

การตรวจพบโคลนสำคัญของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* โดยการสำรวจเชิงโมเลกุลในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น **

บัวลาย ทน่อเจริญ^{1,2}, โชติชนะ วิไลลักษณ์^{2*}, ณัฐนันท์ ทงษ์ศรีจันทร์^{1,2}, วัลลภ แก้วเกษ³, โชคชัย วิลาชัย⁴,
อรุณลักษณ์ อุดิตานนท์², อรุณวดี ชนะวงศ์², ประกาย พิกักษ์⁵, จันทรเพ็ญ บัวเพื่อน⁵, สายสมร พลดงนอก⁵

บทคัดย่อ

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นแบคทีเรียสำคัญที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลตติยภูมิ ความรุนแรงของการติดเชื้ออาจส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ การควบคุมและการป้องกันการติดเชื้อมีความสำคัญ จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลส่วนหนึ่งด้านวิทยาการระบาดระดับโมเลกุล ในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เทคนิคด้านอณูชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง polymerase chain reaction (PCR) ได้รับการประยุกต์เพื่อวัตถุประสงค์ด้านวิทยาการระบาดของการติดเชื้อมากขึ้น และเป็นเทคนิคที่เป็นไปได้สูงที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในประเทศไทย คณะผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้เทคนิคจำแนกสายพันธุ์บนพื้นฐานของ PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดของ SCCmec, variable number of tandem repeat ในตำแหน่ง hypervariable region downstream ของ *mecA* (HVR), *spa* gene เพื่อระบุสายพันธุ์สำคัญที่แพร่ระบาด ลักษณะด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่แพร่ระบาด และห่อผู้ป่วยที่ตรวจพบผู้ป่วยติดเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยศึกษาในตัวอย่างเชื้อ 247 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 124 รายระหว่างเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม 2550 ผลการศึกษาพบว่า ชนิดของ SCCmec ที่พบมากที่สุด คือ type-III SCCmec ร้อยละ 60.7 รองลงมาคือ type-III A, type-II, type-III DCS และ type-I variant ที่มี *mec* complex เป็น class C ในอัตราความชุกร้อยละ 30.8, 6, 1.7 และ 0.9 ตามลำดับ *spa* และ HVR typing จำแนก MRSA ได้ออกเป็น 5 และ 10 แบบ สายพันธุ์สำคัญ คือ สายพันธุ์ที่พบ type-III-HVR15-*spa*-7 (III-15-7) ร้อยละ 43.6 และ IIIA-7-7 ร้อยละ 22.2 ห่อผู้ป่วยที่พบ MRSA สายพันธุ์หลัก (major clone) คือ ห่อผู้ป่วยอายุรกรรม และห่อผู้ป่วยระยะวิกฤต สารที่ได้จากการวิจัยสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล และเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคจำแนกสายพันธุ์ด้วย PCR อย่างรวดเร็ว เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

คำสำคัญ : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, Molecular typing, SCCmec, Hospital epidemiology, Molecular epidemiology

¹ บัณฑิตศึกษา

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

³ ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระดับโมเลกุล

⁴ หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ ⁵ หน่วยควบคุมโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

** นำเสนอด้วยวาจาในการประชุมวิชาการการควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลระดับชาติ ครั้งที่ 5 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช พัทยา 21-25 กรกฎาคม 2551

Recognition of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones by molecular surveillance in Srinagarind Hospital, Khon Kaen

Boualay Norchaleun^{1,2}, Chotechana Wilailuckana^{2*}, Nuttanan Hongsrirachan^{1,2}, Wanlop Kaewkes³,
Chokchai Wilachai⁴, Aroonlug Lulitanond², Aroonwadee Chanawong²,
Prakai Pitak⁵, Janpen Bourpoern⁵, Saisamorn Poldongnauk⁵

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, a well-known nosocomial pathogen in tertiary healthcare facilities, can cause severe life-threatening symptoms. Nowadays, prevention and control of outbreaks related to hospital-acquired infections need molecular information to distinguish and definitely define a real etiology. For the last decade, molecular techniques have been developed and applied to an epidemiological study of infectious diseases. Among them, polymerase chain reaction-based typing techniques are most feasible to be used as molecular tools in clinical microbiology laboratory in Thailand. In this study, PCR-based typing methods, including SCCmec typing, variable numbers of tandem repeats typing of hypervariable region downstream of mecA (HVR) locus and spa gene, were applied in order to determine genetic background, and major endemic clones in Srinagarind Hospital, Khon Kaen. A total of 247 MRSA isolated from 124 patients of Srinagarind Hospital during July 2007 through December 2008 were characterized by the PCR-based typing methods described above. Five SCCmec types were identified as type-III (60.7%), type-IIIA (30.8%), type-II SCCmec (6%), type-III DCS (1.7%), and type-I variant with class C mec complex (0.9%), respectively. HVR and spa typing differentiated MRSA into 5 and 10 groups, respectively. Combination of all genetic markers could identify two major clones, III-15-7 (43.6%), and IIIA-7-7 (22.2%). Medical wards and medical intensive care unit were considered as endemic areas of these two clones. Information in this study may be applied to infection control measure and lead to development of suitable PCR-typing techniques for MRSA in clinical laboratory.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, Molecular typing, SCCmec, Hospital epidemiology, Molecular epidemiology

