

การสร้างไบโอฟิล์มและยีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์ใน *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลินที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น

วิสประภา บุญญา^{1,2}, โชติชนะ วิไลลักษณ์^{2*}, นิชา เจริญศรี², อรุณวดี ชนะวงศ์², อรุณลักษณ์ สุสิตานนท์²,
โชคชัย วิลาชัย³, เสกสิทธิ์ สังคี², พิสมัย สายสุด²

Received: June 24, 2014

Revised & Accepted: August 14, 2014

บทคัดย่อ

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสำคัญทางการแพทย์เป็นสาเหตุของการติดเชื้อบ่อยครั้งทั้งกับผู้ป่วยในชุมชนและในโรงพยาบาล พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อของ *S. aureus* เกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ อาทิเช่น การสร้างสารพิษ ไบโอฟิล์มและโปรตีนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่เกาะติดกับเนื้อเยื่อมนุษย์ เป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อโรค วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ ศึกษาคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มโดยวิธี microtiter plate และการกระจายของยีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์ ประกอบด้วย *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *ebpS*, *sasG*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* และยีนที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์ม (*icaA*) ของตัวอย่าง MRSA จำนวน 126 ตัวอย่างของผู้ป่วยไม่ซ้ำรายที่ได้รับการแยกสายพันธุ์ด้วย PCR-based typing ประกอบด้วย SCCmec และ variable number of tandem repeat (VNTR) typing ผลการศึกษาพบว่า MRSA สร้างไบโอฟิล์มได้ในระดับอ่อนทั้งสิ้น 56 ตัวอย่างจาก 126 ตัวอย่าง (ร้อยละ 44.4) และพบว่าสัดส่วนตัวอย่าง MRSA ที่ตรวจพบยีน *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *sasG*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* อยู่ระหว่างร้อยละ 79-100 ยกเว้นยีน *ebpS* พบเพียงร้อยละ 6.3 รวมทั้งตรวจพบยีน *icaA* ใน MRSA ทุกตัวอย่าง และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มกับจีโนทัยป์ของ MRSA

คำสำคัญ : ไบโอฟิล์ม, โปรตีนผิวเซลล์, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA

¹บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

ได้รับการนำเสนอในการประชุมวิชาการประจำปี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2554 วันที่ 4-6 ตุลาคม 2554 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



Biofilm formation and surface protein encoding genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Srinagarind Hospital, Khon Kaen province

Weeraprapa Boontha,^{1,2} Chotechana Wilailuckana,^{2*} Nicha Charoensri,² Aroonwadee Chanawong,²
Aroonlug Lulitanond,² Chokchai Wilachai,³ Seksit Sungkeeree,² Phitsamai Saisud²

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the principal Gram-positive bacteria pathogen, plays an important role as a common causative agent of various infectious diseases both in community and hospital. Pathogenesis of *S. aureus* has been associated with multiple factors such as toxin production. Biofilm formation and surface proteins have been supposed to be initial properties of infection process. Thus, the objectives of this study were to determine whether biofilm formation of MRSA strains was associated with the distribution of biofilm-producing gene, *icaA* and surface protein genes, including *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *ebpS*, *sasG*, *sdrC*, *sdrD*, and *sdrE* among those MRSA isolates. A total of 126 MRSA isolates from unrepeated patients of Srinagarind Hospital, which were typed by PCR-based typing techniques including SCCmec typing and variable number of tandem repeat typings were enrolled in this study. Biofilm detection was performed by microtiter plate (MTP) technique and the surface protein genes were detected by PCR. Only weak biofilm production was observed among 56 MRSA isolates (44.4%). The surface protein encoding genes were detected in 79 % to 100% of the MRSA isolates, only *ebpS* gene was found in 6.3%. In addition, all isolates carried *icaA* gene. Moreover, there was no association of biofilm formation and MRSA genotypes.

