

สปีชีส์และการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Enterococci* ที่พบในสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นิชา เจริญศรี^{1*}, วรวิทย์ เลิศธรรมา², บัณฑิต พรหมรักษา², ลำไย วงศ์ครุ³
สุจิตา เคนพรม³, พรกัญญา ปันล่อ¹, โชติชนะ วิไลลักษณ์¹

Received: March 6, 2014

Revised & Accepted: April 29, 2014

บทคัดย่อ

Enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจจากเชื้อกลุ่ม *staphylococci* ปัจจุบันการวินิจฉัยสปีชีส์ของเชื้อ *Enterococcus* มีความสำคัญมากขึ้นเนื่องจากแต่ละสปีชีส์ดื้อยาต้านจุลชีพต่างกัน และเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล การวินิจฉัยสปีชีส์โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต้องใช้การทดสอบมากกว่า 10 ชนิด ทำให้ค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานาน การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR จำนวน 2 ชุดปฏิกิริยาที่จำเพาะกับยีน *16S rRNA*, *sodA*, *ddl*, *vanC-1*, *vanC-2/vanC-3*, และ *groEL* ซึ่งสามารถวินิจฉัย *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, และ *Enterococcus* spp. และนำมาใช้ในการวินิจฉัยตัวอย่างเชื้อ *enterococci* จำนวน 396 ตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และวิเคราะห์ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแต่ละสปีชีส์ ผลการศึกษาพบเชื้อ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, และ *Enterococcus* spp. ในอัตราร้อยละ 62.6, 32.3, 0.8, 0.5, 0.3, และ 3.5 ตามลำดับ เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มาจากปัสสาวะ สำหรับการดื้อยาของเชื้อ *E. faecalis* ส่วนใหญ่มีรูปแบบการดื้อยาร่วมกันของยา gentamycin, tetracycline, และ ciprofloxacin ส่วนเชื้อ *E. faecium* มากกว่าครึ่งมีการดื้อยาร่วมกันของยา ampicillin, penicillin, gentamycin, tetracycline, และ ciprofloxacin ข้อมูลสปีชีส์และการดื้อยาของเชื้อที่พบนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานของประชากรเชื้อในภูมิภาค เป็นประโยชน์ต่อการบริหารแนวทางการรักษา ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา

คำสำคัญ: เชื้อเอนเทอโรคอคคัส, สปีชีส์, Multiplex PCR, การดื้อยา

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ²นักศึกษาชั้นปีที่ 4 ระดับปริญญาตรี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ³หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Species and drug resistance of clinical *enterococci* isolates from Srinagarind Hospital, Khon Kaen University

Nicha Charoensri^{1*}, Worrawalan Lerttam², Bundit Promraksa², Lumyai Wonglakorn³,
Suthida Kenprom³, Porntip Pinlaor¹, Chotchana Wilailuckana¹

Abstract

Enterococci are medically important Gram positive coccal bacteria. These bacteria are frequently found from clinical samples. Species of *enterococci* inherit different drug resistance properties and multi-drug resistant enterococci have emerged as a leading cause of nosocomial infection. Conventional method for species identification of these organisms requires more than 10 biochemical tests which is costly and time consuming. Therefore, this study aimed to elucidate species distribution and drug resistance of enterococci by employing 2 sets of multiplex PCR using specific primers to detect the *16S rRNA*, *sodA*, *ddl*, *vanC-1*, *vanC-2/vanC-3*, and *groEL* genes for identification of enterococcal species. Bacterial isolates were obtained from Clinical Microbiology Laboratory of Srinagarind Hospital, Khon Kaen University. A total of 396 enterococci were identified as *E. faecalis* (62.6%), *E. faecium* (32.3%), *E. avium* (0.8%), *E. gallinarum* (0.5%), *E. casseliflavus* (0.3%), and other enterococci (3.5%). Most enterococcal isolates were obtained from urine samples. *E. faecalis* showed drug resistant pattern of gentamycin, tetracycline, ciprofloxacin, while most *E. faecium* were resistant to ampicillin, penicillin, gentamycin, tetracycline, and ciprofloxacin. Species prevalence and drug resistance of enterococci from this study could be used as a basic information of enterococcal population in the region for controlling treatment management and preventing the spread of drug resistant strains.

