



การตรวจหาพาหะของเชื้อ MRSA ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Lipovitellin

mannitol salt agar

Detection of MRSA carriers by using Lipovitellin mannitol salt agar

สุภาภรณ์ พัวเพิ่มพูลศิริ¹, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์¹,
ลำไย วงลคร², จันเพ็ญ บัวเผื่อน³, โชคชัย วิลาชัย²

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการสำรวจหาพาหะของเชื้อ MRSA ในบุคลากรทางการแพทย์ของโรงพยาบาลศรีนครินทร์หลังจากมีการระบาดของเชื้อ MRSA ในหอผู้ป่วย จากการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะจากห้องฉุกเฉินของบุคลากรทางการแพทย์จำนวน 139 ตัวอย่าง และสิ่งส่งตรวจปัสสาวะจากอุปกรณ์เครื่องมือทางการแพทย์จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lipovitellin mannitol salt agar (LMS) และ อาหารเลี้ยงเชื้อ LMS ที่มี oxacillin 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (OX-LMS) พบบุคลากรเป็นพาหะของเชื้อ MRSA ร้อยละ 4.3 (6/139 ราย) แต่ไม่พบแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจปัสสาวะจากอุปกรณ์เครื่องมือทางการแพทย์ เชื้อทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ที่เป็นพาหะและที่แยกได้จากผู้ป่วยระหว่างที่มีการระบาดมีแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพเหมือนกัน กล่าวคือเชื้อไวต่อยา fosfomycin, lincomycin และ vancomycin และดื้อต่อยา erythromycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, cephalothin และ gentamicin การนำอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ OX-LMS มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ MRSA ในสิ่งส่งตรวจที่

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคโนโลยีการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ หน่วยควบคุมโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียประจำถิ่น เช่น จากจมูก พบว่าสามารถแยกวินิจฉัยเชื้อ MRSA ได้เร็วกว่าวิธีเดิมที่ใช้ในงานตรวจประจำวันทั่วไป 1-2 วัน ช่วยให้สามารถตรวจพบ MRSA ได้ง่าย มีผลช่วยให้การติดตามและเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

คำรหัส: MRSA ● พาหะ ● lipovitellin mannitol salt agar

Abstract

Detection of MRSA carriers by using Lipovitellin mannitol salt agar

Supaporn Puapermpoonsiri¹, Pipat Sribenjaluk¹, Lumyai Wonglacorn²,
Janpen Bourpoun³, Chokchai Vilachai²

We used lipovitellin mannitol salt agar (LMS) and LMS supplemented with 6 microgram per millilitre of oxacillin (OX-LMS) for the detection of MRSA carriers. A total of 139 nasal specimens from medical staff in one ward of Srinagarind Hospital and 9 swabs from medical equipments were plated on LMS and OX-LMS. MRSA carrier rate was 4.3% (6/139) and no equipments were contaminated with bacteria. All of MRSA isolated from hospital staff and the patients had the same antibiotic susceptibility pattern; all were sensitive to fosfomycin, lincomycin and vancomycin and resist to erythromycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, cephalothin and gentamicin. In this study, we found that MRSA were isolated from LMS agar more rapid than from blood agar as used in the routine procedure for isolation and identification of MRSA. It is rapid and simple to perform in detection of MRSA from clinical specimens. Thus this medium is suitable for using in the surveillance of MRSA.

Key words: MRSA ● carrier ● lipovitellin mannitol salt agar

¹ Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical, Sciences, Khon Kaen University

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

³ Division of Infection Control, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

บทนำ

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin หรือที่เรียกว่า Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2504¹ ปัจจุบันพบการติดเชื้อ MRSA เพิ่มขึ้น และมีการระบาดอยู่ทั่วไป^{2,3} นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล⁴ เนื่องจากเชื้อ MRSA มักดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด^{5,6} จึงต้องใช้ยาที่มีประสิทธิภาพและมีราคาแพง เช่น ยา vancomycin ในการรักษา จึงก่อให้เกิดปัญหาทั้งในด้านตัวผู้ป่วยเองที่ต้องอยู่รักษาในโรงพยาบาลนานขึ้นทำให้เสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น และในด้านการพยาบาลก็ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วยมากขึ้นเช่นกัน จากรายงานของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นพบมีการระบาดของ MRSA ในระหว่างปี พ.ศ. 2536-2537 ถึง 3 ครั้ง โดยพบในผู้ป่วย อุบัติเหตุฉุกเฉิน ผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก และในผู้ป่วยเด็กแรกคลอด⁷ และเมื่อต้นปีพ.ศ. 2544 พบมีการระบาดของเชื้อ MRSA โดยพบผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA 8 ราย จากจำนวนผู้ป่วยที่เข้ารักษาในหอผู้ป่วยอายุรศาสตร์ในช่วงนั้นจำนวน 121 ราย

