บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.เชื้อ *Enterococcus* spp.

ก.ประวัติ

จีนัส เอ็นเตอร์โรค็อกคัสเดิมจัดอยู่ในกลุ่มสเตรปโตค็อกคัสในกลุ่ม Lancefied group D ใน ปี ค.ศ 1984 Schleifer และ Klipper –Balz [1] ได้ทำการแยกเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัส ออกจากสเตรปโตค็อกคัส โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมในการจำแนก อันได้แก่ DNA-DNA hybridization , DNA- rRNA hybridization และ 16S rRNA sequencing ตั้งแต่ปี 1984 ได้พบ17 สปีชีส์ของเชื้อที่จัดอยู่ในจีนัส เอ็นเตอร์โรค็อกคัส[40] ดังตารางที่ 1

ข. ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม เป็น pathogenic cocci เป็นสาเหตุของการติดเชื้อจากโรงพยาบาล[3,6-10] อาจพบลักษณะเรียวเป็นรูปไข่ ติดสีแกรมบวก เรียงตัวต่อกันเป็นสาย(chain) อาจพบสายสั้น ๆหรืออยู่เป็นคู่ เป็น facultative bacteria เจริญเติบโตยาก (fastidious organism) จะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดร้อยละ 5-10 เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37^0 ซ และยังโตได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45^0 ซ , ปฏิกริยา catalase ให้ผลลบ

ค. แหล่งที่พบของเชื้อ

พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในนม ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากสัตว์ ในอาหาร น้ำ และฝุ่นละออง เป็นแบคทีเรียที่พบในลำไส้ของคนและสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีก[41] รวมถึงแมลง และยังพบปนเปื้อนในเครื่องมือ และอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใช้ในโรงพยาบาล[42]

ง. การพิสูจน์เชื้อ

ในการพิสูจน์เชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสสามารถจำแนกลักษณะได้ดังนี้

1.อาศัยลักษณะโดยดูลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดง การสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ เกิดขึ้นได้ทั้ง 3 แบบ คือ 1) β -hemolysis, คือการสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์เห็นเป็นวงใสเกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อเกิดจากการสร้างเอ็นไซม์ hemolysin 2)α-hemolysis มีการสลายเม็ดเลือดแดงเพียงบางส่วน (partial หรือ incomplete hemolysin) อาหาร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลี้ยงเชื้อที่อยู่รอบ ๆ โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนน้ำตาลเนื่องจากฮีโมโกลบินสลายให้สาร biliverdin และ 3) γ- hemolysis ไม่มีการสลายเม็ดเลือดแดงของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2.ใช้น้ำเหลืองวิทยา (serology) จำแนกเป็น serogroup ตามวิธีของ Lancefield[21] โดยอาศัยความแตกต่างของ C- carbohydrate แบ่งได้เป็น 20 serogroup และ enterococcus จัดอยู่ใน serogroup D มีทั้ง α และ γ hemolysis สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ bile esculin hydrolysis และแยก group D ออกเป็น enterococcus และ non - enterococcus โดยใช้ 6.5 % NaCl เนื่องจากเชื้อ Enterococcus สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นสูงถึง 6.5 % ในขณะที่ non -enterococcus ไม่สามารถเติบโตได้ และเชื้อยังให้ผลบวกในปฏิกริยา L- pyrrolidonyl-nephthylamide PYR reaction ซึ่งเชื้อจะสร้าง aminopeptidase เพื่อสลายสาร (PYR) ซึ่งผลที่ได้จะทำให้เกิดสีแดง

3. ปฏิกริยาชีวเคมีในการจำแนกสปีชีส์ต่าง ๆของเชื้อ โดยแบ่งได้ 4 กลุ่ม อาศัยคุณสมบัติการ utilization ของน้ำตาล ดังตารางที่ 2

4. อาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular techniques) ปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวนิยมใช้ในการจำแนกเชื้อที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์ เช่น *E. faecium* และ *E. faecalis* ซึ่งเป็นการศึกษาทางเคมีและฟิสิกส์ของชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ (biological macromolecule) เช่น protein , lipopolysaccharide และ nucleic acid โดยเทคนิค polymerase chain reaction [43-44] RFLP [45], hybridization [46] และ sequencing[47]

จ.พยาธิสภาพการก่อโรค

เชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสก่อโรคที่พบบ่อย คือ *E. faecium* และ *E. faecalis* แหล่งสำคัญของเชื้อมาจากลำไส้ เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) ระบบขับถ่ายปัสสาวะและเยื่อบุผิวหัวใจอักเสบ (endocarditis) โดยเชื้อจะเข้าไปอาศัยอยู่บนตำแหน่งเยื่อบุผิวของลำไส้ (intestinal epithelial cell) หรือเยื่อบุผิวด้านนอก จากนั้นเชื้อที่อยู่รอบ ๆเยื่อบุผิวจะถูกกลืนกิน (phagocyte) เข้าไปใน mesenteric lymph nodes มีการเพิ่มจำนวน proliferation และเกิด hematogenesis กระจายไปทั่วทุกส่วนของร่างกาย จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสมีส่วนเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียในกลุ่ม anaerobic intestinal organism โดยเฉพาะการกระจายตัวของเชื้อ *E. faecalis* ภายใต้การได้รับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม broad spectrum พบว่าในเยื่อบุลำไส้ยังคงสภาพปกติภายใต้การดูด้วย histological กรณีก่อโรคเยื่อบุผิวหัวใจอักเสบ

นั้นเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสจะยึดติดกับเนื้อเยื่อ endocardial หรือเซลล์อื่นที่ก่อให้เกิด endocarditis

ตารางที่ 1 Proposal of species to be included in the genus *Enterococcus*

Species	Date
E.faecalis	1984
E.faecium	1984
E.avium	1984
E.casseliflavus	1984
E.durans	1984
E.gallinarum	1984
E.malodoratus	1984
E.hirae	1985
E.mundtii	1986
E.raffinosus	1989
E.solitarius	1989
E.pseudoavium	1989
E.cecorum	1989
E.columbae	1990
E.saccharolyticus	1990
E.dispar	1991
E.sulfureus	1991
E.seriolicida	1991
E.flavescens	1992

จาก : Murray *et al.*, Manual of clinical microbiology 6th edition, หน้า309

ฉ. ปัจจัยที่ก่อโรค(virulence factor) [48]

ประกอบด้วย cytosin ,aggregation substance , pheromones, lipoteichoic acid , protease, hyaluronidase และ AS-48 เป็นส่วนประกอบที่ถูกสร้างจากตัวแบคทีเรีย และก่อให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ทดลอง ตารางที่ 3 ส่วน aggregation substance จะง่ายในการจับกับเนื้อเยื่อของเซลล์(host tissue) ส่วน cytolysin ทำลายเนื้อเยื่อและทำให้เกิดการตายสูงถ้าทำงานร่วมกับ aggregation substance ในการติดเชื้อของลิ้นหัวใจอักเสบ pheromone และ lipoteicholic acid เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

ช. อาการทางทางคลีนิค (clinical significance)

-ภาวะโลหิตเป็นพิษ

เกิดขึ้นเป็นอันดับสามของการติดเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสจากโรงพยาบาล ภาวะโลหิตเป็นพิษเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีปัญหาในการรักษา เกิดในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง immonocompromised ใช้ระยะเวลาในการรักษา ควบคู่กับการใช้ยาปฏิชีวนะ เพิ่มอัตราการตายสูง สามารถพบเชื้อจุลชีพอื่น ๆอีกหลายชนิดในรายที่ติดเชื้อเรื้อรัง จากการศึกษาของ Platt และคณะ ในปี 1982 [5] พบว่าแหล่งติดเชื้อที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ มาจากการติดเชื้อในระบบขับถ่ายปัสสาวะ ตามด้วยการติดเชื้อทางบาดแผล

-ภาวะลิ้นหัวใจอักเสบ

เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม โดยเฉพาะการติดเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัส พบประมาณร้อยละ 5-10 ของการติดเชื้อทั้งหมด *E. faecalis* เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคเกิดภาวะการติดเชื้อดังกล่าวและยังพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถก่อโรคได้ เช่นกลุ่ม Viridans streptococci, Streptococcus bovis ผลจากการติดเชื้อพบอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 20-30

-การติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจ

ในระบบทางเดินหายใจพบได้น้อย เกิดร่วมกับการติดเชื้อที่ระบบประสาท(menigitis)

-การติดเชื้อที่ระบบขับถ่ายปัสสาวะ

เกิดจากการที่ติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะและไตที่มีความผิดปกติของรูปร่างในระบบขับถ่ายปัสสาวะ เกิดภายหลังจากภาวะระบบหายใจล้มเหลวและมีจุดเลือดออกในกระเพาะอาหารเป็น

ส่วนใหญ่ร้อยละ 16 ของการติดเชื้อมาจากโรงพยาบาล Patt และคณะ ในปี 1982 ได้รายงานถึงอัตราการตายคิดเป็น 14 เปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อทั้งหมด