Keywords : *Enterococcus*, Species, Multiplex-PCR, Drug resistance

¹Centre for Research and Development of Medical Diagnostics Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, ²Fourth year student, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, ³Clinical Microbiology Laboratory, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

* Corresponding author: (e-mail: nicha@kku.ac.th)

บทนำ

Enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม เชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในอัตราที่สูงรองจากเชื้อ *staphylococci* มักทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด และการติดเชื้อของแผลผ่าตัด^(1, 2) สปีชีส์ของเชื้อ *Enterococci* ที่มักพบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ คือ *E. faecalis* และ *E. faecium* โดยมีรายงานในอัตราร้อยละ 60-90 และ 5-35 ตามลำดับ ส่วนสปีชีส์อื่นที่พบก่อโรคได้บ้าง เช่น *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. avium*, และ *E. durans* เป็นต้น^(3, 4) ข้อมูลสปีชีส์และอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Enterococcus* เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่ควรมีการศึกษาติดตามให้มีความทันสมัย เพื่อประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อและการรักษา เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้มีรายงานเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลมากขึ้น และมีรายงานการแพร่กระจายในโรงพยาบาลในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก⁽⁵⁻⁷⁾ แต่การวินิจฉัยสปีชีส์โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีตามแนวทางของ Facklam and Collins (1989)⁽⁸⁾ ใช้การทดสอบถึง 14 ชนิด ส่วนการวินิจฉัยสปีชีส์ของ *Enterococcus* ตามแนวทางของ Gilmore (2002)⁽⁴⁾ ใช้การทดสอบถึง 17 ชนิด เพื่อจำแนกเชื้อจำนวน 21 สปีชีส์ ซึ่งการทดสอบทางชีวเคมีที่มากเช่นนี้นับเป็นข้อจำกัดในการศึกษาเชื้อจำนวนมาก

เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลได้รับการพัฒนามานำมาใช้วินิจฉัยสปีชีส์ของเชื้อ *Enterococcus* รายงานที่น่าสนใจจากการศึกษาของ Dutka-Malen และคณะ⁽⁹⁾ ใช้ primer ต่อยีน *ddl*, *vanC-1*, และ *vanC-2/vanC-3* ในการวินิจฉัยสปีชีส์ที่สำคัญ ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, และ *E. casseliflavus* โดยใช้เทคนิค simplex PCR ต่อมาการศึกษาของ Jackson และคณะ⁽¹⁰⁾ ใช้ primer ต่อยีน *sodA* ด้วยเทคนิค multiplex PCR จำนวน 7 ชุด ในการวินิจฉัย 23 สปีชีส์ แต่พบการรบกวนผลของปฏิกิริยาจาก primer ที่จำเพาะต่อยีนเดียวกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงประยุกต์ปฏิกิริยา multiplex PCR ใช้ primer ที่จำเพาะกับยีนแตกต่างกันจากการศึกษาของ Dutka-Malen และคณะ⁽⁹⁾ ร่วมกับ Jackson และคณะ⁽¹⁰⁾ สำหรับวินิจฉัย *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, และ *E. casseliflavus* ร่วมกับ primer ที่ออกแบบสำหรับวินิจฉัยเชื้อ *E. avium* โดยศึกษาเชื้อตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก ของโรงพยาบาล

ศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อให้ทราบข้อมูลสปีชีส์และอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อในภูมิภาค

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเชื้อจากหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ที่ให้ลักษณะแกรมบวกรูปร่างกลม ให้ผลการทดสอบคาตาเลสเป็นลบ และให้ผลการทดสอบ bile esculin เป็นบวก ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อในช่วง พ.ศ. 2554-2555 จำนวน 403 ตัวอย่าง

การเตรียมดีเอ็นเอ

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน brain heart infusion broth (Hardy Diagnostics, สหรัฐอเมริกา) ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นดูดเอาอาหารส่วนบนออกให้หมด แล้วเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ให้เชื้อกระจาย นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที หลังจากนั้นปั่นที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนบนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การวินิจฉัยสปีชีส์ของ *Enterococcus* ด้วยวิธี multiplex PCR

ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอในปริมาตร 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP 0.2 mM, primer 1 μM , Taq polymerase (New England BioLabs, สหรัฐอเมริกา) 0.6 Unit, และ 1 ไมโครลิตร ของตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยขั้นตอนปฏิกิริยาประกอบด้วย denaturation ขั้นแรกที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วเข้าสู่รอบการเพิ่มจำนวน 35 รอบที่ประกอบด้วย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้น annealing นาน 30 วินาที โดยใช้อุณหภูมิ 52, 49, และ 55 องศาเซลเซียส สำหรับ multiplex PCR ชุดที่ 1, 2, และ 3 ตามลำดับ ขั้น extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 35 วินาที และ extension ขั้นสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที โดย primer สำหรับ multiplex PCR ชุดที่ 1, 2, และ 3 มีรายละเอียดใน ตารางที่ 1 ส่วนการวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ ใช้การแยกในสนามไฟฟ้าในตัวกลาง 1.5% agarose gel

