

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจหาเชื้อเอ็นเตอริโคคคัสที่ติดต่อยาแวนโคมัยซิน

1.1 ตัวอย่างที่เก็บได้จากอุจจาระไก่ในฟาร์มทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อเอ็นเตอริโคคคัสที่ติดต่อยาแวนโคมัยซิน ทั้งสิ้น 11 ตัวอย่างจากจำนวน 6 ฟาร์มคิดเป็นร้อยละ 0.91 จำแนกเป็น *E. faecalis* 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.41, *E. faecium* 5 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.41 และ *E. duran* 1 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.09 รายละเอียดแสดงในตารางที่ 10.11 และตารางที่ 12

1.2 ตัวอย่างอุจจาระจากคนเลี้ยงไก่จำนวน 14 ตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อเอ็นเตอริโคคคัสที่ติดต่อยาแวนโคมัยซิน

1.3 เชื้อเอ็นเตอริโคคคัสที่ติดต่อยาแวนโคมัยซินจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงปี 2538-2542 จำนวนทั้งสิ้น 1,854 ตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตรวจพบเชื้อเอ็นเตอริโคคคัสที่ติดต่อยาแวนโคมัยซิน 15 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.08 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 9 จำแนกเป็น *E. faecium* 14 คิดเป็นร้อยละ 0.76 และ *E. faecalis* 1 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.05 รายละเอียดแสดงในตารางที่ 13

2. ผลการทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

เอ็นเตอริโคคคัสที่ติดต่อยาแวนโคมัยซินทั้งหมด 11 ตัวอย่างที่แยกได้จากไก่ ทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยา vancomycin และ teicoplanin เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และจำแนกลักษณะทาง phenotype ดังตารางที่ 5 และตารางที่ 12 พบว่า *E. faecium* 5 ตัวอย่าง ค่า MIC ของยา vancomycin และ teicoplanin เท่ากับ 12 ug/ml และ 1 - 0.2 ug/ml ตามลำดับ และมีลักษณะทาง phenotype เป็น Van B, *E. faecalis* 5 ตัวอย่าง ค่า MIC ของยา vancomycin และ teicoplanin \geq 256 ug/ml และ 0.25 ug/ml ตามลำดับ และมีลักษณะทาง phenotype Van B. รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 5 และตารางที่ 12

เอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 15 ตัวอย่าง ทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยา vancomycin และ teicoplanin เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และลักษณะทาง phenotype พบ *E. faecium* 14 ตัวอย่าง มีค่า MIC ของยา vancomycin และ teicoplanin อยู่ระหว่าง 8-12 ug/ml และ 0.25-1 ug/ml ตามลำดับ มีลักษณะทาง phenotype เป็น Van B, *E. faecalis* 1 ตัวอย่าง มีค่า MIC ของยา vancomycin และ teicoplanin ≥ 256 ug/ml และ 1 ug/ml ตามลำดับมีลักษณะทาง phenotype เป็น Van B

3. ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) โดยเทคนิค Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

ผลการศึกษาจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม(genotype) ของเอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน ที่ได้จากไก่และผู้ป่วยจำนวน 18 ตัวอย่างใช้เทคนิค pulsed field gel electrophoresis พบลักษณะที่แตกต่างกัน รูปที่ 5 แสดงให้เห็นผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I *E. faecium* 5 ตัวอย่าง ที่ lane 1-5 และ *E. faecalis* 1 ตัวอย่าง ที่ lane 6 เอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน จากไก่ หมายเลข 19, 20, 21, 25, 30 และ 16 ตามลำดับ ส่วน lane 7 เป็น lamda ladder marker สำหรับ lane 8 เอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน จากผู้ป่วยหมายเลข 106 และ lane 9-12 เอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน จากไก่หมายเลข 42, 43, 96, 202, 215 และค่า MIC ของยา vancomycin ระดับสูง (high level resistance) lane 9 และ lane 10 จากไก่หมายเลข 42, และ 43 รูปที่ 6 แสดงให้เห็นรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I ในผู้ป่วยและไก่ lane 1-2 *E. faecium* ที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินจากผู้ป่วยหมายเลข 1378 และ 1345, lane 3-5 เอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน จากไก่หมายเลข 202, 43 และ 42 เป็น *E. duran*, *E. faecalis* และ *E. faecalis* ตามลำดับ, lane 6-7 เอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน ที่ให้ค่า MIC ≥ 256 และเป็น *E. faecalis* ทั้ง 2 ตัวอย่างคือ 106 และ 16, lane 8 เป็น lamda ladder marker, lane 9-13 เอ็นเตอโรโคคัสที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินจากไก่หมายเลข 20, 25, 21, และ 30 เป็น *E. faecium* ทั้ง 4 ตัวอย่าง และ lane

