บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมมีการเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes gram-positive cocci in grape-like cluster) ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลบวกต่อการทดสอบ catalase, coagulase, DNase สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 นอกจากนี้เชื้อยังมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แห้งได้ดี จึงสามารถพบเชื้อนี้ได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น เตียงนอนผู้ป่วย ผ้าปูที่นอน อ่างล้างมือ พื้นห้องและพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณผิวหนังและรูจมูกของคน เชื้อ *Staphylococcus aureus* มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคที่สำคัญคือการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง ทำให้เกิดการติดเชื้อชนิดเป็นหนอง ฝี นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารพิษชนิด enterotoxin ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ และคณะ. 2547) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ถูกจำแนกตามการดื้อยาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ได้แก่ เชื้อ methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) จะเป็นเชื้อที่ไวต่อยา methicillin ทำให้สามารถรักษาให้หายขาดได้ง่าย และกลุ่มที่สองคือ เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จะหมายถึงเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin รวมทั้งดื้อต่อยาหลายกลุ่ม (multiple drug resistant) เช่น penicillins, tetracyclines, sulfonamides โดยมีกลไกในการดื้อยาได้แก่ การสังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส (β-lactamase) มีฤทธิ์ในการย่อยสลาย lactam ring ซึ่งเป็นองค์ประกอบของยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins นอกจากนี้เชื้อยังมีการเปลี่ยนแปลงที่รับ (receptor site) ของยาบนผิวเซลล์จาก penicillin-binding protein (PBP) เปลี่ยนเป็น penicillin-binding protein ชนิด 2a (PBP2a) ทำให้เชื้อมี affinity ต่อยาในกลุ่ม penicillins ลดลง ยาจึงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ เชื้อจึงดื้อต่อยา เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ถูกจำแนกออกเป็นหลายประเภทตามกลไกการดื้อยา (นลินี อัศวโภคี และคณะ. 2540) ดังนี้

1. True methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (true MRSA) จะมีกลไกการดื้อยาคือการสังเคราะห์ PBP2a เชื้อในกลุ่มนี้จะมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration; MIC) ของยา methicillin มากกว่าหรือเท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และมีค่า MIC ของยา oxacillin มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

2. Borderline-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) เป็นเชื้อ MRSA ที่มีกลไกการดื้อยาคือ สังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส ที่มากเกิน แต่ไม่มีการสังเคราะห์ PBP2a มีค่า MIC ของยา

methicillin เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MIC ของยา oxacillin น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. Modified-resistant *Staphylococcus aureus* (MODSA) เชื้อในกลุ่มนี้ไม่สังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส ที่มากเกินและไม่สร้าง PBP2a มีค่า MIC ของยา methicillin และ oxacillin อยู่ในระดับเดียวกันกับ BORSA

4. Methicillin-aminoglycosides-resistant *Staphylococcus aureus* (MARSA) หมายถึงเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ผลิตเอนไซม์ aminoglycoside-modifying ชนิดที่เรียกว่า bifunctional enzyme โดยมีเอนไซม์ ACC(6') และ APH(2") ร่วมกับการผลิต PBP2a ทำให้เชื้อในกลุ่มนี้ดื้อต่อยา methicillin และ aminoglycosides ได้

การติดต่อของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำเช่น ผู้ป่วยที่มีแผลผ่าตัด แผลน้ำร้อนลวกไฟไหม้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใส่สายสวนปัสสาวะ การใช้เครื่องช่วยหายใจ การให้สารน้ำทางหลอดเลือดจะทำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น โดยมีการติดต่อของเชื้อจากผู้ป่วยหนึ่งไปยังผู้ป่วยอื่นๆ หรือจากบุคลากรทางการแพทย์ สู่ผู้ป่วยโดยการสัมผัส

การศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) มีประโยชน์เพื่อใช้ในการสอบสวนสาเหตุของโรคติดเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการระบาดในโรงพยาบาลว่ามีสาเหตุจากแหล่งใด เพื่อจะได้มีมาตรการในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อนั้น (สมหวัง ด่านชัยวิจิตร. 2544) วิธีการศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อมี 2 หลักการใหญ่คือ จำแนกตามคุณสมบัติทางฟีโนทัยป์ของเชื้อ (phenotypic characterization) และตามคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ของเชื้อ (genotypic characterization) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ตามคุณสมบัติทางฟีโนทัยป์ได้แก่

1.1 การศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ (antibiogram) ด้วยวิธีการทำ disc diffusion (Rossney A และคณะ. 1994, Monttesinos I และคณะ. 2002, Hoefnagels-Schuermans และคณะ 1997.) โดยการปรับความขุ่นของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard number 1 จะมีจำนวนเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml นำเชื้อมา spread บน Mueller-Hinton agar (MHA) + 2% NaCl จากนั้นวาง disc ยาชนิดต่างๆ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสรอบ dise ยา (inhibition zone) เปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของยามาตรฐาน แปลผลเป็นไว (susceptible) ไวปานกลาง (intermediate) และดื้อ (resistant)

