รายการอ้างอิง

1. Murray BE. 1990. The life and time of the Enterococcus. Clin. Microbiol Rev. 3 : 46-65
2. Gordts B, Landnyt HV, Ieven M, Vandamme P and Goossens H. 1995. Vancomycin resistant Enterococci colonization the intestinal tract of hospital patients. J Clin Microbiol 33: 2842-2846
3. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, Pfaller MA, Hwang T, Sanford MD, et al. 1995. Vancomycin – resistant *Enterococcus faecium* bacteremia : risk factors for infection. Clinnfect Dis. 20: 1126 – 1133.
4. Malone CA, Wagner RA, Myers JP and Watanakunakorn C. 1986. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals. The American J Medicine. 81: 601-606
5. Platt R, Polk F, Murdock B, et.al. 1982. Mortality associated with nosocomial urinary tract infection. N Engl J Med. 307: 637-642
6. Schaberg DR, Celver Dhand Gaynes RP. 1991. Major trends in the microbial etioalogy of nosocomial infection. Am J Med. 91: 795 – 825.
7. Kreft B, Marre R, Schramm U and Wirth R. 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cell. Infect Immunity. 60: 25-30
8. Wilson WR, Karehmer AW, Dajani AS, Tanbert KA, Bayer A, Kaye D, Bisno AL, Ferrieri P, Shulman ST and Durack DT. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, Enterococci, Staphylococci and HACEK microorganisms. JAMA. 274: 1070 – 1713.
9. Johnson AP, Warner M, Woodford N, Speller DCE and Livermore DM. 1998. Antibiotic resistance among Enterococci causing endocarditis in the UK: analysis of isolates reference laboratory. BMJ. 317: 629-630
10. Green M. Wadowsky RM and Barbadora K. 1990. Recovery of vancomycin – resistant gram – positive cocci from children. J Clin Microbiol. 28: 484-488.

11. Handwerger S, Perlman DC, Altarac D and MeAuliffe V. 1992. Concomitant high – level vancomycin and pennicillin resistance in clinical isolate of Enterococci. Clin Infect Dis. 14: 656 – 661.

12. Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A and Keane CT. 1997. Incidence and detection of multi – drug –resistant Enterococci in Dublin hospitals. J Med Microbiol. 46: 150 – 156.

13. Wager AR and Murray BE. 1990. Comparision of Enterococcal and staphylococcal β- lactamase plasmids. J Infect Dis. 161: 54 – 58.

14. Devriese LA, leven M, leven H, Goossens P, Andamme Bp, Hommez J and Haesebrouck F. 1996. Presence of vancomycin resistant Enterococci in farm and pet animals. Antimicrob Agents Chemother. 40: 2285 – 2287.

15. Bates J, Jordens Z and Selkon JB. 1993. Evidence for an animal origin of vancomycin resistant Enteroccoci. Lancet. 342: 490 – 491.

16. Bager F, Madsen M, Christensen J and Aarestrup Fm. 1997. Avopacin used as a growth promotor is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* an Danish poultry and pig farm. Prev. Vet.Med. 31: 95 – 112.

17. Bates J, Jordens JZ and Griffiths DT. 1994. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin resistant Enterococcal infection in man. J Antimicro Chemother. 34: 507 – 516.

18. Facklam RR and Collins MD. 1989. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a coventional test scheme. J Clin Microbiol. 27: 731 – 734.

19. Edberg SC, Hardalo CT, Kontnick C and Campbell S. 1994. Rapid detection of vancomycin resistant enterococci. J Clin Microbiol. 32: 2182 – 2184.

20. Boyce JM. 1995. Vancomycin – resistant Enterococci : prevasive and persistent pathogens. InFect Control and Hosp Epidemiol. 16: 676 – 679.

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

22. Stobberingh E, van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Top J and Willems R. 1999.Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmer, turkey slaughters, and (sub) urban residents in the south of the Natherlands : Evidence for transmission of vancomycin resistance from animal to human? Antimicrob Agents Chemother. 43: 2215 – 2221.

23. Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hamerum AM, Bager F. 1999. Use of Antimicrobial growth promoters in food animal and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial durg in Europe. Emerg Infect Dis. 5: 329 – 335.

