

ชนิดของ SCCmec ในเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2553 2558 และ 2559 จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น

เพชรชรัษฐ์ สุทธะมี¹, อริสา ไทยเดิม¹, สุกจินตนา วงศ์ทอง¹, อาภาศิริ ศรีเศรษฐการ¹, ลำไย วงลคร², ภิรมณ์ พวงเงิน², ราตรี ทวีชากรตระกูล³, อรุณวดี ชนะวงศ์³ และ อรุณลักษณ์ ลูลิตานนท์^{3*}

Received: December 25, 2018

Revised: March 20, 2018

Accepted: April 20, 2018

บทคัดย่อ

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้ทั่วโลก และพบก่อโรคติดเชื้อในชุมชนมากขึ้น ปัจจุบันมีการศึกษาแยกชนิดของ Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCCmec) เป็น type I–XII ในประเทศไทยส่วนใหญ่พบ MRSA type III และ type IIIA ในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีรายงานพบ MRSA สายพันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าเชื้ออาจมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน และสายพันธุ์ที่พบในแต่ละพื้นที่อาจมีการเปลี่ยนแปลง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาชนิดของ SCCmec ในเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2553, 2558 และ 2559 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ MRSA ในโรงพยาบาลแห่งนี้ ได้ตรวจหาชนิดของ SCCmec ด้วยวิธี multiplex PCR โดยตรวจ *mec* gene complex class ร่วมกับ *ccr* complex type ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างในปี พ.ศ. 2553 มี SCCmec type ที่พบมากที่สุดคือ type III จำนวน ร้อยละ 57.9 (11/19) รองลงมาเป็น type II ร้อยละ 36.8 (7/19) และมีเชื้อที่ไม่สามารถระบุชนิดของ SCCmec จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.3) และผลการศึกษาเชื้อในปี พ.ศ. 2558-2559 พบว่ามี SCCmec type ที่พบมากที่สุดคือ type II ร้อยละ 46.5 (27/58) รองลงมาเป็น type III และ type I แต่ละชนิดพบร้อยละ 24.1 (14/58) พบ type IV และ type IX แต่ละชนิดพบร้อยละ 1.7 (1/58) และยังพบเชื้อที่ไม่สามารถระบุชนิดของ SCCmec ได้อีก 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.7) สำหรับ MRSA 1 ตัวอย่างที่มี SCCmec type IV ตรวจไม่พบยีน *pvl* จากการศึกษาพบว่า SCCmec type ของ MRSA ที่พบในปี พ.ศ. 2553 มีอุบัติการณ์เช่นเดียวกับการศึกษาที่เคยศึกษาในปี พ.ศ. 2550 และพบว่าในปี พ.ศ. 2558-2559 มีการเปลี่ยนแปลงจากอดีต โดยสัดส่วนของชนิดที่เคยพบน้อยกลับมีอัตราพบเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน แสดงถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เชื้อ MRSA ในโรงพยาบาล

คำสำคัญ: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal Chromosome Cassette *mec*, SCCmec type, MRSA

¹ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² หน่วยจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ



SCCmec types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in 2010, 2015 and 2016 from patients of Srinagarind Hospital, Khon Kaen Province

Petcharat Sutthamee¹, Arisa Thaiderm¹, Sujintana Wongthong¹, Arpasiri Srisrattakarn¹, Lumyai Wonglakorn², Pirom Puang-Ngern², Ratree Tavichakorntrakool³, Aroonwadee Chanawong³ and Aroonlug Lulitanond^{3*}

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been a major cause of nosocomial infection worldwide. Recently, community-acquired MRSA infections have been reported increasingly. Nowadays, 12 types of Staphylococcal Chromosome Cassette mec (SCCmec) elements have been identified by using multiplex PCR methods. In Thailand, SCCmec type III and type IIIA were mostly reported. Ten years later, various SCCmec types of MRSA had been reported. MRSA isolates in different area may have different evolution and strains variation. The objective of this study was to determine the SCCmec types of MRSA isolates from patients in Srinagarind Hospital in 2010, 2015 and 2016 by using multiplex PCR technique. The SCCmec types were specified by combination of mec gene complex class and ccr complex type. Of the 19 MRSA isolates in 2010, 11 (57.9%) isolates were SCCmec type III, 7 (36.8%) were SCCmec type II, and 1 (5.3%) isolate was undetermined for the SCCmec type. Of the 58 MRSA isolated between 2015-2016, 27 (46.5%) isolates were SCCmec type II, 14 (24.1%) were SCCmec type III, 14 (24.1%) were SCCmec type I, 1 (1.7%) was type IV, 1 (1.7%) was type IX and 1 (1.7%) isolate was undetermined for the SCCmec type. In addition, no pvl gene was found in the type IV MRSA isolate. This study reported MRSA isolates in 2010 has the trend of SCCmec types like the previous study in 2007 and the results of MRSA isolated between 2015 to 2016 reported the trend of changing in the SCCmec types of the MRSA isolates in this area.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal Chromosome Cassette mec, SCCmec type, MRSA