¹ Graduate School,

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

³ Center for Emerging Infectious Diseases,

⁴ Clinical Microbiology Laboratory, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine,

⁵ Infection Control Unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

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

บทนำ

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทรงกลม และเป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในบรรดากลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก^(1,2) เนื่องจากเชื้อดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin) ซึ่งใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* การรักษาผู้ป่วยติดเชื้อชนิดนี้ จึงต้องใช้ยาในกลุ่มไกลโคเปปไทด์ เช่น แวนโคไมซิน (vancomycin) ซึ่งมีราคาแพง และเพิ่มโอกาสคัดสายพันธุ์ *Enterococcus* ที่ดื้อต่อยาแวนโคไมซิน⁽³⁾ ปัจจุบัน MRSA แพร่ระบาดในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การระบาดของ MRSA เป็นไปในลักษณะ endemic มีผู้ป่วยติดเชื้ออยู่เป็นประจำ และบางครั้งเกิดขึ้นในลักษณะ outbreak⁽⁴⁻⁶⁾ การจำแนกสายพันธุ์ MRSA จึงมีความสำคัญในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อดังกล่าว ในอดีตการจำแนกสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ การวิเคราะห์แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ แต่ปัจจุบัน MRSA ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดจนไม่อาจใช้เป็นลักษณะจำแนกได้อีกต่อไป ดังนั้นเทคนิคจำแนกสายพันธุ์ทางอณูชีวโมเลกุลสำหรับ MRSA จึงเป็นเทคนิคที่น่าจะนำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการได้ดีกว่าวิธีทางฟิโนทัยป์

เทคนิคการแยกสายพันธุ์ที่นิยมใช้ทั่วไป มีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) เป็นวิธีที่ยอมรับกันแพร่หลายว่าสามารถแยกสายพันธุ์ได้ดี⁽⁷⁾ ครอบคลุมกว่าร้อยละ 90 ของโครโมโซมแบคทีเรีย⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตามวิธี PFGE ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ผู้เชี่ยวชาญ และหากเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมเพียงเล็กน้อย วิธี PFGE ก็ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เช่นกัน วิธีที่เหมาะสมกับสถานการณ์อันใกล้สำหรับห้องปฏิบัติการในประเทศไทย น่าจะเป็นวิธี polymerase-chain reaction (PCR)-based typing methods ซึ่งอาศัยเครื่อง thermal cycler ทำได้ง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก⁽⁹⁾ และมีแนวโน้มว่าห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงในประเทศไทยจะนำเทคนิคด้าน PCR มาใช้ประโยชน์มากขึ้น

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจสายพันธุ์ MRSA โดยประยุกต์ PCR-based typing technique ประกอบด้วย Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing และ Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) typing ในยีน surface protein A (*spa*) และ hypervariable

region ถัดจากยีน *mecA* เพื่อสำรวจลักษณะทางพันธุกรรม และวิเคราะห์หาสายพันธุ์สำคัญที่แพร่ระบาดในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างเชื้อ MRSA ทุกตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ โดยห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย วิทยาคลินิก หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2550 จำนวนทั้งสิ้น 247 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 124 ราย โดยผู้ป่วย 57 รายส่งตัวอย่างตรวจมากกว่าหนึ่งตัวอย่าง ส่วนผู้ป่วย 67 ราย ส่งตรวจเพียงตัวอย่างเดียว แยกเป็นเสมหะ 110 ตัวอย่าง (ร้อยละ 44.5), หลอด 64 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.9), tracheal suction ซึ่งเป็นระบบทางเดินหายใจเช่นกัน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.2) เลือด 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.3) น้ำจากอวัยวะภายใน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.2) cut down tip 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.4) ปัสสาวะ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2) เนื้อเยื่อ (tissue) 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.4) เชื้อทั้งหมดได้รับการทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอล (OF-Mannitol) การทดสอบการสลายดีเอ็นเอ (deoxyribonuclease; DNase) (Becton Dickinson, Cockeysville, USA) และความไวต่อสารต้านจุลชีพ cefoxitin (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) อีกครั้งก่อนนำไปเก็บรักษาใน skimmed milk (Oxoid) ผสมกลีเซอรอล (VWR International, Poole, England) ร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการศึกษาในลำดับต่อไป ข้อมูลตัวอย่างส่งตรวจและผลความไวต่อสารต้านจุลชีพ ซึ่งทดสอบตามวิธีมาตรฐานของ CLSI⁽¹⁰⁾ รวบรวมและวิเคราะห์โดยแสดงเป็นอัตราส่วนของตัวอย่างและการดื้อยาแต่ละชนิด

แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นเชื้อ MRSA สายพันธุ์ NCTC 10442 (type I SCC*mec*), N315 (type II SCC*mec*), 85/2082 (type III SCC*mec*) และ JU4744 (type IV SCC*mec*) สำหรับ SCC*mec* typing, *spa*, HVR typing และ *S. aureus* ATCC 25923 สำหรับควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion⁽¹⁰⁾

2. การสกัดดีเอ็นเอและตรวจยืนยัน MRSA

การสกัดดีเอ็นเอเชื้อตัวอย่างทำตามวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) phenol-chloroform extraction⁽¹¹⁾ โดยใช้ 0.2 mg/ml Lysostaphin (Sigma-Aldrich Inc., Germany) เป็นสารเคมีย่อยสลายผนังเซลล์ ดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาต่อไป ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและตรวจยืนยัน MRSA โดยตรวจหา ยีน *16S-rDNA*, *nuc* และ *mecA* ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ primer 16SrDNA-F (5'-GTAGGTGGCAAGCGTTATCC-3') และ 16SrDNA-R (5'-CGCACATCAGCGTCAG-3')⁽¹²⁾, primer nucF20 (5'-TGCTATGATTGTGGTAGCCATC-3') และ nucF120 (5'-TACAGTTT CAT GATTCGTCCCC-3') และ primer MECA P4 (5'-TCCAGATTACAAC TTCAC CAGG-3') และ MECA P7 (5'-CCACTTCATATCTTG TAACG-3')⁽¹³⁾ ส่วนประกอบสำหรับ M-PCR ในปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer (New England Biolabs, Ontario, Canada), 2 mM MgSO₄, 200 µM dNTP (Promega, Medicon, WI, USA), 0.2 µM 16S rDNA-F และ 16S rDNA-R, 0.5 µM nucF20, nucR120, MECA P4 และ MECA P7, (Operon Biotechnologies, GmbH, Germany), 1 U *Taq* polymerase (NEB) และ ดีเอ็นเอตัวอย่าง 0.5 µl ปฏิกิริยา M-PCR ประกอบด้วย pre-denaturation 95°C 5 นาที และ 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, 100 และ 162 base pairs ตามลำดับ

3. การตรวจสอบชนิดของ SCCmec typing

การตรวจสอบ SCCmec ทำตามวิธีของ Oliveira et al.⁽¹³⁾ กรณีที่ยืนยันชนิดไม่ได้ด้วยวิธีของ Oliveira จะไปทำ *ccr* typing และ *mecA* complex ด้วยวิธีของ Kondo et al.⁽¹⁴⁾

4. spa typing

ตรวจประมาณจำนวน repeat ที่แตกต่างกัน (variable number of tandem repeat) ในส่วน X region ของยีน *spa* (surface protein A) ของตัวอย่าง MRSA ด้วยวิธี PCR⁽¹⁵⁾ ส่วนประกอบของ PCR mixture 25 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 2 mM MgSO₄, 200 µM dNTP (Promega), 0.5 µM primer *spa*_MF: 5'-TCAAGCACCAAAAG AGGAAGA-3' (position 1522-1544 of GenBank accession number X61307) และ reverse primer: *spa*_MR 5'-GTTTAAACGACAT GTACTCCGTTG-3' (position 1784-1806 of GenBank accession number X61307) และ 1 U *Taq* polymerase ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นด้วย predenaturation 94°C 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ ด้วยปฏิกิริยา denaturation ที่ 94°C 1 นาที, annealing ที่ 60°C 1 นาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที และ final extension ที่ 72°C 7 นาที ตรวจสอบขนาดของ PCR product และคำนวณประมาณจำนวน repeat เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน โดยเทียบจาก 1 repeat เท่ากับ 24 เบส

5. Hypervariable region downstream of *mecA* (HVR) typing

ตรวจประมาณจำนวน repeat ขนาด 40 bp ใน HVR โดยวิธี PCR ตามวิธีของ Senna et al.⁽¹⁶⁾ ส่วนประกอบของ PCR mixture 25 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.5 µM primer HVR1, 5'-ACTATTCCCTCAGGCGTCC-3' และ HVR2, 5'-GGAGTTAATC TACGTCTCATC-3' และ 1 U *Taq* polymerase ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นด้วย predenaturation 94°C 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ ด้วยปฏิกิริยา denaturation ที่ 94°C 1 นาที, annealing ที่ 55°C 1 นาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที และ final extension ที่ 72°C 7 นาที ทำการทดสอบควบคู่ไปกับสายพันธุ์มาตรฐาน ตรวจสอบขนาดของ PCR product และคำนวณประมาณจำนวน repeat โดยเทียบจาก 1 repeat เท่ากับ 40 เบส

6. การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลการกระจายของ SCCmec, HVR และ spa typing นำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา โดยคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ และแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง genotype กับหอผู้ป่วย อำนาจการจำแนกของ SCCmec, HVR และ spa typing และการใช้ลักษณะจีโนทัยป์ร่วมกับ ฟิโนทัยป์ คำนวณโดยวิธีของ Hunter et al.⁽¹⁷⁾

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า MRSA คือต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน กล่าวคือคือต่อยา erythromycin, clindamycin, levofloxacin, cotrimoxazole, gentamicin, fosfomycin และ fusidic acid ในอัตรา การดื้อยาร้อยละ 100, 99.1, 98.2, 94.0, 93.7, 11.7 และ 3.6 ตามลำดับ แต่ยังคงไวต่อยา vancomycin (ร้อยละ 100)

2. ชนิดของ SCCmec type

เนื่องจากตัวอย่างจากผู้ป่วย 67 รายส่งตรวจเพียง ตัวอย่างเดียว และตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วยจำนวน 57 ราย นำส่งมากกว่า 1 ตัวอย่าง เมื่อตรวจวิเคราะห์จำแนก สายพันธุ์ด้วยวิธี PCR-based typing แล้วพบว่าตัวอย่าง MRSA ที่ได้จากผู้ป่วย 40 รายให้ผลการตรวจตรงกัน ทุกตัวอย่าง และ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยอีก 7 ราย ให้ลักษณะทางพันธุกรรมไม่ตรงกันทุกครั้ง ดังนั้นจึงวิเคราะห์ การกระจายของ SCCmec, HVR และ spa typing จาก ผู้ป่วย 117 รายที่มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน จากวิธี SCCmec typing พบว่า type-III SCCmec พบมากที่สุดคือร้อยละ 60.7 รองลงมาคือ type-IIIA, type-II, type-III DCS (downstream constant sequence) และ type-I variant ที่มี mec complex เป็น class C ในอัตราความชุกร้อยละ 30.8, 6, 1.7 และ 0.9 ตามลำดับ

3. spa typing

ผลการตรวจวิเคราะห์ spa typing จำแนก MRSA ได้ 5 รูปแบบ คือ PCR product ที่ได้จาก spa_MF และ spa_MR มีขนาด 190 bp (6 repeats), 214 bp (7 repeats), 238 bp (8 repeats), 286 bp (10 repeats) และ 304 bp

(11 repeats) ชนิดที่พบมากที่สุดคือ 7 repeats ร้อยละ 89.7, 8 repeats พบร้อยละ 4.3, 6 และ 10 repeats พบเท่ากัน ร้อยละ 2.6 ชนิดที่พบน้อยที่สุดคือ 11 repeats พบเพียง 1 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.6

4. HVR typing

Repeat ใน HVR region ของ MRSA 117 ตัวอย่าง ของผู้ป่วยที่ตรวจพบลักษณะพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน ในผู้ป่วยแต่ละราย พบความหลากหลายมากกว่า spa typing กล่าวคือพบลักษณะแตกต่างกัน 10 แบบ คือ 4 (331 bp), 5 (371 bp), 6 (411 bp), 7 (451 bp), 9 (531 bp), 11 (611 bp), 12 (651 bp), 14 (731 bp), 15 (771 bp), และ 17 (851 bp) repeats ชนิดที่พบมากที่สุดคือ 15 repeats พบร้อยละ 48.7 และชนิดที่พบรองลงมาตามลำดับ คือ 7 repeats พบร้อยละ 35 ส่วนชนิดอื่นที่พบน้อย คือ 17 และ 9 repeats พบร้อยละ 5.1 และ 4.3 ชนิด 4 และ 12 repeats พบร้อยละ 1.7 และชนิดที่พบน้อยที่สุด ชนิดละ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.9) คือ 5 , 6 และ 11 repeat ตามลำดับ

5. ลักษณะทางพันธุกรรมของ MRSA โดยวิเคราะห์ ลักษณะ SCCmec ร่วมกับ spa และ HVR

เมื่อผนวกลักษณะทางพันธุกรรมโดย 3 marker ร่วมกัน พบว่า สามารถจำแนก MRSA ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ได้เป็น 17 ชนิดหรือ 17 จีโนทัยป์ โดยกำหนดการเรียกชื่อ สายพันธุ์ตามการศึกษานี้ตามรูปแบบ SCCmec-repeats in HVR-repeats in spa ชนิดที่พบมากที่สุดคือ III-15-7 จำนวน 51 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 43.6 รองลงมาคือ IIIA-7-7 จำนวน 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.2) ค่าอำนาจการ จำแนกโดยวิธีอณูชีวโมเลกุล มีอำนาจการจำแนก เท่ากับ 0.75 สัดส่วนของจีโนทัยป์ต่าง ๆ ของ MRSA ที่ตรวจพบ ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์แสดงไว้ดังตารางที่ 1 อนึ่ง ลักษณะ จีโนทัยป์อีกชนิดหนึ่งที่พบในผู้ป่วย 1 รายในผู้ป่วย 7 ราย ที่ตรวจพบ MRSA ที่มีลักษณะแปรปรวน คือ III-15-1 ส่วน MRSA ในผู้ป่วยอีก 6 รายให้ลักษณะจีโนทัยป์ซ้ำกับ จีโนทัยป์ต่าง ๆ ที่แสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะจีโนไทป์ของ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม 2550 โดยอาศัย SCCmec, HVR และ spa typing

