

การจำแนก enterococci อย่างเร็วด้วย modified bile esculin : การศึกษานำร่อง

Rapid Identification of Enterococci Using Modified Bile Esculin: A Preliminary Study

เอนก ภูทอง*, พรชาติ บุญไธ, ปิยะวุฒิ ชูแก้ว และสุวรรณา โคะวินทวีวัฒน์

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

พนารัตน์ รัตนาคม และนริศรา มังกรแก้ว

หน่วยปฏิบัติการแบคทีเรีย ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Anek Pootong*, Pornchat Boonlai, Piyawut Chukaew and Suwanna Cowawintaweewat

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Centre,

Klong Nueng, Khlong Luang, PathumThani 12120

Panarat Rattanakhom and Narissara Mungkornkaew

Bacteriology Unit, Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital,

Thammasat University, Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, PathumThani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจำแนก enterococci อย่างเร็วด้วย modified bile esculin (MBE) ทำการศึกษาโดยเติม NaCl ลงใน bile esculin medium ที่มี 2 และ 4 % (w/v) bile salt ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย ตั้งแต่ 1 ถึง 5 % (w/v) จากนั้นนำไปทดสอบกับแบคทีเรีย Streptococcaeae สายพันธุ์อ้างอิง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า MBE-A ที่มี 3 % NaCl และ 2 % bile salt และ MBE-B ที่มี 3 % NaCl และ 4 % bile salt สามารถจำแนก enterococci สายพันธุ์อ้างอิงได้ถูกต้อง การจำแนกแบคทีเรีย Streptococcaeae จำนวน 163 ตัวอย่าง ด้วยอาหาร MBE ทั้งสองสูตรและเปรียบเทียบกับ conventional method พบว่า MBE-A มี sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) เท่ากับ 73.10, 100.00, 100.00 และ 73.70 % และสำหรับ MBE-B มีค่าเท่ากับ 66.70, 100.00, 100.00 และ 69.30 % ตามลำดับ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า MBE มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปพัฒนาเป็นอาหารทดสอบสำหรับจำแนก enterococci อย่างเร็วได้

คำสำคัญ : enterococci, การจำแนกอย่างรวดเร็ว, modified bile esculin

Abstract

The study aimed to evaluate the rapid identification of enterococci using modified bile esculin (MBE). The final concentrations of 1 to 5 % (w/v) NaCl were added into bile esculin medium containing either 2 or 4 % (w/v) bile salt. These modified bile esculin media were tested with reference stains of Streptococcaceae by incubation at 37 °C for 4 hr. MBE-A containing 3 % NaCl and 2 % bile salt and MBE-B with 3 % NaCl and 4 % bile salt could distinguish enterococci from streptococci. A total of 163 Streptococcaceae strains identified by convention method were tested by both MBEs. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of MBE-A for detection of enterococci were 73.10, 100.00, 100.00 and 73.70 %, and while those of MBE-B were 66.70, 100.00, 100.00 and 69.30 %, respectively. MBE could be further developed and used for rapid identification of enterococci.

Key words: enterococci, rapid identification, modified bile esculin

1. บทนำ

enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม (gram positive cocci) อาจพบอยู่เป็นเชลล์เดี่ยว คู่หรือเรียงตัวเป็นสายสั้น ๆ สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อได้ในหลายระบบ ได้แก่ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) ช่องท้องและอุ้งเชิงกราน (intra-abdominal and pelvic infection) บาดแผลและเนื้อเยื่ออ่อน (wound and soft tissue infection) ลิ้นหัวใจ (endocarditis) และในกระแสเลือด (septicemia) เป็นต้น [1] ปัจจุบันอุบัติการณ์การติดเชื้อสาหร่ายด้านจุลชีพของ enterococci สูงเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ vancomycin (vancomycin resistant enterococci-VRE) ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) [2,3]

ในทางปฏิบัติ การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพกระทำพร้อมไปกับการจำแนกชนิดแบคทีเรีย

โดยใช้ลักษณะโคโลนี การดิสซีสแกรม และผลการทดสอบชีวเคมีอย่างรวดเร็ว (rapid test) เช่น oxidase test และ catalase test เป็นแนวทางในการทดสอบเพื่อลดระยะเวลาของการวิเคราะห์ แต่เนื่องจากการทดสอบดังกล่าวไม่สามารถจำแนก enterococci จาก streptococci ได้ ในขณะที่ การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของ enterococci ตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline แตกต่างจาก streptococci [4] ดังนั้นการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพจึงอาจไม่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย หากทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพหลังจากทราบชนิดของแบคทีเรีย ก็จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการรอผลการทดสอบนานขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้ไม่สามารถรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที

จากการศึกษาการจำแนก enterococci อย่างเร็วด้วยสารละลายที่มี esculin และ 6.5 % NaCl โดยอาศัยสมบัติ esculin hydrolysis ร่วมกับความสามารถใน

การทนเกลือ (salt tolerance) ของแบคทีเรียพบว่าสามารถจำแนก enterococci ออกจาก streptococci ได้ภายใน 4 ชั่วโมง [5] อย่างไรก็ตาม สารเคมีหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบในอาหารทดสอบดังกล่าว เช่น esculin และ ferric ammonium citrate ไม่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจำแนก enterococci อย่างเร็วด้วย modified bile esculin (MBE) ที่ดัดแปลงจาก bile esculin medium ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป โดยการเติม NaCl ในปริมาณที่เหมาะสม

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง

Streptococcus pyogenes DMST 17020, *S. bovis* ATCC 33317T, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 และ *E. faecium* UCLA 192

2.1.2 แบคทีเรียตัวอย่าง

แบคทีเรียกลุ่ม Streptococcaeae จำนวน 163 ตัวอย่าง ที่จำแนกชนิดด้วย conventional methods [6] ประกอบด้วย enterococci จำนวน 93 ตัวอย่าง และ streptococci 70 ตัวอย่าง ได้แก่ viridans streptococci 32 ตัวอย่าง group D streptococci 31 ตัวอย่าง *Streptococcus agalactiae* 3 ตัวอย่าง *Streptococcus pyogenes* 2 ตัวอย่าง และ *Streptococcus pneumoniae* 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) แบคทีเรียถูกเก็บรักษาใน Luria broth (1 % tryptone 0.5 % yeast extract และ 1 % NaCl) ที่มี 25 % glycerol ที่อุณหภูมิ -80 °C ณ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โดยเพาะบน 5 % sheep blood agar (SBA) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 5 % CO₂ เป็นเวลา

18-24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ sensitivity, specificity, positive และ negative predictive values ของ MBE ในการจำแนก enterococci

Microorganism	Modified bile esculin	
	Positive	Negative
Enterococci	True positive (TP)	False negative (FN)
Streptococci	False positive (FP)	True negative (TN)

$$\text{Sensitivity} = \text{TP} \times 100 / (\text{TP} + \text{FN})$$

$$\text{Specificity} = \text{TN} \times 100 / (\text{FP} + \text{TN})$$

$$\text{Positive predictive value} = \text{TP} \times 100 / (\text{TP} + \text{FP})$$

$$\text{Negative predictive value} = \text{TN} \times 100 / (\text{FN} + \text{TN})$$

2.2 การเตรียม modified bile esculin (MBE)

และการทดสอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง

เตรียม MBE โดยเติม NaCl ลงใน Oxiod®

bile-esculin (0.8 % peptone, 2 % bile salts, 0.05 % ferric citrate, 0.1 % esculin และ 1.5 % agar) และ BD Difco™ bile-esculin (0.8 % peptone, 4 % bile salts, 0.05 % ferric citrate, 0.1 % esculin และ 1.5 % agar) ซึ่งละลายใน deionized water ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 จนถึง 5 % (w/v) หลังจากกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 2 แล้ว จึงแบ่งใส่หลอดทดลองปริมาณ 0.5 ml นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที inoculate แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงลงไป MBE ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^8 และ 3×10^8 colony forming units/ml (cfu/ml) โดยเปรียบเทียบกับ McFarland standards No. 0.5 และ 1 ตามลำดับ บ่มที่

37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบทุก ชั่วโมง หากสารละลายเปลี่ยนจากสีเดิมไปเป็นสีน้ำตาลจนถึงสีดำ อ่านผลเป็นบวก หากสารละลายไม่เปลี่ยนสีอ่านผลเป็นลบ

2.3 การจำแนก Streptococcaeae โดยการทดสอบด้วย MBE

Inoculate แบคทีเรีย Streptococcaeae ลงใน MBE บ่มที่ 37 °C อ่านผล ณ ชั่วโมงที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งในขั้นตอนนี้ ผู้ทดสอบไม่ทราบถึงชนิดของแบคทีเรีย

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) รวมทั้งค่าทำนายผลบวกและลบ

(positive and negative predictive values)