Keywords : Biofilm, Surface protein, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

¹Graduate School, Khon Kaen University

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

³Clinical Microbiology Laboratory, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

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

บทนำ

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทรงกลม ก่อโรคติดเชื้อสำคัญทั้งกับผู้ป่วยในชุมชนและในโรงพยาบาล ยาเมธิซิลลิน (methicillin) และยาออกซาลิซิลลิน (oxacillin) เป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* ที่ดีดยาเพนิซิลลิน (penicillin) ในปี ค.ศ. 1961 Javons ตรวจพบสายพันธุ์ดีดยาเมธิซิลลินเป็นครั้งแรก เรียกว่า methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)⁽¹⁾ ปัจจุบัน MRSA มีลักษณะพันธุกรรมที่หลากหลาย มีคุณสมบัติการก่อโรคที่แตกต่างกันไป และแพร่ระบาดในโรงพยาบาลทั่วโลก⁽²⁾ การติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลเกิดขึ้นจากการสัมผัสโดยตรงผ่านบุคลากรทางการแพทย์ หรือโดยอ้อมผ่านทางเครื่องมือและอุปกรณ์ทางการแพทย์ รวมถึงสายท่อต่างๆ ที่ใช้ในการบำบัดรักษา⁽³⁾

S. aureus อาศัยโมเลกุลโปรตีนผิวเซลล์ (surface protein) ต่าง ๆ เพื่อเกาะติดกับเนื้อเยื่อก่อนที่จะก่อพยาธิสภาพตามมาด้วยการสร้างสารพิษ โปรตีนผิวเซลล์ fibronectin-binding protein (FnB), fibrinogen binding protein (ClfA และ ClfB), elastin adhesion protein (EbpS) และโปรตีนกลุ่ม serine-aspartate repeat protein (Sdr) และ *S. aureus* surface protein G (SasG) เป็นต้น⁽⁴⁻⁶⁾ ความชุกของยีนกำกับโปรตีนผิวเซลล์เหล่านี้ แตกต่างกันไปในหมู่สายพันธุ์ของ *S. aureus*⁽⁷⁾ หลังจากเกาะติดกับผิวเซลล์แล้ว *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่ปกคลุมด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ดีเอ็นเอ และโมเลกุลอื่น ๆ ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันและสารต้านจุลชีพ^(8,9)

ข้อมูลการศึกษาชนิดของยีนก่อโรคที่พบใน MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่า มีการกระจายของยีนอย่างหลากหลาย⁽¹⁰⁾ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและความชุกของยีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์ของ MRSA ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคเพื่อเป็นข้อมูลเชิงวิทยาการระบาดของเชื้อดื้อยาชนิดนี้ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างเชื้อ MRSA เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 126 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2550-เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 แยกได้จากเสมหะ (60 ตัวอย่าง) หนอง (28 ตัวอย่าง) tracheal suction (21 ตัวอย่าง) น้ำจากอวัยวะภายใน (6 ตัวอย่าง) เลือด (3 ตัวอย่าง) สายสวนเส้นโลหิต (3 ตัวอย่าง) ปัสสาวะ (2 ปัสสาวะ) และน้ำล้างหลอดลม เนื้อเยื่อจากตับ และเนื้อเยื่อไม่ระบุตำแหน่ง อย่างละ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการพิสูจน์ชนิด และจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี SCCmec, direct repeat numbers in hypervariable region ใน SCCmec (HVR) และ ยีน *spa*⁽¹⁰⁾ ลักษณะทางพันธุกรรมของตัวอย่าง MRSA แสดงไว้ดัง ตารางที่ 1 ตัวอย่างทั้งหมดเก็บรักษาไว้ใน skimmed milk (Oxoid, Hampshire, England) ผสมกลีเซอรอล (VWR International, Poole, England) ร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม โดยวิธีไมโครไทดอร์เพลท

ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มตามวิธีของ O'Neill และคณะ⁽¹¹⁾ โดยเพาะเชื้อตัวอย่างใน Brain-heart infusion (BHI) broth (Oxoid) 5 มิลลิลิตร อบที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติมน้ำ 30 ไมโครลิตร ลงใน BHI broth ที่ผสมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางเชื้อเป็น 1:100 ถ่ายเชื้อที่เจือจางลงใน Nuclon tissue culture-treated (DSurface) 96-well polystyrene plate (Nunc, Denmark) หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วอบที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง เติมนิทานอล (Merck, Darmstadt, Germany) 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 15 นาที เติมนิทานอลทิ้งไป อบที่ 60 องศาเซลเซียสจนแห้ง ย้อมด้วย 0.4% คริสตัลไวโอเล็ต (Merck) 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นาน 5 นาที ล้างโดยเปิดน้ำประปาไหลผ่านเบา ๆ นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสจนแห้ง วัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ 492 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader Sunrise™ TECAN, Switzerland)

