

ยีนก่อโรคสัมพันธ์กับแบคทีเรียโอเฟกและดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ใน *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อและไวต่อยาเมธิซิลลินจากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น

ณัฐนันท์ ทงษ์ศรีจันทร์^{1,2}, โชติชนะ วิไลลักษณ์^{2*}, ปรีชา ทอมจำปา², อรุณวดี ชนะวงศ์², โชคชัย วิลาชัย³,
อรุณลักษณ์ สุสีตานนท์², ประจวบ ชัยมณี³, กิรณ มุตสิกพันธุ์⁴

บทคัดย่อ

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทรงกลม ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อลักษณะต่างๆ ตั้งแต่การติดเชื้อที่ผิวหนัง และบางครั้งก่อให้เกิดอาการรุนแรงจนถึงแก่ชีวิตได้ คุณสมบัติสำคัญทางคลินิกของ *S. aureus* คือ เชื้อสร้าง toxin หลายชนิด และบางสายพันธุ์ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษา จากข้อมูลการศึกษาลำดับเบสทั้งจีโนมของ *S. aureus* ก่อโรครุนแรงพบว่ายีนก่อโรคและยีนดื้อยาเป็นองค์ประกอบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements, MGEs) เช่น แบคทีเรียโอเฟก และ pathogenicity islands (PAI) การศึกษานี้ ต้องการสำรวจความชุกของยีนก่อโรคที่อยู่บน MGEs ในเชื้อ *S. aureus* ทั้งที่ไว (methicillin-susceptible *S. aureus*; MSSA) และดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จากการสุ่มตัวอย่างชนิดละ 50 ตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2549 ถึงเดือนมิถุนายน 2550 พบว่า ยีน *lukDE* และ *sak* พบในตัวอย่าง *S. aureus* ทั้งสองกลุ่มรวมกันคิดเป็นร้อยละ 90 และ 88 ตามลำดับ ส่วนยีนที่พบเฉพาะกลุ่ม MSSA คือ *eta*, *lukSF-PV* (ร้อยละ 2 และ 10 ของ MSSA ตามลำดับ) แต่ไม่พบยีน *tst-1* ทั้งในกลุ่ม MSSA และ MRSA สำหรับยีน staphylococcal enterotoxin พบแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม MRSA และ MSSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กล่าวคือ กลุ่ม MRSA พบยีน *sea* มากกว่า MSSA ขณะที่ *sec*, *sel* และ *sep* พบใน MSSA มากกว่าใน MRSA ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์มียีนก่อโรครุนแรงหลายชนิด บางชนิดก่ออันตรายรุนแรง เช่น *lukSF-PV* การศึกษาข้อมูลวิทยาการระบาดเชิงโมเลกุลของยีนก่อโรคอื่นๆ ต่อไป ใน *S. aureus* อาจมีประโยชน์ต่อการรักษาพยาบาลผู้ป่วยและใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาลอันมีสาเหตุจาก MRSA ในโรงพยาบาล

คำสำคัญ: Virulence genes, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, MSSA, Mobile genetic element, Bacteriophage, Pathogenicity islands

¹บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Prophage - and pathogenicity islands - associated virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from patients at Srinagarind Hospital, Khon Kaen

Nutanan Hongsrirachan^{1,2}, Chotechana Wilailuckana^{2*}, Preecha Homchumpa², Aroonwadee Chanawong²,
Chokchai Wilachai³, Aroonlug Lulitanond², Prajuab Chaimanee³, Piroon Mutsikaphan⁴

Abstract

Staphylococcus aureus, a well-known human pathogen, causes a variety of infections in human, e.g. superficial skin infection through life-threatening infection. *S. aureus* is able to produce many enzymes, including exotoxins which lead to tissue inflammation and injury. Moreover, it also plays an importance role in clinical practice by exhibiting resistance phenotype to methicillin. Many virulence determinants are located on mobile genetic elements (MGEs), such as bacteriophages, pathogenicity islands (PAI), and genomic islands, and existed variably in the bacterial population. Then, virulence genes can be used as genetic markers for clinical manipulations, and nosocomial control measurement. The objective of this study was to determine virulence genes associated with those MGEs in *S. aureus* samples both in methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). A total of 100 MSSA and MRSA isolates (50 of each) were randomly selected from clinical samples of patients at Srinagarind Hospital during November, 2006 through June, 2007. All isolates were determined for the presence of *eta*, *lukDE*, *lukSF-PV*, *tst-1*, *sak*, *sea*, *sec*, *sel*, and *sep* genes by PCR. In case of MRSA, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) types were also determined in order to study the association among the determinants and their allotypes. The results showed that most of *S. aureus* samples harbored at least one virulence gene, and most of them carried *lukDE* (90 %), and *sak* (88 %). High potential virulence genes, *eta* and *lukSF-PV*, were detected in 2 and 10 isolates of MSSA only. However, *sea* gene was detected more frequent in MRSA than MSSA ($P < 0.05$). While *sec* gene was significantly recognized less in MRSA than MSSA isolates ($P < 0.05$). The other staphylococcal enterotoxins such as *sec*, *sel* and *sep* were detected in small samples of *S. aureus*, and none was found to harbor *tst-1* gene. The molecular information associated to virulence genes on MGEs may be useful in clinical practice and hospital epidemiology in Srinagarind Hospital, and other tertiary care facilities.