3. ผลการวิจัย

การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaCl ใน MBE ที่มี 2 และ 4 % bile salt โดยทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่ความเข้มข้น 1.5×10^8 และ 3×10^8 cfu/ml และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่า MBE ที่มี 2 % bile salt กับ 3 % NaCl (MBE-A) และ 4 % bile salt กับ 3 % NaCl (MBE-B) เป็นองค์ประกอบสามารถแยก enterococci ออกจาก streptococci ได้ ภายในเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงเท่ากับ 3×10^8 cfu/ml (รูปที่ 1)

Microorganism	Time (h)	2 % bile salt with NaCl (%)					4 % bile salt with NaCl (%)				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>E. faecium</i> UCLA 192	3										
	4										
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	3										
	4										
<i>S. bovis</i> ATCC 33317T	3										
	4										
<i>S. pyogenes</i> DMST 17020	3										
	4										

รูปที่ 1 ลักษณะของ 2 % bile esculin ที่มี 3 % NaCl และอาหาร 4 % bile esculin ที่มี 3 % NaCl เมื่อทดสอบด้วย enterococci และ streptococci สายพันธุ์อ้างอิงที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3×10^8 cfu/ml

เมื่อทดสอบการจำแนกแบคทีเรีย streptococcaeae ด้วย MBE-A และ B โดยการ inoculate ตัวอย่างแบคทีเรียลงไปในการอาหารให้ได้ประมาณ 3×10^8 cfu/ml และ incubate ที่ 37 °C เป็น

เวลา 4 ชั่วโมง พบว่า ณ ชั่วโมง ที่ 3 และ 4 MBE-A กับ MBE-B สามารถจำแนก enterococci ได้ถูกต้องจำนวน 68 และ 82 กับ 41 และ 62 จาก 93 ตัวอย่างตามลำดับ แต่พบว่า ณ ชั่วโมงที่ 4 group D

streptococci ให้ผลบวกปลอม (false positive) กับ MBE-A จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยสีสารละลายเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย (weak positive) โดย MBE-A มี sensitivity, specificity, PPV

และ NPV ของเท่ากับ 73.10, 100.00, 100.00 และ 73.70% ณ ชั่วโมงที่ 3 และ 66.70, 100.00, 100.00 และ 69.30 % สำหรับ MBE-B ณ ชั่วโมงที่ 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ รวมทั้งค่าทำนายผลบวกและลบของ MBE ในการจำแนก enterococci

Microorganism	MBE-A (2 % bile salt with 3 % NaCl)				MBE-B (4 % bile salt with 3 % NaCl)			
	3 h		4 h		3 h		4 h	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Enterococci (n=93)	68.00	25.00	82.00	11.00	41.00	52.00	62.00	31.00
Streptococci (n=70)	0.00	70.00	3.00	67.00	0.00	70.00	0.00	70.00
Sensitivity (%)	73.10		88.20		44.10		66.70	
Specificity (%)	100.00		95.70		100.00		100.00	
Positive predictive value (%)	100.00		96.50		100.00		100.00	
Negative predictive value (%)	73.70		85.90		57.40		69.30	

4. วิจารณ์และสรุป

การจำแนก enterococci ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์ในปัจจุบันมีข้อจำกัดเนื่องจาก enterococci มีสมบัติเบื้องต้นที่คล้ายคลึงกับ streptococci และเมื่อทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพควบคู่กับการจำแนกชนิดของเชื้อจึงมักพบปัญหาการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสม แต่หากทำการการจำแนก enterococci จาก streptococci ที่โดยทั่วไปใช้ bile esculin hydrolysis test และ 6.5 % NaCl tolerance test ก่อนการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ส่งผลให้การรายงานผลการวิเคราะห์ล่าช้า เนื่องจาก *Enterococcus* spp. บางสายพันธุ์ต้องใช้เวลาในการทดสอบ 6.5 % NaCl tolerance test นานถึง 48 ชั่วโมง จึงให้ผลการทดสอบ

ที่ถูกต้อง [7] และแม้ว่าในปัจจุบันห้องปฏิบัติการสามารถจำแนก *S. pyogenes* และ enterococci ออกจาก streptococci ได้อย่างเร็วโดยใช้การทดสอบความสามารถในการสร้าง pyroglutamyl aminopeptidase (PYR) [8] ที่ได้รับการพัฒนาให้สามารถอ่านผลการทดสอบได้ภายใน 10 นาที [9] อย่างไรก็ตาม การทดสอบดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายสูง ประมาณ 140 บาท/หน่วย และไม่สามารถจำแนก β -hemolysis enterococci จาก *S. pyogenes* ได้ [5]