¹ Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

² Clinical Microbiology Laboratory Unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

³ Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

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

บทนำ

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในโพรงจมูก และผิวหนังของคนปกติ เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคสำคัญ ๆ หลายชนิด ได้แก่การติดเชื้อที่ผิวหนัง กระดูก เลือด และยังเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สามารถก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำกว่าปกติ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบกว้างขวางทั่วโลก⁽¹⁾ แต่ปัจจุบันพบว่า *S. aureus* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในชุมชนมากขึ้น⁽²⁾ โดยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไม่มีประวัติเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมาก่อน มีรายงานพบว่า *S. aureus* ที่พบในโรงพยาบาล และจากชุมชน เป็นเชื้อที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน แสดงถึงที่มาของเชื้อจากแหล่งที่ต่างกัน เนื่องจาก *S. aureus* มีการดื้อยาหลายชนิดเพิ่มขึ้นที่สำคัญคือ สายพันธุ์ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ซึ่งมักดื้อต่อยาอื่นอีกหลายชนิด

MRSA พบครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1961 โดย Patricia Jevons⁽³⁾ ปัจจุบันยังคงเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลหลายแห่ง และยังพบก่อโรคติดเชื้อในชุมชนมากขึ้น การดื้อต่อยา methicillin ใน MRSA เกิดจากการสร้าง penicillin-binding protein (PBP) 2a ที่มีโครงสร้างต่างจาก PBP ปกติ ซึ่งมี affinity ต่омethicillin และยาในกลุ่ม β -lactam ลดลง การผลิต PBP2a ถูกกำกับโดยยีน *mecA* ที่ตั้งอยู่บนชิ้นพันธุกรรมที่เคลื่อนย้ายได้ เรียกว่า Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCCmec)⁽⁴⁾ ถูกค้นพบโดย Teruyo Ito ในปี ค.ศ. 1999⁽⁵⁾ โดย SCCmec มีที่ตั้งจำเพาะในโครโมโซมของ *Staphylococcus* โดยอยู่ใกล้กับตำแหน่ง origin of replication โครงสร้างของ SCCmec มีลักษณะแตกต่างกันหลายแบบ จึงมีการใช้รูปแบบของ SCCmec ในการจำแนกสายพันธุ์ของ MRSA ทำให้ทราบความชุกของ SCCmec แต่ละไทป์ในพื้นที่ที่ต่างกัน ในโครงสร้างของชิ้น SCCmec ประกอบด้วยพันธุกรรมหลัก 3 ส่วน ส่วนแรกคือ Chromosome Cassette Recombinase หรือ *ccr* gene complex ประกอบด้วยยีน *ccrAB* และ/หรือ *ccrC* ร่วมกับ open reading frames (ORFs) ที่อยู่บริเวณโดยรอบ ส่วนที่สองคือ *mec* gene complex ประกอบด้วยยีน *mec*, insertion sequences และ ORFs ที่อยู่

บริเวณรอบๆ ส่วนที่สามเป็นพันธุกรรมที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนหลักของกลุ่มยีน *mec* และกลุ่มยีน *ccr* เรียกว่า joining region (J region) โดยใน *ccr* gene complex มียีน *ccrAB* และ/หรือ *ccrC* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เป็น site-specific recombination ทำหน้าที่เชื่อมต่อสารพันธุกรรม ทำให้สารพันธุกรรมต่าง ๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา การดื้อโลหะหนัก แทรกเข้าและเชื่อมต่อกับ SCCmec ได้ และทำให้ SCCmec แทรกเข้าและเชื่อมต่อกับโครโมโซมของ *Staphylococcus* ได้ การทำงานของ *ccrAB* และ/หรือ *ccrC* ส่งผลให้เกิดการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างเชื้อ *Staphylococcus* ต่างสายพันธุ์กัน เป็นประโยชน์ต่อการปรับตัวของเชื้อ ทำให้ทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมหรือสภาวะที่มีความกดดันจากยาต้านจุลชีพ⁽⁶⁾ โดย MRSA ที่พบในโรงพยาบาล (hospital-associated MRSA, HA-MRSA) ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดต่างจาก MRSA ที่พบก่อโรคติดเชื้อในชุมชน (community-acquired MRSA, CA-MRSA) ซึ่งมักเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อเฉพาะยา methicillin หรืออาจดื้อยาบางชนิดร่วมด้วย CA-MRSA ที่มีการรายงานส่วนใหญ่สามารถผลิตทอกซิน Panton Valentine leukocidin (PVL) เป็นทอกซินที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์อื่นๆ ของโฮสต์ เป็นสาเหตุสำคัญของโรค necrotizing pneumonia ทำให้เกิดอาการปอดอักเสบอย่างรุนแรงและเสียชีวิตได้⁽⁷⁾ MRSA ยังพบแพร่ในสัตว์หลายชนิดรวมถึงปศุสัตว์ (livestock) ซึ่งเรียกว่า livestock-associated MRSA (LA-MRSA) โดยมีรายงานพบเชื้อ LA-MRSA ปนเปื้อนในกลุ่มสัตว์เศรษฐกิจ มีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในหมู่มียารายงานพบเชื้อมากขึ้น ความรุนแรงของการแพร่ระบาดและการติดเชื้อ LA-MRSA มีความสัมพันธ์กับขนาดของฟาร์ม โดยพบการปนเปื้อนเชื้อในสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่นำมาประกอบอาหาร พบการแพร่ระบาดจากหลาย ๆ ประเทศ