Key words: Virulence genes, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, MSSA, Mobile genetic element, Bacteriophage, Pathogenicity islands

¹Graduate School,

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences,

³Clinical Microbiology Laboratory, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine,

⁴Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

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

บทนำ

วงการแพทย์รู้จักเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในฐานะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทรงกลม เซลล์เกาะกลุ่มเป็นพวงอุ้งน ก่อโรคติดเชื้อหลากหลายชนิดทั้งในคนและสัตว์มาเป็นเวลานาน ได้แก่ การติดเชื้อที่ผิวหนัง สามารถรักษาได้ จนถึงการติดเชื้อในกระแสโลหิต และอวัยวะภายใน ซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิต ตั้งแต่ทศวรรษ 1880⁽¹⁻³⁾ ก่อนการค้นพบยาเพนิซิลลิน ผู้ป่วยติดเชื้อ *S. aureus* มีโอกาสเสียชีวิตถึงร้อยละ 80 แม้ว่า การใช้ยาเพนิซิลลินตั้งแต่ปี ค.ศ. 1940 และยาเมธิซิลลินในปี ค.ศ. 1959 ประสบความสำเร็จอย่างดีในระยะต้นของการ นำยามาใช้ แต่ในปัจจุบัน *S. aureus* สามารถวิวัฒนาการด้าน พันธุกรรม จนสามารถดื้อต่อยาทั้งสองชนิดได้ การจำแนก สายพันธุ์ของ *S. aureus* โดยอาศัยคุณสมบัติการดื้อยาเมธิซิลลินออกเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มไวและดื้อต่อยา เรียกว่า methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)⁽⁴⁾ จากการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการ ดื้อยาเมธิซิลลิน พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับยีน *mecA* ซึ่งทำ หน้าที่สังเคราะห์ penicillin-binding protein 2a (PBP2a) ที่มีคุณสมบัติเป็น transpeptidase ทำหน้าที่สร้างชั้นเปปติโด ไกลแคนได้เช่นเดียวกับ PBP2 แต่จับกับยาเมธิซิลลินและ ยากลุ่มบีต้าแลคแตมได้น้อยลง เป็นผลให้เชื้อที่มี *mecA* ดื้อต่อยาบีต้าแลคแตมทุกชนิดเป็นเหตุให้ต้องใช้ยาที่มีราคาแพง เช่น vancomycin⁽¹⁾ MRSA จึงมีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ มากขึ้น ทั้งเป็นสาเหตุการติดเชื้อ แพร่ระบาดในโรงพยาบาล และชุมชน การศึกษาโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาเมธิซิลลิน ลำดับต่อมาพบว่ายีน *mecA* เป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอ เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements; MGE) ชนิดหนึ่งที่ เรียกว่า staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) จำแนกได้เป็น 7 ชนิดตามองค์ประกอบที่แตกต่าง กัน⁽⁴⁻⁶⁾ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction^(5,7) *S. aureus* มีคุณสมบัติก่อโรคสูง สามารถสร้าง toxin และเอนไซม์ได้หลายชนิด⁽³⁾ จากการศึกษาเปรียบเทียบ จีโนมของ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ก่อโรค พบว่า เชื้อดังกล่าวมีองค์ประกอบของจีโนม เป็นดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ ถึงร้อยละ 25 ประกอบด้วย ทรานสโพซอน (transposon) พลาสมิด แบคเทอริโอเฟจ, pathogenicity islands (PAI), genomic islands^(8,9) และประเด็นสำคัญ คือ ยีนก่อโรคบาง