Genotype	SCCmec type	HVR (DRUs)	spa (DRUs)	Total n (%)
1	I variant	11	11	1 (0.9%)
2	II	7	10	3 (2.6%)
3	II	9	7	4 (3.4%)
4	III	5	7	1 (0.9%)
5	III	7	7	8 (6.8%)
6	III	14	7	1 (0.9%)
7	III	15	6	3 (2.6%)
8	III	15	7	51 (43.6%)
9	III	15	8	1 (0.9%)
10	III	17	7	6 (5.1%)
11	IIIA	4	7	2 (1.7%)
12	IIIA	6	7	1 (0.9%)
13	IIIA	7	7	26 (22.2%)
14	IIIA	7	8	4 (3.4%)
15	IIIA	9	7	1 (0.9%)
16	IIIA	15	7	2 (1.7%)
17	III DCS	12	7	2 (1.7%)

SCCmec, Staphylococcal chromosomal cassette *mec*; HVR, Hypervariable region downstream of *mecA*; spa, surface protein A; DRUs, direct repeat units; DCS, Downstream Constant Sequence; Reference strain: NCTC10442, type I SCCmec; N315, type II SCCmec, 9 DRUs in HVR, 10 DRUs in *spa* gene; 85/2082, type III SCCmec, 10 DRUs in HVR

6. ความสัมพันธ์ของ SCCmec กับความไวต่อยาต้านจุลชีพ

เมื่อนำข้อมูล SCCmec ของ MRSA แต่ละชนิดมาพิจารณาพร้อมกับความไวต่อยาต้านจุลชีพดัง ตารางที่ 2 พบว่า MRSA แสดงคุณสมบัติดื้อต่อยาหลายขนาน (multi-drug resistance) กล่าวคือ type-III SCCmec ดื้อต่อยาต้าน

จุลชีพเกือบทุกชนิด และมีความแตกต่างกันเล็กน้อยใน subtype คือ type-IIIa บางสายพันธุ์ไวต่อยา clindamycin เพียงร้อยละ 2.8 สำหรับ type-II (n=7) มีอัตราความไวกับยา cotrimoxazole สูงกว่า SCCmec อื่น ๆ แต่ดื้อต่อยา fosfomycin (ร้อยละ 100) และ fusidic acid (ร้อยละ 42.0%) สูงกว่า SCCmec อื่นๆ ดัง ตารางที่ 3

ตารางที่ 2 อัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของ MRSA จำนวน 117 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม 2550

Antimicrobial agent	SCCmec type of MRSA					Total (n=117)
	I-variant (n=1)	II (n=7)	III (n=71)	IIIA (n=36)	III DCS (n=2)	
Cephalothin	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Erythromycin	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Clindamycin	100.0	100.0	100.0	97.2	100.0	99.1
Cotrimoxazole	0.0	14.2	100.0	100.0	100.0	94.0
Gentamicin	0.0	83.3	95.7	94.1	100.0	93.7
Fosfomycin	0.0	100.0	6.1	5.7	0.0	11.7
Fusidic acid	0.0	42.0	1.4	0.0	0.0	3.6
Vancomycin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

ตารางที่ 3 คุณลักษณะของ MRSA จำแนกโดยจีโนทัยป์ร่วมกับแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ

Profile	SCCmec type	HVR (DRUs)	spa (DRUs)	Antibiogram								Total (%)
				CF	SXT	E	GM	DA	FOS	FUS	VA	
1	I variant	11	11	R	S	R	R	R	S	S	S	1 (0.9%)
2	II	7	10	R	S	R	R	R	R	R	S	1 (0.9%)
3	II	7	10	R	S	R	S	R	R	R	S	2 (1.7%)
4	II	9	7	R	R	R	R	R	R	S	S	1 (0.9%)
5	II	9	7	R	S	R	R	R	R	S	S	3 (2.6%)
6	III	5	7	R	R	R	R	R	R	S	S	1 (0.9%)
7	III	7	7	R	R	R	R	R	S	S	S	8 (6.8%)
8	III	14	7	R	R	R	R	R	-	S	S	1 (0.9%)
9	III	15	6	R	R	R	R	R	S	S	S	3 (2.6%)
10	III	15	7	R	R	R	S	R	S	R	S	1 (0.9%)
11	III	15	7	R	R	R	S	R	S	S	S	3 (2.6%)
12	III	15	7	R	R	R	R	R	R	S	S	3 (2.6%)
13	III	15	7	R	R	R	R	R	S	S	S	44 (37.6%)
14	III	15	8	R	R	R	R	R	S	S	S	1 (0.9%)
15	III	17	7	R	R	R	R	R	S	S	S	6 (5.1%)
16	IIIA	4	7	R	R	R	R	R	S	S	S	2 (1.7%)
17	IIIA	6	7	R	R	R	R	R	S	S	S	1 (0.9%)
18	IIIA	7	7	R	R	R	S	R	S	S	S	1 (0.9%)
19	IIIA	7	7	R	R	R	R	S	S	S	S	1 (0.9%)
20	IIIA	7	7	R	R	R	R	R	S	S	S	22 (18.8%)
21	IIIA	7	7	R	R	R	R	R	R	S	S	2 (1.7%)
22	IIIA	7	8	R	R	R	S	R	S	S	S	1 (0.9%)
23	IIIA	7	8	R	R	R	R	R	S	S	S	3 (2.6%)
24	IIIA	9	7	R	R	R	R	R	S	S	S	1 (0.9%)
25	IIIA	15	7	R	R	R	R	R	S	S	S	2 (1.7%)
26	IIIDCS	12	7	R	R	R	R	R	S	S	S	2 (1.7%)