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการศึกษานี้

ชุดที่	primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความจำเพาะ
1	16S rRNA-ENT	F TCAACCGGGGAGGGT	<i>Enterococcus</i> ⁽¹¹⁾
		R ATTACTAGCGATTCCGG	
	sodA	F CTTATGTGACTAACTTAAA	<i>E. faecalis</i> ⁽¹⁰⁾
		R AATGGTGAATCTTGGTTTG	
	ddl	F CAAGGCTTCTTAGAGAC	<i>E. faecium</i> (ดัดแปลงจาก 9)
		R CATCGTGTAAGCTAACTTC	
2	vanC-1	F GGTATCAAGGAAACCTC	<i>E. gallinarum</i> ⁽⁹⁾
		R CTTCCGCCATCATAGCT	
	vanC-2/vanC-3	F CTCCTACGATTCTCTTG	<i>E. casseliflavus</i> ⁽⁹⁾
		R CGAGCAAGACCTTTAAG	
	groEL	F CTTGAAGATATCGCAATC	<i>E. avium</i> (ออกแบบในการศึกษานี้)
		R CACGTGTTGAGTTTAAG	
3	23S rRNA-Strep	F AGCTTAGAAGCAGCTATTCATTC	<i>Streptococcus</i> spp. ⁽¹²⁾
		R GGATACACCTTTCGGTCTCTC	
	16S rRNA-GP	F CGTGCCTAATACATGCAAG	Gram positive bacteria (ออกแบบในการศึกษานี้)
		R CCAATAAATCCGGACAACG	

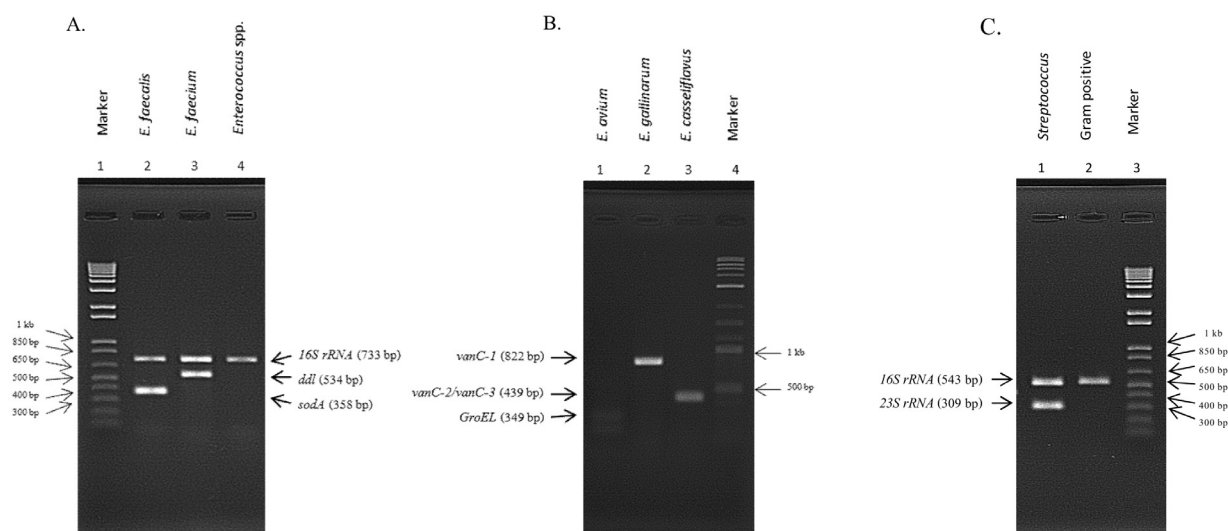
การทำ multiplex PCR ชุดที่ 1 ใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA, ddl, และ sodA สำหรับการวินิจฉัยยีสต์ *Enterococcus*, *E. faecium*, และ *E. faecalis* ตามลำดับ โดยมี product ขนาด 733, 534, และ 358 bp ตามลำดับ (รูปที่ 1A) หาก multiplex PCR ชุดที่ 1 พบเฉพาะแถบขนาด 733 bp จะทำการทดสอบต่อด้วย multiplex PCR ชุดที่ 2 ที่ใช้ primer จำเพาะกับยีน vanC-1, vanC-2/vanC-3, และ groEL สำหรับวินิจฉัย *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, และ *E. avium* ตามลำดับ โดยมี product ขนาด 822, 439, และ 349 bp ตามลำดับ (รูปที่ 1B) ในกรณีที่ multiplex PCR ชุดที่ 1 ไม่ปรากฏแถบ product จะทำ multiplex PCR ชุดที่ 3 สำหรับวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *Streptococcus* spp. หรือเชื้อแกรมบวกอื่นๆโดยเชื้อ *Streptococcus* จะปรากฏแถบขนาด 309 bp ร่วมกับแถบขนาด 543 bp ส่วนเชื้อแกรมบวกอื่นๆ จะปรากฏเฉพาะแถบขนาด 543 bp (รูปที่ 1C)