ชนิดเป็นส่วนประกอบของ MGE เช่น ยีน Toxic shock syndrome toxin-1 (*tst-1*), staphylococcal enterotoxin (SEs), กลุ่ม toxin ที่ออกฤทธิ์กับเซลล์ เช่น exfoliative toxin, leukocidin และ hemolysin ซึ่งแบคเทอริโอเฟจ และ PAI ตรวจพบโครโมโซมหรือพลาสมิดในลักษณะที่แฝง (lysogeny) ในจีโนมของ *S. aureus*⁽¹⁰⁻¹²⁾ ซึ่งแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์^(8, 9) ดังนั้นการศึกษาชนิดของยีนก่อโรคที่สัมพันธ์กับ MGEs ทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *S. aureus* และ อาจช่วยพยากรณ์ความรุนแรงของการก่อโรคในแต่ละสายพันธุ์ได้ รวมทั้งสนับสนุนการสืบสวนการระบาดของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในโรงพยาบาล งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา วิทยาการระบาดของยีนก่อโรค (virulence genes) ได้แก่ *sak sea, sec, sel, sep, eta, tst-1, lukDE, lukSF-PV* ในกลุ่ม ตัวอย่าง *S. aureus* ทั้งกลุ่มที่ไวและดื้อต่อยาเมธิซิลลินที่ แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นด้วยวิธี PCR

วัสดุและวิธีการ

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ โดยห้องปฏิบัติการหน่วยจุลชีววิทยา คลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2550 เชื้อตัวอย่างได้รับการสุ่มอย่างเป็นระบบ (systemic randomization) โดยไม่ซ้ำ รายผู้ป่วยจำนวน 100 ตัวอย่าง จำแนกเป็น MSSA และ MRSA อย่างละ 50 ตัวอย่าง เชื้อทั้งหมดได้รับการทดสอบ การหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอล การทดสอบการย่อยสลายดี เอ็นเอ (deoxyribonuclease; DNase) (Becton Dickinson, Cockeysville, USA) และความไวต่อสารต้านจุลชีพ cefoxitin (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) เชื้อทุกตัวอย่างเก็บรักษาใน skimmed milk (Oxoid) ที่ผสม กลีเซอรอล (VWR International, Poole, England) ร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ ข้อมูลตัวอย่างส่งตรวจและผลการทดสอบความไวต่อสารต้าน จุลชีพ รวบรวมและวิเคราะห์โดยแสดงเป็นอัตราส่วนของ ตัวอย่างและการดื้อยาแต่ละชนิด

แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นเชื้อ MRSA สายพันธุ์ N315 มียีน *sak*, *sec*, *sel*, *sep*, *lukDE*, *tst-1*, สายพันธุ์ Mu50 มียีน *sea*, สายพันธุ์ 85/2082 (แยกได้จากประเทศนิวซีแลนด์) และสายพันธุ์ IVa สายพันธุ์ 2172 มียีน *lukSF-PV* เชื้อทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยยูเทนโด ประเทศญี่ปุ่น ส่วนเชื้อตัวอย่างที่มียีน *eta* (exfoliative toxin A) เป็นเชื้อตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ สายพันธุ์ 0703302621 ซึ่งได้รับการยืนยันโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสแล้ว

2. การสกัดดีเอ็นเอและตรวจหา ยีน MRSA

การสกัดดีเอ็นเอเชื้อตัวอย่างทำตามวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) phenol-chloroform extraction⁽¹³⁾ โดยใช้ 0.2 mg/ml Lysostaphin (L0761, Sigma-Aldrich Inc., Germany) เป็นสารเคมีย่อยสลายผนังเซลล์ ดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาต่อไป ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ยืนยันสปีชีส์ *S. aureus* ด้วยการตรวจหา ยีน *nuc* และคุณสมบัติการดื้อยาเมธิซิลลินด้วยการตรวจหา ยีน *mecA* ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ primer 16SrRNA-F (5'-GTAGGTGGCAAGCGTTATCC-3') และ 16SrRNA-R (5'-CGCACATCAGCGTCAG-3')⁽¹⁴⁾, primer *nucF20* (5'-TGCTATGATTGTGG TAGCCATC-3') และ *nucF120* (5'-TACAGTTTCATGATTCGTCCCC-3') และ primer *MECA P4* (5'-TCCAGATTACAAC TTCACCAGG-3') และ *MECA P7* (5'-CCACTTCATATCTTGT AA CG-3')⁽⁷⁾ ส่วนประกอบสำหรับ M-PCR ในปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 200 µM dNTP (Promega, Medison, WI, USA), 0.5 µM *nucF20*, *nucR120*, *MECA P4* และ *MECA P7*, 0.2 µM 16S rDNA-F และ 16S rDNA-R, 1 U *Taq* polymerase (New England Biolabs, Ontario, Canada) และดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 µl ปฏิกิริยา M-PCR ประกอบด้วย pre-denaturation 95°C 5 นาที และตามด้วย denaturation ที่ 95°C 1 นาที, annealing ที่ 53°C 1 นาที, extension ที่ 72°C 1 นาที 30 รอบ และ final extension 72°C 7 นาที โดยใช้เครื่อง PCT-200 (MJ Research Inc, USA) PCR product ที่ได้นำไปแยกด้วย 1.5 % agarose gel (Promega, USA) electrophoresis และย้อมด้วย 0.5 mg/ml ethidium bromide (Boehringer Mannheim,

