การศึกษารูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

โดย

นายณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษารูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

โดย

นายณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DETERMINATION OF PATTERN AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

By

MR. Nutthapol MUNGCHUKEATSAKUL

มหาวิทยาลัยศิลปากร

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (MICROBIOLOGY)

Science Silpakorn University

Academic Year 2016

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การศึกษารูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus*
โดย	ณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล)

.... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ดร. ทักษวัน ทองอร่าม)

.... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดี)

56313201 : จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : Staphylococcus aureus/ ยาต้านจุลชีพ/รูปแบบการดื้อต่อยา/ ยีนดื้อยา

นาย ณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล: การศึกษารูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อภายในโรงพยาบาลที่สาคัญ และพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (Methicillin resistant *S. aureus*) และยังสามารถดื้อต่อยาได้อีกหลายชนิด (multidrug resistant)โดยกลไกการดื้อยาแต่ละชนิดจะถูกควบคุมโดยยีนดื้อยาชนิดต่างๆ วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการดื้อต่อยาและยีนดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจผู้ป่วยจานวน 31 ไอโซเลทและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาลจานวน 23 ไอโซเลท และยืนยันสายพันธุ์ด้วยการตรวจหายีน *fem*A นาเชื้อมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disc diffusion และหาค่า MIC จากนั้นตรวจหายีนที่กากับการดื้อยาแต่ละชนิดด้วยเทคนิค PCR และ multiplex-PCR ผลการทดสอบพบว่าเชื้อทุกไอโซเลทมีความไวต่อยา chloramphenicol rifampin linezolid และ vancomycin ดังนั้นจึงไม่พบเชื้อสายพันธุ์ vancomycin- intermediate *staphylococcus aureus* (VISA) และ vancomycin-resistant *staphylococcus aureus* (VRSA) และตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ true MRSA ร้อยละ 14.8 เนื่องจากเชื้อดื้อต่อยา cefoxitin และ oxacillin และตรวจพบยีน *mec*A ร่วมด้วย ทั้งนี้ยังพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ (ร้อยละ 83.3) ที่ดื้อต่อยา penicillin จะตรวจพบยีน *bla*Z ร่วมด้วย พบเชื้อจานวนร้อยละ 9.3 ที่ไวต่อยา erythromycin แต่กลับตรวจพบยีน *erm*A ร้อยละ 9.3 ที่ไวต่อยา gentamicin แต่กลับตรวจพบยีน *aac*(6')/ *aph*(2") และร้อยละ 12.9 ที่ดื้อต่อยา tetracycline และตรวจพบยีน tetK และ tetM หรือพบทั้ง 2 ยีน เช่นเดียวกันมีร้อยละ 9.3 ที่ไวต่อยา tetracycline แต่กลับตรวจพบยีน *tet*K และ *tet*M หรือพบทั้ง 2 ยีน จากผลการทดสอบเหล่านี้สรุปได้ว่าการใช้วิธีการทางจีโนไทป์นอกจากจะช่วยยืนยันผลทดสอบของวิธีการทางฟีโนไทป์แล้ว ยังช่วยลดข้อผิดพลาดต่างๆ ให้น้อยลงและช่วยเพิ่มความแม่นยาและความจาเพาะได้มากขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งสาคัญสาหรับการตัดสินใจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างเหมาะสม และยังช่วยลดอัตราการดื้อต่อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

56313201 : Major (MICROBIOLOGY)

Keyword : Staphylococcus aureus / antibiotic /antibiotic resistance pattern/ antibiotic resistance gene

MR. Nutthapol MUNGCHUKEATSAKUL: DETERMINATION OF PATTERN AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS Thesis advisor : Assistant Professor Thongchai Taechowisan

Staphylococcus aureus is an important nosocomial infection worldwide, especially Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) and multidrug resistant, each antibiotic resistance mechanism is controlled by various resistance genes. Therefore, the aim of this study was to determine correlation between antibiotic resistance pattern and resistance gene in *S. aureu*s isolated from specimen (31 isolate) and swab sample from environment hospital (23 isolate) and species confirmed by *fem*A detection. The antimicrobial susceptibility was determined by disc diffusion test and minimal inhibitory concentration (MIC), including detected antibiotic resistance gene by PCR and multiplex-PCR. The result showed all isolate were susceptible to chloramphenicol, rifampin, linezolid and vancomycin. Thus, Vancomycin- intermediate *S. aureus* (VISA) and Vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) could not found in this study, and 8 'true' MRSA isolates (14.8%) were found as resistance to cefoxitin and oxacillin, including carried *mec*A genes. In addition, most of *S. aureus* (83.3%) were found resistance to penicilin that carry to beta-lactam resistance gene (*bla*Z), 5 erythromycin-susceptible isolate (9.3%) but detected *erm*A gene, 5 gentamicin- susceptible isolate (9.3%) but detected *aac*(6')/ *aph*(2") gene, 7 tetracycline-resistant isolates (12.7%) were carry to *tet*K and *tet*M or both genes, as well as 5 tetracycline-susceptible isolates (9.3%) but detected *tet*K and *tet*M or both genes. These result suggests that can be used genotypic methods methods for confirmation of the results obtained by conventional phenotypic methods and also reduce errors and increase accuracy and specificity which important to determine the appropriate therapy, decisions include reduces the rate of drug resistance most effectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดี อาจารย์ประจำคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยมหิดลและอาจารย์คณะกรรมการที่ปรึกษางานวิจัย ประจำภาควิชาจุลชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกๆท่านที่ได้ให้คำแนะนา ช่วยเหลือ สนับสนุนและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการศึกษาวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ วิญญู ภักดี จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี และ คุณอภิวัฒน์ ลาภอานวยทรัพย์ ที่ให้ความรู้ แนวคิด แนะแนวทางในการศึกษาวิจัย และให้กำลังใจในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณกรพรรณ เศวตสุวรรณกุล นักวิทยาศาสตร์ของภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้คาแนะนาในการใช้เครื่องมือ สารเคมีต่างๆ และให้ความรู้ในบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์ของผู้เขียน

ขอขอบคุณ นายฐาเอก ปานเจริญกุล นางสาวดาราวรรณ โนนสายทอง นางสาวอัจฉรา อินทรานุวงษ์ นางสาวพรพิมล เลยยุทธ นางสาวพรทิวา แก้วนาเคียน และรุ่นพี่ ภาควิชาจุลชีลวิทยาทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกาลังใจตลอดมา สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวของผู้เขียนตลอดจนผู้เขียนหนังสือและบทความต่างๆที่ได้ให้ความรู้แก่ผู้เขียนจนสามารถให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สาเร็จได้ด้วยดี

ณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย ...... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ...... จ
กิตติกรรมประกาศ ...... ฉ
สารบัญ ...... ช
สารบัญภาพ ...... ฎ
สารบัญตาราง ...... ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2
สมมติฐานของการศึกษา 3
ขอบเขตการศึกษา 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) 5
เชื้อก่อโรค (Pathogen) 5
ผู้ที่ติดเชื้อ (Host) 6
สิ่งแวดล้อม (Environment) 6
Staphylococcus aureus 6
สมบัติทางชีวเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยา 7
สรีรวิทยาและปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรค 7

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผนังเซลล์ (cell wall) 7
Protein A 9
Teichoic acids 9
สารที่เชื้อ S. aureus สร้างขึ้น 9
สารพิษ (Toxin) 9
เอนไซม์ (Enzymes) 10
โรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ S. aureus 11
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) 13
ระบาดวิทยาของเชื้อ MRSA 15
การดื้อต่อยาต้านจุลชีพและการรักษาโรคติดเชื้อ S. aureus 16
β -lactam 17
Penicillin 17
Penicillinase-resistant penicillin 17
Glycopeptide 18
Aminoglycoside 19
Tetracycline 19
Macrolide, Lincosamide, Streptogramin (MLS) 20
Chloramphenicol 21
Fluoroquinolone 21
Rifampin 22
Linezolid 22
Sulfonamide และ Trimethoprim 23
การวินิจฉัยเชื้อ S. aureus 25
การเก็บสิ่งสิ่งส่งตรวจ (specimen) 25

การจำแนกเชื้อ S. aureus ออกจากเชื้อกลุ่มอื่น 25
การวินิจฉัยการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ S. aureus ด้วยวิธีการทางฟีโนไทป์ 27
Agar disc diffusion 27
Minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution test.......................................27
การวินิจฉัยการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ S. aureus ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล หรือวิธีทางจีโนไทป์ 29
Polymerase Chain Reaction (PCR) 29
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 33
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี..33
การเก็บตัวอย่าง การเพาะเลี้ยงเชื้อและการจำแนกเชื้อ S. aureus.......................................35
การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ...35
Disc diffusion 35
Minimum inhibitory concentration (MIC) broth dilution test 37
การตรวจหายีนดื้อยาด้วยเทคนิค PCR และ multiplex-PCR 39
การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)..39
การตรวจหายีนดื้อยาด้วยเทคนิค PCR และ multiplec-PCR 39
บทที่ 4 ผลการทดลอง..41
การเก็บตัวอย่างและการจำแนกเชื้อ...41
การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 43
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ของยา oxacillin และ vancomycin...45
รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ S. aureus จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ 47
การตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพ 50
ความสัมพันธ์ระหว่างผลทดสอบความไวต่อยาและยีนดื้อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด....................53

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 59
รายการอ้างอิง 67
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 80
ภาคผนวก ข 84
McFarland Standard Solution No. 0.5 84
ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 84
การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ 87
การสกัด DNA 89
การเตรียม Agarose gel 91
การทำ Gel electrophoresis 91
ภาคผนวก ค 92
ข้อมูลดิบ 92
ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ S. aureus เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK 109
คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์ 132
ประวัติผู้เขียน 133

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 องค์ประกอบของเชื้อ *S. aureus*..........8

ภาพที่ 2 ความชุกของ Hospital-Associated Methicillin-resistant *S. aureus*..........16

ภาพที่ 3 Agar Diffusion Test..........28

ภาพที่ 4 Minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution test..........28

ภาพที่ 5 ขั้นตอนการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disc Diffusion..........36

ภาพที่ 6 ขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อด้วยวิธี broth microdilution..........38

ภาพที่ 7 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี disc diffusion..........43

ภาพที่ 8 ผลทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *S. aureus* ด้วยแผ่นยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด..........44

ภาพที่ 9 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของยา oxacillin 45

ภาพที่ 10 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของยา vancomycin..........46

ภาพที่ 11 ผลการตรวจหายีน *fem*A..........51

ภาพที่ 12 ผลการตรวจหายีน *bla*Z และ *mec*A..........52

ภาพที่ 13 ผลการตรวจหายีน *aac* (6′)/*aph*(2″)..........52

ภาพที่ 14 ผลการตรวจหายีน *erm*A *tet*K และ *tet*M..........53

ภาพที่ 15 Gram positive cocci..........84

ภาพที่ 16 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลส..........85

ภาพที่ 17 ผลทดสอบการหมักน้ำตาลแมนนิทอล..........86

ภาพที่ 18 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส..........86

ภาพที่ 19 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง..........87

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ยีนควบคุมกลไกการต่อการดื้อยาต่างๆของ *S. aureus* 24

ตารางที่ 2 ค่ามาตรฐานความไวและดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion...............37

ตารางที่ 3 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) มาตรฐานด้วยวิธี Broth Microdilution 38

ตารางที่ 4 ไพร์เมอร์และสภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้ในการทดสอบ PCR และ multiplex ...40

ตารางที่ 5 หมายเลขเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (specimen) และตัวอย่างป้ายเชื้อ (swab) 42

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของยา oxacillin และ vancomycin 47

ตารางที่ 7 รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ....................49

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อด้วยวิธี PCR และ multiplex-PCR....................51

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Penicillin กับยีน blaZ ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างงส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ 54

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Cefoxitin และ Oxacillin กับยีน *mec*A ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ....................54

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Erythromycin กับยีน ermA ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ....................55

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา gentamicin กับยีน *aac*(6')/ *aph*(2'') ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ....................56

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Tetracycline กับยีน *tet*K และ *tet*M ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ....................57

ตารางที่ 14 ส่วนผสมการทำปฏิกิริยา PCR....................90

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลและผลการทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างที่เก็บตามสถานที่ต่างๆ (ป้ายเชื้อ) ในโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐมทั้งหมด 69 ตัวอย่าง. 92

ตารางที่ 16 แสดงผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย 95

ตารางที่ 17 แสดงผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus ที่*แยกจากตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธี ป้ายเชื้อ 97

ตารางที่ 18 แสดงผลของการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งเชื้อ S. aureus ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย 99

ตารางที่ 20 รูปแบบการดื้อยาต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ 103

ตารางที่ 21 แสดงผลการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพเชื้อ *S. aureus* ที่พบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย 104

ตารางที่ 22 แสดงผลการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพเชื้อ *S. aureus* ที่ตรวจพบในตัวอย่างป้ายเชื้อ 105

ตารางที่ 23 การเปรียบเทียบระหว่างผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย 106

ตารางที่ 24 การเปรียบเทียบระหว่างผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ MIC และยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่าง ป้ายเชื้อ 107

ตารางที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาต่านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ 108

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ จัดอยู่ในกลุ่ม staphylococci และถูกจัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น หรือสามารถพบในร่างกายของมนุษย์ (colonization) โดยเฉพาะที่บริเวณผิวหนัง และในรูจมูก บางครั้งก็อาจก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อที่บริเวณผิวหนัง กระดูก และ ปอด ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการติดเชื้อของผู้ป่วย เช่น ผู้ที่มีภูมิต้านทานโรคต่ำ ผู้ที่ได้รับการผ่าตัด ผู้ที่มีแผลน้ำร้อนลวกไฟไหม้ ผู้ป่วยที่ได้รับการสอดใส่เครื่องมือทางการแพทย์เข้าร่างกาย และการติดเชื้อในกระแสเลือด ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้ออยู่แล้ว ซึ่งถือว่ามีความรุนแรงมากที่สุดทำกระทั่งอาจส่งผลให้ผู้ป่วยถึงกับเสียชีวิตได้

นอกจากจะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ก่อโรคภายในร่างกายผู้ป่วยได้แล้ว ยังมีโอกาสติดเชื้อ *S. aureus* ได้จากสภาพแวดล้อมภายในโรงพยาบาลหรือบุคลากรทางการแพทย์ที่อาจพบได้ในขณะปฏิบัติงาน และไปสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม และอุปกรณ์ต่างๆ ภายในห้องผู้ป่วย เช่น เสื้อผ้า เตียงผู้ป่วย เก้าอี้ผู้ป่วย พื้น ผนังห้อง ที่ผิวด้านนอก และด้านในของระบบท่อของเครื่องช่วยหายใจ อ่างล้างมือ ก๊อกน้ำ สายรัดแขนสำหรับเจาะเลือด เป็นต้น เชื้อ *S. aureus* สามารถแพร่กระจายสู่อุปกรณ์เครื่องใช้และสิ่งแวดล้อมรอบตัวผู้ป่วยได้ ซึ่งถ้าหากมีการสัมผัสบ่อยจะทำให้เกิดการปนเปื้อนหรือการแพร่กระจายเชื้อมากขึ้น ดังนั้นถ้าสิ่งแวดล้อมไม่สะอาดย่อมจะมีเชื้อโรคปนเปื้อนมาก ส่งผลให้ผู้ป่วยมีภาวะเสี่ยงต่อติดเชื้อมากขึ้น (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และ วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2553)

การรักษาโรคติดเชื้อ *S. aurues* เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1941 โดยการใช้ยา penicillin G ต่อมาเชื้อได้เกิดภาวะดื้อต่อยาชนิดนี้อย่างรวดเร็ว โดยเชื้อมียีน *bla*Z ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ออกมา เพื่อยับยั้งการออกฤทธิ์ของยา penicillin ต่อมาในปี ค.ศ. 1961 ได้มีการพัฒนายา methicillin เพื่อรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ หลังจากนั้นไม่นานเชื้อดังกล่าวเกิดการดื้อต่อยา methicillin และยาในกลุ่ม β-lactam จึงเรียกเชื้อชนิดนี้ว่า Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA (Yasmeen *et al*., 2010)

ปัจจุบันพบว่าเชื้อ MRSA มีการระบาดอยู่ภายในโรงพยาบาลทั่วโลก (Hospital-associated MRSA, HA-MRSA) ในแถบทวีปเอเชียบางประเทศพบว่ามีการระบาดของเชื้อ HA-MRSA เช่น เกาหลีใต้ จีน และเวียดนาม (ร้อยละ 70) รวมถึงประเทศไทย (ร้อยละ 57) ดังนั้นการติดเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยาส่งผลให้ผู้ป่วยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงขึ้น ใช้เวลาในการรักษาเพิ่มขึ้นและยังมี

โอกาสเสียชีวิตสูงขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้เชื้อดื้อต่อยายังสามารถส่งผ่านยีนดื้อยาไปสู่เชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ส่งผลให้เกิดปัญหาการดื้อต่อยาทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น

เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicilin เกิดจากยีน *mec*A ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน penicillin binding protein 2a (PBP2a) ซึ่งจะจับกับ β-lactam ring ที่เป็นส่วนประกอบหลักของยาในกลุ่ม β-lactam แทนโปรตีน PBP ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ และเชื้อ MRSA นอกจากจะดื้อต่อยาในกลุ่ม β –lactam ทุกชนิดแล้วยังมีการดื้อต่อยาได้หลายชนิดร่วมด้วย (multidrug resistance) (Frost *et al*., 2009) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ MRSA ที่ดื้อยาหลายชนิดยังสามารถรักษาได้ด้วยยา vancomycin แต่ทว่าในปัจจุบันพบว่ามีบางสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในระดับปานกลาง (vancomycin-intermidiate *Staphylococcus aureus,* VISA และในระดับสูง (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus,* VRSA) ส่งผลให้ต่อไปในอนาคตอาจจะไม่สามารถนำยา vancomycin มารักษาผู้ป่วยได้

ในปัจจุบันเราสามารถตรวจสอบการดื้อต่อยาของเชื้อ *S. aurues* ด้วยวิธีทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพมาตรฐานได้หลายวิธี เช่น oxacillin salt agar, disc diffusion, D-test และ MIC เป็นต้น ดังนั้นความแม่นยำและความรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* นั้นมีความจำเป็นอย่างมากต่อการตัดสินใจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ เพื่อหาทางรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างเหมาะสม และทันเวลา อีกทั้งการวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีการทางฟีโนไทป์นี้ เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่นาน (Derek *et al.,* 2005) และในบางครั้งอาจให้ผลบวกปลอม (false positive) (รณภัทร สำเภา และ องอาจ, 2557; Datta *et al*., 2011) จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการยืนยันการดื้อต่อยา โดยเทคนิคที่เหมาะสมจะต้องมีความรวดเร็ว ใช้งานง่าย ทำซ้ำได้ เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทดสอบการดื้อต่อยา และในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลทดสอบที่รวดเร็วมีความน่าเชื่อถือ และยังเป็นวิธีมาตรฐาน (gold strandard) สำหรับตรวจสอบยีนดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* (CLSI, 2015)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือการศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบการดื้อต่อยา และยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ตรวจคัดกรองเชื้อ MRSA VISA และ VRSA และเปรียบเทียบประสิทธิผลของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการทางฟีโนไทป์ (การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ) และวิธีการทางจีโนไทป์ (PCR และ multiplex-PCR)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ และรูปแบบการดื้อต่อยาของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี disc diffusion

2. เพื่อศึกษา และคัดกรองเชื้อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) และ vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) ด้วยการหาค่า Minimal Inhibition Concentration (MIC) โดยวิธี broth microdilution

3. ตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี PCR และ Multiplex-PCR เพื่อยืนยันการดื้อต่อยาของเชื้อ *S. aureus*

4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการดื้อต่อยา และยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus*

สมมติฐานของการศึกษา

1. เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยามีการแพร่กระจายของเชื้ออย่างต่อเนื่องภายในตัวผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล หรือสิ่งของที่ผู้ป่วยสัมผัสอยู่เป็นประจำ

2. เชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล มีรูปแบบการดื้อต่อยาที่หลากหลาย

3. เชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์มียีนดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด

ขอบเขตการศึกษา

1. แยกเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย เช่น เลือด, เสมหะ และ ปัสสาวะ เป็นต้น และเก็บเชื้อจากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล เช่น ราวเหล็ก เตียงผู้ป่วย พื้น ห้องน้ำ เป็นต้น โดยตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บในโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐม

2. คัดเลือกและจำแนกเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีการทางชีวเคมี เช่น การย้อมแกรม, ทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส การหมักน้ำตาลแมนนิทอล การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลส

3. ตรวจสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆด้วยวิธี disc diffusion และตรวจคัดกรองเชื้อ MRSA VISA และ VRSA ด้วยวิธี broth microdilution

4. ตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค PCR และ Multiplec-PCR

5. ตรวจสอบความสัมพันธ์ของรูปแบบการดื้อต่อยาและยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อเฝ้าระวังเชื้อดื้อต่อยา เฝ้าระวังการใช้ยา รวมถึงใช้เป็นข้อมูลก็ในการตัดสินใจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วย ได้อย่างเหมาะสม ทันเวลาและยังช่วยลดอัตราการดื้อต่อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection)

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่สำคัญของทุกโรงพยาบาลทั่วโลก ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Healthcare- associated infection) เป็นผลมาจากการที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อหรือ พิษของเชื้อ (toxin) ขณะรับการรักษาในโรงพยาบาลโดยที่ผู้ป่วยไม่มีการติดเชื้อนั้นมาก่อน หรือการติดเชื้อนั้นไม่อยู่ในระยะฟักตัวของโรค หรือ/และการติดเชื้อใดๆ ก็ตามที่เกิดขึ้นภายหลังจากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล ผู้ป่วยมีอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น รวมถึงทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตจากภาวะโรคแทรกซ้อนเพิ่มขึ้นหรือส่งผลให้ผู้ป่วยต้องนอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาลยาวนานขึ้น เป็นสาเหตุให้สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการรักษาตัวเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลกระทบอื่นๆ คือ ความทุกข์ทรมานจากการเจ็บป่วยที่เพิ่มขึ้นจากเดิม ความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และประสิทธิภาพการรักษาด้อยลง สำหรับการแพร่กระจายเชื้อนั้น ส่วนใหญ่จะติดต่อทางการสัมผัส ทั้งทางตรงโดยใช้มือ และทางอ้อมโดยผ่านอุปกรณ์ของเครื่องใช้ต่างๆ นอกจากนี้การรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อ ต้องได้รับการวินิจฉัยอย่างถูกต้องและต้องให้การรักษาที่รวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเชื้อเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Resistance, AMR) ซึ่งมีสาเหตุมาจากพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมของผู้ป่วย โดยเกิดจากการรับประทานยาไม่ครบตามขนาดที่เหมาะสม ทำให้เชื้อก่อโรคเกิดพัฒนาหรือกลายพันธุ์กระตุ้นให้เชื้อก่อโรคนั้นเกิดการดื้อยาในที่สุด (ขวัญตา กล้าการนา, 2550; อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, 2553; ยุทธนา สุดเจริญ, 2554) สำหรับปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ ได้แก่

เชื้อก่อโรค (Pathogen)

เชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล มักเป็นเชื้อประจำถิ่น หรือเชื้อที่พบในร่างกายของผู้ป่วย (colonization) โดยพบว่าส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลมากที่สุดในประเทศไทย ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Enterobacteriaceae Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *enterococci* ซึ่งเชื้อเหล่านี้มักเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพในระดับสูง เนื่องจากมีการใช้อย่างไม่ระมัดระวังส่งผลให้อัตราการดื้อต่อยาของเชื้ออยู่ในระดับสูง และจำเป็นต้องใช้สารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งมีราคาแพง และอาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่รุนแรง

ผู้ที่ติดเชื้อ (Host)

ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นผู้ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการติดเชื้อ คือ สภาวะภูมิต้านทานโรคของผู้ติดเชื้อ โดยพบว่าผู้ที่มีภูมิต้านทานโรคต่ำ ได้แก่ เด็กเล็ก ผู้สูงอายุ ผู้ที่ได้รับการรักษาโดยใช้ยารักษามะเร็ง ผู้ที่ได้รับการผ่าตัด ผู้ที่มีแผลน้ำร้อนลวกไฟไหม้ ผู้ป่วยที่ได้รับการสอดใส่เครื่องมือทางการแพทย์เข้าร่างกาย เพื่อการวินิจฉัย หรือการรักษาโรค เช่น การใส่สายสวนปัสสาวะ การใช้เครื่องช่วยหายใจ การฉีดยา การเจาะเลือด เป็นต้น

สิ่งแวดล้อม (Environment)

สิ่งแวดล้อมโดยครอบคลุมถึง หอผู้ป่วย, ห้องผ่าตัด และอาคารส่วนอื่นๆ ของโรงพยาบาล รวมถึงเครื่องมือทางการแพทย์ บุคลากรทางการแพทย์ ญาติของผู้ป่วย รวมทั้งสุขอนามัยของโรงพยาบาล ได้แก่ น้ำดื่ม น้ำใช้ ระบบการระบายน้ำ การกำจัดของเสีย ความสะอาดของอาคารสถานที่ ซึ่งถ้าสิ่งแวดล้อมที่สกปรกย่อมมีเชื้อโรคปนเปื้อนมาก ส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสติดเชื้อก่อโรคมากขึ้น (สมหวัง ด่านชัยวิจิตร, 2533; อิสยา และคณะ, 2548; Harold, 1996)

Staphylococcus aureus

S. aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ จัดอยู่ในกลุ่ม staphylococci และถูกจัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น หรือเชื้อที่สามารถพบในผู้ป่วย (colonization) ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้ไม่ได้พบเฉพาะคนที่เป็นโรคเนื่องจากติดเชื้อนี้เท่านั้น แต่ยังพบในคนที่มีสุขภาพดีด้วย นอกจากนี้ *S. aureus* ยังพบตามส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้อีก เช่น ผิวหนัง ในจมูก คอ และผม บางครั้งพบในอุจจาระด้วย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์อย่างมาก เพราะสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ทุกส่วนของร่างกายหรือการติดเชื้อที่ผิวหนัง เช่น การอักเสบเป็นหนองของรูขุมขน (folliculitis) ชั้นใต้ผิวหนังอักเสบ (*Cellulitis*) และการติดเชื้อที่ผิวหนังกำพร้า (impetigo) เป็นต้น เชื้อ *S. aureus* สามารถก่อให้เกิดปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรคได้หลายแบบ สร้างสารพิษ (α-hemolysin, Panton-Valentine leukocidin) superantigen (enterotoxin, toxic shock syndrome toxin-1) ยับยั้งกระบวนการฟาโกไซโตซิส (polysaccraride capsule, protein A) และหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน (staphylokinase) นอกจากนี้เชื้อ *S. aureus* สามารภก่อให้เกิดโรคขั้นรุนแรงได้หลายชนิด เช่น โรคปอดบวม (pneumonia) การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และการติดเชื้อแผลผ่าตัด (surgical-wound infections) ซึ่งการติดเชื้อก่อโรคชนิดนี้ส่งผลให้มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้น (Levinson, 2010)

สมบัติทางชีวเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นทรงกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มีการเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่สายสั้น ๆ หรืออยู่รวมเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีจะกลม นูน ขอบเรียบและขุ่นเล็กน้อย สามารถสร้างรงควัตถุแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่เรียกว่า staphyloxanthin ซึ่งทำให้โคโลนีมีสีเหลืองทองได้ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลทำให้โคโลนีเป็นเมือก ซึ่งช่วยเพิ่มความทนทานต่อการทำลายของยาต้านจุลชีพ และยังเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค เชื้อมีการดำรงชีวิตแบบ Facultative anaerobe โดยสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เช่น blood agar (BA), nutrient agar (NA), tryptic soy agar (TSA), และ brain heart infusion (BHI) agar เป็นต้น เชื้อยังสามารถเจริญได้ดีในที่ที่มี และไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 ºC โดยทั่วไปเชื้อ *S. aureus* จะทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และสามารถมีชีวิตรอดได้นานแม้จะอยู่ในหนองหรือเสมหะแห้ง (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2555)

คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีทั่วไปของเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ การย้อมสีแกรมติดสีแกรมบวก สร้างเอนไซม์คาตาเลสย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้เป็นน้ำ และออกซิเจน สร้างเอนไซม์ β-hemolysin ที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงบน blood agar ให้เห็นลักษณะเป็นวงใสๆรอบโคโลนี สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และแมนนิทอลได้ และสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลสที่ส่งผลให้พลาสมาเกิดการแข็งตัว เปลี่ยนไฟบริโนเจนให้เป็นไฟบรินซึ่งจะป้องกันกระบวนการฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดขาว และการเข้าจับของยาต้านจุลชีพได้ (Maria, 2012; Harris *et al.*, 2002; John, 2006) บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ β-lactamase และ ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam โดยเฉพาะยากลุ่ม Penicillin (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2555; *Kenneth,* 2012; Lowy, 2003)

สรีรวิทยาและปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรค

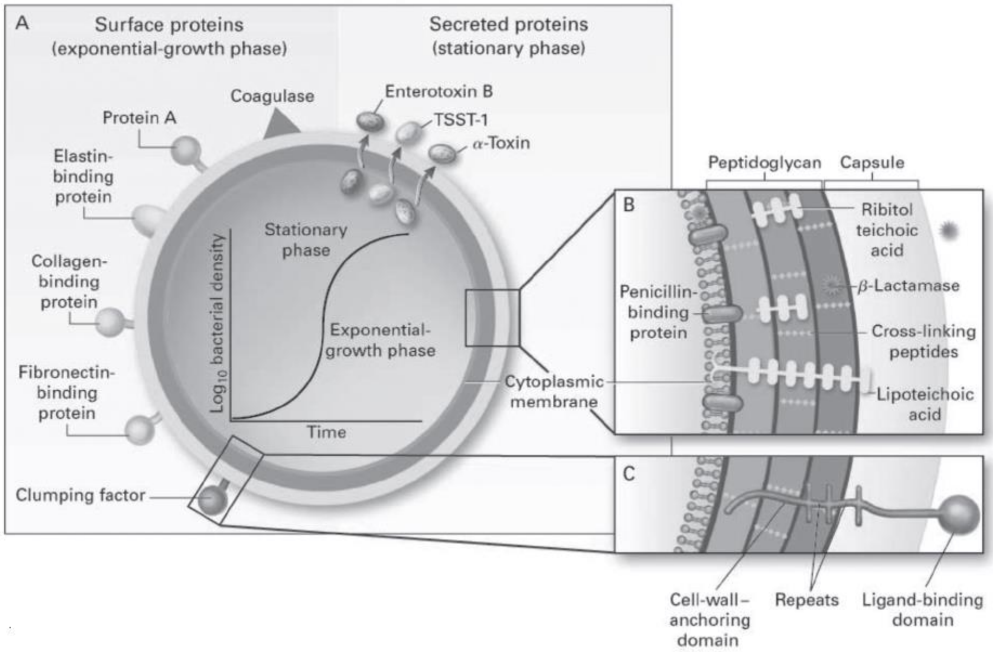
โครงสร้างเซลล์ของ *S. aureus* จะมีโครงสร้างเช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไปได้แก่

ผนังเซลล์ (cell wall)

ผนังเซลล์ของ *S. aureus* ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (ภาพที่ 1) หลายๆชั้น เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ ในแต่ละชั้นของเปปติโดไกลแคนประกอบไปด้วยโพลิแซคคาไรน์ซ้ำๆกันคือ *N*-acetylglucosamine (NAG) และ *N*-acetylmuramicacid (NAM) ต่อกันเป็นสายโซ่โพลิเมอร์และมี

crosslink ระหว่างสายเปปติโดไกลแคนแต่ละสายด้วยพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน (อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา, 2556)

นอกจากนี้เปปติโดไกลแคนยังมีคุณสมบัติกระตุ้นให้มีการหลั่งไซโตไคน์ทำเกิดภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (Disseminated intravascular clotting, DIC) และยังสามารถสร้างแคปซูล (Capsule) ซึ่งเป็นชั้นเมือกของสาร Polysaccharide ล้อมรอบเซลล์ แคปซูลมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) ทำให้เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค (Foster, 1996) และยังป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดขาวชนิดพอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ลิวโคไซด์ (Polymorphonyclear leukocyte, PMN) มาจับทำให้เชื้อแพร่ในเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว ยังช่วยให้เชื้อไปเกาะติดกับเครื่องทางการแพทย์ได้ เช่น ข้อต่อเทียม ลิ้นหัวใจเทียม เป็นต้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2555)



ภาพที่ 1 องค์ประกอบของเชื้อ *S. aureus*

ที่มา: Kaplan S.L., Hulten K.G., Mason E.O (2009). ***Staphylococcus aureus* infections (Coagulase-positive *Staphylococci*)**. In: Feigin R.D., Cherry J.D., Demmler-Harrison G.L., Kaplan S.L editors. Feigin and Cherry's Textbook of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2009. p. 1197-212.

ผนังเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* ยังมีองค์ประกอบที่สำคัญอยู่อีกหลายองค์ประกอบ ได้แก่

Protein A

โปรตีนที่ผนังเซลล์ของ *S. aureus* ที่สำคัญคือ โปรตีนเอ (protein A) ซึ่งจะยึดกับจับชั้นเพปติโดไกลแคนด้วยพันธะโควาเลนต์ และยังเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อโดยจะทำหน้าที่เกาะกับส่วน Fe receptor ของ IgG1 IgG2 และ IgG4 ส่งผลทำให้ยับยั้งการเกิดกระบวนการออพโซไนเซชัน (opsonization) และการกลืนกินของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) และยังสามารถก่อความเสียหายให้กับส่วนที่เกาะติดหรือส่งผลให้เนื้อตายเฉพาะส่วนได้ (necrotic tissue) คุณสมบัตินี้ทำให้โปรตีนเอถูกนำไปใช้ในการตรวจแอนติเจนของเชื้อ *S. aureus* ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Coagglutination โดยอาศัย IgG ที่ปลายด้าน Fe จับอยู่กับ โปรตีนเอ และปลายด้าน Fab จะจับกับแอนติเจนจำเพาะของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย และยังมีเอนไซม์ Bound coagulase หรือ Clumping factor ที่อยู่ในรูปของ coagglutinate ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแอนติบอดี้-แอนติเจน (antign-antibody complexes) ซึ่งสามารถเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ให้เป็นไฟบริน (Fibrin) ที่ไม่ละลายน้ำ และทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการจับกลุ่มกันได้ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549; Levinson, 2010)

Teichoic acids

เป็นกรดอินทรีย์ที่แทรกอยู่ในชั้นของเปปติโดไกลแคนซึ่งจะเชื่อมต่อกับสายเพปติโดไกลแคนด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) กรดไทโคอิกยังเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่มีหมู่ฟอสเฟตจับกับเปปติโดไกลแคนและเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสารพอลิแซคคาไรด์นี้เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีฟอสเฟตชนิดจำเพาะกับสายพันธุ์ *S. aureus* (species – specific carbohydrate antigens) โดยจะมีกรดไรบิทอลไทโคอิก (Ribitol teichoic) จับกับ n-acetyl glucosamine เรียกว่า polysaccharide A (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

สารที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น

สารพิษ (Toxin)

1) Staphylococcal enterotoxin เป็นสารพิษที่หลั่งออกมานอกเซลล์ชนิดทนความร้อน (heat-stable exotoxin) ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ มีหลายชนิด (A-I) และชนิดที่พบว่ามีรายงานในการก่อโรคอาหารเป็นพิษบ่อยที่สุดคือ ชนิด A และ E สารพิษนี้สามารถทนความร้อนได้ดี และยังทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเอนซม์ในกระเพาะอาหารได้อีกด้วย ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ

ชนิดนี้เข้าสู่ร่างกายจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง (*Kenneth,* 2012; ปิยรัชต์ สันตะรัตติวงศ์, 2554)

2) Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) ประมาณ 20% ของสายพันธุ์ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษนี้ได้ TSST-1 จัดเป็น Super antigen ที่จะกระตุ้นการทำงานของ T-lymphocyte ให้ปลดปล่อยไซโตไคน์ต่างๆออกมา เช่น Tumor necrosis factor (TNF) และ interleukin 1 (IL-1) ซึ่งเป็นสื่อกลางในการกระตุ้นการอักเสบ ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษนี้มีอาการไข้ขึ้นสูง หนาวสั่น มีผื่นบริเวณผิวหนัง อุจจาระร่วงเป็นน้ำ ร่างกายขาดน้ำ คลื่นไส้ อาเจียน ความดันเลือดต่ำ และเนื่องจากสูญเสียน้ำในระบบไหลเวียนเลือดจนอาจทำให้เกิดภาวะ Hypovolemic shock ทำให้การทำงานของอวัยวะต่างๆล้มเหลว ทำให้เกิดอาการช๊อกและเสียชีวิตได้ (Parsonnet *et al*., 2008)

3) Exfoliative toxin (ET) หรือ epidemolytic toxin เป็นสารพิษที่มีฤทธิ์ในการทำลายผิวหนังชั้นกำพร้า (epidermal layer) ทำให้ผิวหนังกำพร้าหลุดออก ก่อให้เกิดกลุ่มอาการ staphylococcal scaled skin syndrome (SSSS) หรือโรค Ritter's disease (ปิยรัชต์, 2554) เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างสารพิษชนิดนี้ได้ 2 ชนิด คือ ET-A และ ET-B ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน คือ ET-A สามารถทนต่อความร้อนได้ แต่ ET-B จะไม่ทนต่อความร้อน หลังจากการติดเชื้อ ร่างกายจะสามารถสร้างแอนติบอดีเพื่อป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ (*Kenneth,* 2012; Wilailuckana, 2005).