เชื้อที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพการทดสอบ ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*,

E. avium, *Streptococcus pyogenes*, และ *Lactococcus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้รับการวินิจฉัยชนิดโดยเครื่อง Vitek 2 (bioMérieux, สหรัฐอเมริกา) จากหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์

ข้อมูลสิ่งส่งตรวจ, ชนิดเชื้อที่พบร่วมในสิ่งส่งตรวจ และผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ข้อมูลจากระบบฐานข้อมูลห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ (MLAB program) ได้แก่ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ, ชนิดเชื้อที่พบร่วมในสิ่งส่งตรวจ และผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion method กับสารต้านจุลชีพ ได้แก่ ampicillin, penicillin, tetracycline, gentamicin, ciprofloxacin, fosfomycin, vancomycin, และ tigecycline และแปลผลตามเกณฑ์ของสถาบัน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽¹³⁾ ข้อมูลเหล่านี้นำมาวิเคราะห์ร่วมกับสปีชีส์ของเชื้อที่วินิจฉัยด้วย multiplex PCR



รูปที่ 1 ขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา multiplex PCR

- A. ผลจากปฏิกิริยา multiplex 1 โดยหมายเลข 1 คือ DNA marker, หมายเลข 2, 3, และ 4 คือ แถบดีเอ็นเอที่วินิจฉัยเชื่อเป็น *E. faecalis*, *E. faecium*, และ *Enterococcus* spp. ตามลำดับ
- B. ผลจากปฏิกิริยา multiplex 2 โดยหมายเลข 1, 2, และ 3 คือ แถบดีเอ็นเอที่วินิจฉัยเชื่อเป็น *E. avium*, *E. gallinarum*, และ *E. casseliflavus* ตามลำดับ และ หมายเลข 4 คือ DNA marker
- C. ผลจากปฏิกิริยา multiplex 3 โดยหมายเลข 1 และ 2 คือ แถบดีเอ็นเอที่วินิจฉัยเชื่อเป็น *Streptococcus* spp. และ Gram positive cocci ชนิดอื่นๆ และ หมายเลข 3 คือ DNA marker

ผลการศึกษา

สปีชีส์ของเชื้อ *Enterococcus* และ การกระจายของเชื้อสปีชีส์ในสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ

ผลการวินิจฉัยตัวอย่างเชื้อ 403 ตัวอย่าง พบว่าเป็น *Enterococcus*, *Streptococcus*, และ Gram positive cocci ชนิดอื่นๆ จำนวน 396, 5, และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ

โดยสปีชีส์ของ *Enterococcus* วินิจฉัยได้เป็น *E. faecalis* จำนวน 248 ตัวอย่าง (62.6%), *E. faecium* 128 ตัวอย่าง (32.3%), *E. avium* 3 ตัวอย่าง (0.8%), *E. gallinarum* 2 ตัวอย่าง (0.5%), *E. casseliflavus* 1 ตัวอย่าง (0.3%), และ *Enterococcus* spp. 14 ตัวอย่าง (3.5%) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สปีชีส์ และจำนวนเชื้อ *Enterococcus* ในสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ

ชนิด สิ่งส่งตรวจ	จำนวนตัวอย่าง						รวม (ร้อยละ)
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	
ปัสสาวะ	175	98	1	2	0	3	279 (70.5)
หนอง	40	15	0	0	0	5	60 (15.1)
เลือด	2	4	0	0	0	0	6 (1.5)
อื่นๆ	31	11	2	0	1	6	51 (12.9)
รวม (ร้อยละ)	248 (62.6)	128 (32.3)	3 (0.8)	2 (0.5)	1 (0.3)	14 (3.5)	396 (100)

เชื้อ *Enterococcus* แยกได้จากตัวอย่างปัสสาวะมากที่สุด คือ 279 ตัวอย่าง (ร้อยละ 70.5) และรองลงมา คือ หนอง 60 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.1), เลือด 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.5), และ ตัวอย่างอื่นๆ 51 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.9) โดยสัดส่วนของ *E. faecalis* ต่อ *E. faecium* ที่พบในตัวอย่างปัสสาวะ ประมาณ 2 ต่อ 1 ในขณะที่ตัวอย่างหนอง และ ตัวอย่างอื่นๆ จะมีสัดส่วนระหว่าง *E. faecalis* ต่อ *E. faecium* ประมาณ 3 ต่อ 1 แต่ *E. faecium* พบในตัวอย่างเลือดมากกว่า *E. faecalis* (ตารางที่ 2)