นอกจากนี้ยังพบเชื้อ MRSA ในกลุ่มผู้ที่ทำงานหรืออาศัยอยู่ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ การติดเชื้อ LA-MRSA พบที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน เชื้อ LA-MRSA อาจแพร่มาสู่โรงพยาบาล โดยผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลอาจเป็นพาหะของ MRSA จากปศุสัตว์ โดยมีเชื้ออาศัยอยู่

ในโพรงจมูก ผู้ป่วยที่เกิดโรคติดเชื้อ อาจเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างหรือหลังการผ่าตัด หรือมีการติดเชื้อในกระแสเลือด จากรายงานของโรงพยาบาล South of Brandenburg Federal State of Germany ในบริเวณพื้นที่ของ Ems-Dollart area of North Rhine Westphalia Federal State พบการติดเชื้อ LA-MRSA สูงขึ้นจากร้อยละ 14 ในปี ค.ศ. 2008 เป็นร้อยละ 23 ในปี ค.ศ. 2011⁽⁸⁾ แสดงถึงปัญหาที่เกิดจากเชื้อ MRSA เพิ่มขึ้น จึงมีการศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของ MRSA จากแต่ละภูมิภาคของโลก เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยา เพื่อทราบถึงการกระจายของเชื้อในแต่ละภูมิภาค และใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อ ปัจจุบันมีการค้นพบและจำแนกชนิดของ SCCmec ได้เป็น type I-XII⁽⁹⁻¹⁰⁾ ข้อมูลที่มีรายงานจากประเทศไทยในปี พ.ศ. 2548-2549 และ ปีพ.ศ. 2550 พบเป็น type III และ type IIIA⁽¹¹⁻¹²⁾ มากที่สุด โดยในปี พ.ศ. 2548-2549 พบ SCCmec type III ร้อยละ 60.3 type IIIA ร้อยละ 33.1⁽¹¹⁾ และรายงานในปี พ.ศ. 2550 พบ SCCmec type III ร้อยละ 41.6 รองลงมาคือ type IIIA ร้อยละ 40.6 type III DCS ร้อยละ 12.3 type IIIB ร้อยละ 1.9 และยังตรวจพบ type I-class C complex ร้อยละ 1.9⁽¹²⁾ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานล่าสุดในประเทศไทยและเวียดนามในปี พ.ศ. 2557 ที่พบ type III มากกว่าชนิดอื่น⁽¹³⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาตัวอย่างในปี พ.ศ. 2555-2556 จากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าพบ SCCmec type I มากที่สุดร้อยละ 59.7 รองลงมาเป็น type II ร้อยละ 33.1 type III ร้อยละ 3.2 type IV ร้อยละ 2.4 และไม่สามารถระบุชนิดได้ร้อยละ 1.6⁽¹⁴⁾ และจากรายงานการศึกษา MRSA จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2550 พบ type III มากที่สุดคือร้อยละ 60.7, type IIIA ร้อยละ 30.8 type II ร้อยละ 6 type III DCS ร้อยละ 1.7 และ type I variant ร้อยละ 0.9⁽¹⁵⁾ ในช่วงเวลาที่ผ่านมา มีการรายงานพบ MRSA สายพันธุ์ใหม่ๆ จากในชุมชน ซึ่งอาจแตกต่างจากสายพันธุ์ที่พบในโรงพยาบาล ประกอบกับมีการสันนิษฐานว่าเชื้อจากชุมชนอาจแพร่มาสู่โรงพยาบาลได้ อาจทำให้เชื้อมีวิวัฒนาการ และมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ MRSA ที่พบในโรงพยาบาล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาชนิดของ SCCmec ใน MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ในช่วงปี พ.ศ. 2553, 2558 และ 2559 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ MRSA ในโรงพยาบาลแห่งนี้