ทำการทดสอบ 12 หลุมต่อตัวอย่าง และคำนวณค่าเฉลี่ย การแปลผลสายพันธุ์ที่สร้างไปโอฟิล์มได้ คือ มีค่า OD มากกว่าหรือเท่ากับ 0.17 ให้เป็นผลบวกตามเกณฑ์ของ O'Neill และคณะ⁽¹¹⁾ โดยใช้ *S. epidermidis* ATCC 35984 เป็นสายพันธุ์ควบคุมผลบวก และใช้น้ำกลั่นเป็นหลุมควบคุมผลลบ

3. การตรวจหายีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์และยีน *icaA* ดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดโดยวิธี Cetyltrimethyl

ammonium bromide (CTAB)-phenol chloroform⁽¹⁰⁾ ตรวจหายีน *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *sasG* และยีน *icaA* โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แบ่งออกเป็น 5 ปฏิกริยา จำแนกเป็น multiplex PCR 2 ปฏิกริยา และ simplex PCR 3 ปฏิกริยา^{12,13} ยีนที่ตรวจหาในแต่ละปฏิกริยารวมทั้งสายพันธุ์อ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ลักษณะทางพันธุกรรมของ methicillin-resistant *S. aureus* จำนวน 126 ตัวอย่างจำแนกตาม SCCmec และ variable number of tandem repeats ใน hypervariable region ใน SCCmec และ *spa* gene

SCCmec	VNTR typing (number of repeats)		จำนวนรวมตามชนิด SCCmec (ร้อยละ)
	HVR	<i>spa</i>	
I variant	10	9	3 (2.4)
I variant	11	9	
I variant	11	11	
II	7	10	4 (3.2)
II	9	7	
III	4	7	67 (53.2)
III	5	7	
III	7	7	
III	14	7	
III	15	6	
III	15	7	
III	17	7	
IIIDCS	12	7	4 (3.2)
IIIDCS	15	7	
IIIA	2	7	48 (38.1)
IIIA	4	7	
IIIA	6	7	
IIIA	7	7	
IIIA	7	8	
IIIA	9	7	
IIIA	15	7	
IIIA	17	7	

SCCmec: Staphylococcal Chromosome Cassette mec; VNTR: Variable Number of Tandem Repeats; HVR: Hypervariable region in SCCmec; *spa*: surface protein A gene

ตารางที่ 2 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา ยีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์และยีน *ica* โดยวิธี multiplex PCR และ simplex PCR

ปฏิกิริยา PCR	ยีน	ไพรมเมอร์ (5'-3')	ขนาดของ PCR product (bp)	เชื้ออ้างอิง	เอกสารอ้างอิง
M1	<i>fnbA</i>	FnbA-F: CACAACCAGCAAATATAG	1362	Mu3	12
		FnbA-R: CTGTGTGGTAATCAATGTC			
	<i>sdrD</i>	SdrD-F: GGAAATAAAGTTGAAGTTTC	500		
		SdrD-R: ACTTTGTCATCAACTGTAAT			
	<i>sdrE</i>	SdrE-F: CAGTAAATGTGTCAAAAGA	767		
		SdrE-R: TTGACTACCAGCTATATC			
M2	<i>clfA</i>	ClfA-F: GTAGGTACGTTAATCGGTT	1584	Mu50	12
		ClfA-R: CTCATCAGGTTGTTTCAGG			
	<i>clfB</i>	ClfB-F: TGCAAGATCAAACGTTCCT	596		
		ClfB-R: TCGGTCTGTAAATAAAGGTA			
	<i>ebpS</i>	EbpS-F: CAATCGATAGACACAAATTC	526		
		EbpS-R: CAGTTACATCATCATGTTTA			
S1	<i>icaA</i>	IcaA-F: GATTATGTAATGTGCTTGGA	770	N315	12
		IcaA-R: ACTACTGCTGCGTTAATAAT			
S2	<i>sasG</i>	SasG-F: CGCGGATTTCGCAGCT-GAAAACAATATT	1150	N315	6
		SasG-R: CCCAAGCTTTAATTCTGTTATT-GTTTTTGG			
S3	<i>sdrC</i>	SdrC-F: ACGACTATTAAACCAAGAAC	560	Strain 71050269	12
		SdrC-R: GTACTTGAAATAAGCGGTTG			

