

การเปลี่ยนแปลงของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัสเฟนิซิลลิน จี *

เมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อนาน ๆ

เนตร สุวรรณภักดี วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)**

กัมพล พันธุ์อำพล พ.บ.**

เชื้อสแตฟิโลค็อกคัสที่สามารถทำให้
พลาสมาแข็งตัว (Coagulase positive) ทำให้
เกิดโรคกับกระต่ายได้เมื่อเลี้ยงเชื้อ ไปพบ
ว่าบางโคโลนีไม่สามารถทำให้ พลาสมา แข็ง
ตัว (Coagulase negative) และอำนาจที่เกย
ทำให้เกิดโรคกับกระต่ายก็เสียไปด้วย (Kapral
และ Li, 1960) เชื้อสแตฟิโลค็อกคัสที่มี
ความไวต่อเพนิซิลลินจีเมื่อเพาะบนอาหารที่
มียา เมริซิลลินและมีความเข้มข้นของเกลือ
แกง (Sodium chloride) สูงจะทำให้เชื้อ
สแตฟิโลค็อกคัสเปลี่ยนจากรูปเดิม
เป็นรูป L-form (Kagan และ พวก
1962) สมัยแรกๆ การรักษากันใช้เนื่องจาก
คิดเชื้อสแตฟิโลค็อกคัสเขา ไซยา เพนิซิลลิน
ปรากฏว่าได้ผลดีและค่อยๆ มาเชื้อสแตฟิโล-
ค็อกคัสเกิดก็ต่อเพนิซิลลิน (Knox และ พวก
1961) ได้มีผู้คิดค้นยาเพนิซิลลินใหม่ขึ้น
มาคือเมริซิลลิน เพื่อรักษาคนไข้ที่ติดเชื้อ
สแตฟิโลค็อกคัสชนิดต่อเพนิซิลลิน (Knox

1960) ต่อมาก็พบการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ
สแตฟิโลค็อกคัส คือเกิดก็ต่อยาเมริซิลลิน
และกลายชาซิลลินอีกด้วย (Stewart และ พวก
1963)

วิธีการและการทดสอบ

เชื้อสแตฟิโลค็อกคัสที่นำมาศึกษา แยก
ได้จากคนไข้ที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่เป็น
จำนวน 100 ราย จากตัวอย่างตรวจต่าง ๆ
กันจากคนไข้ (ตาราง 1) เมื่อแยกเชื้อเป็น
Pure culture แล้วก็เอามาทดสอบความไว
กับเพนิซิลลิน จี จากนั้นก็เลี้ยงเชื้อในหลอด
แก้วบนบดเคอาร์เบส (Difco ส่วนผสมของ
อาหารมี บิฟาร์ท อินฟูชั่น, ทริปโทส,
เกลือแกงและเอคาร์) เอาเข้าตู้ อบที่ 37 องศา
เซ็นติเกรดนาน 18-24 ชม. แล้วเอา
เก็บไว้ในห้องอุณหภูมิธรรมดานาน 24 ชม.
หลังจากนั้นเก็บเข้าตู้เย็นที่ 10 องศาเซ็นติ-
เกรดและถ่ายเชื้อทุกๆ 3 เดือนลงบนบดเคอาร์-
เบส

* เพนิซิลลิน จี ไซเค็ม ของ Dumex Co., Ltd. Bangkok

** แผนกจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์เชียงใหม่

เชื้อสแตฟีโลคอคโคทั้งหมคน้เราได้ทดสอบกับพลาสติกของคน โดยวิธี Tube method แล้วปรากฏผลให้โคแอกกูเลสผลบวกทุกราย และเป็นพวกเบคตาเฮโมไลซิสแบบล็กเอการ์เพลต