วัสดุและวิธีการ

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

S. aureus ที่ดื้อยา methicillin ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ เก็บแบบไม่ซ้ำราย ในช่วงปี พ.ศ. 2553, 2558 และ 2559 จำนวน 77 ตัวอย่าง แหล่งที่มาของเชื้อ MRSA แยกได้จากเสมหะ จำนวน 13 ตัวอย่าง, tracheal suction tube จำนวน 9 ตัวอย่าง, หนองจากแผล จำนวน 2 ตัวอย่าง, หนองหรือสิ่งป้ายจากแผลกดทับจำนวน 3 ตัวอย่าง, น้ำดีจำนวน 1 ตัวอย่าง, ป้ายจากบริเวณตาจำนวน 1 ตัวอย่าง, ป้ายจากบริเวณขาจำนวน 1 ตัวอย่าง, สายสวนจากกระเพาะอาหาร จำนวน 1 ตัวอย่าง, เลือด จำนวน 1 ตัวอย่าง และไม่ทราบแหล่งที่มาของเชื้อจำนวน 45 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่ผ่านการพิสูจน์ชนิด จากการย้อมสีแกรม และทดสอบชีวเคมี ได้แก่ catalase, coagulase, PR mannitol และตรวจการดื้อ methicillin โดยวิธี disk cefoxitin (30 µg) ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI⁽¹⁶⁾ และยืนยันด้วยการตรวจยีน *mecA* โดยวิธี PCR⁽¹⁷⁾ และเก็บเชื้อไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ใน skimmed milk ที่เติม glycerol ร้อยละ 20-30

แบคทีเรียอ้างอิง ได้แก่ *S. aureus* สายพันธุ์ NCTC10442, N315, 85/2082, HDE288 และ JCSC 6690 เป็นเชื้อควบคุมผลบวก สำหรับ SCCmec types I, II, III, IV และ IX ตามลำดับ

จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลขโครงการ HE552272

2. การเตรียม DNA

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ MRSA โดยเพาะเชื้อบน blood agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเขี่ยโคลนเดี่ยวของเชื้อมาแขวนลอยใน 1xTE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 1.0 McFarland เติม achromopeptidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วอุ่นที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อทำลายผนังเซลล์ของเชื้อ เก็บรักษาสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น DNA template

3. การศึกษา SCCmec type ของเชื้อ MRSA โดยใช้เทคนิค multiplex PCR

ตรวจหาชนิดของ SCCmec ด้วยวิธี multiplex PCR ตามวิธีของ Kondo และคณะ⁽¹⁷⁾ โดยตรวจหาทั้ง *mec* gene complex class และ *ccr* complex type

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 200 μ M dNTP (Vivantis Technologies Sdn Bhd, California, USA), 10xPCR buffer ที่มี 2 mM $MgCl_2$ (Vivantis), 0.5 μ M ไพรมเมอร์ (Bio Basic Inc, Markham, Ontario, Canada) *Taq* polymerase 1 U (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) จากนั้นเติม template DNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับให้ได้ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดควบคุมผลบวกใช้ DNA ของเชื้ออ้างอิงแต่ละ type และหลอดควบคุมผลลบ ใช้น้ำปราศจากไอออนแทน DNA ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง FlexCycler² (Analytik Jena AG, Germany) เริ่มต้นด้วย initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย annealing ที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที และรอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจ

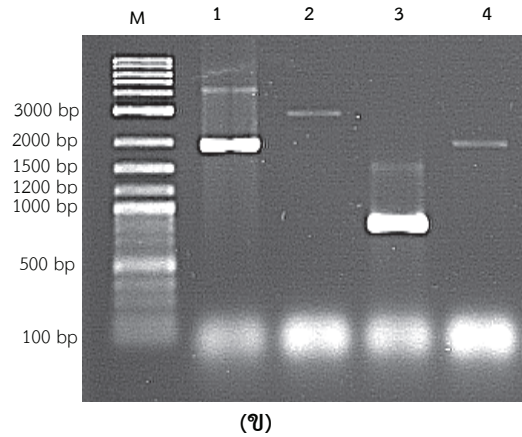
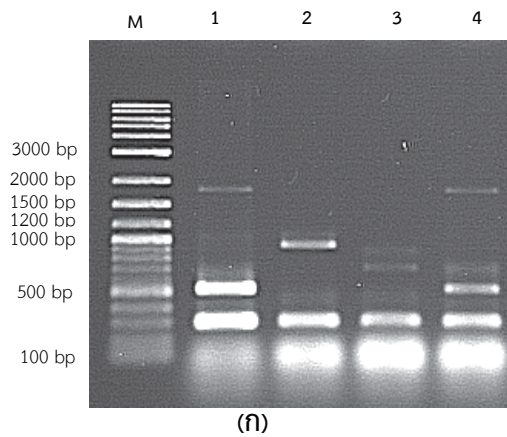
PCR product ใน 1% agarose gel electrophoresis ด้วยเครื่อง electrophoresis (i-Myrun, Cosmo Bio, Japan) โดยมี 1 kb Plus DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) เป็น DNA อ้างอิงสำหรับเทียบขนาดของชิ้น DNA และย้อมเจลด้วย 0.5 μ g/ml ethidium bromide ดูแถบ DNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator (Syngene, Cambridge, United Kingdom)