การพบเชื้อ *Enterococcus* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ

E. faecalis จำนวน 168 ตัวอย่าง พบร่วมกับเชื้อชนิดอื่นๆ และ *E. faecium* 63 ตัวอย่างที่พบร่วมกับเชื้อชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 3) โดยเชื้อที่พบว่าร่วมกับ *E. faecalis* จำนวนมากที่สุด คือ *Escherichia coli* 51 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumoniae* จำนวน 22 และ 21 ตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่พบร่วมกับ *E. faecium* นั้นส่วนใหญ่เป็น ยีสต์ (24 ตัวอย่าง) และ *E. coli* (10 ตัวอย่าง) สำหรับ *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, และ *Enterococcus* spp. จะพบร่วมกับเชื้อ *E. coli* เช่นกัน

ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนเชื้ออื่นๆที่แยกได้ร่วมกับเชื้อ *Enterococcus* spp. จากสิ่งส่งตรวจ

เชื้อที่พบร่วม	จำนวนตัวอย่างที่พบ						รวม
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseli-flavus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	
<i>Staphylococcus</i> coagulase negative	10	5	-	-	-	-	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	1	-	-	-	-	9
Viridans streptococci	2	-	-	-	-	-	2
<i>Enterococcus</i> spp.	13	4	1	-	-	-	18
<i>Escherichia coli</i>	51	10	-	1	1	1	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21	3	-	-	-	-	24
<i>Klebsiella</i> spp.	4	-	-	-	-	-	4
<i>Enterobacter</i> spp.	10	1	-	-	-	-	11
<i>Proteus mirabilis</i>	2	-	-	-	-	-	2
<i>Providencia</i> spp.	2	-	-	-	-	-	2
<i>Morganella morganii</i>	3	-	-	-	-	-	3
<i>Citrobacter diversus</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>Citrobacter freundii</i>	-	2	-	-	-	-	2
<i>Salmonella</i> spp. serogroup E	1	-	-	-	-	-	1

ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนเชื้ออื่นๆที่แยกได้ร่วมกับเชื้อ *Enterococcus* spp. จากสิ่งส่งตรวจ (ต่อ)

เชื้อที่พบร่วม	จำนวนตัวอย่างที่พบ						รวม
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseli-flavus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22	4	-	-	-	-	26
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	-	-	-	-	-	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	5	-	-	-	-	10
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	1	-	-	-	-	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	1	-	-	-	-	1
Yeast	1	7	-	-	-	-	8
<i>Candida albicans</i>	6	10	-	-	-	-	16
<i>Candida tropicalis</i>	1	7	-	-	-	-	8
Other fungus	-	2	-	-	-	-	2
รวม	168	63	1	1	1	1	235

การดื้อยาต้านจุลชีพ

อัตราการดื้อยาโดยภาพรวมของ *Enterococcus* พบว่ามีการดื้อต่อยา tetracycline ในอัตราสูงที่สุดคือ ร้อยละ 87.8 รองลงมาคือ ciprofloxacin (ร้อยละ 67.8), gentamicin (ร้อยละ 56.2) และ penicillin (ร้อยละ 48.7) ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ส่วนยาที่มีการดื้อยาต่ำที่สุดคือ vancomycin พบในอัตราร้อยละ 0.7 สำหรับอัตราการดื้อยาของ *E. faecium* พบมีการดื้อยาเกือบทุกชนิดในอัตราที่สูงกว่า *E. faecalis* สำหรับ *E. avium* และ *E. casseliflavus* มีความไวกับยาทุกชนิดที่ทดสอบแต่เชื้อสองสปีชีส์นี้มีตัวอย่างทดสอบน้อย กรณีของ *E. gallinarum* มีการดื้อยาเกือบทุกชนิดยกเว้น gentamicin และ fosfomycin

ลักษณะของการดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus* แต่ละสปีชีส์ พบว่ามีรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน โดยเชื้อ *E. faecium* มีการดื้อยาลาอย่างน้อย 5 ชนิดพร้อมกัน รูปแบบการดื้อยาที่พบมากที่สุด (ร้อยละ 59.5) เป็นแบบ TET, GEN, PEN, AMP, CIP ส่วน *E. faecalis* มักดื้อยาลาอย่างน้อยชนิดกว่า *E. faecium* โดยส่วนใหญ่ดื้อยารูปแบบ TET, GEN, CIP (31.9%) และรูปแบบ TET, GEN, PEN, CIP (ร้อยละ 23.6) ดังแสดงใน ตารางที่ 5

