enterococcus* spp. สรุปในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *Enterococcus* spp.

ยาต้านจุลชีพ	กลไกการดื้อยา	รูปแบบการดื้อยา	ยีนดื้อยา
กลุ่มยาที่ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (<i>cell wall synthesis inhibitors</i>)			
ยากลุ่ม penicillins	- การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding protein (PBP) เปลี่ยนไปจากปกติ - การสร้างเอนไซม์ β-lactamase	- การดื้อยาโดยธรรมชาติ: ในยา กลุ่ม penicillase-resistant penicillins - การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>pbp5</i> และ <i>pbp5fm</i>
ยากลุ่ม glycopeptides	- การเปลี่ยน D-alanine-D-alanine เป็น D-alanine-D-lactate - การเปลี่ยน D-alanine-D-alanine เป็น D-alanine-D-serine	- การดื้อยาโดยธรรมชาติ - การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>vanC1</i> , <i>vanC2/3</i> เป็นยีนที่ดื้อยาโดยธรรมชาติ <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanD</i> , <i>vanE</i> , <i>vanG</i> , <i>vanL</i> , <i>vanM</i> และ <i>vanN</i> เป็นยีนที่ดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง
ยากลุ่ม fosfomycins	ไม่ทราบกลไกแน่ชัด	-	-
กลุ่มยาที่ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก (<i>nucleic acid synthesis inhibitors</i>)			
ยากลุ่ม quinolones	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	การกลายพันธุ์ของยีน <i>gyrA</i> และ <i>parC</i>
ยากลุ่ม nitrofurantoin	ยับยั้งเอนไซม์ nitrofurantoin reductase	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	การกลายพันธุ์ของยีน <i>recA</i>

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ยาด้านจุลชีพ	กลไกการดื้อยา	รูปแบบการดื้อยา	ยีนดื้อยา
ยาต้านยับยั้งการสร้างโปรตีน (protein synthesis inhibitors)			
ยากลุ่ม aminoglycosides	- การสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างยา - กลุ่ม aminoglycosides - การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ - การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไรโบโซมจากการกลายพันธุ์	- การดื้อยาโดยธรรมชาติ - การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>aac(6')-aph(2'')</i>
ยากลุ่ม tetracycline	- การป้องกันการออกฤทธิ์ของยาโดยวิธี ribosome protection - การขับยาออกจากเซลล์โดยวิธี efflux	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>tet</i> และ <i>otr</i>
ยากลุ่ม macrolides	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ribosome	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>ermA, ermB, ermC, mefA</i> และ <i>mefE</i>
ยากลุ่ม lincosamides	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ribosome	- การดื้อยาโดยธรรมชาติ - การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>erm</i>
ยากลุ่ม streptogramins	- การสร้างเอนไซม์ต้านยา - การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ribosome - การขับยาออกโดยวิธี efflux	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>erm</i>
ยากลุ่ม oxazolidinones	ไม่ทราบชัดเจน	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ยาด้านจุลชีพ	กลไกการดื้อยา	รูปแบบการดื้อยา	ยีนดื้อยา
ยากลุ่มยับยั้งการสร้างโปรตีน (<i>protein synthesis inhibitors</i>)			
ยากลุ่ม phenicols	การสร้างเอนไซม์ทำลายยา	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	<i>cat</i>
ยากลุ่ม rifamycins	ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ RNA polymerase กลายพันธุ์	การดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง	การกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างเอนไซม์ polymerase

6. ปัจจัยก่อความรุนแรง (virulence factor) ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

ปัจจัยก่อความรุนแรง เป็นปัจจัยที่เชื้อสร้างขึ้นซึ่งเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรค ยีนที่เกี่ยวข้องหรือควบคุมในการทำหน้าที่ดังกล่าวเรียกว่า virulence gene ซึ่งอาจพบกลุ่มยีนเหล่านี้ปรากฏบนส่วนหนึ่งของจีโนมเรียกว่า pathogenicity islands หรือ PAI (Hacker and Kaper, 2000) PAI ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ค้นพบครั้งแรกในจีโนมของเชื้อ *E. faecalis* (MMH594) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุในการระบาดของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในช่วงทศวรรษที่ 80 ที่ผ่านมา (Huyke *et al.*, 1991) ปัจจัยก่อความรุนแรงที่มีรายงานใน *Enterococcus* spp. ได้แก่

6.1 Hemolysin สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์บางชนิด สามารถพบได้ในบางสายพันธุ์ การสลายเม็ดเลือดแดงคู่ได้จากการการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดวัว หรือแกะ (ภัทรชัย, 2549; Teixeira *et al.*, 2007) แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

6.1.1 การสลายเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ (partial hemolysis หรือ alpha hemolysis) ทำให้รอบๆ โคลินี่ที่เชื้อขึ้นมีสีเขียวเข้มของสาร bilirubin และส่วนประกอบภายในเซลล์ออกมาสู่ภายนอก หลังจากทีเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก เชื้อที่มีคุณสมบัตินี้ ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium* ฯลฯ (ภัทรชัย, 2549; Quinn *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2007)

6.1.2 การสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (complete hemolysis หรือ beta hemolysis) เป็นการสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ พบบริเวณในรอบๆ โคลินี่ของเชื้อ เชื้อที่มีคุณสมบัตินี้ ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ฯลฯ (ภัทรชัย, 2549; Quinn *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2007)

6.1.3 ไม่มีการสลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolysis หรือ gamma hemolysis) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหรือไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่มีคุณสมบัตินี้ ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium* ฯลฯ (ภัทรชัย, 2549; Quinn *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2007)

บางสายพันธุ์ประมาณหนึ่งในสามของเชื้อ *E. faecalis* อาจจะสามารถสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เลือดกระต่าย ม้า หรือมนุษย์ แต่ไม่มีการสลายเม็ดเลือด

แดงในเลือดและ บางสายพันธุ์ของเชื้อ *E. durans* สามารถสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ แต่ก็ขึ้นอยู่กับประเภทของเลือดที่ใช้ (Teixeira *et al.*, 2007)

6.2 เอนไซม์ gelatinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนสามารถย่อยสลายเจลาติน, คอลลาเจน, เคซีน, ฮีโมโกลบิน และเปปไทด์อื่นๆ ในเนื้อเยื่อและส่วนประกอบอื่นๆ ในเนื้อเยื่อ (Kreft *et al.*, 1992) การสร้างเอนไซม์ gelatinase ของเชื้อ *E. faecalis* พบว่ามีส่วนช่วยในการก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคลิ้นหัวใจอักเสบในสัตว์ทดลองได้ (Gutschik *et al.*, 1979)

6.3 Surface Adhesions (Enterococcal Surface Protein, ESP) คือ โปรตีนในชั้นผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *E. faecalis* มีรายงานผลการทดลองว่า ESP ช่วยให้การคงอยู่ของเชื้อ *E. faecalis* ดีขึ้น ในกระเพาะปัสสาวะเนื่องจาก ESP ช่วยให้การเกาะติดของเชื้อได้ดีขึ้นจากการทดลองการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Upadhyaya *et al.*, 2009)

6.4 Aggregation Substance (AS) เป็นฟีโรโมนที่เหนียวน้ำ surface protein ของเชื้อ *E. faecalis* ทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกัน และทำให้เกิดการถ่ายทอดพลาสมิดกัน โดยวิธี conjugation (Clewel, 1993) นอกจากนี้ยังช่วยให้เกาะติดกับโฮสต์เซลล์ได้ดีมากขึ้น รวมทั้งการเกาะติดกับ extracellular matrix (ECM) proteins และเพิ่ม hydrophobicity ให้กับพื้นผิวเซลล์

6.5 เอนไซม์ hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยกรด hyaluronic ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เชื้อสามารถทำลายเนื้อเยื่อ และแพร่กระจายได้ดีลุกลามผ่านชั้นเนื้อเยื่อได้ง่าย (ภัทรชัย, 2549)

6.6 Bacteriocin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เพื่อไม่ให้เกิดการแข่งขันในการแย่งสารอาหาร และการแข่งขันในการเจริญเติบโต (ภัทรชัย, 2549)

7. ระบาดวิทยาของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin

เชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin (VRE) มีรายงานการพบครั้งแรกที่ยุโรปในปี ค.ศ. 1986 (Uttley *et al.*, 1988, 1989; Leclercq *et al.*, 1988) ในประเทศสหรัฐอเมริกาเชื้อ VRE

พบที่ Midwest State ในปี ค.ศ. 1987 และที่นิวยอร์ก ระหว่างปี ค.ศ. 1988 และ 1991 (Sahm *et al.*, 1989; Frieden *et al.*, 1993) ต่อมาพบว่ามีการระบาดของเชื้อ VRE ในหลายๆ ประเทศทั่วโลก ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย เบลเยียม แคนาดา เดนมาร์ก เยอรมัน อินเดีย อิตาลี เกาหลีใต้ มาเลเซีย เนเธอร์แลนด์ สเปน และสวีเดน เป็นต้น (Bogaard *et al.*, 2000; Butay *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 1998; Leclercq, *et al.*, 1988; Morrison, 2002; Sood *et al.*, 2008; Song, 2005) ในช่วง 10 ปีก่อนถึง ค.ศ. 1998 เชื้อ VRE เพิ่มขึ้นจากน้อยกว่า 1% เป็น 20% ในโรงพยาบาลของสหรัฐอเมริกา (Malathum and Murray, 1999) และจากปี ค.ศ. 1987 ถึง 1996 มีรายงานการแยกเชื้อ VRE จากผู้ป่วย 1,000 คนในโรงพยาบาล 93 แห่งของประเทศสหราชอาณาจักร (Morrison *et al.*, 1997) ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (Center for Disease Control and Prevention หรือ CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานว่าพบการติดเชื้อ VRE เพิ่มขึ้น 35 เท่าจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลปี ค.ศ. 1989 ถึง 1993 (CDC, 1993) การอุบัติขึ้นของเชื้อ VRE อาจเกิดจากการใช้ยา vancomycin ในโรงพยาบาล หลายแห่งของประเทศสหรัฐอเมริกา (Shlaes, 1992) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ VRE ในผู้ป่วยที่โรงพยาบาลราชวิถี จากข้อมูลตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 ถึง 2009 พบเชื้อ VRE 1.9% และพบเชื้อ *E. faecium* 99% และ *E. faecalis* 1% (Thongkoom *et al.*, 2012)

มีการศึกษาพบว่าฟาร์มสัตว์เป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ VRE เนื่องจากมีรายงานในสหภาพยุโรป ว่าพบเชื้อ VRE ที่แยกได้จากสัตว์เศรษฐกิจและผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ แสดงให้เห็นว่าการพบเชื้อ VRE มีสาเหตุมาจากการใช้ยา avoparcin เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ (Aarestrup, 1995; Bager *et al.*, 1997; Klare *et al.*, 1995) นอกจากนี้การพบเชื้อ VRE ในอุจจาระของสัตว์ที่เพิ่มขึ้น สามารถถ่ายทอดเชื้อ VRE จากสัตว์ไปสู่คนได้อีกด้วย (Wegener *et al.*, 1999) ต่อมาสหภาพยุโรป ได้ห้ามใช้ยา avoparcin ในปี ค.ศ. 1997 (Casewell *et al.*, 2003) หลังจากมีการห้ามใช้ยา avoparcin แล้วพบว่าในประเทศเดนมาร์กมีการพบเชื้อ *E. faecium* ที่ดื้อต่อยา vancomycin (VREM) ในตัวอย่างอุจจาระของสัตว์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 80% ในปี ค.ศ. 1995 เหลือเป็นน้อยกว่า 5% ในปี ค.ศ. 1998 เหมือนกับที่มีรายงานในประเทศเยอรมันพบว่าความชุกของเชื้อ VRE ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ลดลงจาก 100% ในปี ค.ศ. 1995 เป็น 25% ในปี ค.ศ. 1997 การลดลงของความชุกของเชื้อ VRE ในตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ที่มีสุขภาพดีจาก 12% ในปี ค.ศ. 1994 เป็น 3% ในปี ค.ศ. 1997 และความชุกของเชื้อ VRE ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ลดลงจาก 15% เหลือ 8% ในประเทศ อิตาลี (Bager *et al.*, 1999; Klare *et al.*, 1999; Pontosti *et al.*, 1999)

อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบความชุกของเชื้อ VRE ในระดับสูง (7.1-85%) ในฟาร์มสัตว์ หลังการยกเลิกใช้ยา avoparcin ในประเทศนอร์เวย์ กรีซ สหรัฐอเมริกา สเปน และได้หวัน (Aarestrup, 2000; Boerlin *et al.*, 2001; Borgen *et al.*, 2000; Donabesian *et al.*, 2010; Hammerum *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2000; Lauderdale *et al.*, 2007; Kotzamanidis *et al.*, 2009) จากข้อมูลข้างต้นพบว่ายังพบความชุกของเชื้อ VRE อยู่มาก ถึงแม้จะมีการประกาศห้ามใช้ยา avoparcin ไปแล้ว ซึ่งหมายความว่ายังมีปัจจัยอื่นที่เป็นสาเหตุของการเกิดเชื้อ VRE นอกเหนือจากการใช้ยา avoparcin และพบว่า VRE มีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline หรือ ยา tylosin (กลุ่ม macrolides) ที่สูงร่วมด้วย จึงอนุมานได้ว่าการใช้ยาเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการคงอยู่ของเชื้อ VRE ในฟาร์มสัตว์ เนื่องจากพบว่าสายพันธุ์กรรมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา กลุ่ม glycopeptides, ยา กลุ่ม macrolides และยา กลุ่ม tetracycline อยู่ใกล้กันมากบนพลาสมิดเดียวกัน (Aarestrup, 2000; Boerlin *et al.*, 2001; Hammerum *et al.*, 2004)

สำหรับการศึกษาเชื้อ VRE ในประเทศไทยนั้น พบว่ามีการศึกษาในสุนัข แมว ไก่ หอยแครง เนื้อสัตว์ อาหารสัตว์ สิ่งแวดล้อม และผู้ป่วยในโรงพยาบาล (ธงชัย และคณะ, 2544, 2546, 2548, 2549; Thongkoom *et al.*, 2012; Singhsuwan *et al.*, 2006; Siri wattanachai *et al.*, 2004) จากการสำรวจของ ธงชัย และคณะ (2548) ได้ทำการตรวจสอบตัวอย่างอุจจาระจากสุนัขและแมว ในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบเชื้อ VRE (ค่า MICs มากกว่าหรือเท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ในตัวอย่างอุจจาระสุนัข ร้อยละ 19.5 (41 จาก 210 ตัวอย่าง) และในตัวอย่างอุจจาระแมวร้อยละ 22.8 (26 จาก 114 ตัวอย่าง) โดยเป็นเชื้อ *E. faecium* ร้อยละ 43.3, *E. faecalis* ร้อยละ 22.4, *E. gallinarum* ร้อยละ 17.9, *E. avium* ร้อยละ 14.9 และ *E. duran* ร้อยละ 1.5 ทั้งนี้พบว่า *E. faecium* 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3) มีค่า MICs มากกว่า 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนที่เหลือ 65 ตัวอย่าง (ร้อยละ 97) มีค่า MICs อยู่ระหว่าง 8-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และไม่พบตัวอย่างที่ดื้อต่อยา teicoplanin เลย สำหรับการดื้อยาชนิดอื่นๆ พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยา ampicillin ร้อยละ 56.7, ยา tetracycline ร้อยละ 46.3, erythromycin ร้อยละ 20.9, tylosin ร้อยละ 16.4 และยา chloramphenicol ร้อยละ 6 เนื่องจากไม่มีการใช้ยา กลุ่ม glycopeptides และ tylosin ในสุนัขและแมว ดังนั้นสาเหตุของการตรวจพบเชื้อ VRE น่าจะมากจากอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์เลี้ยงหรือเจ้าของเตรียมเอง รวมทั้งจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวได้แสดงสถานภาพของเชื้อ VRE ในสัตว์เลี้ยงซึ่งสามารถเกี่ยวข้องกับมนุษย์และชุมชน จากงานวิจัยของ Siri wattanachai *et al.* (2004) ได้ศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ VRE ในสุนัข แมว และเจ้าของ โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระของสุนัข แมว และเจ้าของ จากโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตว

แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มียา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถแยกเชื้อ VRE ได้ร้อยละ 11.5 (61 จาก 530 ตัวอย่าง) ในสุนัขและแมว โดยเป็น *E. faecium* ร้อยละ 26.2 (16 ตัวอย่าง), *E. faecalis* ร้อยละ 4.9 (3 ตัวอย่าง), *E. gallinarum* ร้อยละ 60.7 (37 ตัวอย่าง) และ *E. casseliflavus* ร้อยละ 8.2 (5 ตัวอย่าง) และแยกเชื้อ VRE ได้ร้อยละ 71.4 (15 จาก 21 ตัวอย่าง) ในเจ้าของสุนัขและแมว โดยเป็น *E. faecium* ร้อยละ 40 (6 ตัวอย่าง) และ *E. gallinarum* ร้อยละ 60 (9 ตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบแบบแผน DNA ของเชื้อ VRE ที่แยกได้จากสุนัขกับเจ้าของด้วยวิธี Pulse-Field Gel Electrophoresis พบว่าแบบแผน DNA ของเชื้อ VRE ที่แยกได้จากสุนัขกับเจ้าของไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้น ความสำคัญด้านระบาดวิทยาของเชื้อ VRE จากสัตว์เลี้ยงสุนัขส่วนบุคคลจึงอาจไม่มีนัยสำคัญทางสาธารณสุข

สำหรับการศึกษาความชุกของเชื้อ VRE ในไก่นั้น จากงานวิจัยของ ธงชัยและคณะ (2544) จากการตรวจหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ในตัวอย่างอุจจาระและในเนื้อไก่พบว่าส่วนใหญ่เป็น *E. faecalis* คิดเป็นร้อยละ 12-29.6 ส่วน *E. faecium* พบเพียงร้อยละ 0.7-6.2 และพบว่ามีอัตราการดื้อต่อยา penicillin, chloramphenicol, kanamycin, gentamicin, tetracycline, erythromycin, streptomycin, nitrofurantoin และ tylosin ในเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระไก่ฟาร์มสูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระไก่บ้าน ทั้งนี้ไม่พบเชื้อ VRE ในอุจจาระไก่แต่สามารถแยกเชื้อ VRE ในเนื้อไก่ชุบเปอร์มาร์เก็ตได้ร้อยละ 0.3 ผลจากการวิจัยดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่าเนื้อที่จำหน่ายแก่ผู้บริโภคมีการปนเปื้อนของเชื้อสูงมากซึ่งอาจเกิดในขั้นตอนการฆ่า การขนส่ง และการคัดแต่งเนื้อ นอกจากนี้การใส่ยาต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์มีผลทำให้เกิดอัตราการดื้อต่อยาสูงขึ้น ดังนั้นจึงควรส่งเสริมให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างรอบคอบและเหมาะสมเพื่อป้องกันและลดปัญหาเชื้อดื้อยา และงานวิจัยของ ธงชัยและคณะ (2546) ได้ตรวจตัวอย่างอุจจาระไก่บ้านและไก่ฟาร์ม พบเชื้อ *E. faecalis* ร้อยละ 4 และ *E. faecium* ร้อยละ 8.8 ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในไก่บ้าน และพบเชื้อ *E. faecalis* ร้อยละ 2 และ *E. faecium* ร้อยละ 0.8 ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในไก่ฟาร์ม

ในการศึกษาความชุกของเชื้อ VRE ในสิ่งแวดล้อมของ Singhswan *et al.* (2006) ได้ตรวจหาเชื้อ VRE ในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยหอยแครงที่เลี้ยงอยู่บริเวณปากอ่าวไทย ซึ่งหอยแครงสามารถรับเอาเศษตะกอนเข้าไปในขณะที่กินอาหาร สามารถบอกได้ถึงการปนเปื้อนของเชื้อ VRE ในสิ่งแวดล้อมได้ นำตัวอย่างหอยมาแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มียา vancomycin 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการใช้หอยหนึ่งตัวเท่ากับหนึ่งตัวอย่างสามารถแยกเชื้อ VRE ได้ร้อยละ

ละ 0.36 (5 ตัวอย่าง) พบว่าเป็นเชื้อ *E. gallinarum* ทั้งหมด ซึ่งมีค่า MICs 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการรวมตัวอย่างหอย 25 กรัมเท่ากับหนึ่งตัวอย่าง พบเชื้อ VRE ร้อยละ 4.3 (26 ตัวอย่าง) โดยเป็น *E. faecium* ร้อยละ 57.7 (15 ตัวอย่าง), *E. faecalis* ร้อยละ 23.1 (6 ตัวอย่าง), *E. gallinarum* ร้อยละ 11.5 (3 ตัวอย่าง) และ *E. casseliflavus* ร้อยละ 7.7 (2 ตัวอย่าง) การทดสอบความไวยาของเชื้อ VRE พบว่าเชื้อ VRE ที่แยกได้จากการนับตัวอย่างหอยหนึ่งตัวเท่ากับหนึ่งตัวอย่างซึ่งเป็น *E. gallinarum* ทั้งหมดไม่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ส่วนการรวมตัวอย่างหอย 25 กรัมเท่ากับหนึ่งตัวอย่างซึ่งเป็น *E. faecium* 15 ตัวอย่างพบว่ามีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin ร้อยละ 33.3 และดื้อต่อยา ampicillin, ยา chloramphenicol, ยา tetracycline และยา tylosin เท่ากันคิดเป็นร้อยละ 13.3 *E. faecalis* 6 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin, ยา tetracycline และยา tylosin เท่ากันคิดเป็นร้อยละ 16.7 ไม่มีการดื้อต่อยา ampicillin และยา chloramphenicol *E. gallinarum* พบว่ามีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin และยา tetracycline เท่ากันคิดเป็นร้อยละ 66.7 ดื้อต่อยา chloramphenicol และ ยา tylosin เท่ากันคิดเป็นร้อยละ 33.3 และไม่ดื้อต่อยา ampicillin และ *E. casseliflavus* พบว่าดื้อต่อ erythromycin เพียงชนิดเดียวคิดเป็นร้อยละ 50 ทั้งนี้ การตรวจหายีนดื้อยา vancomycin ของเชื้อ VRE วิธี polymerase chain reaction พบยีน *vanC1* ใน *E. gallinarum* ทุกตัว และพบยีน *vanC2/C3* ใน *E. casseliflavus* ทุกตัว และไม่พบยีน *vanA* และ *vanB* การที่เชื้อ VRE ที่แยกได้จากหอยแครงมีปริมาณน้อย มีการดื้อต่อยา vancomycin ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่า VRE ที่พบในประเทศไทยนั้นไม่ปัญหาคัญทางด้านสาธารณสุข