การระบุชนิดของ SCCmec ใช้ผลของ *ccr* type ร่วมกับ *mec* class⁽¹⁷⁾

ผลการศึกษา

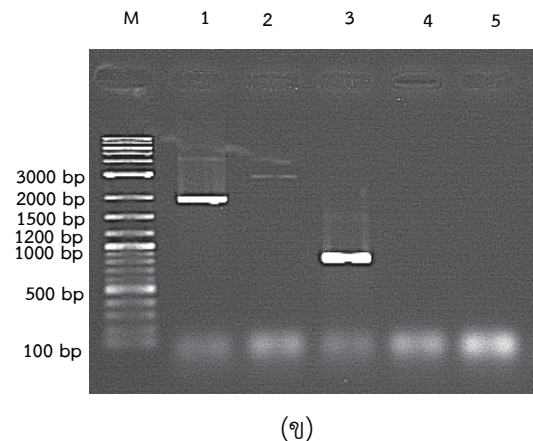
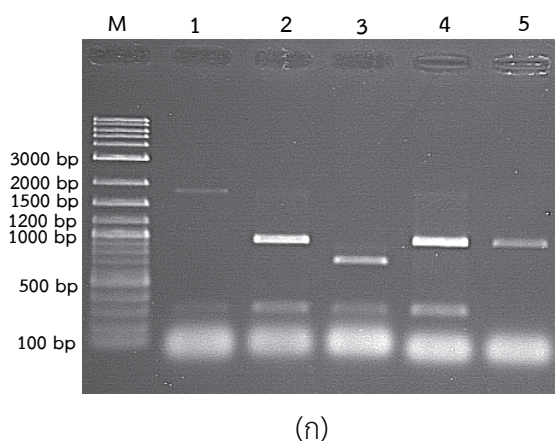
จากการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อพิสูจน์สปีชีส์ของ *S. aureus* พบว่าเชื้อทุกตัวอย่างเป็น *S. aureus* จากนั้นทดสอบการดื้อยา methicillin ของเชื้อดังกล่าวโดยการทดสอบความไวต่อ cefoxitin พบว่าเชื้อทุกตัวอย่างเป็น MRSA คือผลการทดสอบความไวด้วย disk ยา cefoxitin พบว่าดื้อยา (ขนาด inhibition zone น้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 มิลลิเมตร) และทุกตัวอย่างตรวจพบยีน *mecA*

การศึกษาตรวจหาชนิดของ SCCmec ใน MRSA โดยอาศัยผลร่วมกันระหว่าง *ccr* type และ *mec* class (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 (ก) PCR product ของ *ccr* type; Lane M, 2-Log DNA ladder; 1, สายพันธุ์ 85/2082 ซึ่งมี *ccrA3* (1791 bp); 2, สายพันธุ์ N315 ซึ่งมี *ccrA2* (937 bp); 3, สายพันธุ์ NCTC10442 ซึ่งมี *ccrA1* (695 bp); 4, ตัวอย่างหมายเลข 83 พบว่ามี *ccrA3* (1791 bp)

(ข) PCR product ของ *mec* class; Lane M, 2-Log DNA ladder; 1, สายพันธุ์ 85/2082 ซึ่งมี *mec* class A (1963 bp); 2, สายพันธุ์ NCTC10442 ซึ่งมี *mec* class B (2827 bp); 3, สายพันธุ์ MR28 (SCC*mec* type IX) ซึ่งมี *mec* class C (807 bp); 4, ตัวอย่างหมายเลข 83 พบว่ามี *mec* class A (1963 bp)