Germany) PCR product ที่ได้จาก primer ทั้งสามคู่ มีขนาด 228, 162 และ 100 base pairs ตามลำดับ Primer ที่ใช้ในการศึกษานี้สังเคราะห์โดย Operon, Germany

3. การตรวจสอบชนิดของ SCCmec typing

การตรวจสอบ *SCCmec* ทำตามวิธี Oliviera และคณะ⁽⁷⁾

4. การตรวจหา ยีนก่อโรคที่สัมพันธ์กับแบคทีเรียโอเฟกและ MGE โดยวิธี simplex และ multiplex PCR

การตรวจหา ยีนก่อโรคที่สัมพันธ์กับแบคทีเรียโอเฟกและ MGE โดยวิธี simplex และ Multiplex PCR Primer สำหรับการตรวจหา ยีนก่อโรคทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยแบ่ง PCR ออกเป็น 4 ปฏิกิริยา แสดงไว้ใน ตารางที่ 1 แต่ละหลอดทดสอบ 25 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer (NEB), 200 µM dNTP (Promega, USA), primer แต่ละสายเข้มข้น 0.5 µM, *Taq* polymerase (NEB) 1 U และ DNA ของเชื้อตัวอย่าง 0.5 µl และเติมน้ำกลั่นครบ 25 µl ปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับการตรวจยืนยัน ยีน *mecA* ยกเว้น annealing ที่อุณหภูมิ 55°C

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการตรวจหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียโอเฟกและ MGEs นำมาวิเคราะห์โดยคำนวณร้อยละในแต่ละกลุ่มตัวอย่างและเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ Z-test

การศึกษานี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE510216

ผลการศึกษา

ตัวอย่าง *S. aureus* ที่ได้รับการสุ่มแยกจากผู้ป่วยจำนวน 100 ราย จำแนกเป็น MSSA และ MRSA อย่างละ 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่แยก *S. aureus* ได้เพียงชนิดเดียว โดยไม่มีเชื้อชนิดอื่นๆ ปนเปื้อนเลยมีจำนวน 55 ตัวอย่าง แยกเป็น MSSA จำนวน 33 ตัวอย่าง และ MRSA 22 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เหลือเป็นตัวอย่างที่พบเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วย แต่จำนวนโคโลนีของ *S. aureus* พบได้ในจำนวนที่มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น (predominant colonies) ชนิดของตัวอย่างส่งตรวจที่แยกเชื้อเหล่านี้แสดงใน ตารางที่ 2

1. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า MSSA มีความไวต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดที่ทดสอบในระดับสูง ตรงข้ามกับ MRSA ซึ่งแสดงคุณสมบัติดื้อยาหลายขนาน (multi-drug resistance) คือ ดื้อต่อยา ciprofloxacin, cotrimoxazole, gentamicin, และ clindamycin ร้อยละ 100

ตารางที่ 1 Primer ที่ใช้ในการตรวจหาชิ้นก่อโรคสัมพันธ์กับแบคทีเรียโอเฟจ

Reaction	Genes	Primer	Sequence 5' to 3'	PCR product (bp)	Reference strain	Reference
1	<i>eta</i>	ETA-3	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	119	SNR	(15)
		ETB-4	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC		07033026	
	<i>lukDE</i>	LukDE1	ACATGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACG	425	N315	This study
		LukDE2	TCCGGCTGCCTTAAGTACTAACG			
	<i>tst-1</i>	tst-1-1	GCTTGCGACAACCTGCTACAG	559	N315	(14)
		tst-1-2	TGGATCCGTCATTCATTGTTAT			
2	<i>sep</i>	sep1	GACCTTGGTTCAAAAGACACC	275	N315	(16)
		sep2	TGTCTTGACTGAAGGTCTAGC			
	<i>sak</i>	sak1	GCATCAAGTTCATTCGACAAAGG	395	N315	(17)
		sak2	CTTTGTAATTAAGTTGAATCCAGGG			
	<i>sea</i>	sea-F	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	520	Mu50	(14)
		sea-R	GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG			
3	<i>lukSF-PV</i>	LukSF-PV1	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACA	425	JU2172	(18)
		LukSF-PV2	GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAAGC			
	<i>sel</i>	sel1	TATCTAACGGCGATGTAGGTCC	579	N315	this study
		sel2	AGCTTTCTGGAAGACCGTATCC			
	4	secF	CTTGTATGTATGGAGGAATAA CAA	297	N315	(19)
		secR	TGCAGGCATCATATCATACCA			