-การติดเชื้อทางบาดแผล

เกิดจากการบาดแผลที่ผ่าตัด และการติดเชื้อที่สายสะดือของเด็กทารกแรกเกิด คิดเป็นร้อยละ 12

ซ. วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

จากปัญหาสำคัญที่มีการดื้อยาของเชื้อ Enterococcus ที่มีแพร่หลายทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นภายใต้การได้รับยาต้านจุลชีพ ทั้งในคนและในสัตว์ จึงได้มีการศึกษาการทดสอบความไวของเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินโดยวิธีแตกต่างกันดังนี้

Disk diffussion test [49] เป็นวิธีที่ทดสอบความไวของเชื้อ ที่ราคาถูก ทดสอบได้ง่าย นิยมใช้ในประจำวันเพราะความแรงยาที่ใช้ในการทดสอบ สามารถใช้เพียงความเข้มข้นเดียว อีกทั้งในกรณีที่ต้องการผลเร่งด่วนได้ เช่นสามารถทดสอบกับสิ่งตรวจจากคนไข้โดยตรง จาก ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง แต่ก็อาจมีการแปลผลผิดพลาดเนื่องจากขนาดบริเวณใสที่เกิดจากยาต้านจุลชีพไม่แปรผกผันกับระดับ MIC (Minimal Inhibition Concentration) ได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถแปลผลความไวในเชิงปริมาณได้ และแปรผลได้ในเชิงคุณภาพเท่านั้น

Agar dilution test [50-51] เป็นวิธีทดสอบเชื้อหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน อีกทั้งเชื่อได้ว่าเชื้อที่ใช้ทดสอบมีเชื้ออื่นปนเปื้อนหรือไม่ แต่การทดสอบวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะจะต้องเจือจางยาแต่ละตัวซึ่งจะเสียเวลามาก ทั้งยังเปลื้องค่าใช้จ่าย จึงไม่นิยมใช้ในงานประจำ

Epsilometer test (E-test) [52-55] เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาและใช้กันอย่างแพร่หลายวงการแพทย์เพื่อใช้ในการหาค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ที่เจริญเติบโตเร็ว และ fastidious organism ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นกระดาษที่มีความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพเพิ่มขึ้นเป็นอันดับตามที่กำหนดโดยดูตัวเลขความเข้มข้นที่ inhibition zone ตัดกับแผ่น E-test จึงเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ให้ผลละเอียดและแม่นยำ มีการทดลองเปรียบเทียบวิธี E –test กับวิธีอื่น ๆพบว่าสามารถอ่านค่า MIC และบอกลักษณะทาง phenotype ได้

ตารางที่ 2 Identification of *Enterococcus* species

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

"Abbreviations and symbols : MAN, mannitol; SBL, sorbitol; SOR, sorbose; ARG, arginine; ARA, arabinose;RAF, raffinose; TEL, 0.4% tellurite; MOT, motility; PIG, pigmented; Suc, sucrose; PYU, pyruvate; RIB,ribose; +, >90% positive; -, <10% positive; -, Or +, , occasional exception (<3% of strains show aberrant reactions); ?, note tested, so results are unknown.

Excerpted from Facklam R. and Sahm D. (1995)

จาก Murray *et al.*, Manual of clinical microbiology 6th edition หน้า 311

ตารางที่ 3 Difinite and potenttial virulence factors for *Enterococci*

Factor	species in which found to date	observed activities and model system used
Cytosin	*E. faecalis*, *E. faecium* 228	Lytic towards gram-positive bacteria and Selected eukaryotic cell; decrease LD_{50} And time to death in murine peritoneal Infection; destruction of retinal tissue in rabbit
Aggregation Substance	*E . faecalis*, *E. faecium* 228	Facilitates binding of donor to recipient in pheromone mating response; Augmented adherence to cultured renal Tubular cells through Arg-Gly-Asp motifs
Pheromones	*E. faecalis*	chemoattractant for neutrophils in vitro
Lipoteichoic Acid	all *enterococci*	stimulating of cytokine production in Culture human monocytes; binding ligase for aggregation subatance in pheromone mating response
Protease (galatinase)	*E. faecalis*	Zinc- endopeptidase
Hyaluronidase	*E. faecalis*	mocopolysaccharidase
AS-48	*E. faecalis*	Bacteriocin with activity againt bacteria

ช. คุณสมบัติและโครงสร้างของยา Vancomycin [56-57]

Vancomycin เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่ม glycopeptide มีส่วนประกอบมาจาก *Actinomycetes* ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะ *Staphylococus aureus* และ *Enterococcus spp.* นอกจากนี้ยังมียาต้านจุลชีพในกลุ่มนี้อีก 2 ชนิด คือ teicoplanin และ avopacin ส่วน avopacin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

Vancomycin เป็นยาตัวแรกที่นิยมใช้แพร่หลายไปทั่วโลกจนกระทั่งมีการพัฒนา teicoplanin ขึ้นมาใช้ในปี ค.ศ.1980 ในระหว่างนั้นมีการพัฒนายาในกลุ่ม glycopeptide ชนิดอื่น เช่น avopacin เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

Vancomycin เป็น tricyclic glycopeptide ที่แยกได้จากผลการหมักของเชื้อ *Amycoolatopsis orientalis* ประกอบด้วย 2 chlorinated β – hydroxytyrosine, 3 subtituted phenylglycin system, *N* – methyll eucine และ aspartic acid เป็น amine ที่รวมตัวเป็นสาย heptapeptide ดัง รูปที่ 1 การออกฤทธิ์ของยาต่อเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก แสดงดัง ตารางที่ 4 vancomycin ถูกดูดซึมได้ไม่ดีในระบบย่อยอาหาร gastrointestinal tract และยังพบความเข้มข้นของยาในปริมาณสูงในอุจจาระที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง การให้ยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular) นั้น ทำให้เกิดความเจ็บปวดและมีก้อนเลือด การให้ยาโดยการฉีดเข้ากระแสเลือด (Intravenous) ทำให้การกระจายตัวยาซึมผ่านส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ดี แต่ยาไม่สามารถซึมผ่าน cerebraspinal fluild (CSF) ได้ ในทางคลีนิค vancomycin ใช้แทนยาในกลุ่ม β-lactam เช่น pennicillin และ Cephalosporin เพราะยาทั้ง 2 ชนิดทำให้เกิด hypersensitivity ใช้รักษาเชื้อ MRSA และยังใช้ป้องกัน (prophytaxis) ในรายที่เกิด endocarditis รวมกับยาในกลุ่ม aminoglycoside

Teicoplanin มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ Vancomycin ได้จากผลการหมักของ *Actinoplanes teichomyceticus* มีส่วนประกอบของ aglycone backbone ที่เชื่อมต่อกันเป็นสาย heptapeptide ด้วย aromatic amino acids และถูกแทนที่ด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ D – mannose และ *N* – acetylglucosamine มีส่วนประกอบ 5 อย่าง เช่น A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 และ A2-5 ที่มีความแตกต่างจากยาตัวอื่น และแทนที่ด้วย acylaliphatic side chain

ตรงตำแหน่งที่มีการเพิ่มน้ำตาล รูปที่ 2 การออกฤทธิ์ของยาต่อเชื้อแสดงได้ในตารางที่ 5 teicoplanin ถูกดูดซึมได้น้อยในระบบย่อยอาหาร (gastrointestinal tract) แต่ไม่เหมือนกับ vancomycin เลยทีเดียว สามารถให้ยาได้อย่างปลอดภัย โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือฉีดอย่างเร็วเข้า bolus ที่มีการติดเชื้อ ในทางคลีนิคเป็นยาที่ใช้แทน vancomycin ให้ผลดีต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และใช้ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำ และมีผลกระทบต่อ neptrotoxicity และ ototoxicity น้อย

Avopacin เป็น glycopeptide ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับ vancomycin ต่างกันแค่ห่วงด้านข้าง 4 ข้างเท่านั้น ดังรูปที่ 1 นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในยุโรป (EU) เริ่มใช้ในปี 1974 ในสุกร ใช้ 20 mg/kg และ 40 mg/kg สำหรับกลุ่มอายุของสัตว์ ในสัตว์ปีกใช้ ไม่เกิน 10 mg/kg แต่เมื่อใช้ในระยะเวลานานทำให้เชื้อแบคทีเรียที่เป็น normal flora ในร่างกายของสัตว์เกิดการดื้อยา และในการประชุมระดับชาติไม่ยอมรับให้มีการใช้ avopacin เพราะก่อให้เกิด carcinogenic effect [58] และมีน้อยประเทศที่มีข้อมูลที่ถูกต้องในการใช้ยาในสัตว์และคน

ฌ. กลไกการทำงานของยาในกลุ่ม Vancomycin[59]