4) Cytolytic toxin เป็นกลุ่มของสารพิษที่หลั่งออกมานอกเซลล์ ได้แก่ hemolysin หรือ staphylolysin ชนิด แอลฟา (α) เบต้า (β) และเดลต้า (§)ที่มีฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดแดง เยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์อื่นๆหลายชนิด รวมไปถึง ชนิด แกมม่า (γ) และ Leucocidin Panton Valentine Leucocidin (PVL) เป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดความผิดปกติในการควบคุมการผ่านเข้า-ออกเซลล์ของสาร ทำให้สูญเสียสมดุลแรงดันออสโมติก เซลล์จึงบวมและแตกในที่สุด PVL จะมีฤทธิ์จำเพาะต่อเม็ดเลือดขาว โดยจะป้องกันเชื้อจากกระบวนการฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดขาว (*Kenneth,* 2012; ปิยรัชต์ สันตะรัตติวงศ์, 2554)

นอกจากนี้ PVL ยังเป็นปัจจัยการก่อความรุนแรงของโรคในการติดเชื้อที่เนื้อเยื่ออ่อน ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ MRSAสามารถสร้างสารพิษชนิดนี้ได้ และสารพิษชนิดนี้ยังเป็นสาเหตุหลักของโรคปอดติดเชื้อขั้นรุนแรงอีกด้วย (necrotizing pneumonia) โดยพบว่าเชื้อ *S. aureus* ประมาณร้อยละ 2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยจะสร้างพิษชนิดนี้ (Levinson, 2010)

เอนไซม์ (Enzymes)

1) Coagulase สามารถพบการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในเชื้อ *Staphylococcus* spp. เท่านั้น โดยcoagulase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัวโดย การเปลี่ยนไฟบริโนเจน

(Fibrinogen) เป็นไฟบริน (Fibrin) ในปฏิกิริยานั้น Coagulase ต้องการองค์ประกอบที่อยู่ในพลาสมา ซึ่งอาจเป็นโพรทรอมบิน (Prothrombin) หรือ Coagulase-reacting factor (CRF) ซึ่งมีอยู่ในพลาสมาของมนุษย์ และสัตว์บางชนิดเท่านั้นเมื่อรวมกันเป็น Coagulase-CRF Complex แล้วจะเปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบรินได้ ส่งผลให้พลาสมาแข็งตัว นอกจากนี้ยังมี Bound coagulase (Clumping factor) ที่เปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบรินทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกัน บทบาทของ Coagulase ทำให้เกิดไฟบรินมาล้อมรอบเชื้อจึงเกิดการต่อต้านกระบวนการฟาโกไซโตซิส และทนต่อการทำลายด้วยแอนติบอดีได้

2) Catalase เป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) เพื่อปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากการถูกทำลายในเซลล์เม็ดเลือดขาว ภายหลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจับกินเชื้อแบคทีเรียโดยขบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) จะเกิดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระที่เป็นพิษเพื่อทำลายเชื้อแปลกปลอม

3) Hyaluronidase มีหน้าที่ในการสลายกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายและลุกลามเข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้นและเชื้อ *S. aureus* มากกว่าร้อยละ 90 สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้

4) Staphylokinase (fibrinolysin) ทำหน้าที่ในการย่อยไฟบริน โดยเกิดจากสารประกอบ Staphylokinase กับ Plasminogen ที่ไปกระตุ้น Plasmin-like protoltiyca ctivity ทำให้ไฟบรินที่จับตัวเป็นก้อนนั้นละลาย จึงนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเกิดลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดของหัวใจ (Coronary thrombosis) (Kenneth, 2012)

5) Lipase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารตั้งต้นหลายชนิด เช่น พลาสมาและไขมันที่สะสมอยู่ที่ผิวหนังซึ่งประกอบด้วยต่อมไขมันและเนื้อเยื่อไขมัน และเป็นสาเหตุของการรวมกลุ่มของเชื้อที่บริเวณต่อมเหงื่อ การสร้างเอนไซม์ไลเปสจำเป็นต่อการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่ผิวหนังส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในชั้นผิวหนังและใต้ผิวหนัง

6) β-lactamase เป็นเอนไซม์ที่สร้างจากยีนบนพลาสมิดและทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่มβ-lactam อื่นๆอีกหลายชนิด โดยเอนไซม์ β-lactamase จะย่อยสลาย β-lactam ring ทำให้ยาสูญสภาพและไม่สามารถออกฤทธิ์ทำลาย (Foster, 1996)

โรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus*

1) โรคติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน การติดเชื้อ *S. aureus* จะทำให้เกิดฝี ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดที่บริเวณผิวหนัง ซึ่งเริ่มจากการติดเชื้อที่ต่อมไขมันบริเวณที่เกิดฝีเกิดการอักเสบ มีการสะสม

ของเม็ดเลือดขาวที่ตายแล้ว เนื้อเยื่อตาย เมื่อฝีเจริญเต็มที่บริเวณเนื้อเยื่อที่ตายจะเต็มไปด้วยเม็ดเลือดที่ตายแล้วรวมทั้งแบคทีเรียที่เม็ดเลือดขาวจับกิน และมีไฟบรินมาล้อมรอบ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544) การเกิดฝีและฝีฝักบัว (furuncle และ carbuncle) โดยจะเกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังชั้นนอกทำให้เกิดการอักเสบ เช่น รูขุมขนอักเสบ ซึ่งเชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังทำให้เกิดหนองกลายเป็นฝี (furuncle) ส่วนฝีฝักบัว (carbuncle) คล้ายกับฝี แต่จะมีจำนวนมากกว่า และแพร่กระจายลึกลงในเนื้อเยื่อเส้นใย (fibrous tissue) และการเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนังหรือเป็นตุ่มพุพอง (impetigo) มักเป็นตุ่มหนองตื้นๆ อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม พบบ่อยบริเวณใบหน้าแขน ขา เมื่อตุ่มหนองแตกออก กลายเป็นรอยถลอกตื้นๆ ถ้ามีการติดเชื้อที่ต่อมไขมันจะทำให้เกิดการอักเสบ เชื้อบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ Epidermolytic toxin (ET) ที่ทำให้ผิวหนังชั้นกำพร้าหลุดลอก ที่เรียกว่า Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

2) โรคปอดบวม (pneumonia) เป็นโรคที่สำคัญมากเพราะทำให้มีอัตราการตายสูง อาจเกิดขึ้นทันทีทันใดหรือติดเชื้อภายหลังจากเป็นอื่นมาก่อน การติดเชื้อมักเกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ โรคหัดหรือผู้ป่วยหลังการผ่าตัด ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อสูงกว่าคนปกติ อาการของโรคอาจเกิดขึ้นทันทีที่ติดเชื้อ จึงจัดว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยทำให้มีอัตราการตายสูง โดยที่การติดเชื้อจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ และฝีจำนวนมากที่ปอด (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

3) โรคติดเชื้อของกระดูกและข้อ (osteomyelitis) การติดเชื้อที่กระดูกมักมีสาเหตุจากการติดเชื้อในกระแสเลือด และเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในส่วนของไดอะไฟซิส (diaphysis) ของกระดูกยาว (long bones) จะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรง และมีการสะสมของหนองบริเวณผิวของกระดูก เกิดเป็นหนองใต้เยื่อหุ้มกระดูก (pyoarthrosis) ข้อต่อกระดูกที่มีหนองจากการติดเชื้อจะทำลายกระดูกอ่อนของข้อต่อทำให้เกิดความพิการของข้อต่ออย่างถาวร (Foster, 1996)

4) โรคที่เกิดจากสารพิษ (toxins) เกิดจากสารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *S.aureus* เช่น ฮีโมลไลซิน (hemolysin) เป็นโปรตีนที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด ทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังพบว่าบางสายพันธุ์จะสร้างสารพิษ Panton-Valentine-Leukocidin (PVL) เป็นโปรตีนที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน(Enterotoxin) เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษโดยทำให้ผู้ป่วยมีอาการอาเจียน และท้องร่วงอย่างรุนแรง ในบางสายพันธุ์ทำให้เกิดกลุ่มอาการ Toxic-Shock Syndrome โดยการสร้าง toxicshock syndrome toxin-1 (TSST-1) ทำให้มีไข้สูง คลื่นไส้อาเจียน ความดันต่ำ มีผื่นแดงตามตัว การทำงานของไตล้มเหลว และเกิดอาการช็อค (Batzing, 2002)

5) การติดเชื้อในกระแสเลือด และเยื่อบุหัวใจอักเสบ (bacteremia and endocarditis)

การติดเชื้อในกระแสเลือดอาจเกิดขึ้นจาการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น ที่ผิวหนังทางเดินหายใจ หรือทางเดินระบบปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์ มักพบในคนที่เป็นโรคหัวใจ และหลอดเลือด ความผิดปกติของเม็ดเลือดขาวแกรนูโลไซต์ (granulocyte) และภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่กระแสเลือด เช่น การสวนหัวใจ ก็เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้หลายรูปแบบทั้งการติดเชื้อเฉพาะที่ การติดเชื้อในอวัยวะต่างๆ และการติดเชื้อในกระแสเลือด ความรุนแรงของโรคมีตั้งแต่น้อยจนถึงรุนแรงมากจนส่งผลให้มีอัตราเจ็บป่วย และอัตราการเสียชีวิตที่สูง โดยทั่วไปอาจแบ่งเชื้อ *S. aureus* ได้เป็น 2 กลุ่มคือ methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* หรือ MSSA จัดเป็นเชื้อที่ไวต่อยา ยาที่ใช้รักษาลำดับแรกคือยากลุ่ม β-lactam โดยเฉพาะยา cloxacillin, cefazolin และเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งคือ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาทั้งสองดังกล่าวข้างต้น และ Methicillin-resistat *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา methicillin และยาในกลุ่ม β-lactam เกือบทั้งหมด และยังดื้อต่อยาต้านจุลชีพได้หลายกลุ่ม (Multiple drug resistant) เช่น Tetracycline, Sulfonamide และ Aminoglycoside เป็นต้น (Yasmeen *el tl,* 2010; *Kenneth,* 2012)

กลไกหลักของการดื้อต่อยาของ MRSA จะอยู่ที่ Penicillin-binding protein (PBP) ซึ่งโดยปกติยา Methicillin จะจับกับ PBPs (PBP1, 2 และ 3) เพื่อทำลาย Cross-link peptidoglycan ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แต่ใน MRSA นั้นเชื้อจะมีการสร้าง PBP2a ทำให้ยาในกลุ่ม β-lactam ไม่สามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ ในการสร้างโปรตีน PBP2a นั้นจะถูกควบคุมโดยยีน *mec*A งอยู่บนโครโมโซมของ MRSA และมียีน *mec*I และ *mec*RI ควบคุมการทำงานของยีน *mec*A อีกต่อหนึ่ง (Stephens, 2008; Hiramatsu *et al*., 2000)

ลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของ MRSA คือ การดื้อยาแบบ Heterogeneous resistance คือ มีเพียงบางเซลล์เท่านั้นที่แสดงลักษณะการดื้อยา methicilin และการดื้อยาแบบ Homogeneous resistance ซึ่งเซลล์ทุกเซลล์ของ *S. aureus* จะมีการดื้อยาเหมือนกันหมดทุกเซลล์การดื้อยาในลักษณะนี้ถูกควบคุมโดยยีนที่มีชื่อว่ายีน Factor essential for the expression of methicittine resistant (*fem*) โดยยีนจะสร้างโปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของผนังเซลล์และพบได้ในปริมาณมากในระหว่างที่เชื้อเจริญเต็มที่ (Mehrotra *et al*., 2000) ยีน *fem* จะประกอบด้วยยีนโครงสร้าง 4 ชนิด คือ *fem*A, *fem*B และ *fem*D โดยยีน *fem*A เป็นยีนที่มีความสำคัญที่สุดในการ

แสดงออกของการดื้อยา methicillin ซึ่งทำงานร่วมกับยีน *mec*A ทำให้เกิดการดื้อยา Methicillin ในระดับสูง (Ryffet *et al*., 1994) นอกจากนี้ยังสามารถพบยีน *fem*A ใน *S. aureus* ได้ทุกสายพันธุ์ แม้ว่าเชื้อชนิดนั้นจะไม่มีการดื้อยา methicillin (MSSA) ดังนั้นจึงสามารถใช้ยีนชนิดนี้ในการจำแนกสายพันธุ์ *S. aureus* ได้เช่นกัน (Mehrotra *et al*., 2000) และยังสามารถจำแนก MRSA ออกเป็นหลายประเภทตามกลไกการดื้อต่อยา ดังนี้

1) True methicillin-resistant *S. aureus* (true MRSA) มีกลไกการดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactam นั่นคือโปรตีน PBP ที่บริเวณผนังเซลล์ได้เปลี่ยนแปลงเป็น PBP2a และยังตรวจพบยีน *mec*A และมีค่า MIC ของ oxacillin ≥ 4 μg/ml

2) Borderline-resistant *S. aureus* (BORSA) เป็น *S. aureus* สายพันธุ์ ที่ดื้อยา methicillin ในระดับต่ำคือมีค่า MIC ต่อยา oxacillin (0.5-8 μg/ml) แต่จะตรวจไม่พบยีน *mec*A ซึ่งกลไกการดื้อต่อยาของเชื้อชนิดนี้คือ มีการสังเคราะห์เอนไซม์ β-lactamase ออกมาในปริมาณที่สูงเพื่อย่อยสลายโครงสร้างของยา

3) Modified-resistant *S. aureus* (MORSA) เป็น *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยา methicillin ในระดับต่ำเช่นเดียวกับสายพันธุ์ BORSA (MIC ต่อยา oxacillin 0.5-8 μg/ml) และจะตรวจไม่พบยีน *mec*A เช่นกัน โดยกลไกการดื้อยาของเชื้อคือการเพิ่มจำนวนของ PBP ชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่ PBP2a ส่งผลให้ผนังเซลล์หนาขึ้นและยาไม่สามารถแทรกเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้

4) Methicillin-aminoglycosides-resistant *S. aureus* (MARSA) เป็นเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนไซม์ aminoglycoside-modifying ชนิดที่เรียกว่า bifunctional enzyme โดยมีสังเคราะห์เอนไซม์ ACC(6') และ APH (2'') ร่วมกับมีการสร้างโปรตีน PBP2a ทำให้เชื้อกลุ่มนี้ดื้อต่อยา methicillin และยากลุ่ม aminoglycoside (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2555; Wilailuckana, 2005)

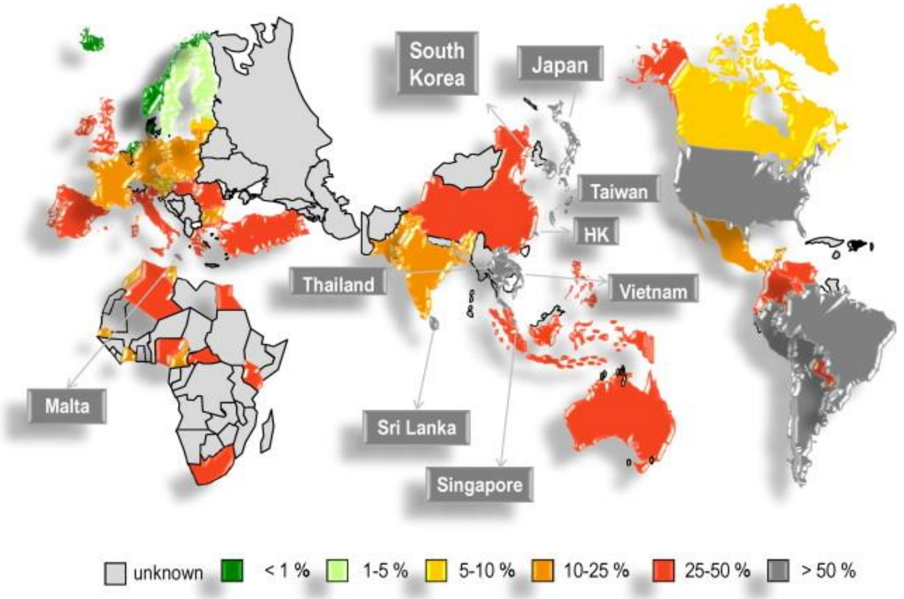
นอกจากนี้ MRSA บางสายพันธุ์ยังดื้อต่อยาได้หลายชนิดร่วมด้วย (multidrug resistance) แต่จะไวต่อยาอื่นๆ บางชนิด เช่น vancomycin ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อต่อยารวมทั้ง MRSA โดยในปีคศ. 1996 พบเชื้อ MRSA ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในระดับปานกลางหรือ vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) เป็นครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น (Hiramatsu, 1998) ต่อมาในปี 2002 มีรายงานถึงการตรวจพบเชื้อ MRSA ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในระดับสูง หรือ vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) ในสหรัฐอเมริกา (CDC, 2002) และในปัจจุบันเชื้อเริ่มที่จะดื้อต่อยาชนิดนี้เพิ่มขึ้น จึงมียาทางเลือกใหม่ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA เช่น linezolid, daptomycin, quinupristin/dalfopristin (Synercid) และ tigecycline ซึ่งจะเป็นยาทางเลือกในผู้ป่วยที่ไม่สามารถใช้ยา vancomycin รวมทั้งอาจพิจารณาเป็นยาหลักสำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA ที่ล้มเหลวหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา

vancomycin จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้พัฒนาจนกลายเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่รักษาได้ยากอีกชนิดหนึ่ง (ธีระพงษ์ มนต์มธุรพจน์, 2558)

ระบาดวิทยาของเชื้อ MRSA

ในปี คศ. 1961 เป็นครั้งแรกที่ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin โดยแยกได้จากผู้ป่วยในประเทศอังกฤษ การติดเชื้อ MRSA ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในโรงพยาบาล (nosocomial infection) หรือเรียกสายพันธุ์เหล่านี้ว่า Hospital-Associated MRSA (HA-MRSA) (Eriksen, 1961; Enright, 2002) ในปัจจุบันมีรายงานถึงเชื้อสายพันธุ์ HA-MRSA ได้ระบาดอยู่ในโรงพยาบาลทั่วโลก (ภาพที่ 2) มีรายงานว่าเชื้อ HA-MRSA มากกว่าร้อยละ 50 ระบาดในประเทศของทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และเอเชีย มีรายงานการระบาดในอัตราปานกลาง (ร้อยละ 25ระบาดวิทยาของเชื้อ MRSA-50) ในประเทศจีน ออสเตรเลีย แอฟริกา ปากีสถาน และบางประเทศในทวีปยุโรป เช่น โปรตุเกส (ร้อยละ 49) อิตาลี (ร้อยละ 37) และโรมาเนีย (ร้อยละ 34) (Heijer, 2013; Ullah *et al*., 2016) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการระบาดของเชื้อ HA-MRSA อัตราสูงในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศ ศรีลังกา (ร้อยละ 86.5) เกาหลีใต้ (ร้อยละ 77.6) เวียดนาม (ร้อยละ 74.1) ไต้หวัน (ร้อยละ 65) ฮ่องกง (ร้อยละ 56.8) รวมถึงประเทศไทย (ร้อยละ 57) (Chambers *et al*., 2009; Grundmann *et al*., 2010; Mejia *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า MRSA สามารถดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งภายในระยะเวลามากกว่า 10 ปีที่ผ่านมาได้ก่อปัญหาทางสาธารณสุขไปทั่วโลก และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (John and Harvin, 2007) เชื้อสายพันธุ์ MRSA นอกจากจะดื้อต่อยา methicillin และยาในกลุ่ม β-lactam ทั้งหมดแล้วยังสามารถดื้อต่อยาในกลุ่มอื่นๆได้อีกหลายชนิดอีกด้วย ในปัจจุบันเชื้อ MRSA ที่ระบาดในประเทศแถบเอเชียจะมีอัตราการดื้อในระดับสูงต่อยา oxacillin (ร้อยละ 82.1) ciprofloxacin (ร้อยละ 78.2) clindamycin (ร้อยละ 64.2), erythromycin (ร้อยละ 76.5) และ tetracycline (ร้อยละ 70.9) (Cheol-In Kang and Jae-Hoon Song, 2013) ขณะที่ Zhoa และคณะ (2012) ได้รายงานว่าในประเทศจีนรายงานว่าเชื้อ *S. aureus* มีอัตราความไวในระดับสูงต่อยา chloramphenicol (ร้อยละ 93.2) และtrimetthoprim-sulfamethoxazole (ร้อยละ 93.2) แต่มีอัตราความไวในระดับปานกลางต่อยากลุ่ม flouroquinolone (ร้อยละ 45-50) (Zhoa *et al*., 2012) นอกจากนี้มีรายงานจากทั่วโลกถึงเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในระดับปานกลาง (VISA) และในระดับสูง (VRSA) ในประเทศญี่ปุ่น อินเดีย, เกาหลี ฮ่องกง สเปน กรีซ เยอรมนี อิตาลี และสหราชอาณาจักร (Loomba *et al.,* 2010) รวมถึงประเทศไทย (Trakulsomboon *et al*., 2001) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความล้มเหลวจากการรักษาด้วยยา vancomycin เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม Chitnis และคณะ (2013) ได้รายงานว่าเชื้อ MRSA และ VRSA ที่แยกจากโรงพยาบาลในประเทศอินเดียวมีความ

ไวต่อยา daptomycin และ linezolid ร้อยละ 100 (Chitnis *et al.*, 2013) นอกจากนี้จากข้อมูลการศึกษาของ US global surveillance ยังรายงานว่าเชื้อ *S. aureus* มีความไวต่อยา linezolid มากกว่าร้อยละ 99 (Gu *et al.*, 2012)



ภาพที่ 2 ความชุกของ Hospital-Associated Methicillin-resistant *S. aureus*

ที่มา Stefani S., Chung D.R., Lindsay J.A., Friedrich A.W., Kearns A.M., Westh H., (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 39: p 273-282

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพและการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus*

การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Resistance, AMR) มีสาเหตุมาจากพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมของผู้ป่วยโดยเกิดจากการรับประทานยาไม่ครบตามขนาดที่เหมาะสม ยาขนาดที่แรงเกินไปจะส่งผลให้เชื้อโรคดื้อยาอย่างรวดเร็วขึ้น (ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ, 2555) ส่งผลให้เชื้อมีการปรับตัวหรือกลายพันธุ์เพื่อป้องกันไม่ให้ถูกทำลาย และจะพัฒนากลายเป็นเชื้อดื้อยาในที่สุด (ขวัญตา กล้าการนา, 2550) อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ากระบวนการถ่ายโอนยีน (Horizontal Transfer Gene) ดื้อยาต้านจุลชีพก็มีส่วนทำให้เชื้อ *S. aureus* ดื้อต่อยาได้หลายชนิด โดยคาดว่าสาเหตุอาจเกิดจาก 1) กระบวนการ transfomation เป็นการขนถ่ายยีนดื้อยาจากตัวให้ (donor)ไปยังตัวรับ (receive) ได้คราวละ 1-2 ยีน โดยยีนดื้อยาจะอยู่ในลักษณะที่ไม่มีอะไรห่อหุ้ม

(naked DNA) กระบวนการนี้สามารถเกิดได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ แต่ต้องมีลักษณะพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน โดยอยู่ในสกุลเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน 2) กระบวนการ transduction เป็นการขนถ่ายยีนดื้อยาที่อยู่ในรูปของฟาจ (phage) และอาศัยไวรัสเป็นตัวพา และ 3) กระบวนการ conjugation เป็นการขนถ่ายยีนดื้อยาในรูปของ R-plasmid ผ่านพิไล (pili) เป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์ทั้งสอง และภายใน R-plasmid จะประกอบด้วยยีนดื้อยา 1-10 ชนิด หรือมากกว่า ซึ่งยีนเหล่านี้สามารถถูกขนถ่ายไปยังตัวรับในเวลาเดียวกันได้ (มาลิน จุลศิริ, 2532; Wongdindam, 2007) สำหรับยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* และกลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่เกิดจากยีนดื้อยา (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549; มาลิน จุลศิริ, 2532; Reygaert, 2013 และ Slade *et al*., 2009) หลักๆมีดังนี้

β-lactam

Penicillin

เป็นยากลุ่ม β -lactam ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ในช่วงแรกๆ มีโครงสร้างหลักคือ 6-aminopenicillanic ซึ่งประกอบด้วย β -lactam ring เชื่อมต่อกับ thiazolidine ring โดยจะเข้าจับกับเอนไซม์ carboxypeptidase และ transpeptidase หรือเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า penicillin-binding proteins (PBP) ตัวยาจะจับกับบริเวณ active site ของ PBPs ส่งผลให้ยับยั้งการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ส่งผลให้แบคทีเรียหยุดการสร้างผนังเซลล์และตายในที่สุด

กลไกการดื้อต่อยา penicillin คือ เชื้อจะสร้างเอนไซม์ penicillinase (β –lactamases) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine peptidase ซึ่งจะออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine คือตำแหน่ง β –lactams ring มีผลทำให้เกิดการแยกพันธะ amide ของ β –lactams ring เรียกผลผลิตที่เกิดขึ้นนี้ว่า penicilloyl ซึ่งจะเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน serine ที่ตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ของเอนไซม์ penicillinase ทำให้เกิดสารกึ่งกลาง acylenzyme intermediate และต่อมาจะทำปฏิกิริยากับน้ำทำให้เกิดการแตกตัวและปล่อย penicilloyl ออกมา ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ โดยกลไกการดื้อต่อยาชนิดนี้จะมียีน *bla*I และ *bla*R1 ควบคุมการออกฤทธิ์ยีน *bla*Z ในการสร้างเอนไซม์ penicillinase ยีนเหล่านี้จะอยู่ในทรานสโพซอน Tn552 (Tn552-like transposon) หรืออยู่บนพลาสมิด (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)

Penicillinase-resistant penicillin

เป็นยา penicillin กึ่งสังเคราะห์ (Semi-synthetic penicillins) เช่น methicillin, oxacillin และ ampicillin มีโครงสร้างยาที่เหมือนกับยา penicillin (β-lactam ring) แต่ยากลุ่มนี้สามารถทนต่อการถูกทำลายโดยเอนไซม์ penicillinase จึงเรียกในกลุ่มนี้ว่า Penicillinase-resistant penicillin โดยตัวยาจะจับกับบริเวณ active site ของ PBPs และจะยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการ

สังเคราะห์ผนังเซลล์รวมทั้งเอนไซม์ carboxypeptidase และ transpeptidase ส่งผลให้แบคทีเรียหยุดการสร้างผนังเซลล์และตายในที่สุด

โครโมโซมของ MRSA จะมีส่วนพันธุกรรมเคลื่อนที่ที่เรียกว่า SCC*mec* ซึ่งในส่วนพันธุกรรมนี้จะประกอบด้วยยีน *mec*R1 *และ mec*I ทำหน้าที่ควบคุมยีน *mec*A ให้สร้างโปรตีน PBP2a ซึ่งโดยปกติเชื้อ *S. aureus* จะมี PBP เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ และเป็นส่วนที่ยาจะเข้าไปจับเพื่อยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ แต่เชื้อ *S. aureus* ที่มียีน *mec*A จะสร้างโปรตีน PBP2a ขึ้นมาแทนที่โครงสร้าง PBP ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ การสร้างโปรตีน PBP2a เกิดจากการกระตุ้นซึ่งเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และยีน *mec*I และ *mec*R1 จะถูกกระตุ้นเมื่อเชื้อได้สัมผัสกับยาโดยจะควบคุมให้ยีน *mec*A สร้างโปรตีน PBP2a (Brown Derek and Peter Retnold, 1980)

Glycopeptide

ยาในกลุ่ม glycopeptide ที่สำคัญได้แก่ vancomycin และ teicoplanin ยาจะออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยจับเข้ากับส่วนของ D-alanine-D-alanine ซึ่งเป็นส่วนประกอบในการสร้าง peptidoglycan ทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tranglycosylase ในการนำโมเลกุลต้นกำเนิดไปสร้างสาน peptidoglycan ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้

การดื้อต่อยา vancomycin ในเชื้อ *S. aureus* จะมีกลไกการดื้อต่อยาที่แตกต่างกัน 2 แบบคือ Vacomycin Intermediate *Staphylococcus aureus:* VISAแล Vacomycin Resistance *Staphylococcus aureus:*VRSA กลไกการดื้อต่อยาของ VISA คือเชื้อจะจะทำให้โครงสร้างของ D-alanine-D-alanine เพิ่มจำนวนขึ้นส่งผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียหนาขึ้น และทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปในตัวเซลล์ได้ และยีนที่ควบคุมการ แสดงออกของการดื้อต่อยายังไม่ทราบแน่ชัด (Reygaert, 2013) ส่วนสายพันธุ์ VRSA จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลต้นกำเนิดของ peptidoglycan ที่เรียกว่า depsipeptide peptidoglycan ที่ประกอบด้วย D-alanine-D-lactase ให้แทนที่ส่วน D-alanine-D-alanine ส่งผลให้ยา vancomycin ไม่สามารถจับกับเป้าหมายที่เปลี่ยนไปได้ และยีนที่ควบคุมการดื้อต่อยานี้คือยีน *van*A อยู่บนทรานโพซอน Tn1546 โดยมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ligase ทำหน้าที่เชื่อมต่อโมเลกุล D-alanine และ D-lactase ให้กลายเป็น D-alanine-D-lactase โดยสันนิษฐานว่าได้รับยีนนี้มาจากเชื้อ *Enterococcus* spp. (Vacomycin Resistance Enterococci, VRE) (Slade *et al.*, 2009)

Aminoglycoside

ยากลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ Gentamicin, Amikacin, Kanamycin และ Tobramicin โครงสร้างของยาประกอบด้วยหมู่ amino sugar หรือ non-amino sugar อย่างน้อย 2 หมู่ เชื่อมต่อกับ aminocyclitol ring ด้วยพันธะ glycosidic กลไกการออกฤทธิ์คือยับยั้งการสร้างโปรตีนไรโบโซมที่หน่วยย่อย 30S (30S ribosomal subunit) ส่งผลให้ไรโบโซมทำงานผิดปกติ เซลล์ไม่สามารถสร้างโปรตีนได้และตายในที่สุด โดยปกติจะประกอบด้วยอะตอมที่มี 2 ประจุ เช่น แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ดังนั้นยากลุ่ม aminoglycoside เป็นยาที่มีประจุบวกจะเข้าจับกับโมเลกุลที่มีประจุลบในชั้นผนังเซลล์ มีผลให้ยามีอัตราการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น

กลไกการดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycoside ในเชื้อ *S. aureus* จะมีการสร้างเอนไซม์ Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยา โดยการเปลี่ยนหมู่ acetyl ส่งผลให้ยาไม่สามารถจับกับไรโบโซม 30S ได้หรือจับได้น้อยลง เอนไซม์ AME แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ Aminoglycoside Acetyltransferases (AACs) ออกฤทธิ์โดยการทำปฏิกิริยา acetylation กับหมู่ ($-NH_2$) ของยา, Aminoglycoside Phosphotransferases (APHs) ออกฤทธิ์โดยการทำปฏิกิริยา phosphorylation กับหมู่ hydroxyl (-OH) ของยา และ Aminoglycoside Adenyltransferases (AADs) หรือ Aminoglycoside Nucleotidyltransferases (ANTs) ออกฤทธิ์โดยการทำปฏิกิริยา adenylation กับหมู่ hydroxyl (-OH) ของยา

เอนไซม์ AMEs ที่พบได้ในเชื้อมียีนที่ *S. aureus* ส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกันเรียกว่า bifunctional enzyme และมียีนที่ควบคุมกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่

1) AAC (6′)/APH(2″) ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin, Amikacin และ Netilmicin ส่วนยีนที่ควบคุมการออกฤทธิ์คือ *aac* (6′)/*aph*(2″) ซึ่งจะอยู่จับกับส่วนประกอบ IS256 ในทรานโพซอน Tn4001 หรืออยู่บนโครโมโซม

2) APH(3′)-III ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Kanamycin และ Amikacin ส่วนยีนที่ควบคุมการออกฤทธิ์ คือ *aph*(3′)-*IIIa* (*aph*A)

3) ANT(4′,4″)-I ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Neomycin, Kanamycin, Tobramycin และ Amikacin ส่วนยีนที่ควบคุมการออกฤทธิ์คือ *ant* (4′,4″) (*aad*D) (Fatholahzadeh *et al.,* 2009)

Tetracycline

ยากลุ่ม tetracycline ได้แก่ tetracycline, doxycycline และ minocycline มีโครงสร้างพื้นฐานคือวงแหวน hydronaphthacene กลไกการออกฤทธิ์คือ ยาจะเข้าสู่เซลล์และจับกับไรโบโซม 30S ส่งผลให้ tRNA ไม่สามารถรวมตัวกับไรโบโซม เนื่องจาก tRNA เป็นพาหะนำกรดอะมิโนเข้ามา

เพื่อรวมตัวสำหรับสร้างสายโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการแปลรหัส ดังนั้นยากลุ่มนี้จึงมีผลขัดขวางกระบวนการสร้างโปรตีนและการจับตัวกับไรโบโซมชั่วคราว ส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้

กลไกการดื้อต่อยากลุ่ม Tetracycline ในเชื้อ *S. aureus* แบ่งได้เป็น 2 แบบ

1) ขัดขวางการออกฤทธิ์ของยาด้วยวิธี ribosome protection protien (RPP) โดยการสร้างโปรตีน Tet(M) และ Tet(O) เพื่อป้องกันไม่ให้ยาออกฤทธิ์หรือเข้าจับกับตำแหน่งของบนไรโบโซม และยีนที่ควบคุมการออกฤทธิ์ของโปรตีน 2 ชนิดนี้คือ ยีน *tet*M และ *tet*O ตามลำดับ

2) ขับยาออกนอกเซลล์ด้วยวิธี efflux เป็นขบวนการขับยาออกจากเซลล์โดยอาศัยพลังงาน โดยอาศัยการทำงานของโปรตีน tet(K) และ tet(L) ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมียีน *tet*K และ *tet*L ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน โดยส่วนใหญ่จะพบการแสดงออกของยีน *tet*K มากกว่า และตำแหน่งของยีนเหล่านี้จะอยู่บนพลาสมิด pT181

Macrolide, Lincosamide, Streptogramin (MLS)

ยากลุ่ม Macrolide ได้แก่ Erythromycin และ oleandomycin มีโครงสร้างพื้นฐานคือ macrocyclic lactone ring เชื่อมต่อกับโมเลกุลน้ำตาล desosamine และ cladinose ออกฤทธิ์โดยการจับตัวชั่วคราวกับส่วนของ 23S rRNA ซึ่งเป็นส่วนประกอบย่อยของ 50S ไรโบโซม ทำให้ยับยั้งกระบวนการ elongation ในระหว่างการสร้างสายโปรตีน

ยากลุ่ม Licosamide ได้แก่ clindamycin และ lincomycin มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกับกลุ่ม amino sugar กลไกออกฤทธิ์คล้ายกับกลุ่ม Macrolide คือยับยั้งการสร้างสายโปรตีน

ยากลุ่ม Streptogramin เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันคือ streptogramin A มีโครงสร้างหลักคือ polyunsaturated macrolactone ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ pristinamycin II_A (quinupristin) และ pristinamycin II_B (dalfopristin) และ streptogramin B มีโครงสร้างหลักคือ cyclic hexadepsipeptide ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ pristinamycin II_Aและ pristinamycin II_c ยาที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ quinupristin/dalfopristin ซึ่งออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการสร้างโปรตีน ซึ่งยาสามารถผ่านชั้นผนังเซลล์ได้โดยกระบวนการ passive diffusion และเข้าจับตัวถาวรกับส่วนประกอบย่อยของ 50S ไรโบโซม

กลไกการดื้อต่อยาของกลุ่มยา MLS และยีนดื้อยากลุ่มนี้ที่พบในเชื้อ *S. aureus* คือ *erm*A *erm*B *erm*C โดยยีน *erm*A นอกจากจะทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม MLS แล้วยังทำหน้าที่ร่วมกับยีน *spc* ทำให้เกิดการดื้อต่อยา spectinomycin เนื่องจากทั้ง 2 ยีนอยู่ในทรานโพซอน Tn554 ร่วมกัน ยีน