ในการควบคุมการระบาดของเชื้อ MRSA จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเฝ้าระวังและตรวจค้นหาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ MRSA อยู่ตลอดเวลา รวมทั้งตรวจหาพาหะของเชื้อ MRSA ในบุคลากรทางการแพทย์และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วย ส่วนห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องตรวจแยกและวินิจฉัยเชื้อ MRSA ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำและเชื่อถือได้ จึงได้มีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ lipovitellin mannitol salt agar มาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจกรองแยกเชื้อ *S. aureus* โดยเชื้อจะให้ลักษณะโคโลนีที่จำเพาะซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถแยก *S. aureus* ออกจาก Coagulase Negative Staphylococci และเชื้ออื่นๆได้อย่างชัดเจน⁸ ในการศึกษานี้ได้ทำการสำรวจหาเชื้อ

MRSA ในบุคลากรทางการแพทย์ โดยใช้อาหารจำเพาะ lipovitellin mannitol salt agar (LMS) ที่เติมยา oxacillin ลงไปด้วยเพื่อช่วยให้ตรวจแยกเชื้อได้เร็วขึ้น

วัสดุและวิธีการ

สิ่งส่งตรวจ ได้แก่ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ปายจากรูมูกของบุคลากรทางการแพทย์ที่ทำงานในหอผู้ป่วยอายุรศาสตร์ของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จำนวน 139 ตัวอย่างและจากอุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆ อีก 9 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในเดือนเมษายน 2544 หลังจากที่ได้พบว่าการระบาดของเชื้อ MRSA ในหอผู้ป่วย เก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจใส่ในหลอดที่บรรจุน้ำเกลือนอร์มัล นำส่งห้องปฏิบัติการ

การตรวจกรองหาเชื้อ MRSA

นำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS⁸ และ LMS ที่มียา oxacillin ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (OX-LMS) แล้วใช้ loop streak เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปอบในตู้อบเพาะเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อ *S. aureus* เจริญเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS อย่างเดียว ส่วนเชื้อ MRSA เจริญได้บน LMS และ OX-LMS ให้ลักษณะโคโลนีที่จำเพาะ โคโลนีสีเหลืองมีขอบทึบแสงรอบๆ โคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง การทดสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ทำโดยการย้อมสีแกรม ทดสอบคาตะเลส โคแอกกูเลส และการเฟอร์เมนที่น้ำตาลแมนนิทอล พร้อมทั้งนำไปทดสอบความไวต่อยา oxacillin ด้วยวิธี agar disk diffusion⁹

ผลการศึกษา

จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ LMA และ OX-LMS มาใช้ในการตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* และ MRSA จากสิ่งส่งตรวจที่ปายจากรูมูกของ

บุคลากรทางการแพทย์และอุปกรณ์เครื่องมือทางการแพทย์ จำนวนทั้งหมด 148 ตัวอย่าง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 แยกได้เชื้อ *S. aureus* จำนวนทั้งหมด 27 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้เป็นเชื้อ MRSA 6 สายพันธุ์ ไม่พบว่าอุปกรณ์เครื่องมือทางการแพทย์มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย จากเวชภัณฑ์ที่ถูกใช้คนไข้ MRSA ซึ่งพบเชื้อได้แก่ fosfomycin, lincomycin และ vancomycin และทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา erythromycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, cephalothin และ gentamicin

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

MRSA เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญโดยเฉพาะโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล การวินิจฉัยเชื่อนี้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้แก่ การเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจบน blood agar และวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus* โดยอาศัยลักษณะโคโลนี การย้อมสีแกรม และให้ผลบวกต่อการทดสอบคาตาเลสและโคแอกกูเลส