ยาในกลุ่ม glycopeptide มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียแกรมบวก โดยส่วนประกอบของยาจะจับกับบริเวณส่วนปลายของกรดอะมิโนแอซิด 2 ตัว คือ D–alanyl–D–alanine ที่จับกันเป็นสาย pentapeptide ซึ่งถูกสร้างจากด้านในเซลล์เมมเบรน (inner membrane) ต่อมาจะถูกยื่นออกมาด้านนอกเซลล์เมมเบรน (outer membrane) ซึ่งบริเวณที่ยาเข้าไปจับจะเกี่ยวข้องในขบวนการสร้าง peptidoglycan polymer เพื่อจะสร้างเป็นส่วนของผนังเซลล์ต่อไป เมื่อเกิดปฏิกริยาดังกล่าว ทำให้ขบวนการ transgosylation และ transpeptidation ในระหว่างการสังเคราะห์ผนังเซลล์ถูกขัดขวาง ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก บริเวณส่วนปลาย D – alanyl – D – alanine จะถูกเปลี่ยนเป็น D – alanyl – D – lactate ซึ่งยาในกลุ่ม glycopeptide ไม่สามารถจับได้อีกต่อไป ดังรูปที่ 3 ผลตามมาคือ แบคทีเรียกลุ่มนั้นจะดื้อยาต่อไป ปริมาณของยาต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ของ vancomycin ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5 – 4.0 ug/ml สามารถยับยั้เชื้อ *E faecalis* พวกที่ก่อให้เกิดโรคในคน ส่วน teicoplamin ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.12 – 0.5 ug/ml

ญ. การดื้อยา Vancomycin

ขบวนการที่ก่อให้เกิดการดื้อยาเกิดขึ้นได้ 2 แบบ

Inducible resistance การดื้อยาภายใต้การถูกกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำด้วยยาปฏิชีวนะ พบได้ในเชื้อที่มีการดื้อยาสูง (MIC) $\geq$ 64 ug/ml

Constitutive resistance การดื้อยาไม่ได้ถูกกระตุ้นเกิดหรือถูกเหนี่ยวนำเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติหรือการได้รับยาในสิ่งแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซม มีคุณสมบัติดื้อต่อยาหลายชนิด พบได้ในเชื้อที่มีการดื้อยาต่ำ

ในการศึกษาขบวนการที่ก่อให้เกิดการดื้อยา มี 4 ชนิด ของการเกิดปฏิกริยาในการทำงานของยา

1. เอ็นไซม์ที่จำเพาะไม่ทำงาน หรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของยาก่อนหรือหลังที่ยาจะเข้าสู่เซลล์ เช่น β– lactamase, Aminoglycoside – modifying enzyme, Chloramphenicol acetyltransferase

2. Cell envelop ของแบคทีเรียอาจมีการเปลี่ยนแปลง มีผลให้ยาไม่สามารถซึมผ่านได้

3. ยาอาจจะทำงานด้านนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

4. เป้าหมายหลักที่ยาจะซึมผ่านมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น ทำให้การซึมผ่านของยามีประสิทธิภาพลดลง เช่น Alteration ต่อ Pennicillin binding Proteins (PBP_S) เกี่ยวข้องในการดื้อยาของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น Enterococcus ,Streptococcus

การจำแนก Phenotype ของ VRE

เชื้อ *Enterococcus* ที่ดื้อต่อยา vancomycin สามารถบ่งชี้ลักษณะที่แสดงออกทาง phenotype ได้ 2 แบบ

เชื้อที่ดื้อยาในระดับต่ำ (low – level) MIC: 8 – 32 ug/ml

เชื้อที่ดื้อยาในระดับสูง (high – level) MIC: $\geq$ 64 ug/ml

และยังสามารถแสดงออกทาง phenotype ได้หลายแบบด้วยกัน phenotype หลักที่สำคัญมีดังนี้

1) low – level เหนี่ยวนำให้เกิดค่าความดื้อต่ำดื้อต่อยา teicoplanin ในเชื้อ *Staphylococci coagulase* ลบ แต่ยังคงไวต่อยา vancomycin

2) inducible – low – level ต่อยา vancomycin ในเชื้อ Enterococcus แต่ยังคงไวรับต่อ teicoplanin

3) inducible high – level transferable ต่อยา vancomycin และ teicoplanin พบในเชื้อ Enterococcus

High – level transferable ต่อ vancomycin เรียกว่า Van A phenotype และ inducible low – level ต่อ vancomycin เรียกว่า Van B phenotype โดยเฉพาะ Van A นั้นเกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง โดยอาศัย plasmid และยัง encode อยู่บนตำแหน่ง transposon ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโคมโมโซม[60] ขณะที่ Van B phenotype เกิดขึ้นได้บ่อยใน chromosome และเกิดขึ้นในระหว่างการถ่ายทอดระหว่าง chromosome ไปยัง chromosome บน transposon[61] Van A phenotype ถูกศึกษามากที่สุด ทำให้ทราบขบวนการของการดื้อยาต่อ glycopeptide Van A สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาต่อ high level ของ vancomycin และ teicoplanin โดยที่ vancomycin จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน 2 ชนิด ใน enterococcal membrane fraction คือ 1) 39 kDa protein ซึ่งจะถูกจำแนกเป็น Van A ligase ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ 2) D,D – carboxypeptidase ซึ่งไม่จำเป็นในขบวนการดื้อยา

High level resistance ต่อ glycopeptide สามารถถ่ายทอดไปยังเชื้อ enterococcus ที่ไวรับต่อยา vancomycin โดยการ conjugation ซึ่งเป็นแบบ self transferable plasmid ยีนที่จำเป็นและเกี่ยวข้องในการแสดงออกของ Van A phenotype ถูก carries โดย Tn*1546* ดังรูปที่ 4 ปัจจุบันคุณสมบัติที่แสดงออกทาง phenotype ของเชื้อ *Enterococci* สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด ดังตารางที่ 5 และต่อมาได้พบอีก 3 ลักษณะ อันได้แก่ Van D[62] Van E[63] และ Van G[64] ขณะที่ Van A และ Van B พบมากใน *E. faecium* และ *E. faecalis* ในส่วน Van C จะพบในเชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* Van A ค่า MIC ของ vancomycin อยู่ระหว่าง 64 ug/ml ถึง >1,024 ug/ml ส่วน teicoplanin จะมีค่าต่ำกว่าประมาณ 1 – 2 เท่าตัว

Genetic mutation ในการเกิดการดื้อยาของ VRE ที่สามารถส่งผ่านได้ (transferable resistance) ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ

พลาสมิด (plasmid) เป็น extrachromosomal DNA ที่มีรูปร่างเป็นสายคู่หรือเป็นวงกลม (circular) เป็น double – strain DNA พบอยู่ใน cytoplasm สามารถเพิ่มจำนวนด้วย

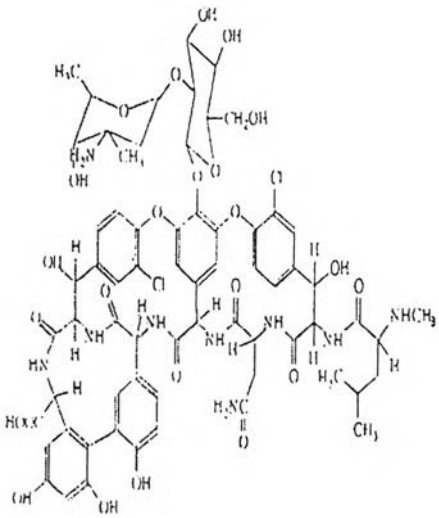
ตัวเอง พลาสมิด ประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา (antibiotic resistant gene) การดื้อยาสามารถถ่ายทอดโดยอาศัยพลาสมิด มี 3 แบบดังนี้

Conjugation เกิดขึ้นได้บ่อยในเชื้อที่มีความสำคัญทางคลีนิค conjugation plasmid สามารถเคลื่อนย้ายตัวเองไปยังแบคทีเรียตัวอื่นพบได้บ่อยในแบคทีเรียแกรมลบ พวก Enteric bacilli ในบางครั้ง conjugation plasmid สามารถขนส่งยีนที่ดื้อยาและยีนที่ส่งผ่าน

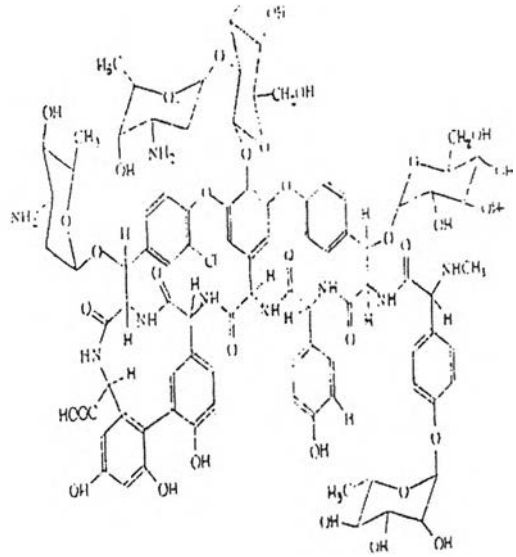
Transduction เกิดขึ้นได้น้อยในธรรมชาติ ประกอบกับ phage virus ที่อาศัยอยู่ในเซลล์