การทดสอบความไวต่อเพนิซิลลิน จี ใช้วิธี Tube Dilution method (Bailey และ Scott, 1962) โดยคัดแปลงใหม่ ใช้เพนิซิลลิน จี นำมาเจือจางด้วย น้ำกลั่นที่ปราศจากแร่ (Deminerize water) ให้ได้ความเข้มข้น 200 ยูนิตต่อ 1 ม.ล. จากเพนิซิลลิน 200 ยูนิตทำให้เจือจางลงในหลอดแก้วด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแร่เป็นเท่าตัวไปตามลำดับจนได้ 9 หลอด (เตรียมไว้เป็นชุด) แล้วคูกยาที่เจือจางแล้วใส่หลอดขนาด 10×100 ม.ม. เป็นชุดๆ ชุดละ 9 หลอด ส่วนหลอดที่ 10 เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากแร่แทนหลอดละ 0.5 ม.ล. ทั้งหมดจะมีความเข้มข้นจากหลอดที่ 1 ถึงที่ 9 ดังนี้ 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 และ 0.78 ยูนิตต่อ 1 ม.ล. ตามลำดับ เชื้อที่จะทดสอบเราเอาจาก Pure Culture ถ่ายเชื้อลงทริบคิเคส ซอย บรอร์ นำไปเข้าตู้อบนาน 16-18 ชม. แล้วนำมาเจือจาง 1:1000 ในแอนตี้ไบโอติก บรอร์ นำเบอร์

3 (Difco) เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของเดิม และกลุ่ใส่ หลอดที่มียา อยู่ เรียบร้อยแล้วหลอดละ 0.5 ม.ล. ทุกหลอดซึ่งปริมาณสุดท้ายแต่ละหลอดจะมี 1 ม.ล. และความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี จะถูกเจือจางลงไปอีกเท่าตัวโดยมีความเข้มข้นดังนี้ จากหลอดที่ 1 ถึง 9. 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 และ 0.39 ยูนิตต่อ 1 ม.ล. ตามลำดับ คูตาราง 2 เอาหลอดทั้งหมดเข้าตู้อบทั้งไว้หลอดคืนที่ 37 องศา เซ็นติเกรดแล้วอ่านผลวันรุ่งขึ้นโดย ดูความขึ้นของเชื้อที่หลอดที่ 10 ก่อนปกติจะต้องมีเชื้อขึ้น ถ้าหลอดใดบรอร์ไม่ขึ้นในความเข้มข้นที่น้อยที่สุดเป็นหลอดที่เชื้อไวต่อ เพนิซิลลิน จี (Minimal Inhibitory Concentration=M.I.C.) ตาราง 1 ชนิดของตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างตรวจ จาก	จำนวน
หนองต่าง ๆ	57 ราย
เลือด	10 „
กอล	17 „
ปัสสาวะ	4 „
ตา	7 „
หู	1 „
น้ำช่องปอด	3 „
น้ำดี	1 „

ตาราง 2 การเจาะของเพนซิลลิน จี

หลอดลำดับที่	จำนวนยา ที่เจาะ	ความเข้มข้น ยูนิตต่อ ม.ล.	จำนวนเชื้อ ที่เจาะ	ความเข้มข้นสุดท้าย ยูนิตต่อ ม.ล.
1	0.5 ม.ล.	200	0.5 ม.ล.	100
2	0.5 "	100	0.5 "	50
3	0.5 "	50	0.5 "	25
4	0.5 "	25	0.5 "	12.5
5	0.5 "	12.5	0.5 "	6.25
6	0.5 "	6.25	0.5 "	3.125
7	0.5 "	3.125	0.5 "	1.56
8	0.5 "	1.56	0.5 "	0.78
9	0.5 "	0.78	0.5 "	0.39
10	—	0	0.5 "	0

