

ชนิดของ *SCC mec* และแบบแผนความไวของยาต้านจุลชีพของเชื้อ MRSA จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

นรสนววรรณ ชาติธีรวัฒนกุล², สุดาลักษณ์ ัญญาหาร², วรดา สโมรสสุข⁴, อัญชลี วิสวโกศา³,
เสกสรรค์ สโมรสสุข^{4*}

Received: June 4, 2015

Revised & Accepted: July 14, 2015

บทคัดย่อ

Staphylococcus aureus ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) เป็นแบคทีเรียที่ร้ายที่สุดและเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล กลไกการดื้อยาที่สำคัญ เกิดจากการสร้าง PBP 2a ซึ่งมี affinity ต่อ methicillin และยาในกลุ่ม beta-lactam ลดลง การสร้าง PBP 2a ถูกควบคุมด้วยยีน *mecA* ที่อยู่บน staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) ซึ่งสามารถจำแนกได้หลายชนิด ด้วยวิธี multiplex PCR งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาชนิดของ *SCCmec* type ของเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากเลือดผู้ป่วยในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า รวมทั้งแบบแผนความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพต่างๆ พบว่าเชื้อ MRSA ที่ตรวจยืนยัน *mecA*-Mediated Oxacillin Resistance โดย cefoxitin disk diffusion จำนวน 124 สายพันธุ์เป็น *SCCmec* ชนิด I ร้อยละ 59.7 , *SCCmec* ชนิด II ร้อยละ 33.1 , *SCCmec* ชนิด III ร้อยละ 3.2 และ *SCCmec* ชนิด IV ร้อยละ 2.4 และไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 2 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์ไม่ไวต่อยา erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin , levofloxacin และไวต่อ fusidic acid ในอัตราร้อยละ 100 นอกจากนี้พบไว้มากต่อยา trimethoprim / sulfamethoxazole ในอัตราร้อยละ 94.4 ส่วนยา fosfomycin และ tetracycline ไวในอัตราร้อยละ 66.7 และ 64.8 ตามลำดับ ส่วนยา gentamicin ให้ผลความไวน้อยมากในอัตราร้อยละ 10.5 สำหรับค่า MIC ของยา vancomycin อยู่ระหว่าง 0.5-2.0 mg/ml และสามารถจัดเป็น antibiogram ได้ทั้งหมด 10 รูปแบบ ซึ่งพบรูปแบบที่ 1 (ไวต่อ vancomycin, fusidic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole, fosfomycin และ tetracycline) และ 3 (ไวต่อ vancomycin, fusidic acid และ trimethoprim /sulfamethoxazole) มากที่สุด คือ ร้อยละ 52.4 และ 28.2 ตามลำดับ

คำสำคัญ: Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, *SCCmec* Type, Antimicrobial susceptibility pattern, Vancomycin

¹นักศึกษานิพนธ์โท สาขาเทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

²แผนกห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า กรุงเทพมหานคร

³ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า กรุงเทพมหานคร

⁴ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี

* ผู้รับผิดชอบบทความ

SCC *mec* type and Antimicrobial susceptibility pattern of MRSA Isolated from blood stream infection in Phramongkutklao hospital

Tassanawan Chatreewattanakul^{1,2}, Sudaluck Thunyaharn², Worada Samosornsuk⁴,
Unchalee Visawapoka³, Seksun Samosornsuk⁴ *