ในการศึกษาความชุกของเชื้อ VRE ในหอยแครง อาหารสัตว์ และเนื้อสัตว์ ของธงชัย และคณะ (2549) ได้สุ่มเก็บตัวอย่างหอยแครง จากตลาดในจังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสมุทรสงคราม และกรุงเทพมหานคร ตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อสุกร และเนื้อโคจากตลาดและซูเปอร์มาร์เก็ตใน กรุงเทพมหานคร ตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดและชนิดเปียกบรรจุกระป๋องสำหรับสุนัข และสำหรับแมว ตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่ และสำหรับสุกร พบเชื้อ VRE (MICs มากกว่าหรือเท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในหอยแครง ร้อยละ 6.6 (จาก 376 ตัวอย่าง) เนื้อไก่ ร้อยละ 5 (จาก 100 ตัวอย่าง) เนื้อสุกร ร้อยละ 3 (จาก 100 ตัวอย่าง) เนื้อโค ร้อยละ 13 (จาก 100 ตัวอย่าง) อาหารสุนัข ร้อยละ 0.93 (จาก 107 ตัวอย่าง) อาหารไก่ ร้อยละ 0.89 (จาก 112 ตัวอย่าง) และไม่พบเชื้อ VRE ในอาหารแมว (จาก 100 ตัวอย่าง) และอาหารสุกร (จาก 126 ตัวอย่าง) ในตัวอย่างหอยแครงพบว่าเป็นเชื้อ *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* จำนวน 15, 5, 3 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อสุกร และเนื้อโคพบว่าเป็นเชื้อ *E. gallinarum*, *E. faecalis* และ *E. faecium* จำนวน 12, 7 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตัวอย่างอาหารสุนัขและอาหาร

ได้พบว่าเป็นเชื้อ *E. gallinarum* ชนิดละหนึ่งตัวอย่าง ทั้งนี้มีเพียง *E. faecalis* 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ในซุเปอร์มาร์เก็ต มีค่า MICs ต่อยา vancomycin 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และเมื่อทดสอบความไวยาต่อยาโทโคพลาโนนจึงสรุปได้ว่าเป็นชนิด VanA เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น ดังนั้น เชื้อ VRE ในสิ่งแวดล้อม อาหารสัตว์และเนื้อสัตว์จึงไม่น่าจะเป็นปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศไทย อย่างไรก็ตามการศึกษาด้านจุลชีพอื่นๆ ที่ทดสอบโดยภาพรวมพบว่าเชื้อ VRE คือต่อยา erythromycin, ยา tetracycline และยา tylosin ค่าขึ้นสูง ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องรณรงค์เรื่องการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างรอบคอบและเหมาะสมต่อไป ทั้งในคนและในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

ในประเทศไทย พบว่าจากข้อมูลของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ พบสถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อ VRE ในวงจรการเลี้ยงสัตว์และการผลิตสัตว์ปีก เนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปีกของประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2547 พบว่า ในปี พ.ศ. 2544 พบเชื้อ VRE ในฟาร์มพ่อแม่พันธุ์ร้อยละ 6.54 (20 จาก 306 ฟาร์ม) โรงฟักไข่ร้อยละ 6.8 (17 จาก 250 โรง) ฟาร์มไก่กระตังร้อยละ 5.89 (48 จาก 815 ฟาร์ม) อาหารไก่ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 2.71 (32 จาก 1,179 ตัวอย่าง) น้ำใช้ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 1.89 (32 จาก 1,696 ตัวอย่าง) สวอปก้น (cloacal swab) ร้อยละ 10.61 (70 จาก 660 ฟาร์ม) เนื้อสัตว์ปีกร้อยละ 6.45 (68 จาก 1,054 ตัวอย่าง) และไม่พบ VRE ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปีก ในปี พ.ศ. 2545 พบเชื้อ VRE ในฟาร์มพ่อแม่พันธุ์ร้อยละ 1.41 (5 จาก 339 ฟาร์ม) โรงฟักไข่ร้อยละ 3.36 (8 จาก 238 โรง) ฟาร์มไก่กระตังร้อยละ 2.82 (22 จาก 780 ฟาร์ม) อาหารไก่ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 0.76 (9 จาก 1,187 ตัวอย่าง) น้ำใช้ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 0.17 (3 จาก 1,749 ตัวอย่าง) สวอปก้น (cloacal swab) ร้อยละ 3.29 (30 จาก 912 ฟาร์ม) เนื้อสัตว์ปีกร้อยละ 0.99 (12 จาก 1,208 ตัวอย่าง) และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปีก ร้อยละ 0.43 (2 จาก 469 ตัวอย่าง) ในปี พ.ศ. 2546 พบเชื้อ VRE ในฟาร์มพ่อแม่พันธุ์ร้อยละ 0.27 (1 จาก 373 ฟาร์ม) ฟาร์มไก่กระตังร้อยละ 1.49 (13 จาก 875 ฟาร์ม) อาหารไก่ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 0.32 (4 จาก 1,236 ตัวอย่าง) น้ำใช้ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 0.05 (1 จาก 1,918 ตัวอย่าง) สวอปก้น (cloacal swab) ร้อยละ 2.56 (22 จาก 858 ฟาร์ม) เนื้อสัตว์ปีกร้อยละ 0.25 (3 จาก 1,211 ตัวอย่าง) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปีก ร้อยละ 0.17 (1 จาก 585 ตัวอย่าง) ไม่พบเชื้อ VRE ในโรงฟักไข่ร้อยละ และในปี พ.ศ. 2547 พบเชื้อ VRE ในฟาร์มพ่อแม่พันธุ์ร้อยละ 3.31 (12 จาก 363 ฟาร์ม) โรงฟักไข่ร้อยละ 1.59 (4 จาก 251 โรง) ฟาร์มไก่กระตังร้อยละ 1.47 (10 จาก 678 ฟาร์ม) อาหารไก่ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 0.97 (11 จาก 1,130 ตัวอย่าง) น้ำใช้ (พ่อแม่พันธุ์และไก่กระตัง) ร้อยละ 0.24 (4 จาก 1,656 ตัวอย่าง)

สวอปก้น (cloacal swab) ร้อยละ 1.89 (15 จาก 794 ฟาร์ม) เนื้อสัตว์ปีกร้อยละ 0.75 (8 จาก 1,070 ตัวอย่าง) และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปีก ร้อยละ 0.6 (3 จาก 499 ตัวอย่าง) (ศศิธร, 2547)

ในการศึกษาความชุกของเชื้อ VRE ในผู้ป่วยพบว่ งานวิจัยของ Thongkoom *et al.* (2012) ได้ทำการตรวจหาเชื้อ VRE จากผู้ป่วยที่โรงพยาบาลราชวิถี จากข้อมูลตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 ถึง 2009 พบเชื้อ VRE ร้อยละ 1.9 (201 จาก 10,470 ตัวอย่าง) ทั้งนี้เป็นเชื้อ *E. faecium* ร้อยละ 99 (199 จาก 201 ตัวอย่าง) และ *E. faecalis* ร้อยละ 1 (2 จาก 201 ตัวอย่าง) เมื่อพิจารณาเป็นรายปีพบว่า พบเชื้อ VRE ร้อยละ 1.8 ในปี ค.ศ 1999, ร้อยละ 3.3 ในปี ค.ศ 2000, ร้อยละ 5.1 ในปี ค.ศ 2001, ร้อยละ 1 ในปี ค.ศ 2002, ร้อยละ 0 ในปี ค.ศ 2003 และ 2004, ร้อยละ 1.1 ในปี ค.ศ 2005, ร้อยละ 4.7 ในปี ค.ศ 2006, ร้อยละ 1.9 ในปี ค.ศ 2007, ร้อยละ 2.2 ในปี ค.ศ 2008 และร้อยละ 0.9 ในปี ค.ศ 2009 ทั้งนี้พบว่า VRE 71 isolates มีฟิโนไทป์เป็น VanA ซึ่งประกอบด้วย *E. faecium* 69 isolates และ *E. faecalis* 2 isolates นอกจากนี้มี 130 isolates มีฟิโนไทป์เป็น VanB ซึ่งเป็น *E. faecium* ทั้งหมด VRE พบมากที่สุดในปีศตวรรษ ร้อยละ 64.2 รองลงมาคือ หนอง ร้อยละ 21, เลือด ร้อยละ 9, ช้องคลอด ร้อยละ 3.5 และเสมหะ ร้อยละ 1.4 ทั้งนี้พบว่ามีอัตราการพบผู้ป่วยที่พบ VRE ในโรงพยาบาล (ร้อยละ 99) มากกว่าผู้ป่วยนอกโรงพยาบาล (ร้อยละ 1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับสัตว์เศรษฐกิจอย่างสุกร พบว่ายังไม่มีรายงานเชื้อ VRE ในอุจจาระสุกรในประเทศไทยมาก่อน และจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีแหล่งของเชื้อ VRE ทั้งในโรงพยาบาลและนอกโรงพยาบาล

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอุจจาระสุกร

ในการศึกษานี้เก็บตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธีป้ายที่ก้น (rectal swab) แล้วใส่ในขวดที่บรรจุอาหารนำส่ง Cary-Blair transport medium (Oxoid™ Ltd., Hampshire, UK)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Mueller-Hinton broth (Oxoid™)
- 2.2 Mueller-Hinton agar (Oxoid™)
- 2.3 Mueller-Hinton agar No. II (Acumedia™)
- 2.3 Heart infusion broth (Bacto™ Becton Dickinson, USA)
- 2.4 Brain heart infusion agar (Bacto™)
- 2.5 Enterococcosel™ agar (BBL™)
- 2.6 Tryptic soy agar (Difco™ Becton, Dickinson and Company Spark MD, USA)
- 2.7 Tryptic soy broth (Bacto™)

3. อุปกรณ์

- 3.1 ไม้พันสำลี (cotton swab)
- 3.2 ปากคีบ (forcep)
- 3.3 ถุงพลาสติก
- 3.4 ถังมือยาง
- 3.5 ไม้จิ้มฟัน
- 3.6 ถุงพลาสติก
- 3.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.8 Spreader

3.9 ซ้อนพลาสติก

3.10 จานเพาะเชื้อ

3.11 เข็มฉีดยา

3.12 กระบอกตวง

3.13 สไลด์

3.14 Automatic pipette พร้อม tip

4. เครื่องมือ

4.1 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

4.2 เครื่องบ่มเชื้อ (incubator)

4.3 ตู้ปลูกถ่ายเชื้อ (microflow laminar flow)

4.4 ตู้อบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (hot air oven)

4.5 เครื่องชั่งสาร

4.6 เครื่องหมุนปั่นเหวี่ยง

4.7 ไมโครเวฟ

4.8 กล้องจุลทรรศน์

4.9 เครื่องหมุนปั่นเหวี่ยง

5. อุปกรณ์เครื่องแก้ว

5.1 บีกเกอร์ (beaker)

5.2 ปิเปต (measuring pipet)

5.3 หลอดทดลอง (test tube)

5.4 ขวดรูปชมพู่ (flask)

5.5 ขวดแก้ว

6. สารเคมี

6.1 สารละลาย McFarland No. 0.5

- 6.2 Sodium pyruvate (Sigma-AlarichTM, St. Louis, MO, USA)
- 6.3 Vancomycin hydrochloride (Sigma-AlarichTM)
- 6.4 Decarboxylase base moeller (DifcoTM)
- 6.5 L-arginine monohydrochloride (Sigma-AlarichTM)
- 6.6 ยา vancomycin 30 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.7 Phenol red broth base (BactoTM)
- 6.8 Potassium tellurite hydrate (Sigma-AlarichTM)
- 6.9 Bromocresol purple (Sigma-AlarichTM)
- 6.10 Methyl- α -D-glycopyranoside (Sigma-AlarichTM)
- 6.11 L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) (OxoidTM)
- 6.12 Leucine- β -naphthylamide (LAP) (OxoidTM)
- 6.13 Luria-Bertani broth
- 6.14 Cary-Blair transport medium (OxoidTM)
- 6.15 Mannitol (May&BakerTM Ltd. Dagenham, UK)
- 6.16 L-Sorbose (BDHTM Chemicals Ltd., Poole, UK)
- 6.17 Arabinose (BactoTM)
- 6.18 D-Sorbital (BactoTM)
- 6.19 Raffinose (BactoTM)
- 6.20 Sucrose (MERCKTM Darmstadt, Germany)
- 6.21 Bromocresol blue (BDHTM)
- 6.22 สาร 3 % H₂O₂
- 6.23 ยา ampicillin 10 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.24 ยา vancomycin 30 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.25 ยา teicoplanin 30 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.26 ยา tetracycline 30 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.27 ยา ciprofloxacin 5 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.28 ยา nitrofurantoin 300 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.29 ยา rifampin 5 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.30 ยา chloramphenicol 30 ไมโครกรัม (OxoidTM)
- 6.31 ยา quinupristin-dalfopristin 15 ไมโครกรัม (OxoidTM)

- 6.32 ยา linzolid 30 ไมโครกรัม (Oxoid™)
- 6.33 ยา fosfomycin 200 ไมโครกรัม (Oxoid™)
- 6.34 ยา gentamycin 120 ไมโครกรัม (Oxoid™)
- 6.35 ชุดสารเคมีซ่อมสีแกรม

7. เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐาน

- 7.1 *Enterococcus faecalis* ATCC 14506 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- 7.2 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
- 7.3 *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
- 7.4 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ (กำแพงแสน) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การคัดเลือกฟาร์มสุกร

ในการคัดเลือกฟาร์มสุกรคัดเลือกจากทะเบียนมาตรฐานฟาร์มสุกรที่ขึ้นไว้กับกรมปศุสัตว์ ในเขตภาคกลางซึ่งได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี ลพบุรี ราชบุรี และสระบุรี โดยมีข้อมูลการให้ยาปฏิชีวนะจากการควบคุมโดยนายสัตวแพทย์คนเดียวกัน มีการให้ยาเป็นไปตามมาตรฐานและในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งได้ทำคัดเลือกจังหวัดละ 1 ฟาร์ม รวม 4 ฟาร์ม ในช่วงปี พ.ศ. 2554 โดยทุกฟาร์มต้องมีลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร และมีการเก็บข้อมูลการให้ยาปฏิชีวนะในสุกรด้วย ฟาร์มที่ได้เก็บตัวอย่างเป็นฟาร์มขนาดเล็ก 2 ฟาร์ม และฟาร์มขนาดใหญ่ 2 ฟาร์ม ซึ่งจำนวนการเก็บตัวอย่างทั้งหมดแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฟาร์มตัวอย่าง แสดงขนาดของฟาร์ม ที่ตั้ง ช่วงอายุสุกรที่เก็บ และจำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละฟาร์ม

ฟาร์ม ตัวอย่าง	จังหวัด	ขนาดฟาร์ม	ลูกสุกร (3-4 สัปดาห์)	สุกรขุน (21-24 สัปดาห์)	แม่พันธุ์สุกร	รวม
A	ลพบุรี	500	15	14	13	42
B	สระบุรี	400	15	15	14	44
C	ราชบุรี	4,000	16	16	16	48
D	สุพรรณบุรี	1,200	15	15	15	45
รวม			61	60	58	179

2. การเก็บตัวอย่างอุจจาระของสุกรด้วยวิธีป้ายที่ก้น (Rectal swabs)

2.1 ใช้ไม้พินสำลีที่ปราศจากเชื้อป้ายสอดไปบริเวณก้นสุกรให้ลึกเข้าไปประมาณ 2-4 เซนติเมตร แล้วหมุนไม้พินสำลีเบาๆ ให้ให้สัมผัสกับผนังของเยื่อบุทวารหนักให้มากที่สุด จนติดอุจจาระสุกรมาด้วย หากไม่มีสีอุจจาระติดอยู่กับไม้พินสำลี ให้ทำใหม่ซ้ำอีกครั้ง

2.2 นำไม้พินสำลีใส่ในขวดที่บรรจุอาหารนำส่ง Cary-Blair transport medium (Oxoid™) แล้วหมุนปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ในกล่องโฟมที่แช่น้ำแข็ง หรือแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมเพาะแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

3. การเก็บตัวอย่างอุจจาระของสุกรด้วยวิธีปกติ (Stool specimens)

การเก็บตัวอย่างอุจจาระของสุกรด้วยวิธีปกติในการศึกษานี้ใช้สำหรับการเก็บตัวอย่างเฉพาะแม่พันธุ์สุกรเท่านั้นที่มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) ในแม่พันธุ์สุกรระหว่างการเก็บอุจจาระด้วยวิธี rectal swab และวิธีการเก็บอุจจาระสุกรปกติแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

3.1 เก็บอุจจาระที่สุกรเพิ่งถ่ายลงบนพื้น โดยเก็บบริเวณส่วนบนที่ไม่มีการสัมผัสกับพื้น หรือสวมถุงมือที่สะอาดแล้วเก็บอุจจาระโดยการล้วงจากบริเวณช่องทวารของสุกร

3.2 นำอุจจาระใส่ในกล่องพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ปิดฝาให้แน่นแล้วเก็บไว้ในกล่องโฟมที่แช่น้ำแข็ง เพื่อเตรียมเพาะแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

4. การเพาะแยกเชื้อ และคัดกรองเชื้อ VRE เบื้องต้นจากตัวอย่างอุจจาระสุกร

4.1 สำหรับการเก็บโดยวิธี rectal swab ผสมอุจจาระที่ติดกับไม้พันสำลี ขนาดประมาณ 0.5 กรัม ใน maximum recovery diluent (MRD) 4.5 มิลลิลิตร สำหรับการเก็บด้วยวิธีปกติ ชั่งน้ำหนักอุจจาระ 1 กรัม ใน MRD 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นได้ทำความเข้มข้นที่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเพาะแยกเชื้อคือ 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3}

4.2 ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร ลงบน bile-esculin azide agar หรือ Enterococcosel™ agar (BBL™) ที่มียา vancomycin (Sigma-Aldrich™) ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเรียกสั้นๆว่า ECVA และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่ยา หรือ ECA ทำการเกลี่ย (spread) สารละลายให้ทั่วบนผิววุ้นจนแห้ง และทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3 สังเกตโคโลนี ที่รอบๆ มีโซนสีดำ หรือน้ำตาลเข้ม คัดเลือกโคโลนีดังกล่าว แล้วนำมาเชยเชื้อ (streak) ลงบน ECA และ ECVA อีกครั้ง บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำจนได้เชื้อบริสุทธิ์

4.4 ทำการเชยเชื้อลงบน Tryptic soy agar (Difco™) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเก็บเชื้อ เลือกโคโลนีมาทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น คือ การทดสอบ catalase และการย้อมสีแกรม *Enterococcus* spp. คิดสีเป็น gram-positive cocci และให้ผลการทดสอบ catalase เป็นลบ

4.5 เก็บเชื้อใน Luria-Bertani broth ที่มี glycerol 20% ที่ -80 องศาเซลเซียส

5. การพิสูจน์เชื้อในระดับจีโนมด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

เชื้อในจีโนม *Enterococcus* spp. มีคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้ คือ สามารถเจริญเติบโตในความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5% สามารถเจริญเติบโตในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถสลาย bile esculin สามารถสลายสาร leucine- β -naphthylamide (LAP) โดยสร้างเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAPase) สามารถสลายสาร L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ pyrrolidonyl arylamidase (PYRase) (Teixeira *et al.*, 2007) เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ คือ *Enterococcus faecalis* ATCC 14506

5.1 การทดสอบการเจริญเติบโตในความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5% (6.5% salt broth test)

5.1.1 เลือกโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน TSA ใส่งไปใน 6.5% salt broth (0.1% bromocresol purple 6.5% NaCl และ 0.5% glucose ใน heart-infusion broth)

5.1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะปกติ คูลครั้งแรกที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตัวอย่างใดที่ให้ผลลบคูลอีกครั้งที่เวลา 7 วัน สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองให้ผลบวกต่อการทดสอบนี้

5.2 การทดสอบการเจริญเติบโตในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

5.2.1 เลือกโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อใส่งไปในหลอดสารละลาย (0.1% bromocresol purple และ 0.5% glucose ใน heart-infusion broth)

5.2.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยเครื่อง water bath คูลตั้งแต่ 1-7 วัน สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองให้ผลบวกต่อการทดสอบนี้

5.3 การทดสอบการเจริญเติบโตใน bile-esculin azide agar (BBL™)

5.3.1 เชื้อ (streak) โคโลนีของเชื้อลงบน bile-esculin azide agar

5.3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีโซนสีดำขึ้นรอบๆ โคลนินของเชื้อ แสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ

5.4 การทดสอบ L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) (Oxoid™)

ทำตามคำแนะนำของบริษัท Oxoid™ โดยมีวิธีการ ดังนี้

5.4.1 ใช้ forcep หยิบแผ่น PYR disc วางบนสไลด์ที่สะอาด ปราศจากความชื้น

5.4.2 ทำให้ PYR disc เกิดความชื้นด้วยการใช้น้ำกลั่นปริมาณ 5-10 ไมโครลิตร ใส่ลงบน PYR disc โดยใช้ micropipette หรือ inoculating loop

5.4.3 ใช้ไม้ขนาดเล็กหรือ inoculating loop ที่ปราศจากเชื้อ เชี่ยโคลนินที่มีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนมากมาบดขยี้บน PYR disc

5.4.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

5.4.5 หยด PYR reagent 1 หยดลงบน PYR disc

5.4.6 ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที พบสีชมพูถึงสีแดงภายใน 1 นาทีหลังจากหยด color developer แสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบสีครีม เหลือง หรือไม่เปลี่ยนสีภายใน 1 นาที แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

5.5 การทดสอบ leucine- β -naphthylamide (LAP) (Oxoid™)

ทำตามคำแนะนำของบริษัท Oxoid™ โดยมีวิธีการ ดังนี้

5.5.1 ใช้ forcep หยิบแผ่น LAP disc วางบนสไลด์ที่สะอาด ปราศจากความชื้น

5.5.2 ทำให้ LAP disc เกิดความชื้นด้วยการใช้น้ำกลั่นปริมาณ 5-10 ไมโครลิตร ใส่ลงบน LAP disc โดยใช้ micropipette หรือ inoculating loop

5.5.3 ใช้ไม้ขนาดเล็กหรือ inoculating loop ที่ปราศจากเชื้อ เช็บโคโลนีที่มีอายุประมาณ 18-72 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อบน LAP disc

5.5.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

5.5.5 หยด LAP reagent 1 หยดลงบน LAP disc

5.5.6 ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที พบสีชมพูถึงสีแดงภายใน 1 นาทีหลังจากหยด color developer แสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบสีครีม เหลือง หรือไม่เปลี่ยนสีภายใน 1 นาที แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

6. การพิสูจน์เชื้อในระดับสปีชีส์ด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในระดับสปีชีส์ โดยทำการทดสอบคาร์โบไฮเดรต (mannitol, sorbose, arabinose, sorbitol, raffinose, sucrose และ methyl- α -D-glycopyranoside) การทดสอบ arginine การทดสอบการทนต่อ tellurite การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ การดูสีโคโลนี และการทดสอบ pyruvate (Facklam and Elliott, 1995; Teixeira *et al.*, 2007) เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ คือ *Enterococcus faecalis* ATCC 14506

6.1 การทดสอบการสร้างกรดในคาร์โบไฮเดรต (Acid formation in carbohydrate broths)

คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ mannitol (May&BakerTM), sorbose (BDHTM), arabinose (BactoTM), sorbitol (BactoTM), raffinose (BactoTM) และ sucrose (MERCKTM)

6.1.1 เช็บโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อลงในหลอดที่มีคาร์โบไฮเดรต (0.1% bromocresol purple และ 1% carbohydrates ใน heart-infusion broth)

6.1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส คูลตั้งแต่ 1-14 วัน พบสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองภายใน 14 วันหลังการบ่มเชื้อ แสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบสารละลายไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

6.2 การทดสอบการกำจัดหมู่อะมิโนของ arginine (Deamination of arginine)

การทดสอบการกำจัดหมู่อะมิโนของ arginine (deamination of arginine) นำมาทดสอบใน Moeller's decarboxylase base medium (Difco™) บางสปีชีส์ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบแสดงว่ามีปฏิกิริยา alkaline เกิดขึ้นเนื่องจากการหลั่งของ NH_3 (Facklam and Elliott, 1995)

