

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการแพร่ระบาดในโรงพยาบาล 17 แห่ง จาก 4 ภาค ได้แก่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออก ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2546 ถึงเดือนมีนาคม 2547 จำนวน 129 สายพันธุ์ โดยทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อออกตามคุณสมบัติทางพีโนทัยป์คือ การดื้อยาของเชื้อ (antibiogram) และตามคุณสมบัติทางจีโนทัยป์ซึ่งเป็นการศึกษาในระดับโมเลกุลด้วยวิธี coagulase gene typing และวิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของ coagulase gene จากการจำแนกด้วยวิธี antibiogram พบ 9 แบบแผนโดย พบ antibiogram 1 และ 2 พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 80 ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการแพร่ระบาดในประเทศไทย โดย antibiogram 1 มีแบบแผนการดื้อยาดังนี้ ให้ผลไวต่อยา chloramphenicol, vancomycin, teicoplanin และดื้อต่อยา oxacillin, erythromycin, gentamicin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin, rifampicin, ส่วน antibiogram 2 ให้ผลไวต่อยา chloramphenicol, rifampicin, vancomycin, teicoplanin และดื้อต่อยา oxacillin, erythromycin, gentamicin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิจัยของ ประภาวดี ติษยาธิคม และคณะ ที่ทำการศึกษาดู antibiogram ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการแพร่ระบาดในช่วงเดือนมกราคม - เดือนกันยายน 2546 (ประภาวดี ติษยาธิคม และคณะ. 2546) แต่ผล antibiogram ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการแพร่ระบาดในประเทศไทยมีความแตกต่างจากเชื้อที่มีการแพร่ระบาดในกลุ่มประเทศยุโรป ได้แก่ ประเทศสเปน (Montesinos I และคณะ. 2002) สหราชอาณาจักร (Tambic A และคณะ. 1997) ประเทศเบลเยียม (Hoefnagels-Schuermans A และคณะ. 1997) ซึ่งมีผล antibiogram ที่คล้ายคลึงกันมากโดยจะให้ผลไวต่อยา trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin, chloramphenicol, rifampicin, vancomycin, teicoplanin และดื้อต่อยา oxacillin, erythromycin, gentamicin, tetracycline จะเห็นได้ว่ายา trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin, chloramphenicol, rifampicin, vancomycin, teicoplanin ยังเป็น drug of choice ที่ใช้ในการรักษาเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการแพร่ระบาดในกลุ่มประเทศยุโรปได้ในขณะที่ยา trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin ไม่สามารถรักษาเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการแพร่ระบาดในประเทศไทยได้ ซึ่งในปัจจุบันยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ในประเทศไทยคือยา vancomycin และ teicoplanin ซึ่งมีแนวโน้มในอนาคตว่ายาทั้ง 2 ชนิดนี้อาจไม่สามารถทำการ

รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ เนื่องจากมีรายงานการพบเชื้อดื้อต่อยา vancomycin, teicoplanin มากขึ้นในประเทศไทย (Trakulsomboon S และคณะ. 2003) ซึ่งในปัจจุบันนี้จะพบเชื้อที่ดื้อยามากขึ้นเรื่อยๆ โดยมีสาเหตุส่วนหนึ่งจากการใช้ยาปฏิชีวนะพร่ำเพรื่อ จึงมีความจำเป็นจะต้องมีมาตรการในการควบคุมและป้องกันไม่ให้เชื้อมีการดื้อยาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้จะต้องมีการป้องกันไม่ให้เชื้อนั้นแพร่ระบาดได้ วิธีการป้องกันและควบคุมได้แก่ นโยบายการใช้ยาปฏิชีวนะ การเฝ้าระวังเชื้อและการสอบสวนหาสาเหตุของโรค (สมหวัง ตำนชัยวิจิตร. 2544)

จากการจำแนกเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ตามคุณสมบัติทางจีโนมัยป์ ซึ่งเป็นการศึกษาในระดับโมเลกุล จาก 129 สายพันธุ์ โดยวิธี coagulase gene typing และวิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของ coagulase gene พบว่าวิธี coagulase gene typing สามารถจำแนกเชื้อออกได้ 4 type ได้แก่ coagulase gene type I, II, III, IV ที่มี PCR product ขนาด 492 ± 20 , 654 ± 20 , 735 ± 20 และ 816 ± 20 base pair ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างหลากหลายกันในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยมีการซ้ำกันของ 81-tandem repeated sequence เป็นจำนวนชุด (copy) ที่แตกต่างกัน เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่นำมาศึกษานี้มี coagulase gene type III มากที่สุด รองลงมาคือ type IV, II และ I คิดเป็นร้อยละ 82.2 และ 14, 3 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งมีการซ้ำกันของ 81-tandem repeated sequence จำนวน 7, 8, 6 และ 4 ตามลำดับ การวิจัยนี้เป็นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธีการทำ PCR ของ coagulase gene เพียงชนิดเดียว ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Stranden A และคณะ ที่ได้ทำ multiplex PCR ของ 3 gene ได้แก่ hypervariable region ที่อยู่ข้างๆ *mecA* gene, *coa* gene และ *spa* gene ซึ่งใน gene เหล่านี้จะมีความแตกต่างหลากหลายกันในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ ทำให้ได้ PCR product ที่มีขนาดแตกต่างกันคือ 300-600, 600-900 และ 1,200-1,500 base pair ตามลำดับ ส่วนวิธี PCR-RFLP ของ coagulase gene นั้น เมื่อนำ PCR product ที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* แล้วนำมา run agarose gel electrophoresis และวิเคราะห์ผลพบว่า PCR-RFLP pattern ที่ได้มีทั้งสิ้น 4 pattern ได้แก่ PCR-RFLP pattern A, B, C, D โดยพบ PCR-RFLP pattern C มากที่สุด รองลงมาคือ pattern D คิดเป็นร้อยละ 82.2 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าการจำแนกเชื้อด้วยวิธี coagulase gene typing และ วิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ให้ผลที่มีความสอดคล้องกัน ซึ่ง coagulase gene type III / PCR-RFLP pattern C จัดเป็นสายพันธุ์แพร่ระบาด (epidemic strain) ส่วน coagulase gene type I, II, IV / PCR-RFLP pattern A, B, D จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดนาน ๆ ครั้ง (sporadic strain) จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการสืบสวน สอบสวนแหล่งที่มาของการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ได้

เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ต่อไป

ในการศึกษาพบว่าเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) coagulase gene type III / PCR-RFLP pattern C ซึ่งพบมากที่สุดถึงร้อยละ 82.2 เป็น antibiogram 1, 2, 3 coagulase gene type IV / PCR-RFLP pattern D จะพบว่าเป็น antibiogram 1-9 โดยมีความถี่ใกล้เคียงกัน ส่วน coagulase gene type I / PCR-RFLP pattern A จะพบเฉพาะ antibiogram 2 เท่านั้น และเช่นเดียวกันกับ coagulase gene type II / PCR-RFLP pattern B จะพบเฉพาะ antibiogram 1 เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามคงจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมมากกว่านี้โดยการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ของเชื้อให้มากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) คณะผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะดังนี้ วิธี antibiogram ยังคงเป็นวิธีที่มีประโยชน์ มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในงานประจำ (routine work) เนื่องจากขั้นตอนการทำงานง่าย สะดวก ราคาถูก ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญหรือผู้ชำนาญการเฉพาะด้าน สามารถปฏิบัติงานได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาที่มีประโยชน์ สามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้ แต่วิธี antibiogram มีข้อจำกัดคือ ข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำต่ำ เนื่องจากเป็นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อที่แสดงออกมา (phenotypic characterization) ส่วนวิธีที่ใช้ในจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง จะเป็นวิธีการศึกษาในระดับโมเลกุล (molecular typing) ได้แก่ วิธี Pulse-field gel electrophoresis (PFGE), Polymerase chain reaction (PCR), Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), DNA sequencing ในแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันคือ วิธี Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เครื่องมือ Pulse-field gel electrophoresis ที่มีราคาแพง ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญที่มีความชำนาญงานในด้านนี้โดยเฉพาะ อีกทั้งยังมีปัญหาในการอ่านและแปลผลแถบดีเอ็นเอ (DNA band) อีกด้วย วิธีที่ใช้หลักการของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ Polymerase chain reaction (PCR), Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) นั้นเป็นวิธีที่มีความสะดวก ไม่ยุ่งยาก ราคาไม่แพง ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ การอ่านและแปลผลทำได้ง่าย ซึ่งในงานวิจัยนี้ ทั้ง 2 วิธีให้ผลการศึกษาที่มีความสอดคล้องกัน แต่วิธี Polymerase chain reaction (PCR) ของ coagulase gene มีข้อดีกว่าวิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของ coagulase gene คือ ไม่ต้องนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* จึงทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ส่วนวิธี DNA sequencing เป็นวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งจะให้ข้อมูลที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูงมาก

ทำให้ทราบถึงการกลายพันธุ์ของเชื้อได้ แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีราคาแพง คณะผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าควรมำ PCR product ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนั้นมาทำ DNA sequencing ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงลำดับเบสของ coagulase gene ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) สายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นฐานข้อมูลลำดับเบส (DNA sequence data base) ของเชื้อต่อไป

สรุป

ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อเป็นเครื่องมือที่ใช้เพื่อการศึกษาเพื่อให้ได้มาซึ่งแหล่งของข้อมูลที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ ทำให้ทราบถึงสาเหตุของโรค แหล่งของเชื้อโรค การติดต่อโรค เพื่อใช้ในการควบคุม ป้องกัน และรักษาโรค ในการวิจัยนี้เป็นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อโรงพยาบาล โดยวิธี antibiogram, coagulase gene typing และ Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของ coagulase gene ซึ่งจากผลการวิจัยสรุปได้ว่าเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีการแพร่ระบาด (epidemic strain) ในขณะนี้ส่วนใหญ่เป็น antibiogram 1, 2 ซึ่งให้ผลไวต่อยา chloramphenicol, vancomycin, teicoplanin และดื้อต่อยา oxacillin, erythromycin, gentamicin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin, rifampicin ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และเป็นสายพันธุ์ coagulase gene type III ที่มี PCR product ขนาด 735 ± 20 base pair และเป็นสายพันธุ์ PCR-RFLP pattern C ที่มี *AluI* digested PCR product ขนาด 420 ± 20 , 220 ± 20 , 81 base pair ส่วน antibiogram 3-9, coagulase gene type I, II, IV และ PCR-RFLP pattern A, B, D จะจัดเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดนานๆ ครั้ง (sporadic strain) ซึ่งจะเป็นฐานข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ ศึกษาความรุนแรงของเชื้อรวมทั้งการสืบสวนหาแหล่งที่มาของการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป ส่วนวิธีที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) นั้น คณะผู้วิจัยเสนอแนะว่าควรใช้วิธี coagulase gene typing และวิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสะดวก การอ่านและแปลผลง่าย ให้ข้อมูลที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง เนื่องจากการเพิ่มปริมาณของ coagulase gene ซึ่งเป็นยีนที่มีความแตกต่างหลากหลายกัน ทำให้สามารถจำแนกเชื้อออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ได้และผลที่ได้ของทั้ง 2 วิธีนี้มีความสอดคล้องกัน