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major cause of infection in hospitals. The main mechanism of antibiotic resistance is mediated by producing an altered penicillin-binding protein (PBP2a), which has low affinity to beta-lactams drug. This protein is encoded by *mecA* gene, located on *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). Nowadays, at least 11 types of SCC*mec* elements have been identified using multiplex PCR. The objectives of this study were to identify and characterize the SCC*mec* type and evaluate the antibiotic susceptibility pattern of MRSA isolated from blood. A total of 124 MRSA isolates were collected from blood samples of bloodstream infection in Phramongkutklao hospital from January 2012 to December 2013. All the isolates were identified as MRSA by agar oxacillin and *mecA*-mediated oxacillin resistance method. The genotyping study demonstrated that all MRSA isolates were positive for *16SrRNA* gene and *mecA* gene. SCC*mec* typing showed 74 (59.7 %) of isolates were SCC*mec* type I, 41 (33.1 %) of isolates were SCC*mec* type II, 4 (3.2 %) of isolates were SCC*mec* type III, 3 (2.4 %) of isolates were SCC*mec* type IV and 2 (1.6 %) of isolates were untypable. Their antibiotic susceptibility was performed using disk diffusion method for nine antimicrobial agents, including ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, fosfomycin, fusidic acid, tetracycline and trimethoprim/ sulfamethoxazole. The result showed that 100%, 94.4%, 66.7%, 64.8%, and 10.5% of the MRSA strains were susceptible to fusidic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole, fosfomycin, tetracycline, and gentamicin respectively. The MIC of vancomycin, by E-tests, ranged from 0.5 to 2 µg/mL. They were also arranged in 10 Antibigrams, of which pattern 1 (susceptible to vancomycin, fusidic acid, trimethoprim /sulfamethoxazole, fosfomycin and tetracycline) and 3 (susceptible to vancomycin, fusidic acid and trimethoprim/sulfamethoxazole) were mostly found with frequency of 52.4 % and 28.2 %, respectively.

Keywords : Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA , Molecular typing, Antibigram

¹Graduate School, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani

²Microbiology Laboratory unit, Phramongkutklao Hospital.

³Department of Biochemistry, Phramongkutklao College of Medicine

⁴Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani

* Corresponding author: (e-mail: seksun@hotmail.com)

บทนำ

MRSA (Methicillin Resistant *S.aureus*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานและเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้ทั่วโลก กลไกหลักของการดื้อยา methicillin เกิดจากการสร้าง penicillin binding protein (PBP) ที่มีโครงสร้างเปลี่ยนไปเป็น PBP2a ที่มี affinity ต่อ methicillin และยาในกลุ่ม β -lactam ลดลง กลไกนี้ถูกควบคุมโดยยีน *mecA* ที่อยู่บนชิ้นส่วนของ DNA เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) เรียกว่า Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) ปัจจุบันการแยกชนิดของ SCC*mec* ด้วยวิธี PCR-based typing สามารถจำแนกได้ถึง 11 ชนิด (SCC*mec* type I-XI)^(1,2) โดยแต่ละชนิดมียีนดื้อยาแตกต่างกันไป สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบชนิดของ SCC*mec* ส่วนใหญ่เป็น type-III และ type-IIIa^(3,4)

สถานการณ์ของเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจต่างๆ ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าซึ่งเป็นโรงพยาบาลตติยภูมิมีเพิ่มมากขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2555 พบการติดเชื้อ *S. aureus* ในกระแสเลือดเป็นลำดับ 3 รองจาก coagulase-negative *Staphylococci* และ *Escherichia coli* โดยพบเป็น MRSA ถึง ร้อยละ 50 เชื้อนี้นอกจากจะดื้อต่อยา methicillin แล้วยังดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactam ทั้งหมดด้วย ร่วมกับการดื้อยาในกลุ่มอื่น เช่น aminoglycosides และ macrolides ดังนั้นการรักษาจึงใช้ยาในกลุ่ม glycopeptides เช่น vancomycin ซึ่งปัจจุบันเริ่มมีรายงานการดื้อต่อยา vancomycin ทั้งชนิดที่ดื้อในระดับปานกลาง ที่เรียกว่า vancomycin-intermediate resistance *S. aureus* (VISA) ในประเทศไทยแล้ว^(5,6,7) และการทดสอบความไวต่อยา vancomycin สำหรับเชื้อ *S. aureus* ตามมาตรฐาน CLSI ในปัจจุบันต้องหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) เท่านั้น⁽⁸⁾ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเชิงลึกในระดับโมเลกุลของเชื้อ MRSA (SCC*mec* type) และแบบแผนความไวของยาต้านจุลชีพต่างๆ ที่ใช้รักษาผู้ป่วยในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาชนิดของ SCC*mec* type และ แบบแผนความไวของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. **แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา** เชื้อ MRSA ที่แยกได้จากเลือด (Hemoculture) ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดที่ไม่ซำราย ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าฯ ในช่วงเดือนมกราคม ปี พ.ศ.2555 ถึง เดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2556 จำนวน 124 สายพันธุ์ ซึ่งถูกเก็บรักษาไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส ใน trypticase soy broth ที่มี 20% glycerol ทำการพิสูจน์ซ้ำว่าเป็น *S. aureus* โดยวิธีทดสอบทางฟิโนไทป์ ตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา⁽⁹⁾ ได้แก่ การทดสอบ catalase test, coagulase test, mannitol salt agar, urease test และ DNase test จากนั้นทำการทดสอบว่าเป็น MRSA ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI⁽⁸⁾ ตามลำดับ ได้แก่