24. Jordens JZ, Bates J and Griffths DT. 1994. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin resistant *Enterococcus faecium.* J Antimicrob Chemother. 34: 515 – 528

25. ญี่ปุ่นพบเนื้อไก่ไทยปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย. ไทยรัฐ 2541. ปีที่ 49 ฉบับ 14779 พฤหัสบดีที่ 9 กรกฎาคม 2541.

26. ไก่ไปหยุ่นอุ่นจิต "สมชาย" ฝันเฟื่องเล็งส่งหมูปีหน้า. ประชาชาติธุรกิจ. 2541. 6-8 กรกฎาคม 2541.

27. ญี่ปุ่นเลี่ยงกินไก่ไทย อ้างมีเชื้ออาจถึงตายได้. มติชน. 2541. ฉบับที่ 9 กรกฎาคม 2541.

28. เกรียงศักดิ์ สายธนู และนิทัศน์ เพราแก้ว. 2536. โรคติดเชื้ออีเซอร์ริเชีย โคลัย ในระบบทางเดินหายใจของไก่กระทง : ตอนที่ 2 อัตราการต้านยาของเชื้ออีเซอร์ริเชีย โคลัย. วารสารเวชสารสัตวแพทย์. 23: 53 – 70.

29. Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, Herring JA, Gianarkis DG, Thurberg BE, Painter BG. 1993. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin resistant Enterococci. J Clin Microbiol. 31: 1280 – 1285.

30. Levy SB. 1978. Emergence of antibiotic resistant bacteria in the intestinal flora of farm inhibitant. J Infect Dis. 137: 688 – 689.

31. Bingen EH, Denamur E, Lambert – Zechovsky NY and Elion J. 1991. Evience for the genetic unrelatedness of nosocomial vancomycin resistance *Enterococcus faecium* strains in a pediatric hospital. J Clin Microbiol. 29: 1888 – 1892.

32. Descheemaeker PRM, Chapelle S, Devriese LA, Butaye P. Vandamme P, and Goossens H. 1999. Comparison of glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* isolates and glycopeptide resistance gene of human and animal origin. Antimicrob Agents Chemother. 43: 2032 – 2037.

33. Noble WC, Virani Z, Cree RG. 1992. Co – transfer of vancomycin and other resistance genes frome *Enterococcus faecalls* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 72: 195 – 198.

34. Klare I, Heier H, Claus H, Reisbrodt R and Witte W. 1995. Van A mediated high – level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry.FFMS Microbiol Lett. 347: 165 – 171

35. Murray Be, Singh KV, Heath JD, Sharma BR and Weinstock, GM. 1990. Comparision of genomic DNAs of different Enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol. 28: 2059-2063.

36. Matushek MG, Bonten MJM. nd Hayden MK. 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 34: 2598 – 2600.

37. Morrison D, Woodford N, Barrett Sp, Sisson P and Cookson BD. 1999. DNA banding pattern polymorphism in vancomycin resistant Enterococcus faecium and criteria for defining strains. J Clin Microbiol. 37: 1084 – 1091.

38. Miranda AG, Kavindra VS and Murray BE. 1991. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed – field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. J Clin Microbiol. 29: 2752 – 2757

39. Van den Braak N, van Belken A, van Keulen M, Vliegenthart J, Verbrugh HA and Endtz HP. 1999. Molecular characterization of vancomycin. Resistant Enterococci from hospitalized patients and poultry product in the Netherlands. J Clin Microbiol. 36: 1927 – 1932.

40. Fack RR and Sahm D. 1995. Enterococcus. In : Manual of Clinical Microbiology 6th Edition. Edited by Murry PR, Baron EJ, Tenover FC and Yolken RH. pp. 308 – 314. ASM Press, Washington D.C.

41. Van den Bogaard AE. Jensen LB. Stobberingh EE. 1997. Vancomycin – resistant Enterococci in turkeys and farmers. N Engl J. Med. 337: 1558 – 1559.