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างแยกเชื้อ MRSA และ MSSA จากผู้ป่วย 100 ราย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2549-มิถุนายน 2550

ตัวอย่างส่งตรวจ	MRSA (n = 50)	MSSA (n = 50)	รวม
เลือด	12	11	23
เสมหะ	23	12	35
น้ำคั้นหลังจากหลอดลม	2	1	3
ตัวอย่างจาก nasopharynx	0	1	1
หนอง	8	20	28
น้ำจากอวัยวะภายใน	1	1	2
สายสอดเส้นโลหิต	2	1	3
ตา	1	1	2
ปัสสาวะ	1	2	3

สำหรับกลุ่มยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ MRSA พบว่า ดื้อต่อยา fosfomycin และ fusidic acid ร้อยละ 28 (14/50) และร้อยละ 4 (2/50) ตามลำดับ แต่ MRSA และ MSSA ทุกตัวอย่าง ยังคงไวต่อยา vancomycin

2. ชนิดของ SCCmec type

จากการตรวจสอบชนิดของ SCCmec ใน MRSA พบเพียง 2 ชนิด คือ type-III SCCmec จำนวน 31 ตัวอย่าง (ร้อยละ 62 ของ MRSA) และ type-IIIa SCCmec จำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 38 ของ MRSA)

3. ความสัมพันธ์ของแบบแผนความไวต่อสารต้านจุลชีพกับ MRSA และ MSSA

เมื่อวิเคราะห์ชนิดของ MRSA และ MSSA กับแบบแผนความไวต่อสารต้านจุลชีพ 9 ชนิด พบว่า MRSA ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, และ clindamycin, ดื้อต่อยา erythromycin, fosfomycin, fusidic acid ร้อยละ 98, 14, และ 2 ตามลำดับ แต่ยังคงไวต่อยา vancomycin ที่น่าสนใจ คือ กลุ่ม type-III SCCmec ดื้อต่อยา fosfomycin ร้อยละ 19.3 ขณะที่ type-IIIa ดื้อต่อยา fosfomycin เพียงร้อยละ 5.3 ขณะที่ MSSA เกือบทั้งหมดไวต่อยาต้านจุลชีพ

ยกเว้นเพียงร้อยละ 2 เท่านั้นที่ดื้อยา trimethoprim-sulfamethoxazole

4. ยีนก่อโรคที่สัมพันธ์กับแบคทีเรียโอเฟและ PAI

ผลการตรวจวิเคราะห์ยีนก่อโรค 9 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียโอเฟและ PAI ดังแสดงใน ตารางที่ 3 พบว่า *S. aureus* ที่พบในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มียีน *lukDE* และ *sak* เป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะกลุ่ม MRSA กล่าวคือ ตรวจพบยีน *lukDE* ใน MRSA และ MSSA ร้อยละ 94 และ 86 ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วน *sak* พบใน MRSA ร้อยละ 96 ขณะที่พบใน MSSA ร้อยละ 80 จากการทดสอบทางสถิติ (Z-test) พบว่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พออนุมานได้ว่ายีนก่อโรคทั้งสองชนิดนี้ เป็นยีนที่พบทั่วไปในประชากรของ *S. aureus* ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ สำหรับกลุ่มยีน leukocidin ที่มีรายงานก่ออาการรุนแรง คือ *lukSF-PV* ผลการศึกษาครั้งนี้ พบเฉพาะในตัวอย่างเชื้อ MSSA จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20 ส่วนกลุ่มยีน SEs พบว่า MRSA และ MSSA มียีน SEs ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กล่าวคือ ตรวจพบ *sea*, *sec*, *sel*, *sep* จำนวน 32 (ร้อยละ 64), 12 (ร้อยละ 24), 1 (ร้อยละ 2)

ตารางที่ 3 การกระจายตัวของ SCCmec และยีนก่อโรค 9 ชนิด ในเชื้อ *S. aureus* ที่ไวและดื้อต่อยาเมธิซิลลินที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2549- มิถุนายน 2550