1.1 วิธี Agar Oxacillin โดยเตรียมเชื้อที่ทดสอบให้มีความขุ่น เท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วใช้ลูปขนาด 1 ml จุ่มป้ายลงบน plate อาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮิตตันเติม NaCl 4% และ 6 μ g Oxacillin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หากพบมีการเจริญของเชื้อ จะอ่านผลว่า เป็น MRSA

1.2. วิธี *mecA*-Mediate Oxacillin Resistance โดยนำเชื้อที่ ต้องการทดสอบมาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ 0.5 McFarland standards เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar แล้ววางแผ่นยา Cefoxitin disk 30 μ g บนผิว agar นำไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส รอบแผ่นยาที่ เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร หากมีขนาดกว้างน้อยกว่าหรือ เท่ากับ 21 mm แสดงว่า *mecA* positive ด้วยวิธี disk diffusion⁽⁸⁾

2. **การศึกษาแบบแผนความไวของเชื้อ** ต่อแผ่นยาต้านจุลชีพ 9 ชนิด (antibiogram) ได้แก่ ciprofloxacin 5 μ g, levofloxacin 5 μ g, erythromycin 15 μ g, clindamycin 2 μ g, gentamicin 10 μ g, fosfomycin 50 μ g, fusidic acid 10 μ g, tetracycline 15 μ g, trimethoprim/sulfamethoxazole 1.25/23.75 μ g (oxoid, UK) ด้วยวิธี disk diffusion (Kirby Bauer) โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone เป็นมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานใน CLSI MI100-S23 แล้วรายงานเป็น susceptible (S), intermediate (I) หรือ resistant (R) สำหรับยา vancomycin ทำการทดสอบความไว โดยการหาค่า MIC ด้วยวิธี E-test⁽⁸⁾

3. การศึกษา SCCmec type ด้วยวิธี multiplex PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้อ MRSA ที่สกัดด้วยน้ำยา Pure-gene Yeast/Bact. Kit B (QUIGEN, Germany) มาศึกษาชนิดของ SCCmec ด้วยวิธี multiplex PCR typing โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ แบ่งออกเป็น 2 ปฏิกริยา คือปฏิกริยา

ที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *16SrRNA* (เป็นยีนที่จำเพาะกับ *Staphylococcus* ใช้เป็น internal control) และ *mecA* และปฏิกริยาที่ 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ccr* gene complex, IS1272 และ *mecA*-IS431 ดังแสดงตาม ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของ SCCmec ในเชื้อ MRSA