*erm*B ถูกพบอยู่ในทรานโพซอน Tn 551 บนพลาสมิด pl228 และยีน *erm*C จะอยู่บนพลาสมิด pE194 ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดเล็กที่เรียกว่า small multicopy plasmid ทั้ง 3 ยีนจะมีกลไกการดื้อยาในกลุ่ม MLS ที่ใกล้เคียงกัน โดยการสร้างเอนไซม์ rRNA methylase ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl ที่ตำแหน่งจำเพาะของ 23S rRNA มีผลส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา ส่งผลให้ยาไม่สามารถหาตำแหน่งที่จะออกฤทธิ์ได้

กลไกดื้อต่อยาของยากลุ่มนี้อีกแบบ คือ สร้างโปรตีนที่สามารถขับยาออกนอกเซลล์ด้วยวิธี efflux และยีนที่ควบคุมกลไกนี้คือยีน *msr*A ซึ่งส่วนใหญ่กลไกดื้อยานี้มักจะเกิดขึ้นในกลุ่มยา macrolide และ streptogramin B (Piatkowska *et al*., 2012)

Chloramphenicol

chloramphenicol มีกลไกออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยยาจะจับตัวชั่วคราวกับเอนไซม์ peptidyltransferase ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ 50S ribosomal โดยเอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่สร้างพันธะเปปไทด์ระหว่างเกิดขบวนการ transpeptidation ในการสร้างสายโปรตีนและส่งผลให้เชื้อหยุดการสังเคราะห์โปรตีน

กลไกการดื้อต่อยากลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเกิดจากยีน *cat* ที่อยู่บนพลาสมิด pC221 โดยจะสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) โดย การเติมหมู่ acyl ซึ่งได้มาจาก coenzyme A เข้าไปในโครงสร้างของยาในตำแหน่งของหมู่ hydroxyl โดยขบวนการ acetylation มีผลส่งผลให้ยาไม่สามารถเข้าจับกับไรโบโซม 50S (Shaw and Brodsky, 1968)

Fluoroquinolone

ยากลุ่มนี้เกิดจากการดัดแปลงโครงสร้างของยา nalixidic acid และยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ciprofloxacin, norfloxacin, sparfloxacin และ ofloxacin มีกลไกการออกฤทธิ์คือ ยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของ DNA ในแบคทีเรีย

DNA gyrase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คลายตัวสาย DNA เพื่อให้เซลล์สร้างโครโมโซมชุดใหม่ ในระหว่างการแบ่งตัว เป้าหมายของยากลุ่มนี้ คือ หน่วยย่อย A (GyrA) และ B (GyrB) ควบคุมการสร้างโดยยีน *gry*A และ *gry*B ตามลำดับ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ DNA gyrase ทำหน้าที่ในขบวนการ replication และ transcription โดยยาจะยับยั้งขั้นตอนที่เอนไซม์จับตัวอยู่กับสาย DNA ส่งผลให้ DNA ไม่สามารถเกิดการแบ่งตัว

topoisomerase IV ทำหน้าที่แยกโครโมโซมลูกทั้ง 2 โครโมโซมภายหลังจากการแบ่งตัวของ DNA แล้ว เอนไซม์นี้มีโครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อย A (GrlA) และ B (GrlB) ควบคุมการสร้างโดยยีน *grl*A และยีน *grl*B ส่วนเป้าหมายของยาในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ ยังไม่ทราบชัดเจน กลไกการดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ แบ่งได้ 2 กลไก คือ

1) เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV ส่งผลให้โครงสร้างเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ไม่สามารถจับกับตำแหน่งเป้าหมายได้ ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *gyr*A (DNA gyrase) และอาจพบการกลายพันธุ์ของยีน *grl*A ร่วมด้วย

2) การขับยาออกนอกเซลล์ด้วยวิธี efflux เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *nor*A ที่ควบคุมการสร้างระบบ efflux (Nakamura, 1997; Rasha *et al*., 2012)

Rifampin

จัดเป็นยาในกลุ่ม rifamycin เป็นยากึ่งสังเคราะห์โดยมีโครงสร้างเป็น chromophoric naphthoquinonone หรือ naphthohydroquinonone ring ยาชนิดนี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) แกรมบวกได้หลายชนิดรวมถึงเชื้อสายพันธุ์ MRSA โดยมีกลไกเข้าจับตัวกับ β-subunit ของเอนไซม์ RNA polymerase และยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ในการสร้างสาย mRNA ในระหว่างขบวนการถอดรหัส ทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์ผิดปกติและเชื้อจะตายลง

กลไกการดื้อยา Rifampin ที่สำคัญคือยีน *rpo*B ที่อยู่บนพลาสมิด RN4220 เกิดจากการกลายพันธุ์ที่บริเวณ resistance-determining (Rif) ซึ่งจะทำหน้าที่ยับยังการสร้างเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้ยาไม่สามารถเข้าจับตัวได้ (Damon *et al*., 1998)

Linezolid

เป็นยาในกลุ่ม oxazolidinone จัดเป็นยาสังเคราะห์ มีกลไกออกฤทธิ์โดยการสร้างโปรตีนไปขัดขวางการเข้ารวมตัวของหน่วยย่อย 30S ribosomal กับสาย mRNA ในขั้นตอนการแปลรหัส ยามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่รวมถึงเชื้อสายพันธุ์ MRSA

กลไกการดื้อยา linezolid ยังไม่เป็นทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าเกิดมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *cfr* ที่อยู่บนพลาสมิด pSCFS7 ซึ่งทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ Cfr methyltransferase ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยาในส่วนที่จับกับ 50S peptidyl transferase center (PTC) ทำให้ยาไม่สามารถหาเป้าหมายในการเข้าจับได้ (Locke *et al*., 2014)

Sulfonamide และ Trimethoprim

ยากลุ่ม sulfonamide เกิดจากดัดแปลงโครงสร้าง sulfanilamide และที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน คือ Sulfamethoxazole (SMX) โดยใช้ร่วมกับยา Trimethoprim (TMP) หรือ Co-trimoxazole กลไกการออกฤทธิ์คือรบกวนการสังเคราะห์กรดโฟลิกที่ใช้ในการสร้างกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย โดยกลุ่มยา Sulfonamide มีสูตรโครงสร้างที่คล้าย Para-aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดโฟลิก ในภาวะปกติ PABA จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Dihydropteroate synthetase (DHPS) ได้เป็นสาร Dihydropteroate (DHP) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น Dihydrofolate (DHF) และ Tetrahydrofolate (THF) ตามลำดับ สาร T กลไกการออกฤทธิ์ของยา sulfonamide จะเข้าแทนที่ PABA และทำปฏิกิริยากับ DHPS ส่งผลให้ยับยั้งการสร้าง DHP ส่วนยา Trimethoprim จะมีโครงสร้างคล้ายกรดนิวคลีอิกชนิด pyrimidine และออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Dihydofolate (DHF) ส่งผลยับยั้งการเปลี่ยน DHF เป็น THF ดังนั้นยาทั้ง 2 ชนิดจึงออกฤทธิ์เสริมกันยับยั้งการสร้างกรดโฟลิก

กลไกการดื้อต่อยา sulfamethoxazole เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *dhps* ที่ควบคุมการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ DHPS มีผลส่งผลให้ตัวยาจับกับ PABA ไม่ได้หรือจับได้น้อยลง และกลไกดื้อต่อยา Trimethoprim เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *dfr*A ที่อยู่บนพลาสมิด pSK1 โดยจะควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR มีผลส่งผลให้ยาไม่สามารถจับกับ DHFR หรือจับได้น้อยลง (Young *et al*., 1987)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 1 ยีนควบคุมกลไกการต่อการดื้อยาต่างๆของ *S. aureus*

Antimicrobial agent	**Product and Mechanism of resistance**	**Gene**	**Gene location**
β-lactam			
Peniciilin	- β-lactamase; hydrolysis of β-lactam ring	*bla*Z	Tn552 Transposon,
Methicillin	- Penicillin-binding protein (PBP2a); Low-affinity PBP	*mec*A	SCC*mec* element
Oxacillin			Plasmid
Glycopeptide	-VISA D-alanine-D-alanine; cell wall thicken	unknown	
Vancomycin	-VRSA, D-ala-D-lac ligase; modified target	*van*A	Tn1546 Transposon
Aminoglycoside	-Aminoglycoside-Modifying enzymes (AMEs)		
Gentamicin	AAC(6')/APH(2") } bifunctional enzyme of drug inactivation	*aac* (6′)/*aph*(2″)	Plasmid and
Kanamycin	APH(3')-III	*aph*(3')-*IIIa* (*aph*A)	Chromosome
Amikasin	ANT(4',"4)-I	*ant*(4',4") (*aad*D)	
Co-trimoxazole	Target enzyme modification		
Trimethoprim	-S1 Dihydrofolate reductase; reduced affinity	*dfr*A	Chromosome
Sulfamethoxazole	-pABA to bind but has greatly reduced binding of sulfamethoxazole	*dhps*	
Macrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS)			Chromosome
Erythromycin	-rRNA methylase; Methylation of ribosome- modifed target and decreased binding	*erm*A, *erm*B, *erm*C	
Clindamycin	-Active efflux	*msr*A	
Streptogramin			
Chloramphenicol	-chloramphenicol acetyltransferase; Acetylation of drug-inactivation	*cat*	Plasmids
Tetracycline			
Tetracycline	-Active efflux	*tet*K, *tet*L	pT181 plasmid
Minocycline	-ribosome protection protien; competitive binding	***tet*M, *tet*O**	SCC*mec* Type III
Fluoroquinolone			
Ciprofloxacin	-Modified target – gyrase	*gyr*A	Chromosome
Norfloxacin	-Modified target – topoisomerase IV	*grl*A	
	-Active efflux	*nor*A	

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 1 ยีนควบคุมกลไกการต่อการดื้อยาต่างๆของ *S. aureus* (ต่อ)

Antimicrobial agent	Product and Mechanism of resistance	Gene	Gene location
Rifamycin		*rpo*B	
Rifampin	Mutations in the rifampin resistance-determining (Rif) regions of the *rpo*B gene and alterations in the target of rifampin		RN4220 Plasmid
Oxazolidinone			pSCFS7 plasmid
Lizolid	structural alterations to the oxazolidinone binding site in the 50S peptidyl transferase center (PTC)	*cfr*	

ดัดแปลงมาจาก Reygaert, W.C. (2013) **Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*.** In: Méndez-Vilas, A. (ed.) Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. p.297–305.

การวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus*

การวินิจฉัยแยกเชื้อ *S. aureus* เป็นสิ่งสำคัญที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลทุกแห่งจำเป็นต้องทำการวินิจฉัยให้ได้ เนื่องจากเป็นเชื้อที่ก่อปัญหาทางการแพทย์อย่างมาก โดยขั้นตอนการทดสอบที่ใช้ในการจำแนกเชื้อมีดังนี้

การเก็บสิ่งสิ่งส่งตรวจ (specimen)

เก็บสิ่งสิ่งส่งตรวจจากรอยโรคบริเวณต่างๆ ได้แก่ ฝี หนอง แผลน้ำร้อนลวกหรือไฟไหม้ รวมทั้ง แผลผ่าตัด ปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ เสมหะจากผู้ป่วยโรคปอดบวม อุจจาระหรือสิ่งอาเจียนจากผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ เลือดจากผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด รวมทั้งสิ่งสิ่งส่งตรวจป้ายจากรูจมูก (nasal swab)

การจำแนกเชื้อ *S. aureus* ออกจากเชื้อกลุ่มอื่น

1) การย้อมแกรม ทดสอบการติดสีและรูปร่างของเชื้อ โดยถ้าเป็นเชื้อแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน-ม่วงของ crystal violet รูปร่างกลมเรียงตัวกันคล้ายพวงองุ่น (gram positive cocci in grape-like cluster)

2) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase โดยหยด H_2O_2 3% ลงบนสไลด์ และเขี่ยเชื้อมาผสมลงในสไลด์ สังเกตการเกิดฟองแก๊สที่เกิดขึ้น ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นคือผลบวก แสดงว่าเชื้อมี

การสร้างเอนไซม์ catalase โดยการเปลี่ยน H_2O_2 เป็นออกซิเจนและน้ำ ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นคือผลลบ

3) ทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลแมนิทอลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol salt agar (MSA) ที่มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือน้ำตาลแมนิทอล และมี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ และมีเกลือ NACl ในปริมาณที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ โดยเชื้อ *S. aureus* มีความสามารถทนเกลือได้ดี และนอกจากนี้ยังสามารถหมักย่อยน้ำตาลแมนิทอลให้เป็นกรด จึงเปลี่ยนสีของ phenol red จากสีแดงเป็นสีเหลือง และเกิดโคโลนีสีเหลืองทองบนอาหาร MSA

4) การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (β - haemolysis) บนอาหาร blood agar (BA) โดยดูจากลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร โดยโคโลนีจะมีขนาดเล็ก นูน ขุ่น สีครีม เกิดวงใส (clear zone) รอบ ๆ
โคโลนี

5) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ของเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ของเชื้อ (bound form หรือ clumping factor) และชนิดที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 ชนิด คือ

5.1) slide coagulase เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ชนิดที่เกาะอยู่ผนังเซลล์ของเชื้อ โดยทำการหยดพลาสมาลงบนสไลด์ จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบมาผสมให้เข้ากัน ผลบวกจะพบการเกาะกลุ่ม (agglutination) ของเชื้อ และผลลบจะไม่พบการเกาะกลุ่มของเชื้อ อย่างไรก็ตามควรนำเชื้อที่ให้ผลลบไปทดสอบยืนยันด้วยการทดสอบ tube coagulase เนื่องจากพบว่าเชื้อ *S. aureus* ประมาณ 15% จะไม่มีการสร้างเอนไซม์ coagulase ชนิดที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์แต่จะสร้างเฉพาะชนิดที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์เท่านั้น

5.2) tube coagulase เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ชนิดที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ โดยเอนไซม์จะเปลี่ยน fibrinogen ให้เป็นก้อน fibrin (fibrin clot) ทำการทดสอบโดยการเขี่ยโคโลนีเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีพลาสมาปริมาณ 0.3-0.5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่ 35 °C นาน 4 ชั่วโมง ผลบวกจะเกิดการจับกันเป็นของก้อน fibrin ผลลบจะไม่เกิดการจับเป็นก้อน ทั้งนี้ถ้าได้ผลเป็นลบควรบ่มต่ออีก 18 ชั่วโมง เพราะการบ่มที่ 4 ชั่วโมง อาจให้ผลลบลวง (false negative) อย่างไรก็ตามพลาสมาที่นำมาทดสอบ ควรใช้พลาสมาที่มาจากกระต่าย (rabbit plasma) ที่มีสาร EDTA (ethylene diamine tetra acitat) ซึ่งเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant)

นอกจากนี้การทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ยังสามารถจำแนกเชื้อ *S. aureus* ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ coagulase-positive *S. aureus* และ coagulase-negative *S. aureus* (CNS)

การวินิจฉัยการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีการทางฟีโนไทป์

ภายหลังจากวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อ *S. aureus* โดยการทดสอบทางชีวเคมีแล้ว จะต้องทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (Susceptibility testing) หรือเป็นการทดสอบทางฟีโนไทป์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้สำหรับการตรวจสอบเชื้อดื้อต่อยาโดยอาจมีการปรับเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งผลให้เชื้อมีการแสดงออกมากขึ้น การทดสอบความไวของเชื้อมีด้วยกันหลายวิธี โดยสามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยมีวิธีหลักอยู่ 2 รูปแบบ คือ broth dilution susceptibility test และ agar diffusion test

Agar disc diffusion

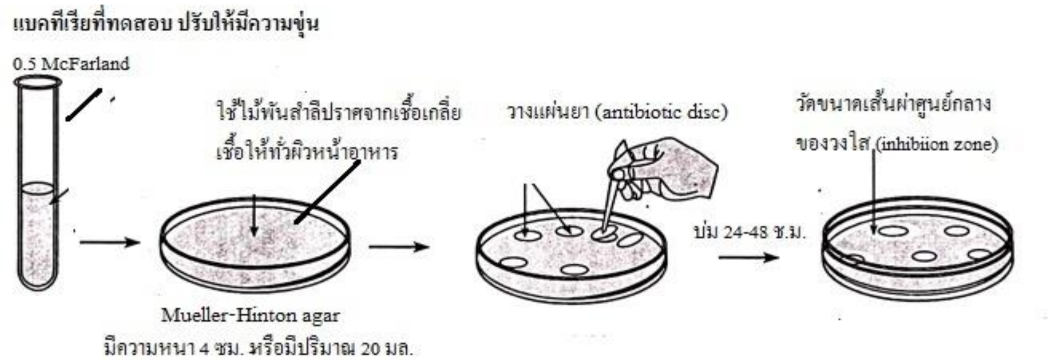
Disc diffusion test (ภาพที่ 3) เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพสามารถบอกผลได้ว่า เชื้อมีความไวต่อยาที่ทดสอบหรือไม่ หลักการทั่วไปคือ ให้เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยปรับให้เชื้อให้มีความขุ่น 0.5 McFarland หรือมีเชื้อปริมาณ 1×10^8 CFU/ml แล้วนำเชื้อไปกระจายให้ทั่วจานอาหาร Mueller-hinton agar ผสมกับ 2 % NaCl จากนั้นให้นำแผ่นยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบมาวางบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆแผ่นยา เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของแผ่นยากับค่า inhibition zone ของสารมาตรฐานที่กำหนดโดย Clinical laboratory standards institute(CLSI) (Brown *et al*., 2005; CLSI, 2015)

Minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution test

เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ภาพที่ 4) หลักการโดยทั่วไปคือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Mueller hinton broth + 4 % NaCl) ซึ่งมียาในความเข้มข้นต่างๆกันผสมอยู่ และสังเกตการเจริญของเชื้อ การอ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่า หรือ อาจใช้สารบางอย่างที่สามารถชี้ให้เห็นการเจริญของเชื้อได้ เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้นโดยอาจทำการทดลองโดยใช้สาร Phenol red ร่วมกับ 10% glucose โดยหากมีเชื้อเจริญจะเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีส้มเหลืองได้ จากนั้นให้เปรียบเทียบค่า MIC ของยาที่ทดสอบกับค่า MIC ของสารมาตรฐานที่กำหนดโดย CLSI (Andrew, 2001; Brown *et al*., 2005; CLSI, 2015)

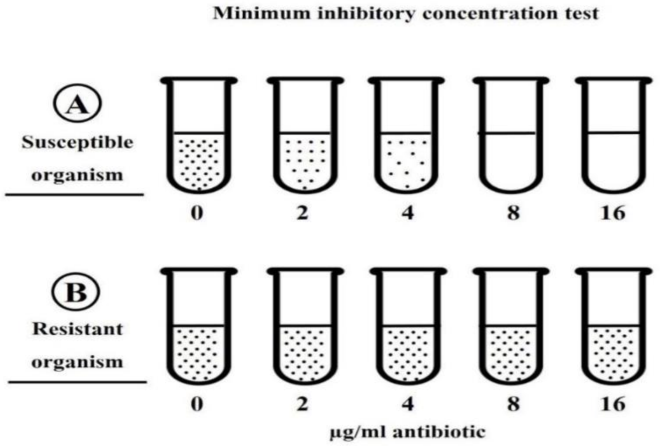
การตรวจสอบความไวและการดื้อต่อยาเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างมากต่อการตัดสินใจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมต่อการรักษา ดังนั้นการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อทำการรักษาขึ้นอยู่กับผลการ

ทดสอบความไวต่อยา ที่ให้ผลในการลดหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งถ้ายาต้านจุลชีพชนิดใดมีความไวต่อตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย แสดงว่ายาชนิดนั้นเหมาะสมต่อการรักษา



ภาพที่ 3 Agar Diffusion Test

ดัดแปลงมาจาก Manisha Garg (2016) Top 4 Tests for Antimicrobial Drug Susceptibility,[online] http://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/top- .4-tests-for-antimicrobial-drug-susceptibility/55863



ภาพที่ 4 Minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution test

ดัดแปลงมาจาก Manisha Garg (2016) Top 4 Tests for Antimicrobial Drug Susceptibility,[online] http://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/top-4-tests-for-antimicrobial-drug-susceptibility/55863

การวินิจฉัยการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล หรือวิธีทางจีโนไทป์

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ หรือวิธีการทางฟีโนไทป์ เป็นวิธีที่ใช้เวลาในการทดสอบที่นานและบางวิธีต้องใช้ความชำนาญในการทดสอบ ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีทดสอบทาง ชีวโมเลกุลซึ่งเป็นการตรวจหาลักษณะทางจิโนไทป์ของเชื้อซึ่งจะมีความจำเพาะมากกว่า และเป็นการช่วยยืนยันผลการดื้อยาได้อีกทางหนึ่ง

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการทางชีวโมเลกุลมาใช้ทดสอบการดื้อยากันมากขึ้น เนื่องจากสามารถแยกเชื้อดื้อต่อยาได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่นาน ทำให้สามารถตรวจสอบติดตาม ควบคุมและป้องกันโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้มีการศึกษาจำนวนมากที่ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* โดยส่วนมากจะมุ่งเน้นไปที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบทางฟีโนไทป์ของการดื้อต่อยา และในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกที่จะใช้วิธี PCR ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย และยังเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อ *S. aureus* (CLSI, 2015) โดยเทคนิค PCR จะเป็นการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมที่สนใจภายในหลอดทดลอง ทำให้สามารถตรวจสอบผลได้รวดเร็วกว่าหลายวิธี อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR ถือเป็นเทคนิคพื้นฐานหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบยีนดื้อยาหลายๆชนิดในครั้งเดียวกันหรือที่เรียกว่า Multiplex PCR ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก ประโยชน์ของเทคนิค PCR ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค การตรวจหายีนก่อมะเร็ง และการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพ เป็นต้น ซึ่งประโยชน์ของเทคนิค PCR ทางการแพทย์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกัน และรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่ จาก ดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย และใช้เวลาน้อย สำหรับหลักการเทคนิค PCR ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากสายดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) หนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase ในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส และ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่

เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ขั้นแรก คือ denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง (92-95 °C) ขั้นที่สอง คือ annealing จะลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับ เบสเป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง (37-60°C) จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นที่ 3 คือ extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนสายดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 °C จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) ดังนั้นเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มากมาย (Frank Stephenson and Maria Abilock, 2012)

สำหรับการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบยีนดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. aureus* นั้น มีหลักการดังนี้ โดยทำการสกัด DNA ทั้งจีโนมของเชื้อแบคทีเรีย และนำมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีนดื้อยาต่างๆ เช่น ยีน *mec*A ซึ่งเป็นยีนที่นำรหัสโครงสร้าง PBP2a มีผลทำให้เชื้อนั้นดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam หรือยีน *fem*A ที่เป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อ staphylococci และมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงของยีนดื้อยาอีกด้วย นอกจากนี้ยีนดังกล่าวเหล่านี้จะมีความแตกต่างหลากหลายกัน (polymorphism) ในขนาด DNA ในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นเทคนิค PCR นอกจากจะใช้ในประโยชน์ในการตรวจหายีนดื้อยา และยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีเทคนิค Multiplex-PCR (m-PCR) ซึ่งเป็นเทคนิค PCR อีกแบบหนึ่งซึ่งเป็นการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันโดยไพรเมอร์แต่ละคู่ ต้องไม่มี complementary กัน และเมื่อนำไปทำ PCR จะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวที่แตกต่างกัน การทำ multiplex PCR ต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมกับปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA จากทุกไพรเมอร์ให้เท่ากัน จากนั้นจะทำการตรวจหา PCR product โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยก DNA บน agarose gel (Gel electrophoresis) นำมาเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน (DNA marker) จากนั้นย้อมด้วยสี ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยผ่าน UV สำหรับ PCR product ที่ดีควรเห็นชิ้นดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และ วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, 2553)

สำหรับตัวอย่างการศึกษาที่ใช้วิธีการทางฟีโนไทป์ควบคู่กับวิธีการทางจีโนไทป์ในการตรวจสอบการดื้อต่อยาของเชื้อ *S. aureus* เช่น รณภัทร สำเภา และ องอาจ เลาหวินิจ (2557) ได้ใช้เทคนิค PCR ยืนยันการดื้อต่อยาของเชื้อในกลุ่ม MRSA ที่แยกได้จากสุนัข โดยหายีน *mec*A ซึ่งสามารถแยกเชื้อ *S.aureus* ได้ทั้งหมด 99 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบ disc diffusion พบว่าดื้อต่อยา methicillin 18 ตัวอย่าง หลังจากนั้นนำไปยืนยันโดยเทคนิค PCR เพื่อหายีน *mec*A แต่กลับพบยีน

*mec*A เพียง 16 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่า เทคนิค disc diffusion มีข้อเสียที่ส่งผลให้เกิดผล false positive ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหายีนดื้อยาเพื่อยืนยันผลการดื้อต่อยา (รณภัทร สำเภา และ องอาจ เลาหวินิจ, 2557)

เนติลักษณ์ ตันทวุทธ และคณะ (2559) ได้พัฒนาวิธี Multiplex-PCR เพื่อลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. aureus* รวมทั้งตรวจหายีนดื้อยา methicillin และ MLS_B ได้อย่างรวดเร็ว โดยศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้วิธี multiplex-PCR กับผลการวินิจฉัย และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธีดั้งเดิมซึ่งจากการทดสอบพบว่ายีน *fem*A *mec*A *erm*A *erm*B และ *erm*C มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย และแสดงผลไปในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คิดเป็นร้อยละ 100 (เนติลักษณ์ ตันทวุทธ และคณะ, 2559)

Murakami และคณะ (1991) ได้ตรวจสอบหายีน *mec*A ด้วยวิธี PCR เปรียบเทียบกับค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilluion ผลการทดลองพบว่า MSSA 100% ไม่พบยีน *mec*A และ 98% ไวต่อยา Oxacillin และตรวจไม่พบยีน *mec*A และมีจำนวน 3 ตัวอย่างที่มียีน *mec*A แต่มีความไวต่อยากลุ่ม β-lactams ซึ่งอาจเป็นเพราะเชื้อไม่มีการสร้าง PBP2a แต่กลับสร้างเอนไซม์ β-lactamase ออกมาเพื่อย่อยสลายยาแทน (Murakami *et al*., 1991)

Krzysztof และคณะ (2000) ทดสอบหายีนดื้อยา Tetracycline ในเชื้อ MRSA โดยใช้วิธี PCR ในการตรวจหายีน *tet*K, *tet*L, *tet*M หรือ *tet*O โดยในจำนวนทั้งหมด 66 ไอโซเลท พบว่ามี 24 ไอโซเลทที่มียีน *tet*M ยีนเดียว 21 ไอโซเลทที่มียีน *tet*K ยีนเดียว และ 21ไอโซเลท ที่มียีน *tet*K และ *tet*M (*tet*KM) เชื้อทั้งหมดมีค่า MIC ของยา Tetracycline > 8 mg/L. แต่กลับพบว่ามีบางเชื้อที่ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion แล้วพบเชื้อที่ไม่ดื้อต่อยา Tetracycline และให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับวิธี PCR แต่ทว่าผลการทดสอบ MIC และ PCR กลับให้ผลที่สอดคล้องกัน สรุปได้ว่าการทดสอบการดื้อต่อยาต้องใช้ขั้นตอนการตรวจสอบมากกว่าหนึ่งวิธี จึงจะสามารถยืนยันผลการทดสอบได้ (Krzysztof *et al*., 2000)

Duran และ คณะ (2012) ได้เปรียบเทียบรูปแบบการดื้อต่อยา และยีนดื้อยาจากเชื้อ Staphylococci จำนวน 298 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยจากโรงพยาบาลในประเทศตุรกี โดยได้ทำการทดสอบความไวต่อยา และตรวจหายีนดื้อยาด้วยเทคนิค multiplex-PCR สามารถแยกเชื้อ *S. aureus* จำนวน 139 ตัวอย่าง พบว่าดื้อต่อยา methicillin 23 ไอโซเลท (16.5%) แต่กลับตรวจพบเชื้อที่จับกับยีน *mec*A 36 ไอโซเลท (25.9%) มี 53 ไอโซเลท (38.1%) ที่ดื้อต่อยา Gentamicin และพบว่าเชื้อในจำนวนนี้มียีนดื้อยา gentamicin อย่างน้อย 1 ยีน [*aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*] ซึ่งพบว่ามี 17 ไอโซเลทที่มีความไวต่อยา gentamicin แต่กลับตรวจพบยีนดื้อยา gentamicin และในเชื้อจำนวนนี้จะมียีนดื้อยาอย่างน้อย 1 ยีน หรือมากกว่า มี 84 ไอโซเลท

(60.4%) ที่ดื้อต่อยา erythromycin, และในเชื้อจำนวนนี้มียีนดื้อยา Erythromycin (*erm*A, *erm*B, *erm*C and *msr*A) อย่างน้อย 1 ยีนหรือมากกว่า และยังพบว่ามีเชื้อ *S. aureus* 57 ไอโซเลท (41%) ที่ดื้อต่อยา Tetracycline แต่กลับพบเชื้อที่มียีน *tet*K หรือ *tet*M หรือพบได้ทั้งคู่จำนวน 59 ไอโซเลท นอกจากนี้เชื้อ *S.aureus* ส่วนใหญ่จะพบยีน *blaZ* (93.5%). (Duran *et al*., 2012)

Martineau และคณะ (2000) ได้คัดแยกเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermis* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลหลายๆประเทศและนำทดสอบเพื่อตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับยาปฏิชีวนะ ด้วยเทคนิค multiplex-PCR โดยใช้ยีนที่กำกับการดื้อยาแต่ละชนิดดังนี้ oxacillin (*mec*A), gentamicin [*aac* (6 ') - *aph* (2 ")] และ erythromycin (*erm*A, *erm*B, *erm*C และ *msr*A) ผลการทดสอบพบความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยากับความไวต่อยา ซึ่งส่วนใหญ่แสดงความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้ คือ ร้อยละ 98 ดื้อต่อยา oxacillin และตรวจพบยีน *mec*A ร้อยละ 100 ดื้อต่อยา gentamicin และตรวจพบยีน *aac* (6 ') - *aph* (2 ") ร้อยละ 98.5 ดื้อต่อยา erythromycin และตรวจพบยีน *erm*A, *erm*B, *erm*C หรือ *msr*A (Martineau *et al*., 2000)

Zmantar และคณะ (2013) ได้ทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากโพรงจมูกของผู้ป่วยโรงพยาบาลในประเทศลิเบียโดยใช้การหาค่า MIC และใช้เทคนิค multiplex-PCR ในการตรวจหายีนดื้อยาแต่ละชนิด ผลการทดสอบพบว่า เชื้อมีอัตราการดื้อต่อยา oxacillin ร้อยละ 98 และ erythromycin ร้อยละ 97 และสามารถตรวจพบยีนดื้อยาได้ดังนี้ *mec*A (ร้อยละ 6), *bla*Z (ร้อยละ 100), *erm*A (ร้อยละ 15), *erm*B (ร้อยละ 30) , *erm*C (ร้อยละ 22) และ *msr*A (ร้อยละ 36) ชี้ให้เห็นว่าเชื้อส่วนใหญ่มีอัตราการดื้อต่อยาในกลุ่ม macrolide ในระดับสูงและส่วนใหญ่จะพบกลุ่มยีน *erm* ที่กำกับการดื้อยาในกลุ่มนี้เช่นกัน (Zmantar *et al.,* 2000)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

เชื้ออ้างอิง *Staphylococus aureus* ATCC 25923

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Nutrient broth (TM media, India)

2.2 Nutrient agar (TM media, India)

2.3 Mannitol salt agar (TM media, India)

2.4 Mueller-Hinton agar (TM media, India)

3. สารเคมี

3.1 Agar (Mermaid, Thailand)

3.2 Ethanol 70% และ 95% (Merck KgaA, Germany)

3.3 Ethidium bromide (Bio-rad, USA)

3.4 McFarland standard

3.5 Sodium Chloride (NaCl; ChemeX, USA)

3.6 Agarose gel powder 1.0% (W/V) (Vivantis, USA)

3.7 Glycerol 20%

3.8 Phosphate buffer saline (PBS)

3.9 Hydrochoric acid (HCl; Mallinckrodt, USA)

3.10 Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$; Univar, Australia)

3.11 Potassium chloride (KCl; Renkem, india)

3.12 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4; Univar, Australia)

3.13 Potassium dihydrogen phosphate trihydrate ($K_2HPO_4.3H_20$;)

3.14 Sodium hydroxide (NaOH; Alpha, India)

3.15 Sodium phosphate dibasic heptahydrate ($Na_2HPO_4.7H_2O$; Unilab, Australia)

4. ยาต้านจุลชีพ

4.1 Vancomycin powder 30 µg (Oxoid, England)

4.2 Oxacillin powder 1 µg (Himedia, India)

4.3 Cefoxitin disc 30 µg (Himedia, India)

4.4 Chloramphenical disc 30 µg (Himedia, India)

4.5 Tetracycline disc 30 µg (Himedia, India)

4.6 Penicillin disc 10 unit (Himedia, India)

4.7 Erythromycin disc 15 µg (Himedia, India)

4.8 Trimethoprim/Sulfamethoxazole disc 25 µg (Oxoid, England)

4.9 Gentamicin disc 10 µg (Himedia, India)

4.10 Clindamycin disc 2 µg (Himedia, India)

4.11 Linezolid disc 30 µg (Oxoid, England)

4.12 Ciprofloxacin disc 25 µg (Himedia, India)

5. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

5.1 จานเพาะเชื้อ (Petridish) (Sterilin,UK)

5.2 บีกเกอร์ (Beaker) (SCHOTT,Germany)

5.3 หลอดทดลอง (Test tube) (Pyrex,USA)

5.4 ขวดแก้ว 500 และ 250 ml (Duran, Germany)

5.5 ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (ป้ายเชื้อ)

5.6 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

5.7 Microscope (Nikon,Japan)

5.8 แผ่นสไลด์ (Pearl,China)

5.9 ขวดรูปชมพู่ 500 และ 125 ml (Erlenmeyer flask)(SCHOTT,Germany)

5.10 กระบวกตวง (Cylinder)

5.11 Pasture pipette (Hirschmann Laborgerate)

5.12 96 well plate (Corning Incorporated,USA)

5.13 Micropipette (Discovery+,Poland)

5.14 Micropipette Tip (Extragene,USA)

5.15 Incubator (Memmert, Germany)

5.16 Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.17 Autoclave (Kokusan, Japan)

5.18 Refrigerator (Sanyo, Japan)

5.19 Hot air oven (Memmert)

5.20 เครื่องชั่งสาร (Denver Instrument, USA)

5.21. Laminar airflow (Ehret)

5.22. Centrifuge (Hettich Zentrifugen Micro 22R,Germany)

5.23. Centrifuge tube (Extragenr,USA)

5.24. Vortex mixer (Vision Scientific)

5.25. 96 well plate (Corning Incorporated,USA)

5.26. Micropipette (Discovery+,Poland)

5.27. Micropipette Tip (Extragene,USA)

5.28. Gel electrophoresis (Biorad,Horizon)

6. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder)

100 bp Ladder (Biolabs, England)

การเก็บตัวอย่าง การเพาะเลี้ยงเชื้อและการจำแนกเชื้อ *S. aureus*

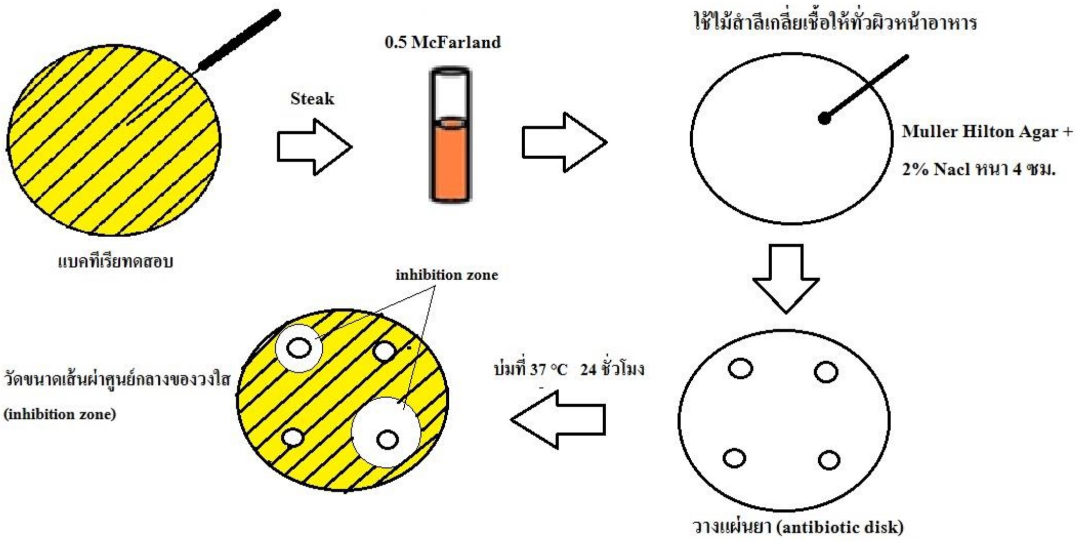
ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐม และทำการเก็บตัวอย่างเชื้อตั้งแต่เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2557 ทั้งนี้ตัวอย่างเชื้อจากสิ่งสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย เช่น เสมหะ, ปัสสาวะ และน้ำไขสันหลัง ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยจุลชีววิทยาคลินิกและตัวอย่างเชื้อที่เก็บสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล เช่น ราวเหล็ก ราวบันไดและตามพื้น ผนังห้อง ภายในแผนกผู้ป่วย ห้องตรวจโรค และห้องพักผู้ป่วย โดยใช้ไม้พันสำลีจุ่มสารละลาย PBS แล้วทำการป้ายเชื้อ (swab) นำตัวอย่างเชื้อทั้งหมดทดสอบด้วยวิธีการทางชีวเคมีในการคัดแยกเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ catalase test, haemolytic test, mannitol fermentation และ coagulase test เชื้อจะถูกเก็บไว้ใน glycerol 20% ที่อุณหภูมิ -20 °C

