

## ความชุกและความไวต่อยาต้านจุลชีพของสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส ที่แยกได้จากโพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดพัทลุง

### Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Anterior Nares of Pre-School Children in Phatthalung Province

ชัยสิทธิ์ นียะสม<sup>\*</sup>, จันทรฉาย กฤษณะทรัพย์, ปาริชาติ คงศรีทอง และ นูรอัยนี ดาโอ๊ะ

Chaisit Niyasom<sup>\*</sup>, Janchai Kritsanasup, Parichat Kongsritong and Nooraanee Daoh

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

#### บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างจากโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนจำนวน 90 คน จากโรงเรียนอนุบาล 3 แห่งในจังหวัดพัทลุง เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อสแตฟิโลคอคคัสออเรียส โดยเฉพาะเชื้อบน Mannitol Salt Egg Yolk Agar พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา พบเชื้อที่โพรงจมูกจำนวน 47 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 52.22 เชื้อที่พบในโพรงจมูกเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อเมธิซิลลิน (MSSA) 44 ตัวอย่าง และดื้อต่อเมธิซิลลิน (MRSA) 3 ตัวอย่าง ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทตรวจพบยีน *mecA* และ *nuc* โดยมีค่า MIC ต่อยา oxacillin เท่ากับ 16 32 และ 256 µg/ml ตามลำดับ MRSA ที่พบดื้อต่อยาเพนิซิลลิน ออกซาซิลลิน เซฟโซติน อีริโทรมัยซินและเตตราไซคลิน จากการตรวจหาชนิดของ SCCmec ใน MRSA พบว่าเป็น SCCmec ชนิดที่ 3 จำนวน 2 ไอโซเลท (R24 และ S13) และ SCCmec เป็นทั้งชนิดที่ 2 และ 3 จำนวน 1 ไอโซเลท (R9) เป็นที่น่าสนใจเมื่อพบว่า มี 1 ไอโซเลทที่ตรวจพบยีน *pvl* การพบ MRSA ในโพรงจมูกของกลุ่มตัวอย่างเด็กก่อนวัยเรียน แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของเชื้อในชุมชนและจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อในชุมชนต่อไป

**คำสำคัญ:** สแตฟิโลคอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลิน ความชุก ความไวต่อยาต้านจุลชีพ ชนิดของ SCCmec

#### Abstract

Ninety nasal swabs of healthy pre-school children from 3 kindergarten schools in Phatthalung province were determined for the prevalence of *Staphylococcus aureus*. Swabs were inoculated onto Mannitol Salt Egg Yolk Agar and incubated at 37 °C for 24 h. *S. aureus* isolates were identified by standard microbiological methods. Of the 90 nares samples screened, 47 samples (52.22 %) showed the growth of *S. aureus*. In 47 *S. aureus* isolates from nares samples, 44 were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and 3 were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) which were *mecA* and *nuc* positive. The oxacillin MIC of these MRSA isolates were 16 µg/ml, 32 µg/ml and 256 µg/ml, respectively. Disk diffusion susceptibility test showed that 3 MRSA isolates were resistant to penicillin, oxacillin, cephoxitin, erythromycin and tetracycline. For SCCmec typing, 2 isolates (R24 and S13) were Type III and 1 isolate (R9) was Type II/III. Interestingly, 1 MRSA isolate was positive for *pvl* gene. The results suggested that MRSA is present in the Thai community and MRSA prevalence should be further explored and observed.

**Keywords:** methicillin-resistant *S. aureus*, prevalence, antimicrobial susceptibility, SCCmec Type

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail : [nchaisit@yahoo.com](mailto:nchaisit@yahoo.com) Tel.086-6402-9830