14-15 เอ็นเตอร์โรค็อกคัสที่ติดต่อยาแวนโคมัยซิน จากผู้ป่วยหมายเลข 1604 และ 1468 เป็น *E. faecium* ทั้ง 2 ตัวอย่าง

การเปรียบเทียบความแตกต่างของ band ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *SmaI* แล้วใช้เทคนิค pulsed field gel electrophoresis สามารถจำแนกได้เป็น 17 pulsotypes ตามหลักเกณฑ์ของ Tenover และคณะ⁽⁷³⁾ ได้ 6 แบบ หลัก(major type)คือ A,B,C,D,E,F และในแบบ A สามารถจำแนกเป็น subtype A1, A2, A3 และ A4 แบบ B สามารถจำแนกเป็น subtype B1, B2, B3 และ B4 แบบ C จำแนกเป็น subtype C1 และ C2 แบบ E จำแนกย่อยเป็น subtype E1, E2 และ E3 และแบบ F จำแนกเป็น subtype F1 และ F2 เชื้อที่ได้จากอุจจาระไก่ประกอบด้วย pulsotype A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, D และเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยประกอบด้วย pulsotype E1, E2, E3, F1 และ F2 รายละเอียดแสดงในตารางที่ 14, 15 และ 16

ตารางที่ 9 เชื้อ enterococcus จากผู้ป่วย จำนวน 15 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบตั้งแต่ปี
2538 – 2542 และแยกได้จาก specimen ที่ต่างกัน

	Code	Specie	วันที่เก็บ	แหล่ง
1	106	<i>E. faecalis</i>	9 พ.ค. 38	Tissue
2	305	<i>E. faecium</i>	10พ.ค. 38	หนอง
3	653	<i>E. faecium</i>	13 ก.พ. 40	Ascits
4	659	<i>E. faecium</i>	25 ก.พ. 40	Urine
5	687	<i>E. faecium</i>	14 มี.ค 40	Bodyfluid
6	693	<i>E. faecium</i>	13 มี.ค. 40	Urine
7	1345	<i>E. faecium</i>	28 ต.ค. 41	Drains
8	1378	<i>E. faecium</i>	19 พ.ย. 41	Cervix
9	1468	<i>E. faecium</i>	12 ม.ค. 42	Serum
10	1568	<i>E. faecium</i>	18 มี.ค. 42	Cervix
11	1598	<i>E. faecium</i>	25 มี.ค. 42	Cervix
12	1604	<i>E. faecium</i>	21 เม.ย. 42	Urine
13	1847	<i>E. faecium</i>	24 ธ.ค. 42	Rx drain
14	1678	<i>E. faecium</i>	18 มี.ย. 42	Drains
15	1736	<i>E. faecium</i>	20 ส.ค. 42	Tissue

ตารางที่ 10. เชื้อ enterococcus จากอุจจาระไก่จำนวน 11 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบจากฟาร์มที่แตกต่างกัน

	Code	Specie	วันที่เก็บ	แหล่ง
1	25	<i>E. faecium</i>	7 มิ.ย. 42	ฟาร์มสีนวล
2	16	<i>E. faecalis</i>	11 ก.ย. 41	ฟาร์มชนิดา
3	19	<i>E. faecium</i>	7 มิ.ย. 42	ฟาร์มเชิด
4	20	<i>E. faecium</i>	7 มิ.ย. 42	ฟาร์มเชิด
5	21	<i>E. faecium</i>	7 มิ.ย. 42	ฟาร์มเชิด
6	30	<i>E. faecium</i>	7 มิ.ย. 42	ฟาร์มราชาเชษฐี
7	42	<i>E. faecalis</i>	11 ก.ย. 41	ฟาร์มสมัย
8	43	<i>E. faecalis</i>	11 ก.ย. 41	ฟาร์มสมัย
9	96	<i>E. faecalis</i>	11 ก.ย. 41	ฟาร์มสมัย
10	202	<i>E. duran</i>	20 ต.ค. 41	ฟาร์มเบญจวรรณ
11	215	<i>E. faecalis</i>	20 ต.ค. 41	ฟาร์มเบญจวรรณ

ตารางที่ 11. ลักษณะทางชีวเคมีเพื่อทดสอบยืนยัน genus enterococic species ที่แยกได้จากไก่ 11 ตัวอย่าง