ปฏิกิริยา multiplex PCR ชุดแรก เป็นการตรวจหา ยีน *fnbA*, *sdrD* และ *sdrE* ส่วนประกอบของ PCR mixture 25 μ l ประกอบด้วย 1X PCR buffer (New England Biolabs, Ipswich, UK), 200 mM dNTP (SibZyme, Academtown, Russia), 0.5 μ M primer *fnbA*-1, *fnbA*-2, *sdrD*-F, *sdrE*-R, *sdrE*-F และ *sdrE*-R, 1 U *Taq* polymerase (NEB), Mg^{2+} 2 mM และดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่าง 0.5 ml ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นด้วย predenaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ ด้วยปฏิกิริยา denaturation ที่

95 องศาเซลเซียส 1 นาที, annealing ที่ 45 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที PCR product ที่ได้นำไปแยกด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย 0.5 mg/ml ethidium bromide และถ่ายภาพด้วยกล้อง CCD ผ่านเครื่อง UV transilluminator ตรวจสอบขนาดของ PCR product ขนาด 1,362, 500 และ 767 bp ของ *fnbA*, *sdrD* และ *sdrE* ตามลำดับ ดีเอ็นเอของ Mu3 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ปฏิกิริยา multiplex PCR ชุดที่ 2 มีส่วนประกอบของ PCR mixture เช่นเดียวกับปฏิกิริยาแรก แต่มี primer

ชุดที่ 2 เพื่อตรวจหา ยีน *clfA*, *clfB* และ *ebpS* และมีความเข้มข้นของ Mg^{2+} เท่ากับ 3 mM โดยใช้ MRSA Mu50 เป็นเชื้อมาตรฐาน ส่วน simplex PCR สำหรับวิเคราะห์หา ยีน *sdrC*, *icaA* และ *sasG* ในแต่ละหลอด ซึ่งมีขนาด PCR product เท่ากับ 560, 770 และ 1,150 bp ตามลำดับ โดยใช้ MRSA สายพันธุ์ 71050269 เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับปฏิกิริยาตรวจหา ยีน *sdrC* และสายพันธุ์ N315 สำหรับยีน *icaA* และ *sasG*

ผลการศึกษา

1. การสร้างไบโอฟิล์ม

จากการวิเคราะห์การสร้างไบโอฟิล์มด้วยวิธี microtiter plate (MTP) พบว่า ค่าเฉลี่ย OD_{492} เท่ากับ 0.22 ± 0.01 (95% confidence interval, 0.21-0.23) พบว่า MRSA ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ตามเกณฑ์ O'Neill

ตารางที่ 3 การกระจายของยีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์และ *icaA* ใน MRSA 126 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ยีน	จำนวน MRSA ที่ตรวจพบยีน (ร้อยละ)
<i>clfA</i> (finbrionogen-binding protein A gene)	100 (79.4)
<i>clfB</i> (finbrionogen-binding protein B gene)	121 (96.0)
<i>fnbA</i> (fibronectin-binding protein A gene)	124 (98.4)
<i>ebpS</i> (elastin-binding protein S gene)	8 (6.3)
<i>sdrC</i> (serine-aspartate repeat C protein gene)	124 (98.4)
<i>sdrD</i> (serine-aspartate repeat D protein gene)	123 (97.6)
<i>sdrE</i> (serine-aspartate repeat E protein gene)	118 (93.7)
<i>sasG</i> (<i>S. aureus</i> surface protein G gene)	117 (92.9)
<i>icaA</i> (intercellular adhesion A protein)	126 (100)

3. ความสัมพันธ์ของการสร้างไบโอฟิล์มกับจีโนไทป์ของ MRSA

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของ MRSA ด้วยวิธี SCCmec typing, variable number of tandem repeat typing ใน hypervariable region ของ SCCmec (HVR) และยีน *spa* ซึ่งประกอบด้วยจีโนไทป์ต่าง ๆ ที่แสดงใน ตารางที่ 4 โดยจำแนก SCCmec เป็น 5 ชนิดประกอบด้วย SCCmec type I (3 ตัวอย่าง),

และคณะ⁽¹¹⁾ มีจำนวนทั้งสิ้น 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 44.4) ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ MRSA ให้ผลบวกอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถของ *S. epidermidis* ATCC 35984 ซึ่งให้ค่าเฉลี่ย OD_{492} เท่ากับ 2.39 ± 0.01