42. Chadwick PR, Oppenticim BA.1994. vancomycin resistant enterococci and bedpan washer machines(letter). Lancet.344:685

43. Petrich AK, Luinstra KE, Groves D, Chernesky MA and Mahony JB. 1999. Direct detection of van A and van B gene in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant Enteroccoci (VRE) using multiplex PCR. Molecular Cellular Probes. 13: 275 – 281

44. Micle A, Bandera M and Goldstein BP. 1995. Use of primers selective for vancomycin resistance gene to determination van genotype in Enterococci and to study gene organization in Van A isolate. Antimicrobiol Agent Chemothera. 39: 1772 – 1778.

45. Michael DO, and Pamela B. 1999. Principle and application of method for DNA- base typing of microbial organism. J Clin Microbiol .37: 1661-1669

46. Enns RK. 1988. DNA probe: an overview and comparision with current method. Lab Med. 19: 295-300.

47. Pate R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Steckelberg JM, Kline B and Cockerill FR. 1998. DNA sequence variation within *van* A, *van* B, *van* C – 1 and *van* C – 2/3 gene of clinical Enterococcus isolates. Antimicrob Agent Chemother. 42: 202 – 205.

48. Jett BD, Huycke MM and Gilmore MS. 1994. Virulence of Enterococci. Clin Microbiol Rev. 7: 462-478

49. Emori TG and Gaynes RP, 1993. An overview of nosocomial infections including the role of microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev. 6: 428 – 442.

50. Rosser SJ, Alfa MJ, Hoban S, Kennedy J and Harding GK. 1999. E–test versus agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of viridans group streptococci. J Clin Microbiol. 37: 26 – 30.

51. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing NCCLS approved standard M100-S9.National committee of Clinical Laboratory Stardards, Wayne,PA

52. Brown DFJ and Brown L. 1991. Evaluation of the Etest, a novel method of quanifying antimicrobial activity. J Antimicrob Chemother. 27: 185 – 190.

53. Bolmstrom A. 1994. Determinations of minimum bactericidal concentration, kill curves and postantibiotic effects with the Etest technology. Diag Microbiol Infect Dis. 19: 187 – 195.

54.Schulz JE and Sahm DF. 1993. Reliability of the Etest for detection of ampicllin, vancomycin and high – level aminoglycoside resistance in Enterococcus spp. J Clin Microbiol. 31: 3336 – 3339.

55. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A and Goldstein EJE. 1991. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 29: 2197 –220.3

56. Handwerger S, Pacci MJ, Volk KJ, Liu J and Lee MS. 1992. The cytoplasmic peptidoglycan precusor of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* terminates in lactate. J Bacteriol. 174: 5982 – 5984.

57. Nagarajan R. 1991. Antibacterial activity and modes of action of vancomycin and related glycopeptide. Antimicrob Agent Chemother. 35: 605 – 609.

58. Donnelly JP, Voss A, Witte W, Murry BE. 1996. Does the use in animals of antimicrobial agents including glycopeptide antibiotics influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans. J Antimicrob Chemother. 37: 389 – 390.

59. Arthur M and Courvalin P. 1993. Genetic and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 37: 1563 – 1571.

60. Arthur M, Molinas C, Depardieu F and Courvalin P. 1993. Characterization of Tn *1546*, a Tn*3* – related transposon conferring glycopeptide resistance by systhesis of depsipeptide peptidoglycan precursor in *Enterococcus faecium* BM4147. J of Bacteiol. 175: 117 – 127.

61. Costa Y, Calimand M, Leclercq R, Duval J and Courvalin P. 1993. Characterization f the chromosome aac (6') – II gene specific for *Enterococcus faecium*. Antimicrob Aqnent chemother. 37: 1896 – 1903.

62. Perichon B, Reynolds P and Courvalin P. 1997. Van D – type glycopeptide – resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob Agent Chemother. 41: 2016 –2018.

63. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF and Courvalin P. 1999. Van E, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob Agent Chemothera. 43: 2161 – 2164.

64. Mckessar SJ, Berry AM, Bell JM and et.al. 2000. Genetic characterization of VanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agent Chemother. 44: 3224-3228

65. Iwen PC, Kelly DM, Tinder J and Hinrichs SH. 1996. Revised approach for identification and of ampicillin and vancomycin resistance in Enterococcus Species by using microscan panels. J Clin Microbiol. 34: 1779 – 1783. Criteria for defining strains. J Clin Microbiol. 37: 1084 – 1091.