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

Disc diffusion

สำหรับการทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อยาต้านจุลชีพจะทำตามวิธีมาตรฐานของ *CLSI (*ภาพที่ *5)* โดยทดสอบกับแผ่นยาต้านจุลชีพมาตรฐาน 11 ชนิด (ตารางที่ 3) ได้แก่ Penicillin, Cefoxitin, Erythromycin, Chloramphenicol, Gentamicin, Clindamycin, Rifampin, Ciprofloxacin,

Linezolid, Sulfamethoxazole/Trimethoprim และ Tetracycline ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่จะต้องใช้ในการทดสอบในเบื้องต้น และใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก นำเชื้อทดสอบมาเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเชื้อใส่สารละลาย 0.85% NaCl ปรับความขุ่นเท่ากับ *0.5* McFarland standard (10^{8} CFU/ml) นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อทดสอบนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar + 2% NaCl (มีความหนา 4 เซนติเมตร) ทิ้งไว้ให้แห้ง ใช้ปากคีบแผ่นยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 2) วางบนผิวหน้าอาหาร (ไม่ควรเกิน 5 แผ่น/จาน) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดของเคลียร์โซน (inhibition zone) (บริเวณวงใสรอบแผ่นยาที่ไม่มีเชื้อเจริญ) ที่เกิดจากแผ่นยาแต่ละชนิดเป็นหน่วยมิลลิเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับค่า inhibition zone มาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 2 เพื่อวัดความสามารถของเชื้อที่ทดสอบว่ามีความไว (sensitive; S), กึ่งกลาง (intermediate; I) หรือดื้อ (resistant; R) ต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบและนำมาเขียนเป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยานั้นๆ โดยอ้างอิงจาก CLSI (2015)



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disc Diffusion

ตารางที่ 2 ค่ามาตรฐานความไวและดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion

Antimicrobial agent	**Disc content (μg)**	**Zone diameter (mm)**		
		Resistant	Intermediate	**Sensitive**
Penicillin (P)	10 unit	≤28	-	≥29
Cefoxitin (FOX)	30	≤21	-	≥22
Erythromycin (E)	15	≤13	14–22	≥23
Chloramphenicol (C)	30	≤12	13–17	≥18
Gentamicin (CN)	10	≤12	13–14	≥15
Clindamycin (DA)	2	≤14	15–20	≥21
Rifampin (R)	30	≤16	17-19	≥20
Ciprofloxacin (CIP)	5	≤15	16–20	≥21
Linezolid (Lzd)	30	≤20	-	≥21
Sulfamethoxazole/Trimethoprim (SXT)	25	≤10	11-15	≥16
Tetracycline (T)	30	≤19	15–18	≥14

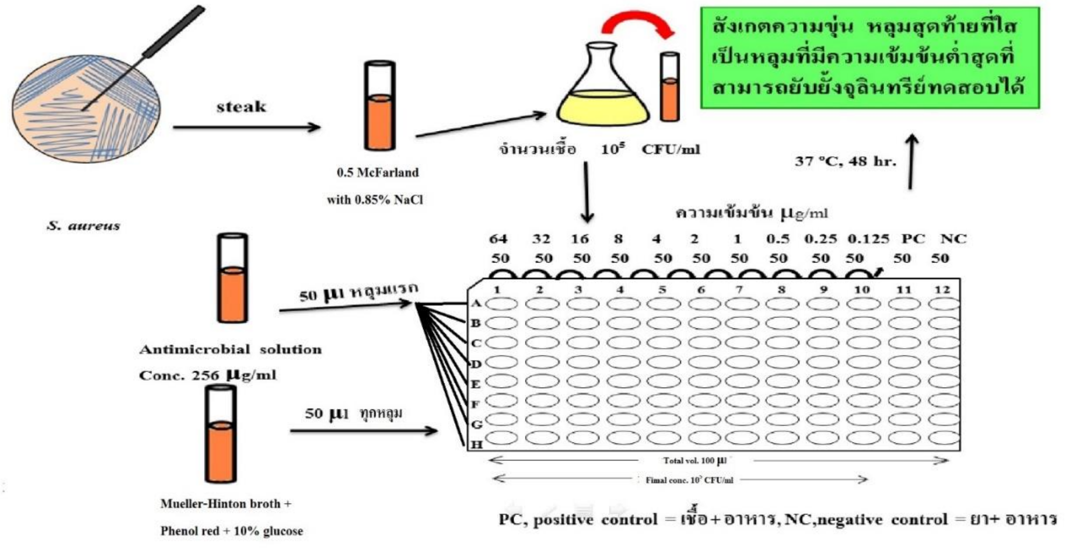
ที่มา Clinical laboratory standards institute (CLSI). (2015). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Third Informational Supplement.** CLSI document M100-S23 (ISBN 1- 56238-865-7).

Minimum inhibitory concentration (MIC) broth dilution test

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา oxacillin และ vancomycin ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ทั้งนี้เพื่อคัดกรองเชื้อ MRSA VISA และ VRSA และใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เป็นเชื้อกลุ่มควบคุมผลบวก (ภาพที่ 6)

เตรียมอาหาร Mueller-Hinton broth + 4% Nacl ลงใน 96 well plate หลุมละ 50 μl ระบุระดับความเข้มข้นของแต่ละหลุม ดังนี้ 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 μg/ml (สำหรับยา oxacillin) และ 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, และ 0.25 μg/ml (สำหรับยา vancomycin) เตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 3) ที่ความเข้มข้น 256 μg/ml (oxacillin) และ 512 μg/ml (vancomycin) จากนั้นใส่ลงในหลุมแรกปริมาตร 50 μl จากนั้นดูดสารละลายที่จากหลุมแรกปริมาตร 50 μl ไปใส่ใน well หลุมที่ 2 จากทำซ้ำเช่นนี้จนถึงหลุมระบุความเข้มข้นสุดท้ายของยาแต่ละชนิด

และให้ดูดสารละลายในหลุมสุดท้ายทิ้งไป 50 µl เตรียมเชื้อ *S. aureus* ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standards (จำนวนเชื้อ 10^8 CFU/ml) ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ใส่เชื้อลงไป 50 µl ทุกหลุม (ยกเว้น negative control) โดยเชื้อในแต่ละหลุมจะมีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^5 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC จากหลุมที่มีความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (หรือหลุมสุดท้ายที่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง) และวิเคราะห์ค่า breakpoint มาตรฐานโดยอ้างอิงจาก CLSI (2015) (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อด้วยวิธี broth microdilution

ตารางที่ 3 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) มาตรฐานด้วยวิธี Broth Microdilution (CLSI, 2015)

ยาต้านจุลชีพ	**MIC (µg/mL)**		
	Sensitive	**Intermediate**	**Resistant**
Oxacillin (OX)	≤2	-	≥4
Vancomycin (VA)	≤2	4-8	≥16

ที่มา Clinical laboratory standards institute (CLSI). (2015). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Third Informational Supplement.** CLSI document M100-S23 (ISBN 1- 56238-865-7).

การตรวจหายีนดื้อยาด้วยเทคนิค PCR และ multiplex-PCR

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอนี้ผู้วิจัยได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Tiago และคณะ (2015) โดยนำเชื้อตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงใน Brain heart broth (BHB) มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,396 g เป็นเวลา 5 นาทีและทิ้งส่วนใสด้านบน (Supernatant) แล้ว*เติม* extraction buffer (200 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 25 mM NaCl, 1% SDS, pH 8.0) ปริมาตร 600 µl วางทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที เติม phenol/chloroform : isoamyl alcohol [1:1 (24:1)] ในอัตราส่วน 1:1 และ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 5 นาที และเก็บส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดใหม่และเติม absolute ethanol ในปริมาณ 2 เท่า เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14549 g เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งส่วนใสทั้งหมดและ ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 x g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสไปและละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl (ph 8.0) ปริมาตร 30 µl จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การตรวจหายีนดื้อยาด้วยเทคนิค PCR และ multiplec-PCR

นำดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้มาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ของยีนที่ควบคุมการดื้อยาซึ่งผู้วิจัยมีความสนใจจะใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหายีน *fem*A (ยืนยันสายพันธุ์ *S. aureus*) และยีน *aac*(6')/*aph*(2'') (ยืนยันการดื้อต่อยา gentamicin) และใช้เทคนิค multiplex-PCR ตรวจหายีนดื้อยา *bla*Z (ยืนยันการดื้อต่อยา penicilin), *mec*A (ยืนยันการดื้อต่อยา methicilin และ oxacillin) *erm*A (ยืนยันการดื้อต่อยา erythromycin) *tet*K และ *tet*M (ยืนยันการดื้อต่อยา tetracycline) ผสมกับส่วนผสมการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR mixture) (แสดงไว้ในตารางภาพผนวกหน้า 90) และสภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่จะแสดงในตารางที่ 5 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยผสมผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ loading dye และตรวจสอบใน 1% (w/v) agarose gel โดยใช้เครื่อง electrophoresis chamber จากนั้นนำ agarose gel ย้อมสีด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอ (band) ของผลิตภัณฑ์ PCR ภายใต้แสง UV เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp DNA ladder และใช้ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น negative control

ตารางที่ 4 ไพร์เมอร์และสภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้ในการทดสอบ PCR และ multiplex

Gene	Primer sequences (5'-3') Forword (F), Reverse (R)	size (bp)	PCR condition	Accession No.	Reference
*fem*A	F : CGATCCATATTTACCATATCA R : ATCACGCTCTTCGTTTAGTT	450	94°C 3 min **30x** [94°C 30s + 48°C 30s + 72°C 30s] 72°C 5 min	CP000255	Neda *et al.*, (2015)
*bla*Z	F : TACAACTGTAATATCGGAGGG R : AGGTTCAGATTGGCCCTTAGG	774	95°C 5 min **30x** [95°C 60s + 50°C 60s + 72°C 60s] 72°C 7 min	X52734	Wilailuckana. (2005)
*mec*A	F : TGTCCGTAACCTGAATCAGC R : TGCTATCCACCCTCAAACAG	519		CP015447	
aac (6')/*aph*(2'')	F: TACAGAGCCTTGGGAAGATG R: CCATTTGTGGCATTATCATCATATC	407	95°C 5 min **30x** [95°C 30s + 57°C 30s + 68°C 60s] 72°C 7 min	AF051917	Ishino *et al.*, (2006)
*erm*A	F : TTCGCAAATCCCTTCTCAAC R : AAGCGGTAAACCCCTCTGA	190	94°C 3 min **30x** [94°C 30s + 55°C 30s + 72°C 30s] 72°C 4 min	X03216	Strommenger *et al.*, (2003)
*tet*K	F : GTAGCGACAATAGGTAATAGT R : GTAGTGACAATAAACCTCCTA	360		S67449	
*tet*M	F : AGTGGAGCGATTACAGAA R : CATATGTCCTGGCGTGTCTA	158		X56353	

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4 ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างและการจำแนกเชื้อ

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 69 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (specimen) เช่น เลือด, เสมหะ, หนอง และจมูก เป็นต้น จำนวน 36 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธีการป้ายเชื้อ (swab) จากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล เช่น ราวเหล็ก ราวบันได และพื้นจำนวน 33 ตัวอย่าง เมื่อนำมาคัดแยกเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีทางชีวเคมี พบว่าสามารถแยกเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยได้จำนวน 31 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่จะแยกได้จากเสมหะของผู้ป่วย (ร้อยละ 41.9) หนอง (ร้อยละ 12.9) และเลือดผู้ป่วย (ร้อยละ 12.9) และตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธีป้ายเชื้อจำนวน 23 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่จะแยกได้จากพื้น (ร้อยละ 30.4) และเตียงภายในห้องผู้ป่วย (ร้อยละ 26) ดังนั้นเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากทั้ง 2 กลุ่มรวมทั้งหมด 54 ไอโซเลท (ตารางที่ 5)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 5 หมายเลขเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (specimen) และตัวอย่างป้ายเชื้อ (swab)

ตัวอย่าง		หมายเลขเชื้อ	สิ่งตรวจผู้ป่วย / ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (ร้อยละ)
ตัวอย่างทั้งหมด (n = 69)	เชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (n = 31)	Sp2, Sp6, Sp9, Sp13, Sp17, Sp19, Sp20, Sp22, Sp23, Sp24, Sp27, Sp29, Sp30	เสมหะ	13 (41.9)
		Sp3, Sp5, Sp21, Sp28	หนอง	4 (12.9)
		Sp4, Sp10, Sp12, Sp26	เลือด	4 (12.9)
		Sp11, Sp16, Sp18	หัวไหล่, รักแร้, แขน	3 (9.7)
		Sp8, Sp7	ขา, เท้า	2 (6.4)
		Sp1	สายสวน	1 (3.2)
		Sp14	จมูก	1 (3.2)
		Sp25	ปัสสาวะ	1 (3.2)
		Sp15	คอ	1 (3.2)
		Sp31	หู	1 (3.2)
	เชื้ออื่นๆที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (n = 5)	Sp34, Sp35	หนอง	2 (6.4)
		Sp32	หลัง	1 (3.2)
		Sp33	เสมหะ	1 (3.2)
		Sp36	เลือด	1 (3.2)
	เชื้อ *S. aureus* ที่แยกตัวอย่างป้ายเชื้อ (n = 23)	Sw2, Sw3, Sw7, Sw8, Sw11, Sw19, Sw20	พื้นภายในห้องผู้ป่วย	7 (30.4)
		Sw1, Sw4, Sw10, Sw12, Sw18, Sw22	เตียงผู้ป่วย	6 (26.1)
		Sw5, Sw13, Sw17, Sw21	พื้นห้องน้ำ	4 (17.4)
		Sw6, Sw14, Sw23	พื้นบันได	3 (13)
		Sw9, Sw15	ราวบันได	2 (8.7)
		Sw16	พื้นทางเดิน	1 (4.3)
	เชื้ออื่นๆที่แยกจากตัวอย่างป้ายเชื้อ (n = 10)	Sw2, Sw5, Sw9, Sw17,Sw23	พื้น	5 (21.7)
		Sw3,Sw16, Sw28	ราวบันได	3 (13)
		Sw6	เตียงผู้ป่วย	1 (4.3)
		Sw18	พื้นห้องน้ำ	1 (4.3)
รวม	เชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ทั้งหมด			54 (78.3)
	เชื้ออื่นๆ ทั้งหมด			15 (21.7)

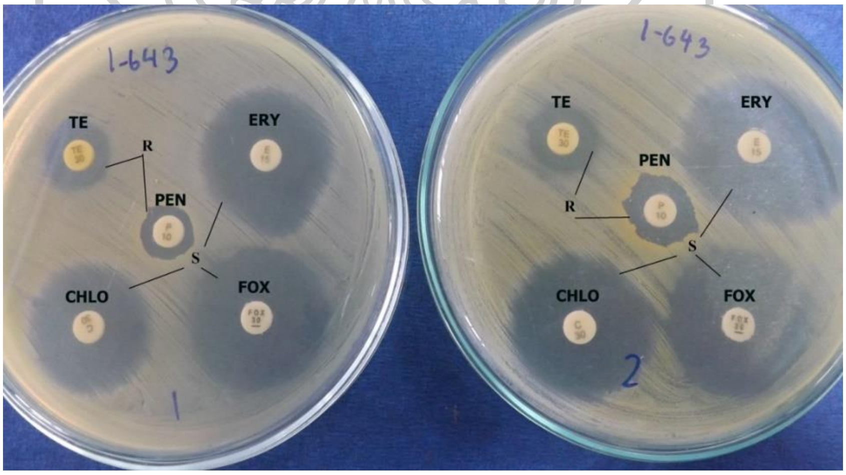
หมายเหตุ Sp (specimen) = ตัวอย่างสิ่งตรวจผู้ป่วย , Sw (swab) = ตัวอย่างป้ายเชื้อ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

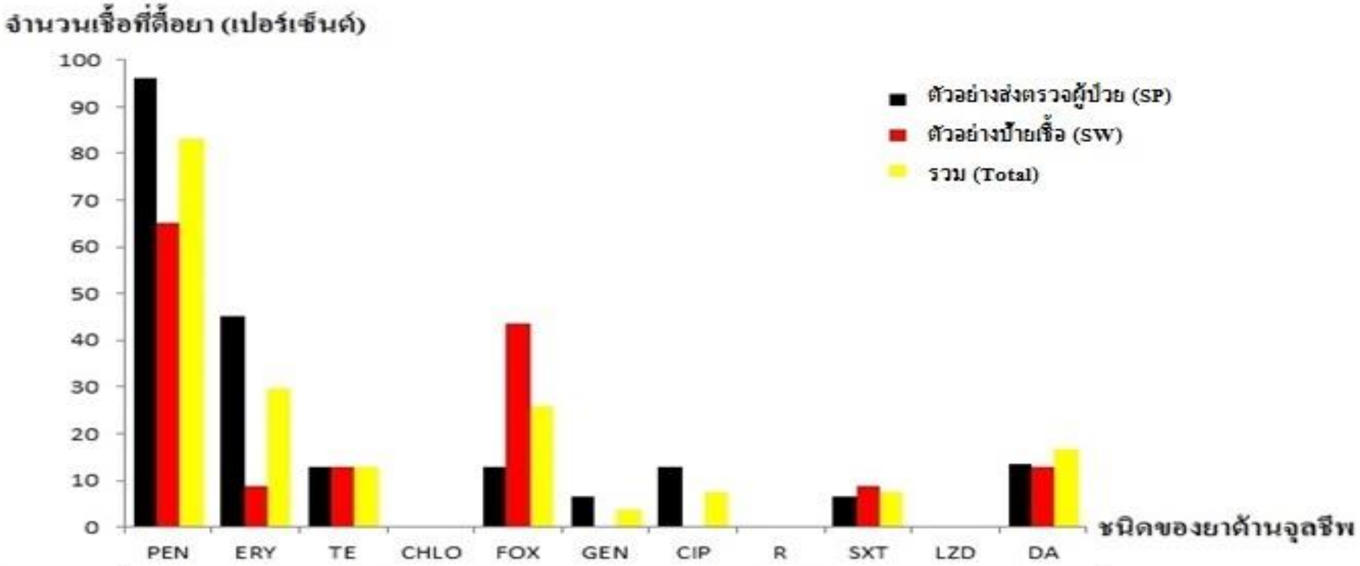
ภาพที่ 7 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อจำนวน 54 ไอโซเลทโดยวิธี disc diffusion (ภาพที่ 8)โดยทดสอบกับแผ่นยาต้านจุลชีพจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ penicillin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol,cefoxitin, gentamicin, ciprofloxacin, rifampin, sulfamethoxazole/trimethoprim, linezolid และ clindamycin

ในส่วนของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย พบว่าทุกไอโซเลทมีความไวต่อยา chloramphenicol, rifampin และ linezolid แต่ดื้อต่อยา penicillin มากที่สุด (ร้อยละ 96) รองลงมา คือ erythromycin (ร้อยละ 45.1) และ clindamycin (ร้อยละ 13.5) ซึ่งในตัวอย่างป้ายเชื้อ พบว่าทุกไอโซเลท มีความไวต่อยา chloramphenicol, gentamicin, ciprofloxacin, rifampin และ linezolid และแสดงออกว่าดื้อต่อยา penicillin มากที่สุด (ร้อยละ 65.2) รองลงมาคือ cefoxitin (ร้อยละ 43.5) และ tetracycline) (ร้อยละ 13) โดยรวมแล้วเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อทุกไอโซเลท มีความไวต่อยา chloramphenicol, rifampin และ linezolid และดื้อต่อยา penicillin มากที่สุด (ร้อยละ 83.3) มีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin และ cefoxitin ในระดับปานกลางและดื้อต่อยา tetracycline, clindamycin, gentamicin และ trimethoprim-sulfamethoxazole ในระดับต่ำ



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี disc diffusion
S; ไวต่อยา R; ดื้อต่อยา

ภาพที่ 8 ผลทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ S. aureus ด้วยแผ่นยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด

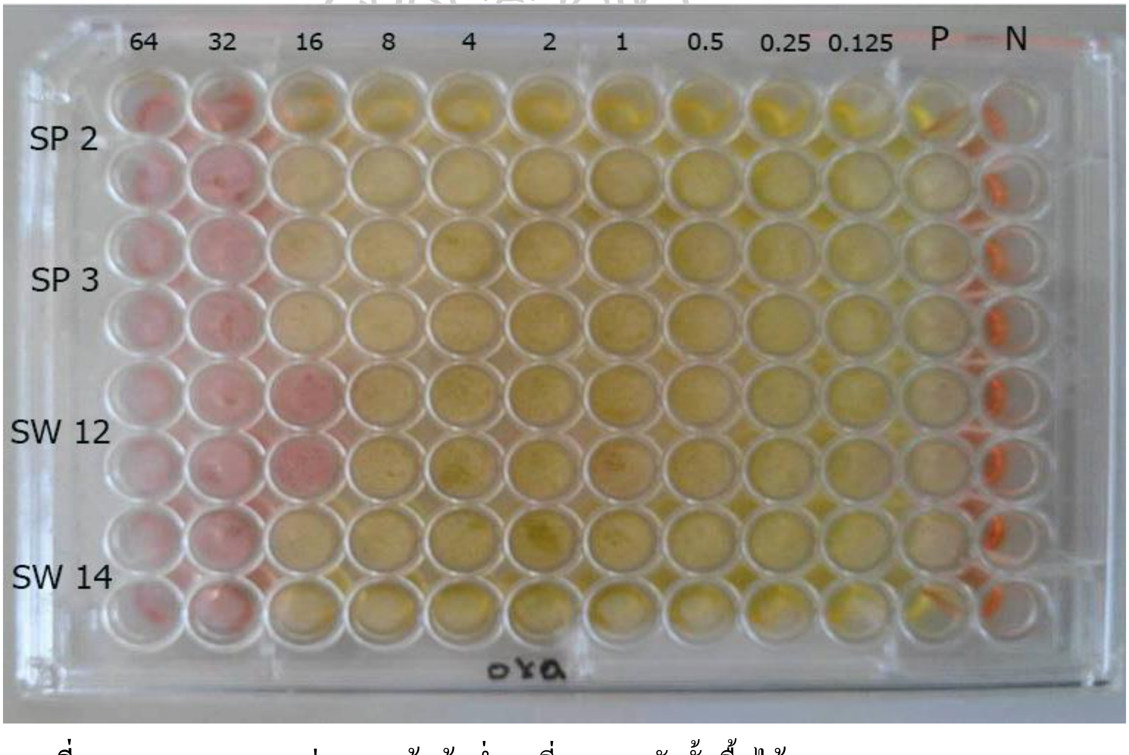


		PEN	ERY	TE	CHLO	FOX	GEN	CIP	R	SXT	LZD	DA
ตัวอย่างส่งตรวจผู้ป่วย (SP)	ไวต่อยา	1	17	27	31	27	29	27	31	29	31	25
	ดื้อต่อยา	30	14	4	0	4	2	4	0	2	0	6
	%ดื้อต่อยา	96.7%	45.1%	12.9%	0%	12.9%	6.4%	12.9%	0%	6.4%	0%	13.5%
ตัวอย่าง swab (SW)	ไวต่อยา	8	21	20	23	13	23	23	23	21	23	20
	ดื้อต่อยา	15	2	3	0	10	0	0	0	2	0	3
	%ดื้อต่อยา	65.2%	8.7%	13%	0%	43.5%	0%	0%	0%	8.7%	0%	13%
รวม SP+SW	ไวต่อยา	9	38	47	54	40	52	50	54	50	54	45
	ดื้อต่อยา	45	16	7	0	14	2	4	0	4	0	9
	%ดื้อต่อยา	83.3%	29.6%	13%	0%	25.9%	3.7%	7.4%	0%	7.4%	0%	16.6%

PEN (penicilin); ERY (erythromycin); TE (tetracycline); CHLO (chloramphenicol); FOX (cefoxitin); GEN (gentamicin); CIP (Ciprofloxacin); R (rifampin); SXT (trimethoprim-sulfamethoxazole);
LZD (linesolid); DA (clindamycin); SP (specimen); SW (swab)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ของยา oxacillin และ vancomycin

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา oxacillin (ภาพที่ 9) และ vancomycin (ภาพที่ 10) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี broth microdilution เพื่อคัดกรองเชื้อ MRSA VISA และ VRSA พบว่าทั้งเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อทุกไอโซเลทมีความไวต่อยา vancomycin ซึ่งมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.25 - 2 μg/ml และมีเชื้อตัวอย่างทั้งหมดร้อยละ 24.1 ที่ดื้อต่อยา oxacillin ซึ่งมีค่า MIC $\geq$ 4 μg/ml โดยเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยส่วนใหญ่ร้อยละ 19.3 จะมีค่า MIC ต่อยา oxacillin ในระดับสูงที่ประมาณ 64->64 μg/ml ในขณะที่เชื้อจากตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 43.5 มีค่า MIC ต่อยา oxacillin มีช่วงการดื้อยากระจายอยู่ในช่วง 8->64 μg/ml (ตารางที่ 6)



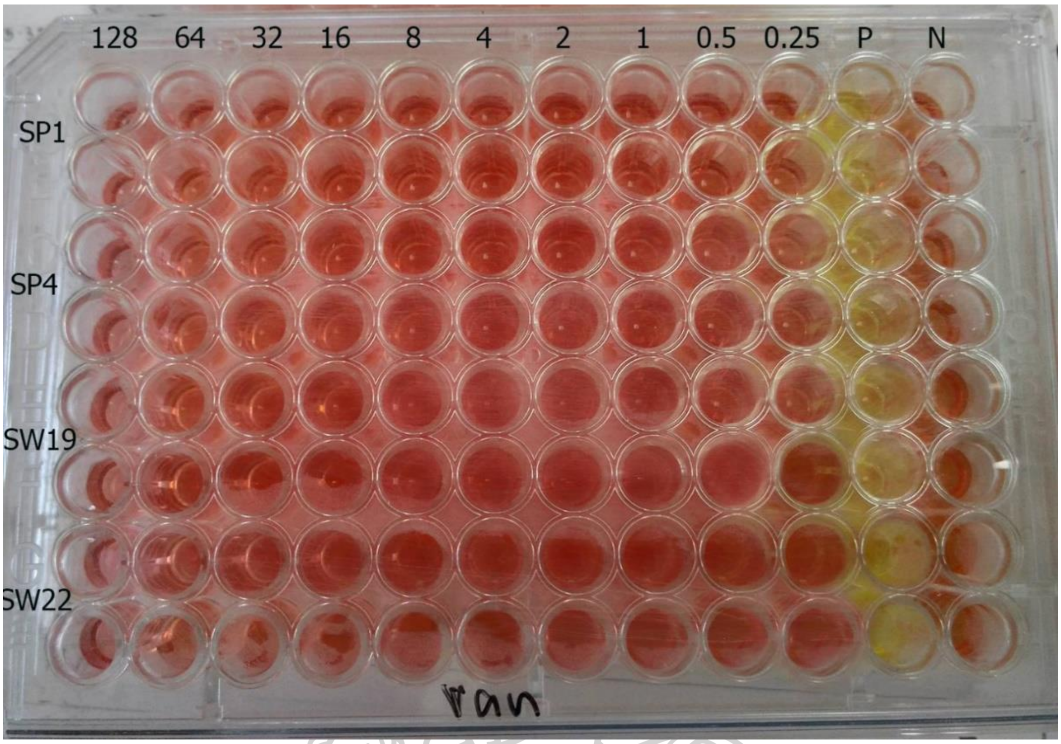
ภาพที่ 9 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของยา oxacillin

P = positive control คือ *S. aureus* ATCC 25923

N = negative control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ

สีเหลือง = ผลบวก คือ เชื้อเจริญ

สีแดง = ผลลบ คือ เชื้อไม่เจริญ



ภาพที่ 10 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของยา vancomycin

P	=	positive control คือ *S. aureus* ATCC 25923
N	=	negative control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ
สีเหลือง	=	ผลบวก คือ เชื้อเจริญ
สีแดง	=	ผลลบ คือ เชื้อไม่เจริญ

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของยา oxacillin และ vancomycin

MIC Conc. (µg/ml)	Oxacillin			Vancomycin		
	ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (n = 31)	ตัวอย่างป้ายเชื้อ (n = 23)	รวม (n =54) (ร้อยละ)	ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (n = 31)	ตัวอย่างป้ายเชื้อ (n = 23)	รวม (n -=54)
0.125	5	3	8 (14.8)	-	-	-
0.25	11	4	15 (27.7)	18	4	22 (40.7)
0.5	6	3	5 (16.6)	7	3	10 (18.5)
1	2	3	9 (9.3)	3	13	16 (29.6)
2	1	3	4 (7.4)	3	3	6 (11.1)
4	-	-	-	-	-	-
8	-	1	1 (1.8)	-	-	-
16	-	2	2(3.7)	-	-	-
32	-	2	2(3.7)	-	-	-
64	2	1	3 (5.5)	-	-	-
>64 หรือ 128	4	1	5 (9.2)	-	-	-

รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

ตารางที่ 7 แสดงรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ พบว่าเชื้อทั้งหมดมีรูปแบบการดื้อต่อยา penicillin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol, cefoxitin, gentamicin, ciprofloxacin, rifampin, sulfamethoxazole/Trimethoprim, linezolid, clindamycin และ oxacillin ตามลำดับ ทั้งหมด 22 รูปแบบ โดยเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยมีรูปแบบการดื้อต่อยา 13 รูปแบบ ซึ่งพบว่ามีส่วนใหญ่จะมีรูปแบบที่ดื้อต่อยา penicillin ชนิดเดียว (รูปแบบที่ 1) มากที่สุดถึงร้อยละ 38.7 รองลงมาคือดื้อต่อยา 2 ชนิดคือ penicilin กับ erythromycin (รูปแบบที่ 3) ร้อยละ 25.8 ในขณะที่รูปแบบการดื้อต่อยาอื่นๆจะมีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 3.2 (รูปแบบที่ 4, 9, 11-13 , 16-18 และ 20-21) ขณะที่พบตัวอย่างร้อยละ 29 (รูปแบบที่ 9, 12-14 17-18 และ 20-21) ที่มีรูปแบบการดื้อต่อยาหลายชนิด (ดื้อต่อยา 3 ชนิดหรือมากกว่า, multidrug resistant) และมีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่ไม่ดื้อต่อยาชนิดใด ในตัวอย่างป้ายเชื้อมีรูปแบบการดื้อต่อยา 13 รูปแบบ พบรูปแบบการดื้อต่อยา penicillin ชนิดเดียวมากที่สุด (รูปแบบที่ 1) ถึงร้อยละ 30.4 รองลงมาคือดื้อต่อยา cefoxitin (รูปแบบที่ 2) ร้อยละ 6.4 และพบเชื้อที่มีรูปแบบการดื้อต่อยาหลายชนิด (รูปแบบที่ 7-8, 10, 15-16

และ 19) ร้อยละ 34.7 ในขณะที่รูปแบบการดื้อต่อยาอื่นๆ (รูปแบบที่ 3, 5-8,10,14-16 และ 19) จะมีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันที่ประมาณร้อยละ 4.3

โดยรวมแล้วทั้งตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อ ค่อนข้างที่จะมีรูปแบบการดื้อต่อยาที่หลากหลาย โดยพบรูปแบบการดื้อต่อยาอย่างน้อยที่สุด 1 ชนิด และอย่างมากที่สุด 6 ชนิด (ตารางที่ 2) อีกทั้งยังพบว่าส่วนใหญ่มีรูปแบบการดื้อต่อยา penicillin ชนิดเดียว (รูปแบบที่ 1) มากที่สุดถึงร้อยละ 35.2 รองลงมาคือดื้อต่อยา penicilin กับ erythromycin (รูปแบบที่ 3) (ร้อยละ 16.6) และรูปแบบการดื้อต่อยาอื่นๆ (รูปแบบที่ 2, 4-21) จะมีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 1.8-3.7 (1-2 ไอโซเลต) นอกจากนี้พบว่ามีถึง 16ไอโซเลต (ร้อยละ 29.6) ที่มีรูปแบบการดื้อต่อยาหลายชนิด (รูปแบบที่ 7-21) โดยเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (ร้อยละ 34.7) มีเชื้อที่มีรูปแบบการดื้อต่อยาหลายชนิดในจำนวนที่ใกล้เคียงกับเชื้อจากตัวอย่างป้ายเชื้อ(ร้อยละ 29) นอกจากนี้ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยยังพบว่ามี 2 ไอโซเลทที่มีรูปแบบที่ดื้อต่อยามากที่สุด 6 ชนิด (รูปแบบที่ 20 และ 21)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 7 รูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

รูปแบบ	รูปแบบการดื้อต่อยา	จำนวน (ไอโซเลท)		รวม (n=54)
		ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย จำนวน (n= 31)	ตัวอย่างป้ายเชื้อ จำนวน (n=23)	
1	PEN	12 (38.7)	7 (30.4)	19 (35.2)
2	FOX	-	2 (8.6)	2 (3.7)
3	PEN/ERY	8 (25.8)	1 (4.3)	9 (16.6)
4	PEN/TE	1 (3.2)	-	1 (1.8)
5	FOX/OXA	-	1 (4.3)	1 (1.8)
6	PEN/FOX	-	1 (4.3)	1 (1.8)
7	PEN/FOX/OXA	-	1 (4.3)	1 (1.8)
8	TE/FOX/OXA	-	1 (4.3)	1 (1.8)
9	PEN/CIP/DA	1 (3.2)	-	1 (1.8)
10	PEN/SXT/DA	-	1 (4.3)	1 (1.8)
11	PEN/ERY/TE/OXA	1 (3.2)	-	1(1.8)
12	PEN/ERY/SXT/DA	1 (3.2)	-	1 (1.8)
13	PEN/GEN/CIP/DA	1 (3.2)	-	1(1.8)
14	PEN/FOX/DA/OXA	-	1 (4.3)	1(1.8)
15	PEN/TE/FOX/OXA	-	1 (4.3)	1(1.8)
16	PEN ERY/TE/ FOX/OXA	1 (3.2)	1 (4.3)	2 (3.7)
17	PEN/GEN/CIP/DA/OXA	1 (3.2)	-	1(1.8)
18	PEN/ERY/FOX/DA/OXA	1 (3.2)	-	1 (1.8)
19	PEN/FOX/SXT/DA/OXA	-	1 (4.3)	1 (1.8)
20	PEN/ERY/FOX/CIP/DA/OXA	1 (3.2)	-	1 (1.8)
21	PEN/ERY/TE/FOX/SXT/OXA	1 (3.2)	-	1 (1.8)
22	ไม่พบการดื้อต่อยา	1 (3.2)	4 (17.4)	5 (9.2)
[redacted]	ดื้อต่อยา 3 ชนิดหรือมากกว่า (multidrug resistant)	9 (29)	7 (30.4)	16 (29.6)
	ดื้อต่อยา 6 ชนิด	2 (16.1)	0	2 (3.7)

PEN, penicilin; ERY, erythromycin; TE, tetracycline;; FOX, cefoxitin; GEN, gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; DA, clindamycin

การตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพ

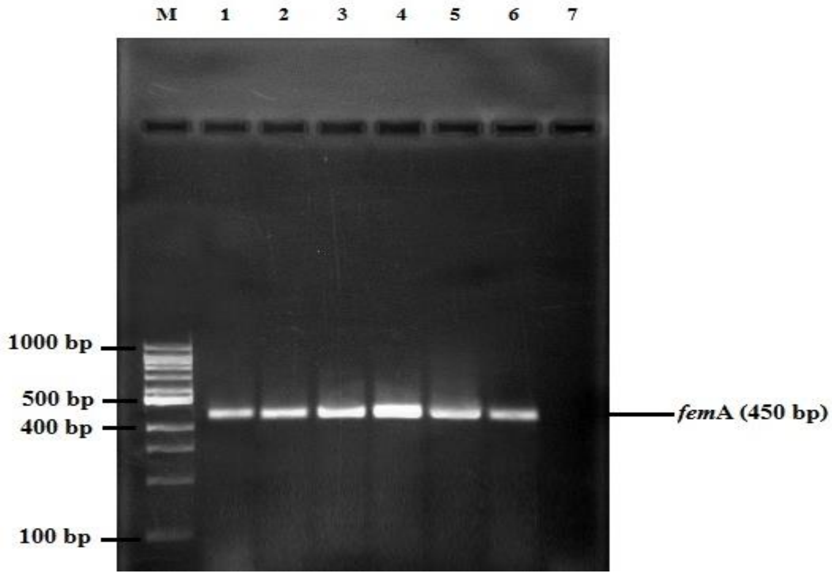
ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบของการใช้วิธี Multiplex-PCR และ PCR ในการตรวจยีนยันยีน *fem*A และยีนดื้อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด ได้แก่ *bla*Z, *mec*A, *erm*A, *aac*(6')/*aph*(2), *tet*K และ *tet*M ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อ โดยพบว่าทุกไอโซเลทตรวจพบยีน *fem*A (ภาพที่ 11) ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อที่จับกับยีน *bla*Z (ภาพที่ 12) มากที่สุด (ร้อยละ 87) โดยตรวจพบยีน *bla*Z จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยได้ร้อยละ 96.7 และตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 74 ตรวจพบเชื้อที่จับกับยีน *mec*A (ภาพที่ 12)ทั้งหมดร้อยละ 27.8 โดยตรวจพบเชื้อที่จับกับยีน *mec*A ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 22.5 และ 34.9 ตามลำดับ ตรวจพบเชื้อที่จับกับยีน *erm*A (ภาพที่ 14) ร้อยละ 37 โดยตรวจพบยีน *erm*A ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อในระดับปานกลางร้อยละ 48.4 และ 21.7 ตามลำดับ ตรวจพบเชื้อที่จับกับยีน *tet*K และ *tet*M (ภาพที่ 14) ร้อยละ 16.6 เท่ากัน โดยตรวจพบยีน *tet*K จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 19.3 และ 13 ตามลำดับ และตรวจพบยีน *tet*M ในเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 17.4 และ 16.1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อที่มีทั้งยีน *tet*K และ *tet*M ร้อยละ 9.3 โดยตรวจพบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 9.7 และ 8.7 ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามกลับตรวจพบเชื้อที่มีการจับกับยีน *aac* (6′)/*aph*(2″) (ภาพที่ 13)ในระดับต่ำ (ร้อยละ 11.1) โดยตรวจพบยีน *aac* (6′)/*aph*(2″) จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 12.9 และ 8.7 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

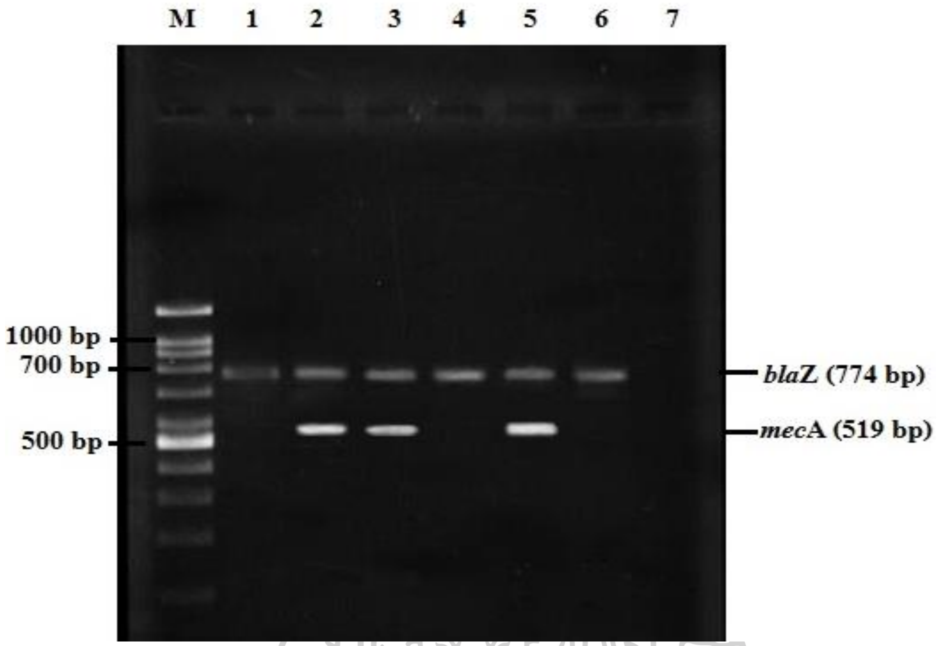
ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อด้วยวิธี PCR และ multiplex-PCR

ยีนดื้อยา	จำนวนตัวอย่างเชื้อที่ตรวจพบยีนดื้อยา		รวม
	ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (n = 31) (ร้อยละ)	ตัวอย่างป้ายเชื้อ (n = 23) (ร้อยละ)	
*fem*A*	31 (100)	23 (100)	54 (100)
*bla*Z	30 (96.7)	17 (74)	47 (87)
*mec*A	7 (22.5)	8 (34.9)	15 (27.8)
*erm*A	15 (48.4)	5 (21.7)	20 (37)
aac (6′)/*aph*(2″)	4 (12.9)	2 (8.7)	6 (11.1)
*tet*K	6 (19.3)	3 (13)	9 (16.6)
*tet*M	5(16.1)	4 (17.4)	9 (16.6)
*tet*K + *tet*M	3 (9.7)	2 (8.7)	5 (9.3)
ตรวจไม่พบยีนดื้อยา	1 (3.22)	6 (26.1)	7 (13)

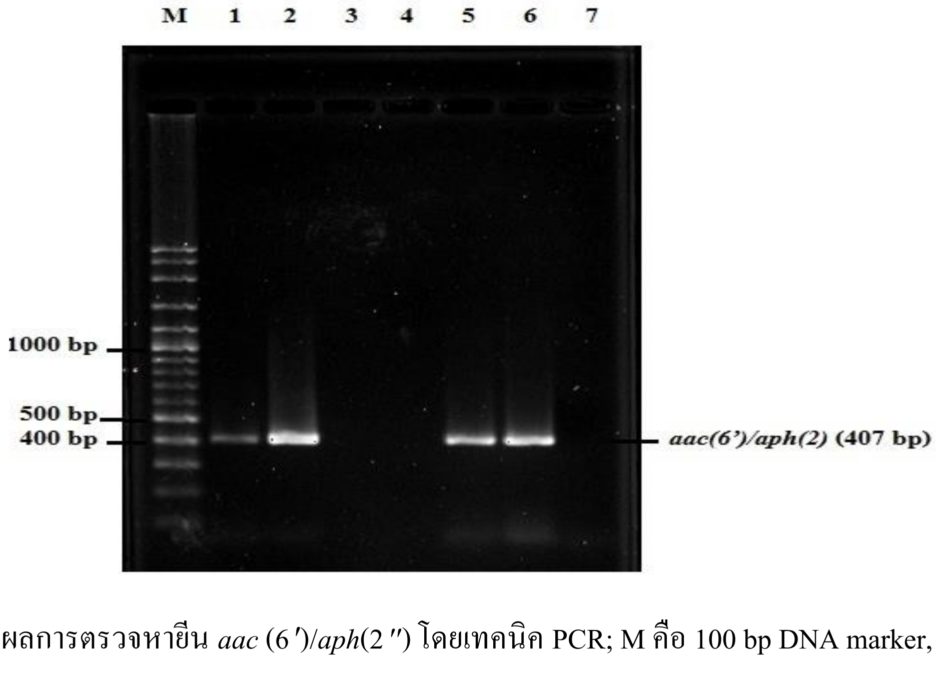
*จำเพาะกับสายพันธุ์ *S. aureus*



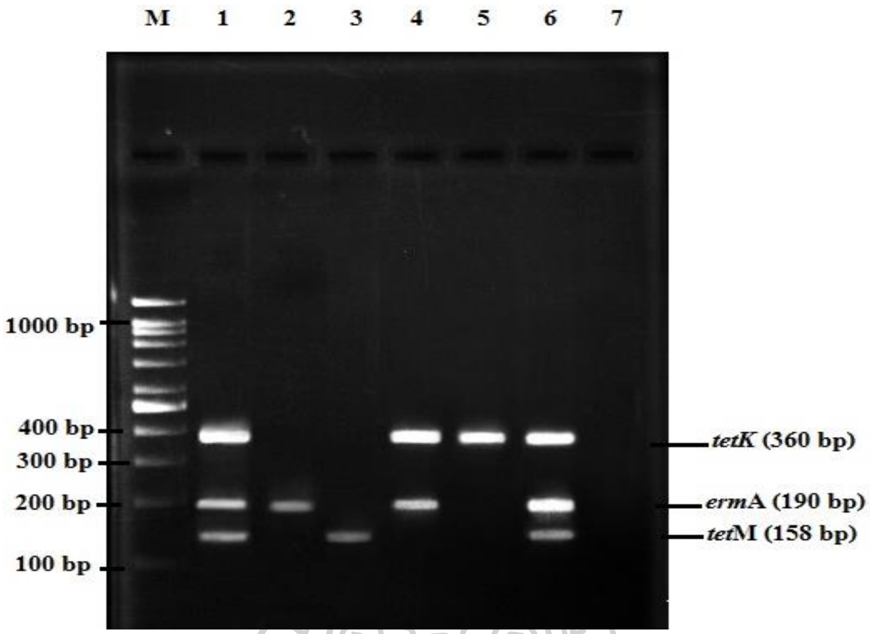
ภาพที่ 11 ผลการตรวจหายีน *fem*A โดยเทคนิค PCR ; M คือ 100 bp DNA marker, lane 1 คือ *S. aureus* ATCC 25923 (positive control); lane 2-6 คือ ยีน *fem*A (450 bp) lane 7; *Escherichia coli* ATCC 25922 (negative control)



ภาพที่ 12 ผลการตรวจหายีน *bla*Z และ *mec*A โดยเทคนิค Multiplex-PCR; M คือ100 bp DNA marker, lane 1-6 คือ *bla*Z (774 bp), lane 2, 3 และ 5 คือ ยีน*mec*A(519 bp), lane 7; *S. aureus* ATCC 25923 (negative control)



ภาพที่ 13 ผลการตรวจหายีน *aac* (6′)/*aph*(2″) โดยเทคนิค PCR; M คือ 100 bp DNA marker, lane 1, 2, 5 และ6 คือยีน *aac* (6′)/*aph*(2″) (407 bp), lane 7; *S. aureus* ATCC 25923 (negative control)



ภาพที่ 14 ผลการตรวจหายีน *erm*A *tet*K และ *tet*M โดยเทคนิค Multiplex-PCR M คือ 100 bp DNA marker, lane 1, 2, 4 และ 6 คือยีน *erm*A (190 bp), lane l, 4, 5 และ6 คือยีน *tet*K, (360 bp), lane 1, 3 และ 6 คือ ยีน *tet*M (158 bp), lane 7; *S. aureus* ATCC 25923 (negative control)

ความสัมพันธ์ระหว่างผลทดสอบความไวต่อยาและยีนดื้อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด

ตารางที่ 9-13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลทดสอบความไวต่อยา penicillin, erythromycin, tetracycline, cefoxitin, และ gentamicin ที่ทดสอบด้วยวิธี disc diffusion และยา oxacillin ที่ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution กับยีนดื้อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด ที่ทดสอบด้วยวิธี PCR และ Multiplex-PCR ได้แก่ blaZ (ยีนยันการดื้อต่อยา penicilin), mecA (ยีนยันการดื้อต่อยา methicilin และ oxacillin) ermA (ยีนยันการดื้อต่อยา erythromycin) aac(6’)/aph(2’’) (ยีนยันการดื้อต่อยา gentamicin) tetK และ tetM (ยีนยันการดื้อต่อยา tetracycline) ในตัวอย่างเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อจำนวน 54 ไอโซเลท

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Penicillin กับยีน *bla*Z ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่าง สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

ตัวอย่าง	Penicillin		
	ความไวต่อยา จำนวน (ร้อยละ)	*bla*Z-positive จำนวน (ร้อยละ)	*bla*Z-negative จำนวน (ร้อยละ)
ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	R = 30 (96.7)	30 (96.7)	-
(n= 31)	S = 1 (3.2)	-	1 (3.2)
ตัวอย่างป้ายเชื้อ	R = 15 (65.2)	15 (65.2)	-
(n = 23)	S = 8 (34.8)	2 (8.7)	6 (26.1)
รวม	R = 45 (83.3)	45 (83.3)	-
(n = 54)	S = 9 (16.7)	2 (3.7)	7 (13)

R = Resistant; S = Susceptible

ตารางที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเชื้อที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา penicilin กับยีน *bla*Z พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทร้อยละ 83.3 โดยแบ่งเป็นตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยร้อยละ 96.7 และเชื้อจากตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 65.2 มีการแสดงออกว่าดื้อต่อยา penicilin และตรวจพบยีน *bla*Z

อย่างไรก็ตามกลับพบว่าในตัวอย่างป้ายเชื้อมี 2 ไอโซเลทที่แสดงออกว่าไวต่อยา penicilin แต่กลับตรวจพบยีน *bla*Z

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Cefoxitin และ Oxacillin กับยีน *mec*A ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

ตัวอย่าง	Cefoxitin			Oxacillin		
	ความไวต่อยา จำนวน (ร้อยละ)	*mec*A-positive จำนวน (ร้อยละ)	*mec*A-negative จำนวน (ร้อยละ)	ความไวต่อยา จำนวน (ร้อยละ)	*mec*A-positive จำนวน (ร้อยละ)	*mec*A-negative จำนวน (ร้อยละ)
ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ	R = 4 (12.9)	4 (12.9)	-	R = 6 (19.3)	5 (16.1)	1 (3.2)
ผู้ป่วย	S = 27 (87)	3 (9.7)	24 (77.3)	S = 25 (80.6)	2 (6.5)	23 (74.1)
(n= 31)						
ตัวอย่างป้ายเชื้อ	R = 10 (43.5)	4 (17.4)	6 (26.1)	R = 7 (30.4)	3 (13)	4 (17.4)
(n = 23)	S = 13 (56.5)	4 (17.4)	9 (39.1)	S = 16 (69.5)	5 (21.7)	11 (47.8)
รวม	R = 14 (25.9)	8 (14.8)	6 (11.1)	R = 13 (24.1)	8 (14.8)	5 (9.3)
(n = 54)	S = 40 (74.1)	7 (13)	33 (61.1)	S = 41 (76)	7 (13)	34 (63)

R = Resistant; S = Susceptible

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเชื้อที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา cefoxitin และ oxacillin กับยีน *mec*A โดยพบว่าเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยทั้งหมด (ร้อยละ 12.9) มีการแสดงออกว่าดื้อต่อยา cefoxitin และตรวจพบยีน *mec*A ในขณะที่มีเพียงร้อยละ 9.7 ที่มีการแสดงออกว่าไวต่อยา cefoxitin แต่กลับตรวจพบยีน *mec*A และมีตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 43.5 ที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา cefoxitin แต่กลับตรวจไม่พบยีน *mec*A ถึงร้อยละ 26.1 ในขณะที่มีตัวอย่างร้อยละ 13 ที่แสดงออกว่าไวต่อยา cefoxitin แต่กลับตรวจพบยีน *mec*A

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเชื้อที่ดื้อต่อยา oxacillin กับยีน *mec*A โดยพบว่าเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยร้อยละ 16.1 ที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา oxacillin แต่กลับมี 1 ไอโซเลทที่ตรวจไม่พบยีน *mec*A ในขณะที่มี 2 ไอโซเลทที่แสดงออกว่าไวต่อยา oxacillin แต่กลับตรวจพบยีน *mec*A และในตัวอย่างป้ายเชื้อร้อยละ 30.4 ที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา oxacillin แต่กลับพบเชื้อที่ตรวจไม่พบยีน *mec*A ถึงร้อยละ 17.4 ตรงกันข้ามกลับพบว่ามีเชื้อร้อยละ 13 ที่แสดงออกว่าไวต่อยาแต่กลับตรวจพบยีน *mec*A

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Erythromycin กับยีน *erm*A ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

ตัวอย่าง	Erythromycin		
	ความไวต่อยา จำนวน (ร้อยละ)	*erm*A-positive จำนวน (ร้อยละ)	*erm*A-negative จำนวน (ร้อยละ)
ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	R = 14 (45.1)	13 (41.9)	1 (3.2)
(n= 31)	S = 17 (54.8)	2 (6.4)	15 (48.4)
ตัวอย่างป้ายเชื้อ	R = 2 (8.7)	1 (4.3)	1 (4.3)
(n = 23)	S = 21 (91.2)	3 (13)	18 (78.2)
รวม	R = 16 (29.6)	14 (25.9)	2 (3.7)
(n = 54)	S = 38 (70.4)	5 (9.3)	33 (61.1)

R = Resistant; S = Susceptible

ตารางที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเชื้อที่ดื้อต่อยา erythromycin กับยีน *erm*A โดยพบว่าเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยร้อยละ 45.1 ที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา erythromycin แต่มี 1 ไอโซเลทที่ตรวจไม่พบยีน *erm*A ในขณะที่มี 2 ไอโซเลทที่แสดงออกว่าไวต่อยา erythromycin แต่กลับตรวจพบมียีน *erm*A และในตัวอย่างป้ายเชื้อมีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา

erythromycin แต่ตรวจไม่พบยีน *erm*A ในขณะที่มีตัวอย่างร้อยละ 13 ที่แสดงออกว่าไวต่อยา erythromycin แต่กลับตรวจพบยีน *erm*A

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา gentamicin กับยีน *aac*(6')/ *aph*(2'') ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

ตัวอย่าง	Gentamicin		
	ความไวต่อยา จำนวน (ร้อยละ)	*aac*(6')/ *aph(2)*-positive จำนวน (ร้อยละ)	*aac*(6')/ *aph(2)*-negative จำนวน (ร้อยละ)
ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	R = 2 (6.4)	2 (6.4)	-
(n= 31)	S = 29 (93.5)	3 (9.6)	26 (83.9)
ตัวอย่างป้ายเชื้อ	R = 0 (0)	-	-
(n = 23)	S = 23 (100)	2 (8.7)	21 (91.3)
รวม	R = 2 (3.7)	2 (3.7)	-
(n = 54)	S = 52 (96.3)	5 (9.3)	47 (87)

R = Resistant; S = Susceptible

ตารางที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเชื้อที่ดื้อต่อยา gentamicin กับยีน *aac*(6')/ *aph*(2'') โดยพบว่าเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยทั้งหมด 2 ไอโซเลทที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา gentamicin และตรวจพบยีน *aac*(6')/ *aph*(2'') ในขณะที่มี 3 ไอโซเลทที่แสดงออกว่าไวต่อยา gentamicin แต่กลับตรวจพบว่ามียีน *aac*(6')/ *aph*(2'') และในตัวอย่างป้ายเชื้อทั้งหมดไม่มีการแสดงออกว่าดื้อต่อยา gentamicin และตรวจไม่พบยีน *aac*(6')/ *aph*(2'') ตรงกันข้ามพบว่ามี 2 ไอโซเลทที่แสดงออกว่าไวต่อยา gentamicin แต่กลับตรวจพบยีน *aac*(6')/ *aph*(2'')

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยา Tetracycline กับยีน *tet*K และ *tet*M ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

ตัวอย่าง	Tetracycline					
	ความไวต่อยา จำนวน (ร้อยละ)	*tet*K-positive จำนวน (ร้อยละ)	*tet*K-negative จำนวน (ร้อยละ)	*tet*M-positive จำนวน (ร้อยละ)	*tet*M-negative จำนวน (ร้อยละ)	*tet*K และ *tet*M-positive จำนวน (ร้อยละ)
ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (n= 31)	R = 4 (12.9)	4 (12.9)	-	3 (9.7)	1 (3.2)	3 (9.7)
	S = 27 (87.1)	4 (12.9)	23 (74.2)	2 (6.4)	25 (80.7)	2 (6.4)
ตัวอย่างป้ายเชื้อ (n = 23)	R = 3 (13.9)	2 (8.6)	1 (4.3)	2 (8.6)	1 (4.3)	2 (8.6)
	S = 20 (87)	1 (4.3)	19 (82.6)	2 (8.6)	18 (78.3)	1 (4.3)
รวม (n = 54)	R =7 (12.9)	6 (11.1)	1 (1.8)	5 (9.3)	2 (3.7)	5 (9.3)
	S = 47 (87)	5 (9.3)	42 (77.7)	4 (7.4)	43 (79.6)	4 (7.4)

R = Resistant; S = Susceptible

ตารางที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเชื้อที่ดื้อต่อยา tetracycline กับยีน *tet*K และ *tet*M โดยพบว่าเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยทั้งหมดร้อยละ 9.7 แสดงออกว่าดื้อต่อยา tetracycline และตรวจพบยีน *tet*K และ *tet*M แต่มีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่ตรวจไม่พบยีน *tet*M ในขณะที่มีตัวอย่างร้อยละ 87.1 ที่แสดงออกว่าไวต่อยา tetracycline แต่กลับตรวจพบเชื้อที่มียีน *tet*K และ *tet*M หรือพบทั้ง 2 ยีน ร้อยละ 12.9 6.4 และ 6.4 ตามลำดับ และในตัวอย่างป้ายเชื้อมีร้อยละ 8.6 ที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา tetracycline และตรวจพบทั้งยีน *tet*K และ *tet*M แต่มีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่ตรวจไม่พบยีน *tet*K และ *tet*M ในขณะที่มีเชื้อร้อยละ 78.3 ที่แสดงออกว่าไวต่อยา tetracycline และตรวจไม่พบทั้งยีน *tet*K และ *tet*M ตรงกันข้ามกลับพบว่ามี 1 ไอโซเลท ที่มียีน *tet*M เพียงชนิดเดียวเท่านั้นและอีก 2 ไอโซเลทที่ตรวจพบทั้งยีน *tet*K และ *tet*M

จากความสัมพันธ์ระหว่างผลทดสอบความไวต่อยาและยีนดื้อยาต้านจุลชีพที่ตรวจพบในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ (ตารางที่ 9-13) โดยรวมแล้วพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ (ร้อยละ 83.3) ที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา penicillin จะตรวจพบยีน *bla*Z ร่วมอยู่ด้วย และมีตัวอย่างร้อยละ 14.8 ที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา cefoxitin และ oxacillin หรือดื้อยาชนิดใดชนิดหนึ่งจะตรวจพบยีน *mec*A ร่วมด้วย ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่ามี 7 ไอโซเลท ที่แสดงออกว่าไวต่อยา cefoxitin และ oxacillin หรือไวต่อยาชนิดใดชนิดหนึ่งแต่กลับตรวจพบยีน *mec*A

นอกจากนี้มีเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้นที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา erythromycin แต่ตรวจไม่พบยีน *erm*A ในขณะที่มีตัวอย่างร้อยละ 9.3 ที่แสดงออกว่าไวต่อยา erythromycin แต่กลับตรวจพบยีน *erm*A นอกจากนี้ยังตัวอย่างร้อยละ 9.3 ที่แสดงออกว่าไวต่อยา gentamicin แต่กลับตรวจพบยีน *aac*(6')/*aph*(2'') อย่างไรก็ตามพบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา tetracycline แต่กลับตรวจไม่พบทั้งยีน *tet*K และ *tet*M เช่นเดียวกันพบว่ามีตัวอย่างร้อยละ 7.4 ที่แสดงออกว่าไวต่อยา tetracycline แต่กลับตรวจพบทั้งยีน *tet*K และ *tet*M

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

S. aureus เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ร่างกายของผู้ป่วย (colonization) เช่น รูจมูก ใบหน้า แขน หรือขา เป็นต้น และยังสามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น พื้น ผนัง หรือราวบันได เป็นต้น เราสามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากสารคัดหลั่งจากร่างกายผู้ป่วย เช่น เสมหะ หนอง ปัสสาวะ รวมถึงเลือดของผู้ป่วย โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และพบว่าสามารถแยกเชื้อได้จากตัวอย่างเสมหะมากที่สุด รองลงมาคือจากเลือด และหนองของผู้ป่วย ซึ่งสามารถใช้เป็นสิ่งบ่งชี้ได้ว่าเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น เสมหะคือสารคัดหลั่งที่ร่างกายสร้างออกมาจากต่อมสร้างสารคัดหลั่งที่อยู่ในเยื่อบุทางเดินหายใจดังนั้นการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในเสมหะก็มีความเป็นไปได้ที่เชื้ออาจจะก่อให้เกิดโรคปอดบวม (pneumonia) หรือการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในเลือดของผู้ป่วยก็มีความเป็นไปได้ที่เชื้ออาจจะก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) หรือโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบ (*endocarditis*) เป็นต้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Nabeetha และคณะ (2005) ที่พบว่าส่วนใหญ่จะสามารถแยกเชื้อ *S. aureus* ได้จากเสมหะของผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดบวม (Nabeetha *et al*., 2005) และ Prabhu และคณะ (2010) สามารถแยกเชื้อ *S. aureus* ได้จากเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือด (Prabhu *et al*., 2010) นอกจากนี้เรายังสามารถแยกเชื้อ *S. aureus* ได้จากการป้ายเชื้อ (swab) จากสิ่งแวดล้อม สิ่งของ และสถานที่ต่างๆภายในโรงพยาบาล เช่น พื้นในห้องผู้ป่วย พื้นห้องน้ำ ผนัง เตียงผู้ป่วย รถเข็น เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. aureus* นอกจากจะอยู่ในตัวผู้ป่วยแล้วยังสามารถพบได้อยู่ในสิ่งแวดล้อม โดยตรวจพบเชื้อ *S. aureus* จากพื้นในห้องผู้ป่วยได้มากที่สุด รองลงมาคือ เตียงผู้ป่วย ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าเกิดจากพาหะ เช่น ญาติผู้ป่วย ผู้ป่วยท่านอื่น แพทย์ หรือบุคลากรภายในโรงพยาบาล ซึ่งเป็นผู้นำพาเชื้อ *S. aureus* จากภายนอกเข้ามาภายในห้องผู้ป่วย ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอัตราเสี่ยงต่อการสัมผัสกับเชื้อก่อโรคมากขึ้น เช่นเดียวกันการศึกษาของ Boyce และคณะ (1997) ที่ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* บนพื้นห้องผู้ป่วยและเตียงผู้ป่วย โดยพบว่าส่วนใหญ่เกิดจากนางพยาบาลที่เป็นต้นเหตุทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อก่อโรคชนิดนี้ (Boyce *et al*., 1997) แต่อย่างไรก็ตามความเสี่ยงที่ผู้ป่วยจะสัมผัสกับเชื้อก่อโรคและเกิดอาการรุนแรงน่าจะขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยมากกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ สมหวัง ด่านชัยวิจิตร (2533) ที่ได้รายงานว่า ถึงแม้แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมจะมีมาก แต่อัตราการติดเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลอาจไม่ได้สูงขึ้นตาม เนื่องจากตัวแปรที่สำคัญคือ ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยและความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ (สมหวัง ด่านชัยวิจิตร, 2533)

การจำแนกสายพันธุ์ *S. aureus* ด้วยวิธีทางชีวเคมีตามปกติ (ทดสอบการหมักน้ำตาลและการสร้างเอนไซม์ต่างๆหลายชนิด) นั้นจะใช้เวลาที่นานและสิ้นเปลืองสารเคมีมาก ดังนั้นการจำแนกเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. aureus* อันได้แก่ catalase test, haemolytic test, mannitol fermentation และ coagulase test นั้นก็เพียงพอแล้วต่อการจำแนกสายพันธุ์ *S. aureus* ซึ่งจะช่วยในการประหยัดเวลาและลดการสิ้นเปลืองสารเคมีอีกด้วย และนอกจากนี้เพื่อเป็นยืนยันสายพันธุ์ *S. aureus* จึงควรตรวจหายีนที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ *S. aureus* ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ยีน *fem*A หรือ Factor essential for the expression of methicittine resistant (*fem*) ซึ่งเป็นยีนที่สามารถพบได้ในเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ยีนชนิดนี้ในการจำแนกสายพันธุ์ *S. aureus* ได้เช่นกัน (Mehrotra *et al*., 2000)

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพพบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีความไวต่อยา chloramphenicol, rifampin, linezolid และ vancomycin แสดงให้เห็นว่ายาต้านจุลชีพเหล่านี้ยังสามารถใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* อย่างได้ผล สอดคล้องกับการศึกษาของ Chayakul and Ingviya (2004) ที่รายงานว่าเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ยังคงมีความไวต่อยา vancomycin, fusidic acid และ linezolid (Hortiwakul, Chayakul and Ingviya, 2004) อีกทั้งยังให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่นๆ (Elsahn *et al*., 2010; Armin *et al.,* 2013; Ullah *et al*., 2016) และในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อสายพันธุ์ VISA และ VRSA แม้ว่าในปัจจุบันจะมีรายงานถึงการดื้อต่อยาชนิดนี้ในต่างประเทศ (Hiramatsu, 1998; Mazzulli, 2006; Zhu *et al*., 2008 และ Rahimi *et al.,* 2013) รวมถึงประเทศไทย (Trakulsomboon *et al*., 2001 และ Lulitanond *et al*., 2009) ทั้งนี้ vancomycin ยังเป็นยาที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าควรเลือกใช้เป็นอันดับแรกสำหรับรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ที่รุนแรง แต่ทว่ายาดังกล่าวยังมีผลข้างเคียงคือมีความเป็นพิษต่อหูและไต ดังนั้นจึงควรใช้ยาชนิดนี้ในปริมาณที่เหมาะสมและใช้ด้วยความระมัดระวัง (Yue *et al*., 2013) นอกจากนี้มีรายงานว่าในปัจจุบันยา linezolid สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อ MRSA VISA และ VRSA อย่างได้ผล (Ng *et al*., 2011; Gu *et al*., 2012; Chitnis *et al*., 2013) ในทางตรงกันข้ามพบว่าเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และตัวอย่างป้ายเชื้อส่วนใหญ่จะดื้อต่อยา penicillin ในระดับสูง สอดคล้องกับรายงานจาก CLSI (2015) ที่รายงานว่าในปัจจุบันร้อยละ 80 ของสายพันธุ์ *S. aureus* ที่แยกจากในโรงพยาบาลจะดื้อต่อยา penicilin ชี้ให้เห็นว่ายาชนิดนี้เกือบจะไม่สามารถนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* อย่างได้ผล (CLSI, 2015) ทุกไอโซเลทมีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline, clindamycin gentamicin และ trimethoprim-sulfamethoxazole ในระดับต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Moran และคณะ (2006) ที่แยกเชื้อ *S. aureus* จากโรงพยาบาล 11 แห่งในสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบว่าทุกไอโซเลทมีอัตราการดื้อต่อยาเหล่านี้ในระดับที่ต่ำจนถึงปานกลาง (Moran *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยัง

พบว่าทุกไอโซเลทดื้อต่อยา erythromycin, cefoxitin และ oxacillin ในระดับปานกลาง (ร้อยละ 26.9 25.6 และ 24.1 ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kitti และคณะ (2012) ที่พบว่าเชื้อ MRSA ที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยประเทศไทย ส่วนใหญ่จะดื้อยา erythromycin, oxacillin และ cefoxitin ในระดับปานกลางถึงระดับต่ำ (ร้อยละ 26.7, 6.7 และ 6.7 ตามลำดับ) (Kitti *et al*., 2012) แต่ตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Al-Zoubi และคณะ (2015) ได้รายงานว่าเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยในโรงพยาบาลของประเทศจอร์แดนส่วนใหญ่ร้อยละ 57-63 จะดื้อต่อยา erythromycin cefoxitin และ oxacillin ในระดับสูง (Al-Zoubi *et al*., 2015)

วิธีการตรวจหาเชื้อ MRSA ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี โดยปัจจุบัน CLSI ได้กำหนดให้การตรวจสอบค่า MIC ของยา oxacillin ด้วยวิธี broth dilution (CLSI, 2015) เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบเชื้อ MRSA แต่ถ้าในกรณีที่ต้องใช้วิธี disc diffusion ทาง CLSI ได้แนะนำให้ใช้แผ่นยาปฏิชีวนะ cefoxitin (30 μg) ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (CLSI, 2015) ทั้งนี้ยาทั้ง 2 ชนิดจัดเป็นยาที่อยู่ในกลุ่ม penicillinase resistant penicillins ซึ่งเป็นยากลุ่มเดียวกับ methicillin จึงเป็นประโยชน์ที่จะใช้ตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin หรือ MRSA ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion โดยใช้แผ่นยา cefoxitin สามารถตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ MRSA จำนวน 14 ไอโซเลท แต่เมื่อทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution กับยา oxacillin กลับตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ MRSA เพียง 13 ไอโซเลทเท่านั้น (MIC ของ Oxacillin $\geq$4 μg/ml) ชี้ให้เห็นว่ายา cefoxitin มีความไวและความจำเพาะมากกว่ายา oxacillin อีกทั้งยังมีผู้วิจัยอีกหลายกลุ่มที่รายงานว่ายา cefoxitin นั้นมีความไวและความจำเพาะกับยีน mecA มากกว่ายา oxacillin อีกทั้งยังเป็นตัวชักนำ (inducer) ในการกระตุ้นให้เชื้อแสดงการดื้อต่อยาออกมา (Swenson et al., 2005; Broekema et al., 2009; Pourmand et al., 2014; CLSI, 2015) อย่างไรก็ตามทั้ง 2 วิธีเป็นเพียงการตรวจสอบเชื้อสายพันธุ์ MRSA เบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นถ้าต้องการยืนยันเชื้อสายพันธุ์ MRSA จึงควรใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหายีน mecA ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactam ของเชื้อ MRSA

เชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อค่อนข้างที่จะมีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลาย ซึ่งพบว่าเชื้อประมาณครึ่งหนึ่งจะมีรูปแบบการดื้อต่อยา 1-2 ชนิดโดยส่วนใหญ่จะมีรูปแบบที่ดื้อต่อยา 1 ชนิด คือดื้อต่อยา penicillin ชนิดเดียว และรองลงมาคือรูปแบบที่ดื้อต่อยา 2 ชนิด คือดื้อต่อยา penicillin และ erythromycin ถึงกระนั้นก็ยังพบเชื้อถึง 16 ไอโซเลทที่มีรูปแบบการดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug resistant) และพบว่าในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยมี 2 ไอโซเลทที่มีรูปแบบการดื้อยามากที่สุดถึง 6 ชนิด ส่วนสาเหตุที่เชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดสันนิษฐานว่าเกิดจากผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพมาเป็นระยะเวลานาน หรือใช้ยาโดยไม่ปรึกษาแพทย์จนกระทั่งเชื้อดื้อต่อ

ยาชนิดนั้น สอดคล้องกับบทความของ Carl Llor และ Lars Bjerrum (2014) ได้กล่าวไว้ว่า สาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อก่อโรคในตัวผู้ป่วยดื้อต่อยาหลายชนิดนั้น เกิดจากผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพในปริมาณมาก และเป็นเวลานานหรือบางครั้งที่ผู้ป่วยไม่ปรึกษาแพทย์ และหายามารับประทานด้วยตัวเอง จึงทำให้ใช้ยาไม่ตรงกับชนิดของเชื้อก่อโรค จึงมีโอกาสทำให้เชื้อพัฒนาจนกระทั่งดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดได้เช่นกัน (Carl Llor and Lars Bjerrum, 2014) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดจากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล เช่น เตียงผู้ป่วย ผนัง และ พื้น สันนิษฐานว่าอาจจะเกิดจากพาหะ เช่น บุคลากรทางการแพทย์หรือญาติผู้ป่วยเป็นผู้นำเชื้อดื้อยามาแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาล นอกจากนี้สิ่งของหรือตำแหน่งดังกล่าวก็เป็นสิ่งที่ผู้ป่วยสัมผัสอยู่เป็นประจำจึงมีโอกาสอย่างมากที่ผู้ป่วยจะสัมผัสกับเชื้อดื้อยาหลายชนิดนี้ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pravas และคณะ (2015) ที่แยกเชื้อ *S. aureus* จากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล เช่น พื้น ผนัง เตียงห้องฉุกเฉิน และจากบุคลากรทางแพทย์ และเชื้อมีรูปแบบการดื้อยา erythromycin ampicillin ciprofloxacin และ tetracycline มากที่สุด (Pravas *et al*., 2015)

ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดและการตรวจหายีนดื้อยา พบว่ามีทั้งผลลัพธ์ที่สอดคล้องกันและไม่สอดคล้องกัน โดยแบ่งได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ กรณีที่ 1) มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์และทางจีโนไทป์ที่สอดคล้องกัน คือ เชื้อแสดงออกว่าดื้อต่อยาชนิดหนึ่งและตรวจพบยีนดื้อยาที่ควบคุมการดื้อต่อยาชนิดนั้น กรณีที่ 2) มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์แต่ตรวจไม่พบยีนดื้อยา คือ เชื้อแสดงออกว่าดื้อต่อยาชนิดหนึ่งแต่กลับตรวจไม่พบยีนดื้อยาที่ควบคุมกลไกการดื้อต่อยาชนิดนั้น และกรณีที่ 3) ไม่มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์แต่ตรวจพบยีนดื้อยา คือ เชื้อแสดงออกว่าไวต่อยาชนิดหนึ่งแต่กลับตรวจพบยีนดื้อยาที่ควบคุมกลไกการดื้อต่อยาชนิดนั้น (ศิริลักษณ์ ธีระภูธร และ ธานี วงษ์ชัย, 2558)

ยีน *bla*Z จะควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-lactamsae เข้าทำลายโครงสร้าง β-lactam ring ส่งผลให้ดื้อต่อยา penicillin และในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อส่วนใหญ่ที่ดื้อต่อยา penicillin และตรวจพบยีน *bla*Z ด้วยเช่นกัน ชี้ให้เห็นว่ายีนชนิดนี้มีแพร่การกระจายอยู่ในเชื้อ *S. aureus* เป็นวงกว้าง อย่างไรก็ตามพบว่ามีบางไอโซเลทที่แสดงออกว่าไวต่อยา penicillin แต่ตรวจพบยีน *bla*Z ซึ่งสันนิษฐานได้ว่ายีนไม่มีการแสดงออกหรือไม่มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β-lactamsae เข้าทำลายโครงสร้างของยา ส่งผลให้สามารถยับยั้งเชื้อได้สำเร็จ (Feghaly *et al*., 2012)

กลไกในการดื้อต่อยา cefoxitin, oxacillin และยาในกลุ่ม β-lactam คือยีน *mec*A โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin binding protein (PBP) (โดยปกติเชื้อ *S. aureus* จะมี PBP 4 ชนิด)ให้กลายเป็น PBP2a ทำให้เชื้อไม่ตอบสนองต่อยากลุ่ม β –lactam ในการศึกษาครั้งนี้

ได้ตรวจพบเชื้อที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา cefoxitin และ oxacillin หรือชนิดใดชนิดหนึ่งและตรวจพบยีน *mec*A ร่วมอยู่ด้วย แสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มนี้เป็น True methicillin-resistant *S. aureus* (true MRSA) ซึ่งมีกลไกการดื้อต่อยาที่บริเวณผนังเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็น PBP2a สอดคล้องกับการศึกษาของ Siripornmongcolchai และคณะ (2002) ได้ทำการเปรียบเทียบกับการทดสอบ Oxacillin disc agar diffusion และ Oxacillin salt screening ในการตรวจหาเชื้อ MRSA และยืนยันสายพันธุ์ MRSA โดยการตรวจหายีน *mec*A ผลการทดสอบพบว่าเชื้อที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา Oxacillin พบว่าทั้งหมดจับกับยีน *mec*A แสดงให้เห็นว่าเชื้อเหล่านี้เป็น true MRSA (Siripornmongcolchai *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังมีบางไอโซเลทที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา cefoxitin และ oxacillin หรือชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วตรวจไม่พบยีน *mec*A สันนิษฐานว่าอาจจะเป็นเชื้อชนิด Borderline-oxacillin resistant *S. aureus* (BORSA) ซึ่งเชื้อจะสร้างเอนไซม์ β-lactamase ออกมาในปริมาณมาก ทำให้สามารถย่อยสลายยาได้โดยตรง (รัตดาวัลย์ ขันโยธา และคณะ 2555) สอดคล้องกับการศึกษาของ Maalej และ คณะ (2012) ที่รายงานว่าตรวจพบเชื้อ BORSA ในโรงพยาบาลประเทศตูนิเซีย โดยเชื้อทั้งหมดแสดงออกว่าดื้อต่อยา oxacillin แต่ทั้งหมดกลับ แสดงออกว่าไวต่อยา cefoxitin อีกทั้งยังตรวจไม่พบยีน *mec*A ชี้ให้เห็นว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการควรทดสอบทั้งยา cefoxitin และ oxacillin. (Maalej *et al*., 2012)

ยีน *erm* (erythromycin ribosome methylase) เป็นยีนที่ยืนยันการดื้อต่อยากลุ่ม macrolide, lincosamide และ streptogramin B (MLS_B) เช่น erythromycin โดยมีกลไกการดื้อยาที่ทำให้เกิดกระบวนการ methylation บริเวณ 23S ribosomal ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา ทำให้ไม่สามารถหาตำแหน่งที่จะออกฤทธิ์ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีบางไอโซเลทที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา erythromycin แต่ตรวจพบไม่พบยีน *erm*A ซึ่งสามารถแบ่งข้อสันนิษฐานเป็น 2 กรณีคือ กรณีที่ 1) มียีน *erm* ชนิดอื่นนอกเหนือจากยีน *erm*A คือยีน *erm*B และ *erm*C ซึ่งทั้ง 3 ยีนจะมีลักษณะและกลไกการดื้อยาที่ค่อนข้างเหมือนกัน ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจจะมียีน *erm*B หรือ *erm*C ที่ควบคุมการดื้อต่อยากลุ่ม erythromycin และในกรณีที่ 2) เชื้ออาจมีการแสดงออกของยีน *msr*A (macrolide streptogramin B resistance) โดยจะสร้างโปรตีนที่สามารถขับยาออกนอกเซลล์ด้วยวิธี efflux (Reygaert, 2013) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้เหตุผลแรกที่เลือกใช้ยีน *erm*A เพียงชนิดเดียวในยืนยันการดื้อต่อยา erythromycin เนื่องจากมีหลายๆการศึกษาที่ใช้ยีน *erm*A, *erm*B *erm*C หรือ *msr*A เพื่อยืนยันการดื้อต่อยา erythromycin ของเชื้อ *S. aureus* โดยพบว่าส่วนมากจะตรวจพบยีน *erm*A มากกว่ายีนชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Mlynarczyk และคณะ (2006) ที่รายงานว่ายีน *erm*A จะมีความชุกมากกว่ายีน *erm* ชนิดอื่นๆหรือยีน *msr*A ในเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา erythromycin (Mlynarczyk *et al*., 2006) ส่วน Lim และคณะ (2002) ได้รายงานว่าส่วนใหญ่จะ

พบยีน *erm*C ในเชื้อ coagulase-negative- *S. aureus* (CoNS)(Lim *et al*., 2002) ตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Zmantar และคณะ (2013) ที่รายงานว่าตรวจพบยีน *erm*B และ *msr*A มากกว่ายีน *erm* ชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเพื่อให้ได้ผลทดสอบที่ครอบคลุมจึงควรทดสอบด้วยยีน *erm*A, *erm*B, *erm*C และ *msr*A ร่วมกันเพื่อยืนยันกลไกการดื้อต่อยา erythromycin หรือยาในกลุ่ม MLS_B (Zmantar *et al*., 2013)

ยีน *aac* (6′)/*aph*(2″) ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ AAC (6′)/APH(2″) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิด Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) โดยจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาในกลุ่ม aminoglycoside เช่น gentamicin ทำให้เกิดกระบวนการ acetylation และ phosphorylation ร่วมกัน ส่งผลให้ยาไม่สามารถจับกับ 30S ribosomal ได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามี 2 ไอโซเลทเท่านั้นที่ดื้อต่อยา gentamicin และตรวจพบยีน *aac* (6′)/*aph*(2″) ในกรณีที่เชื้อเหล่านี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactam และ gentamicin และตรวจพบยีน *mec*A และ *aac* (6′)/*aph*(2″) แสดงว่าเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อชนิด Methicillin-aminoglycosides-resistant *S. aureus* (MARSA) โดยเกิดจากการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside-modifying ชนิดที่เรียกว่า bifunctional enzyme ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC(6’) และ APH (2’’) ร่วมกับมีการสร้างโปรตีน PBP2a ส่งผลให้เชื้อกลุ่มนี้ดื้อต่อยา methicillin และยากลุ่ม aminoglycoside (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2555; Wilailuckana, 2005) อย่างไรก็ตามในจากผลการทดสอบพบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทแม้จะแสดงออกว่าดื้อต่อยา gentamicin และตรวจพบยีน *aac* (6′)/*aph*(2″) แต่กลับไม่แสดงออกว่าดื้อต่อยา cefoxitin หรือ oxacillin อีกทั้งยังตรวจไม่พบยีน *mec*A ด้วยเช่นกัน ชี้ให้เห็นว่าเชื้อเหล่านี้ไม่ใช่เชื้อในกลุ่ม MARSA แต่เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา gentamicin และมียีน *aac* (6′)/*aph*(2″) กำกับการดื้อยาเท่านั้น

กลุ่มยีน *tet* (Tetracycline resistance protein) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา tetracycline ในเชื้อ *S. aureus* ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา tetracycline จะตรวจพบยีน *tet*K, *tet*M หรือตรวจพบทั้ง 2 ยีน แสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวสามารถมีกลไกดื้อต่อยา tetracycline เพียงกลไกเดียวหรือมีมากกว่า 1 กลไกได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่ามี 1 ไอโซเลทที่แสดงออกว่าดื้อต่อยา tetracycline แต่ตรวจไม่พบยีน *tet*K หรือ *tet*M สันนิษฐานว่าเชื้อมียีนดื้อยา tetracycline ชนิดอื่นๆควบคุมการแสดงออกนอกเหนือจากยีน *tet*K หรือ *tet*M โดยได้แก่ยีน *tet*L ที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการขับยาออกนอกเซลล์ได้เช่นเดียวกับยีน *tet*K และมียีน *tet*O ทำหน้าที่เช่นเดียวกับยีน *tet*M คือสร้างโปรตีนที่กระตุ้นทำให้เกิดกลไก ribosome protection protien (RPP) เพื่อป้องกันไม่ให้ยาออกฤทธิ์หรือเข้าจับกับตำแหน่งของบนไรโบโซม (Pentti, 1987) อย่างไรก็ตามสาเหตุที่ไม่ได้เลือกใช้ยีน *tet*L และ *tet*O มาทดสอบการดื้อยาในกลุ่ม tetracycline นั้น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่ามีโอกาสที่จะตรวจพบยีน *tet*K และ *tet*M ได้มากกว่ายีน *tet*L และ

*tet*O สอดคล้องกับการศึกษาของ Emaneini และคณะ (2013) ที่รายงานว่าส่วนใหญ่จะตรวจพบยีน *tet*K และ *tet*M ในเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา tetracycline แต่จะตรวจพบยีน *tet*L และ *tet*O ได้ยากมาก (Emaneini *et al*., 2013)

อย่างไรก็ตามสำหรับตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลลัพธ์ที่ไม่สัมพันธ์กันอาจก่อปัญหาในการรายงานผลทดสอบที่ผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบการดื้อต่อยาของเชื้อเหล่านี้อีกครั้งด้วยวิธีการอื่น ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Martineau และคณะ (2000) ได้นำเชื้อที่ให้ผลทดสอบไวต่อยาด้วยวิธี disc diffusion แต่ตรวจพบยีนดื้อยาไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อหาค่า MIC โดยพบว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวมีค่า MIC อยู่ในช่วงที่ดื้อต่อยา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวหากมีการกระตุ้นด้วยยาต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นสูงๆอาจกระตุ้นให้เชื้อมีการแสดงออกทางฟีโนไทป์เพิ่มขึ้นได้ (Martineau *et al*., 2000)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกทดสอบไม่สามารถใช้เทคนิค multiplex-PCR ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่ได้พร้อมๆกันทั้งหมดได้ ซึ่งสาเหตุเกิดจากแต่ละไพรเมอร์จะมีสภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ที่แตกต่างกัน จึงทำให้ไปสามารถทำการทดสอบพร้อมๆกันได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหาจึงได้เลือกไพรเมอร์ที่มีสภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ใกล้เคียงกันมาทดสอบโดยใช้เทคนิค multiplex-PCR และใช้เทคนิค PCR ในการทดสอบกับไพรเมอร์ที่เหลือแทน สำหรับสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลการทดสอบไม่สัมพันธ์กันนั้น สันนิษฐานว่าในขั้นตอนการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของการดื้อต่อยาได้เช่นกัน ซึ่งปัจจัยที่อาจมีผลต่อการแสดงออกของการดื้อต่อยานั้นมีอยู่หลายปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง เช่น ปริมาณเชื้อที่ใช้ ระยะเวลาที่ใช้สำหรับการบ่มเพาะเลี้ยง, อุณหภูมิที่ใช้, pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงปัจจัยอื่นๆซึ่งล้วนมีผลต่อการทดสอบผิดพลาด (false positive) ได้เช่นกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ รณภัทร สำเภา และ องอาจ เลาหวินิจ, (2557) ที่รายงานว่าในการทดสอบ disc diffusion หรือ MIC ที่ต้องเตรียมความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นมาตรฐานที่ 0.5 Mcfarland จึงมีความเป็นไปได้ที่ขั้นตอนนี้จะทำให้ความเข้มข้นของเชื้อผิดพลาดไปอันเนื่องมาจากผู้วิจัยเอง ส่งผลให้ในบางครั้งที่นำเชื้อไปทดสอบหายีนดื้อยาแล้วตรวจพบหรือไม่พบยีนดื้อยาชนิดนั้นส่งผลให้ต้องทำการทดสอบใหม่อีกครั้ง (รณภัทร สำเภา และ องอาจ เลาหวินิจ, 2557)

จากผลการทดลองเหล่านี้สรุปได้ว่าการวินิจฉัยเชื้อดื้อยาด้วยวิธีการทางฟีโนไทป์เพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่สามารถตรวจหาเชื้อดื้อต่อยาได้อย่างแม่นยำหรือมีความจำเพาะที่เพียงพอ อีกทั้งยังใช้เวลาในการทดสอบที่นานและบางวิธีการต้องใช้ความชำนาญในการทดสอบส่งผลให้ได้ผลการทดสอบที่ผิดพลาด ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้วิธีการทางจีโนไทป์ควบคู่กับวิธีการทางฟีโนไทป์ในการตรวจสอบการดื้อต่อยาซึ่งจะช่วยลดข้อผิดพลาดต่างๆจากผลการทดสอบให้น้อยลงและช่วยเพิ่ม

ความแม่นยำและความจำเพาะได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถช่วยยืนยันผลการทดสอบของวิธีการทางฟีโนไทป์ได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้การควบคุมการใช้ยาอย่างสมเหตุผลเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่สำคัญในการชะลอเชื้อดื้อต่อยา ควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อต่อยาในโรงพยาบาลซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการลดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อต่อยาสู่ผู้ป่วยคนอื่นๆและสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล นอกจากนี้ข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกวิธีการทดสอบการดื้อยาภายในโรงพยาบาลเพื่อใช้ในการตัดสินใจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างเหมาะสม ทันเวลาและยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อเฝ้าระวังเชื้อดื้อต่อยา เฝ้าระวังการใช้ยาและยังช่วยลดอัตราการดื้อต่อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ขวัญตา กล้าการนา. (2550). ผลของโปรแกรมการส่งเสริมความรู้และการปฏิบัติของพยาบาลต่อการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อสแตปฟิโลคอกคัสออเรียสที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลินในหอผู้ป่วยหนัก. **วิทยานิพนธ์ พยาบาลศาสตรมหาบัณฑิต** สาขาวิชาการพยาบาลด้านการควบคุมการติดเชื้อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โชติชนะ วิไลลักขณา. (2553). **การศึกษายีนก่อโรคร่วมกับ SCC*mec* typing และ variable numbers of tandem repeats typing (VNTR) เพื่อจำแนกสายพันธุ์ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลินในประเทศไทย.** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย.

ปิยรัชต์ สันตะรัตติวงศ์. (2554). วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อสแตฟฟิลโลคอคคัส, **ตำราวัคซีนของสมาคมโรคติด เชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย** กรุงเทพฯ **:** นพชัยการพิมพ์.

ธีระพงษ์ มนต์มธุรพจน์ (2558) ยาทางเลือกใหม่สำหรับการรักษาภาวะติดเชื้อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ในโรงพยาบาล. **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน**; 11: 1-19.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544) **แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร, กรุงเทพฯ.

เนติลักษณ์ ตันทวุทธ, พุทธภูมิ ลำเจียกเทศ และ พิทักษ์ สันตนิรันดร์. (2559). การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus*.**วารสารเทคนิคการแพทย์** 44*:* 5553- 5566.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2549). **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์.** ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

มาลิน จุลศิริ. (2532**). ยาต้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์.** (พิมพ์ครั้งที่ 1) กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ยุทธนา สุดเจริญ. (2554) **การแยกเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลจากผู้ป่วยโรคมะเร็ง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา.

รณภัทร สำเภา และ องอาจ เลาหวินิจ. (2557). การตรวจยืนยันเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Methicillin ด้วยวิธี PCR จากสุนัขที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสัตว์. **วารสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52**: สาขาสัตวแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมหวัง ด่านชัยวิจิตร (2533) **วิธีการป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล.** (พิมพ์ครั้งที่ 1) กรุงเทพฯ : โครงการตำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2555). **การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมวงศ์ไมโครคอคเคซีอี และสเตรปโตคอคเคซีอี**, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (NARST). (2555). **สถานการณ์เชื้อดื้อต่อยาในประเทศไทย.** สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. นนทบุรี.

อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา. (2556). **โครงการการศึกษาคุณสมบัติของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของเชื้อสแตไฟโลคอกคัส ออเรียสที่ดื้อต่อยาเมททิซิลิน และเชื้อ โคแอกกูเลส เนกกาทีฟ สแตไฟโลคอกไคที่ดื้อต่อยาเมททิซิลินที่แยกได้จากชุมชน.** รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวรประจำปี งบประมาณ 2555.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และ วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์(2553). **แบคทีเรียทางการแพทย์.** (พิมพ์ครั้งที่ 2) กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริลักษณ์ ธีระภูธร และ ธานี วงษ์ชัย, (2558) **การจำแนกชนิดและการตรวจหายีนดื้อยาในกลุ่มสแตปฟิโลคอคคัส**. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวรประจำปี งบประมาณ 2558.

Al-Zoubi M., Ibrahim A. Al-T., Emad H., Alla A. J., and Salih K., (2015) Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in **Northern area of Jordan Iran** *Journal of Microbiology*.; 7(5): 265–272.

Andrew M. J (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemother** 48: p 5–16.

Batzing, *B. L.* (2002). *Microbiology: An Introduction*. *Brooks*/*Cole Thomson Learning*, Stanford, CT.

Bignardi, G.E., Woodford, N., Chapman A., Johnson A.P., and Speller D.C.E. (1996). Detection of the *mec*A gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemother** 37: p 53–63.

Broekema N. M., Tam T. V., Timothy A. M., Steven A. M., and David M. W. (2009) Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disc Diffusion Methods for Detection of mecA-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study**. Journal of Clinical Microbiology** 47: p 217-219.

Brown, D.F.J., Edward, D.I., and Hawkey, P.M. (2005).Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Antimicrobial Chemother** 56: p 1000-1018.

Brown Derek F. J. and Peter E. Retnold (1980) Intrinsic resistance to lactam antibiotics in *staphylococcus aureus.* **FEBS Letters Journal** 122 (2).

Boyce J.M., Potter-Bynoe G., Chenevert C., King T. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. **Infection Control and Hospital Epidemiology Journal** 18(9): p 622-627.

Carl Llor and Lars Bjerrum (2014). Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem**. Therapeutic Advances in Drug Safety** 5(6): p 229–241.

Chambers H.F. and Deleo F.R. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* 7: p 629-641.

Chitnis S. Gunjan K., Nanda H., Siddika P., and Dhananjay S. C., (2013) In vitro activity of daptomycin and linezolid against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant enterococci isolated from hospitalized cases in Central India. **Indian Journal of Medical Research** 137(1): 191–196.

Cheol-In Kang and Jae-Hoon Song (2013). Antimicrobial Resistance in Asia: Current Epidemiology and Clinical Implications**. Journal of Infection and Chemotherapy** 45(1): p 22–31.

Clinical laboratory standards institute (CLSI). (2015). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Third Informational Supplement.** CLSI document *M100-S23* (ISBN 1- 56238-865-7).

Centers for Disease Control and Prevention. (2002) *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States**, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)** 51: p 565-567.

Damon H.A, Claude-James S., and Patrice C., (1998) Characterization of Mutations in the *rpo*B Gene That Confer Rifampin Resistance in *Staphylococcus aureus* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 42(10): 2590–2594.

Datta P., Gulati N., Singla N., Vasdeva H. R., Bala K. (2011). Evaluation of various methods for the detection of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. **Journal of Medical Microbiology** 60: p 1613-1616.

Duran, N., Burcin, O., Gulay, G. D., Yusuf, O. and Cemil, D. (2012). Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci, **Indian Journal of Medical Research,** 135: p 389-396.

Elsahn A.F., Yildiz E.H., Jungkind D.L., Abdalla Y.F., Erdurmus M., Cremona F.A., Rapuano C.J., Hammersmith K.M., Cohen E.J. (2010) In vitro susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococcus corneal isolates to antibiotics. **Cornea Journal** 10**:** p 1131-1135.

Emaneini M., Bigverdi R., Kalantar D., Soroush S., Jabalameli F., Noorazar K. B., Asadollahi P., and Taherikalani M., (2013), Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center, **Annals of Burns and Fire Disasters,** 26(2)**.**

Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences,** 99:p 7687–7692.

Eriksen K.R. (1961) Celbenin-resistant staphylococci. **Ugeskr Laeger** ;123: p 384-386.

Rahimi, F. Majid, B., Mohammad, K., and Mohammad, R. P. (2013). Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates in Tehran, Iran. **Journal of Microbial** : p 144-149.

Fatholahzadeh B., Mohammad E., Mohammad M. F., Hossein S., Marzieh A., Morovat T., Fereshteh J. (2009) Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran**. International Journal of Antimicrobial Agents** 33; 264–265.

Feghaly R. E, Jennifer E. S., Stephanie A. F., Carey-Ann D. B. (2012) Presence of the *bla*Z beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 74**; 388–393.

Ferreira, A.M., Katheryne B.M., Vanessa R. S., Alessandro L. M., Maria L. R. S. C., (2017). Correlation of phenotypic tests with the presence of the blaZ gene for detection of beta-lactamase. Brazilian Journal of Microbiology 48: p 159-166.

Frost, L.S., Leplae, R., Summer, A.O., and Toussaint, A. (2005). **Mobile genetic elements : the agents of open source evolution.** Nature Reviews Microbiology 3(9) : p 722-732.

Foster T. (1996). **Antimicrobial Chemotherapy**. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 11.

George, M.E. (2003). Quinupristin-Dalfopristin and Linezolid: Evidence and Opinion**. Journal of Clinical Infectious Diseases** 36: p 473–481.

Gerard, L, Alain, Q., Marie, E. R., Roland, L., Franc¸O. V. and Jerome, E. (1999). Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. **Journal of antimicrobial agents and chemotherapy** 43: p 1062–1066.

Grundmann H., Aanensen D.M., van den Wijngaard C.C., Spratt B.G., Harmsen D., Friedrich A.W. (2010) Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. **Public Library of Science (PLOS) medicine,** 7: 100-215.

Haddadin, A. S., Fappiano, S. A. and Lipsett, P. A.. (2002). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. **Journal of Postgraduate Medicine**. 78: p 385.

Harold, C. N. and Thomas, D.G. (1996). **Medical Microbiology** (4th edition). University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.

Harris, L.G., Foster, S.J., and Richard, R.G.. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, andtechniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials, **European Cells and Materials.** 4: p 39-60.

Heijer, C. D. J., Evelien, M. E., Mike, P., Herman, G., Cathrien, A. B., Franois, G. S., Ellen, E. S., and The APRES Study Team. (2013). Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*. including meticillin-resistant *S. aureus* in nine European countries a cross-sectional study. **The Lancet Infectious Diseases.** 13: p 409-415.

Hiramatsu, K. (1998). Vancomycin resistance in Staphylococci. Drug Resistance Updates I, **Harcourt Brace and Company Limited:** p 135-150.

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover F.C., (2000) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* inical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 40: p 135-136.

Hortiwakul R., Chayakul P. and Ingviya N. (2004) In vitro Activiies of linezolid Vancomycin Fosfomycin and Fusidic acid Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* **Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents:** p 7-10**.**

Ian, C. and Marilyn, R. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology review**. 65: p 232–260.

Ishino, K., Tsuchizaki, N., Saito, F., Ishikawa, J., Nakajima, M., and Hotta, K (2006). Trends of Arbekacin- resistant MRSA Strains in Japanese Hospitals (1979 to 2000), **Journal of Antibiotic.** 59: p 229–233.

John J.F and Harvin A.M. (2007) History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. **Therapeutics and Clinical Risk Management Journal**, 3: p 1143-1152.

Kaplan S.L., Hulten K.G., Mason E.O (2009). ***Staphylococcus aureus* infections (Coagulase-positive *Staphylococci*)**. In: Feigin R.D., Cherry J.D., Demmler-Harrison G.L., Kaplan S.L editors. Feigin and Cherry's Textbook of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.;. p. 1197-212.

Kenneth, T. P. (2017, April 15). ***Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease Retrieved** Todar's Online Textbook of Bacteriology: [online] http://textbookofbacteriology.net/staph.html

Krzysztof, T. Cooper B.S, Hryniewicz W., Dowson C.G., (2000). Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 45: p 763–770.

Kitti, T., Boonyonying, K., & Sitthisak, S. (2011). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among university students in Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health. 42**: p 1498- 1504.

Levinson, W. (2010). **Review of Medical Microbiology and Immunology 11th Edition**, New York McGraw-Hill Medical: p 94-97.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

Lim K.T., Hanifah Y.A., Yusof M., Thong K.L. (2012) ermA, ermC , tetM and tetK are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. Indian Journal of Medical Microbiology 30(2):p203-7

Locke J. B., Douglas E. Z., Caitlyn R. S., Jennifer D., Daniel F. S., Gerald A. D., Richard V. G., and Karen J. S. (2014) Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain 1128105, the First Known Clinical Isolate Possessing the cfr Multidrug Resistance Gene. Antimicrob Agents Chemother; 58(11): 6592–6598.

Loomba P.S., Juhi T., and Bibhabati M. (2010) Methicillin and Vancomycin Resistant *S. aureus* in Hospitalized Patients. Journal of Global Infectious Diseases, 2(3): 275–283.

Lowy D. F. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Investigation, 111: p 1265–1273.

Lulitanond, A., Chulapan E., Prajuab C., Malai V., Teruyo I., and Keiichi H. (2009). The First Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology** 47 : p 2311–2316.

Ma X. X. En H. W., Yong L. and En J. L. (2011) Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplaninnon- susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin.. **Journal of Medical Microbiology,** 60, p 1661–1668.

Maalej S. M., Faouzia M. R., Marguerite F., Basma M., Roland L., and Adnene H., (2012) Analysis of Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) Strains Isolated in Tunisia, **Journal of Clinical Microbiology,** 50 (10): p 3345–3348.

Mathanraj S., Sujatha S., Sivasangeetha K., Parija S.C. (2009). Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers among patients and health care workers of a tertiary care hospitalin south India**, Indian Journal of Medical Microbiology,** 27: p 62-64.

Maria S. (2012). ***Staphylococcus aureus* colonisation and host-microbe interactions.** Thesis, Department of medical biology, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø.

Martineau F. , François J. P., Nicolas L., Christian M., Paul H. R., Marc O., and Michel G. B . (2000). Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR

Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44: p 231–238.

Martineaua F., François J. P., Louis G., Paul H. R., Marc O., the ESPRIT Trial and Michel G. B. (2000) Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patientsinfected after cardiac, **Surgery Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** 46: p 527–533.

Manisha Garg (2016) **Top 4 Tests for Antimicrobial Drug Susceptibility**, [online] http://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/top-4-tests-for-antimicrobial-drug- susceptibility/55863.

Mazzulli T., (2006). Canadian patterns of antimicrobial resistance: Overview of current trends related to hospital pathogens. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology;** 173B-175B.

Mehrotra M., Gehua W., and Wendy M. J., (2000), Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic ShockSyndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance, **Journal of Clinical Microbiology**, 38: p. 1032–1035.

Mejia C, Zurita J, Guzman-Blanco M. (2010) Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases,** 14: p 79-86.

Mlynarczyk G., Mlynarczyk A., Szymanek K, Luczak M. The frequency of the occurrence of genes *erm*A, *erm*B, *erm*C and *msr*A/B among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to erythromycin. **Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia,** 58(3): p 183-190.

Murakami, K and Minamido W. (1991). Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. 29: p 2240-2244.

Moran J. G., Anusha K., Rachel J. G., Gregory E. F., Linda K. M., Roberta B. C., and David A. T., (2006) Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department. **The New England Journal of Medicine**, 355(7): p 666-674.

Nabeetha A. N.; Abiodun A. A.; William H. S.; Maria B., (2005). A cross-sectional study of isolates from sputum samples from bacterial pneumonia patients in Trinidad. **Brazilian Journal Infection Disease** 9 (3).

Nakamura S.(1997). Mechanisms of Quinolone Resistance , **Journal of Infection and Chemotherapy**, 3:p 128 138.

Neda R. D.,, Seyed D. S., Farzam V., J., Vand Y., Naser H., Ali R., Bahareh R., Mehrangiz Z., Alireza J. N., Shahin N. P. and Ahmad R. B. (2015). Identification of *Staphylococcus aureus* and Coagulase- negative *Staphylococcus* (CoNS) as well as Detection of Methicillin Resistance and Panton-Valentine Leucocidin by Multiplex PCR. **Journal of Pure and Applied Microbiology,** 9: p. proof.

Nkwelang G., Jane-Francis T. K. A., Lucien H. K., Emmanuel D. N. and Roland N. N., (2009) *Staphylococcus aureus* isolates from clinical and environmental samples in a semi-rural area of Cameroon: phenotypic characterization of isolates, **African Journal of Microbiology esearch** 3(11): p. 731-736.

Oluseun, A.O. (2012). **Molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and environmental sources**. Thesis of Department of biological science, school of natural and applied science, college of science and technology , Covenart university, OTA, Ogun stage, Nigeria.

Parsonnet, J., Goering, R. V., Hansmann, M. A., Jones, M. B., Ohtagaki, K., Davis, C.C. and Totsuka, K. (2008). Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1)-Producing Strains of *Staphylococcus aureus* and Antibody to TSST-1 among Healthy Japanese Women. **Journal of clinical microbiology**. 46: p. 2731–2738.

Pallab, R., Vika G. and Rachna S., (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in developing and developed countries: implications and solutions. **Regional Health Forum**,. 15: p 74-82.

Patchanee, P. (2011). ***Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among outpatients with skin and soft tissue infections at Prachuapkhirikhan general, Hua Hin and Pranburi hospital.** Master's Thesis Department of Public Health, Facultry of Science, Mahidol.

Pentti H. (1987). Trimethoprim Resistance. **Journal of Antimicrobial agents and chemotherapy**.31: p. 1451-1456.

Piatkowska E., Jerzy P. and; Anna P-M. (2012) The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* toerythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. **Cellular and Molecular Biology Letters An International Journal**, 17: p 633-645.

Prabhu K., Sevitha B., and Sunil R. (2010) Bacteriologic Profile and Antibiogram of Blood Culture Isolates in a Pediatric Care Unit. **Journal of Lab Physicians**., 2(2): p 85–88.

Pravas C. R., Shaheduzzaman M., Nigarin S., Iqbal K.J. (2015) Comparative Antibiotic Sensitivity Pattern of Hospital and Community Acquired *Staphylococcus aureus* Isolates of Jessore, Bangladesh**. Journal of Biosciences and Medicines**, 3: p 17-23.

Pourmand M. R., Sepideh H., Rahil M., Emran A., (2014). Comparison of four diagnostic methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, **Indian journal of microbiology** 6: p 341- 344.

Ryffet, C., Strassle, A., Kayser, F.H. and Berger-Bachi, B. (1994), Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant Stophylococcus oureus. **Antimicrobio{ Agents ond Chemotheropy,** 38, 724-728.

Ralbetli C., Mehmet P., Yasemin B., Huseyin G., and Nesrin C., (2016) Evaluation of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates by Years, **Journal of Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases,** 10 **:** p 1-4.

Ramazanzadeh R, Salimizand H, Shahbazi B, Khonshah M, Narenji H. (2015). Prevalence of *mec*A Gene of Methicillin Resistant *Staphylococcus spp*. Isolated from Nosocomial Infections and Environmental Specimens in Sanandaj Hospitals, Kurdistan, Iran. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** 3: p 38-42.

Rasha, A. H., Aymen, S. Y., Hamdallah, H. Z., and Magdy A. A (2012). Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Cairo, Egypt. **Infection in Developing Countries**. **Journal** 7: p 796-803.

Reygaert, W.C. (2013). **Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus***. In: Méndez- Vilas, A. (ed.) Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.; p. 297–305.

Shaw W. V. and Brossky R. F. (1968) Characterization of Chloramphenicol Acetyltransferase from Chloramphenicol-resistant *Staphylococcus aureus.* **Journal of Bacteriology**, 95 (1) p. 28-36.

Siripornmongcolchai T., Chariya C., Kunyaluk C.,Temduang L. and Chaisiri W. (2002). Evaluation of different primers for detecting mecA gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health,** 33 :p 758-63.

Slade, O. J., and Bruce, R. L. (2009). Genetics of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus.* **Future Microbial journal**.4 : p 565-582.

Stefani S., Chung D.R., Lindsay J.A., Friedrich A.W., Kearns A.M., Westh H., (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 39: p 273-282.

Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology** 41: p.4089-4094.

Suwanparadon P. (1995). **Antibiogram and plasmid DNA analysis to characterize *Staphylococcus aureus* strains**. Thesis of Public Hearth Facultry. Mahidol University.

Swenson M.J., Fred C. T., and the Cefoxitin Disc Study Group, (2005) Results of Disc Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of *mec*A in *Staphylococcus spp*. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(8) p. 3818–3823.

Trakulsomboon, S., Somwang, D., Yong, R.g, Chertsak, D., Wattanachai, S., Teruyo, I., & Keiichi, H.(2001). First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 39 : p. 591–595 .

Ullah A., Muhammad Q., Hazir R., Jafar K., Mohammad H., Niaz M., (2016) High frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Peshawar Region of Pakistan. **Springer Plus,** 5: p 600.

Wang L.,Yingchao L.,Yonghong Y., Guoying H., Chuanqing W., Li D.,Yuejie Z., Zhou F.,Changcong L.,Yunxiao S., Changan Z., Mingjiao S., Xiangmei L., Sangjie Y., Kaihu Y. and Xuzhuang S. (2012) Multidrug-resistant clones of community-associated

meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children and the resistance genes toclindamycin and mupirocin **Journal of Medical Microbiology**; 61,1240–1247.

Wilailuckana, C. (2005). **Molecular characteristic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Thesis of Medical Microbiology Facultry. Mahidol University.

Yasmeen, T., Farhan, E. A. & Shahana, U.K. (2010). Current Pattern of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates and the Emergence of Vancomycin Resistance. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**. 20 : p 728-732.

Yue J., Dong B.R., Yang M., Chen X., Wu T., Liu G.J.,. (2013) **Linezolid versus vancomycin for skin and soft tissue infections**. pulished in The Cochrane Library (7).

Young H-K., Ronald A. S. and Sebastian G. B. (1987). Plasmid-mediated trimethoprim-resistance in *Staphylococcus aureus* Characterization of the first Gram-positive plasmid dihydrofolate reductase (type Si). **Biochemical Journal,** 243: p 309-312.

Zehra A., Randhir S., Simranpreet K. and Gill J. P. S. (2017) Molecular characterization of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from livestock (bovine and swine). **Veterinary World**: 10(6): p 598–604.

Zhu W., Nancye C. C., Linda K. M., Jeffery H. L., Clifford M. and Jean B. P. (2008) Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Inc18-Like *van*A Plasmids in Michigan. **Journal of antimicrobial agents and chemotherapy**, 52: p 452- 457.