Transformation เกิดขึ้นภายใต้การทดลองภายนอกร่างกายจากเชื้อ enterococcus ไปยัง *Streptococcus sanguis, Lactococcus lactis, Streptococcus pyogenes* และ *Listeria monocytogenes*

ทรานสโปซอน (Transposon) เป็น jumping gene ที่อยู่เป็นชิ้นกลม ๆ (circular segment) เป็น double strand DNA มีความยาวขนาด 4 – 25 kb สามารถเคลื่อนได้ encode ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายชนิด transposon ที่ถูกศึกษามากที่สุดในเชื้อ *Enterococcus* ที่ดื้อต่อ vancomycin คือ Tn*1546*



Vancomycin



Avoparcin

<u>รูปที่ 1</u> โครงสร้างของยาในกลุ่ม glycopeptide

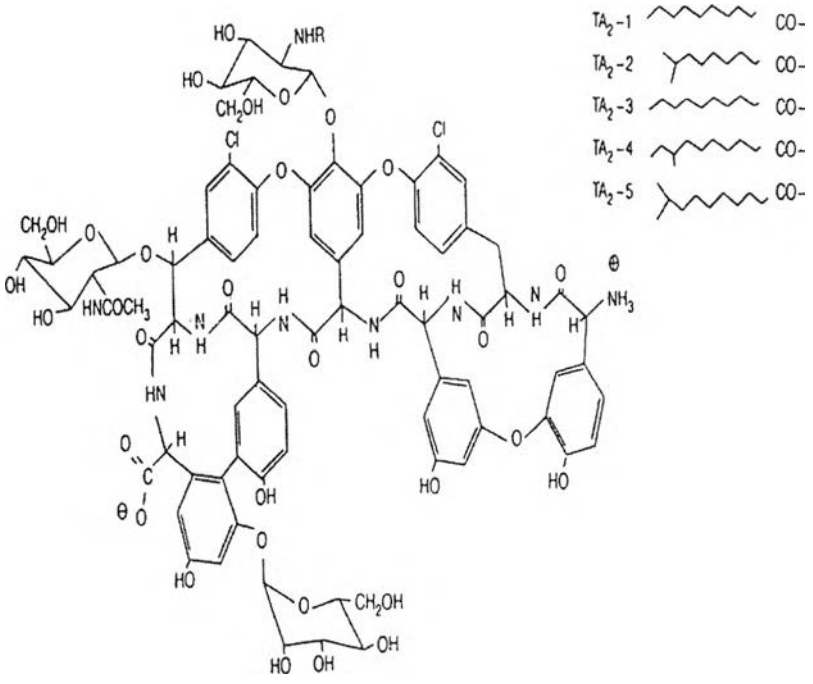
ตารางที่ 4 Comparative in Vitro activity of glycopeptides againt some common pathogenic bacteria: MIC(mg/l)

Species	Vancomycin	Teicoplanin
Staph.aurues(Methicillin-sensitive)	1-2	0.12-1
Staph.aurues(Methicillin-resistant)	1-2	0.5-1
Coagulase-negative Staphylococci	1-4	0.25-32
Haemolytic Streptococci (Lancefield group A-C and G)	0.12-0.25	0.03-0.12
Viridans Streptococci	0.25-2	0.06-2
Str.pneumoniae	0.12-0.25	0.03-0.12
Ent.faecalis	1-4	0.12-0.5
L.monocytogenes	0.25-0.5	0.25-0.5
Coryn.diphtheriae	0.06-0.25	0.06-0.5
Coryn.jeikeium	0.5-2	0.5-1
Propionibaterium acnes	0.5-1	0.06-2
Peptostreptococccus spp.	0.12-0.5	0.12-0.25
Cl.perfringens	0.12-0.5	0.03-0.12
Cl.difficile	0.06-1	0.03-0.2
Enterobacteriaceae	R	R
Ps.aeruginosa	R	R
B.fragilis groub	R	R

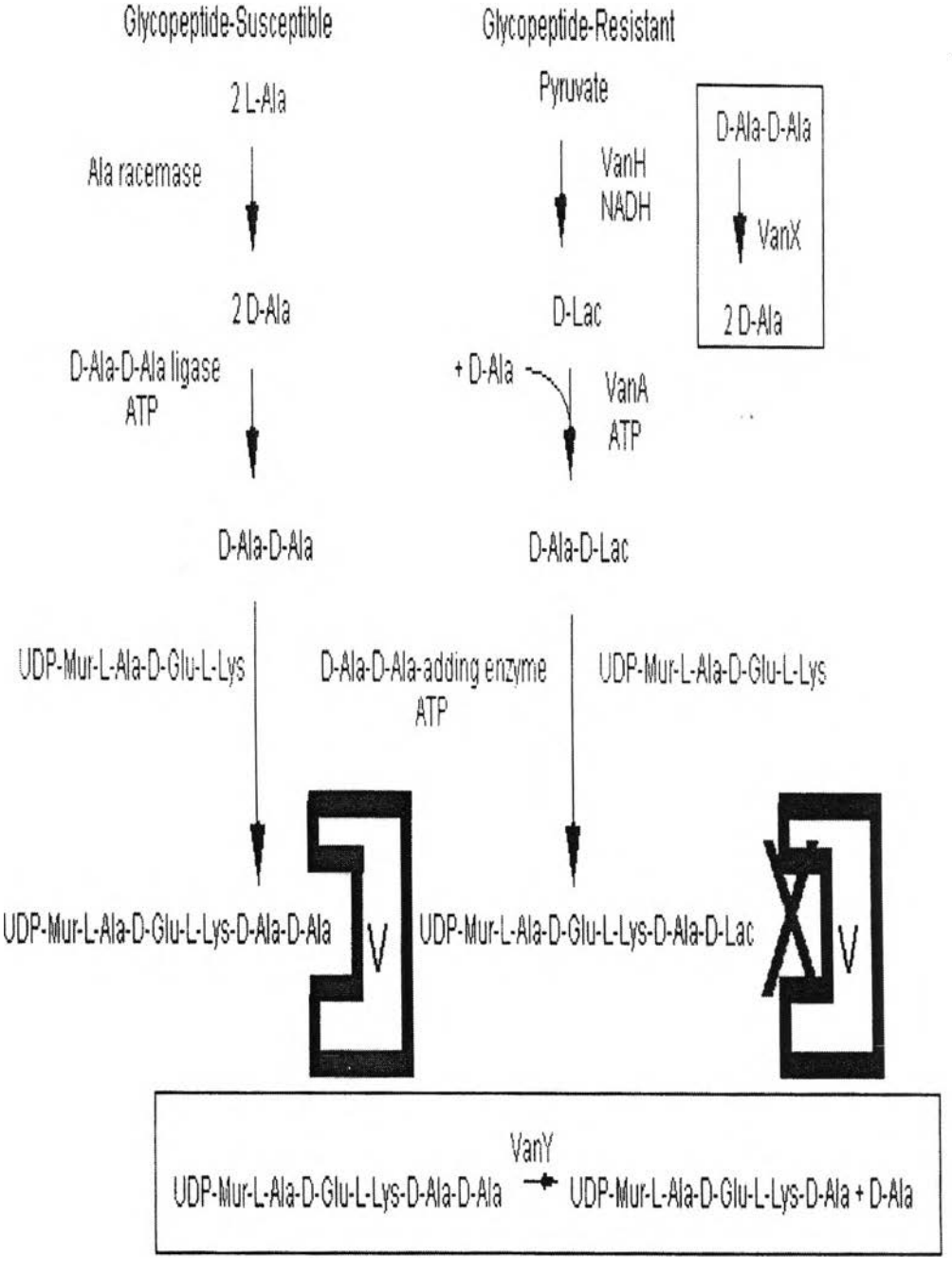
R = resistant

ตารางที่ 5. Glycopeptide resistance enterococci

Phenotype	Genotype	Vancomycin MIC (μg/mL)	Teicoplanin MIC (μg/mL)	Expression	Transfer	Bacterial species
VanA	*vanA*	64-1000	16-512	Inducible	+	*E. faecium* *E. faecalis* *E. avium* *E. gallinarum* *E. durans* *E. mundtii* *E. casseliflavus* *E. raffinosus* *E. hirae*
VanB	*vanB*	4-1000	0.25-2	Inducible	+	*E. faecium* *E. faecalis* *E. gallinarum* *E. durans*
VanC	*vanC-1*	2-32	0.12-2	Constitutive Inducible	-	*E. gallinarum*
VanC	*vanC-2*	2-32	0.12-2	Constitutive	-	*E. casseliflavus*
VanC	*vanC-3*	2-32	0.12-2	Constitutive	-	*E. flavescens*
VanD	*vanD*	16-256	2-64	Constitutive	-	*E. faecium* *E. faecalis*
VanE	*vanE*	16	0.5		-	*E. faecalis*
VanF	*vanF*	800	<1		-	*Paenibacillus popilliae*
VanG	*vanG*	16	0.5		-	*E. faecalis*