2. การกระจายของยีนโปรตีนผิวเซลล์และ *icaA*

ผลการตรวจวิเคราะห์หา ยีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์ 8 ชนิด และยีน *icaA* ใน MRSA จำนวน 126 ตัวอย่าง มียีน *fnbA* 124 ตัวอย่าง (ร้อยละ 98.4), ยีน *sdrC* 124 ตัวอย่าง (ร้อยละ 98.4), ยีน *sdrD* 123 ตัวอย่าง (ร้อยละ 97.6), ยีน *sdrE* 118 ตัวอย่าง (ร้อยละ 93.7), ยีน *clfA* 100 ตัวอย่าง (ร้อยละ 79.4), ยีน *ebpS* 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.5) และยีน *sasG* 117 ตัวอย่าง (ร้อยละ 92.9) ส่วนยีน *icaA* 126 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) ดังแสดงในตารางที่ 3

type II (4 ตัวอย่าง), type III (67 ตัวอย่าง) type III DCS (4 ตัวอย่าง), type IIIA (48 ตัวอย่าง) แต่ละชนิด จำแนกเป็น subtype ตามความแตกต่างของจำนวน repeat ใน HVR และยีน *spa* ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า SCCmec type I ไม่สร้างไบโอฟิล์ม (ร้อยละ 0), SCCmec type II สร้างไบโอฟิล์ม 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25) อย่างไรก็ตาม MRSA ทั้งสองชนิดนี้ จัดเป็นโคลนที่พบไม่บ่อย, SCCmec type III เป็นตัวอย่างส่วนใหญ่ พบสร้างไบโอฟิล์ม 34 ตัวอย่าง (31/67;

ร้อยละ 46.3), III DCS สร้างไบโอฟิล์ม 2 ตัวอย่าง (2/2; ร้อยละ 50) และ type IIIA ซึ่งพบเป็นโคลนสำคัญอันดับ 2 ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ พบสร้างไบโอฟิล์ม 22 ตัวอย่าง (24/48; ร้อยละ 45.8) เมื่อวิเคราะห์จำเพาะโคลนสำคัญ 3 ลำดับแรกโดยอาศัย SCCmec type, HVR type และ spa

type พบว่าโคลน III-15-7 ซึ่งเป็นตัวอย่างศึกษามากที่สุด พบสร้างไบโอฟิล์ม 27 ตัวอย่างจาก 48 ตัวอย่าง (ร้อยละ 56.3) โคลน IIIA-7-7 พบสร้างไบโอฟิล์ม 14 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 46.7) และโคลน IIIA-7-8 พบสร้างไบโอฟิล์ม 5 ใน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 55.6)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ของ MRSA กับความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม

MRSA genotype			จำนวน	จำนวน MRSA ที่สร้าง ไบโอฟิล์มตามจีโนไทป์ (%)	MRSA ที่สร้าง ไบโอฟิล์มตามกลุ่ม SCCmec (%)
SCCmec	VNTR typing (number of repeats)				
	HVR	spa			
I variant	10	9	1	0 (0)	0/3 (0)
I variant	11	9	1	0 (0)	
I variant	11	11	1	0 (0)	
II	7	10	1	1 (25)	1/4 (25)
II	9	7	3	0 (0)	
III	4	7	1	0 (0)	31/67 (53.2)
III	5	7	1	0 (0%)	
III	7	7	7	2 (28.6)	
III	14	7	2	0 (0)	
III	15	6	7	2 (28.6)	
III	15	7	48	27 (56.3)	
III	17	7	1	0 (0)	
IIIDCS	12	7	3	1 (33.3)	
IIIDCS	15	7	1	1 (100)	
IIIA	2	7	1	0 (0)	22/48 (45.8)
IIIA	4	7	2	1 (50)	
IIIA	6	7	1	1 (100)	
IIIA	7	7	30	14 (46.7)	
IIIA	7	8	9	5 (55.6)	
IIIA	9	7	1	0 (0)	
IIIA	15	7	2	1 (50)	
IIIA	17	7	2	0 (0)	

SCCmec: Staphylococcal Chromosome Cassette mec; VNTR: Variable Number of Tandem Repeats; HVR: Hypervariable region in SCCmec; spa: surface protein A gene