Gene	MRSA			MSSA	All <i>S. aureus</i>	P-value ^a
	Type-III SCCmec (n = 31)	Type-IIIa SCCmec (n = 19)	Overall (n = 50)	(n = 50)	(n = 100)	
<i>tst-I</i>	0	0	0	0	0	NT
<i>eta</i>	0	0	0	2 (4%)	2	> 0.05
<i>lukSF-PV</i>	0	0	0	10 (20%)	10	< 0.05
<i>lukDE</i>	28	19	47 (94%)	43 (86%)	90	> 0.05
<i>sak</i>	30	18	48 (96%)	40 (80%)	88	< 0.05
<i>sea</i>	28	4	32 (64%)	15 (30%)	47	< 0.05
<i>sec</i>	2	1	3 (6%)	11 (22%)	14	< 0.05
<i>sel</i>	0	1	1 (2%)	10 (20%)	11	< 0.05
<i>sep</i>	0	0	0 (0%)	4 (8%)	4	< 0.05

A: ^a Z-test; NT: not tested,

ละ 2), 0 (ร้อยละ 0) ตัวอย่างในกลุ่ม MRSA ตามลำดับ ส่วนใน MSSA พบ 15 (ร้อยละ 30), 26 (ร้อยละ 52), 10 (ร้อยละ 20) และ 4 (ร้อยละ 8) ตามลำดับ โดยสรุปคือ เชื้อ MRSA ปรากฏใน sea เด่นชัดกว่าใน MSSA แต่ยีน SEs อื่นๆ กลับพบใน MSSA มากกว่า นอกจากนี้ยังพบอีกด้วยว่า ยีน sea พบใน type-III SCCmec MRSA มากกว่ากลุ่ม type-IIIa SCCmec

สำหรับยีนก่อโรครุนแรงกับผิวหนัง คือ ยีน *eta* พบในตัวอย่าง *S. aureus* ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ เพียง 2 ตัวอย่าง เฉพาะกลุ่ม MSSA เท่านั้น ซึ่งตัวอย่างทั้งสองแยกได้จากแผลเปิดของผู้ป่วยที่เข้ารับการฟอกโลหิตที่หน่วยไตเทียม และจากเสมหะของผู้ป่วย ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสัมพันธ์กับลักษณะอาการทางคลินิกหรือไม่ และยีนก่อโรครุนแรงอีกชนิดหนึ่งคือ *tst-1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับภาวะ toxic shock syndrome ไม่พบในตัวอย่างเชื้อในการศึกษา

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ยีนก่อโรคหรือ virulence gene ได้รับความสนใจมากขึ้นในกลุ่มนักวิจัย *Staphylococcus* ด้วยข้อมูลลำดับเบสแสดงให้เห็นว่ายีนก่อโรคเหล่านี้มักอยู่บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ได้ (MGEs)^(8, 9) บ่งบอกถึงความสามารถการแพร่กระจายยีนเหล่านั้นไปยังเซลล์แบคทีเรียอื่น และอาจใช้เป็น genetic marker สำหรับจำแนกสายพันธุ์ได้ ยีนก่อโรคสำคัญเหล่านี้ได้แก่ *sak*, *sea*, *sec*, *sel*, *sep*, *lukDE*, *lukSF-PV*, *tst-1* และ *eta* ที่พบปรากฏบนจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจและ PAI ที่แฝงตัวอยู่ในโครโมโซมของ *S. aureus*⁽⁹⁾ ทั้งแบคทีเรียโอเฟจและ PAI ต่างเป็น MGE แต่มีขนาดและโครงสร้างที่แตกต่างกัน กล่าวคือแบคทีเรียโอเฟจเป็นไวรัสที่สามารถแทรกเข้าไปในจีโนมหรือครอบงำกระบวนการสร้างโปรตีนสำหรับสร้างไวรัสใหม่พร้อมกับสร้างโปรตีนก่อโรคไปด้วย ส่วน PAI มีขนาดใหญ่กว่าเฟจ มักเป็นจีโนมของแบคทีเรียชนิดอื่นที่แทรกเข้าไปในตำแหน่งที่จำเพาะเนื่องจากมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้าย^(9,12) จากการศึกษาพบว่า *S. aureus* ทั้งกลุ่ม MRSA และ MSSA ปรากฏยีน *sak* และ *lukDE* ในจีโนมถึงร้อยละ 88 และ 90 ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม MRSA ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าเป็นเชื้อก่อโรคมียีนทั้งสองชนิดนี้ ถึงร้อยละ 90 ยีน *sak* ควบคุมการสร้าง staphylokinase ซึ่งเพิ่มคุณสมบัติย่อยสลายโปรตีน เป็นผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ ช่วยให้เชื้อ