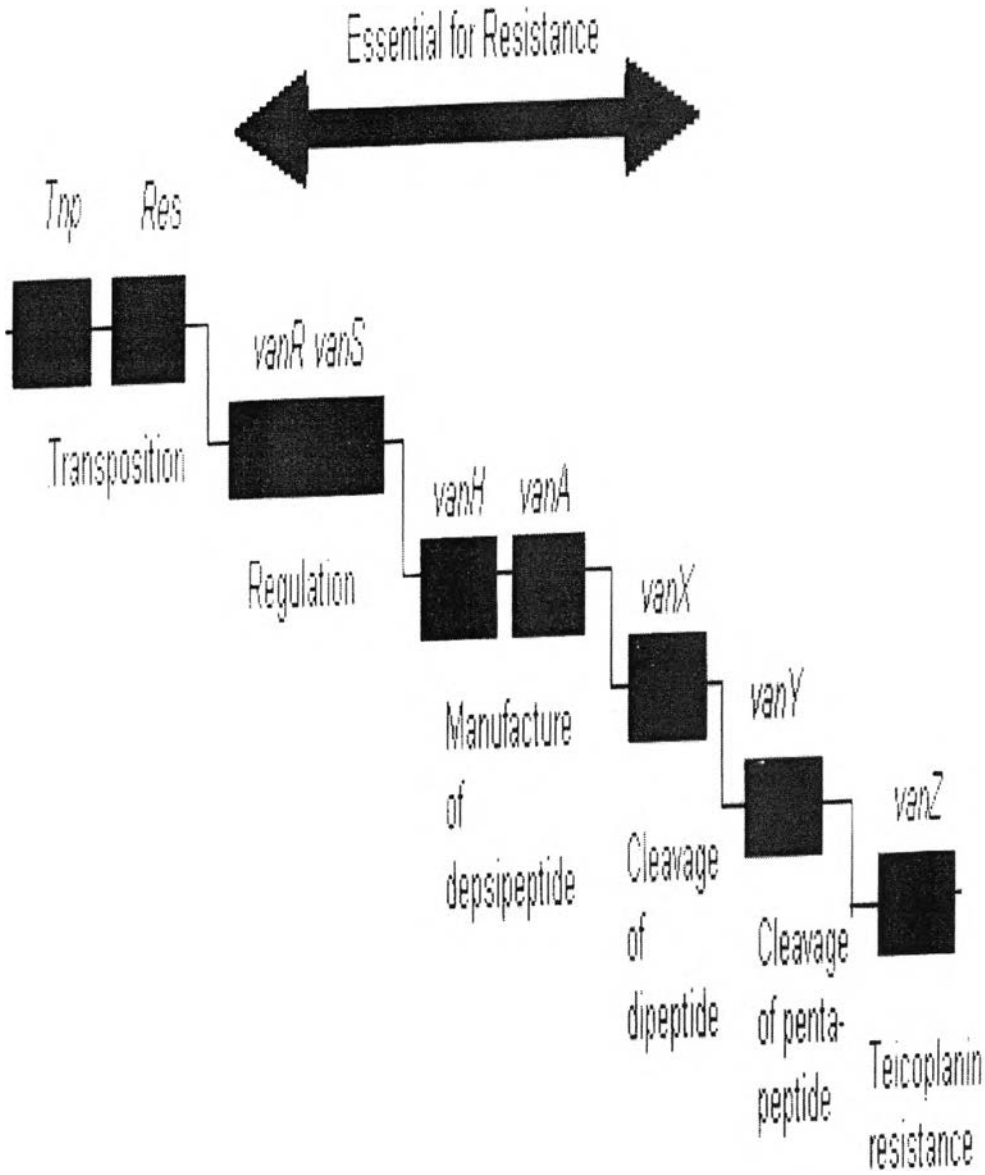


รูปที่ 2 โครงสร้างของยา Teicopanin



<u>รูปที่ 3</u> กลไกการยับยั้งและดื้อยาแวนโคมัยซินต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 คุณลักษณะของ Transposon element Tn*1546*

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของ phenotypic typing

Typing system	Proportion of Strains typeable	Reproducibilit	Discriminatory power	Ease of interpretation	Ease of Performance
Biotyping	All	Poor	Poor	Excellent	Excellent
Antimicrobial	All	Fair	Poor	Excellent	Excellent
susceptibiliry	Most	Good	Fair	Good	Fair
Serctyping	Most	Fair	Fair	Fair	Poor
Bacteriophage typing	All	Good	Good	Fair	Good
Immunoblotting	All	Excellent	Good	Excellent	Good
MLEE					

ฎ. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ VRE

พบว่าเชื้อ *Enterococcus* เป็นสาเหตุการติดเชื้อในโรงพยาบาล จากการรายงานเชื้อดังกล่าวเกิดการดื้อต่อยาหลายชนิด เช่น กลุ่มเบต้า-แลคแตม[13,60] ,กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์[65 ดู] และควิโนโลน มีวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสามารถแบ่งได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ Phenotype techniques และ Genotype techniques

1. Phenotype techniques

ลักษณะของ phenotype ที่แสดงออกเกิดจากการควบคุมการแสดงออกของยีน สามารถแบ่งได้หลายวิธีดังนี้

1.1 Biotyping

เป็นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยดูลักษณะที่แสดงออกของ metabolic activity เช่น biochemical reaction, colony morphology และการต่อสภาวะแวดล้อม (conventional tolerances) เช่นความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด ความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรด-เบส และอุณหภูมิที่ต่างกัน

1.2 Antimicrobial Susceptibility Testing

เป็นวิธีที่ง่ายและเป็นที่นิยมในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา การพบรูปแบบของการดื้อยา ของเชื้อที่แยกได้จากคนไข้ และจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันเป็นตัวบ่งชี้ตัวแรกว่าเกิดการระบาดของเชื้อที่ดื้อยา ซึ่งการดื้อจะเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ (point mutation) การดื้อของเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัสต่อยาแวนโคมัยซินนั้นเกิดขึ้นและแสดงรูปแบบการดื้อยาที่สามารถอ่านได้จากการทำ MIC ของเชื้อต่อยา ที่สำคัญเชื้อที่ดื้อยาจะเกิดการถ่ายทอดยีนที่ดื้อยาทางพลาสมิด หรือ transposon จากเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน หรือต่างสายพันธุ์ เช่นการถ่ายทอดยีนระหว่างเชื้อ *S.aureus* ไปยังเชื้อ *E. faecalis*[33]

1.3 Serotyping

เป็นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยหลักการที่เชื้อในสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน สามารถแสดง antigenic determinants ที่ต่างกันบนผิวเซลล์ ซึ่งผิวของเซลล์ประกอบด้วย lipopolysaccharide . capsule , polysaccharide member protein และ extracellular organells serotyping อาศัยปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้ monoclonal antibody สามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น direct agglutination, latex agglutination , enzyme lebeling และ fluorescence labeling ข้อดีของการใช้ monoclonal antibody จะทำให้เพิ่ม reproducibility แต่วิธีนี้จะให้ discriminatory ต่ำ เมื่อใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ทำให้ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้

1.4 Bacteriophage

Phage typing ใช้ทดสอบเพื่อดูลักษณะรูปแบบของการดื้อยา หรือความไวรับต่อ standard set of phage เช่นใช้ทดสอบกับเชื้อ *S.aureus* และ S*amonella species*

ปัญหาของการทำ phage typing คือการที่ต้องการรักษา stock ของ biological active phage และ control strain ดังนั้นการทำ phage typing นิยมทำในห้องปฏิบัตbการอ้างอิง (reference laboratory) การทำการทดสอบจะต้องอาศัยเทคนิคในการทำและผู้มีประสบการณ์ วิธีการทำค่อนข้างยุ่งยาก และเชื้อบางสายพันธุ์ไม่สามารถแยกได้ด้วย standard phage

1.5 Electrophoretic protein typing and Immunobloting

เป็นการทดสอบส่วนประกอบของเซลล์ เช่น โปรตีน , glycoprotien, conjugates และ lipopolysaccharides จากส่วนของเซลล์ทั้งหมด หรือเฉพาะผิวเซลล์ที่เตรียมได้โดยวิธี sodium –deocyle sulfate-polyacrylamine gel electrophoresis และย้อมดูรูปแบบโปรตีนในเจล ถ้าโปรตีนนั้นเป็น radiolabel สามารถดู pattern ได้โดยวิธี autoradiography

Immunobloting เป็นการถ่ายทอด ที่ถูกสร้างจากเซลล์แบคทีเรียไปบนแผ่น nitrocellulose แล้วนำมาทำปฏิกริยากับแอนติบดีที่มีความจำเพาะ ต่อมาตรวจหาแอนติบอดีโดยการใช้ enzyme – labeled anti – immunoglobulins