	Primer	Nucleotide sequence (5'---3')	PCR products (bp)	Target	Ref
ปฏิกริยาที่ 1*	Staph756F	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA	756 bp	16S rRNA	Mignard S ^(10,11)
	Staph750R	CCACCTTCCTCCGTTTGTCCACC			
	MecA1	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310 bp	<i>mecA</i>	McClure <i>et al.</i> ⁽¹²⁾
	MecA2	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA			
ปฏิกริยาที่ 2**	α 1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695 bp (<i>ccrA1</i> - <i>ccrB1</i>)	<i>ccrA1</i>	Kondo <i>et al.</i> ⁽¹³⁾
	α 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937 bp (<i>ccrA2</i> - <i>ccrB2</i>)	<i>ccrA2</i>	“
	α 3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	1791 bp (<i>ccrA3</i> - <i>ccrB3</i>)	<i>ccrA3</i>	“
	β c	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		<i>ccrB1</i> , <i>ccrB2</i> , and <i>ccrB3</i>	“
	α 4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	1287 bp (<i>ccrA4</i> - <i>ccrB4</i>)	<i>ccrA4</i>	“
	β 4.2	TTGCGACTCTCTTGCGGTTT		<i>ccrB4</i>	“
	γ R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	518 bp (<i>ccrC</i>)	<i>ccrC</i>	“
	γ F	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT		<i>ccrC</i>	“
	1272F1	GCCACTCATAACATATGGAA	415 bp	IS1272	Ito <i>et al.</i> ⁽¹⁴⁾
	1272R1	CATCCGAGTGAAACCCAAA			
	5RmecA	TATACCAAACCCGACAACACTAC	359 bp	<i>mecA</i> -IS431	Ito <i>et al.</i> ⁽¹⁴⁾
	5R431	CGGCTACAGTGATAACATCC			

*ปฏิกริยาที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *16SrRNA* และ *mecA*

**ปฏิกริยาที่ 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ccr* gene complex, IS1272 และ *mecA*-IS431

PCR mixture (20 µl) ประกอบด้วย 2X KA-PA2G Fast Multiplex Mix (KAPA Biosystems,USA) forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 µmol/µl อย่างละ 0.25 µl และดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่าง 1 µl ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง PCR/Thermal cycler รุ่น AERIS-MB (Aeris™,UK) ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นด้วย predenature ที่ 94 °C 5 นาที จากนั้นทำ PCR ต่ออีก 25 รอบ โดย denaturation ที่ 94 °C 1 นาที, annealing ที่ 55 °C 1 นาที, extension ที่ 72 °C 1 นาที และ final extension ที่ 72 °C 10 นาที ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 0.5x Tris-borate-EDTA (TBE) buffer และย้อมด้วย SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen,USA) วิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK) และดูด้วยเครื่อง UV illumination รุ่น Gel DOC 1000 (ChemiDoc™ MP System BIO-RAD, USA)

โดยพบ PCR product ขนาดต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ 16SrRNA (756 bp) แสดงว่าเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น internal control, *mecA* (310 bp) แสดงว่ามี *mecA* และสำหรับการตรวจสอบชนิดของ SCCmec ให้ PCR product คือ SCCmec type I (415 bp), SCCmec type II (937 bp), และ SCCmec type III (518 bp)

สำหรับ SCCmec type IV (415 bp และ 937 bp) และ SCCmec type V (518 bp และ 359 bp)

เชื้อแบคทีเรียควบคุมคุณภาพสำหรับปฏิกิริยาตรวจหายีนจำแนกชนิดของ SCCmec ได้แก่ MRSA สายพันธุ์ NCTC 10442 (SCCmec type I) , N315 (SCCmec type II), 85/2082 (SCCmec type III) และ JU4744 (SCCmec type IV), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบทางฟิโนไทป์ของเชื้อ MRSA จำนวน 124 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ ติดต่อ cefoxitin 30 µg ผลการศึกษาแบบแผนความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพต่างๆใน พบเชื้อทุกสายพันธุ์ไวต่อยา vancomycin และ fusidic acid ในอัตราร้อยละ 100 ไวต่อยา trimethoprim/sulfamethoxazole ในอัตราร้อยละ 94.4 และไวต่อยา fosfomycin และ tetracycline ในอัตราร้อยละ 66.7 และ 64.8 ตามลำดับ สำหรับยา gentamicin ให้ผลความไว้น้อยมากในอัตราร้อยละ 10.5 และพบว่าทุกสายพันธุ์ติดต่อยา ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin และ clindamycin สำหรับค่า MIC ต่อยา vancomycin มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-2.0 mg/ml ดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า MIC ของเชื้อ MRSA 124 สายพันธุ์ต่อยา vancomycin