## 1. บทนำ

*Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวก ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ทำให้เกิดโรคตั้งแต่การติดเชื้อที่ผิวหนัง อาหารเป็นพิษ กลุ่มอาการช็อคจากสารพิษ ปอดอักเสบ ไปจนถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) *S. aureus* เป็นเชื้อที่ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ทนความแห้งแล้งและความเข้มข้นของเกลือในปริมาณที่สูง นอกจากนี้ยังพบเป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ในช่องจมูก ลำคอและผิวหนังของคนปกติ (ภัทรชัย กิรติสิน, 2550) หลังจากมีการใช้ยาเพนิซิลลินรักษาโรคติดเชื้อนี้ได้นานก็เริ่มพบสายพันธุ์ที่ดื้อยาและมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันพบว่าร้อยละ 90 ของ *S. aureus* ดื้อต่อยากลุ่มนี้ ซึ่งต่อมายาเมธิซิลลินถูกนำมาใช้แทนที่เพนิซิลลิน แต่เมื่อนำมาใช้ได้นานก็เริ่มมีสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาดังกล่าว เรียกว่า methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) โดยกลไกการดื้อยาเกิดจากยีน *mecA* ซึ่งกำหนดการสร้าง Penicillin Binding Protein (PBP) 2a ที่มีคุณสมบัติไม่จับกับยาในกลุ่มเบต้าแลคแตม ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ซึ่ง *mecA* จะพบอยู่ที่ mobile genetic element ที่เรียกว่า staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) ขนาด 21-67 kb ปัจจุบันสามารถแบ่ง SCC*mec* ได้ 8 แบบ (Type I-VIII) (สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์, 2554) นอกจาก MRSA จะดื้อยาในกลุ่มเพนิซิลลินและเบต้าแลคแตมแล้วยังดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นอีกหลายชนิด ทำให้การรักษาทำได้ยากและมีอัตราเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง โดยทั่วไปการติดเชื้อ MRSA มักเกิดขึ้นในโรงพยาบาล เรียกว่า Hospital associated-MRSA (HA-MRSA) โดยพบในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยง เช่น มีแผลผ่าตัดหรือใส่สายสวนต่างๆ แต่ในปัจจุบันเริ่มมีการระบาดของ MRSA ในชุมชน เรียกว่า Community-associated MRSA (CA-MRSA) โดยทั่วไป CA-MRSA ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ไม่รุนแรงที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน เช่น ฝีหนอง แต่ในบางรายอาจพบการติดเชื้อที่รุนแรง เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด โรคหนังเน่า (necrotizing fasciitis) กลุ่มอาการช็อคจากสารพิษและปอดอักเสบ โดย CA-MRSA ที่พบเป็นสายพันธุ์ที่มียีน *pvl* ซึ่งกำหนดการสร้างสารพิษ Panton-Valentine leukocidin (PVL) มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว ปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อ CA-MRSA และระบาดในหลายประเทศทั่วโลก เช่น อเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย และหลายประเทศในยุโรป (Deleo *et al.*, 2010) รวมถึงใกล้ประเทศไทยที่สุดคือมาเลเซีย (Nor Shamsudin *et al.*, 2008) แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงสายพันธุ์ดังกล่าว *S. aureus* พบได้ในโพรงจมูกของคนปกติประมาณร้อยละ 20-35 การพบเชื้อในโพรงจมูกมีความสัมพันธ์กับโอกาสในการก่อโรคของเชื้อ นอกจากนั้นยังเป็นแหล่งของการแพร่เชื้ออีกด้วย (สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์, 2554) ในประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถพบ MRSA ในคนปกติร้อยละ 0.84 (Mainous *et al.*, 2006) ในประเทศอินเดียพบ MRSA ในเด็กวัยเรียนร้อยละ 3.06 (Ramana *et al.*, 2009) แต่ในประเทศไทยยังไม่มีตัวเลขที่ชัดเจน จากรายงานการศึกษาในปี พ.ศ. 2539 และปี 2549 ในกลุ่มนักศึกษายังไม่พบรายงานของเชื้อ MRSA (Dhiraputra *et al.*, 1996; มณฑล เลิศคณาวินชกุล และคณะ, 2549) จากความสำคัญของการติดเชื้อในทางการแพทย์ การเฝ้าระวังเชื้อนี้ในชุมชนจึงมีความสำคัญอย่างมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของการเป็นพาหะของเชื้อ *S. aureus* โดยเฉพาะ MRSA ในโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดพัทลุง ตลอดจนศึกษาแบบแผนการดื้อยาด้านจุลชีพชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อในชุมชนต่อไป

## 2. วิธีการ

### 2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากโพรงจมูกของเด็กอนุบาลในจังหวัดพัทลุง 3 โรงเรียน ได้แก่ อนุบาลสุวรรณภักดี อนุบาลป่าพะยอม และอนุบาลเวดศึกษา โรงเรียนละ 30 คน ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2556 การเก็บตัวอย่างดัดแปลงจากวิธีการของ Ramana และคณะ (Ramana *et al.*, 2009) โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน โดยใช้สำลีพันปลายไม้ปราศจากเชื้อจุ่มใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์แล้วบิดจนหมาด ป้ายในโพรงจมูก (nasal swab) แล้วป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt Agar ที่มีส่วนผสมของไข่แดงร้อยละ 3 ที่มีและไม่มี oxacillin ความเข้มข้น 6 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