ตารางที่ 4 การด้อยของเชื้อ *Enterococcus*

ยาปฏิชีวนะ	จำนวนตัวอย่างที่ด้อย / จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ (ร้อยละ)						รวม
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	
Penicillin	54/195 (27.7)	91/93 (97.9)	0/2 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	2/12 (16.7)	148/304 (48.7)
Ampicillin	12/196 (6.1)	92/95 (96.8)	0/2 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/12 (8.3)	106/307 (34.5)
Tetracycline	62/72 (86.1)	37/37 (100)	0/2 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/2 (50.0)	101/115 (87.8)
Gentamicin	105/196 (53.6)	67/94 (71.3)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/12 (0)	172/306 (56.2)
Ciprofloxacin	114/194 (58.8)	91/94 (96.8)	0/2 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/12 (0)	206/304 (67.8)
Fosfomycin	4/143 (2.8)	10/62 (16.1)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/7 (0)	14/216 (6.5)
Vancomycin	0/197 (0)	1/94 (1.1)	0/2 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/12 (0)	2/307 (0.7)
Tigercycline	2/123 (1.6)	0/57 (0)	nd	nd	nd	2/10 (20)	4/190 (2.1)

nd หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 5 รูปแบบและจำนวนการดื้อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* สปีชีส์ต่างๆ

จำนวนยา	รูปแบบการดื้อยา	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)	
		<i>E. faecalis</i> n = 65	<i>E. faecium</i> n = 37
6	TET, GEN, PEN, AMP, CIP, FOS	-	5 (13.5)
	TET, GEN, PEN, AMP, CIP, VAN	-	1 (2.7)
5	TET, GEN, PEN, AMP, CIP	-	22 (59.5)
	TET, PEN, AMP, CIP, FOS	-	1 (2.7)
4	TET, GEN, PEN, AMP	-	1 (2.7)
	TET, GEN, PEN, CIP	17 (26.2)	1 (2.7)
	TET, GEN, AMP, CIP	-	1 (2.7)
	TET, PEN, AMP, CIP	-	4 (10.8)
	TET, PEN, CIP, FOS	1 (1.5)	-
3	TET, GEN, CIP	23 (35.4)	1 (2.7)
	TET, GEN, FOS	1 (1.5)	-
	TET, GEN, PEN	1 (1.5)	-
2	TET, CIP	4 (6.2)	-
	TET, GEN	4 (6.2)	-
	CIP, GEN	1 (1.5)	-
1	TET	11 (16.9)	-
	CIP	2 (3.1)	-

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

เทคนิคการวินิจฉัยสปีชีส์ของแบคทีเรียแบ่งได้ 2 แนวทาง คือ การวินิจฉัยจากคุณสมบัติทางฟิโนทัยป์ และการวินิจฉัยจากคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ การศึกษานี้เลือกใช้การวินิจฉัยจากคุณสมบัติทางจีโนทัยป์โดยใช้เทคนิค multiplex PCR เนื่องจากมีความสะดวก ให้ผลรวดเร็ว รวมทั้งเสียค่าใช้จ่ายน้อยสำหรับการศึกษาเชื้อจำนวนมากในคราวเดียว ในส่วนความถูกต้องของการวินิจฉัยมาจากการเลือกใช้ primer ที่มีรายงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับ^(9,10) นอกจากนี้เพื่อลดโอกาสของการรบกวนกันระหว่าง primer จึงเลือกใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนต่างกันมาประยุกต์ และเน้นการวินิจฉัย 2 สปีชีส์ที่พบได้บ่อยก่อนคือ *E. faecalis* และ *E. faecium* ทำให้สามารถวินิจฉัยเชื้อมากกว่าร้อยละ 95 โดยใช้ปฏิกิริยา multiplex PCR ใน 1 หลอดแรก ซึ่งพบว่าให้ผลแถบดีเอ็นเอ

ชัดเจน ใช้วินิจฉัยแยกได้ง่าย สำหรับ *Enterococcus* สปีชีส์ที่พบได้น้อยที่การศึกษานี้ให้ความสำคัญคือ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติตามธรรมชาติดื้อยา vancomycin^(14, 15) สำหรับ *E. avium* ถึงแม้จะมีรายงานไม่บ่อยแต่มีความสำคัญเนื่องจากมักทำให้เกิดการติดเชื้อปอดในสมอง⁽¹⁶⁾ จากผล multiplex PCR ของ *E. avium* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 349 bp ที่ไม่ชัดเจน รวมทั้งพบแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กกว่า 349 bp รวมด้วย ซึ่งการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจะช่วยให้คำตอบว่าชิ้นดีเอ็นเอนี้มาจากยีนใด และควรศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมใหม่ต่อไป ส่วนการวินิจฉัย *E. raffinosus*, *E. hirae*, และ *E. durans* ไม่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้เนื่องจากขนาดชิ้นดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนในการศึกษาของ Jackson และคณะ⁽¹⁰⁾ มีขนาดเล็กใกล้เคียงกันมาก (287, 187, และ 295 bp ตามลำดับ) จึงไม่เหมาะในการนำมาประยุกต์กับ