66. Aimn NE, Jalal S and Wretline B. 1999. Alterations in *GyrA* and *Par* C associated with fluroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 43: 947 – 949.

67. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN and Whittam TS. 1986. Method of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetic and systematics. Appl Environ Microbiol. 51: 873-884.

68. Kuhn I, Burman LG, Haeggman S, Tullus K and Murry BE. 1995. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of Enterococci. J Clin Microbiol. 33: 2812 – 2817.

69. Maslow JN and Mulligan ME. 1993. Molecular epidimiology : Application of contemporary techniques to the typing of microorganism. Clin Infect Dis. 17: 153 – 164.

70. Gordillo ME, Singh KV and Murray BE. 1993. Comparison of ribotyping and pulsed field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol. 31: 1570 – 1574

71. Maslow JN, Slutsky Am, Arbeit RD. Application of pulsed filed gel electrophoresis to molecular epidemiology. In White TJ (ed), Persing DH, Smih TE, Tenover FC. Diagnostic Moleccular Microbiology : Principle and Applications.Washington DC : American Society of Microbiology.

72. Gorering RV and Duensing TD. 1990. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with and rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphyloccci. J Clin Microbiol. 28: 426 – 429.

73. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelson PA, Murray BE, Persing DH, et. al. 1963. Interpretating chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis : Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33: 2233 – 2239.

74. Rao GG. 1998. Risk factor for the spread of antibiotic – resistant bacteria. Drug. 55: 323 – 329.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ก. มีเดีย

ก.1. 1% sheep blood agar (TBS)

Pancreatic digest of casein	15.0	กรัม
Papaic digest of soybean meal	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7 .6 เข้าตู้อบเพื่อฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันที่อุณหภูมิ 121^0 ซ นาน 15 นาที แช่ใน waterbath อุณหภูมิ 55^0 ซ เติมเลือดแกะที่ปราศจากเชื้อ 1 %

ก.2. K.F streptococcus agar (Oxoid, England)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium glycerophosphate	10.0	กรัม
Maltose	20.0	กรัม
Lactose	1.0	กรัม
Sodium azide	0.4	กรัม
Bromcresol purple	0.015	กรัม
Agar	20.0	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากันปรับ pHให้ได้ 7.4$\pm$ 2 ละลายให้ดีและนำเข้าตู้อบเพื่อฆ่าเชื้อโดยใช้ความดัน 121^0 ซ นาน 15 นาที แช่ไว้ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 55^0 ซ ต่อมาเติม 1% Solution ของ 2,3,5 triphenyl tetrazodium chloride(TTC)

ก.3 Brain heart infusion broth (Oxoid, England)

Calt brain infusion solid	12.5	กรัม
Beef heart infusion solid	5.0	กรัม

Proteose peptone	10.0	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากันปรับ pH ให้เป็น 7.4 $\pm$ 0.2 แบ่งใส่หลอดจุกเกลียวขนาด 13×10 มม. หลอดละ 5 มล.อบโดยใช้ความดันเพื่อฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121^{0} ซ นาน 15 นาที

ก.4 Brain heart infusion agar (Oxoid, England)

Calt brain infusion solid	12.5	กรัม
Beef heart infusion solid	5.0	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Agar	10.0	กรัม
D.W	1000	กรัม

ละลายให้เข้ากันปรับ pH ให้เป็น pH 7.4 $\pm$ 0.2 อบโดยใช้ความดันที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ นาน 15 นาที เทใส่ petridish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. ให้ได้จำนวน 19 มล.

ก.5 Muller Hinton Agar (BBL,U.S.A)

Beef extract	2.0	กรัม
Acid Hydrolysate of casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากันปรับ pH ให้เป็น 7.3 $\pm$ 0.1 อบโดยใช้ความดันที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ นาน 15 นาที เทใส่ petridish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 90 มม. ให้ได้จำนวน 20 มล.