จากนั้นจึงนำไปทดสอบความไวต่อยา methicillin หรือยา oxacillin ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2-3 วัน ได้มีการเสนอแนะว่าการเพาะเชื้อเพื่อตรวจหาแหล่งแพร่กระจายของเชื้อ MRSA ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทจำเพาะหรือแยกความแตกต่าง (selective หรือ differential media) เพื่อลดภาระงานของห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาของ Merlini ส่วนประกอบของ lipovitellin จากไข่แดง เกลือโซเดียมคลอไรด์ และน้ำตาลแมนนิทอล ช่วยให้วินิจฉัยแยกเชื้อ *S. aureus* ออกจากเชื้อ Staphylococci coagulase negative และเชื้ออื่นๆได้ง่าย ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ OX-LMS ที่มียา Oxacillin มาใช้ในการตรวจกรองเชื้อ MRSA จากลักษณะโคโลนีที่จำเพาะและเจริญได้บน OX-LMS พบโคโลนีสีเหลืองมีโซนทึบแสงรอบๆโคโลนี ทำให้สามารถแยกวินิจฉัยเชื้อ MRSA ออกจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆซึ่งไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื่อนี้หรือหากเจริญได้ก็ไม่ให้ลักษณะจำเพาะดังกล่าวได้ง่าย ดังนั้นในการตรวจ

ตารางที่ 1 จำนวนสิ่งส่งตรวจที่ป้ายจากรูมูกและอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ตรวจพบเชื้อ MRSA

แบคทีเรีย	จำนวนสิ่งส่งตรวจที่ตรวจพบเชื้อ	
	สิ่งส่งตรวจป้ายจากรูมูก	สิ่งส่งตรวจป้ายจากอุปกรณ์ทางการแพทย์
No growth	6	9
<i>S. aureus</i>	21	0
MRSA	6	0
others	106	0
รวม	139	9

กรองเชื้อ MRSA โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ OX-LMS ทางห้องปฏิบัติการจึงไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบโคแอกกูเลสและเฟอร์เมนที่น้ำตาลแมนนิทอล รวมถึงทดสอบความไวต่อยา methicillin หรือ oxacillin จึงทำให้แยกวินิจฉัยเชื้อ MRSA ได้ง่ายและเร็วกว่าวิธีเดิมที่ใช้ในงานตรวจประจำวันทั่วไป 1-2 วัน

จากการสำรวจครั้งนี้พบบุคคลที่เป็นพาหะของ MRSA ได้ ร้อยละ 4.32 (6/139 ราย) ซึ่งพบได้อัตราใกล้เคียงกับที่เคยทำการสำรวจพบในปี พ.ศ. 2538 พบว่ามีอัตราการเป็นพาหะของเชื้อ MRSA ในบุคลากรทางการแพทย์ ร้อยละ 5.5⁷ จากการระบาดของเชื้อ MRSA ในหอผู้ป่วยอายุรศาสตร์ ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน 2544 พบผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA จำนวน 8 ราย พบว่าเชื้อ MRSA ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและที่แยกได้จากผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อมีแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพเหมือนกัน กล่าวคือเชื้อไวต่อยา fosfomycin, lincomycin และ vancomycin และดื้อต่อยา erythromycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, cephalothin และ gentamicin เหมือนกันจึงน่าที่จะเป็นไปได้ว่าการระบาดของเชื้อในหอผู้ป่วยนี้อาจมาจากแหล่งระบาดเดียวกัน อย่างไรก็ตามการที่จะพิสูจน์ได้แน่นอนจำเป็นต้องทำ bacteriophage typing หรือตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุลและพลาสมิดของเชื้อที่แยกได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Barber M. Methicillin-resistant Staphylococci. J Clin Path 1961; 14: 385-93.
2. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In Mandell GI, Bennett JE, Dolin R ed. Mandell, Douglas & Bennett's principles and practice of infectious, 4th. ed. Churchill Livingstone, New York 1995.

3. Voss AD, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 50-5.
4. Haley RW, Hightower AW, Khabbaz RF, et al. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United State hospitals. Ann Intern Med 1982; 97: 297-308.
5. Perry PL, Coombs GW, Boehm JD, Pearman JW. A rapid (20 h) solid screening medium for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 1998; 40: 67-72.
6. Speller DCE, Johnson AP, James D, Marples RR, Charlett A, George RC. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-1995. Lancet 1997; 350: 323-5.
7. รายงานการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลสรีนครินทร์ปี 2537. หน่วยควบคุมโรคติดเชื้อโรงพยาบาลสรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
8. Merlino J, Gill R, Robertson GJ. Application of lipovitellin-salt-mannitol agar for screening, isolation, and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital. J Clin microbiol 1996; 34: 3012-5.
9. Kloos WE, Bannerman TL. Staphylococci and Micrococci. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, ed. Manual of Clinical Microbiology 7th. ed. ASM Press, Washington D.C. 1999.