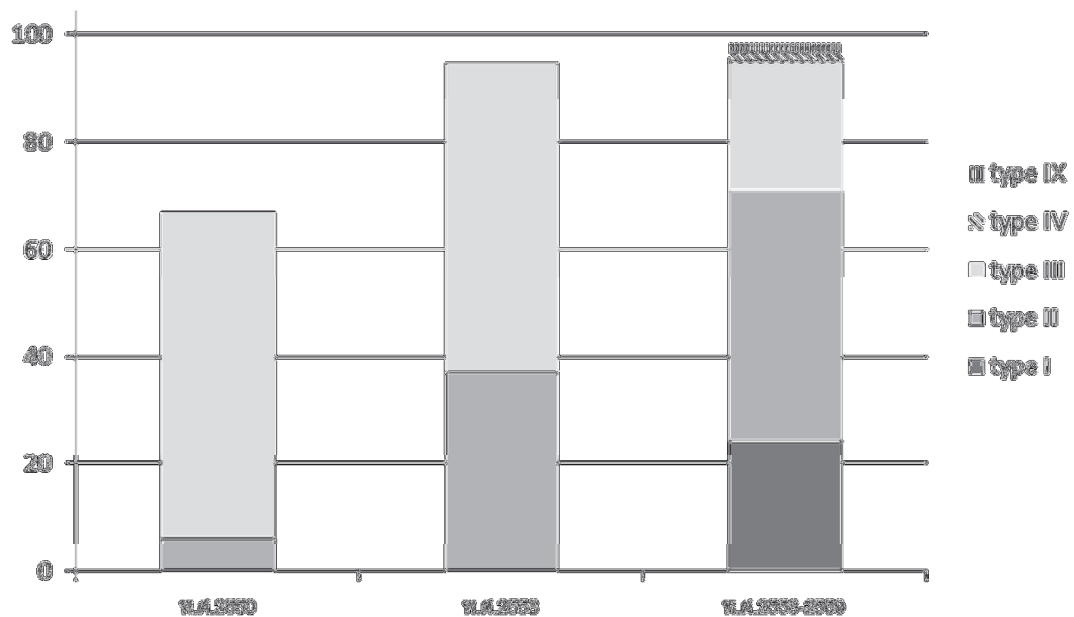
รูปที่ 2 PCR product ของตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุ SCC*mec* type

(ก) PCR product ของ *ccr* type; Lane M, 2-Log DNA ladder; 1, สายพันธุ์ 85/2082 (*ccrA3*, 1791 bp); 2, สายพันธุ์ N315 (*ccrA2*, 937 bp); 3, สายพันธุ์ NCTC10442 (*ccrA1*, 695 bp); 4, ตัวอย่างหมายเลข MR-2 (*ccrA2*, 937bp); 5, ตัวอย่างหมายเลข 939 (*ccrA2*, 695 bp)

(ข) PCR product ของ *mec* class; Lane M, 2-Log DNA ladder; 1, สายพันธุ์ 85/2082 (*mec* class A, 1963 bp); 2, สายพันธุ์ NCTC10442 (*mec* class B, 2827 bp); 3, สายพันธุ์ MR28 (*mec* class C, 807 bp); 4, ตัวอย่างหมายเลข MR-2 ตรวจไม่พบ *mec* class; 5, ตัวอย่างหมายเลข 939 ตรวจไม่พบ *mec* class

พบว่าเมื่อจำแนกเชื้อที่ศึกษาตามปี พ.ศ. ที่แยกได้จากผู้ป่วย เป็น 2 กลุ่ม โดยจำแนกเป็นเชื้อในปี พ.ศ. 2553 และเชื้อในปี พ.ศ. 2558-2559 พบว่าตัวอย่างในปีพ.ศ. 2553 มีจำนวน 19 ตัวอย่าง เป็น SCCmec type III มากที่สุด ร้อยละ 57.9 (11/19) รองลงมาเป็น type II ร้อยละ 36.8 (7/19) และไม่สามารถระบุ SCCmec type ได้ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.3) ส่วนกลุ่มตัวอย่างในปี

พ.ศ. 2558-2559 มีจำนวน 58 ตัวอย่าง พบ SCCmec type II มากที่สุด (ร้อยละ 46.6) (27/58) รองลงมาเป็น type III ร้อยละ 24.1 (14/58), type I ร้อยละ 24.1 (14/58), type IV ร้อยละ 1.7 (1/58), type IX ร้อยละ 1.7 (1/58) และไม่สามารถระบุ SCCmec type ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.7) ดังในแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 เปรียบเทียบค่าร้อยละของ SCCmec type ของเชื้อ MRSA ที่พบจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่นในปี พ.ศ. 2550 และผลที่ได้จากการศึกษานี้ (ปี พ.ศ. 2553 2558 และ 2559)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