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Nutrient agar (NA) Suspend 23 g/L

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Agar	15.0	g

Final pH: 6.8 ± 0.2 at 25ºC

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

2. Mueller Hinton Agar (MHA agar) Suspend 38 g/L

Beef Extract	2	g
Acid Hydrolysate of Casein	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17	g

Final pH 7.3 ± 0.1 at 25°C

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับการทดสอบ Disc diffusion ให้เตรียม MHA ใส่จานเพาะเชื้อจานละ 20 ml จะได้ความหนาของ MHA 4 cm

3. Mueller Hinton II broth (MHB) Suspend 38 g/L

Beef Extract	2	g
Acid Hydrolysate of Casein	17.5	g
Starch	1.5	g
Nacl	20	g

Final pH 7.3 ± 0.1 at 25°C

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

4. Mannitol Salt Agar (MSA agar) Suspend 111 g/L

Enzymatic Digest of Casein	5	g
Enzymatic Digest of Animal Tissue	5	g
Beef Extract	1	g
D-Mannitol	10	g
Sodium Chloride	75	g
Phenol Red	0.025	g
Agar	15	g

Final pH: 7.4 ± 0.2 at 25°C

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

5. Blood Agar (BA) Suspend 42 g/L

Tryptic Soy borth	30	g
Agar	14	g
Whole blood	50	ml

Final pH: 7.0 ± 0.2 at 25°C

ละลาย TSB กับ Agar ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 900 มิลลิลิตร แล้วเติม Human plasma ลงไป จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

7. Normal saline 0.85%

NaCl	8.5	g
น้ำกลั่น (distilled water)	1000	ml

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

8. Tris-buffer saline solution (TBS)

Tris	3.03	g
NaCl	29.22	g
Distilled water	800	ml

pH 7.5 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml

9. 1 M Tris HCL

Tris base	12.1	g
deionized water	100	ml

ชั่ง Tris base จำนวน 12.1 ละลายในน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH 8.0 ด้วย HCl จากนั้นเติมน้ำให้ครบ 100 ml

10. 500 mM EDTA

Disodium EDTA	18.61	g
deionized water	100	ml
NaOH	20	g

pH 8

ชั่ง Disodium EDTA จำนวน 18.61 g และ NaOH 20 g ละลายน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml นำไปอุ่นเล็กน้อยและคนจนละลายหมด

11. 10X TAE buffer 1 L

Tris base	48.5	g
acetic acid	11.4	ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	20	ml

ชั่ง Tris base 48.5 g ละลายน้ำกลั่น 800 ml เติม acetic acid 11.4 ml และ EDTA 20 ml เติมน้ำกลั่น ให้ได้ 1 ลิตร นำไป autoclave 121 °C 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

12. 1X TAE buffer 1 L

10X TAE buffer	100	ml

deionized water	900	ml

ใช้ 10X TAE buffer 100 ml เติมน้ำกลั่น 900 ml จะได้ 1x TAE ปริมาตร 1000 ml

13. 1 % Agarose gel

Agarose powder	1	g
1X TAE buffer	100	ml

เตรียมผงอะกาโรส 1 g จากนั้นเติม 1x TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงไป นำไปอุ่นในเตาไมโครเวฟ ให้ผงวุ้นละลายดี ทิ้งไว้อุณหภูมิลดลง

14. Phosphate Buffer Saline (PBS) 10X (pH 7.4)

NaCl	80	g
KCl	2	g
Na2HPO4 .2H_2O	14.4	g
KH_2PO_4	2.4	g
ddH_2O	1000	ml

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 7.4 ด้วย 1 N NaOH หรือ 20% HCl เติมน้ำกลั่น

ปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

15. Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X

PBS 10X	100	ml
ddH_2O	900	ml

ดูด PBS 10X มา 100 มิลลิลิตรผสมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

16. 1% SDS

SDS	*1*	*g*
ddH_2O	100	ml

ละลาย SDS 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

McFarland Standard Solution No. 0.5

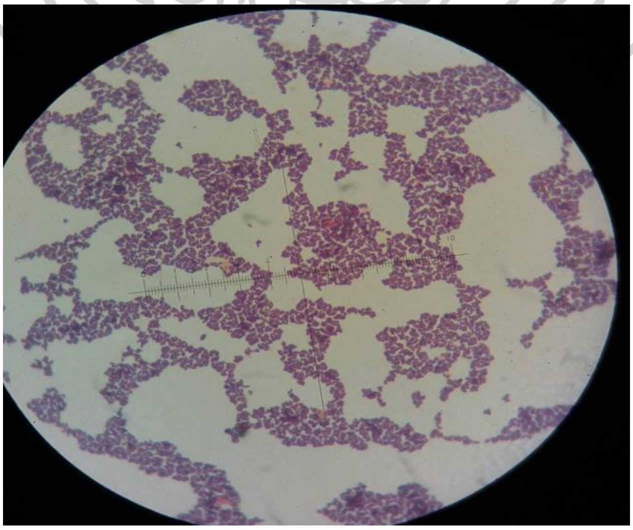
Barium chloride 0.048 M (1.175%W/V $BaCl_2.H_2O$)	0.5	ml
Sulfuric acid 0.35 N (1% V/V)	99.5	ml

นำ Barium chloride ผสมกับ Sulfuric acid จะได้สารละลาย McFarland Standard No. 0.5 และเมื่อนำไปตรวจเช็คด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 nm ควรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.08 - 1.0

ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1) Gram's stain

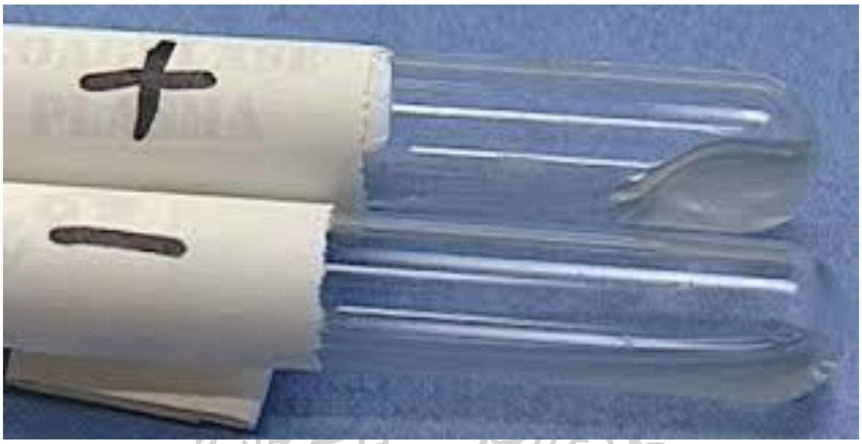
ทดสอบการติดสีและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการเขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อมากระจายตัวในหยดน้ำแล้วเกลี่ยเป็นแผ่นบาง ๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง หยด crystal violet บนสไลด์ทิ้งไว้ 10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด Gram's iodine ทิ้งไว้ 10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วเทแอลกอฮอล์ 95% บนสไลด์แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด safranin ลงบนสไลด์ทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นซับด้วยกระดาษกรองจนแห้ง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการติดสีและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียถ้าเป็นเชื้อแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน-ม่วงของ crystal violet รูปร่างกลมเรียงตัวกันคล้ายพวงองุ่น (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 Gram positive cocci

2) Coagulase test

ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสซึ่งจะเปลี่ยนไฟบริโนเจนในพลาศม่าให้เป็นก้อนไฟบริน (fibrin clot) ซึ่งจะใช้การทดสอบแบบ tube test โดยใช้ Human plasma แบ่งใส่ Sterile Tube ๆ ละ 1 ml จากนั้นเขี่ยเชื้อผสมกับเข้ากันกับ plasma นำไปบ่มที่ 37° C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่ออ่านผลเบื้องต้นหากให้ผลลบ ให้บ่มต่ออีก 18-24 ชั่วโมง ถ้าผลเป็นบวกคือ ถ้าเกิดการแข็งตัวของพลาสมา (Clot) ถ้าผลเป็นลบ คือ ไม่มีการแข็งตัวของพลาสมา (No Clot) (ภาพที่ 16)



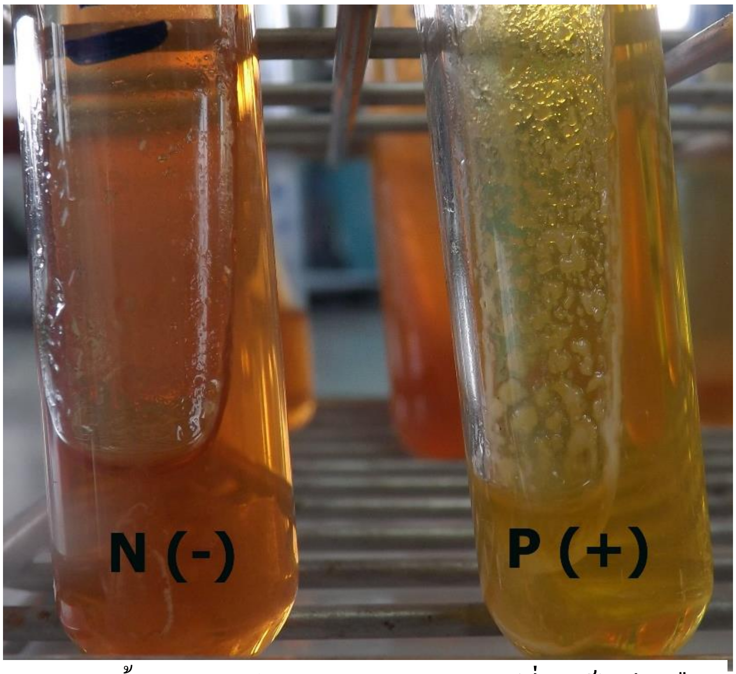
ภาพที่ 16 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลส: ผลบวก เกิดการแข็งตัวของพลาสมา; *ผลลบ ไม่มีการแข็งตัวของพลาสมา*

3) Mannitol fermentation

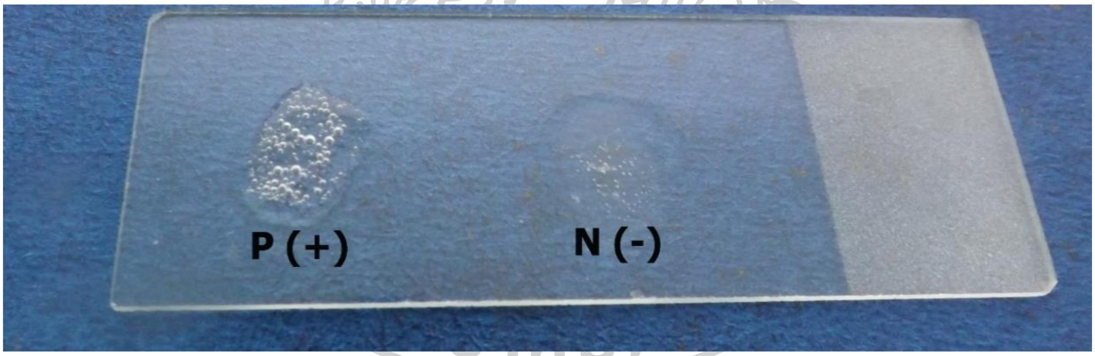
ทดสอบการหมักน้ำตาลแมนนิทอลของเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร Mannitol Salt Agar (MSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจผลการใช้น้ำตาลแมนนิทอลแล้วเกิดกรด โดยสังเกตสีของฟีนอลเรดที่เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 17)

4) Catalase test

ทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส โดยหยด H_2O_2 3% ลงบนสไลด์ และเขี่ยเชื้อมาแตะลงในสไลด์และหยด H_2O_2 สังเกตการเกิดฟองแก๊สที่เกิดขึ้น ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นคือผลเป็นบวก แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คาตาเล ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นคือผลเป็นลบ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 ผลทดสอบการหมักน้ำตาลแมนนิทอล ผลบวกอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง; ผลลบอาหารไม่เปลี่ยนสี



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส ผลบวกเกิดฟองแก๊ส ผลลบไม่เกิดฟองแก๊ส

5) β- haemolysis

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (haemolysis) ของเชื้อ วิธีทดสอบ โดยทำการเลี้ยงเชื้อลงบน blood agar (BA) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่ได้และการสลายเม็ดเลือดแดง โดยโคโลนีจะมีขนาดเล็ก นูน ขุ่น สีครีม สามารถสลายเม็ดเลือดแดง โดยสังเกตเห็น clear zone รอบ ๆ โคโลนี (β - haemolysis) (ภาพที่ 21)

ภาพที่ 19 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ผลบวกคือเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีสีขาวขุ่น นูน

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

1. Disc diffusion

ทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ตามวิธีการของ Kirby-Bauer โดยแผ่นยาต้านจุลชีพมาตรฐาน 11 ชนิด (ตารางที่ 2) ใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้ออ้างอิง มีขั้นตอนวิธีทำดังนี้

1) นำเชื้อทดสอบมาเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง

2) ปรับความขุ่นของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงใน NaCl 0.85% ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard หรือมีปริมาณเชื้อ 1 X 108. CFU/ml

3) นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมได้ นำไปป้ายบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (หนา 4 ซม.) โดยลากเส้นผ่านศูนย์กลางแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ให้ทั่วผิวหน้า โดยจะป้ายทั้งหมด 3 ระนาบ เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้า แล้วจึงป้ายรอบจานเพาะเลี้ยง อาจทำซ้ำไปมาประมาณ 2 – 3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อกระจายทั่วจานเพาะเลี้ยงในปริมาณที่เท่ากัน

4) ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารที่ป้ายไว้แล้วแห้ง แล้วจึงใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อ รอจนปากคีบเย็นแล้วคีบแผ่นยาปฏิชีวนะ วางบนผิวหน้าอาหาร

ที่ป้ายเชื้อไว้แล้ว การวางแผ่นยาปฏิชีวนะไม่ควรเกิน 5 แผ่น/จาน ควรวางห่างจากขอบจานอาหาร 15 mm และวางห่างกันอย่างน้อย 3 cm

5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

6) อ่านผลด้านหลังของจานเพาะเลี้ยง โดยวัดขนาดของเคลียร์โซน (inhibition zone) (บริเวณวงใสรอบแผ่นยาที่ไม่มีเชื้อเจริญ) ที่เกิดจากยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเป็นมิลลิเมตร

7) นำค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ที่เกิดจากยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดไปเปรียบเทียบกับค่า inhibition zone มาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 2 เพื่อดูความสามารถของเชื้อที่ทดสอบที่มีต่อยาปฏิชีวนะว่ามีความไว (sensitive; S), กึ่งกลาง (intermediate; I) หรือดื้อ (resistant; R) ต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบและนำมาเขียนเป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยานั้นๆ โดยอ้างอิงจาก Clinical laboratory standards institute(CLSI, 2015)

2. หาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth Microdilution

ศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาของเชื้อ (Antibiogram) โดยหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของยาที่ใช้ทดสอบคือ Oxacillin และ Vancomycin และใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เป็นเชื้ออ้างอิง วิธีการทดสอบคือ

1) ถ่ายอาหาร Mueller-Hinton broth ลงใน 96 well plate ปริมาตรหลุมละ 50 μl ระบุระดับความเข้มข้นของแต่ละหลุม ดังนี้ 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 μg/ml (oxacillin)128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.และ 0.25 μg/ml (vancomycin)

2) ปิเปตสารละลายยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 3) ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 256 μg/ml ปริมาตร 50 μl ลงใน well ที่เขียนระบุระดับความเข้มข้น 64 μg/ml ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 50 μl ลงใน well ที่เขียนระบุระดับความเข้มข้น 32 μg/ml ผสมให้เข้ากัน แล้วทำซ้ำเช่นนี้จนถึง well ที่เขียนระบุระดับความเข้มข้น 0.125 μg/ml จากนั้นเมื่อผสมสารเข้ากันดีแล้ว ปิเปตสารละลายใน well สุดท้ายทิ้งไปปริมาตร 50 μl

3) ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ โดยนำโคโลนีของเชื้อผสมลงในสารละลาย 0.85% NaCl ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standards ส่งผลให้เชื้อมีจำนวน 1×10^8 CFU/ml และถ่ายเชื้อปริมาตร 50 μl ลงใน well ทั้ง 11 well ผสมให้เข้ากัน เชื้อในแต่ละ well จะมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^5 CFU/ml

4) นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

5) อ่านค่า MIC จาก well ที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ และวิเคราะห์ค่า breakpoint โดยอ้างอิงจาก National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2013)

การสกัด DNA

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Tiago และคณะ, 2015

1) นำเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงใน Brain heart broth (BHB) มาใส่หลอด microcentrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ 12,396 x g นาน 5 นาทีและดูดส่วนใส (Supernatant) ออก

2) เติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 25 mM NaCl, 1% SDS, pH 8.0) 600 µl วางทิ้งไว้ 5 นาที และนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65°c นาน 30 นาที

3) เติม phenol/chloroform : isoamyl alcohol [1:1 (24:1)] ในปริมาตรที่เท่ากันและปั่นเหวี่ยงที่ 10000 x g นาน 5 นาที และเก็บส่วนใสด้านบนไปใส่หลอด microcentifuge ใหม่

4) เติม 100 % ethanol ในปริมาณ 2 เท่า นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5) ปั่นเหวี่ยงที่ 14549 x g เป็นเวลา 30 นาที และ ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 x g เป็นเวลา 5 นาที

6) เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl (ph 8.0)) 30 µl เก็บไว้ที่ -20 °C

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 14 ส่วนผสมการทำปฏิกิริยา PCR

ชื่อยีน	สารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้าย (1 reatcion)	ปริมาณ (µl)	Reference
*fem*A	10x PCR buffer	1x PCR Buffer	5	Neda *et al*., (2015)
	50 mM $MgCl_2$	3 mM $MgCl_2$	3	
	10 mM dNTPs	200 µM dNTPs	1	
	10 µM of each forward primer	1 µM (*fem*A)	5 (*fem*A)	
	10 µM of each reverse primer	1 µM (*fem*A)	5 (*fem*A)	
	Template DNA		2	
	5 U Taq polymerase	2.5 U Taq polymerase	0.5	
	น้ำกลั่น		8.5	
*bla*Z และ *mec*A	10x PCR buffer	1x PCR Buffer	5	Wilailuckana, (2005)
	50 mM $MgCl_2$	1.5 mM $MgCl_2$	1.5	
	10 mM dNTPs mix	200 µM dNTPs	1	
	10 µM of each forward primer	0.5 µM of each forward primer	2.5 each primer	
	10 µM of each reverse primer	0.5 µM of each reverse primer	2.5 each primer	
	Template DNA		1	
	5 U Taq polymerase	2.5 U Taq polymerase	0.5	
	น้ำกลั่น		31	
*erm*A, *tet*K และ *tet*M	10x PCR buffer	1x PCR Buffer	2.5	Strommenger *et al*., (2003)
	50 mM $MgCl_2$	1.5 mM $MgCl_2$	0.75	
	10 mM dNTPs mix	200 µM dNTPs	0.5	
	10 µM of each forward primer	0.25 µM of each forward primer	0.6 each primer	
	10 µM of each reverse primer	0.25 µM of each forward primer	0.6 each primer	
	Template DNA		2	
	5 U Taq polymerase	1.25 U Taq polymerase	0.25	
	น้ำกลั่น		17.8	

ตารางที่14 ส่วนผสมการทำปฏิกิริยา PCR (ต่อ)

ชื่อยีน	สารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้าย (1 reatcion)	ปริมาณ (µl)	Reference
	10x PCR buffer	1x PCR Buffer	2.5	
	50 mM $MgCl_2$	1.0 mM $MgCl_2$	0.5	
	10 mM dNTPs mix	200 µM dNTPs	0.5	
	10 µM of each forward primer	0.3 µM of each forward primer	0.75	Ishino, *el al*
aac (6′)/*aph*(2″)	10 µM of each reverse primer	0.3 µM of each reverse primer	0.75	(2006)
	Template DNA		2	
	5 U Taq polymerase	0.4 U Taq polymerase	0.25	
	น้ำกลั่น		17.75	

การเตรียม Agarose gel

เตรียม 1 % Agarose gel ละลายใน 1X TAE buffer นำไปละลายจนกระทั่งละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 50-60 ºC ประกบ chamber เข้ากับ comb เข้าด้วยกัน จากนั้นเท agarose gel ใส่ chamber ตั้งทิ้งให้เจลแข็งตัวหลังจากเจลแข็งตัวแล้วดึง comb ออก จากนั้นนำ agarose gel ที่มีแม่พิมพ์วางใน electrophoresis chamber โดยหันด้านที่มีหลุม (origin) ไปทางขั้วลบ และเติม 1X TAE buffer จนท่วมผิวหน้าของ gel

การทำ Gel electrophoresis

การเตรียมตัวอย่าง : ผสม PCR product 10 µl กับ loading dye 5 µl

การเตรียม ladder : DNA marker (100 bp DNA ladder) 10 µl marker

ขั้นตอนการ run gel : ทำการ load PCR product ที่ผสมใน loading dye ลงในแต่ละหลุมโดยหลุมแรกจะ load marker ลงไปก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบจากนั้นจึง load PCR product ตามลงไปในหลุมอื่นๆ จากนั้นจึงทำการ run gel (ใน TAE buffer) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ให้ตรงขั้วประจุไฟฟ้า โดยขั้วลบจะอยู่ด้าน loading well เมื่อ run gel เสร็จโดยสังเกตได้จากสีของ bromphenol blue ที่เคลื่อนที่ไปใกล้ขอบเจลอีกด้านและจึงหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้านำไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำกลั่นอีก 15 นาที จากนั้นนำไปส่อง UV ด้วยเครื่อง UV light transilluminator เพื่อดูแถบของ PCR product ที่เกิดบนวุ้น

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลดิบและผลการทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างที่เก็บตามสถานที่ต่างๆ (ป้ายเชื้อ) ในโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐมทั้งหมด 69 ตัวอย่าง

หมายเลขเชื้อ	ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	การทดสอบทางชีวเคมี			
				catalase	coagulase	mannitol	β-haemolytic
5-142	เสมหะ	ICU แผนกศัลยกรรม	11/05/57	+	+	+	+
6-106	หนอง	แผนกศัลยกรรม	22/05/57	+	+	+	+
1-588	เลือด	แผนกศัลยกรรม	14/05/57	+	+	+	+
6-57	เท้า (ซ้าย)	ห้องพิเศษศัลยกรรม	14/05/57	+	+	+	+
6-60	cavafix - ป้ายเชื้อ	แผนกศัลยกรรม	14/05/57	+	+	+	+
5-24	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมหญิง	03/06/57	+	+	+	+
5-398	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมชาย	28/05/57	+	+	+	+
6-87	ขา (ซ้าย)	แผนกกระดูกชาย	18/06/57	+	+	+	+
6-46	รักแร้ (ขวา)	แผนกศัลยกรรมหญิง	11/05/57	+	+	+	+
5-124	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมชาย	10/05/57	+	+	+	+
5-140	เสมหะ	ICU แผนกอายุรกรรม	11/05/57	+	+	+	+
5-319	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมชาย	22/05/57	+	+	+	+
6-110	หนอง	แผนกศัลยกรรมชาย	22/05/57	+	+	+	+
5-200	เสมหะ	ตึกผู้ป่วยพิเศษ	11/05/57	+	+	+	+
1-664	เลือด	ICUแผนกกุมารเวชกรรม	16/05/57	+	+	+	+
5-189	จมูก(ขวา)	แผนกล้างช่องไต	14/05/57	+	+	+	+
5-226	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมหญิง	16/05/57	+	+	+	+
5-263	เสมหะ	แผนกศัลยกรรมประสาท	18/05/57	+	+	+	+
1-643	เลือด	ICUแผนกกุมารเวชกรรม	15/05/57	+	+	+	+
2-59	ปัสสาวะ	ห้องผู้ป่วยพิเศษรวม	4/05/57	+	+	+	+
1-1234	เลือด	แผนกอายุรกรรมหญิง	28/05/57	+	+	+	+
5-402	เสมหะ	แผนกศัลยกรรมหญิง	28/05/57	+	+	+	+
6-133	หัวไหล่	ห้องผู้ป่วยพิเศษ	29/05/57	+	+	+	+
6-20	แขน (ซ้าย)	แผนกศัลยกรรมหญิง	05/06/57	+	+	+	+

หมายเลขเชื้อ	ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	การทดสอบทางชีวเคมี			
				catalase	coagulase	mannitol	β-haemolytic
6-74	หลัง	แผนกศัลยกรรม	14/06/57	-	-	+	-
6-80	หนอง	OPDแผนกอายุรกรรม	17/06/57	+	+	+	+
5-53	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมหญิง	17/06/57	-	-	+	+
5-231	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมหญิง	17/06/57	+	+	+	+
5-261	เสมหะ	ICUแผนกกุมารเวชกรรม	18/05/57	+	+	+	+
5-411	เสมหะ	แผนกอายุรกรรมหญิง	29/05/57	+	+	+	+
6-147	คอ	แผนกอายุรกรรมหญิง	30/05/57	+	+	+	+
6-103	ท้อง	แผนกล้างช่องไต	22/05/57	+	+	+	+
6-127	หนอง	แผนกกุมารเวชกรรม	28/05/57	+	+	+	+
6-63	หู	แผนกกุมารเวชกรรม	15/05/57	+	+	+	+
5-63	หนอง	แผนกอายุรกรรมหญิง	04/06/57	+	-	+	-
6-122	หนอง	แผนกสูติกรรม	26/05/57	-	-	+	+
1-115	เลือด	พิเศษรวม	04/05/57	-	-	+	-

ตัวอย่างป้ายเชื้อ

หมายเลขเชื้อ	ตัวอย่างป้ายเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	การทดสอบทางชีวเคมี			
				catalase	coagulase	mannitol	β-haemolytic
Sw1	เตียงผู้ป่วย	แผนกศัลยกรรม	19/06/57	+	+	+	+
Sw2	พื้น	แผนกศัลยกรรม	19/06/57	-	-	-	-
Sw3	ราวบันได	ตึกผู้ป่วยพิเศษ ชั้น 2	19/06/57	-	-	+	-
Sw4	พื้น	ตึกผู้ป่วยพิเศษ ชั้น 3	19/06/57	+	+	+	+
Sw5	พื้น	ตึกผู้ป่วยพิเศษ ชั้น 4	19/06/57	-	-	+	-
Sw6	เตียงผู้ป่วย	ตึกผู้ป่วยพิเศษ ชั้น 5	25/06/57	-	-	-	-
Sw7	เตียงผู้ป่วย	ห้องผู้ป่วยพิเศษรวม	25/06/57	+	+	+	+
Sw8	พื้นห้องน้ำ	ห้องผู้ป่วยพิเศษรวม	25/06/57	+	+	+	+
Sw9	พื้นทางเดิน	ตึกผู้ป่วยพิเศษ	25/06/57	-	-	-	-
Sw10	พื้นบันได	ตึกผู้ป่วยพิเศษ	25/06/57	+	+	+	+
Sw11	พื้น	ห้องผู้ป่วยพิเศษรวม	30/06/57	+	+	+	+

หมายเลขเชื้อ	ตัวอย่างป้ายเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	การทดสอบทางชีวเคมี			
				catalase	coagulase	mannitol	β-haemolytic
Sw12	พื้น	แผนกอายุรกรรมชาย	30/06/57	+	+	+	+
Sw13	ราวบันได	แผนกอายุรกรรมชาย	30/06/57	+	+	+	+
Sw14	เตียงผู้ป่วย	แผนกไตเทียม	30/06/57	+	+	+	+
Sw15	พื้น	แผนกไตเทียม	30/06/57	+	+	+	+
Sw16	ราวบันได	แผนกศัลยกรรมหญิง	30/06/57	-	-	-	-
Sw17	พื้น	แผนกศัลยกรรมหญิง	10/07/57	-	-	+	-
Sw18	พื้นห้องน้ำ	แผนกศัลยกรรมหญิง	10/07/57	-	-	-	-
Sw19	เตียงผู้ป่วย	แผนกล้างช่องไต	10/07/57	+	+	+	+
Sw20	พื้นห้องน้ำ	แผนกล้างช่องไต	10/07/57	+	+	+	+
Sw21	พื้นบันได	แผนกล้างช่องไต	10/07/57	+	+	+	+
Sw22	ราวบันได	แผนกล้างช่องไต	10/07/57	+	+	+	+
Sw23	พื้น	ตึกอุบัติเหตุ	10/07/57	-	-	-	-
Sw24	พื้นทางเดิน	ตึกอุบัติเหตุ	10/07/57	+	+	+	+
Sw25	พื้นบันได	ตึกอุบัติเหตุ	17/07/57	+	+	+	+
Sw26	พื้นห้องน้ำ	ตึกอุบัติเหตุ	17/07/57	+	+	+	+
Sw27	เตียงผู้ป่วย	ตึกอุบัติเหตุ	17/07/57	+	+	+	+
Sw28	ราวบันได	ตึกอุบัติเหตุ	17/07/57	-	-	-	-
Sw29	พื้น	แผนกไตเทียม	17/07/57	+	+	+	+
Sw30	พื้น	ICU กุมารเวชกรรม	17/07/57	+	+	+	+
Sw31	พื้นห้องน้ำ	แผนกกุมารเวชกรรม	17/07/57	+	+	+	+
Sw32	เตียงผู้ป่วย	ICU กุมารเวชกรรม	17/07/57	+	+	+	+
Sw33	พื้นบันได	แผนกกุมารเวชกรรม	17/07/57	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 16 แสดงผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (sp)

	Zone diameter (mm)										
	S $\geq$ 29 R $\leq$ 26	S $\geq$ 23 R $\leq$ 13	S $\geq$ 19 R $\leq$ 14	S $\geq$ 18 R $\leq$ 12	S $\geq$ 22 R $\leq$ 21	S $\geq$ 15 R $\leq$ 12	S $\geq$ 21 R $\leq$ 15	S $\geq$ 20 R $\leq$ 16	S $\geq$ 16 R $\leq$ 10	S $\geq$ 21 R $\leq$ 20	S $\geq$ 21 R $\leq$ 14
ยาต้านจุลชีพ ไอโซเลท	Penicillin (P)	Erytromycin (E)	Tetracycline (TE)	Chloramphenical (C)	Cefoxitin (FOX)	Gentamicin (GEN)	Ciprofloxacin (CIP)	Rifampin (R)	Sulfamethozazole/ Trimethoprim (SXT)	Linezolid (LZD)	Clindamycin (DA)
6-60 (Sp1)	10	30	16	25	25	27	35	35	30	35	37
5-24 (Sp2)	9	0	14	30	10	30	35	32	30	35	35
6-106 (Sp3)	10	0	30	30	0	15	0	40	35	42	0
1-643 (Sp4)	15	30	15	25	28	12	12	22	22	35	0
6-127 (Sp5)	12	30	25	25	32	35	30	35	25	33	33
5-142 (Sp6)	12	0	12	30	19	27	35	30	0	30	35
6-57 (Sp7)	10	0	16	35	27	17	21	30	0	30	0
6-87 (Sp8)	0	0	19	30	20	30	21	35	22	35	0
5-398 (Sp9)	25	35	15	33	30	16	10	35	25	35	0
1-588(Sp10)	11	0	14	30	22	28	30	35	22	30	30
6-20 (Sp11)	11	32	29	30	23	10	11	35	24	35	0
1-664(Sp12)	15	33	13	28	26	25	30	30	25	30	30
5-261 (S13)	18	13	25	28	33	25	35	32	25	30	30
5-189(Sp14)	15	30	25	30	30	26	35	38	25	30	30
6-147(Sp15)	15	13	30	30	31	20	30	30	25	32	30
6-133(Sp16)	15	30	30	32	24	35	35	30	25	30	29
5-263(Sp17)	10	10	27	28	29	30	32	30	25	30	30
6-46 (Sp18)	10	12	26	30	25	30	40	28	25	29	30

ตารางที่16 แสดงผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (sp)(ต่อ)

	Zone diameter (mm)										
	S ≥ 29 R ≤ 26	S ≥ 23 R ≤ 13	S ≥ 19 R ≤ 14	S ≥ 18 R ≤ 12	S ≥ 22 R ≤ 21	S ≥ 15 R ≤ 12	S ≥ 21 R ≤ 15	S ≥ 20 R ≤ 16	S ≥ 16 R ≤ 10	S ≥ 21 R ≤ 20	S ≥ 21 R ≤ 14
ยาต้านจุลชีพ ไอโซเลท	Penicillin (P)	Erytromycin (E)	Tetracycline (TE)	Chloramphenical (C)	Cefoxitin (FOX)	Gentamicin (GEN)	Ciprofloxacin (CIP)	Rifampin (R)	Sulfamethozazole/ Trimethoprim (SXT)	Linezolid (LZD)	Clindamycin (DA)
5-124 (Sp19)	10	25	25	30	23	30	22	28	25	30	30
5-140 (Sp20)	12	22	29	30	25	31	35	30	24	30	30
6-110 (Sp21)	12	28	30	30	25	34	30	32	25	31	32
5-319 (Sp22)	15	14	30	30	25	34	30	30	25	32	30
5-200 (Sp23	13	32	30	29	25	35	35	32	25	34	32
5-226 (Sp24)	14	14	30	32	24	35	35	32	28	33	31
2-59 (Sp25)	18	30	30	30	25	34	35	32	25	31	32
1-1234(Sp26)	15	30	30	34	25	32	35	30	24	33	33
5-402 (Sp27)	11	14	30	31	32	25	30	30	25	33	31
6-80 (Sp28)	13	29	30	32	33	27	34	34	28	35	33
5-231 (Sp29)	40	25	30	33	30	25	30	30	25	30	30
5-411 (Sp30)	18	26	30	35	30	25	30	30	25	28	30
6-63 (Sp31)	15	12	26	30	30	22	33	30	22	27	26
รวม	S= 1, R= 30	S= 17, R= 14	S= 27, R= 4	S= 31, R= 0	S= 27, R= 4	S= 29, R=2	S= 27, R= 4	S= 31, R= 0	S= 29, R= 2	S= 31, R= 0	S= 25, R= 6

ตารางที่ 17 แสดงผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธี ป้ายเชื้อ (sw)

	Zone diameter (mm)										
	$S \geq 29$ $R \leq 26$	$S \geq 23$ $R \leq 13$	$S \geq 19$ $R \leq 14$	$S \geq 18$ $R \leq 12$	$S \geq 22$ $R \leq 21$	$S \geq 15$ $R \leq 12$	$S \geq 21$ $R \leq 15$	$S \geq 20$ $R \leq 16$	$S \geq 16$ $R \leq 10$	$S \geq 21$ $R \leq 20$	$S \geq 21$ $R \leq 14$
ยาต้านจุลชีพ / ไอโซเลท	Penicillin (PEN)	Erytromycin (ERY)	Tetracycline (TE)	Chloramphenical (CHLO)	Cefoxitin (FOX)	Gentamicin (GEN)	Ciprofloxacin (CIP)	Rifampin (R)	Sulfamethozazole/ Trimethoprim (SXT)	Linezolid (LZD)	Clindamycin (DA)
Sw1	30	30	30	31	30	30	35	34	25	33	26
Sw2	15	34	35	20	0	18	35	38	18	34	23
Sw3	30	25	29	30	30	29	36	20	25	29	22
Sw4	25	20	34	35	30	31	40	36	24	36	26
Sw5	40	38	40	42	40	29	33	40	24	40	32
Sw6	14	21	23	30	18	18	32	30	25	30	30
Sw7	13	25	26	30	30	21	38	30	25	31	30
Sw8	25	30	32	35	20	30	29	38	13	32	13
Sw9	32	35	12	22	0	32	40	28	15	32	34
Sw10	9	11	14	20	13	30	35	29	20	30	14
Sw11	29	30	30	28	35	30	31	32	13	33	14
Sw12	14	28	28	28	32	25	33	29	21	30	34
Sw13	11	28	31	21	15	32	35	35	25	35	13

ตารางที่17 แสดงผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธี ป้ายเชื้อ (sw) (ต่อ)

	Zone diameter (mm)										
	S $\geq$ 29 R $\leq$ 26	S $\geq$ 23 R $\leq$ 13	S $\geq$ 19 R $\leq$ 14	S $\geq$ 18 R $\leq$ 12	S $\geq$ 22 R $\leq$ 21	S $\geq$ 15 R $\leq$ 12	S $\geq$ 21 R $\leq$ 15	S $\geq$ 20 R $\leq$ 16	S $\geq$ 16 R $\leq$ 10	S $\geq$ 21 R $\leq$ 20	S $\geq$ 21 R $\leq$ 14
ยาต้านจุลชีพ / ไอโซเลท	Penicillin (PEN)	Erytromycin (ERY)	Tetracycline (TE)	Chloramphenical (CHLO)	Cefoxitin (FOX)	Gentamicin (GEN)	Ciprofloxacin (CIP)	Rifampin (R)	Sulfamethozazole/ Trimethoprim (SXT)	Linezolid (LZD)	Clindamycin (DA)
Sw14	22	32	35	30	35	30	39	35	32	35	37
Sw15	35	35	36	29	9	35	40	23	25	35	29
Sw16	40	30	32	19	20	30	32	35	28	35	34
Sw17	40	39	35	31	20	30	38	35	20	36	21
Sw18	19	30	15	30	30	30	35	35	15	32	30
Sw19	22	35	30	29	35	30	38	34	20	35	35
Sw20	10	29	12	25	17	30	38	17	30	35	25
Sw21	30	29	30	30	30	26	32	30	21	30	25
Sw22	15	20	30	32	34	30	36	35	30	34	32
Sw23	20	30	35	30	35	30	33	34	20	32	33
รวม	S = 8 R = 15	S = 21 R = 2	S = 20 R = 3	S = 23 R = 0	S = 13 R = 10	S = 23 R = 0	S = 23 R = 0	S = 23 R = 0	S = 21 R = 2	S = 23 R = 0	S = 20 R = 3
รวม SP+SW	S = 9 R = 45	S = 38 R = 16	S = 47 R = 7	S = 54 R = 0	S = 40 R = 14	S =52 R = 2	S = 50 R = 4	S =54 R =0	S = 50 R = 4	S = 54 R = 0	S = 45 R = 9