### 2.2 การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *S. aureus*

เลือกโคโลนีสีขาวหรือเหลือง ลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร และเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลืองจากการหมักย่อน้ำตาลแมนนิทอล มีตะกอนรอบๆ โคโลนีจากการสร้างเอนไซม์เลคซิทีเนส ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นเชื้อ *S. aureus* นำไปย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คาทาเลสและเอนไซม์โคแอกกูเลส โดยที่เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม ให้ผลบวกกับการทดสอบคาทาเลสและโคแอกกูเลส

## 2.3 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disk diffusion

ทดสอบความไวของ *S. aureus* ที่แยกได้ด้วยวิธี Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test โดยผสมโคโลนีของเชื้อลงในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปราศจากเชื้อจุ่มสารละลายเชื้อ บิดพอหมาด แล้วป้ายลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) หลังจากนั้นวางแผ่นยามาตรฐานชนิดต่างๆ คือ Penicillin, Chloramphenicol, Oxacillin, Gentamicin, Erythromycin, Co-Trimoxazole, Tetracycline, Cephoxitin, Nitrofurantoin, Cephalocithin, Bacitracin และ Novobiocin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (inhibition zone) เปรียบเทียบกับค่าในตารางมาตรฐาน

## 2.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยา Oxacillin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี Broth microdilution

ทำการเจือจางยา Oxacillin ในอาหารเหลว MHB แล้วเตรียมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 ( $10^8$  cfu/ml) จากนั้นเจือจาง 1:100 ( $10^6$  cfu/ml) แล้วเติมใส่ในหลุมสารละลายยา Oxacillin ที่เจือจางหลุมละ 50  $\mu$ l ( $5 \times 10^4$  cells/well) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC

## 2.5 การตรวจหายีน *nuc*, *mecA*, *pvl* และการตรวจสอบชนิดของ SCC*mec* โดยเทคนิค Colony PCR

เตรียม DNA ต้นแบบจากเชื้อที่แยกได้ โดยใช้เชื้อประมาณ 1-2 โคโลนี ละลายใน TE buffer pH 8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ใช้ 1.5 ไมโครลิตรสำหรับเป็น DNA ต้นแบบในปฏิกิริยา PCR โดยที่การตรวจหายีน *mecA* และ *nuc* ทำพร้อมกันในหลอดเดียว โดยดำเนินการตามวิธีของ Poulsen และคณะ (Poulsen *et al.*, 2003) โดยใช้ไพรเมอร์ mecup1 (5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3') และ mecup2 (5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3') สำหรับยีน *mecA* และ ไพรเมอร์ nuc-1 (5'-TCAGCAAATGCATCACAAACAG-3') และ nuc-2 (5'-CGTAAATGCACTTGCTTCAGG-3') สำหรับยีน *nuc*

การตรวจหายีน *pvl* ดำเนินการตามวิธีของ McClure และคณะ (McClure *et al.*, 2006) โดยใช้ไพรเมอร์ luk-PV-1 (5'-ATCATTAGGTAAATGTCTGGACATGATCCA-3') และ luk-PV-2 (5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAGC-3') สำหรับการตรวจสอบชนิดของ SCC*mec* ใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ SCC*mec* ชนิดที่ I-V โดยดำเนินการตามวิธีของ Zhang และคณะ (Zhang *et al.*, 2005) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ซีอาร์มาตรวจสอบด้วยเครื่อง electrophoresis โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน และบันทึกภาพ