ค่า MIC ต่อยา Vancomycin (µg/ml)	จำนวนสายพันธุ์ของ MRSA (ร้อยละ)
0.5	1 (0.8)
0.75	1 (0.8)
1.0	41 (33.1)
1.5	57 (46.0)
2.0	24 (19.4)

เมื่อจัดรูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ตามลำดับดังนี้ vancomycin, fusidic acid, trimethoprim sulfamethoxazole, fosfomycin, tetracycline, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin และ clindamycin สามารถจัดได้ทั้งหมด 10 รูปแบบ ดังแสดงใน

ตารางที่ 3 รูปแบบที่พบมากที่สุด คือรูปแบบที่ 1 (SSSSRRRRR) ร้อยละ 52.4 และ รองลงมาคือแบบแผนที่ 3 (SSSRRRRRR) ร้อยละ 28.2

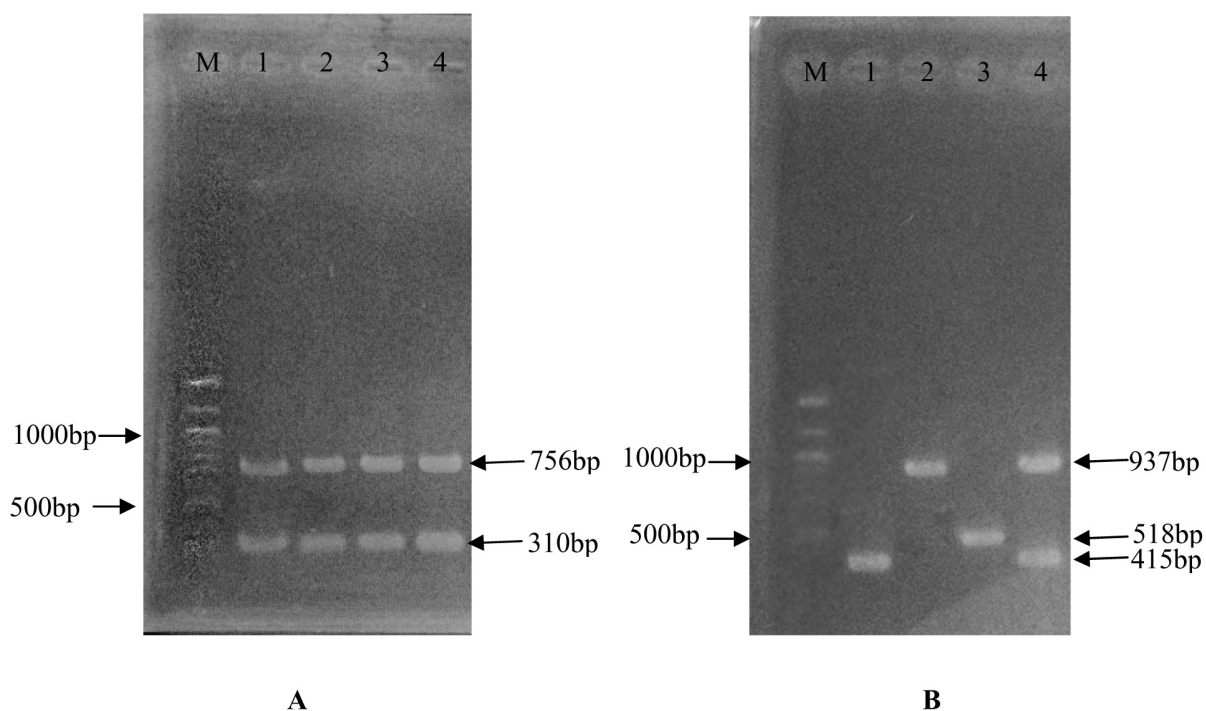
ตารางที่ 3 รูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 10 ชนิดของเชื้อ MRSA 124 สายพันธุ์