Qadri และคณะ ได้ทำการพัฒนาวิธีการจำแนก enterococci ด้วยการทดสอบ NaCl-esculin hydrolysis โดยใช้สารละลายที่มี 5 % NaCl และ 0.2 % esculin เป็นองค์ประกอบและทดสอบสมบัติ 2 ประการ ของเชื้อ คือ salt tolerance และ esculin

hydrolysis พบว่าการทดสอบมี sensitivity ในการจำแนก enterococci เท่ากับ 100.00 % [5] สำหรับ modified bile esculin (MBE) ในการศึกษานี้จำแนก enterococci โดยอาศัยสมบัติ 3 ประการ ของแบคทีเรีย คือ salt tolerance, bile salt tolerance และ esculin hydrolysis เมื่อเปรียบเทียบผลการจำแนกเชื่อกับ conventional method แล้วพบว่า MBE สามารถจำแนก enterococci สายพันธุ์อ้างอิงได้จาก streptococci ได้ภายในเวลา 4 ชั่วโมง โดยมี sensitivity, specificity, PPV และ NPV ของ MBE-A เท่ากับ 73.10, 100.00, 100.00 และ 73.70 % เมื่ออ่านผล ณ ชั่วโมงที่ 3 และของ MBE-B มีค่าเท่ากับ 66.70, 100.00, 100.00 และ 69.30 % เมื่ออ่านผล ณ ชั่วโมงที่ 4 ตามลำดับ ซึ่ง MBE ทั้งสองสูตรมี sensitivity ไม่สูงนัก อาจเกิดจากความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ MBE ที่ 3×10^8 cfu/ml นั้นน้อยไปเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Qadri และคณะ ที่ใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 9×10^8 cfu/ml จึงอาจทำให้เกิดผลลบปลอมได้ ประกอบกับ convention method ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษานำร่องนี้ยังมีข้อจำกัด เพราะแบคทีเรีย lactococci และ vagococci สามารถให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย bile esculine hydrolysis, PYR และ 6.5 % NaCl tolerance test ได้เช่นเดียวกันกับ enterococci [11,12] ดังนั้นการจำแนก enterococci ด้วย MBE จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยควรทดสอบความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมและเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีการจำแนกที่มีความแม่นยำ เช่น polymerase chain reaction (PCR) เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า MBE ที่เตรียมได้จากการเติม NaCl ลงใน bile esculin medium ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์ทั่วไปและ

มีต้นทุนต่ำ (ประมาณ 3.70 บาทต่อหน่วย) มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปพัฒนาเป็นอาหารทดสอบสำหรับจำแนก enterococci อย่างเร็วได้ ซึ่งสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายที่เกิดจากการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อที่ไม่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการได้ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนจากภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Patterson, J.E., Sweeney, A.H., Simms, M., Carley, N., Mangi, R., Sabetta, J. and Lyons, R.W., 1995, An analysis of 110 serious enterococcal infections, *Medicine* 74: 191-200.
- [2] National Nosocomial Infections Surveillance System, 2004, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004, *Am. J. Infect. Control* 32: 470-485.
- [3] Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P. and Edmond, M.B., 2004, Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study, *Clin. Infect. Dis.* 39: 309-317.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009, Performance standards for antimicrobial

- disk susceptibility tests: Approved standard M2-A10, 10th Ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P.A.
- [5] Qadri, S.M., Flournoy, D.J. and Qadri, S.G., 1987, Sodium chloride-esculin hydrolysis test for rapid identification of enterococci, *J. Clin. Microbio.* 25: 1107-1108.
- [6] Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M. and Pfaller, M., 2007, *Manual of clinical microbiology*, 9th Ed., ASM Press, Washington, D.C., 2488 p.
- [7] Qadri, S.M., de Silva, M.J., Qadri, S.G. and Villarreal, A., 1979, Presumptive identification of enterococci from other D streptococci by a rapid sodium chloride tolerance test, *Med. Microbiol. Immunol.* 167: 197-203.
- [8] Bosley, G.S., Facklam, R.R. and Grossman, D., 1983, Rapid identification of enterococci, *J. Clin. Microbiol.* 18: 1275-1277.
- [9] Ellner, P.D., Williams, D.A., Hosmer, M.E. and Cohenford, M.A., 1985, Preliminary evaluation of a rapid colorimetric method for the presumptive identification of group A streptococci and enterococci, *J. Clin. Microbiol.* 22: 880-881.
- [10] Devriese, L.A., Pot, B., Collins, M.D., 1993, Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups, *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.
- [11] Facklam, R.R. and Collins, M.D., 1989, Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme, *J. Clin. Microbiol.* 27: 731-734.
- [12] Knudtson, L.M. and Hartman, P.A., 1992, Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci, *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3027-3031.