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยก่อโรคอื่น ๆ คือ ไบโอฟิล์มและยีนกำกับโปรตีนนอกเหนือจากการมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่เคยศึกษาไว้ก่อนหน้านี้โดยบัวลาย หน่อเจริญ และคณะ⁽¹⁰⁾ การศึกษานี้ พบว่า MRSA ที่แพร่ระบาดในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มีสัดส่วนไม่ถึงร้อยละ 50 ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ไม่ดัดนัก รายงานคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มของ MRSA จากประเทศต่าง ๆ แตกต่างกันไป การศึกษาของ Souza และคณะ⁽¹⁴⁾ พบว่าสัดส่วนเชื้อ MRSA สร้างไบโอฟิล์มได้ถึงร้อยละ 90 รวมถึง ST239-MRSA-IIIa ที่แยกได้ในประเทศบราซิล ซึ่งคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ในประเทศไทย สร้างไบโอฟิล์มได้ถึงร้อยละ 93 ส่วนผลการศึกษาจากประเทศสก็อตแลนด์ พบว่าร้อยละ 53.8 ของตัวอย่าง MRSA ที่แยกได้จากทั่วประเทศจำนวน 763 ตัวอย่าง สร้างไบโอฟิล์มได้ ร้อยละ 25.7⁽¹⁵⁾ ส่วนการศึกษาในเอเชียโดย Cha และคณะ⁽¹⁶⁾ พบว่า ร้อยละ 51.2 ของตัวอย่าง MRSA ที่ศึกษาในสาธารณรัฐเกาหลี สร้างไบโอฟิล์มได้ และยังสามารถศึกษาความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับลักษณะทางพันธุกรรมโดย SCCmec typing พบว่า ร้อยละ 41.6 ของสายพันธุ์ SCCmec type III และ IIIa ซึ่งใกล้เคียงกับผลรวมของกลุ่มตัวอย่าง MRSA type III และ IIIa ในการศึกษา และผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์จากสาธารณรัฐเกาหลีและประเทศไทย ยังสอดคล้องกันอีกในความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มอย่างอ่อน คือ ตัวอย่างที่ศึกษาโดย Cha และคณะ⁽¹⁶⁾ ให้ค่า OD₅₇₀ เฉลี่ย เท่ากับ 0.316 ซึ่งการศึกษานี้พบค่า OD₄₉₂ เฉลี่ย 0.22 MRSA ที่แยกได้จากทั้งสองประเทศนี้ แสดงคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน อาจเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของสายพันธุ์ระดับภูมิภาคตามผลการศึกษาของ Smyth และคณะ⁽¹⁷⁾ ที่ระบุว่า สายพันธุ์ในเอเชีย เช่น สายพันธุ์จากอินโดนีเซีย สาธารณรัฐเกาหลี สิงคโปร์ ศรีลังกา เวียดนาม รวมถึงสาธารณรัฐประชาชนจีน และอินเดีย มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดในยุโรป อเมริกาใต้และสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นไปได้ที่จะสังเกตเห็นความคล้ายคลึงกันในระดับการแสดงออกหรือ phenotype

การควบคุมการสร้างไบโอฟิล์ม ประกอบด้วย ระบบควบคุมผ่าน *ica* locus (*ica*-mediated biofilm mechanism) ซึ่งกลไกนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มที่มีองค์ประกอบเป็น PIA (polysaccharide intercellular adhesion)

หรือ polymeric N-acetyl-glucosamine (PNAG) ส่วนอีกระบบหนึ่งเป็นกลไกไม่ขึ้นกับ *ica* locus (*ica*-independent biofilm mechanism)⁽¹⁸⁾ กลไกนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนผิวเซลล์ O'Neill และคณะ พบว่า ไบโอฟิล์มที่สร้างโดย MRSA มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนผิวเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เกาะติด และไม่เกี่ยวข้องกับการ *ica* locus ส่วนไบโอฟิล์มใน MSSA มีองค์ประกอบเป็น PIA/PNAG ควบคุมโดยยีน *ica*⁽¹⁸⁾ การศึกษานี้ พบว่า MRSA ทุกสายพันธุ์ตรวจพบยีน *icaA* ซึ่งยืนยันว่ามี *ica* locus แต่ MRSA เพียงร้อยละ 44 เท่านั้นที่สร้างไบโอฟิล์ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kawamura และคณะ ที่พบว่าตัวอย่าง MRSA ทั้งหมดที่ศึกษามี *ica* locus แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้⁽¹⁹⁾