MRSA จำนวน 77 ตัวอย่าง ที่ศึกษาในครั้งนี้ เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างของผู้ป่วยในปี พ.ศ. 2553, 2558 และ 2559 จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ พบว่าตัวอย่างในปีพ.ศ. 2553 มี SCCmec type III มากที่สุด (ร้อยละ 57.9) รองลงมาเป็น type II (ร้อยละ 36.8) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานจากโรงพยาบาลเดียวกันในปี พ.ศ. 2550 ที่พบ type III มากที่สุด คือร้อยละ 60.7 แต่พบ type II เพียงร้อยละ 6⁽¹⁵⁾ แตกต่างจากตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558-2559 ซึ่งเป็น SCCmec type II มากที่สุด รองลงมาคือ type III ซึ่ง SCCmec ทั้ง 2 ชนิดมีรายงานพบในประเทศไทยและเวียดนาม มากกว่า type อื่นๆ⁽¹³⁾ type II มีอัตราพบมากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานจากโรงพยาบาล

อื่น ๆ ในประเทศไทย เช่น โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ที่พบถึงร้อยละ 33.1⁽¹⁴⁾ ส่วน type I พบจำนวนน้อย ๆ เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานจากโรงพยาบาลแห่งนี้⁽¹⁵⁾ แตกต่างจากรายงานที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าในปี พ.ศ. 2555-2556 ที่พบ type I มากที่สุดถึงร้อยละ 59.7⁽¹⁴⁾ สำหรับ type IX ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบมากในฟาร์มสุกร⁽¹⁸⁾ และเคยพบครั้งแรกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ในปี พ.ศ. 2556⁽¹⁹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้พบเพียง 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.3) จากเชื้อในกลุ่มปี พ.ศ. 2559 โดยแยกได้จากแผลที่ขาของผู้ป่วย ซึ่งสันนิษฐานว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ ผู้ป่วยอาจได้รับมาจากชุมชน

นอกจากนี้ยังพบ type IV 1 ตัวอย่าง จากตัวอย่าง
เสมหะของผู้ป่วยในหอผู้ป่วยฉุกเฉิน ซึ่ง type IV เป็น type
ที่ไม่เคยตรวจพบมาก่อนในโรงพยาบาลแห่งนี้ โดยทั่วไป
MRSA ที่มี SCCmec type IV มีรายงานพบบ่อยจากชุมชน
ซึ่งในประเทศไทยเคยมีรายงานการตรวจพบ type IV จาก
โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าในปี พ.ศ. 2555-2556 จำนวน
3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.4)⁽¹⁴⁾ และพบจากตัวอย่างในสุนัขจาก
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ในปี พ.ศ. 2557⁽²⁰⁾ โดยทั่วไป MRSA
ที่มี SCCmec type IV มักมียีนที่ผลิตทอกซิน PVL
แต่สายพันธุ์ type IV ที่พบในการศึกษานี้ตรวจไม่พบยีน
pvl เช่นเดียวกับ type IV ที่มีรายงานในประเทศไทย⁽¹⁴⁾
และจากประเทศบราซิลและเกาหลี ซึ่งตรวจไม่พบยีน
pvl⁽²¹⁻²²⁾ แตกต่างจากรายงานอื่นๆ ที่มักพบยีน *pvl* ใน
MRSA ที่มี SCCmec type IV⁽²³⁾

ในการศึกษานี้ยังพบ MRSA อีก 2 ตัวอย่างที่
ไม่สามารถระบุ SCCmec type ได้ สันนิษฐานว่าเชื้อ
อาจมีการกลายพันธุ์ของยีน *mec* class ตรงบริเวณ
ที่ primer เข้าจับ ทำให้ตรวจไม่พบ PCR product จึงไม่
สามารถระบุ *mec* class ได้ แต่เชื้อทั้ง 2 ตัวอย่างตรวจพบ
ccr type เป็น *ccrA2* ดังในรูปที่ 2

ในการศึกษานี้พบอัตราส่วนของ MRSA ที่มี
SCCmec type II มากที่สุด ส่วน type III ซึ่งเคยเป็น type
ที่พบมากที่สุดจากรายงานเมื่อปี พ.ศ. 2545-2546⁽²⁴⁾ และ
ปี พ.ศ. 2550⁽¹³⁾ แต่ในการศึกษานี้กลับพบสัดส่วนน้อยลง
แสดงถึงแนวโน้มที่ MRSA ในโรงพยาบาลนี้อาจมีการ
เปลี่ยน แปลงสายพันธุ์ โดยชนิดที่เคยพบน้อยเมื่อปี พ.ศ.
2550 มีอัตราพบเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากแหล่งกักเก็บเชื้อ
หรือสภาวะแวดล้อมของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง เชื้อแต่ละ
สายพันธุ์อาจมีความทนต่อสิ่งแวดล้อมได้แตกต่างกัน
อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ยังมีจำนวนจำกัด
อาจไม่ครอบคลุมตัวแทนเชื้อทั้งหมด จึงควรเก็บตัวอย่าง
เชื้อเพิ่มเติม และศึกษาติดตามต่อไป รวมถึงการเก็บข้อมูล
เกี่ยวกับการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม หรือแนวปฏิบัติต่อ
ผู้ป่วยของบุคลากรในโรงพยาบาล ที่อาจมีผลต่อการ
เปลี่ยนแปลง ของเชื้อ