Code	6.5 NaCl	Bile	Pyruvate	PYR.	Arabinose	Arginine	Sorbitol	Surcross	Motility	Raffinose
9	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
16	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
19	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
20	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
21	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
30	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
42	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
43	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
96	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
202	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
215	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-

ตารางที่ 12 เชื้อ Enterococcus ที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินที่แยกได้จากไก่ จำนวน 11 ตัวอย่าง จากทั้งสิ้น 1,200 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.91%

Code number	เชื้อ	MIC (ug/ml)		Phenotype characteristic
		Vancomycin	Teicoplanin	
25	<i>E. faecium</i>	12	1.0	Van B
16	<i>E. faecalis</i>	≥256	8	Van A
19	<i>E. faecium</i>	12	2	Van B
20	<i>E. faecium</i>	12	1.0	Van B
21	<i>E. faecium</i>	12	1.0	Van B
30	<i>E. faecium</i>	12	2	Van B
42	<i>E. faecalis</i>	≥256	16	Van A
43	<i>E. faecalis</i>	≥256	16	Van A
96	<i>E. faecalis</i>	≥64	32	Van A
202	<i>E. duran</i>	≥256	0.25	Van B
215	<i>E. faecalis</i>	≥256	8	Van A
RF strainATTC 29212	<i>E. faecalis</i>	4	0.25	
RF strainATTC 25923	<i>S. aureus</i>	4	0.25	

ตารางที่ 13 เชื้อ Enterococcus ที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 15 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งสิ้น 1,854 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.80 %

Code number	เชื้อ	MIC (ug/ml)		Phenotype characteristic
		Vancomycin	Teicoplanin	
106	<i>E. faecalis</i>	≥ 256	1.0	Van B
305	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
653	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
659	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
687	<i>E. faecium</i>	12	2	Van B
693	<i>E. faecium</i>	12	2	Van B
1345	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
1378	<i>E. faecium</i>	8	0.5	Van B
1468	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
1568	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
1598	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
1604	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
1678	<i>E. faecium</i>	8	1.0	Van B
1736	<i>E. faecium</i>	8	2	Van B
1847	<i>E. faecium</i>	8	2	Van B
RfstrainATTC29212	<i>E. faecalis</i>	4	0.25	
RfstrainATTC 25923	<i>S. aureuss</i>	4	0.25	

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวน band ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ที่จำเพาะของเชื้อ