6.2.1 เชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อลงในหลอดทดลองที่มี arginine ใน Moeller's decarboxylase base medium (Difco™) (0.05% L-arginine hydrochloride และ 0.025% agar ใน Moeller's decarboxylase base medium)

6.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส คูลภายใน 7 วัน พบสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเข้ม หลังการบ่มเชื้อ แสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบสารละลายไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

6.3 การทดสอบการทนต่อ tellurite (Tellurite tolerance test)

การทดสอบการทนต่อ tellurite นำมาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มี 0.04% potassium tellurite โดยการใช้ potassium tellurite hydrate (Sigma-Alarich™) การเตรียมสามารถเตรียมทั้งในหลอดทดลอง หรือในจานเพาะเชื้อ (Facklam and Elliott, 1995)

6.3.1 เชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อลงบน 0.04% tellurite agar (1% agar, 5% bovine blood, 0.04% potassium tellurite solution ใน heart-infusion broth, pH 6)

6.3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส 2 ผลภายในเวลา 7 วัน พบโคโลนีสีดำหลังการบ่มเชื้อแสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ โดย *E. faecalis* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ สปีชีส์อื่นๆ ให้โคโลนีสีเทา ซึ่งเป็นผลลบ หรือไม่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้

6.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ (Motility test)

6.4.1 เชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อด้วย needle แทงลงในเนื้อวุ้นที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ (1% tryptone และ 0.35% agar)

6.4.2 บ่มที่อุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่ามีการเคลื่อนที่ของเชื้อภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อแสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของเชื้อภายใน 24-48 ชั่วโมงแสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

6.5 การดูสีของโคโลนี (Pigmentation test)

6.5.1 เชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar

6.5.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพแวดล้อมที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ใน candle jar เมื่อนำไม้พันสำลีป้ายที่โคโลนีของเชื้อ 24 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อ พบโคโลนีสีเหลือง แสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบโคโลนีสีครีม ขาว และเทา แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

6.6 การทดสอบ pyruvate (Pyruvate utilization test)

6.6.1 เชื้อโคโลนิบริสุทธิ์ของเชื้อลงในหลอดทดลองที่มี pyruvate (2.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% NaCl, 1% sodium salt of pyruvic acid, 0.004% bromothymol blue และ pH 7.2-7.4)

6.6.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส และดูผลภายในเวลา 7 วัน พบสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวหรือสีเหลืองเป็นสีเหลืองหลังการบ่มเชื้อ แสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบสารละลายไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

6.7 การทดสอบ methyl- α -D-glycopyranoside (Methyl- α -D-glycopyranoside test)

6.7.1 เชื้อโคโลนิบริสุทธิ์ของเชื้อลงในหลอดทดลองที่มี methyl- α -D-glycopyranoside (2.5% methyl- α -D-glycopyranoside ใน phenol red broth base)

6.7.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อแสดงว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ พบสารละลายไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Enterococcus* spp. ในแต่ละสปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อ *Enterococcus* spp. ในแต่ละสปีชีส์

สปีชีส์	ลักษณะคุณสมบัติที่ตรวจพบได้ของเชื้อ ^a											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
กลุ่มที่ 1												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. Pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. saccharolyticus</i> ^b	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
“ <i>E. hawaiiensis</i> ”	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สปีชีส์	ลักษณะคุณสมบัติที่ตรวจพบได้ของเชื้อ ^a											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
กลุ่มที่ 2												
<i>E. faecium</i>	+ ^c	-	+	+	V	V	-	-	-	+ ^c	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+ ^c	+	V	+	- ^c	+ ^c	+ ^c	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+ ^c	+	-	+	-	+ ^c	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	+ ^c	-	+ ^c	-	+	-	+	-	-	+ ^c	+	-
<i>E. haemoperoxidus</i> ^b	+ ^d	-	+ ^d	-	-	-	-	-	-	+	-	+
“ <i>E. sanguinicola</i> ”	+	-	+	-	-	-	+ ^e	-	-	+	-	-
<i>Lactococcus</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สปีชีส์	ลักษณะคุณสมบัติที่ตรวจพบได้ของเชื้อ ^a											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
กลุ่มที่ 3												
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลุ่มที่ 4												
<i>E. cecorum</i> ^b	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. phoeniculicola</i> ^b	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สปีชีส์	ลักษณะคุณสมบัติที่ตรวจพบได้ของเชื้อ ^a											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
กลุ่มที่ 4												
<i>E. asini</i> ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. caccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+ ^d
กลุ่มที่ 5												
<i>E. canis</i> ^b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. columbae</i> ^b	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. moraviensis</i> ^b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hermanni</i> ^b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+

ตารางที่ 5 (ต่อ)

หมายเหตุ ^aคำย่อและสัญลักษณ์: MAN, mannitol; SOR, sorbose; ARG, arginine; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, raffinose; TEL, 0.04% tellurite; MOT, motility; PIG, pigment; SUC, sucrose; PYU, pyruvate; MGP, methyl- α -D-glycopyranoside; + 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ให้ผลบวก; -, 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ให้ผลลบ; V, ความแปรปรวน (11-89% ให้ผลบวก)

^bลักษณะคุณสมบัติที่ตรวจพบได้จากข้อมูลประเภทสายพันธุ์

^cการยกเว้นเป็นกรณีพิเศษ (<3% ของสายพันธุ์ที่แสดงปฏิกิริยาผิดปกติ)

^dให้ผลบวกช้ากว่าปกติ (3 วันหลังการบ่มเชื้อหรือมากกว่านี้)

^eเกิดปฏิกิริยาอ่อน

ที่มา: Teixeira *et al.* (2007)

7. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc diffusion technique

ใช้การทดสอบโดยวิธี Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ และเป็นวิธีที่ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) แนะนำให้ใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เชื้อ VRE 1 isolate ที่แยกได้ ทำสองซ้ำในการทดสอบ สำหรับยาในแต่ละตัว

ยาที่ใช้ทดสอบในการทดลองนี้ได้แก่ยา ampicillin 10 ไมโครกรัม (AMP), ยา vancomycin 30 ไมโครกรัม (VA), ยา teicoplanin 30 ไมโครกรัม (TEC), ยา tetracycline 30 ไมโครกรัม (TE), ยา ciprofloxacin 5 ไมโครกรัม (CIP), ยา nitrofurantoin 300 ไมโครกรัม (F), ยา rifampin 5 ไมโครกรัม (RD), ยา chloramphenicol 30 ไมโครกรัม (C), ยา quinupristin-dalfopristin 15 ไมโครกรัม (QD), ยา linezolid 30 ไมโครกรัม (LZD), ยา fosfomycin 50 ไมโครกรัม (FOS), ยา streptomycin 300 ไมโครกรัม (ระดับสูง) (S) และยา gentamicin 120 ไมโครกรัม (ระดับสูง) (CN) disc ยาที่ใช้ทดสอบทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท Oxoid™ เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

วิธีการทดสอบ

7.1 วาง disc ยาที่ใช้ทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนทดสอบ

7.2 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อ 2-3 โคโลนีในอาหารเหลว Mueller Hinton broth (Oxoid™) โดยความเข้มข้นของเชื้อนำไปปรับความขุ่นเทียบกับสารละลาย McFarland No. 0.5

7.3 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้แล้ว บิดให้แห้งพอหมาดๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการเกลี่ยทำมุม 60 องศา 3 ครั้ง ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (Oxoid™) และวนรอบบริเวณขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาทีเพื่อให้ส่วนของผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แต่ห้ามทิ้งไว้เกิน 15 นาที

7.4 ใช้ปากกีสที่เผาฆ่าเชื้อแล้วคืบ disc ขาออกมา 1 อันวางบนเพลทที่เพาะเชื้อไว้ดังกล่าว แล้วใช้ปลายปากกีสแตะย่ำให้แน่ใจว่า disc ขาดิบนอาหาร การวางตำแหน่งของ disc ยาให้ประมาณเนื้อที่ระหว่าง disc ยาให้เหมาะสม ให้ระยะห่างจากขอบเพลทอย่างน้อย 15 มิลลิเมตร เพื่อความสะดวกในการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เสร็จแล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับยาที่ใช้ทดสอบชนิดอื่นๆ ยกเว้นยา vancomycin ตัวเดียวที่อ่านผลที่เวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการอ่านผล

การอ่านผล ให้วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibition zone) โดยวัดจากขอบโซนหนึ่งไปยังขอบโซนหนึ่ง ของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของ paper disc ทำการวัดสองครั้ง แล้วบันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร

วิธีการแปลผล

การแปลผลนำขนาดของ inhibition zone เปรียบกับตารางการแปลผลตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011) สำหรับยาทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น ยา fosfomycin 50 ไมโครกรัม คูณผลตาม Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN 58940)

8. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย double disc diffusion technique (CLSI, 2009)

วิธี double disc diffusion technique เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อเพื่อหาสายพันธุ์ที่ดื้อยา กลุ่ม macrolides, lincosamides และ streptogramins B (MLS_B) โดยใช้ disc ยา erythromycin 15 ไมโครกรัม และยา clindamycin 2 ไมโครกรัม (Oxoid™) เป็นตัวแทนในการทดสอบ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) แนะนำให้ใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B ทั้งหมดเป็นรูปแบบการดื้อที่สามารถคาดเดาได้ว่ามียีน erythromycin resistance methylase (*erm*) และพบว่ามีโอกาสเป็นทั้งการดื้อที่เกิดขึ้นตลอดเวลา โดยไม่มีการถูกกระตุ้นด้วยยา (constitutive resistance) และการถูกกระตุ้นด้วยยา (inducible resistance) ซึ่งกลไกการดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B เหมือนกัน คือ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไรโบโซม

เนื่องจากยาทั้งสามกลุ่มมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ยาเดียวกัน คือ 23S rRNA ถึงแม้ว่ายาทั้งสามชนิดจะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันก็ตาม เชื้อสร้างเอนไซม์ rRNA methylase โดยยีน *erm* พบได้ทั้งบนพลาสมิดและโครโมโซม เอนไซม์ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl โดยขบวนการ methylation ที่โมเลกุลเบส adenine ในตำแหน่งจำเพาะของ 23S rRNA มีผลทำให้ไรโบโซมเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003) เชื้อ VRE 1 isolate ที่แยกได้ ทำสองซ้ำในการทดสอบเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

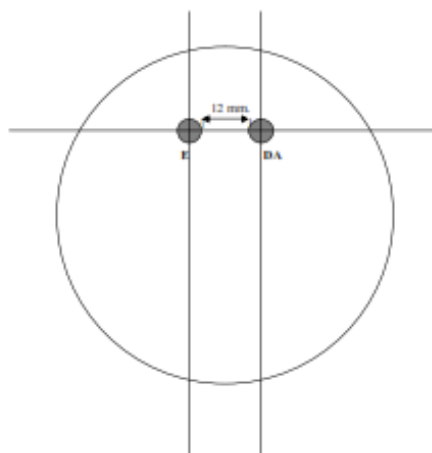
วิธีการทดสอบ

8.1 วาง disc ยาที่ใช้ทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนทดสอบ

8.2 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อ 2-3 โคโลนีในอาหารเหลว Mueller Hinton broth โดยความเข้มข้นของเชื้อนำไปปรับความขุ่นเทียบกับสารละลาย McFarland No. 0.5

8.3 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้แล้วบิดให้แห้งพอหมาดๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการเกลี่ยทำมุม 60 องศา 3 ครั้ง ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (Oxoid™ Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) และวนรอบบริเวณขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาทีเพื่อให้ส่วนของผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แต่ห้ามทิ้งไว้เกิน 15 นาที

8.4 ใช้ปากคีบที่เผาฆ่าเชื้อแล้วคีบ disc ยา erythromycin ออกมา 1 อันวางบนเพลทที่เพาะเชื้อไว้ดังกล่าวแล้วใช้ปลายปากคีบแตะย่ำให้แน่ใจว่า disc ยาติดบนอาหาร การวางตำแหน่งของ disc ยาให้ประมาณเนื้อที่ระหว่าง disc ยาให้เหมาะสม แล้วใช้ปากคีบ disc ยา clindamycin มาวางให้ห่างจาก disc ยา erythromycin 12 มิลลิเมตร ตามรูปแบบในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 รูปแบบสำหรับการวาง disc ยา clindamycin (DA) และ erythromycin (E)

ที่มา: Procedure manual Toronto medical laboratories (2005)

8.5 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

วิธีการอ่านผล

สำหรับเชื้อ *Enterococcus* spp. สามารถอ่านผลได้ 2 แบบ (Procedure manual Toronto medical laboratories, 2005) ดังภาพที่ 5 และ 6



ภาพที่ 5 เชื้อดื้อยา (resistance) หรือดื้อยาปานกลาง (intermediate) ต่อยาทั้ง E และ DA ซึ่งพบว่า inhibition zone ของ DA เป็นรูปตัว D แสดงว่ามีการถูกกระตุ้นด้วยยา (inducible) ต่อกลุ่มยา MLS_B ซึ่งเชื่อว่ามีจีโนไทป์ของยีน *erm* รายงานผลทั้ง E และ DA ว่าดื้อยา (resistance, R)

ที่มา: Procedure manual Toronto medical laboratories (2005)



ภาพที่ 6 เชื้อดื้อยา (resistance) หรือดื้อยาปานกลาง (intermediate) ต่อยาทั้ง E และ DA แต่ inhibition zone ไม่เป็นรูปตัว D ซึ่งเป็นได้ทั้งการถูกกระตุ้นด้วยยา (inducible) หรือ ไม่มีการถูกกระตุ้นด้วยยา (constitutive) ต่อกลุ่มยา MLS_B ซึ่งเชื่อว่ามีจีโนไทป์ของยีน *erm* รายงานผลทั้ง E และ DA ว่าดื้อยา (resistance, R)

ที่มา: Procedure manual Toronto medical laboratories (2005)

9. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดยวิธี agar dilution technique (CLSI, 2009)

9.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหาค่า MICs โดยวิธี agar dilution technique

วิธีการเตรียม

9.1.1 เตรียมยา vancomycin (Sigma-Alarich™) ให้มีความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นจริงที่ใช้ แล้วทำ two-fold dilution จากความเข้มข้นสูงไปยังความเข้มข้นต่ำ โดยใช้ น้ำกลั่น เป็นตัวทำเจือจาง ในการชั่งยานั้นเพื่อความแม่นยำเมื่อคำนวณปริมาณยาที่ใช้เรียบร้อยแล้ว ควรชั่งด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง

9.1.2 นำ 1 ส่วนของยาที่เตรียมไว้ซึ่งมีขนาด 10 เท่า ผสมกับ 9 ส่วนของ Mueller Hinton II agar โดยใช้ยาปริมาณ 2 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ 18 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิระหว่าง 45-50 องศาเซลเซียส ผสมกันในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วทำการ pour plate จะได้ความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร

9.1.3 วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัว หลังจากนั้นจึงเก็บไว้ในตู้พลาสติกที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บไม่เกิน 7 วัน ในกรณีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทันที ให้

ทำการตากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในตู้ปลูกถ่ายเชื้อ (microflow laminar flow) ที่ฆ่าเชื้อโดยการเปิด UV และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% เรียบร้อยแล้ว ตากไว้จนผิวหน้าของอาหารแห้ง ปราศจากความชื้นจากไอน้ำ

ตัวอย่างการคำนวณค่า potency ของยาที่ใช้

ในกรณีที่ไม้ออกค่า potency มาให้ สังเกตค่าต่างๆ ที่ข้างขวดยาเพื่อคำนวณหาค่า potency ดังนี้

Assay Purity = 92

Active Fraction = 1.0

Water Content = 7.8%

สูตรการคำนวณค่า potency

$$\begin{aligned}\text{Potency} &= (\text{Assay Purity})(\text{Active Fraction}) (1-\text{Water Content}) \\ &= (92)(1.0)(1-7.8/100) \\ &= 84.824\% \text{ หรือใน } 100 \text{ กรัมที่ซึ่งมี } 84.824 \text{ กรัม}\end{aligned}$$

ในการทดลองนี้ขวดยา vancomycin ที่ใช้บอกค่า potency ข้างขวดว่า potency $\geq 900 \mu\text{g per mg}$ หมายความว่ามีความเข้มข้น vancomycin มากกว่าหรือเท่ากับ 90% หรือใน 100 กรัมที่ซึ่ง มียา vancomycin มากกว่าหรือเท่ากับ 90 กรัม

9.2 การเตรียม culture suspension สำหรับหาค่า MICs โดยวิธี agar dilution technique

วิธีการเตรียม

9.2.1 นำเชื้อจาก LB broth ลงใน TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีบริสุทธิ์ที่แยกได้ใส่ลงใน TSB แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเพาะเชื้ออีกครั้งลงใน heart infusion agar (Bacto™) ที่มี vancomycin 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (HIVA) จากนั้นนำโคโลนีที่ได้เพาะลง HIVA อีกครั้งหนึ่ง

แล้วเลือกโคโลนีของเชื้อจาก HIVA ใส่งใน normal saline ปรับความขุ่นเทียบสารละลาย McFarland No. 0.5 เชื้อจะมีปริมาณความขุ่น 10^8 CFU/มิลลิลิตร

9.2.2 ทำการเจือจางอีก 10 เท่า ด้วย normal saline เพื่อให้เชื้อมีปริมาณความขุ่น 10^7 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อที่ได้จากการแตะ suspension ของเชื้อที่ปลาย microplanter inoculators 1-2 ไมโครลิตร คือ 10^4 CFU

9.3 วิธีการหาค่า MICs โดยวิธี agar dilution technique

วิธีการทดสอบ

9.3.1 นำหลอด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้ บรรจุลงในถาดของเครื่อง inoculum repeating device หรือ microplanter โดยทุกครั้งที่ทดสอบต้องมีเชื้อสายพันธุ์ที่ควบคุมคุณภาพที่ไวต่อยาที่ทดสอบ คือ *E. faecalis* ATCC 29212 และคือต่อยาที่ทดสอบ *E. faecalis* ATCC 51299 รวมทั้งทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่ยา ทั้งก่อนและหลังการทดสอบ

9.3.2 ทำการฆ่าเชื้อ microplanter inoculator โดยจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 70% แล้วเผาไฟ หลังจากนั้นทำการเช็ด inoculator เข้ากับ holder ของเครื่องแล้วขันให้แน่น

9.3.3 นำ microplanter inoculator จุ่มลงใน suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้ ยก holder ขึ้นลงเพื่อผสมเชื้อให้เข้ากัน แล้วแตะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA II ที่มีส่วนผสมของยา vancomycin ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณเชื้อที่ได้จากการแตะ suspension ของเชื้อที่ปลาย microplanter inoculators 1-2 ไมโครลิตร คือ 10^4 CFU ถ้าไม่มีเครื่อง inoculum repeating device ให้ใช้ autopipette ดูดเชื้อขนาด 2 ไมโครลิตรถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

9.3.4 ทิ้ง MHA II ไว้จนกว่า suspension ของเชื้อจะแห้ง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงมาอ่านผล

วิธีการอ่านผล

อ่านผลหลังบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยใช้เครื่องหมาย – คือ ไม่มีการเจริญของเชื้อ เครื่องหมาย + มีเชื้อขึ้นบ้าง เครื่องหมาย ++ มีเชื้อขึ้นห่างๆ และเครื่องหมาย +++ มีเชื้อขึ้นหนาแน่น ถ้าเชื้อไม่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาผสมอยู่ ซึ่งเป็นงานเพาะเชื้อแรกหลังจากความเข้มข้นก่อนหน้าเชื้อขึ้น ให้แปลผลว่าค่า MICs ของเชื้อมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของยาในจานอาหารเพาะเชื้อนั้นๆ ที่ไม่มีเชื้อขึ้น การแปลผลค่า MICs เปรียบเทียบกับตารางการแปลผลตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011)

ตัวอย่างการอ่านผล ถ้าเชื้อขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาผสมอยู่ที่ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้แปลผลเป็นค่า MICs ที่งานเพาะเชื้อก่อนหน้าเชื้อขึ้นคืองานที่มียาผสมอยู่ที่ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นค่า MICs ที่อ่านได้ คือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปัจจัยอื่นๆ ที่ควรพิจารณา เช่น เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐานมีค่า MICs ตรงกับที่ CLSI อ้างอิง รวมทั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในงานเพาะเชื้อที่ไม่ได้ใส่ยา ทั้งก่อน และหลังทำการทดสอบ ถ้าเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐานมีค่า MICs ที่ไม่ตรงกับที่ CLSI อ้างอิงเอาไว้ ผลการทดลองทั้งหมดไม่สามารถแปลผลได้

10. การเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ VRE ในสุกรในแต่ละกลุ่มอายุด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบทางสถิติเชิงพรรณนาโดยหาค่าเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การกระจายด้านจุลชีพอื่นๆ ของเชื้อ VRE โดยใช้โปรแกรม NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT) ในการทดสอบ

ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Chi-Square tests จากโปรแกรม Quickcals Program (GraphPad Software, InC., CA) เพื่อเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ VIRE ในสุกรในแต่ละกลุ่มอายุ ได้แก่ ลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกฟาร์มสุกรและการเก็บตัวอย่าง

ในการคัดเลือกฟาร์มสุกรคัดเลือกจากทะเบียนมาตรฐานฟาร์มสุกรที่ขึ้นไว้กับกรมปศุสัตว์ ในเขตภาคกลาง ซึ่งได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี ลพบุรี ราชบุรี และสระบุรี โดยมีข้อมูลการให้ยา ปฏิชีวนะจากการควบคุมโดยนายสัตวแพทย์คนเดียวกัน มีการให้ยาเป็นไปตามมาตรฐานและใน ปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งได้ทำคัดเลือกจังหวัดละ 1 ฟาร์ม รวม 4 ฟาร์ม โดยทุกฟาร์มต้องมีลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร ในช่วงปี พ.ศ. 2554 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระสุกรรุ่นต่างๆ ด้วยวิธี ป้ายที่ก้นโดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อสอดเข้ารูทวารหนัก (rectal swab) แล้วใส่ในขวดที่บรรจุ อาหารนำส่ง Cary-Blair transport medium (Oxoid™)

ตารางที่ 6 ฟาร์มตัวอย่าง แสดงขนาดของฟาร์ม ที่ตั้ง และยาที่ใช้ในช่วงอายุของสุกรในแต่ละฟาร์ม

ฟาร์ม (จังหวัด)	ขนาดฟาร์ม	ลูกสุกร (3-4 สัปดาห์)	สุกรขุน (21-24 สัปดาห์)	แม่พันธุ์สุกร
A (ลพบุรี)	500	colistin 120 ppm	-	amoxicillin 250 ppm
		amoxicillin 250 ppm		chlortetracycline 400 ppm
		tiamulin 120 ppm		
		zinc oxide 3000 ppm		
B (สระบุรี)	400	colistin 120 ppm	chlortetracycline 300 ppm	amoxicillin 250 ppm
		amoxicillin 250 ppm		chlortetracycline 400 ppm
		tiamulin 120 ppm		
		zinc oxide 3000 ppm		
C (ราชบุรี)	4,000	colistin 120 ppm	chlortetracycline 300 ppm	amoxicillin 250 ppm
		amoxicillin 250 ppm		chlortetracycline 500 ppm
		tiamulin 120 ppm		(มีการเสริม talmicosin 200
		zinc oxide 3000 ppm		ppm บางช่วง)
D (สุพรรณบุรี)	1,200	colistin 120 ppm	-	amoxicillin 250 ppm
		amoxicillin 250 ppm		chlortetracycline 500 ppm
		valosin 50 ppm		
		zinc oxide 3000 ppm		