รุกรานเนื้อเยื่อได้ดียิ่งขึ้น การตรวจพบว่าสายพันธุ์โคสสร้าง staphylokinase ได้ อาจช่วยอธิบายถึงคุณสมบัติรุกรานเนื้อเยื่อของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์นั้นๆ ได้⁽²⁰⁾ Sung และคณะพบว่ายีน *sak* พบมากใน *S. aureus* ที่ก่อโรคในคนมากกว่าในวัว เป็นไปได้ว่า *S. aureus* มีวิวัฒนาการปรับตัวจำเพาะกับชนิดของโฮสต์มากขึ้น แสดงถึงวิวัฒนาการร่วมกันระหว่าง *S. aureus* กับแบคทีเรียโอเฟจที่มียีน *sak* กับโฮสต์ที่เป็นมนุษย์⁽²¹⁾ ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีน *sak* พบในตัวอย่างเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นส่วนใหญ่

ยีนก่อโรคสำคัญอีกกลุ่มหนึ่ง คือ ยีนสังเคราะห์ leukocidin คือ *lukDE* และ *lukSF-PV* toxin ที่สังเคราะห์จากยีนทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะเป็น bi-component leukocidin ประกอบด้วย subunit ย่อยๆ *lukDE* ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่าง *S. aureus* ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มีสัดส่วนสูงเช่นเดียวกับยีน *sak* โดยเฉพาะกลุ่ม MRSA การกระจายของยีน *lukDE* ใน *S. aureus* แตกต่างกันไปตามกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา Ben Nejma ศึกษาในประเทศตูนิเซีย รายงานการตรวจพบยีน *lukDE* ใน MRSA ได้ถึงร้อยละ 92.4⁽²²⁾ และสายพันธุ์ Community-acquired MRSA (CA-MRSA) ที่ระบาดใหม่ในฝรั่งเศส⁽²³⁾ แต่การศึกษาเฉพาะ MSSA ในผู้ป่วย implant orthopedic infection พบในสัดส่วนที่น้อยกว่า คือร้อยละ 67⁽²⁴⁾

ยีน *lukSF-PV* เป็น leukocidin อีกชนิดหนึ่งที่ยอมรับในปัจจุบันว่าเป็นยีนก่อโรครุนแรงที่พบใน CA-MRSA⁽²⁵⁾ แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่พบใน MRSA แต่ PVL toxin ใน MSSA มีความสำคัญไม่น้อยไปกว่า MRSA มีรายงานผู้ป่วย HIV เสียชีวิตด้วยอาการ necrotizing pneumonia จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์⁽²⁶⁾ และการวิจัยครั้งนี้ยืนยันผลการศึกษาของ Chumpol และคณะ⁽²⁷⁾ รายงานไว้ในปี ค.ศ. 2006 และ *S. aureus* ที่มียีน PVL นั้นน่าจะมีหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจาก agr type ของ *S. aureus* เหล่านี้พบได้ทั้ง 4 ชนิด (ไม่ได้แสดงผลการศึกษาไว้) แสดงให้เห็นว่า PVL น่าจะพบมากในประชากร *S. aureus* ในชุมชนจังหวัดขอนแก่น และยังไม่เป็น clone ที่ชัดเจนนัก โดยทั่วไป *S. aureus* ที่มียีน *lukSF-PV* พบน้อย⁽²⁸⁾ แต่มีรายงานการตรวจพบ *lukSF-PV* ในตัวอย่าง *S. aureus* ที่ก่อโรคสูงกว่าร้อยละ 10 เช่นที่พบในการศึกษานี้^(29,30) การตรวจพบยีน *lukSF-PV* ใน MSSA จึงเป็น genetic marker สำคัญที่อาจช่วยให้แพทย์ดูแลรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อด้วยความระมัดระวังยิ่งขึ้น

สำหรับการกระจายของกลุ่มยีน SEs ใน *S. aureus* คือ *sea*, *sec*, *sel* และ *sep* พบร้อยละ 47, 40, 11 และ 4 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม MRSA และ MSSA พบว่า MRSA พบ *sea* สูงกว่า MSSA ($P < 0.05$) ขณะที่ยีน *sec*, *sel* และ *sep* พบใน MSSA สูงกว่า ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า *sea* พบใน type-III SCCmec มากกว่า type-IIIA SCCmec MRSA SEA toxin เป็น toxin ที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง พบบ่อยใน *S. aureus* ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ⁽³¹⁾, sepsis⁽³²⁾ ส่วนยีนก่อโรคที่พบน้อยหรือไม่พบเลย ได้แก่ *eta* (ร้อยละ 2) และ *tst-1* ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ประชากรของ *S. aureus* ในเขตจังหวัดขอนแก่น มียีนก่อโรครุนแรงทั้งสองชนิดนี้น้อยมาก