VRE จากไก่

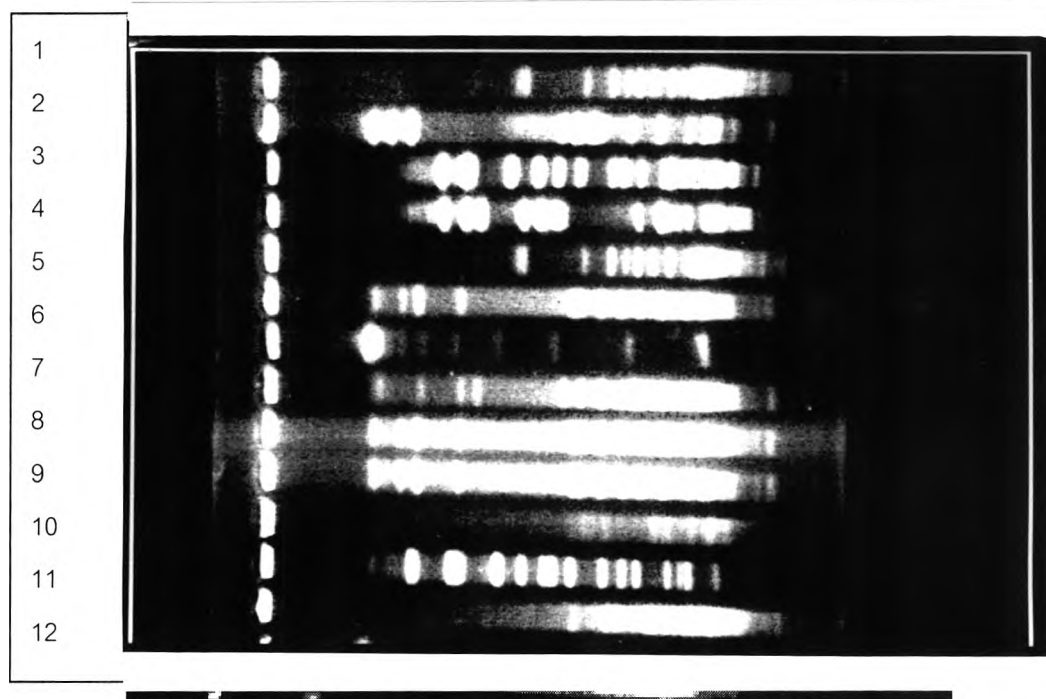
หมายเลขเชื้อ

	19	20	21	25	30	16	42	43	96	202	215
19	0	>7	>7	>7	3	>7	>7	>7	6	>7	6
20	>7	0	>7	>7	>7	6	4	4	>7	>7	>7
21	>7	>7	0	6	3	>7	>7	>7	>7	>7	>7
25	>7	>7	6	0	>7	>7	>7	>7	>7	>7	>7
30	3	>7	>7	>7	0	>7	>7	>7	6	>7	5
16	>7	6	>7	>7	>7	0	3	3	>7	>7	>7
42	>7	4	>7	>7	>7	3	0	0	>7	>7	>7
43	>7	4	>7	>7	>7	3	0	0	>7	>7	>7
96	6	>7	>7	>7	6	>7	>7	>7	0	>7	4
202	>7	>7	>7	>7	>7	>7	>7	>7	>7	0	>7
215	6	>7	>7	>7	>6	>7	>7	>7	6	>7	0

ตารางที่ 16 ลักษณะ pulsotype ของเชื้อ VRE จากไก่และผู้ป่วย

ลักษณะของสายพันธุ์ที่แยกได้

Pulsotype	ไก่	ผู้ป่วย
A1	2 (42,43)	
A2	1 (16)	
A3	(20)	
A4		1 (106)
B1	1 (30)	
B2	1 (19)	
B3	1 (215)	
B4	1(96)	
C1	1 (21)	
C2	1 (25)	
D	1 (202)	
E1		1(1468)
E2		1 (1604)
E3		1 (1598)
E4		1(1678)
F1		1(1345)
F2		1 (1378)



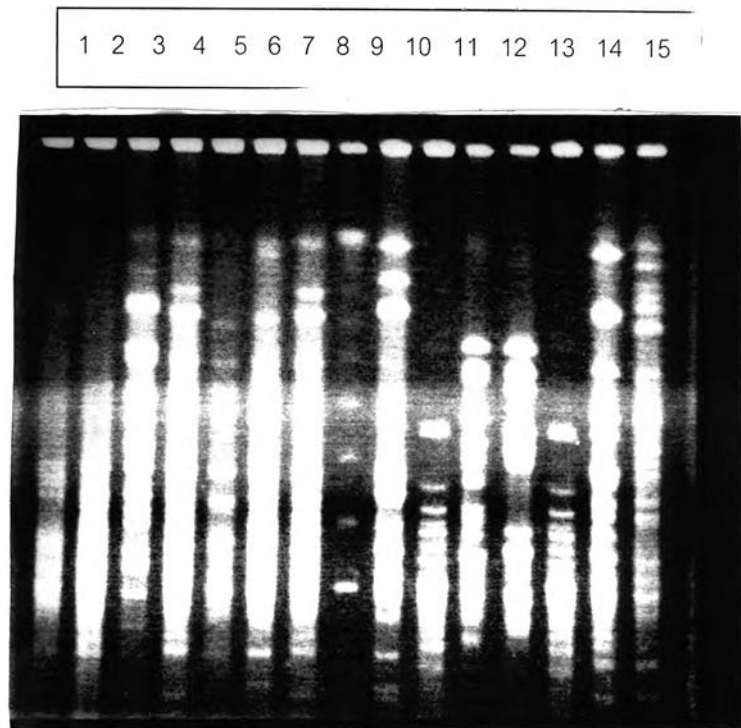
รูปที่ 5 ผลการทดลองโดยการใช้เอ็นไซม์ *Sma*I ตัด whole chromosome ของเชื้อ VRE ใช้เทคนิค pulsed field gel electrophoresis ใช้ initial switching time 5s , final switch time 35s, running time 30s , $V = 6$ v/m(CHEF-DRIII system Biorad, USA)

lane 1-6 VRE จากไข้ หมายเลข 19, 20, 21, 25, 30 และ 16 ตามลำดับ

lane 7 lamda ladder

lane 8 VRE จากผู้ป่วยหมายเลข 106

lane 9-12 VRE ในไข้หมายเลข 42,43, 96,202,215 ตามลำดับ



รูปที่ 6 ผลการทดลองโดยการใช้อินไซม์ SmaI ตัด whole chromosome ของเชื้อ VRE ใช้เทคนิค pulsed filed gel electrophoresis ใช้ initial switching time 5s , final switch time 35s, running time 30s ,V = 6 v/m(CHEF-DRIII system Biorad, USA)