การใช้ยาในลูกสุกรนั้น เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในระบบทางเดินอาหาร โรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ โรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกตามเนื้อเยื่อต่างๆ ตับ ปอด กล้ามเนื้อ ไชข้อ โรคบิดมูกเลือดในสุกร โรค Ilitis โดยผสมลงในอาหาร ด้วยยาที่ใช้เหมือนกันทั้งสี่ฟาร์ม ได้แก่ ยา colistin 120 ppm, ยา amoxicillin 250 ppm, ยา tiamulin 120 ppm และ zinc oxide 3000 ppm มีหนึ่งฟาร์มที่ใช้ยา valosin 50 ppm แทนยา tiamulin การใช้ยาในสุกรขุน เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ *Mycoplasma* spp., *Brucella* spp., *Balantidium coli*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Leptospira* spp. และ *Clostridium* spp. โดยผสมลงในอาหารด้วยยาที่ใช้ คือ chlortetracycline (CTC) 300 ppm ในสุกรขุนนี้มีการใช้ยา CTC 2 ฟาร์ม ส่วนอีก 2 ฟาร์มที่เหลือไม่ใช้ยาในสุกรขุนเลย และการใช้ยาในแม่พันธุ์สุกรนั้น เพื่อป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับเชื้อหุ้มสมองอักเสบ โรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกตามเนื้อเยื่อต่างๆ ตับ ปอด กล้ามเนื้อ ไชข้อ และโรคติดเชื้อ *Mycoplasma* spp., *Brucella* spp., *B. coli*, *P. multocida*, *H. parasuis*, *B. bronchiseptica*, *Leptospira* spp. และ *Clostridium* spp. โดยผสมลงในอาหารและให้ตลอดอายุของแม่พันธุ์สุกร ด้วยยาที่ใช้เหมือนกันทั้งสี่ฟาร์ม ได้แก่ ยา amoxicillin 250 ppm และยา chlortetracycline 400-500 ppm มีหนึ่งฟาร์มที่ให้ยา tiamicosin ในบางช่วงซึ่งขนาดที่ใช้ คือ 250 ppm (กมลชัย, 2547; มาลินี, 2541; วรา, 2551)

2. การเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) ในแม่พันธุ์สุกรระหว่างการเก็บอุจจาระด้วยวิธี rectal swab และวิธีการเก็บอุจจาระสุกรปกติแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

จากข้อมูลการเก็บอุจจาระแม่พันธุ์สุกรด้วยวิธี rectal swab ซึ่งมีอุจจาระสุกรติดมาขนาดประมาณ 0.5 กรัม และการชั่งน้ำหนักอุจจาระสุกรจากการเก็บปกติ พบเชื้อ *Enterococcus* spp. จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion techniques แล้วให้ผลเป็นดื้อยา ดังนั้นจึงต้องการทราบว่า การเก็บอุจจาระด้วยวิธี rectal swab และวิธีการเก็บอุจจาระสุกรปกติแล้วนำมาชั่งน้ำหนักมีอัตราการพบเชื้อ VRE แตกต่างกันหรือไม่

จากผลการทดลองพบว่าวิธี rectal swab พบเชื้อ VRE 10 ตัวอย่าง จาก 58 ตัวอย่าง และวิธีการเก็บอุจจาระปกติแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก พบเชื้อ VRE 5 ตัวอย่าง จาก 41 ตัวอย่าง แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ Chi-square test พบว่าการเก็บอุจจาระด้วยวิธี rectal swab และวิธีการเก็บอุจจาระสุกรปกติแล้วนำมาชั่งน้ำหนักมีอัตราการพบเชื้อ VRE ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เนื่องจากอุจจาระถูกสุกรส่วนใหญ่ก็มีลักษณะเหลว การชั่งน้ำหนักอุจจาระสุกรมีความยุ่งยากกว่าอีกทั้งวิธี rectal swab ยังช่วยให้เก็บตัวอย่างอุจจาระสุกรได้จำนวนตัวอย่างมากกว่าในเวลาจำกัด เพื่อความสะดวกในการเก็บตัวอย่างในงานวิจัยนี้จึงเลือกวิธี rectal swab ในการเก็บตัวอย่างสุกรทุกรุ่น

3. ความชุกของเชื้อ vancomycin-resistant enterococci (VRE) และ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร

ตัวอย่างอุจจาระที่ได้สุ่มเก็บจากสุกร 3 รุ่น คือ ลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร จากฟาร์มในเขตภาคกลางของประเทศไทย เก็บตัวอย่างรวมทั้ง 179 ตัวอย่าง ทำการคัดกรองเบื้องต้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ bile-esculin azide agar ที่ผสมยา vancomycin ในปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ECVA) หลังจากทำการแยกเชื้อในระดับจีสด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วนั้น จึงทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc diffusion technique โดยวิธี Kirby-Bauer ด้วยยา vancomycin ขนาด 30 ไมโครกรัม ผลการทดลองแสดงตามตารางที่ 7 พบว่ามีเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant enterococci; VRE) และเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ไวหรือดื้อในระดับปานกลางต่อยา vancomycin (vancomycin-intermediate resistant enterococci, VIRE) โดยคิดรวมกันพบเชื้อ VRE และ VIRE ในลูกสุกรร้อยละ 26.23 (16 จาก 61 ตัวอย่าง) ในสุกรขุนร้อยละ 33.33 (20 จาก 60 ตัวอย่าง) ในแม่พันธุ์สุกรร้อยละ 31.04 (18 จาก 58 ตัวอย่าง) และพบเชื้อ VRE และ VIRE ในสุกรทั้ง 3 ช่วงอายุรวมกันร้อยละ 30.17 (54 จาก 179 ตัวอย่าง) เมื่อพิจารณาเฉพาะเชื้อ VRE พบเชื้อ VRE ในลูกสุกรร้อยละ 11.48 (7 จาก 61 ตัวอย่าง) ในสุกรขุนร้อยละ 15 (9 จาก 60 ตัวอย่าง) ในแม่พันธุ์สุกรร้อยละ 17.24 (10 จาก 58 ตัวอย่าง) และพบเชื้อ VRE ในสุกรทั้ง 3 ช่วงอายุรวมกันร้อยละ 14.53 (26 จาก 179 ตัวอย่าง) จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อ VRE และ VIRE ได้รวมทั้งหมด 71 isolates จาก 54 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อ VRE และ VIRE ในลูกสุกรได้ 18 isolates ในสุกรขุนได้ 26 isolates และในแม่พันธุ์สุกรได้ 27 isolates เฉพาะเชื้อ VRE สามารถแยกเชื้อ VRE ในลูกสุกรได้ 7 isolates ในสุกรขุนได้ 10 isolates และในแม่พันธุ์สุกรได้ 12 isolates ตามตารางที่ 8 จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ VRE และ VIRE ในสุกรในแต่ละกลุ่มอายุด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ Chi-squared พบว่าอัตราการพบเชื้อในสุกรทุกช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 7 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) และเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จาก
การทำ disc diffusion technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี

ฟาร์มตัวอย่าง(จังหวัด)	ลูกสุกร (3-4 สัปดาห์)			สุกรขุน (21-24 สัปดาห์)			แม่พันธุ์สุกร			รวม (%)
	IR	R	รวม (%)	IR	R	รวม (%)	IR	R	รวม (%)	N = 179
			n = 61			n = 60			n = 58	
A (ลพบุรี)	1	2	3	4	3	7	1	3	3	13
n = 44			(18.75%)			(35%)			(16.67%)	(29.55%)
B (สระบุรี)	3	4	6	1	-	1	4	1	5	12
n = 42			(37.5%)			(5%)			(27.78%)	(28.57%)
C (ราชบุรี)	2	-	2	4	4	7	3	1	4	13
n = 48			(12.5%)			(35%)			(22.22%)	(27.08%)
D (สุพรรณบุรี)	4	1	5	4	2	5	5	5	6	16
n = 45			(31.25%)			(25%)			(33.33%)	(35.56%)
รวม	10	7	16	13	9	20	13	10	18	54
N = 179			(29.63%)			(37.04%)			(33.33%)	(30.17%)

หมายเหตุ: IR, intermediate resistance (ดื้อยาปานกลาง); R, Resistance (ดื้อยา)

ตารางที่ 8 จำนวน isolates ที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) และเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทำ disc diffusion technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี

ฟาร์มตัวอย่าง(จังหวัด)	ลูกสุกร (3-4 สัปดาห์)			สุกรขุน (21-24 สัปดาห์)			แม่พันธุ์สุกร			รวม (isolates)
	IR	R	รวม	IR	R	รวม	IR	R	รวม	
A (ลพบุรี)	1	2	3	6	4	10	2	3	5	18
B (สระบุรี)	4	4	8	2	-	2	4	1	5	15
C (ราชบุรี)	2	-	2	4	4	8	3	1	4	14
D (สุพรรณบุรี)	4	1	5	4	2	6	6	7	13	24
รวม	11	7	18	16	9	26	15	10	27	71

หมายเหตุ: IR, intermediate resistance (ดื้อยาปานกลาง); R, Resistance (ดื้อยา)

เมื่อนำเชื้อ *Enterococcus* spp. ทั้ง 71 isolates มาทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดยวิธี agar dilution technique พบว่าเชื้อ *Enterococcus* spp. มีค่า MICs 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 2.82 (2 จาก 71 isolates), ค่า MICs 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 23.94 (17 จาก 71 isolates), MICs 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 59.16 (42 จาก 71 isolates) และ MICs 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 14.09 (10 จาก 71 isolates) ดังนั้นพบว่า เชื้อ *Enterococcus* spp. ให้ผลเป็นเชื้อยาปานกลาง (MICs 8-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบร้อยละ 73.24 (52 จาก 71 isolates) และเชื้อไวต่อยา (MICs 2-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบร้อยละ 26.76 (19 จาก 71 isolates)

จากผลการทดลองพบเชื้อ VIRE ในลูกสุกรร้อยละ 19.67 (12 จาก 61 ตัวอย่าง) ในสุกรขุน ร้อยละ 25 (15 จาก 60 ตัวอย่าง) ในแม่พันธุ์สุกรร้อยละ 27.59 (16 จาก 58 ตัวอย่าง) และพบเชื้อ VIRE ในสุกรทั้ง 3 ช่วงอายุรวมกันร้อยละ 24.02 (43 จาก 179 ตัวอย่าง) ตามตารางที่ 9 และสามารถแยกเชื้อ VIRE ได้รวมทั้งหมด 52 isolates จาก 43 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อ VIRE ในลูกสุกรได้ 13 isolates ในสุกรขุนได้ 17 isolates และในแม่พันธุ์สุกรได้ 22 isolates ตามตารางที่ 10 จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ VIRE ในสุกรในแต่ละกลุ่มอายุด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ Chi-squared พบว่าอัตราการพบเชื้อ VIRE ในสุกรทุกช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 9 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทำ agar dilution technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี

ฟาร์มตัวอย่าง(จังหวัด)	จำนวนตัวอย่างของ VIRE จากสุกรกลุ่มต่างๆ			รวม (%)
	ลูกสุกร (3-4 สัปดาห์) (n = 61)	สุกรขุน (21-24 สัปดาห์) (n = 60)	แม่พันธุ์สุกร (n = 58)	N = 179
A (ลพบุรี) n = 44	2	5	3	10 (22.73%)
B (สระบุรี) n = 42	5	1	4	10 (23.81%)
C (ราชบุรี) n = 48	1	4	3	8 (16.67%)
D (สุพรรณบุรี) n = 45	4	5	6	15 (33.33%)
รวม	12	15	16	43
N = 179	(19.67%)	(25%)	(27.59%)	(24.02%)

ตารางที่ 10 จำนวน isolates ที่ให้ผลบวกของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทำ agar dilution technique ในลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกรจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี สระบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี

ฟาร์มตัวอย่าง(จังหวัด)	จำนวน isolates ของ VIRE จากสุกรกลุ่มต่างๆ			รวม (isolates)
	ลูกสุกร (3-4 สัปดาห์)	สุกรขุน (21-24 สัปดาห์)	แม่พันธุ์สุกร	
A (ลพบุรี)	2	6	4	12
B (สระบุรี)	6	2	4	12
C (ราชบุรี)	1	4	3	8
D (สุพรรณบุรี)	4	5	11	20
รวม	13	17	22	52

ในการแยกเชื้อ *Enterococcus* spp. งานวิจัยนี้ได้เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ bile-esculin azide agar หรือชื่อทางการค้าคือ Enterococcosel agar อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เป็นอาหารที่นิยมและเหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *Enterococcus* spp. จากตัวอย่างต่างๆ รวมทั้งอุจจาระของสัตว์ (Coombs *et al.*, 1999; Donabedian *et al.*, 2010; Edberg *et al.*, 1994; Hammerum *et al.*, 2004; Kariyama *et al.*, 2000; Kempf *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 1998; Landman *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2005) เนื่องจากเชื้อ *Enterococcus* spp. มีคุณสมบัติในการสลาย glycoside esculin ด้วย esculinase (β -glycosidase) ได้ dextrose และ esculetin เมื่อทำปฏิกิริยากับ ferric ammonium citrate ในอาหาร จะได้ phenolic iron ที่มีสีน้ำตาลหรือดำออกมา ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีโอกาพบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มอื่นๆ นอกจาก *Enterococcus* spp ได้แก่ *Rothia* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Vagococcus* spp., *Tetragenococcus* spp., *Aerococcus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Globicatella* spp. (Teixeira *et al.*, 2007) และในการคัดกรองเชื้อดื้อยาเบื้องต้นนั้นจะใส่ยา vancomycin ในปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่าความไวยาของค่า MICs ของยา vancomycin (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ต่ำกว่าค่า MICs ในระดับปานกลางของยา vancomycin (8-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากนั้นเลือกโคโลนีของเชื้อมาทำการทดสอบ catalase ซึ่งเชื้อ *Enterococcus* spp. ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ catalase มาสลาย H_2O_2 และทำการย้อมสีแกรมพบว่าติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีในแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มที่กล่าวมาเกือบทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องทำการแยกเชื้อจนบริสุทธิ์แล้วทำการพิสูจน์เชื้อที่ได้ในระดับจีโนมด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบการเจริญเติบโตในความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5% การทดสอบการเจริญเติบโตในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การทดสอบการเจริญเติบโตใน bile-esculin azide agar การทดสอบ L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) และการทดสอบ leucine- β -naphthylamide (LAP) เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังกล่าวแล้วได้ผลบวกทั้งหมดจึงสามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ค่อนข้างแน่นอนจริงๆ ถึงแม้ว่าอาจจะมีโอกาสได้เชื้อ *Lactococcus* spp. แต่เป็นโอกาสที่น้อยมากเพราะเชื้อ *Lactococcus* spp. มีความไม่แน่นอนและความแปรปรวนในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีข้างต้น (Teixeira *et al.*, 2007)

วิธีการแยกเชื้อเพื่อหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin มีทั้งวิธี direct plating technique เป็นวิธีที่ไม่มีการ enrichment เชื้อ ทำโดยดูดสารละลายที่ประกอบด้วยตัวอย่างที่ถูกทำให้เจือจางกับ MRD ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง และวิธี enrichment method เป็นวิธีที่นำตัวอย่างมาทำการ enrichment ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เพื่อให้เกิดการฟุ้งคินของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น

โดยเฉพาะ bile esculin azide broth เป็น selective-enrichment broth สำหรับเชื้อ VRE ที่ได้ผลดีที่สุด สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ นอกเหนือจากอาหาร bile esculin azide agar ที่นิยมใช้สำหรับแยกเชื้อ VRE ได้แก่ อาหาร modified Thayer-Martin medium, Kenner fecal (KF) Streptococcal agar, Columbia colistin-nalidixic acid (CAN) agar และ Slanetz and Batley agar ที่ผสมยา vancomycin อาหารเหล่านี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective สำหรับเชื้อ *Enterococcus* spp. (Teixeira *et al.*, 2007) สำหรับการศึกษาใช้วิธี direct plating technique ซึ่งเป็นวิธีที่มีการใช้แยกเชื้อ VRE ในรายงานอื่น (Ghidan, 2007; Kotzamanidis *et al.*, 2009)

สำหรับงานวิจัยที่เก็บตัวอย่างอุจจาระสุกรและใช้วิธี direct plating technique หลังจากมีการเลิกใช้ยา avoparcin แล้ว ได้แก่ งานวิจัยของ Bager *et al.* (1997) ได้เก็บตัวอย่างในอุจจาระสุกรในประเทศเดนมาร์ก พบว่ามีเชื้อ VRE ร้อยละ 8 (2 จาก 25 ตัวอย่าง) และร้อยละ 40 (10 จาก 25 ตัวอย่าง) งานวิจัยของ Garcia-Migura *et al.* (2005) ได้เก็บตัวอย่างในอุจจาระสุกรในประเทศอังกฤษและเวลส์ พบว่ามีเชื้อ VRE ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยา vancomycin 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 2-5 งานวิจัยของ Manero *et al.* (2006) ได้เก็บตัวอย่างในอุจจาระสุกรในประเทศสเปน พบว่ามีเชื้อ VRE ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยา vancomycin 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 16.1 (จาก 68 ตัวอย่าง) งานวิจัยของ Donabedian *et al.* (2010) ได้เก็บตัวอย่างในอุจจาระสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีเชื้อ VRE ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยา vancomycin 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 10.9 (6 จาก 55 ตัวอย่าง) ผลการทดลองของการศึกษาต่างๆ ที่ได้มีค่าความชุกแตกต่างกันไปตามลักษณะวิธีการและพื้นที่ที่ทำการศึกษา

4. การพิสูจน์เชื้อในระดับสปีชีส์ด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

จากผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11 พบว่าสปีชีส์ของเชื้อ VIRE จากอุจจาระสุกรที่พบมากที่สุด ได้แก่ *E. gallinarum* ร้อยละ 71.15 (37 จาก 52 isolates) รองลงมา คือ *E. casseliflavus* ร้อยละ 21.15 (11 จาก 52 isolates) นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งสามารถบอกได้คร่าวๆ ว่าอยู่ใน group II และ group IV โดยพบร้อยละ 5.77 (3 จาก 52 isolates) และร้อยละ 1.92 (1 จาก 52 isolates) ตามลำดับ

สปีชีส์ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ในอุกสุกร ที่พบมากที่สุด คือ *E. gallinarum* ร้อยละ 53.85 (7 จาก 13 isolates) รองลงมาคือ *E. casseliflavus* และเชื้อที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ (group II) ร้อยละ 23.08 (3 จาก 13 isolates) ส่วนสปีชีส์ที่พบในสุกรขุนมากที่สุด คือ *E. gallinarum* ร้อยละ 82.35 (14 จาก 17 isolates) รองลงมา คือ และ *E. casseliflavus* ร้อยละ 11.76 (2 จาก 17 isolates และ เชื้อที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ (group IV) ร้อยละ 5.88 (1 จาก 17 isolates) ส่วนแม่พันธุ์สุกรพบ เพียง 2 สปีชีส์ สปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *E. gallinarum* ร้อยละ 72.73 (16 จาก 22 isolates) รองลงมา คือ *E. casseliflavus* ร้อยละ 27.27 (6 จาก 22 isolates)

ตารางที่ 11 สปีชีส์ของ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จาก 52 isolates แบ่งจำแนกตามรุ่นสุกร

สปีชีส์	จำนวน isolates ของเชื้อ VIRE จากกลุ่มสุกรต่างๆ			รวม (%)
	อุกสุกร	สุกรขุน	แม่พันธุ์สุกร	
<i>E. gallinarum</i>	7	14	16	37 (71.15)
<i>E. casseliflavus</i>	3	2	6	11 (21.15)
เชื้อที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ (group II)	3	-	-	3 (5.77)
เชื้อที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ (group IV)	-	1	-	1 (1.92)
รวม (%)	13 (25)	17 (32.7)	22 (42.3)	52 (100)

สำหรับเชื้อที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้นั้น การที่จัดอยู่ใน group II เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้ให้ผลบวกต่อ mannitol และ arginine และให้ผลลบต่อ sorbose ใน group II ประกอบด้วย *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* และ *E. mundtii* จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเชื้อทั้ง 3 isolates ใกล้เคียงกับ *E. faecium* มาก ยกเว้นเชื้อที่ใช้ทดสอบให้ผลบวกต่อการทดสอบ methyl- α -D-glycopyranoside แต่ในสปีชีส์ *E. faecium* ให้ผลลบต่อการทดสอบ methyl- α -D-glycopyranoside ส่วน group IV ให้ผลลบต่อ mannitol, sorbose และ arginine ใน group IV ประกอบด้วย *E. asini*, *E. cecorum* และ *E. sulfurous*

และรูปแบบการให้ผลทางชีวเคมีไม่มีความใกล้เคียงกับสปีชีส์ใดๆ ซึ่งอาจใช้การทดสอบในระดับโมเลกุลช่วยในการวินิจฉัย

เชื้อ *E. gallinarum* ที่พบมากที่สุดในการทดลองนี้ มีลักษณะเซลล์ที่เป็นรูปร่างกลม ส่วนใหญ่จะอยู่เป็นคู่หรือสายสั้นๆ โคโลนิบน blood agar หรือ nutrient agar มีรูปร่างกลม เรียบ และมีการสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -hemolysis ใน blood agar ที่ผสมเลือดม้า พบว่าไม่มีการสร้างสารสีสายพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แต่สามารถทนได้ในความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีการเจริญเติบโตช้าใน acetate-tetrazolium agar ที่อุณหภูมิห้องซึ่งจะมีการสร้างโคโลนีสีชมพูเข้ม เชื้อสามารถสร้างแอมโมเนียจาก L-arginine และเชื้อไม่สามารถสร้างก๊าซ H_2S ได้ (Collins, 1984) เชื้อ *E. gallinarum* มีค่า MICs ของยา vancomycin อยู่ในช่วง 2-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไวต่อยา teicoplanin ซึ่งสอดคล้องกับผลทดลองที่ได้ ค่า MICs ของยา vancomycin ดังกล่าวเป็นช่วงที่ตรงกับการดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่มียีน *vanC1* โดยยีน *vanC1* เป็นยีนที่มีการดื้อยาแบบธรรมชาติ ซึ่งมีโอกาสที่จะดื้อยาได้ตลอดเวลาหรือดื้อเมื่อมีการสัมผัสกับยา ตำแหน่งการดื้อยายูบนโครโมโซม อย่างไรก็ตามมีโอกาสเป็นไปได้ที่เชื้อ *E. gallinarum* จะมียีน *vanB* เนื่องจากยีน *vanB* มีค่า MICs ของยา vancomycin อยู่ระหว่าง 4-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเคยมีรายงานว่าพบยีน *vanB* ใน *E. gallinarum* ด้วยเช่นกัน (Werner, 2008) และ *E. casseliflavus* มีเซลล์เรียงกันเป็นคู่ หรือสายสั้นๆ เคลื่อนที่ได้ พื้นผิวโคโลนิบน blood agar หรือ nutrient agar มีลักษณะเป็นวงกลม เรียบ และมีการสร้างสารสีเป็นสีเหลือง สามารถสร้าง acetylmethylcarbinol ไม่สามารถสร้างก๊าซ H_2S ได้ โคโลนีมีสีเทาบนอาหารที่มีการเติม 0.04% potassium tellurite ไม่มีการ decarboxylation ของ tyrosine (Collins, 1984) เชื้อ *E. casseliflavus* มีค่า MICs ของยา vancomycin อยู่ระหว่าง 4-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไวต่อยา teicoplanin ซึ่งสอดคล้องกับผลทดลองที่ได้ ค่า MICs ดังกล่าวนี้อาจเป็นยีน *vanC2/3* สูงมากเนื่องจากเป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. casseliflavus* (Werner et al., 2008; Werner et al., 2012)

ในการจำแนกเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* นั้น โดยปกติแล้วสปีชีส์ทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกัน คือให้ผลบวกต่อการทดสอบ mannitol, arginine, arabinose, raffinose, motility, sucrose และ methyl- α -D-glucopyraniside และให้ผลลบต่อการทดสอบ sorbose และ tellurite นอกจากนี้ยังพบว่า *E. casseliflavus* มีโอกาสให้ทั้งผลบวกและลบต่อการทดสอบ sorbitol และ pyruvate ส่วน *E. gallinarum* ให้ผลลบต่อการทดสอบ sorbitol และ pyruvate

แต่เชื้อทั้งสองสปีชีส์นี้มีความแตกต่างกันตรงที่การสร้างเมดลี เชื้อ *E. gallinarum* ไม่มีการสร้างเมดลีจึงพบโคโลนีเป็นสีขาว ส่วน *E. casseliflavus* สามารถสร้างเมดลีได้จึงพบโคโลนีเป็นสีเหลือง ดังนั้นการดูสีของโคโลนีจึงสามารถแยกสปีชีส์ระหว่าง *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* ได้แต่มีบางการศึกษารายงานว่ามีความจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *E. casseliflavus* ไม่สร้างเมดลี เนื่องจากความไม่แน่นอนของสายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามจำนวนดังกล่าวมีโอกาสพบได้น้อยมาก (Clark *et al.*, 1998; Donabedian *et al.*, 1995; Patel *et al.* 1998; Shlaes *et al.*, 1981) อย่างไรก็ตามการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีสำหรับเชื้อ *Enterococcus* spp. เป็นวิธีที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในอีกหลายงานวิจัย (Day *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005) ดังนั้นการทดสอบในระดับโมเลกุลควบคู่กันไปจะช่วยในการยืนยันผลการทดลองได้แม่นยำมากขึ้น

ความสำคัญทางคลินิกพบว่าโดยทั่วไปเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* สามารถก่อโรคได้แต่พบในเปอร์เซ็นต์ที่น้อยกว่าสปีชีส์อื่น ได้แก่ *E. faecalis* ที่สาเหตุเกือบ 80% ของการติดเชื้อในมนุษย์ รองลงมาคือ *E. faecium* (Huycke *et al.*, 1998) มีรายงานว่าเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* สามารถก่อโรคติดเชื้อในกระแสเลือดในมนุษย์ และมักจะติดเชื้อร่วมกันกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Choi *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบเชื้อ *E. gallinarum* เป็นสาเหตุของโรคคลื่นหัวใจอักเสบในมนุษย์ได้ (Dargere *et al.*, 2002) และมีรายงานว่าเชื้อ *E. casseliflavus* เป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในมนุษย์ได้อีกด้วย (Duygu *et al.*, 2011; Iaria *et al.*, 2005)

งานวิจัยนี้พบว่าอัตราการพบเชื้อ VRE ที่มีฟีโนรูปแบบ VanC ไม่มีความแตกต่างกันในสุกแต่ละรุ่น งานวิจัยของ Butaye *et al.* (1998) ซึ่งได้ศึกษาความชุกของเชื้อ VRE ในสุกแต่ละรุ่นได้เก็บตัวอย่างอุจจาระสุกในประเทศเบลเยียม พบเชื้อ VRE ในลูกสุกรร้อยละ 21 (13 จาก 60 ตัวอย่าง) ในสุกรขุนร้อยละ 18 (11 จาก 60 ตัวอย่าง) และในแม่พันธุ์สุกรร้อยละ 53 (32 จาก 60 ตัวอย่าง) ซึ่งอัตราการพบเชื้อ VRE ในแม่พันธุ์สุกรสูงที่สุด เชื้อ VRE ที่พบส่วนใหญ่มียีน *vanA* เด่นอาจเป็นไปได้ว่าพลวัตรของการติดเชื้อ VRE มีความแตกต่างกันในแต่ละฟีโนไทป์

มีการศึกษาหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่พบการดื้อยาในรูปแบบ VanC ในความชุกที่สูงสอดคล้องกับการทดลองนี้ ได้แก่ Mac *et al.* (2003) ได้ทำการสำรวจเชื้อ VRE โดยการเก็บตัวอย่างเนื้อสุก ได้ทำการคัดกรองเบื้องต้นโดยการผสมยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของสุกพบว่า *E. gallinarum* เป็นสปีชีส์ที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 58.18

(32 จาก 55 สายพันธุ์) รองลงมา *E. casseliflavus* ร้อยละ 18.18 (10 จาก 55 สายพันธุ์) *E. durans/hirae* และ *E. faecium* พบเท่ากันร้อยละ 9.09 (5 จาก 55 สายพันธุ์) *E. faecalis* ร้อยละ 5.45 (3 จาก 55 สายพันธุ์)

Seo *et al.* (2005) จากประเทศเกาหลีใต้ได้ทำการสำรวจเชื้อ VRE ในสุกร ในส่วนของสุกร พบว่ามีเชื้อ VRE (ค่า MICs 4-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) จากฟาร์มที่ใช้ยา avoparcin 33 isolates และจากฟาร์มที่ไม่ใช้ยา avoparcin 23 isolates เชื้อเหล่านี้มีรูปแบบการดื้อยาแบบ VanC ทั้งหมดซึ่งประกอบด้วย *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus*

โดยปกติการคัดกรองเชื้อ VRE ด้วยการผสมยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่สามารถเจริญขึ้นได้มีตั้งแต่สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในความเข้มข้นของยาระดับต่ำ เช่น เชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* VanC พิโนไทป์ จนถึงสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในความเข้มข้นของยาระดับสูง เช่น พวก VanA และ VanB พิโนไทป์ จากผลการทดลองนี้ไม่พบสายพันธุ์ VRE ที่มีการดื้อยาในความเข้มข้นของยาระดับสูง แสดงให้เห็นว่าการใช้ยาในฟาร์มสุกรที่ทำการศึกษาไม่ทำให้เกิดการดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลัง (acquired resistance) ซึ่งเกิดจากการถ่ายทอด transposon และ พลาสมิด สปีชีส์ที่พบในสุกรบ่อยๆ ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* และ *E. cerorum* (Devriese *et al.*, 1987; Devriese *et al.*, 1994) ซึ่งไม่พบในการศึกษานี้ บ่งชี้ว่า *Enterococcus* spp. เหล่านั้น มีความไวต่อยา vancomycin

มีการศึกษาหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่พบการดื้อยาในรูปแบบ VanC ในความชุกที่สูงในอุจจาระผู้ป่วย ได้แก่ Gambarotto *et al.* (2000) ได้รายงานความชุกของเชื้อ VRE จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล และคนที่อาศัยอยู่ในชุมชน จากประเทศฝรั่งเศส พบเชื้อ VRE จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลร้อยละ 37 และคนในชุมชนร้อยละ 11.8 ทั้งนี้พบว่าเชื้อ VRE 65 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *E. gallinarum* ร้อยละ 70.7 (46 สายพันธุ์), *E. faecium* ร้อยละ 18.5 (12 สายพันธุ์) และ *E. casseliflavus* ร้อยละ 10.8 (7 สายพันธุ์) โดยบริเวณที่ทำการวิจัยนี้เคยมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่คล้ายกับยา vancomycin ในฟาร์มสัตว์มาก่อน และการติดเชื้อ VRE อาจติดผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (food chain)

5. รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc-diffusion technique

รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพอื่นๆ ของเชื้อ VIRE จำนวนทั้งหมด 52 isolates พบว่ามีการ อัตราการดื้อต่อยา tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 86.54 (45 จาก 52 isolates) รองลงมาคือ ยา erythromycin ร้อยละ 61.54 (32 จาก 52 isolates), ยา ampicillin ร้อยละ 53.85 (28 จาก 52 isolates), ยา chloramphenicol ร้อยละ 34.62 (18 จาก 52 isolates), ยา ciprofloxacin ร้อยละ 32.69 (17 จาก 52 isolates), ยา gentamicin (ระดับสูง) ร้อยละ 15.38 (8 จาก 52 isolates), ยา quinupristin-dalfopristin ร้อยละ 13.46 (7 จาก 52 isolates), ยา linezolid และ ยา streptomycin (ระดับสูง) ร้อยละ 11.54 (6 จาก 52 isolates), ยา rifampin ร้อยละ 9.62 (5 จาก 52 isolates), ยา fosfomycin ร้อยละ 3.85 (2 จาก 52 isolates) และ ยา nitrofurantoin ร้อยละ 1.92 (1 จาก 52 isolates) ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE)

ยาต้านจุลชีพ	จำนวน isolates ของเชื้อ VIRE จากกลุ่มสูตรต่างๆ			รวม (%)
	ดูสูตร (3-4 สัปดาห์)	สูตรขุน (21-24 สัปดาห์)	แม่พันธุ์สูตร	
tetracycline	12	14	19	45 (86.54%)
erythromycin	9	9	14	32 (61.54%)
ampicillin	4	11	13	28 (53.85%)
chloramphenicol	3	10	5	18 (34.62%)
ciprofloxacin	1	7	9	17 (32.69%)
gentamicin	4	1	3	8 (15.38%)
quinupristin-dalfopristin	1	3	3	7 (13.46%)
linezolid	1	3	2	6 (11.54%)
streptomycin	1	1	4	6 (11.54%)
rifampin	2	2	1	5 (9.62%)
fosfomycin	-	-	2	2 (3.85%)
nitrofurantoin	-	1	-	1 (1.92%)
รวม	13	17	22	52 (100%)

หมายเหตุ ampicillin 10 ไมโครกรัม, tetracycline 30 ไมโครกรัม, ciprofloxacin 5 ไมโครกรัม, nitrofurantoin 300 ไมโครกรัม, rifampin 5 ไมโครกรัม, chloramphenicol 30 ไมโครกรัม, quinupristin-dalfopristin 15 ไมโครกรัม, linezolid 15 ไมโครกรัม, gentamicin 120 ไมโครกรัม, streptomycin 300 ไมโครกรัม, fosfomycin 50 ไมโครกรัม, erythromycin 15 ไมโครกรัม

จากผลการทดลองพบว่าอัตราของการดื้อยา erythromycin ของเชื้อ VIRE มากเป็นลำดับที่ 2 หรือคิดเป็นร้อยละ 61.54 ดังนั้นจึงมีโอกาที่เชื้อจะดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B ซึ่งประกอบด้วยยากลุ่ม macrolides, lincosamides และ streptogramins B มากขึ้นตามมาด้วย ยา erythromycin ที่ใช้ทดสอบ จัดอยู่ในกลุ่ม macrolides การทดสอบการดื้อยากลุ่ม MLS_B จะใช้ยา erythromycin กับยา clindamycin เป็นแทนของการดื้อยากลุ่ม MLS_B ผลการทดลองที่ได้สามารถคาดเดาได้ว่าเชื้อ VIRE ที่ตรวจพบมียีน erythromycin resistance methylase (*erm*) ซึ่งเป็นยีนที่ดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B

เชื้อ VIRE ดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B ทั้งหมดร้อยละ 90.38 (47 จาก 52 isolates) และดื้อเฉพาะยากลุ่ม lincosamides ซึ่งได้แก่ ยา clindamycin ร้อยละ 9.62 (5 จาก 52 isolates) โดยพบว่าลูกสุกรดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B ร้อยละ 100 (13 จาก 13 isolates) สุกรขุนดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B ร้อยละ 88.24 (15 จาก 17 isolates) และแม่พันธุ์สุกรดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B ร้อยละ 86.36 (19 จาก 22 isolates) ส่วนการดื้อยาเฉพาะ clindamycin เพียงอย่างเดียว พบว่าลูกสุกรไม่มีการดื้อยา clindamycin เพียงอย่างเดียว สุกรขุนดื้อยาเฉพาะ clindamycin ร้อยละ 11.76 (2 จาก 17 isolates) และแม่พันธุ์สุกรดื้อยาเฉพาะ clindamycin ร้อยละ 13.63 (3 จาก 22 isolates) ตามตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การดื้อยาด้านจุลชีววิทยากลุ่ม MLS_B ของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จำนวน 52 isolates

รูปแบบการดื้อยา	ลูกสุกร (3-4 สัปดาห์)	สุกรขุน (21-24 สัปดาห์)	แม่พันธุ์สุกร	รวม (%)
ดื้อทุกกลุ่มยา MLS _B	13	15	19	47 (90.38)
ดื้อเฉพาะยา clindamycin	-	2	3	5 (9.62)
รวม	13	17	22	52 (100)

หมายเหตุ MLS_B (macrolides, lincosamides and streptogramins B)

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อมีการอัตราการดื้อยา tetracycline, ยา ampicillin, ยา erythromycin, ยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin ที่สูง การศึกษานี้พบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มสุกรมีความสอดคล้องกับรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ VIRE ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งยา tetracycline มีการใช้ในฟาร์มในรูปแบบของยา chlortetracycline (CTC) และยา ampicillin มีการใช้ในฟาร์มในรูปแบบของยา amoxicillin ส่วนยา erythromycin, ยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin ไม่มีการใช้ในฟาร์มแห่งนี้

โดยทั่วไปการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มสัตว์ไม่ว่าในปริมาณสูงหรือต่ำก็ตามมีโอกาสเกิดการคัดเลือกการดื้อยาตามมาได้ มีรายงานว่าการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มสัตว์ที่เป็นยาในกลุ่มเดียวกันมีผลทำให้เกิดการดื้อยาภายในกลุ่มยานั้นๆ หรือดื้อข้ามไปยังกลุ่มยาอื่นได้ (Aerestrup *et al.*, 2002) งานวิจัยของ Barnes (1958) และ Elliott and Barnes (1959) รายงานว่าการใช้ยา tetracycline ในปริมาณสำหรับการรักษาหรือสำหรับเร่งการเจริญเติบโตพบว่าการคัดเลือกการดื้อยา tetracycline ของเชื้อใน group D streptococci ในไก่

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้ยา tetracycline ในฟาร์มสัตว์ปีก นอกจากเชื้อ *Enterococcus* spp. จะดื้อต่อยา tetracycline แล้วยังมีการดื้อยาในกลุ่มยา MLS_B อีกด้วย ซึ่งอาจเกิดจากการคัดเลือกการดื้อยาร่วมกัน เนื่องจากการพบยีน *int* หรือ transposon integrase gene ซึ่งบรรจุทั้ง Tn916 และ Tn1545 transposons ซึ่งมียีน *tet* และยีน *erm(B)* ที่ดื้อต่อยา tetracycline และกลุ่มยา MLS_B ตามลำดับ (Cauwerts *et al.*, 2007) จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าเชื้อ VIRE มีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline และกลุ่มยา MLS_B สูง ดังนั้นจากข้อมูลที่มีอยู่ควรทำการทดสอบในระดับโมเลกุลเพื่อหา ยีน *tet*, ยีน *erm* และยีน *int* ต่อไป

จากข้อมูลของฟาร์มตัวอย่างพบว่าการใช้ยา CTC ในสุกรขุน 2 ฟาร์ม คือ ฟาร์ม B และ C และไม่ใช้ยา CTC ในสุกรขุน 2 ฟาร์ม คือ ฟาร์ม A และ D พบเชื้อ VIRE จำนวน 17 isolates จากฟาร์มที่ใช้ยา CTC 6 isolates และไม่ใช้ CTC 11 isolates เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบการดื้อยาของเชื้อ VIRE จากฟาร์มที่ใช้ CTC และไม่ใช้ CTC ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ Fisher's exact test พบว่าการพบเชื้อ VIRE จากฟาร์มที่ใช้ CTC และไม่ใช้ CTC ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าการเกิด VIRE ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการใช้ยา CTC

นอกจากนี้พบว่าเชื้อ VIRE คือยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin ในอัตราที่สูงกว่าร้อยละ 30 ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวไม่สามารถระบุถึงสาเหตุของการดื้อยาทั้งสองชนิดนี้ได้ เนื่องจากการใช้ยาในปัจจุบันไม่มีการใช้ยาในกลุ่มเดียวกันกับยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin ในสูตรแล้ว เป็นไปได้ว่าการดื้อยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin เกิดจากการใช้ยาในอดีต

ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อมีการดื้อยาในรูปแบบ VanC และเป็นสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เชื้อเหล่านี้มีโอกาสนี้แพร่กระจายสู่คนผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (food chain) จากการศึกษาในเนื้อสุกร ในประเทศฝรั่งเศสพบเชื้อ VRE ร้อยละ 60 (30 จาก 50 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นเชื้อ *E. gallinarum* ร้อยละ 38 (19 จาก 50 ตัวอย่าง) และ เชื้อ *E. casseliflavus* ร้อยละ 20 (10 จาก 50 ตัวอย่าง) (Gambartotto *et al.*, 2001) ในประเทศโปรตุเกสได้ทำการหาเชื้อ VRE โดยใส่ยา vancomycin ปริมาณ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ Enterococcus agar และหาสปีชีส์ของเชื้อด้วยการทำ multiplex PCR ในตัวอย่างเนื้อสุกร สปีชีส์ที่พบมากที่สุด ได้แก่ *E. casseliflavus* ร้อยละ 24 (10 จาก 41 isolates) และ *E. gallinarum* ร้อยละ 13 (5 จาก 41 isolates) (Braga *et al.*, 2012) สำหรับในประเทศไทยพบเชื้อ VRE ร้อยละ 3 (3 จาก 100 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นเชื้อ *E. gallinarum* ร้อยละ 66.7 (2 จาก 3 ตัวอย่าง) (ธงชัย และคณะ 2549) การตรวจหาเชื้อ VanC เหล่านี้ในคนปกติและการศึกษารูปแบบการดื้อยา รวมทั้งลักษณะทางพันธุกรรม จะมีประโยชน์ในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาดังกล่าวต่อไป

ในทางคลินิกเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* ก่อโรคในคนได้ จากผลการทดลองสายพันธุ์ที่พบเป็น multidrug resistance ยา ampicillin หรือยา penicillin G จัดเป็น drug of choice ในการรักษาโรคติดเชื้อ enterococci ที่ไม่รุนแรง สำหรับการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและบาดแผล หากเชื้อดื้อยาหรือผู้ป่วยแพ้ยาในกลุ่ม penicillins สามารถใช้ยา vancomycin รักษาแทนได้ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ enterococci อย่างรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคลิ้นหัวใจอักเสบ ควรใช้ยาต้านจุลชีพอย่างน้อยสองชนิดเพื่อเสริมฤทธิ์กัน ซึ่งได้แก่ยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น ยา vancomycin, ยา penicillin หรือยา ampicillin ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycosides ระดับสูง เช่น ยา gentamycin หรือ ยา streptomycin นอกจากนี้ยังมียาในกลุ่มใหม่ที่ใช้ได้ผลสำหรับเชื้อ VRE ที่ดื้อต่อยาในความเข้มข้นของยาระดับสูง ได้แก่ ยา quinupristin/dalfopristin (กลุ่มยา streptogramins) และยา linezolid (กลุ่มยา oxazolidinones) (ภัทรชัย, 2549; CLSI, 2011) จากผลการทดลองที่พบเชื้อ VIRE คือยาอื่นๆ ในอัตราที่สูง ได้แก่ยา ampicillin ถึงร้อยละ 53.85 แสดงให้เห็นว่าหากผู้ป่วยติดเชื้อ VIRE ดังกล่าว ได้รับการรักษาด้วยยา

ampicillin ซึ่งเป็นยาชนิดแรกสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ enterococci อาจมีผลทำให้ยา ampicillin รักษาไม่ได้ผลทางคลินิกเนื่องจากเชื้อ VIRE คือตัวยา ampicillin สำหรับยาชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการรักษาเชื้อ *Enterococcus* spp. แล้วพบว่าเชื้อ VIRE มีอัตราการดื้อต่อยาเหล่านี้ ได้แก่ ยา gentamycin (ระดับสูง) ร้อยละ 15.38, ยา quinupristin/dalfopristin ร้อยละ 13.46 และยา streptomycin (ระดับสูง) และยา linezolid มีอัตราการดื้อเท่ากันคือ ร้อยละ 11.54

จากผลการทดลองด้วยวิธี double disc diffusion technique พบว่าเชื้อ VIRE มีการดื้อต่อยา MLS_B เกือบทั้งหมด คือร้อยละ 90.38 แสดงให้เห็นว่าการดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B เหล่านี้เป็นรูปแบบการดื้อที่สามารถคาดเดาได้ว่ามียีน *erm* และพบว่ามีโอกาสเป็นทั้งการดื้อยาที่เกิดขึ้นตลอดเวลา (constitutive resistance) หรือการถูกกระตุ้นด้วยยา (inducible resistance) วิธีนี้ยังไม่สามารถยืนยันว่าเชื้อมียีน *erm* (Jaglic *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2002) จะต้องทำการตรวจหายีน *erm* ในระดับโมเลกุลต่อไป

สำหรับกลไกการดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B คือ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไรโบโซมเนื่องจากยาทั้งสามกลุ่มมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์เดียวกัน คือ 23S rRNA ถึงแม้ว่ายาทั้งสามชนิดจะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันก็ตาม เชื้อสร้างเอนไซม์ rRNA methylase โดยยีน *erm* ซึ่งยีนนี้พบได้ทั้งบนพลาสมิดและโครโมโซม เอนไซม์ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl โดยขบวนการ methylation ที่โมเลกุลเบส adenine ในตำแหน่งจำเพาะของ 23S rRNA มีผลทำให้ไรโบโซมเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (ภัทรชัย, 2549; Rice *et al.*, 2003)

6. รูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกันของเชื้อ vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE) จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc-diffusion technique

จำนวนของยาด้านจุลชีพที่เชื้อ VIRE ดื้อยาพบว่าเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ 1 ชนิด ร้อยละ 7.69 (4 จาก 52 isolates) เชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ 2 ชนิด และ 3 ชนิดอย่างละ ร้อยละ 23.08 (12 จาก 52 isolates) เชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ 4 ชนิด ร้อยละ 21.15 (11 จาก 52 isolates) เชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ 5 ชนิด ร้อยละ 15.38 (8 จาก 52 isolates) เชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ 6 ชนิด ร้อยละ 3.85 (2 จาก 52 isolates) และเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ 7 ชนิดและ 8 ชนิดอย่างละร้อยละ 1.92 (1 จาก 52 isolates) และรูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิดของเชื้อ VIRE พบว่ามีรูปแบบการดื้อยามากที่สุด ได้แก่ การดื้อร่วมกันของ

ยา ampicillin, ยา tetracycline, ยา ciprofloxacin, ยา chloramphenicol และยา erythromycin และการคือร่วมกันของยา ampicillin และยา tetracycline ร้อยละ 7.69 (4 จาก 52 isolates) เท่ากัน รองลงมา คือ การคือร่วมกันของยา tetracycline และยา erythromycin คือ ร้อยละ 5.77 (3 จาก 52 isolates) ตามตารางที่ 14

จำนวนของเชื้อ VIRE ที่เป็นสายพันธุ์ multi-drug resistance (MDR) หรือเชื้อคือยาตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป คิดเป็นร้อยละ 67.31 (35 จาก 52 isolates) ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์สูง จากข้อมูลดังกล่าวเชื้อ VanC enterococci เป็นแหล่งของยีนคือยาด้านจุลชีพหลายชนิด