## 3. ผลและอภิปราย

### 3.1 การแยก *S. aureus* จากตัวอย่างในโพรงจมูก

การแยกเชื้อ *S. aureus* ในโพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียน จังหวัดพัทลุง โดยทำการเก็บตัวอย่างจากโพรงจมูกเด็กอนุบาล 3 โรงเรียน ได้แก่ โรงเรียนอนุบาลสุวรรณภักดี โรงเรียนอนุบาลป่าพะยอม และโรงเรียนอนุบาลเวดศึกษา โรงเรียนละ 30 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง พบเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างใน โพรงจมูกจำนวน 47 ไอโซเลท เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ไวต่อยาเมธิซิลลิน (MSSA) 44 ไอโซเลท และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (MRSA) 3 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในโพรงจมูกแยกตามโรงเรียน

| โรงเรียนอนุบาล<br>(จำนวนตัวอย่าง) | จำนวน <i>S. aureus</i> ที่แยกได้จากตัวอย่าง |          |
|-----------------------------------|---|----------|
|                                   | MSSA  | MRSA     |
| เวดศึกษา (30)                     | 18  | 2        |
| สุวรรณภักดี (30)                  | 9   | 1        |
| ป่าพะยอม (30)                     | 17  | 0        |
| <b>รวม (90)</b>                   | <b>44</b>                                   | <b>3</b> |

### 3.2 แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ (antibiogram)

จากการทดสอบแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างในโพรงจมูกจำนวน 47 ไอโซเลทพบว่า เชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้มีความไวต่อยา Cephalothin และ Bacitracin มากที่สุด คิดเป็น 97.87% รองลงมา คือ Oxacillin, Gentamicin, Chloramphenicol และ Co-Trimoxazole คิดเป็น 93.62% และไวต่อยา Tetracycline, Novobiocin, Nitrofurantoin, Erythromycin, Cephoxitin และ Penicillin G คิดเป็น 89.36%, 82.98%, 78.72%, 72.34%, 48.94% และ 2.13% ตามลำดับ MSSA ที่แยกได้มีแบบแผนการดื้อยา (antibiogram) ทั้งหมด 18 แบบ และ MRSA ที่แยกได้มีแบบแผนการดื้อยา 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 ดื้อต่อยา Oxacillin, Erythromycin, Cephoxitin และ Penicillin G แบบที่ 2 ดื้อต่อยา Oxacillin, Erythromycin, Cephoxitin, Tetracycline และ Penicillin G (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากโพรงจมูก

| <i>S. aureus</i> | Antimicrobial agents |   |     |     |   |   |    |     |    |     |    |   | จำนวน |   |
|------------------|----------------------|---|-----|-----|---|---|----|-----|----|-----|----|---|-------|---|
|                  | OX                   | E | CEP | GEN | B | C | CX | COT | TE | NIT | NV | P |       |   |
| MSSA (44)        | S                    | S | S   | S   | S | S | S  | S   | S  | R   | S  | R | 1     |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | S | S | R  | S   | S  | R   | S  | R | 3     |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | S | S | S  | S   | S  | S   | S  | R | 17    |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | S | S | R  | S   | S  | S   | S  | R | 7     |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | R | R | R  | S   | S  | R   | R  | R | 1     |   |
|                  | S                    | R | S   | S   | S | S | S  | S   | S  | S   | S  | R | 2     |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | S | S | S  | S   | R  | S   | S  | S | 1     |   |
|                  | S                    | R | S   | S   | S | S | R  | R   | S  | S   | S  | R | 1     |   |
|                  | S                    | R | S   | S   | S | S | R  | S   | S  | S   | S  | R | 2     |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | S | S | S  | S   | S  | S   | R  | R | 1     |   |
|                  | S                    | R | S   | R   | S | S | R  | S   | S  | R   | R  | R | 1     |   |
|                  | S                    | R | S   | S   | S | S | R  | S   | S  | R   | R  | R | 1     |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | S | S | R  | R   | S  | R   | R  | R | 1     |   |
|                  | S                    | S | S   | S   | S | S | R  | R   | R  | S   | S  | R | 1     |   |
|                  | S                    | R | S   | S   | S | S | S  | S   | S  | S   | S  | R | 1     |   |
|                  | MRSA (3)             | R | R   | S   | S | S | S  | R   | S  | S   | S  | S | R     | 2 |
|                  |                      | R | R   | S   | S | S | S  | R   | S  | R   | S  | S | R     | 1 |