ปฏิกิริยา multiplex PCR ในปฏิกิริยาเดียวกัน สำหรับเชื้อที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นแกรมบวก ทรงกลมหรือรี ให้ผลการทดสอบคาตาเลสและผลการทดสอบ bile esculin เป็นบวกที่ไม่ใช่ *enterococci* ได้ทำการวินิจฉัยโดย primer ที่จำเพาะกับยีน *Streptococcus* และ แกรมบวกอื่นๆเพื่อยืนยันคุณภาพตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา

ความชุกของสปีชีส์ *E. faecalis* และ *E. faecium* และอัตราการดื้อยา penicillin, ampicillin, และ gentamicin ที่พบในการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Thapa⁽¹⁷⁾ ซึ่งเก็บตัวอย่างเชื้อระหว่าง พ.ศ. 2548-2550 จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นเช่นกัน และทำการวินิจฉัยสปีชีส์โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี สิ่งที่น่าสังเกตคือลักษณะประชากรของเชื้อก่อโรคสองสปีชีส์นี้ในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความคงตัวในช่วง 5-6 ปีที่ผ่านมา สำหรับความชุกของเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* ของภูมิภาคอื่นในประเทศไทยมีรายงาน เช่น การศึกษาของ Chayakul P และคณะ⁽¹⁸⁾ ใช้ตัวอย่างเชื้อที่เก็บเมื่อ พ.ศ. 2546 จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พบ *E. faecalis* ร้อยละ 87.8 และ *E. faecium* ร้อยละ 12.2 ในขณะที่การศึกษาของ Sangsuk และคณะ⁽¹⁹⁾ เก็บเชื้อระหว่างปี พ.ศ. 2543-2548 จากโรงพยาบาลทั่วประเทศ จำนวน 28 แห่ง พบ *E. faecalis* ร้อยละ 47 และ *E. faecium* ร้อยละ 23 และ *E. faecium* มีอัตราการดื้อยา ampicillin และ gentamicin เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ข้อมูลที่แตกต่างกันนี้อาจมาจากปัจจัยของสภาพทางภูมิศาสตร์ ประชากร และช่วงเวลาในการศึกษา ดังนั้นในแต่ละภูมิภาคควรทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลพื้นฐาน เช่น ความชุกของสปีชีส์และการดื้อยาของเชื้อ *enterococci* ของตนเองเพื่อเป็นข้อมูลในการบริหารจัดการเชื้อก่อโรคในกลุ่มนี้ และควรทำการศึกษาระยะอย่างต่อเนื่องเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของอัตราการดื้อยา

ปัญหาการดื้อยา vancomycin ของเชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* เป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมาก เนื่องจากมักพบว่าเชื้อทำให้เกิดการระบาดของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตในผู้ป่วย^(5,20) แต่การบริหารจัดการที่มีประสิทธิภาพสามารถควบคุมการแพร่ระบาดและการติดเชื้อได้⁽²¹⁾ สำหรับการศึกษาของ Thapa พบอัตราการดื้อยา vancomycin เพียงร้อยละ 1.7 และในการศึกษานี้พบเพียง 1 ตัวอย่างของเชื้อ *E. faecium* และเชื้อ *E. gallinarum*

ที่ดื้อต่อยา vancomycin นับว่าพบอัตราการดื้อยาที่ต่ำ เป็นที่น่าทึ่งว่าการดื้อยา vancomycin ของ *E. gallinarum* มาจากพันธุกรรมที่อยู่ในโครโมโซมและเป็นลักษณะพันธุกรรมดั้งเดิม⁽¹⁵⁾ สำหรับการศึกษา vancomycin ของ *E. faecium* ควรมีการศึกษาต่อกำหนดโดยยีนดื้อยาชนิดใด เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการติดตามเชื้อดื้อยาที่มีโอกาสพบในอนาคต

ถึงแม้ว่าเชื้อ *E. faecalis* พบเป็นเชื้อก่อโรคได้ในอัตราที่สูงกว่าเชื้อ *E. faecium* แต่การดื้อยาของ *E. faecium* มีลักษณะดื้อยาหลายชนิดมากกว่าเชื้อ *E. faecalis* ข้อมูลนี้สอดคล้องกับข้อมูลเชื้อจากรายงานของต่างประเทศ⁽²⁾ ลักษณะพื้นฐานของเชื้อเช่นนี้อาจบ่งบอกศักยภาพของเชื้อในการรับยีนดื้อยาได้ดี และการแพร่ระบาดของสายพันธุ์ที่ดื้อยา ดังเช่นเชื้อ *E. faecium* มากกว่าครึ่งมีการดื้อยาแบบ TET, GEN, PEN, AMP, CIP มีข้อที่น่าสังเกตว่าการแยกเชื้อ *Enterococcus* spp. มักพบร่วมกับจุลินทรีย์อื่นๆทั้งแบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งมีศึกษาของ Desai และคณะ ในปี 2001⁽²²⁾ พบว่ามีการติดเชื้อ *Enterococcus* ร่วมกับเชื้ออื่นๆในการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ สิ่งนี้อาจบ่งชี้ถึงการพึ่งพาอาศัยกันระหว่าง *Enterococcus* spp. กับจุลินทรีย์อื่นๆในการรุกรานระบบป้องกันของร่างกาย