ยา tetracycline, ยา ampicillin, ยา erythromycin, ยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin เชื้อมีอัตราการคือต่อยาสูงในการทดลองนี้ และรูปแบบการคือยาหลายชนิดร่วมกันมักจะมีการคือต่อยาเหล่านี้ด้วย ยาเหล่านี้ใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในคน โดยยา tetracycline, ยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin ใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยา ampicillin ใช้รักษาโรคติดเชื้อ enterococci, *Listeria* และ *Haemophilus* และยา erythromycin ใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด

มีรายงานการพบเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* VanC ฟิโนไทป์คือต่อยา ampicillin, ยา tetracycline และยา ciprofloxacin ที่แยกได้จากอุจจาระคนที่มีสุขภาพดี โดยพบว่าเชื้อเหล่านี้มีรูปแบบการคือต้านจุลชีพร่วมกันด้วย (Lopez *et al.*, 2013) จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีการพบเชื้อ VanC ในคนปกติ และมีรูปแบบการคือยาใกล้เคียงกันกับเชื้อ VanC ในสุกร ที่ทำการศึกษา ดังนั้นควรทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระคนปกติในประเทศไทยเพิ่มเติม เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการคือยาด้านจุลชีพของเชื้อ VanC ในคนปกติและสุกรในประเทศไทย เพื่อหาความสำคัญด้านระบาดวิทยาของเชื้อ VRE จากสุกรสู่มนุษย์

ตารางที่ 14 จำนวนของยาด้านจุลชีพที่เชื้อดื้อยาและรูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ
vancomycin-intermediate resistant enterococci (VIRE)

การดื้อยา	รูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพ (จำนวน isolates, n=52)	รวม (%)
ยาด้านจุลชีพ 1 ชนิด	TE อย่างเดียว (2), RD อย่างเดียว (1), AMP อย่างเดียว (1)	4 (7.69)
ยาด้านจุลชีพ 2 ชนิด	TE-E (3), TE-LZD (1), S-E (1), AMP-TE (4), TE-CN (2), TE-C (1)	12 (23.08)
ยาด้านจุลชีพ 3 ชนิด	CIP-C-E (1), AMP-TE-LZD (1), TE-QD-E (2), AMP-TE- E (2), TE-C-E (1), AMP-TE-QD (1), TE-CN-E (2), AMP- TE-CIP (1), TE-CIP-CN (1)	12 (23.08)
ยาด้านจุลชีพ 4 ชนิด	TE-CIP-LZD-FOS (1), TE-RD-C-E (1), AMP-TE-C-E (2), TE-C-FOS-E (1), AMP-QD-S-E (1), AMP-CIP-QD-E (1), AMP-TE-RD-C (1), AMP-TE-CIP-E (1), AMP-TE-CIP- RD (1) AMP-TE-S-E (1)	11 (21.15)
ยาด้านจุลชีพ 5 ชนิด	AMP-TE-CIP-C-E (4), AMP-TE-CN-S-E (1), TE-RD-C- LZD-E (1), TE-CIP-C-CN-E (1), AMP-TE-CIP-S-E (1),	8 (15.38)
ยาด้านจุลชีพ 6 ชนิด	AMP-TE-CIP-C-LZD-E (1), AMP-TE-CIP-C-QD-E (1)	2 (3.85)
ยาด้านจุลชีพ 7 ชนิด	AMP-TE-CIP-C-CN-S-E (1)	1 (1.92)
ยาด้านจุลชีพ 8 ชนิด	AMP-TE-CIP-F-C-QD-LZD-E (1)	1 (1.92)

หมายเหตุ AMP = ampicillin 10 ไมโครกรัม, TE = tetracycline 30 ไมโครกรัม, CIP = ciprofloxacin 5 ไมโครกรัม, F = nitrofurantoin 300 ไมโครกรัม; RD = rifampin 5 ไมโครกรัม, C = chloramphenicol 30 ไมโครกรัม, QD = quinupristin-dalfopristin 15 ไมโครกรัม, LZD = linezolid 15 ไมโครกรัม, CN = gentamicin 120 ไมโครกรัม, S = streptomycin 300 ไมโครกรัม, FOS = fosfomicin 50 ไมโครกรัม, E = erythromycin 15 ไมโครกรัม

สรุปและข้อเสนอแนะ

การตรวจหาและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในสุกร โดยตัวอย่างอุจจาระที่ได้สุ่มเก็บจากสุกร 3 รุ่น คือ ลูกสุกร สุกรขุน และแม่พันธุ์สุกร จากฟาร์มในเขตภาคกลางของประเทศไทย เก็บตัวอย่างรวมทั้งหมด 179 ตัวอย่าง ทำการคัดกรองเบื้องต้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ bile esculin azide agar ที่ใส่ยา vancomycin ในปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากทำการแยกเชื้อในระดับจีสด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี เมื่อให้ผลบวกทุกการทดสอบแล้ว จึงทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดย disc-diffusion technique โดยวิธี Kirby-Bauer ด้วยยา vancomycin ขนาด 30 ไมโครกรัม พบว่ามีเชื้อ VRE และเชื้อ VIRE ในลูกสุกรร้อยละ 26.23 ในสุกรขุนร้อยละ 33.33 ในแม่พันธุ์สุกรร้อยละ 31.04 และพบเชื้อ VRE และ VIRE ในสุกรทั้ง 3 ช่วงอายุรวมกันร้อยละ 30.17 จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อ VRE และ VIRE ได้รวมทั้งหมด 71 isolates จาก 54 ตัวอย่าง จากข้อมูลดังกล่าว พบว่าอัตราการพบเชื้อในสุกรแต่ละช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำเชื้อ *Enterococcus* spp. ทั้ง 71 isolates มาทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี agar dilution technique พบว่าเชื้อ *Enterococcus* spp. จาก 71 isolates ให้ผลเป็นดื้อยาปานกลาง (MICs 8-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบร้อยละ 73.24 และเชื้อไวต่อยา (MICs 2-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบร้อยละ 26.76 จากผลการทดลองพบเชื้อ VIRE ในลูกสุกรร้อยละ 19.67 ในสุกรขุนร้อยละ 25 ในแม่พันธุ์สุกรร้อยละ 27.59 และพบเชื้อ VIRE ในสุกรทั้ง 3 ช่วงอายุรวมกันร้อยละ 24.02 และสามารถแยกเชื้อ VIRE ได้รวมทั้งหมด 52 isolates จาก 43 ตัวอย่าง พบว่าอัตราการพบเชื้อ VIRE ในสุกรทุกช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกัน

อัตราการดื้อยาของเชื้อ VIRE ต่อยาต้านจุลชีพอื่นๆ พบว่ามีการดื้อต่อยา tetracycline มากที่สุด ร้อยละ 86.54 รองลงมาคือ ยา erythromycin ร้อยละ 61.54, ยา ampicillin ร้อยละ 53.85, ยา chloramphenicol ร้อยละ 34.62, ยา ciprofloxacin ร้อยละ 32.69, ยา gentamicin (ระดับสูง) ร้อยละ 15.38 นอกจากนี้มีระดับการดื้อยาที่น้อยกว่า 15% ได้แก่ ยา quinupristin-dalfopristin, ยา linezolid, ยา streptomycin (ระดับสูง), ยา rifampin และระดับการดื้อยาที่น้อยกว่า 5% ได้แก่ ยา fosfomycin และยา nitrofurantoin และไม่ดื้อต่อยา teicoplanin เลย จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าการดื้อยา erythromycin สูงดังนั้นจึงทำการทดสอบ double disc diffusion technique เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม MLS_B ทั้งหมดร้อยละ 90.38 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ VIRE ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีระดับสปีชีส์ พบเชื้อ *E. gallinarum* สูงที่สุดร้อยละ 71.15 รองลงมาคือ *E. casseliflavus* ร้อยละ 21.15 นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่ง

สามารถบอกได้คร่าวๆ ว่าอยู่ใน group II และ group IV โดยพบร้อยละ 5.77 และร้อยละ 1.92 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อพิจารณาจากค่า MICs และสปีชีส์ที่พบสามารถพยากรณ์ได้ว่าเป็นการดื้อยาในรูปแบบ VanC

การศึกษานี้เป็นการรายงานความชุกของเชื้อ VRE และการศึกษาลักษณะของเชื้อในสุกรครั้งแรก และจากข้อมูลบ่งบอกได้ว่าสุกรเป็นแหล่งของการพบเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. caseliflavus* ที่มีการดื้อยาในรูปแบบฟิโนไทป์ VanC มีค่า MICs ของยา vancomycin 8-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 24.02 นอกจากนี้พบว่าเชื้อ VIRE ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกัน (multidrug resistance) รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อส่วนใหญ่ ดื้อต่อยา tetracycline ยา erythromycin ยา ampicillin ยา chloramphenicol และยา ciprofloxacin

เชื้อ VIRE ที่พบคิดเป็นร้อยละ 24.02 ซึ่งถือว่าเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ควรให้ความสนใจ เชื้อ VIRE อาจมีการปนเปื้อนไปสู่ผู้บริโภคผ่านการบริโภคเนื้อสุกรที่ปรุงไม่สุก การดื้อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของเชื้อ VIRE นี้ อาจจะเป็นแหล่งพลาสมิดดื้อยา ampicillin, tetracycline และยาอื่นๆ ที่อาจแพร่กระจายไปยังเชื้อก่อโรคอื่นๆ ได้ การเปลี่ยนแปลงสูตรยาที่ใช้ในสุกรไปจากเดิม จำเป็นจะต้องมีการเฝ้าระวังอุบัติการณ์ของเชื้อ VRE และการดื้อยาของเชื้อในระดับยาที่สูงขึ้น

การวิจัยครั้งต่อไปควรทำการศึกษาเชื้อ VRE ในมนุษย์ที่มีสุขภาพดีเพื่อเปรียบเทียบแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ VRE ที่แยกได้จากคนที่มีสุขภาพดีและจากสุกร ด้วยวิธีทางโมเลกุล ได้แก่ pulse-field gel electrophoresis และเปรียบเทียบการศึกษารูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ VRE ในคนที่มีสุขภาพดีและสุกร เพื่อหาความสำคัญด้านระบาดวิทยาของเชื้อ VRE จากสุกรสู่มนุษย์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. ยาสัตว์ตกค้าง ความปลอดภัยทางอาหาร และการคุ้มครองผู้บริโภค. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

ธงชัย เณลิมชัยกิจ, กนกกุล สิริวัฒนชัย, นภาพร เลิศวรปรีชา, วรณนา สุริยาสถาพร และสิริรัตน์ แก้วท่าไม้. 2548. ความชุกของเชื้อเอ็นเตอโรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินในสัตว์เลี้ยงสุ่นัขและแมวจังหวัดเชียงใหม่. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 3: 5-14

_____, _____, คณินิจ ก่อธรรมฤทธิ และ สังกศิต ศรีสง่า. 2549. ความชุกของเชื้อเอ็นเตอโรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินในหอยแครง อาหารสัตว์ และเนื้อสัตว์ในประเทศไทย. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2549.

_____, จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และมณฑล เลิศวรปรีชา. 2544. การเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียเอ็นเตอโรค็อกคัสและซาลโมเนลล่าที่ดื้อยาในไก่เนื้อ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2542. 97 หน้า.

_____, _____ และ _____. 2546. การเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียเอ็นเตอโรค็อกคัสและซาลโมเนลล่าที่ดื้อยาในไก่เนื้อ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2545. 47 หน้า.

ภัทรชัย กิรติสิน. 2549. ตำราแบคทีเรียการแพทย์. วี.เจ. พรินติ้ง, กรุงเทพฯ.

มาลินี ลิ้มโกคา. 2541. ยาต้านจุลชีพ. โรงพิมพ์จัดสนิทวงศ์, กรุงเทพฯ.

วรา พานิชเกรียงไกร. 2551. การใช้ยา A to Z สำหรับสัตวแพทย์. โรงพิมพ์วิโชติการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ศศิธร คณรัตน์. 2547. เชื้อเอนเทอโรคอกไคที่ดื้อยาแวนโคมัยซิน และการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Aarestrup, F.M. 1995. Occurrence of glycopeptides resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. **Microb. Drug. Resist.** 1(3): 255-257.

_____, 2000. Characterization of glycopeptides-resistant enterococcus faecium (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. **J. Clin. Microbiol.** 38(7): 2774-2777.

_____, A.M. Seyfarth, H.D. Emborg, K. Pedersen, R.S. Hendriksen and F. Bager. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45: 2054-2059.

Allignet, J., S. Aubert, A. Morvan and N.E. Solh. 1996. Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among staphylococci resistant to these antibiotics. **Antimicrob. Agents Chermother.** 40: 2523-2528.

Amin N.E., S. Jalal, and B. Wretlind, 1999. Alterations in GyrA and ParC Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43(4): 947-949.

Andrewes, F.W., T.J. Horder. 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. **Lancet**, 2: 708-713.

- Awada, A., P. Auwera, F. Meunier, D. Daneau and J. Klastersky. 1992. Streptococcal and enterococcal bacteremia in patients with cancer. **Clin. Infect. Dis.** 15: 33-48.
- Bager, F., F. M. Aarestrup, M. Madsen and H.C. Wegener. 1999. Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pig following discontinued use of avoparcin. **Microbial. Drug. Resistance.** 5: 53-56.
- _____, M. Madsen, J. Christensen, F.M. Aarestrup. 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev. Vet. Med.* 31: 95-112.
- Barnes, E.M. 1956. Tetrazolium reduction as a means of differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. **J. Gen. Microbiol.** 14: 57-68.
- _____. 1958. The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry. **Br. Vet.** 114: 333.
- Bauer, A.W., M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Truck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45: 493-496.
- Benno, Y., K. Suzuki, K. Suzuki, K. Narisawa, W.R. Bruce and T. Mitsuoka. 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. **Microbiol. Immunol.**, 30: 521-532.
- Bergan, T., C. Delin, S. Johansen, I.M. Kolstad, C.E. Nord and S.B. Thorsteinsson. 1986. Pharmacokinetics of ciprofloxacin and effect of repeated dosage on salivary and fecal microflora. **Antimicrob. Agents Chemother.** 29: 298-302.

- Bhardwaj A., H. Gupta, S. Kapila, G. Kaur, S. Vij and R.K. Malik. 2010. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in *vitro* and in *vivo* conditions. **Int. J. Food Microb.** 141(3): 156-164.
- Boerlin, P., A. Wissing, F.M. Aarestrup, J. Frey, and J. Nicolet. 2001. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs. **J Clin Microbiol.** (11): 4193-4195.
- Bogaard, A.E.J.M., N. London and E.E. Stobberingh. 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. **J. Antimicrob. Chemother.** 45: 663-671.
- Borgen, K., G.S. Simonsen, A. Sundsfjord, Y. Wasteson, O. Olsvik, and H. Kruse. 2000. Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. **J Appl Microbiol.** 89(3): 478-485.
- Braga, T.M., C. Pomba and M.F.S. Lopes. 2012. High-level vancomycin resistant *Enterococcus faecium* related to humans and pigs found in dust from pig breeding facilities. **Vet. Microb.** 161(3-4): 344-349.
- Brook, I. 1988. Effect of *Streptococcus faecalis* on the growth of *Bacteroides* species and anaerobic cocci in mixed infection. **Surgery.** 103: 107-110.
- Butaye, P., L.A. Devriese, H. Goossens, M. Ieven and F. Haesebrouck. 1999. Enterococci with Acquired Vancomycin Resistance in Pigs and Chickens of Different Age Groups. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43(2): 365-366.

- Casewell, M., C. Friis, E. Macro, P. McMullin and I. Phillips. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **J. Antimicrob. Chemother.** 52: 159-161
- Cauwerts, K., A. Decostere, E. M. De Graef, F. Haesebrouck and F. Pasmans. 2007. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**. 36(5): 395-399.
- Chambers, H.F. 2000. Penicillins. 261-274. *In*: G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin., eds. **Principle and Practice of Infectious Disease**. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Choi, S.H., S.O. Lee, T.H. Kim, J.W. Chung, E.J. Choo, Y.G. Kwak, M.N. Kim, Y.S. Kim, J.H. Woo. J. Ryn and N.J. Kim. 2004. Clinical Features and Outcomes of Bacteremia Caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: Analysis of 56 Cases. **Clin. Infect. Dis.** 38: 53-61.
- Chopra, I, P.M. Hawkey and M. Hinton. 1992. Tetracycline, molecular and clinical aspects. **J. Antimicrob. Chemother.** 29: 245-277.
- _____ and M.Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Bio. Rev.** 65: 232-260.
- Clark, N.C., L.M. Teixeira, R.R. Facklam and F.C. Tenover. 1998. Detection and differentiation of vanC-a, vanC-2, and vanC-3 glycopeptide resistance genes in enterococci. **J. Clin. Microbiol.** 36: 2294-2297.
- Clewell, D.B. 1981. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. **Microbiol. Rev.** 45: 409-436.

_____. 1993. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. **Cell**. 73: 9-12.

_____ and C. Gawron-Burke. 1986. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. **Annu. Rev. Microbiol.** 40: 635-659.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. Approved standard, 10th ed. **M02-A10 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, Wayne, P.A.

_____. 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved standard, 8th ed. **M07-A8 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, Wayne, P.A.

_____. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement. **M100-S21 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, Wayne, P.A.

Collins, M.D., D. Jones, J.A.E. Farrow, R. Kilpper-Balz and K.H. Schleifer. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 34 (2): 220-223.

Coombs, G.W., I.D. Kay, R.A. Steven, J.E. Pearman, D. Bertolatti and W.B. Grubb. 1999. Should Genotyping Testing be done on all phenotypically Vancomycin-Resistant Enterococci detected in hospitals? (Letter to the editor). **J. Clin. Microbiol.** 37(4): 1129-1130.

- Costa, Y., M. Galimand, R. Leclercq, J. Duval, P. Courvalin. 1993. Characterization of the chromosomal *aac(6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37: 1896-1903.
- Courvalin, P. 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clin. Infect. Dis.** 42: 25-34.
- Cruz Colque, J.I., L.A. Devriese and F. Haesebrouck. 1993. Streptococci and enterococci associated with tonsils of cattle. **Lett. Appl. Microbiol.** 16: 72-74.
- Cupakova, S and J. Lukasova. 2003. Agricultural and Municipal Waste Water as a Source of Antibiotic-Resistant Enterococci. **Acta Vet. Brno.** 72: 123-129.
- Dargere, S., M. Vergnaud, R. Verdon, E. Saloux, O.L. Page, R. Leclercq and C. Bazin. 2002. *Enterococcus gallinarum* Endocarditis Occurring on Native Heart Valves. **J. Clin Microbiol.** 40(6): 2308-2310.
- Day, A.M., J.A.T. Sandoe, J.H. Cove and M.K. Phillips-Jones. 2001. Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 392-396.
- Deibel, R.H. 1964. The group D streptococci. **Bacteriol. Rev.** 28: 330-336
- Deutsches Institut für Normung e.V (DIN 58940). 1992. Methoden der Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika Agar-Diffusionstest. **In DIN-Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Normen und weitere Unterlagen.** Beuth-Verlag, Berlin and Cologne.

- De Vaux, A., G. Laguerre, C. Divies and H. Prevost. 1998. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48: 383-387.
- Devriese, L.A., M. Baele and P. Butaye. 2000. The genus *Enterococcus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleiffer and E. Stackebrandt, eds. **The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**. Springer Verlag, New York.
- _____, K. Ceyssens, U.M. Rosrigues and M.D. Collins. 1990. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. **FEMS Microbiol. Lett.** 71: 247-252.
- _____, J. Hommeez, B. Pot and F. Haesebrouck. 1994. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. **J. Appl. Bacteriol.** 77: 31-36.
- _____, _____, R. Wijfels and F. Haesebrouck. 1991. Composition of enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. **J. Appl. Microbiol.** 71: 46-50.
- _____, L. Laurier, P. De Herdt and F. Haesebrouck. 1992. Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. **J. Appl. Bacteriol.** 72: 29-31.
- _____, P. Vandamme, B. Pot, M. Vanrobaeys, K. Kersters and F. Haesebrouck. 1998. Differentiation between *Streptococcus gallolyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tract of ruminants. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3520-3523.
- _____, A. Van De Kerchove, R. Kilpper-Balz and K.H. Schleiffer. 1987. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 36: 257-259.

- Domabedian, S., J.W. Chow, D.M. Shlaes, M. Green, M.J. Zervos. DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level. **J. Clin. Microbiol.** 33: 141-145.
- Donabedian, S.M., M.B. Perri, N. Abdujamilova, M.J. Gordoncillo, A. Naqvi, K.C. Reyes, M.J. Zervos and P. Bartlett. 2010. Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Swine in Three Michigan Counties. **J. Clin Mibrobiol.** 48(11): 4156-4160.
- Donowitz, G.R. 2000. Oxazolidinones, pp. 392-394. In G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin., eds. **Principle and Practice of Infectious Diseases**. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Drlica, K. and X. Zhao. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61: 377-392.
- Dunne, W.M., B.S. Dunne and Smith. 1996. Watch out where the huskies go. **ASM News.** 62: 283.
- Duygu, F., P.O. Balci, M. Solmaz and N.S. Ucar. 2011. Meningitis associated with Vancomycin resistant *Enterococcus casseliflavus*: First report. **J. Microbiol. Infect. Dis.** 1 (3): 138-140.
- Edberg, S.C., C.J. Hardalo, C. Kontrick and S. Campbell. 1994. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. **J. Clin. Microbiol.** 32(9): 2182-2184.
- Edlund, C., A. Lidbect, L. Kager and C.E. Nord. 1987. Comparative effects of enoxacin and norfloxacin on human colonic microflora. **Antimicrob. Agents Chemother.** 31: 1846-1848.

- Eliopoulos, G.M., C.B. Wennersten, G. Cole and R.C. Moellering. 1994. *In vitro* activities of two glycyclcyclines aganst gram-positive bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38: 534-541.
- Elliott, S.D. and E.M. Barnes. 1959. Changes in serological type and antibiotic resistance on Lancefield group D streptococci in chickend receiving dietary chlortetracycline. **J. Gen. Microbiol.** 20: 426-433.
- Enzenxbetger, R., P.M. Shah and H. Knothe. 1985. Impact of oral ciprofloxacin on the faecal flora of healthy volunteers. **Infection.** 13: 273-275.
- Facklam, R.R., M.D. Collins. 1989. Identification of *enterococcus* species isolated from human infection by conventional test scheme. **J. Clin. Microbial.** 27: 731-734.
- Fekety, R. 2000. Vancomycin, teicoplanin and the streptogramins: quinupristin and dalfopristin, pp. 382-394. *In* G.L. Medell, J.E. Bennett and R. Dolin., eds. **Principle and Practice of Infectious Disease.** Churchill Livinggstone, Philadelphia.
- Felmingham, D., A.P. Wilson, A.I. Quintana and R.N. Gruneberg. 1992. *Enterococcus* species in urinary tract infection. **Clin. Infect. Dis.** 15: 295-301.
- Finken, M., P. Kirschner, A. Meir, A. Wrede and E.C. Bottger. 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Mol. Microbiol.** 9: 1239-1246.
- Ford, C.W., J.C. Hamel, D. Stapert, J.K. Moerman, D.K. Hutchinson and M.R. Barbachyn. 1997. Oxazolidinones: a new antimicrobial agents. **Trends. Microbiol.** 5: 196-200.