ข้อเสียของวิธีนี้คือ รูปแบบที่ใช้ทดสอบได้มีความยุ่งยากซับซ้อนและการเปรียบเทียบรูปแบบเพื่อการจำแนกสายพันธุ์จำนวนมาก ๆ ทำได้ยาก เนื่องจากมีความแตกต่างกันของรูปแบบบางส่วนที่ยังไม่เข้าใจ ผลการทดสอบขึ้นอยู่กับปัจจัยในการทดสอบ เช่น วิธีการสกัดสาร (extraction) และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacterial growth condition) ดังนั้นวิธีนี้ไม่นิยมทำในห้องปฏิบัติการทั่วไป

1.6 MLEE (Multiocus Enzyme Electrophoresis)[67]

เป็นการจำแนกความแตกต่างของเชื้อด้วย electrophoretic moblities ด้วยกลุ่มของ metabolic enzyme โดย cell extracts ที่มี soluble material enzyme จะถูกนำมาทำ electrophoresis ใน non – denaturing starch gel ตำแหน่งของเอ็นไซม์แต่ละตัวจะถูกวิเคราะห์โดยการย้อมด้วย specific colorimetric substrate ตำแหน่งของการเคลื่อนที่ของเอ็นไซม์ที่แตกต่างกัน จะแสดงถึง electromorphs ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของประจุโปรตีน ซึ่งจะให้ alleic variations ในยีนของโครโมโซมที่ code เป็นเอ็นไซม์ และการใช้ combined electromorphs โดยใช้ electropheretic types (ETs) ที่แตกต่างกัน ทำให้เกิด multilocus genotypes ถึงแม้เอ็นไซม์บางชนิดอาจจะไม่มีในเชื้อทดสอบ แต่การจำแนกสายพันธุ์ด้วย multiple metabolic enzyme มั่นใจได้ว่าทุกเชื้อได้ถูกจำแนก

MLEE มีประสิทธิภาพมากในการจำแนก population genetics ของเชื้อแบคทีเรีย เพราะเอ็นไซม์แต่ละตัวจะแสดงออกลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนั้นความยาวของสารพันธุกรรม (genetic distance) ของเชื้อ 2 สายพันธุ์สามารถแสดงค่าออกมาได้โดยการคำนวณ

ค่าที่เป็นสัดส่วนของ enzyme locci ที่ให้ electromorphs ต่างกันนำมาเปรียบเทียบกัน และคุณลักษณะในการจำแนกสายพันธุ์ทาง phenotypic techniques แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 7 คุณสมบัติของ genotypic typing

Typing system	Proportion of Strains typeable	Reproducibilit	Discriminatory power	Ease of interpretation	Ease of Performance
Plasmid restriction	Most	Good	Good	Good	Excellent
digest	All	Good	Good	Poor	Excellent
REA	All	Excellent	Fair	Good	Good
Ribotyping	All	Excellent	Excellent	Excellent	Good
PFGE	All	Excellent	Good	Excellent	Good
PCR restriction digest	All	Good	Good	Fair	Good
Arbitrarily primed PCR	All	Excellent	Excellent	Excellent	Fair
Nucleotide sequence Analysis					

2. Genotyping techniques

เป็นการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ DNA หรือสายพันธุกรรมมีความสำคัญทางระบาดวิทยาระหว่างแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ประกอบด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.1 Plasmid analysis

พลาสมิดเป็น mobile extrachromosomal elements พลาสมิดสามารถสูญเสียไปได้และรับมาภายหลังได้ การศึกษาทางระบาดวิทยาจะดูลักษณะขนาดและจำนวนของ plasmid profiles ที่แตกต่างกันและลำดับการเกิดก่อนหลัง มีพลาสมิดหลายชนิดที่นำยีนดื้อยาโดยมีอยู่ใน mobile genetic element (transposon) ซึ่งเกิดได้ง่ายและไปเอง ดังนั้น องค์ประกอบของ DNA ในพลาสมิดจึงเปลี่ยนแปลงได้ง่าย

ในบางสภาวะจุลชีพที่แสดงการดื้อยาต้านจุลชีพ อาจมีสาเหตุมาจากการถ่ายทอดพลาสมิดอย่างรวดเร็วระหว่างสายพันธุ์หรือต่างสปีชีส์กัน พลาสมิดอาจเกี่ยวข้องกับการแพร่ระบาดของ virulence factors เช่น pathogenic toxins, adhesins และ invasins ที่พบในเชื้อ Enterotoxingenic และ enteroinvasive *E. coli* isolate ที่แยกได้จากคนไข้บางเชื้อไม่มีพลาสมิด บางเชื้อมี 1 – 2 พลาสมิด การวิเคราะห์พลาสมิดเพื่อแปลผลจำเป็นต้องได้ข้อมูลของเวลาและสถานที่ที่ทำการวิเคราะห์ เพื่อดูลำดับการเกิดก่อนหลังและสถานที่ที่ได้รับถ่ายทอดมา

เนื่องจากพลาสมิดมีหลายรูปแบบ คือ supercoil (closed circle), nicked (open circle) และ linear การวิเคราะห์ plasmid profiles จะหาจำนวนพลาสมิดแล้วทำการสกัดพลาสมิดและย่อยด้วย restriction enzymes แล้วทำ electrophoresis เพื่อดูขนาด (size)

2.2 Restriction Endonuclease Analysis (REA) of chromosome DNA

เป็นการใช้ Restriction endonuclease enzymes ตัด DNA ที่ตำแหน่งเฉพาะจำนวนขนาด และ restriction fragments เกิดจาก recognition sequence ของ enzymes และส่วนประกอบของ DNA โดย enzyme ที่มีการจดจำการตัดที่ 6 bp จะตัดสาย DNA ได้บ่อยมากกว่าและได้ restriction enzyme fragments ชิ้นเล็กกว่า enzyme ที่จดจำการตัดที่ 8bp และที่มี recognition sequence ที่ตำแหน่ง guanine (G) และ cytosine (C) จะตัดเส้น DNA ที่เป็น low G + C content ได้บ่อยน้อยกว่า และได้ fragments ที่ใหญ่กว่า enzyme ที่ตัดเส้น DNA ที่เป็น high G + C content หรือ enzyme และที่มี recognition sequence ที่ตำแหน่ง thymine (T) และ adenine (A)

การตัด DNA ด้วย restriction enzyme แล้วนำมา run ใน agarose gel electrophoresis สังเกต patterns โดยการย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจดูภายใต้แสง UV เชื้อต่างสายพันธุ์กันในในสปีชีส์เดียวกันจะให้ REA profiles ต่างกันเนื่องจาก มี DNA sequence ที่เปลี่ยนแปลงไป วิธี REA ใช้ศึกษาสายพันธุ์ของ *C. difficile* ได้ดี

ข้อเสียของวิธี REA คือ แปลผลยาก โดยในการเปรียบเทียบ bands จาก profiles ที่ยุ่งยากซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยจำนวน band เป็นร้อย อาจเกิด unresolved หรือ overlapping ได้ patterns ที่ได้อาจมีปนเปื้อน จากการเตรียม genomic DNA ซึ่งอาจมาจากพลาสมิดด้วย

แต่โดยทั่วไปวิธี REA เป็นวิธีที่นิยมทำมากกว่าวิธี genotypic typing อื่น ๆ

2.3 Southern blot analysis of $RFLP_s$ (Ribotping)[68]

จากการที่วิธี REA ให้ profiles ที่ยุ่งยากซับซ้อน เพราะ ethidium bromide ย้อมติดทุก fragment ดังนั้น จึงมีการพัฒนาตรวจหาเฉพาะ particular restriction fragments ด้วย specific chromosomal loci โดยการเตรียม bacterial DNA แล้วตัดด้วย restriction enzyme (RE) นำไป run ใน agarose gel electrophoresis และ blot fragments ลงในแผ่น nitrocellulose หรือ nylone membrane fragments ที่เป็น specific squences (loci) จะตรวจหาโดยใช้ labeled piece of homologous DNA (Probe) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม probe จะจับ (hybridzes) โดยการจับคู่แบบ complementary base pair ความแตกต่างของจำนวนและขนาดของ fragment ที่ตรวจวัดได้คือ restriction fragment length polymorphyism ($RFLP_s$) ซึ่งเกิดสาเหตุ 2 ประการ คือ จำนวน loci ที่ homologous กับ probe และตำแหน่งของ restriction site ที่จัดเรียงของ loci เหล่านั้น

วิธีนี้มี reproducibility สูงมาก แต่ discriminatory power จะเกี่ยวข้องกับการเลือกใช้ probe ในการทดสอบหา *van* A ,*van* B และ *van* อื่น ๆ ในเชื้อที่เกิดการดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน

Ribotyping เกี่ยวข้องกับ ribosomal operon (s) หรือ กลุ่มยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องร่วมกัน Ribotyping มีความ stable และ reproducibility สูง เชื้อที่แยกได้จากการระบาดมักมี ribotype เหมือนกัน เชื้อบางชนิดมี ribosomal operons หลายอัน (5-7 อัน) เช่น *E.coli*, *Klebsiella*, *Haemophilus* และ *Staphylococus spp.* ปกติ ribotype pattern จะมี 10 – 15 bands จึงให้ discriminatory power ปานกลาง (ดังรูปที่ 1) ประโยชน์ของ ribotyping ต่อการศึกษาทางระบาดวิทยามีน้อย เนื่องจากจะให้ผลที่เหมือนกันจากเชื้อที่เกิดระบาดต่างภูมิภาคกัน ในขณะที่วิธี genotyping อื่น ๆ ให้ผลแตกต่าง

2.4 Necleotide Sequence Analysis[47]

เป็นการใช้ PCR – based sequence analysis ของ bacterial rDNA เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางธรรมชาติของประชากรเชื้อแบคทีเรีย primer ที่ใช้เป็น ribosomal sequences

ข้อดีของวิธีนี้ใช้แยก family, genus และ species ของที่ก่อให้เกิดโรคได้ และสามารถใช้ดูการกระจายของการเกิด point mutation ที่ต่างกันในเชื้อบางชนิดได้ เช่น M. tuberculosis ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยา Rifampin

ข้อเสียของวิธีนี้คือ เครื่องมือมีราคาแพงมากและการแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อจำเป็นต้องได้ข้อมูลของ sequence ที่มีหลาย locus และมาจาก isolates ที่มีการระบาดจำนวนมาก ๆ ใน species เดียวกัน

รายละเอียดเกี่ยวกับคุณลักษณะของวิธี Genotypic systems แสดงใน ตารางที่ 7

2.5 PCR

จากหลักการของ PCR ที่เชื้อต่างกัน โดยสายพันธุ์หรือ subtype ถ้ามี component ที่ต่างกันเพียง 1 copy หรือ DNA sequence (template) ขนาดเล็กประมาณ 0.5 – 2.0 b สามารถนำมาเพิ่มจำนวน (amplify) ได้มากมายมหาศาลในเวลาเป็นนาทีเท่านั้น โดยเทคนิคการทe chain reaction ของ DNA polymerase และเครื่อง thermocycle สามารถตรวจจับ products ที่ได้โดยการทำ electrophoresis ใน agarose หรือ polyacrylamide gel

ข้อเสียของ PCR คือ การเกิด flase positive ดังนั้นการทำจึงต้องการผู้มีประสบการณ์และพื้นที่ในการทำงานที่แยกออกจากกันระหว่างห้องเตรียมตัวอย่างและห้องทำ PCR

เทคนิค PCR มีการนำไปประยุกต์ใช้งานต่าง ๆ เช่น

2.5.1 Restriction Digestion of PCR products

เป็นวิธีที่ย่อย PCR products ด้วย restriction endonuclease และตรวจหา restriction fragments โดยดู polymorphisms ด้วยการทำ electrophoresis วิธีนี้นิยมใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น *Cryptococus neoformans*, *S. auareus* และ *Helicobactor pylori* เป็นต้น

ข้อดีของวิธีนี้คือ ให้ reproducibility สูงมาก แต่ discriminatory power จะขึ้นกับความแตกต่างของ species, loci และ restriction enzymes ที่ใช้

2.5.2 Rep – PCR (Repetitive chromosomal sequences PCR)

เป็นเทคนิค PCR ที่มี primer เป็น short extragenic repetitive sequences แล้วทำการ amplify sequences นั้น แล้วตรวจหาจำนวนและตำแหน่งของ inter repeat fragment

วิธีนี้ให้ reproducibility สูงมาก discriminatory power ปานกลาง ตัวอย่างของเชื้อที่ใช้วิธีนี้จำแนกสายพันธุ์ เช่น Citrobactor diversus

2.5.3 Arbitrary primed PCR

เป็นเทคนิค PCR ที่ random amplified polymorphic DNA ส่วนมากจะเป็น primer สั้น ๆ (ประมาณ 10 bp) ดังนั้น เชื้อที่มีความแตกต่างกันในสายพันธุ์จะมีตำแหน่งและจำนวนของ random site ต่างกัน

2.6 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)[69-72]

Schwartz และ Cantor ได้พัฒนาวิธีนี้ขึ้นในปี ค.ศ.1984 เพื่อแก้ปัญหาจากการที่วิธี REA มีข้อจำกัดของการมี frequent recognition site และ pattern ที่ได้ยากต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากการมี overlapping และ resolved restriction fragment ที่ไม่ดี

หลักการของวิธีนี้คือ การเตรียม chromosomal DNA หรือ genomic DNA จากการทำให้ cell lysis แล้วใช้ restriction enzyme ที่เหมาะสมตัด DNA ให้ได้ DNA fragment ไม่มากเกินไป (ประมาณ 5 – 20 fragments) แล้วนำมาแยกขนาดและจำนวน DNA fragment ใน agarose gel electrophoresis โดยทั่วไป DNA fragment ขนาดใหญ่มากกว่า 25 kb จะแยกได้ยากโดยวิธี agarose gel electrophoresis และการเตรียม DNA ที่มีขนาดใหญ่มาก ๆ ในสารละลายจะไม่ stable เนื่องจากเกิดการตัดตัวเองแบบ random ให้มีขนาดเล็กลง (<100kb) ดังนั้น การทำ PFGE จึงต้องมีการเตรียม chromosomal DNA เพื่อให้ stable โดยการฝังตัวเชื้อใน agarose plugs แล้วใช้ enzyme ย่อย cell wall ของตัวเชื้อให้แตกออกและย่อย DNA แล้วนำมาทำ electrophoresis โดยการให้กระแสไฟฟ้าไปรอบ ๆ ตลอดแนว gel เป็นระยะ ๆ (pulse) วิธีนี้จะทำให้ DNA fragment ขนาดใหญ่แยกออกจากกันได้

การแปลผลของ PFGE pattern [73]

การมี PFGE patterns ที่แตกต่าง แสดงถึงการเกิด mutation ซึ่งจะเกิดได้ 3 ลักษณะ คือ1)Insertion 2)Deletion 3) Rearrangement

การเกิด mutation ถ้าเกิดยีนบริเวณที่ไม่ใช่ restriction site จะให้ PFGE patterns ได้ดังนี้

	จำนวน band	ขนาดของ fragment
1. Insertion	คงเดิม	โตขึ้น (1 ชิ้น)
2. Deletion	คงเดิม	เล็กลง (1 ชิ้น)
3. Rearrangement	คงเดิม	คงเดิม

ถ้า mutation เกิดที่ยีนบริเวณที่เป็น restriction site จะให้ PFGE patterns ได้ดังนี้

	จำนวน band	ขนาดของ fragment
1. Insertion	เพิ่ม	ไม่แน่นอน (เล็กหรือใหญ่)
2. Deletion	ลด	"
3. Rearrangement	ลดหรือเพิ่ม	"

การจำแนกอาศัยความแตกต่างของ fragment ตามตารางที่8 กล่าวคือความแตกต่างที่มากกว่าหรือเท่ากับ 7 จัดเป็นคนละ type แต่ไม่มีความสัมพันธ์กัน และความแตกต่างระหว่าง 2-6 fragment เป็นสายพันธ์ที่อาจมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันจัดเป็น Subtype วิธีนี้ให้ discriminatory power สูง เชื้อที่นิยมใช้วิธีนี้แยกสายพันธุ์ คือ E.coli, P. aeruginosa และ M. vium

ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ การเตรียม DNA insert ใน agarose ต้องให้ buffer และ enzyme ซึมผ่านเข้า gel ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาเตรียมนาน 2 – 3 วัน และเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง

Category	No. of genetic differences compared with outbreak strain	Typical no. of fragment differences compared with outbreak pattern	Epidemiologic interpretation
Indistinguishable	0	0	Isolate is part of the outbreak
Closely related	1	2–3	Isolate is probably part of the outbreak
Possibly related	2	4–6	Isolate is possibly part of the outbreak
Different	≥3	≥7	Isolate is not part of the outbreak

ตารางที่ 8 Criteria for interpreting PFGE pattern

ฏ. ปัจจัยส่งเสริมในการกระจายของเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยา [74]

เกิดขึ้นภายใต้การรับยาปฏิชีวนะทั้งในคนและสัตว์ รวมถึงการให้ยาในชุมชนและโรงพยาบาลภายใต้การควบคุมด้านการติดเชื้อเกิดความล้มเหลว มีการติดต่อเกิดขึ้นได้ 3 ทาง ดังนี้

1. บุคคลต่อบุคคล (Person to Person)