ผลการทดสอบ

จากการทดสอบครั้งแรกเมื่อแยกได้จาก
คนไข้ใหม่ ๆ ปรากฏผลว่าเชื้อสแตฟีโลคอก
ไคที่ก่อเพนซิลลินมาก ดูตาราง 3 เชื้อ
สามารถขึ้นที่ความเข้มข้น 100 ยูนิต ของเพน
ซิลลินถึง 49% เมื่อเราเอาหลอดที่มีความเข้ม
ขึ้น 12.5 ยูนิตต่อ 1 ม.ล. เป็นความเข้มข้นที่
น้อยที่สุดที่ไวต่อยา (M.I.C.) จะพบว่าเชื้อ
สแตฟีโลคอกไค ที่ไวต่อเพนซิลลิน จี มี
เพียง 27% เป็นเชื้อที่ก่อเพนซิลลิน จี ถึง
73% เชื้อสแตฟีโลคอกไค ได้ ถ่ายเชื้อไว้ ทั้ง
แต่เดือนสิงหาคม 2508 และถ่ายเชื้อทุกๆ

3 เดือนจนถึงเดือนสิงหาคม 2510 ครบ 2
ปี เรานำเชื้อมาทดสอบความไวต่อเพนซิล
ลินใหม่ปรากฏถึงการทดสอบครั้งที่สอง คือ
เชื้อสแตฟีโลคอกไคสามารถขึ้นในหลอดที่มี
ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อ ม.ล. มีเหลือเพียง
6% และเพนซิลลินสามารถยับยั้ง การเจริญ
ของเชื้อ สแตฟีโลคอก ไค ที่มีความเข้มข้น
0.39 ยูนิต ถึง 22% เมื่อคอกเอาหลอดที่มี
ความเข้มข้น 12.5 ยูนิตเป็น M.I.C. ปรากฏ
ผลเชื้อสแตฟีโลคอกไค จะไว ต่อเพนซิลลิน
เพิ่มขึ้นถึง 78% ที่ก่อเพนซิลลิน เหลือ
เพียง 22%

ตารางที่ 3 การทดสอบเชื้อสแตฟีโลคอคโค ท่อเพนิซิลลิน จี

จากเชื้อ 100 ราย	ความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี ยูนิต ต่อ ม.ล.										MIC
	>100	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	12.5
การทดสอบครั้งแรก	49	14	3	7	9	11	1	2	4	0	27
การทดสอบครั้งที่สอง	6	2	4	10	10	9	11	12	14	22	78

วิจารณ์ผลทดสอบ

เชื้อสแตฟีโลคอคโคที่เราเก็บไว้ ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2508 และถ่ายเชื้อทุก ๆ 3 เดือนจนถึงเดือนสิงหาคม 2510 มีทั้งหมด 300 เชื้อเหลือมาทดสอบเพียง 100 เชื้อ ซึ่งเป็นเวลานาน 2 ปีเต็ม เชื้อจะต้องถูกถ่ายถึง 8 ครั้งเป็นอย่างน้อยระหว่างที่เก็บเชื้อ เรา

เพาะบนบดักเกอร์เบสตลอดเวลา

Knox และพวก 1961 พบว่าเชื้อสแตฟีโลคอคโคที่สื่อ ท่อเพนิซิลลิน เนื่องจาก ตัวเชื้อสแตฟีโลคอคโคสามารถสร้างเพนิซิลลินเนสไปทำลายเพนิซิลลินได้ Ceiter และพวก 1961 ได้แสดงให้เห็นว่าอำนาจการสื่อท่อเพนิซิลลินขึ้นอยู่กับการสร้างเพนิซิลลินเนสของเชื้อสแตฟีโลคอคโคนั้น การสร้างเพนิซิลลินเนสได้ก็ จะต้องมีขัณภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรด (pH 5.4-5.5) และมีจำนวนของ Fe^{++} พอเหมาะ Steinman และพวก 1961 ได้เพาะเชื้อสแตฟีโลคอคโคบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ทริบิกเคสซอย บรอร์ จะ