ยาต้านจุลชีพ	รูปแบบความไว									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vancomycin *	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fusidic acid	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Co-trimoxazole	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S
Fosfomycin	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R
Tetracycline	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S
Gentamicin	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
Ciprofloxacin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Levofloxacin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Erythromycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Clindamycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)	65 (52.4)	1 (0.8)	35 (28.2)	1 (0.8)	3 (2.4)	5 (4.03)	1 (0.8)	11 (8.9)	1 (0.8)	1 (0.8)

* ผลของการทดสอบยา vancomycin ได้ค่ามาจากการทำ MIC ด้วยวิธี E-test

ผลการศึกษาทางจีโนไทป์ของเชื้อ MRSA 124 สายพันธุ์ โดยวิธี multiplex PCR ได้ PCR product ดังแสดงในรูปที่ 2 สามารถตรวจพบยีน 16SrRNA และ mecA ในทุกสายพันธุ์และจากการตรวจชนิดของ SCCmec พบว่าเป็น

SCCmec type I ร้อยละ 59.7 (74/124), SCCmec type II ร้อยละ 33.1 (41/124), SCCmec type III ร้อยละ 3.2 (4/124) และ SCCmec type IV ร้อยละ 2.4 (3/124) ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ อีก 2 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.6



รูปที่ 2 (A) PCR product ของยีน *mecA* (310bp) และ *16SrRNA* (756bp)

Lane M : 100 bp DNA ladder; Lane 1 : SCCmec type I; Lane 2 : SCCmec type II; Lane 3 : SCCmec type III และ Lane 4 : SCCmec type IV

(B) PCR product ของ SCCmec typing I-IV โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *ccr* complex, IS1272 และ *mecA*-IS431

Lane M : 100 bp DNA ladder; Lane 1 : SCCmec type I (415bp) ; Lane 2 : SCCmec type II (937bp) ; Lane 3 SCCmec type III (518bp) และ Lane 4 : SCCmec type IV (415bp, 937bp)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาตัวอย่างเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าและจากข้อมูลหน่วยควบคุมป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ในช่วงเดือนมกราคม ปี พ.ศ.2555 ถึงเดือนธันวาคม ปี พ.ศ.2556 จำนวน 124 สายพันธุ์โดยทุกรายพบว่าเป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล หมายถึง ผู้ป่วยมีการติดเชื้อหลังจากเข้ารับการรักษานในโรงพยาบาล หลังจาก 48 ชั่วโมง โดยไม่อยู่ในระยะการฟักตัวของเชื้อ หรือหลังจากออกจากโรงพยาบาล 48 ชั่วโมง (Center for Disease Control and Prevention) ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อทำการทดสอบทางฟิโนไทป์ด้วยวิธี agar oxacillin และตรวจยืนยันด้วย *mecA*-Mediated Oxacillin Resistance โดย cefoxitin disk diffusion ให้ผลบวกทุกสายพันธุ์ บ่งชี้ว่าเชื้อ MRSA ในกลุ่มตัวอย่างนี้มีการดื้อยาด้วยกลไกที่สัมพันธ์กับยีน *mecA*

ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจหายีน *mecA* โดยวิธี multiplex PCR ที่ให้ผลบวกทุกตัวอย่าง แสดงว่า เชื้อทั้งหมดเป็น true MRSA และ HA-MRSA โดยทุกสายพันธุ์จะดื้อต่อยา methicillin และยาในกลุ่ม β -lactam ทุกชนิดด้วย ยกเว้น ยา ceftaroline ซึ่งเป็นยาตัวใหม่ในกลุ่ม cephalosporin ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวกที่ดื้อยารวมทั้งเชื้อแกรมลบที่ไม่มีการสร้าง extended-spectrum- β -lactamase อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดสอบความไวต่อยาตัวนี้⁽⁸⁾ สำหรับแบบแผนความไวของเชื้อ MRSA ต่อยาต้านจุลชีพจำนวน 10 ชนิด เชื้อทั้งหมดยังไวต่อยา vancomycin และ fusidic acid แต่ไม่ไวต่อ ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin และ clindamycin ส่วนยา trimethoprim/ sulfamethoxazole, fosfomycin, tetracycline, gentamicin มีความหลากหลายในความไว สามารถแบ่งได้เป็น 10 รูปแบบ โดยรูปแบบที่ 1 (SSSSRRRRR) พบมากที่สุดถึงร้อยละ 52.4