โดยสรุปพบว่า *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์มียีนก่อโรคสัมพันธ์กับแบคทีเรียโอเฟกและ PAI หลายชนิด บางชนิดพบในอัตราที่สูง เช่น *lukDE* และ *sak* ส่วนยีนอื่น ๆ พบในอัตราที่แตกต่างกันไป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ของ MRSA ที่พบในโรงพยาบาลอาจมีลักษณะเป็น clone เนื่องจากความหลากหลายของยีนกลุ่ม SEs น้อยกว่ากลุ่ม MSSA การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับยีนก่อโรครุนแรงของ *S. aureus* ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ด้วยเทคนิค PCR ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในเชิงยีนก่อโรค อาจเป็นประโยชน์สำหรับจำแนกสายพันธุ์เชิงวิทยาการระบาดโรงพยาบาล (hospital epidemiology) และสนับสนุนการรักษาการติดเชื้อชนิดนี้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการสนับสนุนนักวิจัยใหม่ ปีงบประมาณ 2549ทุนบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2550 และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Keiichi Hiramatsu และ Dr. Teruyo Ito มหาวิทยาลัยจุนเทนโด ประเทศญี่ปุ่น และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ. ชาญวิทย์ ตริพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียอ้างอิง และเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บเชื้อตัวอย่างในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339: 520-32.
2. Kloos W. *Staphylococcus*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. 9th ed. London: Arnold; 1998; 577-631.
3. Bannerman T. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover R (eds.) Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington, D.C.: ASM; 2003; 384-404.
4. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 2008; 8: 747-63.
5. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol 2002; 40: 4289-94.
6. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1001-12.
7. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2155-61.
8. Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends Microbiol 2004; 12: 378-85.
9. Lindsay JA, Holden MT. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. Funct Integr Genomics 2006; 6: 186-201.
10. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical

- aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 224-42.
11. Dinges M, Orwin P, Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:16-34.
 12. Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brussow H. Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 238-76.
 13. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
 14. Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3411-4.
 15. Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2548-53.
 16. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2006; 193: 1495-503.
 17. Goerke C, Koller J, Wolz C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 171-7.
 18. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1128-32.
 19. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70: 631-41.
 20. Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Rozalska B. Staphylokinase production by clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Pol J Microbiol* 2007; 56: 97-102.
 21. Sung JM, Lloyd DH, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 2008; 154: 1949-59.
 22. Ben Nejma M, Mastouri M, Frih S, Sakly N, Ben Salem Y, Nour M. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 21-6.
 23. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 819-24.
 24. Arciola CR, Baldassarri L, Von Eiff C, Campoccia D, Ravaioli S, Pirini V, et al. Prevalence of genes encoding for staphylococcal leukocidal toxins among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from implant orthopedic infections. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 792-7.
 25. Lopez-Aguilar C, Perez-Roth E, Moreno A, Duran MC, Casanova C, Aguirre-Jaime A, et al. Association between the presence of the Panton-Valentine leukocidin-encoding gene and a lower rate of survival among hospitalized pulmonary patients with staphylococcal disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 274-6.
 26. Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Puapermpoonsiri S, Prariyachatgul C, Chumpol J. A rapidly fatal case of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia in an HIV-infected patient. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 690-4.
 27. Chumpol J, Puapermpoonsiri S, Prariyachatgul C. Detection of Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from patients at

- Srinagarind Hospital. KKU Res J. 2006; 6: 91-5.
28. Ellington MJ, Hope R, Ganner M, Ganner M, East C, Brick G, et al. Is Panton-Valentine leukocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? J Antimicrob Chemother 2007; 60: 402-5.
 29. Hsu LY, Koh TH, Kurup A, Low J, Chlebicki MP, Tan BH. High incidence of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in a tertiary care public hospital in Singapore. Clin Infect Dis 2005; 40: 486-9.
 30. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 29-34.
 31. Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, et al. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. J Appl Microbiol 2006;101:864-71.
 32. Ferry T, Thomas D, Genestier AL, Bes M, Lina G, Vandenesch F, et al. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. Clin Infect Dis 2005; 41: 771-7.