SCCmec; Staphylococcal cassette chromosome; HVR, hypervariable region downstream of *mecA*; spa, surface protein A; DRUs, direct repeat units; CF, cephalothin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; E, erythromycin; GM, gentamicin; DA, clindamycin; Fos, fosfomycin; FA, fusidic acid; VA, vancomycin

7. แบบแผนคุณลักษณะร่วมของจีโนทัยป์และฟีโนทัยป์

จากข้อมูลความหลากหลายของ SCCmec, HVR และ spa และความแตกต่างของแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของ MRSA จึงนำข้อมูลการจำแนกสายพันธุ์โดยจีโนทัยป์และความไวต่อยาต้านจุลชีพซึ่งเป็นลักษณะฟีโนทัยป์ผนวกรวมกันเพื่อจำแนกสายพันธุ์ พบว่า MRSA ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน สามารถจำแนกเป็น subtype ดังแสดงในตารางที่ 3 สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 26 รูปแบบ (profile) ค่าอำนาจการจำแนกเท่ากับ 0.82

8. การกระจายของจีโนทัยป์ในหอผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์

จากการวิเคราะห์ข้อมูลหอผู้ป่วยที่มีผู้ป่วยรายใดรายหนึ่งที่ส่งตรวจร่วมกับลักษณะทางจีโนทัยป์ โดยพิจารณาจากข้อมูลตัวอย่างแรกที่ห้องปฏิบัติการได้รับเพื่อศึกษาการกระจายของจีโนทัยป์ตามหอผู้ป่วย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ พบว่าจีโนทัยป์ III-15-7 แพร่กระจายอยู่หอผู้ป่วยใน 19 แห่ง และพบจากผู้ป่วยนอก 1 ราย ส่วนจีโนทัยป์ IIIA-7-7 พบกระจายอยู่ในหอผู้ป่วย 14 แห่ง หอผู้ป่วยที่พบ MRSA มากเป็นลำดับต้นๆ คือ หอผู้ป่วยอายุรกรรม และหอผู้ป่วยอายุรกรรมระยะวิกฤตดัง ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การกระจายของอีโนทัยป์ต่างๆ ของ MRSA ตามหอผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม 2550