รองลงมาเป็น แบบที่ 3 (SSSRRRRRR) ร้อยละ 28.2 ซึ่งเป็นแบบที่มีการดื้อยาหลายกลุ่มมากกว่า และเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าที่ศึกษาในครั้งนี้นี้ยังมีความไวมากต่อยา SXT (ร้อยละ 94.4) ซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีรายงานจากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และโรงพยาบาลรามาธิบดีที่มีความไวปานกลาง คือ ร้อยละ 79.7 และ ร้อยละ 71.2⁽¹⁶⁾ และรายงานจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่มีความไวน้อยเพียงร้อยละ 3.4⁽³⁾

นอกจากนี้เชื้อ MRSA ทั้งหมดยังไวต่อ vancomycin โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5-2.0 mg/ml แต่ในจำนวนนี้มีเชื้อร้อยละ 19.4 ที่มีค่า MIC เท่ากับ 2.0 mg/ml ซึ่งเป็น MIC ค่าสูงใกล้ค่า cut off (ค่า MIC 4-8 mg/ml เป็นไวปานกลาง) สำหรับในประเทศไทยมีรายงาน hetero-VISA ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2544^(6,17) รวมทั้งเริ่มมีรายงานการพบ VISA ในปี พ.ศ. 2553 และมีแนวโน้มว่าจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ในการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีค่า MIC ต่อ vancomycin เป็น 1 และ 2 mg/ml อาจเป็น hetero-VISA ที่ไม่แสดงการดื้อยา vancomycin ชัดเจน โดยจากข้อมูลการติดเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากเลือด (hemoculture) ของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพบว่า ผู้ป่วยบางรายไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา vancomycin แต่อย่างไรก็ตามรายงานนี้ไม่ได้ทำการทดสอบ population analysis⁽¹⁸⁾

การศึกษาชนิดของ SCCmec ในกลุ่มตัวอย่างนี้พบส่วนใหญ่เป็น SCCmec type I (ร้อยละ 59.7) และ SCCmec type II (ร้อยละ 33.1) ส่วน SCCmec type III และ IV พบเพียง 4 และ 3 สายพันธุ์ ซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีรายงานจากโรงพยาบาลในระดับเดียวกันในประเทศไทยที่พบส่วนใหญ่เป็น SCCmec type III (ร้อยละ 95-97)^(3,4,19) แต่ก็มีรายงานจากต่างประเทศพบเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากกระแสเลือดเป็น SCCmec type I (ร้อยละ 89)⁽²⁰⁾ สำหรับตัวอย่างเชื้อ MRSA ที่หา SCCmec type ไม่ได้ จำนวน 2 สายพันธุ์ อาจเกิดจาก primer ที่ใช้ในครั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ สำหรับการกระจายของ SCCmec type ในแต่ละเดือนพบไม่แตกต่างกัน อาจกล่าวได้ว่า การติดเชื้อ MRSA สามารถแพร่กระจายได้ทุกฤดูกาลไม่จำเพาะต่อฤดูกาลใดฤดูกาลหนึ่งและจากข้อมูลของหอผู้ป่วยแบ่งเป็น ICU, NON ICU, หอผู้ป่วยเด็ก พบ SCCmec type ต่างๆ มีการกระจายในแต่ละหอผู้ป่วยทั้ง ICU, NON ICU นั้นไม่แตกต่างกัน