1.2 การทดสอบความไวของเชื้อต่อ bacteriophage (bacteriophage typing) (Montesinos I และคณะ. 2002, Tambic A และคณะ. 1997) โดยการใช้ phage สายพันธุ์มาตรฐานหลายชนิด นำ

bacteriophage มาหยดลงบนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบดูว่า bacteriophage สายพันธุ์ใดมีความสามารถทำให้เซลล์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เกิดการแตกสลาย (lysis) เห็นเป็นวงใส (plaque) ก็จัดว่าเป็น phage typing ชนิดนั้น วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) บางสายพันธุ์ไม่สามารถถูกจำแนกได้ด้วย bacteriophage สายพันธุ์มาตรฐานที่มีอยู่ในปัจจุบัน (not typeable) เนื่องจาก bacteriophage สายพันธุ์มาตรฐานที่มีอยู่ไม่สามารถทำให้เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เกิดการแตกสลายได้

2. จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ตามคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ ซึ่งเป็นการจำแนกสายพันธุ์ในระดับโมเลกุล ได้แก่

2.1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Ichiyama S และคณะ. 1997, Fluckger U และคณะ. 1999, Schwarzkope A และคณะ. 1994, Sakoulas G และคณะ. 2001, Schuermans A และคณะ. 1997) โดยมีหลักการดังนี้ ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I ทำการแยกดีเอ็นเอออกตามขนาดโดยนำมาทำ pulsed-field gel electrophoresis วิธีนี้จัดเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในระดับโมเลกุล เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงมาก มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูงมาก เครื่องมือมีราคาแพง สิ้นเปลืองเวลาและจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญที่มีความชำนาญการในเรื่องนี้โดยเฉพาะ

2.2 Polymerase chain reaction (PCR) (Goh S และคณะ. 1992, Strander A และคณะ. 2003) โดยมีหลักการดังนี้ ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) นำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ของยีนต่างๆ เช่น hypervariable region (HVR) ของ *mecA* gene เป็นยีนที่ encode การสังเคราะห์ PBP2a ซึ่งมีผลทำให้เชื้อนั้นดื้อยา หรือ *spa* gene เป็นยีนที่ encode การสังเคราะห์ protein A ที่เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค (virulent factor) หรือ *coa* gene เป็นยีนที่ encode การสังเคราะห์เอนไซม์ coagulase ทำให้เปลี่ยน fibrinogen ให้เป็น fibrin clot ได้ โดยยีนดังกล่าวเหล่านี้จะมีความแตกต่างหลากหลายกัน (polymorphism) ในขนาดของดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์จึงมีประโยชน์นำมาใช้ในการจำแนกเชื้อได้ ยกตัวอย่างใน *coa* gene ที่บริเวณ 3' end จะมี sequence ที่มีลักษณะที่เรียกว่า 81 base pair tandem repeats ที่ encode การสังเคราะห์กรดอะมิโน 27 ชนิด โดยในแต่ละสายพันธุ์จะมีการซ้ำกันเป็นจำนวนชุด (copy) ของ 81 base pair tandem repeats แตกต่างกันเช่น ถ้ามีการซ้ำกัน 4, 5, 6, 7 หรือ 8 ชุดของ 81 base pair tandem repeats จะทำให้ PCR product ของ *coa* gene มีดีเอ็นเอขนาด

492, 573, 654, 735 หรือ 816 base pair ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้

2.3 Polymerase chain reaction- Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) (Wichelhaus T และคณะ. 2001, Strander A และคณะ. 2003, Hookey J และคณะ. 1998, Hookey J และคณะ. 1999, Nada T และคณะ. 1996, Vandenberg M และคณะ. 1999) โดยมีหลักการดังนี้ ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) นำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ของยีนต่างๆ เช่น *spa* gene หรือ *coa* gene จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I หรือ *Alu*I ตามลำดับ แล้วนำมา run agarose gel electrophoresis จะได้ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ

2.4 DNA sequencing เป็นการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ มีรายงานการศึกษาระบาดวิทยาเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยการหาลำดับเบสของ *spa* gene (Shopsin B และคณะ. 2000, Hookey J และคณะ. 1998) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีค่าใช้จ่ายต่อการทดสอบสูงมาก

2.5 Randomly amplification polymorphic DNA (RAPD) (Tambic A และคณะ. 1998, Saulnier A และคณะ. 1993, Vandenberg M และคณะ. 1999) ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* จากนั้นนำมาทำ PCR ในสภาวะที่ไม่จำเพาะโดยใช้ primer ที่ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อ และใช้ annealing temperature ต่ำ ในการศึกษานี้จะใช้อุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ PCR product ที่มีขนาดหลากหลายแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ เมื่อนำ PCR product มาวิ่งภายใต้กระแสไฟฟ้า (2% agarose gel electrophoresis) จะทำให้ได้ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน วิธี RAPD นี้ จะมีการอ่านและแปลผลยากจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

การศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เพื่อจำแนกสายพันธุ์ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ในการจำแนกเชื้อตามคุณสมบัติทางฟีโนทัยป์ นิยมใช้วิธี antibiogram เนื่องจากวิธีการทำง่ายและเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ ที่ต้องทำการตรวจสอบอยู่แล้วในงานประจำ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตรของโรงพยาบาลทั่วไปที่จะทำการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ ส่วนวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อทางจีโนทัยป์ ซึ่งเป็นการจำแนกในระดับโมเลกุลนั้น ได้แก่ Pulse-field gel electrophoresis (PFGE), PCR, PCR-RFLP, DNA sequencing, RAPD ในแต่ละวิธีจะต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและชำนาญการโดยเฉพาะ อีกทั้งยังใช้งบประมาณในการศึกษาสูงเนื่องจากอุปกรณ์และเครื่องมือมีราคาแพง แต่เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ผลการทดสอบที่มีความจำเพาะมาก จึงเหมาะสมที่ใช้สำหรับงานวิจัยเท่านั้น