ต้องเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปด้วย จึงจะช่วยเร่งการสร้าง เพนิซิลลินเนสของเชื้อสแตฟีโลคอคโค และถ้าเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทริบิกเคส ฟอสเฟตไม่ต้องเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปเพราะว่า เกลือฟอสเฟตจะเป็นตัวกระตุ้นการสร้างเพนิซิลลินเนสได้ก็ จากการทดสอบเชื้อสแตฟีโลคอคโคที่ทดสอบ ครั้งที่สองนี้ ปรากฏว่า ไว ต่อ เพนิซิลลิน มากขึ้น แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อไว้นานๆ บนบดักเกอร์เบส การสร้างเพนิซิลลินเนสลดน้อยลง เชื้อสแตฟีโลคอคโคจึงไม่สามารถทำลายเพนิซิลลินได้ การลดการสร้างเพนิซิลลินเนสอาจเนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเชื้อ ขาด ตัวกระตุ้นการสร้างเพนิซิลลินเนสเช่น น้ำตาลกลูโคส เกลือฟอสเฟต Fe^{++} ตลอดจนมีขัณภูมิของอาหารซึ่งค่อนข้างเป็นกลาง (pH 6.8) ก็ เป็นได้

สรุปผล

จากผลการทดสอบ ครั้งที่สองจะ สรุปได้ว่า ถ้าต้องการศึกษาความไวของเชื้อต่อยา

แอนติไบโอติก โดยจะเพาะเพนิซิลลินเพื่อให้ได้ผลดีและแน่นอนต่อการที่จะนำไปใช้รักษาในคน ใช้ไม่ควรเก็บเชื้อไว้นานเกินไป เพราะจะทำให้เชื้อเปลี่ยนแปลงผลการทดสอบไปได้ และอาหารที่สำหรับเก็บเชื้อควรจะมีตัวกระตุ้น (Factor) ที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละเชื้อไปเพื่อยับยั้งการเปลี่ยนของเชือกักไว้

เอกสารอ้างอิง

1. Bailey and Scott, 1962. Diagnostic Microbiology, p 252-254.
2. Ceitner, F., Sweeney, H.M., Martin, T.F. and Cohen, S. 1963. Induction of Staphylococcal Penicillinase by Benzylpenicillin effect of pH, concentration of Ferrous Iron and inducer, and duration of exposure of cell to inducer. J. Bacteriol. 86:717-727.
3. Kagan, B.M., Molander, C.W. and Weinberger, H.J. 1962. Induction and cultivation of staphylococcal L forms in the presence of Methicillin. J. Bacteriol. 83:1162-3.
4. Kapral, F.A. and Li, I.W. 1960. Virulence and coagulase of staphylococcus aureus. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 104: 151-153.
5. Knox, R. and Smith, J. T. 1961. The nature of penicillin resistance in staphylococci. Lancet 2:520-522.
6. Knox, R. 1960. A new penicillin (BRL 1241) active against penicillin resistant staphylococci. Brit. Med. J. 2:690.
7. Steinman, H.G. 1961. Factor modifying induced formation of penicillinase in staphylococcus aureus J. Bacteriol. 81: 895-902.
8. Stewart, G.T and Holt, R.J. 1963. resistance to the newer penicillins. Brit. Med. J. 1:676.

Abstract

Mutation of Staphylococci to Penicillin G. on Prolong Culture

Natre Suwankrughasna, B.Sc. (Med. Tech.)*

Kampol Panas—Ampol, M.D.*

Susceptibility test by using tube dilution method of penicillin G. sodium to 100 strains of Staphylococci isolated from clinical specimens in Nakorn Chiangmai Hospital found that only 27% is sensitive (M.I.C. 12.5 unit/ml.) at first of isolation. After prolonged culture on blood agar base medium by subculture every 3 months for 2 years, then

test for sensitivity to penicillin G. sodium. Staphylococci increase susceptible to 78%. These may be staphylococci lost their ability to produce penicillinase because of lacking stimulating factors in stock medium such as glucose, tryptose phosphate, ferrous sulfate and low pH, or may be prolonged subculture.

**Department of Microbiology Chiangmai Medical School.*