และมีเพียง 1 สายพันธุ์ (SCCmec type III) ที่พบหอผู้ป่วยเด็ก

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงแบบแผนความไวของยาและแนวโน้มการดื้อของเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเลือกจ่ายยาที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วย ป้องกันการดื้อยา จากการจ่ายยาไม่เหมาะสม ลดอัตราการตายของผู้ป่วย และยังช่วยลดต้นทุนการรักษา ส่วนข้อมูลชนิดของ SCCmec จะเป็นประโยชน์เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางระบาดวิทยา ตลอดจนการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร. อรุณลักษณ์ ลูธิตานนท์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ รศ.ดร.นพ.ชาญวิทย์ ตริพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่อนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และ สำนักงานพัฒนาวิจัย โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าและวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

เอกสารอ้างอิง

1. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 4961-7.
2. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) analysis of MRSA. Meth Mol Biol 2014; 1085: 131-48.
3. Wanachit C. Staphylococcal cassette chromosome *mec* type and antibiograms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from patients in Maharajnakorn Chiangmai hospital. Chiang Mai University Bibliography 2008: 99-128.
4. โชติชนะ วิไลลักษณ์, ชาญวิทย์ ตริพุทธรัตน์. โครงการการศึกษายีนก่อโรคร่วมกับ SCCmec typing และ

- variable numbers of tandem repeats typing (VNTR) เพื่อจำแนกสายพันธุ์สแตฟิโลคอคคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลินในประเทศไทย. ขอนแก่น: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย; ธันวาคม 2553. สัญญาเลขที่ MRG5180126.
5. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Khewkes W, Vorachit M, Chongtrakool P, et al. Detection of heterogenous, intermediate-vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (hVISA) using lowconcentration vancomycin disks. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37: 761-7.
 6. Lulitanond A, Engchanil C, Chaimanee P, Vorachit M, Ito T, Hiramatsu K. The first vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Thailand. J Clin Microbiol 2009; 47: 2311-6.
 7. Phongsamart W, Srifeungfung S, Tiensasitorn C, Vanprapar N, Chearskul S, Chokephaibulkit K. The first pediatric case of *Staphylococcus aureus* with heterogenous resistant to vancomycin endocarditis in Thailand. J Med Assoc Thai 2005; 88 (Suppl 2): S264-8.
 8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third information supplement. M100-S23. CLSI, Wayne, PA. Vol. 30. 2013.
 9. Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington, D.C. ASM Press 2003: 385-404.
 10. Mignard S, Flandrois JP. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. J Microbiol Meth 2006; 67: 574-81.
 11. Hassanain Al-Talib, Chan YY, Alyaa Al-Khateeb, Habsah H, Kirnpal-Kaur BS, Karim Al-Jand, et al. Pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin. BMC Microbiology 2009; 9: 113.
 12. McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine Leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. J Clin Microbiol 2006; 44: 1141-4.
 13. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, 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.
 14. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V Staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2637-51.
 15. Dien BJ, Hindler JA, Gold HS, Limbago B. Rationale for eliminating *Staphylococcus* breakpoints for beta-lactam agents other than penicillin, oxacillin or cefoxitin, and ceftaroline. Clin Infect Dis 2014; 58: 1287-96.
 16. Chuamuangphan T, Chongtrakool P, Sungkanuparph S. Predicting factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia among hospitalized patients in a tertiary-care hospital: A case-control study. J Infect Dis Antimicrob Agents 2014; 31: 79-89.
 17. Trakulsomboon S, Danchaivijitr S, Rongrungruang Y, Dhiraputra C, Susaemgrat W, Ito T, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. J Clin Microbiol 2001; 39: 591-5.
 18. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 2001; 1: 147-55.

19. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Wilailuckana C, Kaewkes W, Vorachit M, et al. Preliminary report of *SCCmec*-types and antimicrobial susceptibilities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a university hospital in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2010; 41: 920-7.
20. Budimir A, Deurenberg RH, Plecko V, Vink C, Kalenic S, Stobberingh EE. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 331-4.