ก.6 Cary and Blair Transport media (BBL,U.S.A)

Sodium Thioglycollate.	1.5	กรัม
Disodium Phosphate.	1.1	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม.
Agar	5.0	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ pH 8.0 ±0.5 เทใส่หลอดพลาสติกขนาด 13×10 มม. อบโดยใช้ความดัน ที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ นาน 15 นาที

ก.7 Bile esculin ager (Difco. U.S.A)

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Esculin	1.0	กรัม
Oxgall	40.0	กรัม
Ferric Citrate	0.5	กรัม
Agar.	15.0	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากัน ปรับ pHให้เป็น 6.6± 0.2 แบ่งใส่หลอดจุกเกลียวขนาด 13×10 มม. จำนวน 3 มล. เข้าอบโดยใช้ความดันเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ นาน 15 นาที วาง slant

ก.8 CTA medium (BBL. U.S.A)

L-eystine	0.5	กรัม
Pancreatic.Digest oF Cascin	20.0	กรัม
Agar	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Sodium sulfite	0.5	กรัม
Phenal	0.017	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากันปรับ pH ให้เป็น 7.3+-02 แบ่งใส่ flask ขนาด 250 มล. Flask ละ 100 มล. จำนวน 6 flask จากนั้นเติมน้ำตาล 1 % (1 กรัม ใน 100 มล.) ดังนี้ arabinose, mannitol, sucross , raffinose , sorbitol ,arginine

ก.9 Motility test medium

Beef extract	3.0	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	4.0	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากันปรับ pH ให้เป็น 7.6± 0.2 จากนั้นนำไปอบภายใต้ความดัน 121^0 ซ นาน 15 นาที จากนั้นแช่ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 55^0 ซ ต่อมาเติม 0.05 กรัม หรือ 1 % ของ triphenyltetrasodium chloride แบ่งใส่หลอดเกลียว ขนาด 13×10 มม. จำนวน 3 มล.

ก.10 Sodium chloride (6.5%)

Heart infusion broth	4.5	กรัม
NaCl	19.5	กรัม
Dextrose	0.3	กรัม
D.W	300	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันและปรับ pH ให้ได้ 7.6 ต่อมาเติม indicator 0.3 มล. (1.6%) แล้วนำไปอบโดยใช้ความดันเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^0 ซ นาน 15 นาที แช่ไว้ใน waterbath อุณหภูมิ 55^0 ซ จากนั้นเติม horse serum 5 มล. แบ่งใส่หลอดจุกเกลียววาง slant

ก.11 Pyruvate utilization

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
K_2HPO_4	5	กรัม
NaCl	5	กรัม

Sodium pyruvate	10	กรัม
Bromthymol bule	0.104	กรัม
D.W	1000	มล.

ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 7.1±1 แบ่งใส่หลอดจุกเกลียวขนาด 13×10 มม.อบ โดยใช้ความดันเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^0 ซ นาน 15 นาที วาง slant

ข. สารเคมี

Low melting point agarose (Gibco.BBL,Spain)

High melting agarose(Gibco.BRL,Spain)

Tris base (Bio-rad,U.S.A)

EDTA (Amresco,U.S.A)

Boric acid (Promaga, U.S.A)

Sodium chloride (Merck,Germany)

Sodium lauroyl sarcosine (Amresco, U.S.A)

Sodium deoxycholate (Amresco,U.S.A)

Tris hydrochoride (Amresco,U.S.A)

Brij 58(Polyoxyethylene 20 cetyl ether)(Sigma,U.S.A)

Protenase K (Amresco,U.S.A)

2,3,5 Triphenyltetrasolium chloride(TTC)(Fluka, Swithzerland)

Vancomycin (powder) (Sigma,U.S.A)

E-test strips ของ Vancomycin และ Teicoplanin (AB Biodisk,Sweden)

Bromthymol blue (Fluka,Swithzerland)

Bromcresol purple (Fluka, Swithzerland)

Arabinose (Difco,U.S.A)

D-sorbitol(Fluka, Swithzerland)

Arginine (Sigma, England)

D-mannitol (Difco, U.S.A)

Raffinose (Difco, U.S.A)

Sucross (Difco, U.S.A)