ลักษณะธรรมชาติของ MRSA ที่แพร่ระบาดในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่สนับสนุนการก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *sasG* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับเซลล์เยื่อที่หลุดลอกได้ในโพรงจมูก⁽⁶⁾ ส่วนการศึกษาโดย Peacock และคณะ ศึกษาการมีเยื่อหุ้มเซลล์กับการสร้างโปรตีนกับ *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อแบบรุกราน เปรียบเทียบกับกลุ่มพาหะ พบว่า กลุ่มที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อแบบรุกราน พบว่ามีอัตราพบยีน *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *sdrC* ร้อยละ 98-100 ส่วนยีน *sdrD*, *sdrE* พบประมาณร้อยละ 50 และพบยีน *ebpS* ร้อยละ 68⁽¹²⁾ แสดงว่า MRSA ที่แพร่ระบาดในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มีเยื่อหุ้มเซลล์โปรตีนผิวเซลล์สำคัญ ๆ ที่พบได้ในกลุ่ม *S. aureus* ที่รุกรานเนื้อเยื่อเยื่อเยื่อ *ebpS*

สรุปผลการศึกษา MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มีความสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ร้อยละ 44.4 และเกิดปฏิกิริยาอ่อน มากกว่าร้อยละ 90 ของ MRSA เหล่านี้มีเยื่อหุ้มเซลล์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค คือ ยีน *fnbA*, *sdrD*, *sdrE*, *sasG* ส่วนยีนอื่น ๆ ที่พบประปราย คือ ยีน *clfA* พบร้อยละ 79.4 ขณะที่ยีน *ebpS* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับ elastin พบเพียงร้อยละ 6.3 และ MRSA ทุกตัวอย่าง พบ *ica* locus แต่คุณสมบัติไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มใน MRSA

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสภากิจแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2552ทุนบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2553 และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจทาง

ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และได้รับการรับรองการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE510216 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Kei-ichi Hiramatsu และ Dr. Teruyo Ito มหาวิทยาลัยจุนเทนโด ประเทศญี่ปุ่น และรองศาสตราจารย์ ดร. นพ. ชาญวิทย์ ตริพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์แบบที่เรื้อยอ้างอิง และเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บเชื้อตัวอย่างในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J 1961; 124: 124-5.
- Deurenberg RH, Stobberigh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 2008; 8: 747-63.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol 2009; 11: 1034-43.
- Roche FM, Massey R, Peacock SJ, Day NP, Visai L, Speziale P, et al. Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. Microbiology 2003; 149(Pt 3): 643-54.
- O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cell Microbiol 2002; 4: 759-70.
- Roche FM, Meehan M, Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. Microbiol-ogy 2003; 149(Pt 10): 2759-67.
- Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. Microbiology 1999; 145: 3477-86.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93.
- Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev 2002; 15: 155-66.
- บัวลาย หน่อเจริญ, โชติชนะ วิไลลักษณ์, ฐิฐนันท์ หงส์ศรีจันทร์, วัลลภ แก้วเกษ, โชคชัย วิลาชัย, อรุณลักษณ์ ลุติตานนท์ และคณะ. การตรวจพบโคลนสำคัญของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* โดยการสำรวจเชิงโมเลกุลในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2553; 23: 26-36.
- O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. J Clin Microbiol 2007; 45: 1379-88.
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 2002; 70: 4987-96.
- Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. Biomaterials 2007; 28: 1711-20.
- Souza RR, Coelho LR, Botelho AM, Ribeiro A, Rito PN, Vieira VV, et al. Biofilm formation and prevalence of *lukF-pv*, *seb*, *sec* and *tst* genes among hospital- and community-acquired isolates of some international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. Clin Microbiol

- Infect 2009; 15: 203-7.
15. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 2008; 57: 1018-23.
 16. Cha JO, Park YK, Lee YS, Chung GT. *In vitro* biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70: 112-8.
 17. Smyth DS, McDougal LK, Gran FW, Manoharan A, Enright MC, Song JH, et al. Population structure of a hybrid clonal group of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ST239-MRSA-III. PLoS One 2010; 5: e8582.
 18. O’Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 2007; 270: 179-88.
 19. Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanohara H, Hashiguchi T, et al. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 63: 10-5.