Ward	หอผู้ป่วย																	Total n (%)
	I var-11-11	II-7-10	II-9-7	III-5-7	III-7-7	III-14-7	III-15-6	III-15-7	III-15-8	III-17-7	IIIA-4-7	IIIA-6-7	IIIA-7-7	IIIA-7-8	IIIA-9-7	IIIA-15-7	III DCS-12-7	
กุมารเวชกรรม 1								4		1						1		6 (5.1%)
กุมารเวชกรรม 2					1			1										2 (1.7%)
หอผู้ป่วยพิเศษ								1					1					2 (1.7%)
เวชศาสตร์ฟื้นฟู 1								2										2 (1.7%)
ศัลยกรรม 1								1	1				1					3 (2.6%)
ศัลยกรรม 2	1									1							1	3 (2.6%)
ศัลยกรรม 3								3										3 (2.6%)
ศัลยกรรม													1					1 (0.9%)
สวัสดิการ												1	3					6 (5.1%)
เวชศาสตร์ฟื้นฟู								1										1 (0.9%)
อายุรกรรม 1					1			1					1				1	4 (3.4%)
อายุรกรรม 2					1		1	10			1		7					20 (17.1%)
อายุรกรรม 3					1			7					2					10 (8.5%)
บำบัดพิเศษ								1								1		2 (1.7%)
โสต คอ นสิก											1							1 (0.9%)
หอพิเศษ					1													1 (0.9%)
ฉุกเฉิน1					1		1											2 (1.7%)
ฉุกเฉิน2	1							1				1	1					4 (3.4%)
ฉุกเฉิน3								2										2 (1.7%)
MICU		2		1				4					2	3				12 (10.3%)
Burn Unit			1					1										2 (1.7%)
CCU										1			1		1			3 (2.6%)
ICU			1		1													2 (1.7%)
หอผู้ป่วยนอกฉุกเฉิน					1			2										3 (2.6%)
OPD1			1					1										2 (1.7%)
OPD2										1								1 (0.9%)
OPD3						1												1 (0.9%)
หอสงฆ์อาพาธ								4						1				6 (5.1%)
SICU			1							2			2					5 (4.3%)
หน่วยไตและไตเทียม																		
RESUSCITATION								2					1					1 (0.9%)
Total	1	3	4	1	8	1	3	51	1	6	2	1	26	4	1	2	2	117 (100%)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า MRSA ส่วนใหญ่เป็น type-III *SCCmec* และ type-IIIa ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบทั่วไปในประเทศไทยมีรายงานสายพันธุ์เหล่านี้จากโรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร⁽¹⁸⁾ อุบลราชธานี⁽¹⁹⁾ และประเทศในทวีปเอเชีย คือ ศรีลังกา อินโดนีเซีย เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ซาอุดีอาระเบีย อินเดีย และสิงคโปร์⁽²⁰⁾ ส่วน type-II *SCCmec* พบประปรายในประเทศไทย สายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ แตกต่างจากสายพันธุ์ N315 ซึ่งเป็น prototype ของ type-II *SCCmec* และสายพันธุ์จากโรงพยาบาลศิริราช⁽¹⁸⁾ กล่าวคือ สายพันธุ์ดังกล่าวให้ลักษณะจีโนทัยป์ เป็น II-9-10 ขณะที่สายพันธุ์ที่พบในโรงพยาบาลศรีนครินทร์เป็นจีโนทัยป์ II-7-10 สำหรับ type-I *SCCmec* เป็นสายพันธุ์ที่พบน้อยในประเทศไทย และที่น่าสนใจจากการศึกษาครั้งนี้คือ พบว่า *mec* complex ของ type-I เป็น class C *mec* complex ซึ่งมีรายงานพบใน type-V^(14,21) อย่างไรก็ตาม *SCCmec* เป็นประโยชน์ด้านข้อมูลวิทยาการระบาดระดับนานาชาติ แต่ไม่อาจใช้เป็น marker สำหรับจำแนกสายพันธุ์เชิงวิทยาการระบาดในโรงพยาบาลได้ เนื่องจากมีอำนาจการจำแนกต่ำ^(18,22) เช่นเดียวกับการใช้ HVR และ *spa* typing เพียงวิธีใดวิธีหนึ่ง การผนวก *SCCmec*, HVR, *spa* ช่วยให้อำนาจการจำแนกสายพันธุ์ได้ดีขึ้น⁽²²⁾

การศึกษานี้บ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ MRSA และแสดงให้เห็นการกระจายของสายพันธุ์ MRSA ทั้งที่มีลักษณะเหมือนกันและแตกต่างกันตามหอผู้ป่วยต่างๆ กล่าวคือ หากอาศัยลักษณะทางจีโนทัยป์ตามการศึกษานี้จำแนก MRSA พบว่าทั้งหมด 17 จีโนทัยป์ แต่เมื่อผนวกกับแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบรูปแบบคุณลักษณะมากขึ้นเป็น 26 รูปแบบ โดยเฉพาะในกลุ่มสายพันธุ์ที่พบบ่อยหรือ major clone คือ III-15-7, IIIA-7-7 ที่พบว่าแบบแผนความไวสามารถจำแนก major clone เหล่านี้ออกได้อีก ซึ่งแสดงให้เห็นประเด็นที่เป็นไปได้ 2 ประเด็นคือ ในกลุ่ม major clone ยังมี subtype และอำนาจการจำแนกของ *SCCmec*, HVR และ *spa* มีอำนาจการจำแนกไม่เพียงพอที่จะแยก subtype ในกลุ่มนี้ได้ ซึ่งค่าอำนาจการจำแนกของวิธีทางจีโนทัยป์ในการศึกษานี้

เท่ากับ 0.75 หากผนวกแบบแผนความไว จะมีอำนาจการจำแนกเพิ่มขึ้นเป็น 0.81

สายพันธุ์ที่พบบ่อยกระจายทั่วไปในหอผู้ป่วยหลายๆ แห่ง หอผู้ป่วยที่มี MRSA หลากหลายสายพันธุ์มากที่สุด คือ หอผู้ป่วยอายุรกรรม และหอผู้ป่วยอายุรกรรมระยะวิกฤต บางหอผู้ป่วยตรวจพบผู้ป่วย MRSA น้อยมากและยังเป็นสายพันธุ์ที่พบน้อยจึงเห็นได้ว่าวิธีการทางอณูชีวโมเลกุลสามารถบ่งชี้ปัญหา และปัจจัยที่เกี่ยวกับเชื้อก่อโรคได้ชัดเจนขึ้น เช่น ระบุชนิดของสายพันธุ์ และหอผู้ป่วยที่มีปัญหาของ MRSA ได้^(23, 24)