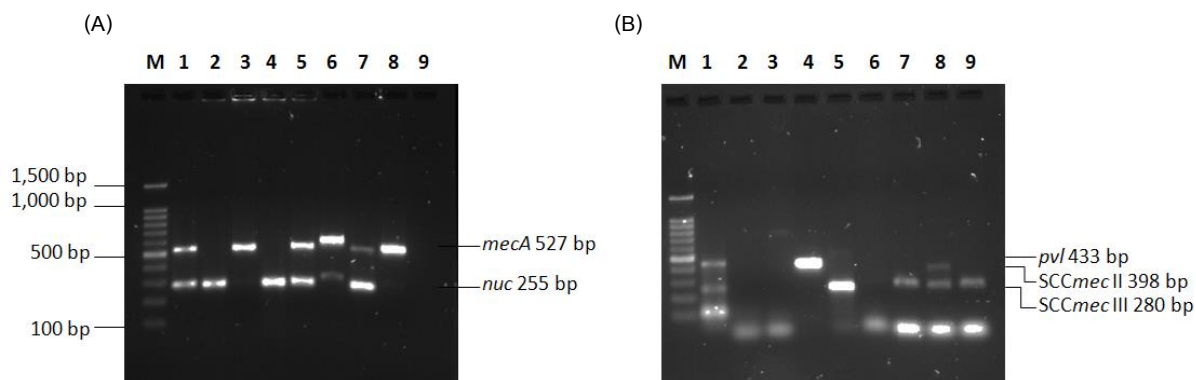
R, Resistant; S, Susceptible; OX, Oxacillin; E, Erythromycin; CEP, Cephalothin; GEN, Gentamicin; B, Bacitracin; C, Chloramphenicol; CX, Cephoxitin; COT, Co-Trimoxazole; TE, Tetracycline; NIT, Nitrofurantoin; NV, Novobiocin และ P, Penicillin G

### 3.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยา oxacillin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ด้วยวิธี broth microdilution

จากผลการทดลองหาค่า MIC ของยา Oxacillin ต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ MRSA R9, R24 และ S13 พบว่า ค่า MIC ของยา Oxacillin ต่อเชื้อ มีค่าเท่ากับ 16, 32 และ 256 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทจัดเป็น MRSA ที่แท้จริง (true MRSA) เนื่องจากมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 4 µg/ml

### 3.4 การตรวจยีน *nuc*, *mecA*, *pvl* และการตรวจหาชนิดของ SCCmec ในเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากโพรงจมูกด้วยเทคนิค PCR

จากการศึกษาในระดับพันธุกรรม พบว่า MRSA ทั้ง 3 ไอโซเลทที่พบ มียีน *mecA* และ *nuc* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไอโซเลทที่พบเป็น MRSA ที่แท้จริง (ภาพที่ 1A) จากการตรวจหาชนิดของ SCCmec ด้วยวิธี PCR ใน MRSA ดังกล่าว โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ MRSA ANT04 (*pvl*<sup>+</sup>) เป็น positive control และสายพันธุ์ MSSA ANT01 (*pvl*<sup>-</sup>) เป็น negative control ผลการทดลองพบว่า MRSA S13 และ MRSA R24 ให้ผล *pvl* เป็นลบ แต่ MRSA R9 ให้ผล *pvl* เป็นบวก (ภาพที่ 1B) ส่วนการตรวจหาชนิดของ SCCmec ใช้เชื้อสายพันธุ์ MRSA ANT02 (SCCmec Type III) เป็น positive control และสายพันธุ์ MSSA ANT01 (ไม่มี SCCmec) เป็น negative control พบว่า MRSA S13 และ MRSA R24 มี SCCmec เป็นชนิด SCCmec Type III ส่วน MRSA R9 พบทั้งชนิด SCCmec Type II และ III (ภาพที่ 1B)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจหายีน *mecA* *nuc* *pvl* และการตรวจสอบชนิดของ SCCmec ด้วยวิธี PCR

(A) M, 100 bp DNA Marker; 1, MRSA TSU02 (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>); 2, MSSA ANT01 (*nuc*<sup>+</sup>); 3, Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci (MRCoNS) ANT01 (*mecA*<sup>-</sup>); 4, MSSA R27; 5, MRSA S13; 6, MRSA R24; 7, MRSA R9; 8, MRCoNS R29; และ 9, Blank control

(B) M, 100 bp DNA Marker; 1, MRSA ANT04 (*pvl*<sup>-</sup>); 2, MSSA ANT01 (*pvl*<sup>-</sup>); 3, MRSA S13; 4, MRSA R9; 5, MRSA ANT02 (SCCmec Type III); 6, MSSA ANT01 (ไม่มี SCCmec); 7, MRSA S13; 8, MRSA R9; และ 9, MRSA R24