ตารางที่ 18 แสดงผลของการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งเชื้อ S. aureus ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

	MIC (µg/ml)																				
	Oxacillin (Quality control = 0.12-0.5 µg/ml)											Vancomycin (Quality control = 0.5-2 µg/ml)									
ยาต้านจุลชีพ / ไอโซเลท	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
6-60 (Sp1)																					
5-24 (Sp2)																					
6-106 (Sp3)																					
1-643 (Sp4)																					
6-127 (Sp5)																					
5-142 (Sp6)																					
6-57 (Sp7)																					
6-87 (Sp8)																					
5-398 (Sp9)																					
1-588(Sp10)																					
6-20 (Sp11)																					
1-664(Sp12)																					
5-261 (S13)																					
5-189(Sp14)																					
6-147(Sp15)																					
6-133(Sp16)																					
5-263(Sp17)																					
6-46 (Sp18)																					

ตารางที่18 แสดงผลของการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย(ต่อ)

	MIC (µg/ml)																				
	Oxacillin (Quality control = 0.12-0.5 µg/ml)											Vancomycin (Quality control = 0.5-2 µg/ml)									
ยาต้านจุลชีพ / ไอโซเลท	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
5-124 (Sp19)																					
5-140 (Sp20)																					
6-110 (Sp21)																					
5-319 (Sp22)																					
5-200 (Sp23																					
5-226 (Sp24)																					
2-59 (Sp25)																					
1-1234(Sp26)																					
5-402 (Sp27)																					
6-80 (Sp28)																					
5-231 (Sp29)																					
5-411 (Sp30)																					
6-63 (Sp31)																					
รวม	Susceptible = 25 Resistance = 6											Susceptible = 31 Resistance = 0									

= No growth = Bacteria Growth

ตารางที่ 19 แสดงผลของการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธีป้ายเชื้อ

	MIC (μg/ml)																				
	Oxacillin (Quality control = 0.12-0.5 μg/ml)											Vancomycin (Quality control = 0.5-2 μg/ml)									
ยาต้านจุลชีพ ไอโซเลท	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Sw1																					
Sw2																					
Sw3																					
Sw4																					
Sw5																					
Sw6																					
Sw7																					
Sw8																					
Sw9																					
Sw10																					
Sw11																					
Sw12																					
Sw13																					
Sw14																					
Sw15																					
Sw16																					
Sw17																					
Sw18																					

ตารางที่19 แสดงผลของการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธีป้ายเชื้อ (ต่อ)

	MIC (µg/ml)																				
	Oxacillin (Quality control = 0.12-0.5 µg/ml)											Vancomycin (Quality control = 0.5-2 µg/ml)									
ยาต้านจุลชีพ / ไอโซเลท	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Sw19																					
Sw20																					
Sw21																					
Sw22																					
Sw23																					
รวม	Susceptible = 13 Resistance = 7											Susceptible = 23 Resistance = 0									
รวม SP+SW	S = 38 R = 16											S = 54 R = 0									

(grey box) = No growth (yellow box) = Bacteria Growth

ตารางที่ 19 รูปแบบการดื้อยาต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

ยาต้านจุลชีพ	รูปแบบการดื้อยา																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
PEN	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
ERY	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S
TE	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
CHLO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FOX	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S
GEN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CIP	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S
R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SXT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
LZD	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DA	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
OXA	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Specimen (ร้อยละ)	12 (38.7)	-	8 (25.8)	1 (3.2)	-	-	-	-	1 (3.2)	-	1 (3.2)	1 (3.2)	1 (3.2)	-	-	1 (3.2)	1 (3.2)	1 (3.2)	-	1 (3.2)	1 (3.2)	1 (3.2)
Swab (ร้อยละ)	7 (30.4)	2 (4.3)	1 (4.3)	-	1 (4.3)	1 (4.3)	1 (4.3)	1 (4.3)	-	1 (4.3)	-	-	-	1 (4.3)	1 (4.3)	1 (4.3)	-	-	1 (4.3)	-	-	4 (17.4)
รวม	19 (35.2)	2 (3.7)	9 (16.6)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	2 (3.7)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	5 (9.2)
								Multidrug resistant = 16 ไอโซเลท														

ตารางที่ 20 แสดงผลการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพเชื้อ *S. aureus* ที่พบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (Sp)

Isolate	Positive	Resistance gene						Isolate	Positive	Resistance gene					
	*fem*A	*bla*Z	*mec*A	*aac* (6′)/*aph*(2″)	*erm*A	*tet*K	*tet*M		*fem*A	*bla*Z	*mec*A	*aac*(6′)/*aph*(2)	*erm*A	*tet*K	*tet*M
6-60 (Sp1)	+	+	-	-	-	+	+	5-124 (Sp19)	+	+	-	-	-	-	-
5-24 (Sp2)	+	+	+	-	+	+	-	5-140 (Sp20)	+	+	-	-	+	-	-
6-106 (Sp3)	+	+	+	+	+	-	-	6-110 (Sp21)	+	+	-	-	-	-	-
1-643 (Sp4)	+	+	-	+	-	+	-	5-319 (Sp22)	+	+	-	-	+	-	-
6-127 (Sp5)	+	+	-	-	-	-	-	5-200 (Sp23	+	+	-	-	-	-	-
5-142 (Sp6)	+	+	+	-	+	+	+	5-226 (Sp24)	+	+	-	-	+	-	-
6-57 (Sp7)	+	+	+	+	+	+	-	2-59 (Sp25)	+	+	-	-	-	-	-
6-87 (Sp8)	+	+	+	-	+	-	-	1-1234(Sp26)	+	+	-	-	-	-	-
5-398 (Sp9)	+	+	-	-	-	-	+	5-402 (Sp27)	+	+	-	-	+	-	-
1-588(Sp10)	+	+	+	-	+	+	+	6-80 (Sp28)	+	+	-	-	-	-	-
6-20 (Sp11)	+	+	-	+	-	-	-	5-231 (Sp29)	+	-	-	-	-	-	-
1-664(Sp12)	+	+	-	-	-	+	+	5-411 (Sp30)	+	+	-	-	-	-	-
5-261 (S13)	+	+	-	-	+	-	-	6-63 (Sp31)	+	+	-	-	+	-	-
5-189(Sp14)	+	+	+	-	-	-	-								
6-147(Sp15)	+	+	-	-	-	-	-								
6-133(Sp16)	+	+	-	-	-	-	-								
5-263(Sp17)	+	+	-	-	+	-	-								
6-46 (Sp18)	+	+	-	-	+	-	-	(+) =Positive resistance gene ;							
รวม	(+)= 31 (-) = 0	(+)=30 (-) = 0	(+)= 7 (-) = 24	(+)= 4 (-) = 27	(+)= 14 (-) = 17	(+)= 7 (-) =24	(+)= 5 (-) = 26	(-) = Negative resistance gene							

ตารางที่ 21 แสดงผลการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพเชื้อ *S. aureus* ที่ตรวจพบในตัวอย่างป้ายเชื้อ (Sw)

Isolate	Positive	Resistance gene						Isolate	Positive	Resistance gene					
	*fem*A	*bla*Z	*mec*A	*aac* (6')/*aph*(2'')	*erm*A	*tet*K	*tet*M		*fem*A	*bla*Z	*mec*A	*aac* (6')/*aph*(2'')	*erm*A	*tet*K	*tet*M
Sw1	+	-	-	-	-	-	-	Sw15	+	-	+	-	-	-	-
Sw2	+	+	+	+	-	-	-	Sw16	+	-	-	-	-	-	-
Sw3	+	+	-	-	-	-	-	Sw17	+	-	-	-	-	-	-
Sw4	+	+	-	-	+	-	-	Sw18	+	+	-	-	+	+	+
Sw5	+	-	-	-	-	-	-	Sw19	+	+	+	-	-	-	-
Sw6	+	+	-	+	+	-	-	Sw20	+	+	-	-	-	+	+
Sw7	+	+	+	-	-	-	-	Sw21	+	+	-	-	-	-	-
Sw8	+	+	+	-	-	-	-	Sw22	+	-	-	-	-	-	-
Sw9	+	+	-	-	-	+	+	Sw23	+	+	-	-	-	-	+
Sw10	+	+	-	-	+	-	+								
Sw11	+	+	+	-	-	-	-								
Sw12	+	+	+	-	-	-	-								
Sw13	+	+	+	-	-	-	-								
Sw14	+	+	-	-	-	-	-								
รวม	(+)= 23 (-) = 0	(+)= 17 (-) = 6	(+)= 8 (-) = 15	(+)= 2 (-) = 21	(+)= 4 (-) = 19	(+)= 3 (-) =20	(+)= 5 (-) = 18								
รวม SP+SW	(+) = 54 (-) = 0	(+) = 47 (-) = 7	(+) = 17 (-) = 37	(+) = 2 (-) = 19	(+) = 18 (-) = 36	(+) = 10 (-) = 44	(+) = 11 (-) = 43	(+) =Positive resistance gene ; (-) = Negative resistance gene							

ตารางที่ 22 การเปรียบเทียบระหว่างผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

ไอโซเลท	แผ่นยาต้านจุลชีพ					MIC	ยีนดื้อยาต้านจุลชีพ					
	PEN	FOX	ERY	GEN	TE	OXA	*blaZ*	*mecA*	*ermA*	*aac(6')/ aph(2'')*	*tetK*	*tetM*
6-60 (Sp1)	R	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	+
5-24 (Sp2)	R	R	R	S	R	R	+	+	+	-	+	-
6-106 (Sp3)	R	R	R	S	S	R	+	+	+	+	-	-
1-643 (Sp4)	R	S	S	R	S	S	+	-	-	+	+	-
6-127 (Sp5)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
5-142 (Sp6)	R	R	R	S	R	R	+	+	+	-	+	+
6-57 (Sp7)	R	S	R	S	S	S	+	+	+	+	+	-
6-87 (Sp8)	R	R	R	S	S	R	+	+	+	-	-	-
5-398 (Sp9)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+
1-588 (Sp10)	R	S	R	S	R	R	+	+	+	-	+	+
6-20 (Sp11)	R	S	S	R	S	R	+	-	-	+	-	-
1-664 (Sp12)	R	S	S	S	R	S	+	-	-	-	+	+
5-261 (Sp13)	R	S	R	S	S	S	+	-	+	-	-	-
5-189 (Sp14)	R	S	S	S	S	S	+	+	-	-	-	-
6-147 (Sp15)	R	S	R	S	S	S	+	-	-	-	-	-
6-133 (Sp16)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
5-263 (Sp17)	R	S	R	S	S	S	+	-	+	-	-	-
6-46 (Sp18)	R	S	R	S	S	S	+	-	+	-	-	-
5-124 (Sp19)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
5-140 (Sp20)	R	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-

ไอโซเลท	แผ่นยาต้านจุลชีพ					MIC	ยีนดื้อยาต้านจุลชีพ					
	PEN	FOX	ERY	GEN	TE	OXA	*blaZ*	*mecA*	*ermA*	*aac(6')/ aph(2'')*	*tetK*	*tetM*
6-110 (Sp21)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
5-319 (Sp22)	R	S	R	S	S	S	+	-	+	-	-	-
5-200 (Sp23	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
5-226 (Sp24)	R	S	R	S	S	S	+	-	+	-	-	-
2-59 (Sp25)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
1-234(Sp26)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
5-402 (Sp27)	R	S	R	S	S	S	+	-	+	-	-	-
6-80 (Sp28)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
5-231 (Sp29)	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-
5-411 (Sp30)	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
6-63 (Sp31)	R	S	R	S	S	S	+	-	+	-	-	-

PEN, penicilin; ERY, erythromycin; TE, tetracycline; FOX, cefoxitin; OXA, oxacillin

S = Susceptible

R = Resistance

(+) =Positive resistance gene ;

(-) = Negative resistance gene

ตารางที่ 23 การเปรียบเทียบระหว่างผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ MIC และยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ S. aureus จากตัวอย่าง ป้ายเชื้อ

ไอโซเลท	แผ่นยาต้านจุลชีพ					MIC	ยีนดื้อยาต้านจุลชีพ					
	PEN	FOX	ERY	GEN	TE	OXA	*blaZ*	*mecA*	*ermA*	*aac(6')/ aph(2'')*	*tetK*	*tetM*
Sw1	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-
Sw2	R	R	S	S	S	R	+	+	-	+	-	-
Sw3	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
Sw4	R	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-
Sw5	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-
Sw6	R	R	S	S	S	S	+	-	+	+	-	-
Sw7	R	S	S	S	S	S	+	+	-	-	-	-
Sw8	R	R	S	S	S	R	+	+	-	-	-	-
Sw9	S	R	S	S	R	R	+	-	-	-	+	-
Sw10	R	R	R	S	R	R	+	-	+	-	-	+
Sw11	R	S	S	S	S	S	+	+	-	-	-	-
Sw12	R	S	S	S	S	S	+	+	-	-	-	-
Sw13	R	R	S	S	S	R	+	+	-	-	-	-
Sw14	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
Sw15	S	R	S	S	S	S	-	+	-	-	-	-
Sw16	S	R	S	S	S	R	-	-	-	-	-	-
Sw17	S	R	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-
Sw18	R	S	S	S	S	S	+	-	+	-	+	+
Sw19	R	S	S	S	S	S	+	+	-	-	-	-
Sw20	R	R	S	S	R	R	+	-	-	-	+	+
Sw21	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-
Sw22	R	S	R	S	S	S	-	-	-	-	-	-
Sw23	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+

PEN, penicilin; ERY, erythromycin; TE, tetracycline; FOX, cefoxitin; OXA, oxacillin

S = Susceptible

R = Resistance

(+) =Positive resistance gene ;

(-) = Negative resistance gene

ตารางที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและตัวอย่างป้ายเชื้อ

กลุ่ม	รูปแบบการดื้อยากับยีนดื้อยาต้านจุลชีพที่ตรวจพบในตัวอย่าง												จำนวนตัวอย่าง		
	PEN	*bla*Z	FOX	OXA	*mec*A	ERY	*erm*A	GEN	*aac*(6')/ *aph*(2'')	TE	*tet*K	*tet*M	ตัวอย่างสิ่งสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (ร้อยละ) (n = 31)	ตัวอย่างป้ายเชื้อ (ร้อยละ) (n = 23)	รวม (ร้อยละ) (n = 54)
1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	Sp1 (3.2)	Sw4 (4.3)	2 (3.7)
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	Sp2 (3.2)	-	1 (1.9)
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+			-	Sp3 (3.2)	-	1 (1.9)
4	+	+	-	-	-	-	-	+	+		+	-	Sp4 (3.2)	-	1 (1.9)
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sp5,Sp16,Sp19,Sp20,Sp23,Sp25,Sp26,Sp27,Sp28, Sp30 (32.3)	Sw5,Sw14 (8.7)	12 (22.2)
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	Sp6 (3.2)	-	1 (1.9)
7	+	+	-	-	+	+	+	-	+		+	+	Sp7 (3.2)	-	1 (1.9)
8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Sp8 (3.2)	-	1 (1.9)
9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Sp9 (3.2)	-	1 (1.9)
10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	Sp10 (3.2)	-	1 (1.9)
11	+	+	-	+	-	-	-	+	+				Sp11 (3.2)	-	1 (1.9)
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	Sp12 (3.2)	-	1 (1.9)
13	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Sp14 (3.2)	Sw7,Sw11,Sw12 (13)	4 (7.4)
14	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Sp15,Sp20 (6.5)	Sw22 (4.3)	3 (5.5)
15	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Sp,13,Sp17,Sp18,Sp22, Sp24,Sp27,Sp31 (22.6)	-	7 (13)
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sp29 (3.2)	Sw1 (4.3)	2 (3.7)
17	+	+	+	+	+	-	-	+		-	-	-	-	Sw2 (4.3)	1 (1.9)
18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sw3 (4.3)	1 (1.9)
19	+	+	+	-	-	-	+		+	-	-	-	-	Sw6 (4.3)	1 (1.9)
20	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Sw8,Sw13,Sw19 (13)	3 (5.5)
21	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Sw9 (4.3)	1 (1.9)
22	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+		+	-	Sw10 (4.3)	1 (1.9)
23	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Sw15 (4.3)	1 (1.9)
24	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sw16 (4.3)	1 (1.9)
25	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sw17 (4.3)	1 (1.9)
26	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	Sw18 (4.3)	1 (1.9)
27	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	Sw20 (4.3)	1 (1.9)
28	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sw21 (4.3)	1 (1.9)
29	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Sw23 (4.3)	1 (1.9)

Sp = ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย; Sw = ตัวอย่างป้ายเชื้อ

ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. aureus* เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK

1. *fem*A

ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีน *fem*A เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK# CP000255

Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_FPR3757, complete genome

Sequence ID: CP000255.1Length: 2872769 Number of Matches: 1

Score	**Expect**	**Identities**	**Gaps**
833 bits(451)	0.0	451/451(100%)	0/451(0%)

Query 1

CGATCCATATTTACCATATCAATACTTGAATCATGATGGCGAGATTACAGGTAATGCT

GG 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397366

CGATCCATATTTACCATATCAATACTTGAATCATGATGGCGAGATTACAGGTAATGCT

GG 1397425

Query 61

TAATGATTGGTTCTTTGATAAAATGAGTAACTTAGGATTTGAACATACTGGATTCCAT

AA 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397426

TAATGATTGGTTCTTTGATAAAATGAGTAACTTAGGATTTGAACATACTGGATTCCAT

AA 1397485

Query 121

AGGATTTGATCCTGTGCTACAAATTCGTTATCACTCAGTGTTAGATTTAAAAGATAAA

AC 180

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397486

AGGATTTGATCCTGTGCTACAAATTCGTTATCACTCAGTGTTAGATTTAAAAGATAAA

AC 1397545

Query 181

AGCAGATGACATCATTAAAAATATGGATGGACTTAGaaaaagaaacacgaaaaaagttaa 240

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397546

AGCAGATGACATCATTAAAAATATGGATGGACTTAGAAAAAGAAACACGAAAAAAG

TTAA 1397605

Query 241

aaaGAATGGTGTTAAAGTAAGATTTTTATCTGAAGAAGAACTACCAATTTTTAGATCAT

T 300

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397606

AAAGAATGGTGTTAAAGTAAGATTTTTATCTGAAGAAGAACTACCAATTTTTAGATC

ATT 1397665

Query 301

TATGGAAGATACGTCAGAATCAAAAGCTTTTGCTGATCGTGATGACAAATTTTACTA

CAA 360

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397666

TATGGAAGATACGTCAGAATCAAAAGCTTTTGCTGATCGTGATGACAAATTTTACTA

CAA 1397725

Query 361

TCGCTTAAAATATTACAAAGACCGTGTGTTAGTACCTTTAGCGTATATCAACTTTGAT

GA 420

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397726

TCGCTTAAAATATTACAAAGACCGTGTGTTAGTACCTTTAGCGTATATCAACTTTGAT

GA 1397785

Query 421 ATATATTAAAGAACTAAACGAAGAGCGTGAT 451

|||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1397786 ATATATTAAAGAACTAAACGAAGAGCGTGAT 1397816

2. ยีน *blaZ*

ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนดื้อยา *blaZ* เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK# X52734

S.aureus Tn552 transposable element

Sequence ID: X52734.1 Length: 6545Number of Matches: 1

Score	**Expect**	**Identities**	**Gaps**
2169 bits(1174)	0.0	1174/1174(100%)	0/1174(0%)

Query 1

TACAACTGTAATATCGGAGGGTTTATTTTGAAAAAGTTAATATTTTTAATTGTAATTG

CT 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5372

TACAACTGTAATATCGGAGGGTTTATTTTGAAAAAGTTAATATTTTTAATTGTAATTG

CT 5431

Query 61

TTAGTTTTAAGTGCATGTAATTCAAACAGTTCACATGCCAAAGAGTTAAATGATTTAG

aa 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5432

TTAGTTTTAAGTGCATGTAATTCAAACAGTTCACATGCCAAAGAGTTAAATGATTTAG

AA 5491

Query 121

aaaaaaTATAATGCTCATATTGGTGTTTATGCTTTAGATACTAAAAGTGGTAAGGAAGTA

180

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5492

AAAAAATATAATGCTCATATTGGTGTTTATGCTTTAGATACTAAAAGTGGTAAGGAA

GTA 5551

Query 181

AAATTTAATTCAGATAAGAGATTTGCCTATGCTTCAACTTCAAAAGCGATAAATAGT

GCT 240

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5552

AAATTTAATTCAGATAAGAGATTTGCCTATGCTTCAACTTCAAAAGCGATAAATAGT

GCT 5611

Query 241

ATTTTGTTAGAACAAGTACCTTATAATAAGTTAAATAAAAAAGTACATATTAACAAA

GAT 300

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5612

ATTTTGTTAGAACAAGTACCTTATAATAAGTTAAATAAAAAAGTACATATTAACAAA

GAT 5671

Query 301

GATATAGTTGCTTATTCTCCTATTTTAGAAAAATATGTAGGAAAAGATATCACTTTAA

AA 360

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5672

GATATAGTTGCTTATTCTCCTATTTTAGAAAAATATGTAGGAAAAGATATCACTTTAA

AA 5731

Query 361

GCACTTATTGAGGCTTCAATGACATATAGTGATAATACAGCAAACAATAAAATTATA

AAA 420

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5732

GCACTTATTGAGGCTTCAATGACATATAGTGATAATACAGCAAACAATAAAATTATA

AAA 5791

Query 421

GAAATCGGTGGAATCAAAAAAGTTAAACAACGTCTAAAAGAACTAGGAGATAAAGT

AACA 480

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5792

GAAATCGGTGGAATCAAAAAAGTTAAACAACGTCTAAAAGAACTAGGAGATAAAGT

AACA 5851

Query 481

AATCCAGTTAGATATGAGATAGAATTAAATTACTATTCACCAAAGAGCAAAAAAGAT

ACT 540

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5852

AATCCAGTTAGATATGAGATAGAATTAAATTACTATTCACCAAAGAGCAAAAAAGAT

ACT 5911

Query 541

TCAACACCTGCTGCTTTCGGTAAGACTTTAAATAAACTTATCGCAAATGGAAAATTA

AGC 600

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5912

TCAACACCTGCTGCTTTCGGTAAGACTTTAAATAAACTTATCGCAAATGGAAAATTA

AGC 5971

Query 601

AAAGAAAACAAAAAATTCTTACTTGATTTAATGTTAAATAATAAAAGCGGAGATACT

TTA 660

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 5972

AAAGAAAACAAAAAATTCTTACTTGATTTAATGTTAAATAATAAAAGCGGAGATACT

TTA 6031

Query 661

ATTAAAGACGGTGTTCCAAAAGACTATAAGGTTGCTGATAAAAGTGGTCAAGCAATA

ACA 720

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 6032

ATTAAAGACGGTGTTCCAAAAGACTATAAGGTTGCTGATAAAAGTGGTCAAGCAATA

ACA 6091

Query 721

TATGCTTCTAGAAATGATGTTGCTTTTGTTTATCCTAAGGGCCAATCTGAACCTATTG

TT 780

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 6092

TATGCTTCTAGAAATGATGTTGCTTTTGTTTATCCTAAGGGCCAATCTGAACCTATTG

TT 6151

3. ยีน *mec*A

ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนดื้อยา *mec*A เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK# AB037671

Staphylococcus aureus strain M92, complete genome

Sequence ID: CP015447.1Length: 3050062 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
959 bits(519)	0.0	519/519(100%)	0/519(0%)

Query 1

TGTCCGTAACCTGAATCAGCTAATAATATTTCATTATCTAAATTTTTGTTTGAAATTTG

A 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77385

TGTCCGTAACCTGAATCAGCTAATAATATTTCATTATCTAAATTTTTGTTTGAAATTTG

A 77444

Query 61

GCATTATAAAATGGATAATCACTTGGTATATCTTCACCAACACCTAGTTTTTTCATGC

CT 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77445

GCATTATAAAATGGATAATCACTTGGTATATCTTCACCAACACCTAGTTTTTTCATGC

CT 77504

Query 121

TTTTCAAATTTCTTACTGCCTAATTCGAGTGCTACTCTAGCAAAGAAAATGTTATCTG

AT 180

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77505

TTTTCAAATTTCTTACTGCCTAATTCGAGTGCTACTCTAGCAAAGAAAATGTTATCTG

AT 77564

Query 181

GATTCTATTGCTTGTTTTAAGTCGATATTACCATTTACCACTTCATATCTTGTAACGTT

G 240

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77565

GATTCTATTGCTTGTTTTAAGTCGATATTACCATTTACCACTTCATATCTTGTAACGTT

G 77624

Query 241

TAACCACCCCAAGATTTATCTTTTTGCCAACCTTTACCATCGATTTTATAACTTGTTTT

A 300

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77625

TAACCACCCCAAGATTTATCTTTTTGCCAACCTTTACCATCGATTTTATAACTTGTTTT

A 77684

Query 301

TCGTCTAATGTTTTGTTATTTAACCCAATCATTGCTGTTAATATTTTTTGAGTTGAACC

T 360

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77685

TCGTCTAATGTTTTGTTATTTAACCCAATCATTGCTGTTAATATTTTTTGAGTTGAACC

T 77744

Query 361

GGTGAAGTTGTAATCTGGAACTTGTTGAGCAGAGGTTCTTTTTTATCTTCGGTTAATT

TA 420

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77745

GGTGAAGTTGTAATCTGGAACTTGTTGAGCAGAGGTTCTTTTTTATCTTCGGTTAATT

TA 77804

Query 421

TTATATTCTTCGTTACTCATGCCATACATAAATGGATAGACGTCATATGAAGGTGTGC

TT 480

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77805

TTATATTCTTCGTTACTCATGCCATACATAAATGGATAGACGTCATATGAAGGTGTGC

TT 77864

Query 481 ACAAGTGCTAATAATTCACCTGTTTGAGGGTGGATAGCA 519

|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 77865 ACAAGTGCTAATAATTCACCTGTTTGAGGGTGGATAGCA 77903

4. ยีน *aac* (6′)/*aph*(2″)

ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนดื้อยา *aac* (6')/*aph* (2") เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK# AF051917

Staphylococcus aureus plasmid pSK41, complete sequence

Sequence ID: AF051917.1Length: 46445Number of Matches: 2

Score	**Expect**	**Identities**	**Gaps**
2069 bits(1120)	0.0	1120/1120(100%)	0/1120(0%)

Query 1

CCTACATGATGAATGGATTTATTCTTCAAGAAAATACATCAATTTTGATAAGTAGAA

ATG 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42001

CCTACATGATGAATGGATTTATTCTTCAAGAAAATACATCAATTTTGATAAGTAGAA

ATG 42060

Query 61

GTAAAAACATTGTATAGCATTTTACACAGGAGTCTGGACTTGACTGAGTTTATGGAA

GAA 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42061

GTAAAAACATTGTATAGCATTTTACACAGGAGTCTGGACTTGACTGAGTTTATGGAA

GAA 42120

Query 121

GTTTTAATTGATGATAATATGGTTTTTGATATTGATAATTTAAAAGGATTTCTTAATG

AT 180

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42121

GTTTTAATTGATGATAATATGGTTTTTGATATTGATAATTTAAAAGGATTTCTTAATG

AT 42180

Query 181

ACCAGTTCATTTGGGTTTATAGCTAAAGAAAATAATAAAATTATAGGATTTGCATATT

GC 240

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42181

ACCAGTTCATTTGGGTTTATAGCTAAAGAAAATAATAAAATTATAGGATTTGCATATT

GC 42240

Query 241

TATACACTTTTAAGACCTGATGGAAAAACAATGTTTTATTTACACTCAATAGGAATGT

TA 300

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42241

TATACACTTTTAAGACCTGATGGAAAAACAATGTTTTATTTACACTCAATAGGAATGT

TA 42300

Query 301

CCTAACTATCAAGACAAAGGTTATGGTTCAAAATTATTATCTTTTATTAAGGAATATT

CT 360

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42301

CCTAACTATCAAGACAAAGGTTATGGTTCAAAATTATTATCTTTTATTAAGGAATATT

CT 42360

Query 361

AAAGAGATTGGTTGTTCTGAAATGTTTTTAATAACTGATAAAGGTAATCCTAGAGCTT

GC 420

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42361

AAAGAGATTGGTTGTTCTGAAATGTTTTTAATAACTGATAAAGGTAATCCTAGAGCTT

GC 42420

Query 421 CATGTATATGAAAAATTAGGTGGtaaaaatgattataaagatgaaatagtatatgtatat 480

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42421

CATGTATATGAAAAATTAGGTGGTAAAAATGATTATAAAGATGAAATAGTATATGTA

TAT 42480

Query 481 gattatgaaaaaggtgataaataaatgaatatagttgaaaatgaaatatgtataAGAACT 540

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42481

GATTATGAAAAAGGTGATAAATAAATGAATATAGTTGAAAATGAAATATGTATAAG

AACT 42540

Query 541

TTAATAGATGATGATTTTCCTTTGATGTTAAAATGGTTAACTGATGAAAGAGTATTAG

AA 600

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42541

TTAATAGATGATGATTTTCCTTTGATGTTAAAATGGTTAACTGATGAAAGAGTATTAG

AA 42600

Query 601

TTTTATGGTGGTAGAGATAAAAAATATACATTAGAATCATTAAAAAAACATTATACA

GAG 660

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42601

TTTTATGGTGGTAGAGATAAAAAATATACATTAGAATCATTAAAAAAACATTATACA

GAG 42660

Query 661

CCTTGGGAAGATGAAGTTTTTAGAGTAATTATTGAATATAACAATGTTCCTATTGGAT

AT 720

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42661

CCTTGGGAAGATGAAGTTTTTAGAGTAATTATTGAATATAACAATGTTCCTATTGGAT

AT 42720

Query 721

GGACAAATATATAAAATGTATGATGAGTTATATACTGATTATCATTATCCAAAAACT

GAT 780

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42721

GGACAAATATATAAAATGTATGATGAGTTATATACTGATTATCATTATCCAAAAACT

GAT 42780

Query 781

GAGATAGTCTATGGTATGGATCAATTTATAGGAGAGCCAAATTATTGGAGTAAAGGA

ATT 840

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42781

GAGATAGTCTATGGTATGGATCAATTTATAGGAGAGCCAAATTATTGGAGTAAAGGA

ATT 42840

Query 841

GGTACAAGATATATTAAATTGATTTTTGAATTTTTGAAAAAAGAAAGAAATGCTAAT

GCA 900

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42841

GGTACAAGATATATTAAATTGATTTTTGAATTTTTGAAAAAAGAAAGAAATGCTAAT

GCA 42900

Query 901

GTTATTTTAGACCCTCATAAAAATAATCCAAGAGCAATAAGGGCATACCAAAAATCT

GGT 960

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42901

GTTATTTTAGACCCTCATAAAAATAATCCAAGAGCAATAAGGGCATACCAAAAATCT

GGT 42960

Query 961

TTTAGAATTATTGAAGATTTGCCAGAACATGAATTACACGAGGGCAAAAAAGAAGAT

TGT 1020

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 42961

TTTAGAATTATTGAAGATTTGCCAGAACATGAATTACACGAGGGCAAAAAAGAAGAT

TGT 43020

Query 1021

TATTTAATGGAATATAGATATGATGATAATGCCACAAATGTTAAGGCAATGAAATAT

TTA 1080

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 43021

TATTTAATGGAATATAGATATGATGATAATGCCACAAATGTTAAGGCAATGAAATAT

TTA 43080

5. ยีน *tet*K

ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนดื้อยา *tet*K เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK# S67449

Staphylococcus aureus plasmid pT181 tetracycline efflux protein (tet(K)) gene, complete cds

Sequence ID: S67449.1Length: 1380Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
942 bits(510)	0.0	510/510(100%)	0/510(0%)

Query 1

GTAGCGACAATAGGTAATAGTGTTATTTTTCCTGGAACCATGAGTgttattgtttttggt 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 871

GTAGCGACAATAGGTAATAGTGTTATTTTTCCTGGAACCATGAGTGTTATTGTTTTTG

GT 930

Query 61 tattttggtggtttttagtggatagaaaaggatcattatttgtttttattttaggatca 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 931

TATTTTGGTGGTTTTTAGTGGATAGAAAAGGATCATTATTTGTTTTTATTTTAGGATC

A 990

Query 121 ttgtctatctctataagtttttaactattgcatttttgttgAGTTTAGTATGTGGTTG 180

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 991

TTGTCTATCTCTATAAGTTTTTAACTATTGCATTTTTGTTGAGTTTAGTATGTGGTT

G 1050

Query 181

ACTACTTTTATGTTTATATTTGTTATGGGCGGATTATCTTTTACTAAAACAGTTATATC

A 240

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1051

ACTACTTTTATGTTTATATTTGTTATGGGCGGATTATCTTTTACTAAAACAGTTATATC

A 1110

Query 241

AAAATAGTATCAAGTAGTCTTTCTGAAGAAGAAGTTGCTTCTGGAATGAGTTTGCTA

AAT 300

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1111

AAAATAGTATCAAGTAGTCTTTCTGAAGAAGAAGTTGCTTCTGGAATGAGTTTGCTA

AAT 1170

Query 301

TTCACAAGTTTTTTATCAGAGGGAACAGGTATAGCAATTGTAGGAGGTTTATTGTCAC

TA 360

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1171

TTCACAAGTTTTTTATCAGAGGGAACAGGTATAGCAATTGTAGGAGGTTTATTGTCAC

TA 1230

Query 361

CAATTGATTAATCGTAAACTAGTTCTGGAATTTATAAATTATTCTTCTGGAGTGTATA

GT 420

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1231

CAATTGATTAATCGTAAACTAGTTCTGGAATTTATAAATTATTCTTCTGGAGTGTATA

GT 1290

Query 421

AATATTCTTGTAGCCATGGCTATCCTTATTATTTTATGTTGTCTTTTGACGATTATTGT

A 480

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1291

AATATTCTTGTAGCCATGGCTATCCTTATTATTTTATGTTGTCTTTTGACGATTATTGT

A 1350

6. ยีน tetM

ลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนดื้อยา tetM เทียบกับฐานข้อมูล GENBANK# S67449

S. faecalis tet(M)916 gene for tetracycline resistance

Sequence ID: X56353.1Length: 2186Number of Matches: 1

Score	**Expect**	**Identities**	**Gaps**
1077 bits(560)	0.0	560/560(100%)	0/560(0%)

Query 1

GAGGAAAATCACATGAAAATTATTAATATTGGAGTTTTAGCTCATGTTGATGCAGGA

AAA 60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 211

GAGGAAAATCACATGAAAATTATTAATATTGGAGTTTTAGCTCATGTTGATGCAGGA

AAA 270

Query 61

ACTACCTTAACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGC

GTG 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 271

ACTACCTTAACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGC

GTG 330

Query 121

GACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTAC

AATT 180

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

มหาวิทยาลัยศิลปากร

Sbjct 331

GACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTAC

AATT 390

Query 181

CAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACG

CCA 240

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 391

CAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACG

CCA 450

Query 241

GGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCAA

TT 300

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 451

GGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCAA

TT 510

Query 301

CTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTATTTCATGCAC

TT 360

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 511

CTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTATTTCATGCAC

TT 570

Query 361

AGGAAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATT

GAT 420

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 571

AGGAAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATT

GAT 630

Query 421

TTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAAGAGAAACTTTCTGCCGAAATTGTAATCAAA

CAG 480

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 631

TTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAAGAGAAACTTTCTGCCGAAATTGTAATCAAA

CAG 690

มหาวิทยาลัยศิลปากร

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

PEN	=	penicilin
ERY	=	erythromycin
TE	=	tetracycline;
FOX	=	cefoxitin
SXT	=	trimethoprim-sulfamethoxazole
CHLO	=	chloramphenicol
OXA	=	oxacillin
VAN	=	vancomycin
MIC	=	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้
µl	=	ไมโครลิตร
ºC	=	องศาเซลเซียส
ml	=	มิลลิลิตร
cm	=	เซนติเมตร
bp	=	คู่เบส
µg/ml	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µg	=	ไมโครกรัม
mmol/l	=	มิลลิโมลต่อลิตร
µm	=	ไมโครโมล
ml	=	มิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
rpm	=	รอบต่อนาที
et al.	=	และคณะ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล
วัน เดือน ปี เกิด	30 สิงหาคม 2533
สถานที่เกิด	จังหวัดตราด
วุฒิการศึกษา	2556-ปัจจุบัน: ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม 2552-2556: ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	44/2 ม.1 ซ.แหลมตะโคย ถ. ตราด-แหลมงอบ ต.หนองเสม็ด อ.เมือง จ.ตราด 23000
ผลงานตีพิมพ์	ณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล และ ธงชัย เตโชวิศาล . (2559). “การศึกษารูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ Staphylococcus aureus.” การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับชาติ เกษตรแฟร์ นนทรีอีสาน ครั้งที่ 4, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตสกลนคร 27 พฤศจิกายน, 2559.

มหาวิทยาลัยศิลปากร