การศึกษาชนิดของ SCCmec ของเชื้อ MRSA ครั้ง
นี้เป็นประโยชน์ในด้านระบาดวิทยา เป็นข้อมูลสำหรับ
ศึกษาแนวทางในการควบคุม ป้องกันการแพร่ระบาด
ของเชื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากคณะเทคนิค
การแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ
เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์
ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อตัวอย่างขอขอบคุณ Prof.
Keiichi Hiramatsu ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ MRSA
สายพันธุ์อ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

1. Azis MN, Pung HP, Rachman AR, Nordin AS, Sarchio SNE, Suhaili Z, et al. A persistent antimicrobial resistance pattern and limited methicillin-resistance-associated genotype in a short-term *Staphylococcus aureus* carriage isolated from a student population. J Infect Public Health 2017; 10: 156-64.
2. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2010; 375: 1557-68.
3. Molton JS, Tambyah PA, Ang BS, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. Clin Infect Dis 2013; 56: 1310-18.
4. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microb Pathog 2016; 101: 56-67.

5. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1449-58.
6. Lulitanond A. *Staphylococcus*. Khon Kaen: Khon Kaen University Printing House; 2018.
7. Adler A, Temper V, Block CS, Abramson N, Moses AE. Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1789-90.
8. Cuny C, Wieler LH, Wittle W. Livestock-associated MRSA: The impact on humans. *Antibiotics (Basel)* 2015; 4: 521-43.
9. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4961-7.
10. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. *Staphylococcal cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. *Meth Mol Biol* 2014; 1085: 131-48.
11. Wanachat C. Staphylococcal cassette chromosome *mec* type and antibiograms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Maharajnakorn Chiangmai Hospital. Chiangmai University Bibliography 2008: 99-128.
12. Wilailuckana C. Determination of virulence determinants combined with SCC*mec* typing and variable numbers of tandem repeats typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Thailand. Khonkaen: Medical Technology, Associated Medical Science, Khon Kaen University; 2010.
13. Lawung R, Chuong L, Cherdtrakulkiat R, Srisarin A, Prachayasittikul V. Revelation of staphylococcal cassette chromosome *mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Thailand and Vietnam. *J Microbiol Methods* 2014; 107: 8-12.
14. Chatree Wattanakul T. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood samples in Phramongkutklao Hospital [Master of medical technology program's thesis]. Pathumthani: Medical Technology, Allied Health Sciences, Thammasat University; 2014.
15. Norchaleun B, Wilailuckana C, Hongsrirachan N, Kaewkes W, Wilachai C, Lulitanond A, et al. Recognition of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones by molecular surveillance in Srinagarind Hospital, Khon Kaen. *J Med Tech Phy Ther* 2010; 22: 26-36.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute/ NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test: Twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania USA, 2015.
17. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 264-74.

18. Sinlapasorn S, Lulitanond A, Angkititrakul S, Chanawong A, Wilailuckana C, Tavichakorntrakool R, et al. SCCmec IX in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from pigs and workers at pig farms in Khon Kaen, Thailand. J Med Microbiol 2015; 64: 1087-93.
19. Lulitanond A, Ito T, Li S, Han X, Ma XX, Engchanil C, et al. ST9 MRSA strains carrying a variant of type IX SCCmec identified in the Thai community. BMC Infect Dis 2013; 13: 214.
20. Patchanee P, Tadee P, Ingkaninan P, Tankaew P, Hoet AE, Chupia V. Distribution and characterization of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) at the small animal hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang mai University, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2014; 45: 413-20.
21. Mimica MJ, Berezin EN, Damaceno N, Carvalho RB. SCCmec type IV, PVL negative, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients from Brazil. Curr Microbiol 2011; 62: 388-90.
22. Hwang JW, Joo EJ, Ha JM, Lee W, Kim E, Yune S, et al. Community-acquired necrotizing pneumonia caused by ST 72-SCC-mec type IV-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. Tuberc Respir Dis (Seoul) 2013; 75: 75-8.
23. Kawaguchiya M, Urushibara N, Yamamoto D, Yamashita T, Shinagawa M, Watanabe N, et al. Characterization of PVL/ACME-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (genotypes ST8-MRSA-IV and ST5-MRSA-II) isolated from a university hospital in Japan. Microb Drug Resist 2013; 19: 48-56.
24. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Wilailuckana C, Kaewkes W, Vorachit M, et al. Preliminary report of SCCmec-types and antimicrobial susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a university hospital in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010; 41: 920-7.