จากการศึกษาพบความชุกของ *S. aureus* ในโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดพัทลุง ร้อยละ 55.22 แต่ที่น่าสนใจอย่างมาก คือ การพบ MRSA ในกลุ่มตัวอย่าง 3 ราย ซึ่งการศึกษากาแฟกระจายของ MRSA ในประชากรไทยปกติที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่พบ MRSA ในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาในนักศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 147 คน (Dhiraputra *et al.*, 1996) และในนิสิตมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์จำนวน 50 คน (มณฑล และคณะ, 2549) แต่การพบ MRSA ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ของ Kitti และคณะ ซึ่งศึกษาในกลุ่มตัวอย่างนิสิตมหาวิทยาลัยนเรศวร พบ MRSA 2 ราย จากตัวอย่างทั้งหมด 200 ราย คิดเป็นร้อยละ 1 และอ้างว่าเป็นรายงานแรกที่พบ MRSA ในคนไทยปกติที่มีสุขภาพแข็งแรงในชุมชน โดยเมื่อศึกษาถึงระดับ *mec* cassette chromosome (SCCmec) พบว่าเป็นชนิด SCCmec type II (Kitti *et al.*, 2011) และรายงานของยีสมานีและชัยสิทธิ์ ซึ่งศึกษาในกลุ่มตัวอย่างนิสิตมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง พบ MRSA 2 ราย จากตัวอย่างทั้งหมด 55 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.64 (ยีสมานี เจ๊ะหะ และชัยสิทธิ์ นิยะสม, 2555) อาจกล่าวได้ว่ารายงานนี้เป็นรายงานแรกหรือเป็นหนึ่งในรายงานเพียงไม่กี่ชิ้นของประเทศไทยที่พิสูจน์ยืนยันว่ามี MRSA ในโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนที่มีสุขภาพปกติ แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่หรือการแพร่กระจายของ MRSA ในโรงเรียนอนุบาล ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการเฝ้าระวัง ตลอดจนการแพร่กระจายของ MRSA ในชุมชน สำหรับ MRSA 3 ไอโซเลตที่แยกได้ให้แบบแผนความไวของยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกัน แต่ก็ยังไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบหลายชนิด คือ Cephalothin Gentamicin Chloramphenicol Co-trimoxazole และ Nitrofurantoin ในขณะที่ MRSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาลส่วนมากจะดื้อต่อยาเกือบทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่พบว่า MRSA ที่แยกได้จากชุมชนมีการดื้อยาต้านจุลชีพน้อยกว่า MRSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาล (Deleo *et al.*, 2010) จากการศึกษาที่พบเชื้อ MRSA ในอัตราที่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ตรวจพบในผู้ใหญ่ อาจเป็นเพราะว่าเด็กมีภูมิคุ้มกันต่ำกว่า จึงทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่อาศัย (colonization) ได้ดีกว่า และจากงานวิจัย SCCmec เป็นชนิด SCCmec Type II และ III ซึ่งเป็นชนิดที่มีรายงานการพบในเชื้อ MRSA ที่พบได้ในโรงพยาบาล ดังนั้นเชื้อที่พบในการศึกษานี้จึงอาจเป็นสายพันธุ์ที่ติดมาจากโรงพยาบาลที่กลุ่มตัวอย่างเคยเข้ารับการรักษาในก่อนหน้านั้นก็อาจเป็นไปได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาในระดับสายพันธุ์ของเชื้อที่พบต่อไป นอกจากนั้นผลการวิจัยยังตรวจพบยีน *pvl* ใน MRSA R9 โดยยีน *pvl* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ Paton-Valentine leucocidin เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ ซึ่งยีนนี้มีรายงานการพบใน CA-MRSA ที่เป็นการติดเชื้อในชุมชน ถ้ามีการติดเชื้อนี้ในกระแสเลือด ติดเชื้อในปอด หัวใจ และกระดูก จะทำให้มีอัตราในการเสียชีวิตสูง (สุทธิรัตน์ สิริศักดิ์, 2554) โดยปกติแล้วสามารถพบการติดเชื้อ HA-MRSA ได้ในสถานพยาบาลทั่วโลก ซึ่งแตกต่างจากการติดเชื้อ MRSA ในชุมชน ที่เกิดจาก CA-MRSA โดยการติดเชื้อชนิดหลังนี้พบในคนที่มีสุขภาพแข็งแรงปกติ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่สายพันธุ์ CA-MRSA มีความรุนแรงกว่าและสามารถติดต่อได้ง่ายกว่าสายพันธุ์ HA-MRSA ถึงแม้ว่าเชื้อ CA-MRSA ยังไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย แต่ในยุคของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และ/หรือโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำ CA-MRSA อาจเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อชนิดใหม่สำหรับประเทศไทยก็ได้ถ้าไม่มีการเฝ้าระวังและป้องกันที่ดีพอ