ค.วัสดุและอุปกรณ์

15 ml snap -top tube

15 ml round bottom , screw cap (Pyrex,U.S.A)

Insert mold (Biorad,U.S.A)

Glass tray (20 by 30 cm)

Metal tray (16 by 25 cm)

ง. เครื่องมือ

Incubator 37 ^{0} C

Shaking incubator

Shaking waterbath

Mixer vortex

Digital slide vernier caliper

Refrigenator centrifuge (4 ^{0}C) (Sigma U.S.A)

Refrigenator (20^{0} C listed , Household Freezer ,U.S.A)

Automatic pipette , p20/p200/p1000

Medical Electronic , France

pH meter (Beckman, U.S.A)

Millipore filter

Pulsed - Field Gel Box (Bio-rad ,U.S.A)

Pump, Gel Molds (Bio-rad, U.S.A)

Cooling waterbath (Bio-rad, U.S.A)

Power supply, pulsed wave swither (Bio-rad,U.S.A)

Gel Doc 1000 (Bio-rad, U.S.A)

จ.เอ็นไซม์และ Molecular marker

Lysozyme (Ameresco, U.S.A)

Lamda ladder marker (Bio-rad ,U.S.A)

Rnase A (Ameresco, U.S.A)

Sma I (Gibco. BBI, Spain)

ฉ. การวิเคราะห์เชื้อ

1. ย้อมแกรม

- Crystal violet solution
- Iodine solution
- 95% ethanol
- Safranin solution

ขั้นตอนในการย้อมแกรม

เขี่ยเชื้อจุลชีพย้อมบนสไลด์ที่สะอาดและทำให้แห้งโดยการ fix ให้แห้ง หลังจากนั้นหยด Crystal violet บนบริเวณ smear 1 นาที ต่อมาล้างสไลด์ด้วยน้ำต่อจากนั้นหยด Iodine solution บนบริเวณที่ smear และล้างด้วยน้ำหลังจากนั้น 1 นาที ต่อมา decolorized ด้วย 95 % ethanol และล้างด้วยน้ำ จากนั้นหยด safranin ลงบนสไลด์ประมาณ 30 นาที ล้างด้วยน้ำและทิ้งให้แห้ง ต่อมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กำลังขยาย 100X objective len บนสไลด์

การทดสอบ Catalase test

หยดสารละลาย H_2O_2 ลงบนสไลด์ แล้วถ่ายเชื้อ Enterococcus ที่ต้องการทดสอบลงบนสารละลาย ผสมให้เข้ากัน ผลบวกจะแสดงกลุ่ม bubles information ผลลบ no gas production

การทดสอบ *Genus Enterococcus*

1.เตรียมหลอด bile esculin, 6.5% NaCl เขียนหมายเลขข้างหลอด ใช้ needle เขี่ยเชื้อที่ pure culture บน blood agar จากนั้น inoculate เชื้อโดยใช้ wire แทง (stab)ลงในส่วนก้นหลอด (butt) แล้วลากขึ้นมา streak ผิวหน้าของ slope แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 370 ซ 24 ชั่วโมง

2.เตรียมหลอด PYR broth ใช้ needle เขี่ยเชื้อจาก blood agar จากนั้น inoculate เชื้อลงในหลอด PYR broth เข้าอบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ ข้ามคืน เติม reagent สำหรับ PYR หลังครบการอบข้ามคืน

การแปลผล	
bile esculin	ผลบวกจะให้สีดำ
	ผลลบจะให้สีน้ำตาลคงเดิม
6.5 % NaCl	ผลบวกให้สีเหลือง
	ผลลบให้สีม่วงคงเดิม
PYR	ผลบวกจะให้สีแดงอิฐเชื้อที่ตกตะกอนจะเป็นสีชมพู
	ผลลบจะเป็นสีเหลือง

ภาคผนวก ข

น้ำยาที่เตรียม

1. Lysis buffer

6 mM Tris (pH 7.6)	1.2	มล.
1 M NaCl	40	มล.
100 mM EDTA (pH 7.6)	20	มล.
0.5 % Sodium lauroly sarcosine	20	มล.
0.2 % Deoxycholate	8	มล.
0.5 % Brij	50	มล.

เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ครบ 200 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.6 steriled โดยใช้หัวกรองขนาด 0.4 um membrane filter เก็บที่อุณหภูมิ 4^0 ซ

2. PIV buffer

1 M NaCl	0.4	มล.
10 mM Tris (pH 7.6)	2	มล.

เติมน้ำกลั่นที่สะอาดให้ครบ 200 มล. นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^0 ซ นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4^0 ซ

3. Lysis solution

- 20 ไมโครกรัม/มล. ของ Rnase A

ละลาย Rnase A ด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วยความร้อน 50^0 ซ นาน 30 นาที ดูดใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20^0 ซ

- 1 มิลลิกรัม/มล. ของ Lysozyme

ละลาย lysozyme ด้วยน้ำกลั่นดูดใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 200 มล. เก็บที่อุณหภูมิ – 20^{0} ซ

4. ES buffer

0.5 EDTA (pH 8.0)	140	มล.
10 % Sodium lauroly sarcosine	40	มล.

เติมน้ำกลั่นที่สะอาดให้ครบ 200 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.0 steriled โดยใช้หัวกรองขนาด 0.4 um membrane filter เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- เตรียม 20 × Protenase K Stock solution

ชั่งสาร 0.02 กรัม ละลายใน 1 มล. ES buffer ได้ final concentration 50 ไมโครกรัม/มล. แบ่งหลอด microcentrifuge หลอดละ 100 ไมโครลิตร อบที่อุณหภูมิ 50^{0} ซ ใน waterbath นาน 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ –20^{0} ซ

5. ESP solution

- 50 ไมโครกรัม/มล ของ Protenase K ใน ES buffer
- ES buffer

100 ไมโครลิตร ของ 20 × เติมใน 40 มล. ของ ES buffer ผสมให้เข้ากัน

6. 1× TE buffer

10 mM Tris (pH 7.6)	1	มล.
0.1mM EDTA (pH 7.6)	0.2	มล.

เติมน้ำให้ครบ 200 มล. ปรับ pH ให้ได้ pH 7.6 นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

7.10×TBE buffer

44.5 mM Tris	54	กรัม
44.5 mM Boric acid	27.5	กรัม
1 mM EDTA	20	มล

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล. นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. Ethidium bromide solution

- 0.5 ไมโครกรัมในน้ำกลั่น

ละลายหนึ่งเกล็ดของ ethidium bromide ละลายในน้ำกลั่น 11 มล.

Working solution : 100 ไมโครลิตรของ ethidium bromide stock solution ผสมกับน้ำกลั่น 200 มล.

ภาคผนวก ค

การเตรียมยา

ยาต้านจุลชีพที่ใช้ คือ vancomycin

เตรียม Stock Solution = 1200 ug/ml

Potency = 1.059

สูตร

$$\text{น้ำหนักยา (กรัม)} = \frac{1200 \times \text{ปริมาตรที่ต้องการ}}{\text{potency ของยาชนิดนั้น}}$$

$$= \frac{1200 \times 50}{1.059}$$

$$= 0.056657 \text{ กรัม}$$

วิธีการ

1. ชั่งสาร 0.056657 กรัม เติมในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 50 มล.
2. ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดๆ ละ 10 มล. จำนวน 5 หลอด
4. เตรียม working solution ในอัตราส่วน 1:9
5. ดูด 1 มล. ของ working solution หยดลงใน petridish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. ให้ได้จำนวนตามต้องการ
6. ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 19 มล. ลงใน petridish ผสมกันเข้ากัน
7. ทิ้งให้แข็งและเก็บเข้าตู้เย็น

ประวัติผู้เขียน

นายวิโรจน์ คงเกลี้ยง เกิดวันที่ 28 พฤษภาคม 2516 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาระดับอนุปริญญาวิชาชีพสัตวแพทย์ จากโรงเรียนสัตวแพทย์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์เมื่อปี พ.ศ. 2536 และสำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเพาะขยายพันธ์สัตว์) จากสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2540 และเข้าศึกษาในสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาคณะการแพทย์ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อ พ.ศ. 2540