Frieden, T.R., S.S. Munsiff, D.E. Low, B.M. Willey and G. Williams. 1993. Emergence of vancomycin resistant enterococci in New York City. **Lancet**. 342: 76-79.

Gambarotto, K., M.C. Ploy, F. Dupron, M. Giangiobbe and F. Denis. 2001. Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Pork and Poultry Products from a Cattle-Rearing Area of France. **J. Clin. Microbiol.** 39(6): 2354-2355.

_____, _____, P. Turlure, C. Grelaud, C. Martin, D. Bordessoule and F. Denis. 2000. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Fecal Samples from Hospitalized Patients and Nonhospitalized Controls in a Cattle-Rearing Area of France. **J. Clin Microbiol.** 38(2): 620-624.

Garrison, R.N., D.E. Fry, S. Berberich and H.C. Polk. 1982. Enterococcal bacteremia: clinical implications and determinants of death. **Ann. Surg.** 196: 43-47.

Ghidan, A. 2007. **Epidemiology of *vanA* gene carrier enterococci: Molecular characterization, antibiotic sensitivity and phylogenetic relationship of Hungarian isolates.** Ph.D. Thesis, Semmelweis University.

Gholizadeh, Y. and P. Conrvalin. 2000. Acquired and Intrinsic glycopeptides resistance in enterococci. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 16: 11-17.

Gilbert, P., D.G. Allison and P.A. Lambert. 2002. Antibiotics that act on nucleic acids and protein synthesis, pp. 599-608. *In* M. Sussman., eds. **Molecular Medical Microbiology.** Academic Press, London.

Granninger, W., R. Ragette. 1992. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. **Clin. Infect. Dis.**, 15: 49-57.

Gray, J.W. and S.J. Pedler. 1992. Antibiotic-resistant enterococci. **J. Hosp. Infect.** 21: 1-14.

Grayson, M.L., C. Thauvin-Eliopoulos, G.M. Eliopoulos, J.D. Yao, D.V. DeAngelis, L. Walton, J.L. Woolley and R.C. Moellering. 1990. Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental enterococcal endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 34: 1792-1794.

Gullberg, R.M., S.R. Homann and J.P. Phair. 1989. Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. **Rev. Infect. Dis.** 11: 74-85

Guthof, O. 1995. Über eine neue serologische Gruppe alfa-hemolytischer Strep-tokokken (serologische Gruppe Q). **Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt.1 Orig.** 164: 60-69.

Gutschik, E., S. Moller and N. Christensen. 1979. Experimental endocarditis in rabbits, 3: Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.** 87: 353-356.

Hacker, J., J.B. Kaper. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu. Rev. Microbial.** 54: 641-679.

Hammerum, A.M., C.H. Lester, J. Neimann, L.J. Posrsbo, K.E.P. Olsen, L.B. Jensen, H. Emborg, H.C. Wegener and N. Frimodt-Moller. 2004. A vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate from a Danish healthy volunteer, detected 7 years after the ban of avoparcin, is possibly related to pig isolates. **J. Antimicrob. Chemother.** 53(3): 547-549.

Hartman, P.A., G.W. Reinbold, D.S. Saraswat. 1966. Indicator organisms – a review. I. Toxonomy of the fecal streptococci. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 16: 197-221.

- Harwood, V.J., M. Brownell, W. Perusek and J.E. Whitlock. 2001. Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(10): 4930-4933.
- Hasman, H., Frank M.A., Anders D. and Luca G. 2006. Heterologous expression of glycopeptide resistance *vanHAX* gene clusters from soil bacteria in *Enterococcus faecalis*. **J. Antimicrob. Chemother.** 57: 648-65.
- Hidron, A.I., J.R. Edwards, J. Patel, T.C. Horan, D.M. Sievert, D.A. Pollock and S.K. Fridkin. 2008. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect. Control Hosp epidemiol.** 29(11): 996-1011.
- Hite, K.E., M. Locke and H.C. Hesseltine. 1949. Synergism in experimental infections with nonsporulating anaerobic bacteria. **J. Infect. Dis.** 84: 1-9.
- Hooper, D.C. 2000a. Quinolones, pp. 404-423. In Mandell G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin, eds. **Principle and Practice of Infectious Disease**. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- _____. 2000b. Urinary tract agents: nitrofurantoin and methenamine, pp. 423-427. In Mandell G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin, eds. **Principle and Practice of Infectious Disease**. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Huyke, D.F. Sahm, M.S. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerg. Infect. Dis.** 4: 239-249.

- _____, C.A. Spiegel and M.S. 1991. Bacteraemia caused by haemolytic high level gentamycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 35: 1626-1634.
- Huys, Geert, K. D'Haene, J. Collard and J. Swings. 2004. Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in Enterococcus Isolates from Food. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 1555-1562.
- Iaria, C., G. Stassi, G.B. Costa, R.D. Leo, A. Toscano and A. Cascio. 2005. Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. **BMC Infect. Dis.** 5(3).
- Ike, Y., H. Hashimoto, D.B. Clewell. 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. **J. Clin. Microbiol.** 25: 1524-1528.
- _____, K. Tanimoto, Y. Ozawa, T. Nomura, S. Fujimoto and H. Tomita. 1999. Vancomycin-Resistant Enterococci in Imported Chickens in Japan. **The Lancet.** 353(9167): 854.
- Jaglic, Z., H. Vlkova, J. Baron, E. Michu, D. Cervinkova and V. Babak. 2011. Distribution, Characterization and Genetic Bases of Erythromycin Resistance in Staphylococci and Enterococci Originating from Livestock. **Zoonoses and Public Health.** 59(3): 202-211.
- Jarvis, W.R., R.P. Gaynes, T.C. Horan, T.G. Emori, L.A. Stroud and L.K. Archibald. 1997. CDC NNIS System National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1997. **AJIC Am. J. Infect. Control.** 25: 447-487.
- Jett, B.D., M.M. Huycke and M.S. Gilmore. 1994. Virulence of enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.** 7: 462-478.

- Kacmaz, B. and A. Aksoy. 2005. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. **Int. J. Antimicrobiol. Agents.** 25: 535-538.
- Kadurugamuwa, J.L., A.J. Clarke and T.J. Beveridge. 1993. Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** 37: 1896-1903.
- Kalina, A.P. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 20: 185-189.
- Kanematsu, E., T. Deguchai, M. Yasuda, T. Kawamura, Y. Nishino and Y. Kawada. 1998. Alterations in the *GyrA* subunit of DNA gyrase and the *ParC* subunit of DNA tooisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42: 433-435.
- Kariyama, R., R. Mitsuata, J.W. Chow, D.B. Clewell and H Kumon. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci. **J. Clin. Microbiol.** 38(8): 3092-5.
- Karlene C. Reid Franklin R. Cockerill, and Robin Patel. 2001. Clinical and Epidemiological Features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* Bacteremia: A Report of 20 Cases. **Clin. Infect. Dis.** 32:1540–1546.
- Kaukas, A., M. Hinton and A.H. Linton. 1987. The effect of ampicillin and tylosin in the faecal enterococci of healthy young chickens. **J. Appl. Microbiol.** 62: 441-447.
- Kempf, I., H. Heier, H. Claus, G. Bohme, S. Marin, G. Seltmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova and W. Witte. 1995. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptides resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. **Microb. Drug. Resist.** 1(3): 265-272.

- Klare, I., D. Badstubner, C. Konstabel, G. Bohme, H. Claus, and W. Witte. 1999. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. **Microb Drug Resist.** 5(1): 45-52.
- _____, H. Heier, H.Claus, G. Bohme, S. Marin, G. Seltmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova and W.Witte. 1995. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptides resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. **Microb Drug Resist.** 1(3): 265-272.
- Klein, G, A. Pack and G. Reuter. 1998. Antibiotic Resistance Patterns of Enterococci and Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Raw Minced Beef and Pork in Germany. **App. Environ. Microbiol.** 64(5): 1825-1830.
- Kotzamanidis, C., A. Zdragas, A. Kourelis, E. Moraitou, A. Papa, V. Yiantzi, C. Pantelidou and M. Yiangou. 2009. Characterization of *vanA*-type *Enterococcus faecium* isolates from urban and hospital wastewater and pigs. **J. Appl. Microb.** 107: 997-1005.
- Kreft, B., R. Marre, U. Schramm and R. Wirth. 1992. Aggregarion substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured tenal tubular cells. **Infect. Immun.** 60: 25-30.
- Landman, D., J.M. Quale, E. Oydana, B. Willey, V. Ditore, M. Zaman, K. Patel, G. Saurina and W. Huang. 1996. Comparasion of five media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. **J. Clin. Microbiol.** 34(3): 751-752.
- Lauderdale, T.L., Y.R. Shiau, H.Y. Wang, J.F. Lai, I.W. Huang, P.C. Chen, H.Y. Chen, S.S. Lai, Y.F. Liu and M. Ho. 2007. Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. **Environ. Microbiol.** 9(3): 819-823.

- Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval and P. Courvalin. 1988. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **N. Engl. J. Med.** 319: 157-161.
- Lim, J.A., R.K. Ae, K.K. Sook, C. Yunsop, L. Kungwon and C.C. Eung. 2002. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. **J. Animicrob. Chemother.** 49: 489-495.
- Lim, S.K., T.S. Kim, H.S. Lee, H.M. Nam, Y. Seokjoo and H.B. Koh. 2006. Persistence of vanA-type *Enterococcus faecium* in Korean livestock after ban on avoparcin. **Microb. Drug Resist.** 12(2): 136-9.
- Livornese, L.L., S. Dias, C. Samel, B. Romanowski, S. Taylor, P. May, P. Pitsakis, G. Woods, D. Kaye and M.E. Levison. 1992. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. **Ann. Intern. Med.** 117: 112-116.
- Lopez, M., C. Tenorio and Torres. 2013. Study of Vancomycin Resistance in Faecal Enterococci from Healthy Humans and Dogs in Spain a Decade after the Avoparcin Ban in Europe. **Zoonoses and Public Health.** 60: 160-167.
- Mac, K., W.S. Heidi, P. Jan and E. Luppó. 2003. Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. **Int. J. Food Microb.** 88: 305-309.
- Malathum, K. and B.E. Murray. 1999. Vancomycin resistant enterococci: recent advances in genetics epidemiology and therapeutic options. **Drug Resist. Update.** 2: 224-243.
- Manero, A and A.R. Blanch. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. **App. Environ. Microbiol.** 65(10): 4425-4430.

- _____, X. Vilanova, M. Cerda-Cuellar and A.R. Blanch. 2006. Vancomycin- and erythromycin-resistant enterococci in a pig farm and its environment. **Environ. Microbiol.** 8(4): 667-674.
- Mederski-Samoraj, B.D. and B.E. Murray. 1983. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. **J. Infect. Dis.** 15: 49-57.
- Megran, D.W. 1992. Enterococcal endocarditis. **Clin. Infect. Dis.** 15: 63-71.
- Miller, G.H., F.J. Sabatelli, R.S. Hare, Y. Glupczynski, P. Mackey and D. Shlaes. 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns. **Clin. Infect Dis.** 24(Suppl 1): S46-62.
- Moellering, R.C., B.K. Watson and L.J. Kunz. 1974. Endocarditis due to group D streptococci: comparison of disease caused by *Streptococcus bovis* with that produced by the enterococci. **Am. J. Med.** 57: 239-250.
- Morrison, A.J. and P.P. Wenzel. 1986. Nosocomial urinary tract infections due to enterococcus. Ten years experience at a university hospital. **Arch. Intern. Med.** 146: 1549-1551.
- Morrison, D. 2002. The Enterococci. 921-936. *In*: M. Sussman, ed. **Molecular Medical Microbiology**. Academic Press, London.
- _____, N. Woodford and B.D. Cookson. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. **J. Appl. Microbiol.** 83: 89S-99S.
- Moriss, A.B., B. Brown and M. Sands. 1993. Use of rifampin in nonstaphylococcal, nonmycobacterial disease. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37: 1-7.

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

_____. 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. **Emerg. Infect. Dis.** 4: 37-47.

_____ and B. Mederski-Samoraj. 1983. Transferable β -lactamase: A new mechanism for *in vitro* penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. **J. Clin. Invest.** 72: 1168-1171.

Murray, I.A. and W.V. Shaw. 1997. O-Acetyltransferase for chloramphenicol and other nature products. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41: 1-6.

Neu, H.C., D. Amsterdam, S.L. Barriere, R.N. Jones, C. Thornsberry and L.S. Young. 1990. Update on glycopeptides resistance in enterococci. **The Antimicroic Newsletter.** 7: 81-88.

Nichols, R.L. and A.C. Muzik. 1992. Enterococcal infections in surgical patients: the mystery continues. **Clin. Infect. Dis.** 15: 72-6.

Noble, C.J. 1987. Carriage of group D streptococci in the human bowel. **J. Clin. Pathol.**, 31: 1182-1186.

Nowlan, S.S. and R.H. Deibel. 1967. Group Q streptococci. I. Ecology, serology, physiology and relationship to established enterococci. **J. Bacteriol.** 94: 291-296.

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

Opal, S.M., K.H. Mayer and A.A. Medeiros. 2000. Mechanism of bacterial antibiotic resistance, pp. 236-253. In G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin., eds. **Principle and Practice of Infectious Diseases.** Churchill Livingstone, Philadelphia.

Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. Mem. **Acad. R. Soc. Denmark. Sect. Sci. Ser. 5:** 81-197.

Pontosti, A., M. Del Grosso, S. Tagliabue, A. Macri, and A. Caprioli. 1999. Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban. **Lancet.** 354(9180): 741-742.

Patel, R., K.E. Piper, M.S. Rouse, et al. 1998. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of no-motile *Enterococcus gallinarum* isolates. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3399-3407.

Poeta, P., D. Costa, J. Rodrigues and C. Torres. 2006. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicates in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 27: 131-137.

Quinn, P.J., M.E. Carter, B.K. Markey and G.R. Carter. 1994. **Clinical Veterinary Microbiology.** Wolfe Publishing. Grafos. 127-136.

Rice, L.B., D. Salm and R.A. Bonomo. 2003. Mechanisms of resistance to antibacterial agents, pp. 1074-1101. In P.R. Murray, E.J. Boron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover, eds. **Manual of Clinical Microbiology.** ASM press, Washington DC.

Roberts, M.C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS. Microbiol. Lett.** 245: 195-203.

Sahm, D.F., J. Kissinger and J. Gilmore. 1989. *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob. Agent Chemother.** 33: 1588-1591.

- Schaberg, D.R., D.H. Culver and R.P. Gaynes. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **Am. J. Med.** 91: 79-82.
- Scheld, W.M. and G.L. Mandell. 1984. Enigmatic enterococcal endocarditis. **Ann. Intern. Med.** 100: 904-905.
- Schleifer, K.H. and R. Kilpper-Balz. 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. Sys. Bacteriol.** 34: 31-34.
- Seo, K.S., J.Y. Lim, H.S. Yoo, W.K. Bae and Y.H. Park. 2005. Comparasion of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. **Vet. Microb.** 106: 225-233.
- Shah, P.M., R. Enzensberger, O. Glogau and H. Knothe. 1987. Influence of oral ciprofloxacin of ofloxacin on the fecal flora of healthy volunteers. **Am. J. Med.** 2: 333-338
- Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare and G.H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. **Microbiol. Rev.** 57: 138-163.
- Sherman, J.M. 1937. **The streptococci. Bacteriol. Rev.** 1: 3-97.
- Shlaes, D.M. 1992. Vancomycin-resistant bacteria. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 13: 193-194.
- _____, J. Levy and E. Wolinsky. 1981. Enterococcal bacteremia without endocarditis. **Arch. Intern. Med.** 141: 578-581.

- Shinabarger, D.L., K.R. Marotti, R.W. Murray, A.H. Lin, E.P. Melchoir, and S.M. Swaney. 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reaction. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41: 2132-2136.
- Singhsuwan, V., T. Chalermchaikit and T. Chatsuwan. 2006. **Prevalence and van gene of vancomycin-resistant enterococci isolated from ark shell (*arca granulosa*) in Thailand.** M.S. Thesis. Chulalongkorn University.
- Siriwattanachai, K., T. Chalermchaikit and T. Chatsuwan. 2004. **Comparison of antimicrobial resistance and DNA patterns of vancomycin-resistant enterococci isolated from dogs cats and owners.** M.S. Thesis. Chulalongkorn University.
- Song, J.Y., I.S. Hwang, J.S. Eom, H.J. Cheong, W.K. Bae, Y.H. Park and W.J. Kim. 2005. Prevalence and Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) Strains Isolated from Animals and Humans in Korea. **Korean J. Int. Med.** 20: 55-62.
- Sood, S., M. Malhotra, B.K. Das and Arti Kapil. 2008. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian J. Med. Res.** 128: 111-121.
- Swenson, J.M., B.C. Hill and C. Thornsberry. 1989. Problems with Disk Diffusion Test for Detection of Vancomycin Resistance in Enterococci. **J. Clin. Microbiol.** 27(9): 2140-2142.
- Tankovic, J., F. Mahjoubi, P. Courvalin, J. Duval and R. Leclercq. 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40: 2558-2561.

- Teixeira, L.M., M.G. Carvalho and R.R. Facklam. 2007. *Enterococcus* spp. pp. 430-442. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M.A. Pfaller., eds. **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press, Washington DC.
- Thal, L.A., J.W. Chow, R. Mahayni, H. Bonilla, M.B. Perri, S.A. Donabedian, J. Silverman, S. Taber and M.J. Zervos. 1995. Characterization of antimicrobial resistance in enterococci from animal origin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 39: 2112-2115.
- Thiercelin, M.E. 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogen. **C. R. Soc. Biol.** 5: 269-271.
- Thongkoom, P., S. Kanjanahreutai, S. Chantrakooptungool and S. Rahule. 2012. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolates isolated in Rajavithi Hospital between 1999 and 2009. **J. Med. Assoc. Thai.** 95(3): 7-15.
- Upadhyaya, P.M.G., K.L. Ravikumar and B.L. Umapathy. 2009. Review of Virulence Factors of *Enterococcus*: An Emerging Nosocomial Pathogen. **Indian J. Med. Microbiol.** 27(4): 301-305.
- Uttley, A.H., R.C. George and J. Naidoo. 1989. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infection. **Epidemiol. Infect.** 103: 173-181.
- Uttley, A.H.C., C.H. Collins, J. Naidoo and R.C. George. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet** i: 57-58.
- Vancanneyt, M., C. Snauwaert, I. Cleenwerck, M. Baele, P. Descheemaeker, H. Goossens, B. Pot, P. Vandamme, J. Swings, F. Haesebrouck and L.A. Devriese. 2001. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhea in piglets. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 393-400.

Vannuffel, P. and C. Cocito. 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides.

Drugs. 51(Suppl 1): 20-30.

Warren, R.E. 1988. Difficult streptococci. **J. Hosp. Infect.** II (Suppl A): 352-357.

Wells, C.L., R.P. Jechorek and S.L. Erlandsen. 1990. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. **J. Infect. Dis.** 162: 82-90.

Wells, L.D. and A. Graevenitz. 1980. Clinical significance of enterococci in blood cultures from adult patients. **Infection.** 4: 147-151.

Werner, G. 2012. Current Trends of Emergence and Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci, pp. 303-354. In M. Pana., ed. **Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium.**

_____, T.M. Coque, A.M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K.G. Kristinsson, R. Leclercq, C.H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L.V. Peixe, E. Sadowy, G.S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R.J. Willems, W. Witte and N. Woodford. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance.** 13(47).

Wegener, H.C., F.M. Aarestrup, L.B. Jensen, A.M. Hammerum, and F. Bager. 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. **Emerg Infect Dis.** 5(3): 329-335.

Wolfson, J.S. and D.C. Hooper. 1985. The fluoroquinolones: structure, mechanism of action and resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 28: 581-586.

Xu, X., D. Lin, G. Yan, X. Ye, S. Wu, Y. Guo, D. Zhu, F. Hu, Y. Zhang, F. Wang, G.A. Jacoby and M. Wang. 2010. *vanM*, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 54(11): 4643-4647.

Zervos, M.J. and D.R. Schaberg. 1985. Reversal of the *in vitro* susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. **Antimicrob. Agents Chemother.** 28: 446-448.

Zinner, S.H. and K.H. Mayer. 2000. Sulfonamides and trimethoprim, pp. 394-404. In G.L. Medell, J.E. Bennett and R. Dolin., eds. **Principle and Practice of Infectious Diseases**. Churchill Livingstone, Philadelphia.

Zorzi, W., X.Y. Zhou, O. Dardenne, J. Lamotte, D. Raze and J. Pierre. 1996. Structure of the low-affinity penicillin-binding-protein 5, PBP5_{fm}, in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. **J. Bacteriol.** 178: 4948-4957.

Zouain, M.G. and G.F. Araj. 2001. Antimicrobial resistance of Enterococci in Lebanon. **Int. J. Antimicrob. Agents** 17: 209-213.





ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller-Hinton broth

ส่วนประกอบของอาหาร Mueller-Hinton broth

Beef, Dehydration Infusion Form	300	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 ± 0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

1.1 ชั่งอาหาร 21 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.2 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนกว่าสารละลายจะเย็น แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2. Mueller-Hinton agar

ส่วนประกอบของอาหาร Mueller-Hinton agar

Beef, Dehydration Infusion form	300	กรัม
Casein Hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 ± 0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

2.1 ชั่งอาหาร 38 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.2 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทเพลา แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3. Heart infusion broth

ส่วนประกอบของอาหาร Heart infusion broth

Beef Heart, Infusion form 500 g	10	กรัม
Tryptose	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.4 ± 0.2		

วิธีเตรียม

3.1 ชั่งอาหาร 25 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.2 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนกว่าสารละลายจะเย็น แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4. Brain heart infusion broth

ส่วนประกอบของอาหาร Brain heart infusion broth

Calf Brains, Infusion form 200 g	7.7	กรัม
Beef Heart, Infusion form 250 g	9.8	กรัม
Proteose Peptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Dextrose	2	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม
ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.4 ± 0.2		

วิธีเตรียม

4.1 ชั่งอาหาร 37 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4.2 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนกว่าสารละลายจะเย็น แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

5. Enterococcosel™ agar

ส่วนประกอบของอาหาร Enterococcosel™ agar

Pancreatic Digest of Casein	17	กรัม
Peptic Digest of Animal Tissue	3	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
Oxgall, dehydrated	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Sodium Citrate	1	กรัม
Esculin	1	กรัม
Ferric Ammonium (HI) Citrate	0.5	กรัม
Sodium Azide	0.25	กรัม
Agar	13.5	กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.1 ± 0.2

วิธีเตรียม

5.1 ชั่งอาหาร 56 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5.2 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทเพลท แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

6. Tryptic soy agar

ส่วนประกอบของอาหาร Tryptic soy agar

Pancreatic Digest of Casein	15	กรัม
Papaic Digest of Soybean	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 ± 0.2

วิธีเตรียม

6.1 ชั่งอาหาร 40 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทเพลท แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

7. Tryptic soy broth

ส่วนประกอบของอาหาร Tryptic soy broth

Pancreatic Digest of Casein	17	กรัม
Papaic Digest of Soybean	13	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

7.1 ชั่งอาหาร 30 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

7.2 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนกว่าสารละลายจะเย็น แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

8. เกลีโอโซเดียมคลอไรด์ 6.5% (6.5% salt broth)

วิธีการเตรียมสารละลายในการทดสอบ

8.1 เตรียมสารละลายดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร)

Heart infusion broth	25	กรัม
Bromocresol purple (1.6% ใน 95% ethanol)	1	มิลลิลิตร
NaCl (6%)	60	กรัม
Glucose (0.5%)	5	กรัม

8.2 ผสมให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

8.3 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8.4 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนกว่าสารละลายจะเย็น แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

9. อาหารที่ใช้ทดสอบการเจริญเติบโตในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียมสารละลายในการทดสอบ

9.1 เตรียมสารละลายดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร)

Heart infusion broth	25	กรัม
Bromocresol purple (1.6% ใน 95% ethanol)	1	มิลลิลิตร
Glucose (0.5%)	5	กรัม

9.2 ผสมให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

9.3 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9.4 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนกว่าสารละลายจะเย็น แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

10. น้ำตาล mannitol, sorbose, arabinose, sorbitol, raffinose และ sucrose (Acid formation in carbohydrate broths)

วิธีการเตรียม

10.1 เตรียม Heart infusion broth ดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร)

Heart infusion broth	25	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

10.2 เติม Bromocresol purple 1 มิลลิลิตร

10.3 เติมคาร์โบไฮเดรต (mannitol, sorbose, arabinose, sorbitol, raffinose หรือ sucrose) ลงไป 1%

10.4 ต้มจนสารละลายใส และเป็นเนื้อเดียวกัน

10.5 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 4 มิลลิลิตร

10.6 ทำการ autoclave ที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

10.7 รอจนเย็นแล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. Arginine (Deamination of arginine)

วิธีการเตรียม

11.1 เตรียม arginine ดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร)

Moeller's decarboxylase base medium (Difco)	10.5	กรัม
L-arginine hydrochloride	0.5	กรัม
Agar	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

11.2 ต้มจนสารละลายใส และเป็นเนื้อเดียวกัน

11.3 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 4 มิลลิลิตร

11.4 ทำการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11.5 รอจนเย็นแล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. 0.04% tellurite (Tellurite tolerance test)

เป็นการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในรูปหลอด หรือเพลท กับ 0.04% Potassium tellurite

วิธีการเตรียม

12.1. เตรียม Heart infusion agar ดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร) pH 7.4 ± 0.2

Heart infusion broth	25	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

12.2 ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส แล้วรอนอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงทำการปรับพีเอชด้วยเครื่อง pH meter ทำให้เป็น pH 6 ด้วย 1 N HCl

12.3 ทำการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12.4 แช่ในเครื่อง water bath ปรับอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส แล้วใส่เลือดประมาณ 5%

12.5 ปรับอุณหภูมิให้ได้ 50 องศาเซลเซียส เพื่อใส่ 0.1 % Potassium tellurite solution ปริมาณ 4 มิลลิลิตร (ต่อปริมาณ Heart infusion agar 1 ลิตร)

12.6 เทใส่เพลท เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13. Motility test

วิธีการเตรียม

13.1 เตรียมสารละลาย ดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร)

Tryptone	10	กรัม
Agar	3.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

13.2 ต้มจนสารละลายใส และเป็นเนื้อเดียวกัน

13.3 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร

13.4 ทำการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13.5 รอจนเย็นแล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14. Pyruvate utilization test

วิธีการเตรียม

14.1 เตรียม pyruvate ดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร) pH 7.2-7.4

Tryptone	25	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
K ₂ HPO ₄	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Sodium salt of pyruvic acid	10	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

14.2 ต้มจนสารละลายใส และเป็นเนื้อเดียวกัน

14.3 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร

14.4 ทำการ autoclave ที่ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14.5 เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15. Methyl- α -D-glycopyranoside test

วิธีการเตรียม

15.1. เตรียม Methyl- α -D-glycopyranoside ดังนี้ (สำหรับปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร)

Methyl- α -D-glycopyranoside	25	กรัม
Phenol red	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

15.2 ต้มจนสารละลายใส และเป็นเนื้อเดียวกัน

15.3 ทำการกรองสารละลายแล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตร

15.4 เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

16. Mueller Hinton agar No. II

ส่วนประกอบของอาหาร Mueller-Hinton agar No. II

Beef Extract	2	กรัม
Acid Hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 ± 0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

16.1 ชั่งอาหาร 38 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน ใส่แท่งแม่เหล็ก แล้วนำไปต้มบน Hot plate stirrer จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

16.2 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

16.3 เมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งจนอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทเพท แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข

การเตรียมความชุ่มมาตรฐาน และความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MICs) จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์

1. การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland nephelometer Standards)

การเตรียมความขุ่นมาตรฐานตามวิธีของ McFarland (McFarland nephelometer) โดยใช้กรดซัลฟูริก และแบเรียมคลอไรด์ มีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

1.1 เตรียม 1% ของ H_2SO_4

1.2 เตรียม 1% aqueous solution ของ BaCl_2

1.3 ผสมสารละลายในหลอดทดลองใหม่ๆ ที่ไม่มีรอยดำ หรือขุ่น ปริมาณตามต้องการตามตารางผนวกที่ ข1

ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland Standards)

ปริมาณความขุ่นมาตรฐาน	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% BaCl_2 (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
1% H_2SO_4 (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Approx.cell density (x 10^8 /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ตารางผนวกที่ ข2 ความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc-diffusion technique โดยวิธี Kirby-Bauer

กลุ่มยา	ยาด้านจุลชีพ	ปริมาณยา	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยา (mm)		
			S	I	R
Penicillins					
A	Pencillin	10 units	≥ 15	-	≤ 14
A	Ampicillin	10 µg	≥ 17	-	≤ 16
Glycopeptides					
B	Vancomycin	30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14
Inv.	Teicoplanin	30 µg	≥ 14	11-13	≤ 10
Lipopeptides					
B	Daptomycin	-	-	-	-
Macrolides					
O	Erythromycin	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13
Tetracyclines					
U	Tetracycline	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
O	Doxycycline	30 µg	≥ 16	13-15	≤ 12
O	Minocycline	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
Fluroquinolones					
U	Ciprofloxacin	5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
U	Levofloxacin	5 µg	≥ 17	14-16	≤ 13
U	Norfloxacin	10 µg	≥ 17	13-16	≤ 12
O	Gatifloxacin	5 µg	≥ 18	15-17	≤ 14
Nitrofurantoin					
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥ 17	15-16	≤ 14
Ansamycins					
O	Rifampin	5 µg	≥ 20	17-19	≤ 16

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

กลุ่มยา	ยาต้านจุลชีพ	ปริมาณยา	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยา (mm)		
			S	I	R
Phenicols					
O	Chloramphenicol	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12
Fosfomycins					
O	Fosfomycin	200 µg	≥ 16	13-15	≤ 12
	Fosfomycin	50 µg	≥ 20	14-19	≤ 13
Phenicols					
O	Chloramphenicol	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12
Streptogramins					
B	Quinupristin- dalfopristin	15 µg	≥ 19	16-18	≤ 15
Oxazolidinones					
B	Linezolid	30 µg	≥ 23	21-22	≤ 20
Aminoglycosides HLAR					
	Gentamicin	120 µg	≥ 10	7-9	≤ 6
	Streptomycin	300 µg	≥ 10	7-9	≤ 6

ที่มา: CLSI (2011); DIN 58940 (1992)

ตารางผนวกที่ ข3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MICs) จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดยวิธี agar dilution technique

กลุ่มยา	ยาด้านจุลชีพ	ค่า MICs (µg/ml)		
		S	I	R
Penicillins				
A	Pencillin	≤ 8	-	≥ 16
A	Ampicillin	≤ 8	-	≥ 16
Glycopeptides				
B	Vancomycin	≤ 4	8-16	≥ 32
Inv.	Teicoplanin	≤ 8	16	≥ 32
Lipopeptides				
B	Daptomycin	≤ 4	-	-
Macrolides				
O	Erythromycin	≤ 0.5	1-4	≥ 8
Tetracyclines				
U	Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16
O	Doxycycline	≤ 4	8	≥ 16
O	Minocycline	≤ 4	8	≥ 16
Fluroquinolones				
U	Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
U	Levofloxacin	≤ 2	4	≥ 8
U	Norfloxacin	≤ 4	8	≥ 16
O	Gatifloxacin	≤ 2	4	≥ 8
Nitrofurantoin				
U	Nitrofurantoin	≤ 32	64	≥ 128
Ansamycins				
O	Rifampin	≤ 1	2	≥ 4
Fosfomycins				
O	Fosfomycin	≤ 64	128	≥ 256
Phenicol				
O	Chloramphenicol	≤ 8	16	≤ 32

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

กลุ่มยา	ยาต้านจุลชีพ	ค่า MICs (µg/ml)		
		S	I	R
Gramins				
B	Quinupristin-dalfopristin	≤ 1	2	≥ 4
Oxazolidinones				
B	Linezolid	≤ 2	4	≥ 8
Aminoglycosides HLAR				
	Gentamicin	≤ 500	-	> 500
	Streptomycin	≤ 500	-	> 2000

ที่มา: CLSI (2011)



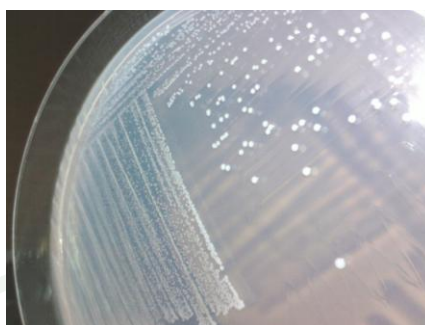
ตารางผนวกที่ ค1 เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน

เชื้ออ้างอิง	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
มาตรฐาน	<i>faecalis</i> ATCC	<i>faecalis</i> ATCC	<i>faecalis</i> ATCC	<i>aureus</i> ATCC
	29212	51299	14506	25923
ชื่อเดิม	<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>	<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>	<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
ผู้ค้นพบครั้งแรก	Andrewes และ Horder	Andrewes และ Horder	Andrewes และ Horder	Rosenbach
แหล่งที่แยกเชื้อครั้งแรก	ปัสสาวะของ มนุษย์	ของเหลวในช่อง ท้อง	-	แยกเชื้อทางคลินิก
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต	37 องศาเซลเซียส สภาวะอากาศที่ ต้องการออกซิเจน	35 องศาเซลเซียส สภาวะอากาศที่ ต้องการออกซิเจน	37 องศาเซลเซียส	37 องศาเซลเซียส สภาวะอากาศที่ ต้องการออกซิเจน
จีโนมไทป์	-	<i>vanB ant(6)-I</i> <i>aac(6') aph(2'')</i>	-	-
การดื้อยา	ไวต่อยา	ดื้อยา vancomycin	-	ไวต่อยา
vancomycin	vancomycin (MICs 1-4 µg/ml)	ในระดับต่ำ (8-16 µg/ml)	-	vancomycin



ภาพผนวก ง

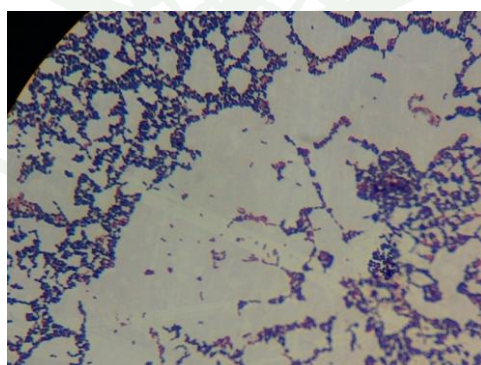
ภาพแสดงลักษณะโคโลนี รูปร่างของเชื้อ VRE และ VIRE การขึ้นชั้นผลควยวิธีทางจุลชีววิทยาและ
ชีวเคมี และการทดสอบความไวยาต้านจุลชีพ



ภาพผนวกที่ ๓1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin อายุ 24 ชั่วโมง บนอาหาร Tryptic soy agar ลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่นนวล มันวาว



ภาพผนวกที่ ๓2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร bile-esculin azide agar ที่ผสมยา vancomycin ปริมาณ 6 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ที่ dilution 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ลักษณะโคโลนีมีสีน้ำตาล หรือดำ มีโซนสีดำ หรือสีน้ำตาลเข้มรอบๆ โคโลนี



ภาพผนวกที่ ๓3 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *Enterococcus* spp. เมื่อย้อมสีแกรมและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เชื้อติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม มีการเรียงตัวเป็นเป็นเชลล์เดี่ยว คู่ สายสั้นๆ หรือเกาะกลุ่ม



ภาพผนวกที่ ๓4 การทดสอบการเจริญเติบโตในความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5% (6.5% salt broth test) ภาพ A แสดงผลลบต่อการทดสอบ และภาพ B แสดงผลบวกต่อการทดสอบของเชื้อ *Enterococcus* spp. เชื้อสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือได้ 6.5 % โดยดูการเปลี่ยนสีของสารบ่งชี้ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง



ภาพผนวกที่ ๓5 การทดสอบการเจริญเติบโตในอุณหภูมิจานอง 45 องศาเซลเซียส ภาพ A แสดงผลลบต่อการทดสอบ และภาพ B แสดงผลบวกต่อการทดสอบของเชื้อ *Enterococcus* spp. เชื้อสามารถทนต่ออุณหภูมิ โดยดูการเปลี่ยนสีของสารบ่งชี้ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง



ภาพผนวกที่ ๖ ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) ของเชื้อ *Enterococcus* spp.



ภาพผนวกที่ ๗ การทดสอบการสลายสาร L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) ของเชื้อ *Enterococcus* spp. โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ pyrrolidonyl arylamidase (PYRase) สลายสาร PYR ได้ β -naphthylamide และเมื่อหยดน้ำยา PYR reagent หรือ *N,N*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) จะเกิดการจับตัวกับ β -naphthylamide ได้สีแดง



ภาพผนวกที่ ๘ ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ leucine- β -naphthylamide (LAP)



ภาพผนวกที่ ๙ การทดสอบการสลายสาร leucine- β -naphthylamide (LAP) ของเชื้อ *Enterococcus* spp. โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAPase) สลายสาร LAP ได้ β -naphthylamide และเมื่อหยดน้ำยา LAP reagent หรือ *N,N*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) จะเกิดการจับตัวกับ β -naphthylamide ได้สีแดง



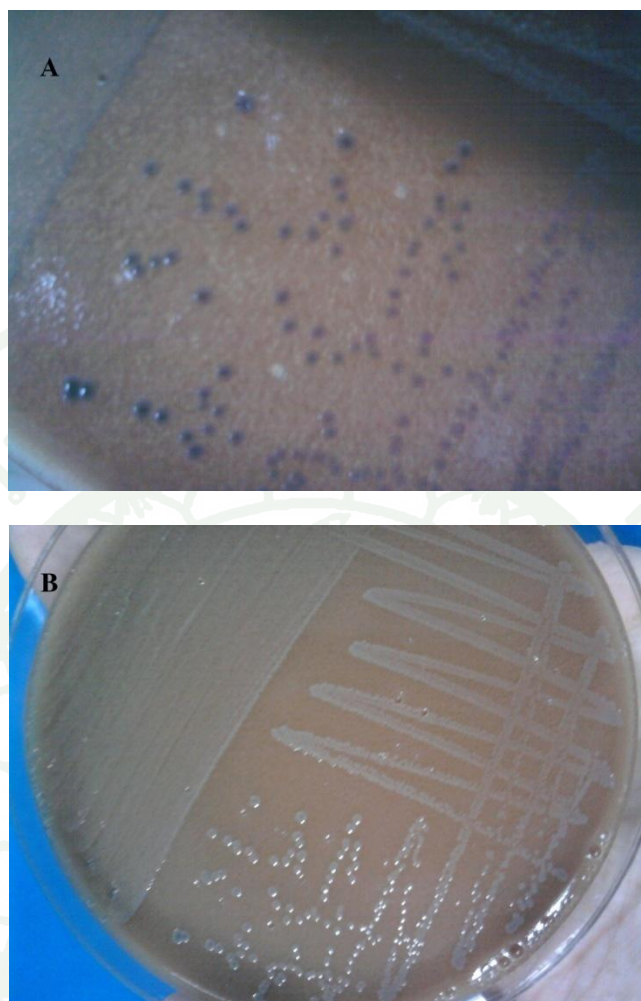
ภาพผนวกที่ 10 ตัวอย่างการพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus* spp. ในระดับสปีชีส์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จากภาพคือ *E. faecalis* ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบน้ำตาล mannitol, sorbitol และ sucrose เนื่องจากการที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลจนได้กรดออกมาทำให้เปลี่ยนสี indicator ของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง เชื้อให้ผลลบต่อน้ำตาล sorbose, arabinose และ raffinose เนื่องจากการที่เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลจนได้กรดออกมาทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนสี indicator ของ bromocresol purple จึงได้สีม่วงเหมือนเดิม นอกจากนี้ยังให้ผลบวกต่อ arginine และ puruvate และให้ผลลบต่อ methyl- α -D-glycopyranoside



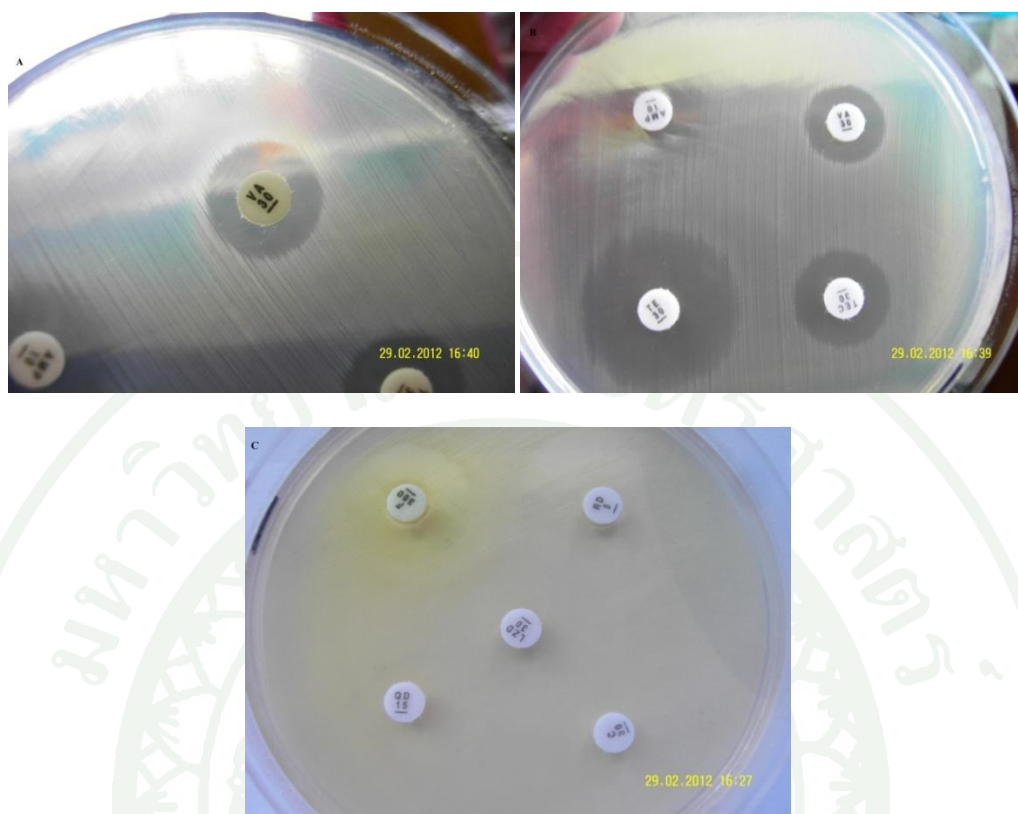
ภาพผนวกที่ 11 ตัวอย่างการพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus* spp. ในระดับสปีชีส์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จากภาพคือ *E. gallinarum* ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบน้ำตาล mannitol, arabinose, raffinose และ sucrose เนื่องจากการที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลจนได้กรดออกมาทำให้เปลี่ยนสี indicator ของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง เชื้อให้ผลลบต่อน้ำตาล sorbose และ sorbitol เนื่องจากการที่เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลจนได้กรดออกมาทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนสี indicator ของ bromocresol purple จึงได้สีม่วงเหมือนเดิม นอกจากนี้ยังให้ผลบวกต่อ arginine และ puruvate และให้ผลบวกต่อ methyl- α -D-glycopyranoside



ภาพผนวกที่ 12 ตัวอย่างการพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus* spp. ในระดับสปีชีส์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จากภาพคือ *E. casseliflavus* ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบน้ำตาล mannitol, arabinose, raffinose และ sucrose เนื่องจากการที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลจนได้กรดออกมาทำให้เปลี่ยนสี indicator ของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง เชื้อให้ผลลบต่อน้ำตาล sorbose และ sorbitol เนื่องจากการที่เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลจนได้กรดออกมาทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนสี indicator ของ bromocresol purple จึงได้สีม่วงเหมือนเดิม นอกจากนี้ยังให้ผลบวกต่อ arginine และ puruvate และให้ผลบวกต่อ Methyl- α -D-glycopyranoside



ภาพผนวกที่ 13 การทดสอบการทนต่อ tellurite ภาพ A คือ เชื้อ *Enterococcus faecalis* ให้ผลต่อการทดสอบ พบโคโลนีสีดำบน tellurite ภาพ B เชื้อ *Enterococcus casseliflavus* ให้ผลต่อการทดสอบ พบโคโลนีสีเทาบน tellurite หรือสายพันธุ์อื่นส่วนใหญ่ไม่สามารถขึ้นบน tellurite ได้



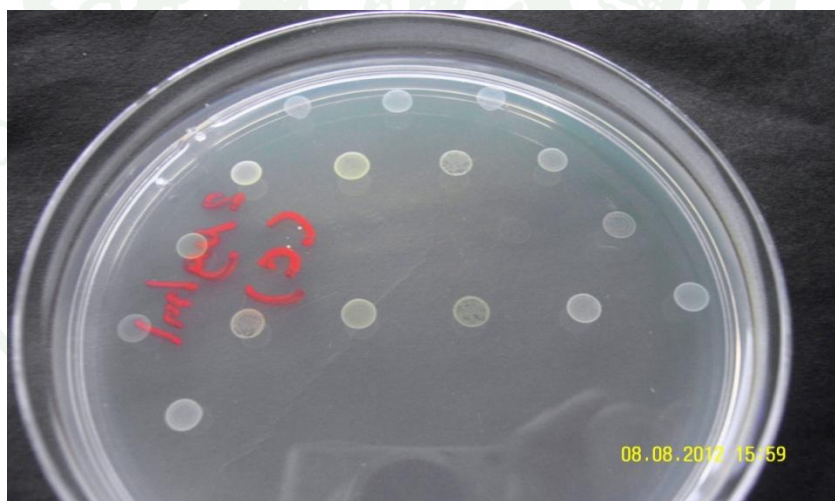
ภาพผนวกที่ 14 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย disc diffusion technique โดยวิธี Kirby-Bauer ของเชื้อ VRE และ VIRE ที่แยกได้จากอุจจาระสุกร



ภาพผนวกที่ 15 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) โดย double disc diffusion technique ของเชื้อ VRE และ VIRE ที่แยกได้จากอุจจาระสุกร



ภาพผนวกที่ 16 เครื่อง microplanter ใช้ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดยวิธี agar dilution technique



ภาพผนวกที่ 17 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) โดย agar dilution technique ของเชื้อ VRE และ VIRE ที่แยกได้จากอุจจาระสุกร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายจักรพันธ์ พิมาน
เกิดวันที่	21 ธันวาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการสัตวแพทย์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลวิชาการ	-
ทุนที่ได้รับ	ได้รับทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2554)