lane 1-2 VRE จากผู้ป่วยหมายเลข 1378 และ 1345

lane 3-5 VRE จากไก่หมายเลข 202, 43, และ 42

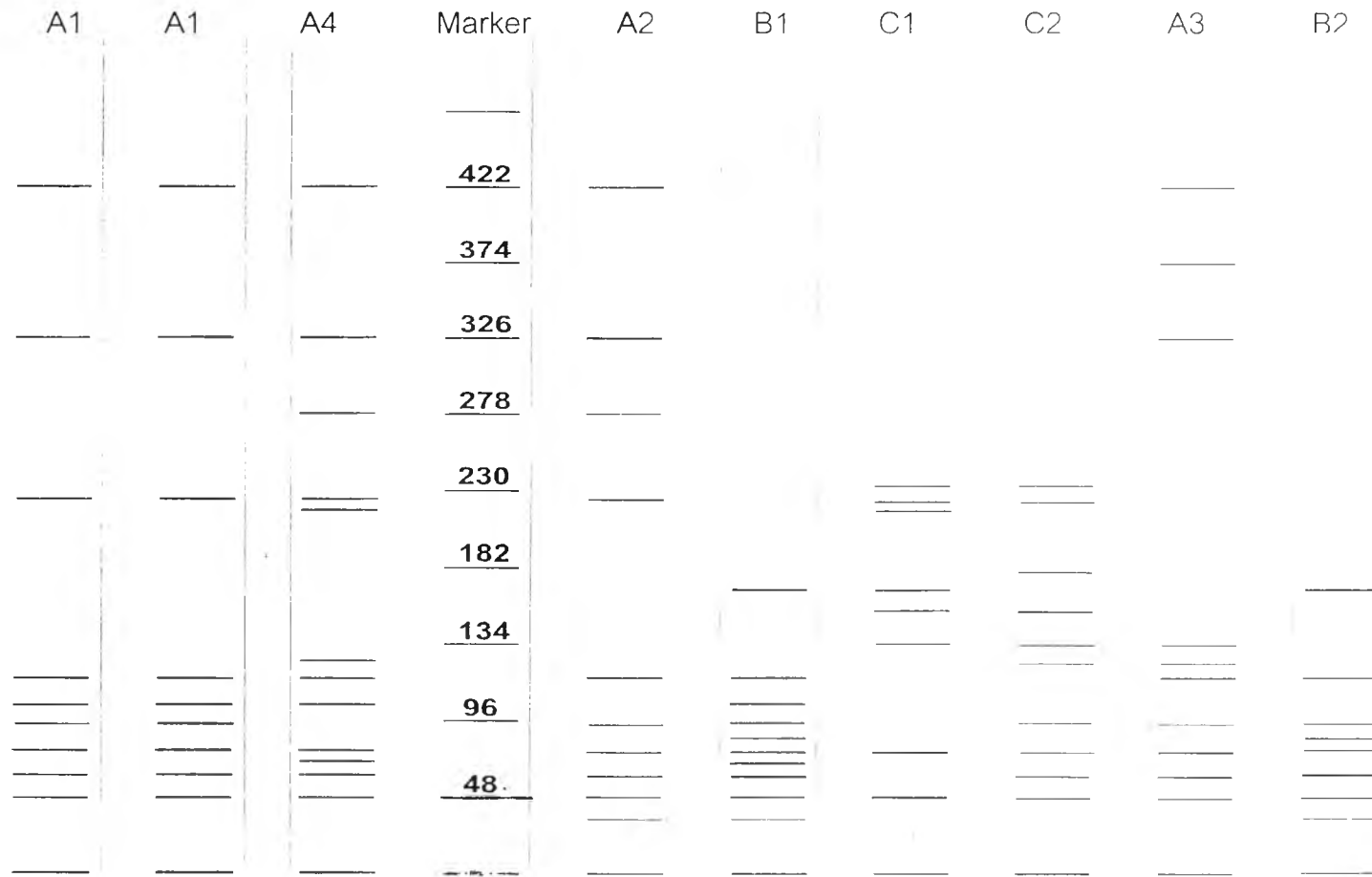
lane 6-7 VRE จากผู้ป่วยและไก่หมายเลข 106 และ 16

lane 8 lamda ladder

lane 9-13 VRE จากไก่หมายเลข 20,25,21และ 30

lane 14-15 VRE จากผู้ป่วยหมายเลข 1604 และ 1468

รูปที่ 8 รูปแบบ pulstotype ของเชื้อ Enterococcus จากไก่



รูปที่ 9 รูปแบบ pulsotype ของเชื้อ Enterococcus จากผู้ป่วย