โดยสรุปจากการศึกษานี้ใช้เทคนิค multiplex PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *sadA*, *ddl*, *vanC-1*, และ *vanC-2/vanC-3* วินิจฉัยสปีชีส์ของเชื้อกลุ่ม *enterococci* จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก พบเชื้อ *E. faecalis* ในอัตราสูงสุด รองลงมาคือเชื้อ *E. faecium* โดยรวมเชื้อสองสปีชีส์นี้มีอัตราถึงร้อยละ 95 ส่วนสปีชีส์อื่นที่พบด้วย คือ *E. avium*, *E. gallinarum*, และ *E. casseliflavus* สำหรับอัตราการดื้อยานั้นพบว่าเชื้อ *E. faecium* มีอัตราการดื้อยาสูงกว่า *E. faecalis* รูปแบบการดื้อยาของ *E. faecalis* ที่พบมากที่สุดคือการดื้อยาร่วมกันของ gentamycin, tetracycline, และ ciprofloxacin ส่วนเชื้อ *E. faecium* มีรูปแบบการดื้อยาร่วมกันของ ampicillin, penicillin, gentamycin, tetracycline, และ ciprofloxacin มากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์, คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและโครงการพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 2009; 155: 1749-57.
2. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol 2012; 10: 266-78.
3. Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32: 133-45.
4. Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington DC: ASM Press; 2002.
5. Lee SC, Wu MS, Shih HJ, Huang SH, Chiou MJ, See LC, et al. Identification of vancomycin-resistant enterococci clones and inter-hospital spread during an outbreak in Taiwan. BMC Infect Dis 2013; 13: 163.
6. Cheng VC, Tai JW, Ng ML, Chan JF, Wong SC, Li IW, et al. Extensive contact tracing and screening to control the spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST414 in Hong Kong. Chin Med J 2012; 125: 3450-7.
7. Porto JP, Mantese OC, Arantes A, Freitas C, Gontijo Filho PP, et al. Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country: NHSN surveillance. Rev Soc Bras Med Trop 2012; 45: 475-9.
8. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989; 27: 731-4.
9. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 24-7.
10. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microbiol 2004; 42: 3558-65.
11. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Beresford TP. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. Syst Appl Microbiol 2000; 23: 510-22.
12. Sakaguchi S, Saito M, Tsuji H, Asahara T, Takata O, Fujimura J, et al. Bacterial rRNA-targeted reverse transcription-PCR used to identify pathogens responsible for fever with neutropenia. J Clin Microbiol 2010; 48: 1624-8.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First. Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA. 2011.
14. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 2005-8.
15. Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1675-7.
16. Park SY, Park KH, Cho YH, Choi SH. Brain abscess caused by *Enterococcus avium*: a case report and review of the literature. Infect Chemother 2013; 45: 335-8.
17. Thapa B, Tattawasart U, Manjai A, Chantarasuk Y. Antimicrobial resistance and species prevalence of enterococcal isolates in Srinagarind Hospital, Northeastern Thailand. KKU Res J 2007; 7: 97-107.

18. Chayakul P, Hortiwakul R, Ingviya N, Chayakul V. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci in hospitalized patients in Southern Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 2007; 24: 49-54.
19. Sangsuk L, Dejsirilert S, Sawanpanyalert P, Aswapokee N, Jariyasethpong T. Antimicrobial susceptibility of enterococci in Thailand from 2000 to 2005. *J Med Assoc Thai* 2009; 92: S1-S7.
20. Cho SY, Lee DG, Choi SM, Kwon JC, Kim SH, Choi JK, et al. Impact of vancomycin resistance on mortality in neutropenic patients with enterococcal bloodstream infection: a retrospective study. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 504.
21. Matsushima A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Shirano M, Nagao M, et al. Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1095-100.
22. Desai PJ, Pandit D, Mathur M, Gogate A. Prevalence, identification and distribution of various species of enterococci isolated from clinical specimens with special reference to urinary tract infection in catheterized patients. *Indian J Med Microbiol* 2001; 19: 132-7.