ข้อจำกัดสำหรับการศึกษานี้ คือ ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อ MRSA ได้ทั้งหมด ซึ่งอาจส่งผลกับความชุกของสายพันธุ์ต่างๆ ของ MRSA ในระยะเวลาที่ศึกษา การระบุหอผู้ป่วยที่ตรวจพบ MRSA สายพันธุ์ต่างๆ โดยพิจารณาจากตัวอย่างแรกของผู้ป่วยที่แยกเชื้อได้ ไม่สามารถบ่งบอกถึงหอผู้ป่วยติดเชื้อได้แม่นยำนัก เนื่องจากผู้ป่วยอาจมีการเคลื่อนย้ายก่อนทำการศึกษา หรือติดเชื้อโดยปราศจากอาการก่อนการเคลื่อนย้าย อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้สามารถระบุสายพันธุ์สำคัญ และหอผู้ป่วยที่มีปัญหาการแพร่กระจายของ MRSA ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับแหล่งเก็บกักเชื้อที่ยังคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล ไม่ว่าจะเป็นบุคลากร หรือวัสดุ อุปกรณ์ และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ การตรวจหา genetic marker ด้วยวิธี PCR อาจไม่ครอบคลุมลักษณะทางพันธุกรรมได้ทั้งหมด กลุ่มสายพันธุ์ที่พบบ่อยหรือ major clone ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้ศึกษาในครั้งนี้ อาจมีลักษณะทางพันธุกรรมบางตำแหน่งแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิจัยเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกสายพันธุ์ด้านอณูชีวโมเลกุลอื่น เช่น การศึกษาการกระจายของยีนก่อโรค⁽²⁵⁾ Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)⁽⁹⁾ หรือ *spa* sequencing⁽²⁶⁾ และนำข้อมูลเหล่านี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการแยกสายพันธุ์สำหรับโรงพยาบาลในประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสโครงการ 510710006 ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่ คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

และได้รับการพิจารณารับรองการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE501238 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Keiichi Hiramatsu และ Dr. Teruyo Ito มหาวิทยาลัยจุนเทนโด ประเทศญี่ปุ่น และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์แบบคที่เรียอ้างอิง และเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิกโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บเชื้อตัวอย่างในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 781-91.
- Danchaivijitr S, Judaeng T, Sripalakij S, Naksawas K, Plipat T. Prevalence of nosocomial infection in Thailand 2006. J Med Assoc Thai 2007; 90: 1524-9.
- Drago L, Nicola L, De Vecchi E. A comparative *in-vitro* evaluation of resistance selection after exposure to teicoplanin, vancomycin, linezolid and quinupristin-dalfopristin in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 608-11.
- Casewell MW. New threats to the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 1995; 30 (Suppl):465-71.
- Lessing MP, Jordens JZ, Bowler IC. Molecular epidemiology of a multiple strain outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* amongst patients and staff. J Hosp Infect 1995; 31: 253-60.
- Hoefnagels-Schuermans A, Borremans A, Peetermans W, Van Lierde S, Reybrouck G, Van Eldere J. Origin and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an endemic situation: differences between geriatric and intensive-care patients. J Hosp Infect 1997; 36: 209-22.
- Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1991; 29: 2690-5.
- Riley L. Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices. Washington, D.C.: ASM press; 2004.
- Sabat A, Malachowa N, Miedzobrodzki J, Hryniewicz W. Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 2006; 44: 3804-7.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S17. Wayne, PA.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
- Sambrook J, Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
- 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.
- 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.

14. 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.
15. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2119-25.
16. Senna JPM, Pinto CA, Carvalho LPS, Santos DS. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2254-6.
17. Hunter P, Gaston M. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465-6.
18. Wilailuckana C, Tribuddharat C, Tiensasitorn C, Pongpech P, Naenna P, Rugdeekha S, et al. Discriminatory powers of molecular typing techniques for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 327-34.
19. Feil EJ, Nickerson EK, Chantratita N, Wuthiekanun V, Srisomang P, Cousins R, et al. Rapid detection of the pandemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST 239, a dominant strain in Asian hospitals. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1520-2.
20. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1001-12.
21. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008; 8: 747-63.
22. Hongsrirachan N. Determination of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from Srinagarind Hospital. M.Sc. Thesis, Khon Kaen University; 2009.
23. Frazee BW, Lynn J, Charlebois ED, Lambert L, Lowery D, Perdreau-Remington F. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. *Ann Emerg Med* 2005; 45: 311-20.
24. Khandavilli S, Wilson P, Cookson B, Cepeda J, Bellingan G, Brown J. Utility of *spa* typing for investigating the local epidemiology of MRSA on a UK intensive care ward. *J Hosp Infect* 2009; 71: 29-35.
25. 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.
26. Strommenger B, Bräulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nubel U, et al. *spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 574-81.