เกิดขึ้นได้บ่อยในกลุ่มประชากรที่มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่เกิดการดื้อยา ดังนั้นการติดต่อจึงเกิดขึ้นในโรงพยาบาล หรือหน่วยงานด้านการพยาบาล การติดต่อโดยตรงระหว่างคนไข้และบุคคลอื่นในโรงพยาบาลเกิดการติดต่อทางอากาศหายใจ ฝุ่นละอองสามารถกระจายไปยังคนไข้และพนักงาน(staff) ในโรงพยาบาล กรณีการติดต่อทางอ้อมนั้นเกิดจากที่เชื้อสามารถอาศัยอยู่อย่างชั่วคราวบนแขน ,เสื้อ ,เครื่องมือ ,สิ่งแวดล้อม สามารถติดต่อระหว่างกันได้จากการขนย้ายผู้ป่วยระหว่าง ward , จากโรงพยาบาลไปยังโรงพยาบาล หรือการเดินทางระหว่างประเทศ และการอพยพอาจเปิดโอกาสให้เชื้อที่เกิดการดื้อยาสามารถแพร่กระจายได้

2. สัตว์ต่อบุคคล (Animal to Person)

การที่ประชาชนบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น เนื้อไก่ เนื้อวัว เกิดการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยา ทำให้คนได้รับเชื้อดื้อยาส่งผลกระทบทางด้านการรักษาในวงการแพทย์

3. สัตว์ต่อสัตว์ (Animal to Animal)

เกิดการแพร่กระจายของเชื้อได้ง่าย จากการเลี้ยงรวมกันในฟาร์มที่มีประชากรสัตว์หนาแน่น เกิดการติดต่อทาง vertical transmission สามารถติดต่อได้ระหว่างแม่สู่ลูก ดังเช่นการติดต่อของเชื้อ salmonella ส่วนการติดต่อ horizontal transmisson เกิดจากอาหารที่ใช้เลี้ยง โดยการติดต่อร่วมกันระหว่างสัตว์ เช่นสัตว์ที่ยังไม่หย่านม การปนเปื้อนของซากหรือหนังในโรงงานฆ่าสัตว์

ฐ. Glycopeptide ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่

ในแถบทวีปยุโรปการเกิด VRE ส่วนใหญ่มาจากแหล่งอื่น ๆที่ไม่ใช่คน Bates และคณะได้รายงานพบว่า VRE ที่แยกได้จาก raw sewage จากฟาร์มสัตว์ (เป็ด, ไก่ง่วง, สุนัข, นก และสุกรรวมถึงเนื้อไก่ที่ยังไม่ได้ปรุง การทดสอบทาง ribotyping พบมีความแตกต่างกันถึง 14

แบบ และพบเชื้อที่ดื้อต่อยา Vancomycin ในปริมาณที่สูงมาก เนื่องจากการใช้ avopacin ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

VRE เกิดในหลายประเทศในยุโรป เช่น เยอรมัน อังกฤษ นอรเวย์ ฝรั่งเศส สเปน และ เดนมาร์ก ในปี 1995 รัฐบาลเดนมาร์กประกาศห้ามใช้ avopacin ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ทุกชนิด ผลกระทบในหลายประเทศตรวจพบเชื้อ VRE และยังแพร่กระจายของเชื้อในชุมชนและในฟาร์มปศุสัตว์ ภายใต้การเกิด selective pressure

ฑ. ระบาดวิทยาของเชื้อ VRE

มีรายงานการเกิด VRE ที่แสดงออกลักษณะทาง phenotype ชนิด Van A ครั้งแรกในปี ค .ศ 1988 ซึ่งการระบาดวิทยาส่วนใหญ่ เกิดในผู้ป่วยโรคไตพบทางตอนใต้ของประเทศอังกฤษ ระหว่างปี ค.ศ 1986-1988 สปีชีส์ที่พบได้บ่อยคือ *E. faecium* และพบ *E. faecalis* และ *E. avium* ได้เช่นกัน เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มาจากการติดเชื้อที่ระบบขับถ่ายปัสสาวะเป็นเวลายาวนาน รวมถึงผู้ป่วยที่เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ ตรวจพบเชื้อ VRE ที่แยกได้ต่างพื้นที่กันจะความคล้ายคลึงกันของยีน แยกได้จาก อุจจาระ เลือด หนอง ในเยื่อบุช่องท้อง และปัสสาวะผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางระบบขับถ่ายปัสสาวะ การระบาดวิทยาเกิดขึ้นในโรงพยาบาลเด็ก หอผู้ป่วยอภิบาล หอผู้ป่วยมะเร็ง และผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ศึกษาความแตกต่างกันระหว่างพันธุกรรมของเชื้อโดยวิเคราะห์โดยการใช้ เอ็นไซม์ในย่อยโครโมโซม

ในอเมริกา VRE เกิดขึ้นในปี ค.ศ 1989 มีรายงานจากโรงพยาบาลที่มีผู้ป่วยเข้ารับการรักษาเป็นจำนวนมาก จำนวน 360 คน จาก 38 โรงพยาบาลสาเหตุหลักมาจากการได้รับยาภายในโรงพยาบาล ในชุมชนเกิดได้น้อย มีอัตราการตายเกิดขึ้น จากการทดสอบวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยการใช้เอ็นไซม์ในการย่อยพบความแตกต่างถึง 14 สายพันธุ์ แต่แสดงให้เห็นรูปแบบความแตกต่างได้แค่ 3 แบบเท่านั้น มีการรายงานในช่วงปี 1989-1993 รายงานโดย NNIS ในอเมริกาพบว่าจากเดิมพบ VRE 0.3% เพิ่มขึ้นเป็น 7.9 % ในปี 1993 และ 0.4 % ของการติดเชื้อมาจากการติดเชื้อจากระบบขับถ่ายปัสสาวะ และเพิ่มขึ้นถึง 3.8 % ในปี 1993

ฌ. ข้อกำหนดในการใช้สารเร่งการเจริญเติบโตในประเทศไทย

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อขายตลอดจนอัตราส่วน หรือปริมาณที่ให้ใช้หรือห้ามมิให้ใช้วัตถุนั้นเกินกำหนด พ.ศ 2539 ประกาศในราชกิจจานุเบกษาฉบับประเภททั่วไป เล่มที่ 113 ตอนพิเศษ 13ง วันที่ 8 พฤษภาคม 2539

ให้วัตถุซึ่งมีสรรพคุณเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ที่เติมในอาหารสัตว์และให้ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราที่กำหนดดังต่อไปนี้

(1) ในหนึ่งกิโลกรัมของอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่กระทง ไกไข่หรือไก่พันธุ์และเป็ดเนื้อ เป็ดไข่ หรือเป็ดพันธุ์ ให้มีวัตถุซึ่งมีสรรพคุณเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดของสารเร่งการเจริญเติบโตตามชื่อตามวิทยาศาสตร์คฆต่อไปนี้ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ได้ไม่เกินปริมาณที่กำหนดดังต่อไปนี้

(ก) อะโวพาร์ซิน (Avopacin)	ไม่เกิน 10 มิลิกรัม
(ข) คลอร์เททระไซคลิน (Chlortetracycline)	ไม่เกิน 50 มิลิกรัม
(ค) เอนราไมซิน (Enramycin)	ไม่เกิน 10 มิลิกรัม
(ง) ฟลาโวฟอสโฟไลพอล (Flavophospholipol)	ไม่เกิน 2 มิลิกรัม
(จ) ลินโคไมซิน (Lincomycin)	ไม่เกิน 4 มิลิกรัม
(ฉ) ไนโทรวิน (Nitrovin)	ไม่เกิน 10 มิลิกรัม
(ช) ออกซีเททระไซคลิน (Oxytetracycline)	ไม่เกิน 15 มิลิกรัม
(ซ) ไทโลซิน (Tylosin)	ไม่เกิน 22 มิลิกรัม
(ฌ) เวอร์จิเนียไมซิน (Virginiamycin)	ไม่เกิน 15 มิลิกรัม
(ญ) สไปราไมซิน (Spiramycin)	ไม่เกิน 20 มิลิกรัม
(ฎ) ซิงก์- แบซิทราซิน (Zinc- Bacitracin)	ไม่เกิน 50 มิลิกรัม

สารเร่งการเจริญเติบโตชนิดไนโทรวิน (Nitrovin) ตามข้อ (ฉ) ในวรรคก่อน ห้ามไม่ให้ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูป สำหรับไก่ไข่

สารเร่งการเจริญเติบโตในวรรคหนึ่งทุกชนิด ห้ามมิให้ใช้ผสมในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่และเป็ดตามอายุและชนิดของไก่และเป็ดดังต่อไปนี้

(ก) อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่กระทงอายุมากกว่า 6 สัปดาห์นับตั้งแต่วันเกิดเป็นต้นไป

(ข) อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ไข่หรือไก่พันธุ์อายุมากกว่า 6 สัปดาห์ นับตั้งแต่วันเกิดเป็นต้นไป

อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับเป็ดเนื้ออายุมากกว่า 8 สัปดาห์ นับตั้งแต่วันเกิด เป็นต้นไป

อาหารผสมสำเร็จรูปสำหรับเป็ดไข่และเป็ดพันธุ์อายุมากกว่า 20 สัปดาห์ นับตั้งแต่วันเกิดเป็นต้นไป

I 2000 2538