#### 4. บทสรุป

อัตราการแพร่กระจายของเชื้อ *S. aureus* ในโพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดพัทลุง เท่ากับ 52.22% เป็นสายพันธุ์ MSSA 48.89% มีรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ 18 แบบ และเป็น MRSA 3.33% มีรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ 2 แบบ ค่า MIC ต่อยา Oxacillin ของ MRSA ที่แยกได้ 3 ไอโซเลท มีค่าเท่ากับ 16, 32 และ 256 µg/ml ตามลำดับ จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางพันธุกรรมของ MRSA ที่แยกได้พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นไอโซเลทที่มียีน *mecA* และชนิดของ SCC*mec* ที่พบมี 2 แบบ คือ เป็นแบบที่ III (Type III) จำนวน 2 ไอโซเลท (ไอโซเลท S13 และ R24) และแบบที่ II และ III (Type II/III) จำนวน 1 ไอโซเลท (ไอโซเลท R9) นอกจากนี้ยังตรวจพบยีน *pvl* ใน MRSA 1 ไอโซเลท (ไอโซเลท R9) รายงานวิจัยนี้น่าจะเป็นรายงานแรกของประเทศไทยที่มีการพบ MRSA ในโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนที่มีสุขภาพปกติ

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงเรียนอนุบาลป่าพะยอม โรงเรียนอนุบาลเรวดีศึกษา และโรงเรียนอนุบาลสุวรรณภักดี จังหวัดพัทลุง ที่กรุณาให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่สนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน

#### 6. เอกสารอ้างอิง

- ภัทรชัย ภัทรดีสิน. (2551). ตำราแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์. (พิมพ์ครั้งที่ 2). มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.
- มณฑล เลิศคณาวินชกุล, รุ่งฤทัย ทองแสง, สกลฤกษ์ โพธิ์ชา และฮาซึมิชิชิ ลาโห๊ะยา. (2549). การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโคคคัสตอสเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินในหอพักนักศึกษามหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์จังหวัดนครศรีธรรมราช. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์*, 20(2), 129-142.
- ยี่สมานี เจ๊ะหะ และ ชัยสิทธิ์ นิยะสม. (2555). ความชุกและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อสแตฟิโล-คอคคัสตอสเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินซึ่งแยกได้จากโพรงจมูกของนิสิตมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*, 15(3), 24-32.
- สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์. (2554). วิทยาการระบาดของการดื้อเชื้อ Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* ที่เกิดจากชุมชน. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, 11(1), 62-73.
- DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N. and Chambers, H.F. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 375(9725), 1557-1568.
- Dhiraputra, C., Pongpech, P., Rimpranee, S., and Danchaiyijitr, S. (1996). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) carriers among Thai patients and medical personnel. *Journal of Infectious Disease and Antimicrobial Agents*, 13(3), 101-106.
- Kitti, T., Boonyonying, K., and Sitthisak, S. (2011). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among university students in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(6), 1498-1504.
- Mainous, A.G., Hueston, W.J., Everett, C.J., and Diaz, V.A. (2006). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *Annual of Family Medicine*, 4(2), 132-137.
- Nor Shamudin, M., Sekawi Z., van Belcom A., and Needla, V. (2008). First community-acquired *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *Journal of Medical Microbiology*, 57(9), 1180-1181.
- Ramana, K.V., Mohanty, S.K., and Wilson, C.G. (2009). *Staphylococcus aureus* Colonization of Anterior Nares of School Going Children. *Indian Journal of Pediatrics*, 76(8), 813-816.
- Poulsen, A.B., Skov, R. and Pallesen, L.V. (2003). Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 419-421.
- McClure, J.A., Conly, J. M., Lau, V., Elsayed, S., Louie, T., Hutchins, W., et al. (2006). Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1141-1144.
- Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Louie T. and Conly, J.M. (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5026-5033.