อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การจำแนกชนิดและการตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อกลุ่มสแตปฟิโลคอคคัส

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 1 ก.พ. 2559
เลขทะเบียน
เลขเรียกหนังสือ

โดย

ศิริลักษณ์ ธีระภูธร

และ ธานี วงษ์ชัย

QR
.M5
0/4845
2558

พฤษภาคม 2558

สัญญาเลขที่ R2558C116

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การจำแนกชนิดและการตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อกลุ่มสแตปฟิโลคอคคัส

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระภูธร	คณะสหเวชศาสตร์
2. นายธานี วงษ์ขัย	โรงพยาบาลแม่สอด

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีงบประมาณ 2558

บทคัดย่อ

เชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. พบเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและการติดเชื้อในกระแสเลือด ปัจจุบันพบว่ามีแนวโน้มของการดื้อต่อยาเพิ่มขึ้น ซึ่งห้องปฏิบัติการทั่วไปยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มนี้ได้อย่างชัดเจน ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มารักษาที่โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 262 isolates ด้วยการทดสอบทางชีวเคมีและเทคนิค MALDI-TOF MS พบเชื้อ *S. aureus* จำนวน 168 isolates เชื้อในกลุ่ม CoNS จำนวน 94 isolates โดยเป็นเชื้อ *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* และ *S. hominis* คิดเป็น 12.60%, 11.45% และ 4.96% ตามลำดับ และทำการทดสอบการดื้อยาของเชื้อชนิด *mec*A-mediated oxacillin resistance และ inducible clindamycin resistance ด้วยวิธี disk diffusion พบเชื้อในกลุ่ม MRSA จำนวน 25 isolates คิดเป็น 14.88% เชื้อในกลุ่ม MRCoNS จำนวน 60 isolates คิดเป็น 63.83% และเชื้อ inducible clindamycin resistance จำนวน 10 isolates คิดเป็น 3.82%รวมถึงการตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mec*A, *erm*A, *erm*B, *erm*C และ *van*A ด้วยเทคนิค multiplex-PCR พบยีนดื้อยาชนิด *mec*A มากที่สุด จำนวน 104 isolates คิดเป็น 39.69% รองลงมาเป็นยีน *erm*C จำนวน 95 isolates ยีน *erm*A จำนวน 46 isolates และยีน *erm*B จำนวน 1 isolates คิดเป็น 36.26%, 17.56%, 0.38% ตามลำดับ โดยตรวจไม่พบยีน *van*A งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. มีการดื้อยาเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญ เฝ้าระวัง และติดตามการดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ต่อไป

Abstract

Staphylococcus spp. is a main cause of nosocomial infection and sepsis. Nowadays, the incidence of antibiotics resistance for this species have been increased and the species identification could not be performed. The purpose of this study was to identify 262 clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from Mae Sot hospital in Tak province using biochemical tests and MALDI-TOF technique. The results showed there were 168 isolates of *S. aurues* and 94 isolates of coagulase negative Staphylococci (CoNS). In the CoNS group, there were 12.60% of *S. haemolyticus*, 11.45% of *S. epidermidis* and 4.96% of *S. hominis*. In addition, we performed the *mec*A-mediated oxacillin resistance test and inducible clindamycin resistance test to determine the antibiotic resistance phenotypes. The results showed that there were 25 isolates of MRSA (14.88%), 60 isolates of MRCoNS (63.83%), and 10 isolates of inducible clindamycin resistance (3.82%) has been identified. Moreover, we detected the antibiotic resistant genes including *mec*A, *erm*A, *erm*B, *erm*C, and *van*A gene by multiplex-PCR. The results showed that 104 isolates of *mec*A gene (36.69%), 95 isolates of *erm*C gene (36.26%), 46 isolates of *erm*A gene (17.56%) and only 1 isolates of *erm*B gene (0.38%). There was no *van*A gene in any isolates. It this study indicated that *Staphylococcus* spp. contain the antibiotic resistance. Therefore, the medical personnel should be aware and concern about antibiotic resistance crisis.

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. เป็นปัญหาสำคัญของการก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ ตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งพบว่าต่อมามีการดื้อยาหลายชนิด เช่น การดื้อยาแมทธิซิลิน; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) การดื้อยาแวนโคมัยซิน (Vancomycin resistance; VRSA) การชักนำให้ดื้อต่อยาคลินดามัยซิน (Inducible clindamycin resistance) เป็นต้น ซึ่งกลไกการดื้อยาของเชื้อมีได้หลายรูปแบบ (1-4) มีรายงานการระบาดของเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ที่พบการติดเชื้อจากบุคลากรทางการแพทย์หรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ขณะนอนรักษาตัวในโรงพยาบาล (Hospital Acquired MRSA; HA-MRSA) หรือการติดเชื้อในกลุ่มคนที่อยู่ร่วมกันในชุมชน เช่น หมู่นักกีฬา หรือสถานเลี้ยงเด็ก (Community Acquired MRSA; CA-MRSA) ที่พบรายงานในต่างประเทศ (3, 5-7) นอกจากนี้ เชื้อ *Staphylococcus lugdunensis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม coagulase-negative staphylococci (CoNS) ที่เพิ่งถูกค้นพบได้ประมาณ 20 ปี สามารถก่อโรคในคนได้ตั้งแต่ในระดับที่ไม่รุนแรง ได้เช่นเดียวกับเชื้อ *S. aureus* เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนังเนื้อเยื่ออ่อน โดยเฉพาะที่ขาหนีบ จนถึงขั้นที่รุนแรงได้ เช่น การอักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจ (endocarditis) การติดเชื้อของข้อต่อ (prosthetic joint infection) (8-9) แต่ข้อมูลยังมีปรากฏน้อย เนื่องจากปัญหาในการจำแนกชนิดของเชื้อในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกทั่วไปมีข้อจำกัด ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดได้ถึงระดับสปีชีส์ ตลอดจนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาชนิดต่างๆ

จากข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบความชุกของเชื้อ MRSA ร้อยละ 60 และในปี พ.ศ. 2546 และพบเชื้อที่มีแนวโน้มดื้อยา vancomycin เพิ่มมากขึ้น (2) และมีรายงานจากทั่วโลก พบเชื้อ MRSA ได้ในโรงพยาบาลทุกขนาด และในโรงเรียนแพทย์ขนาดใหญ่ในประเทศสหรัฐอเมริการ้อยละ 97 นอกจากนี้ได้พบเชื้อ MRSA ในชุมชนที่เรียกว่า CA-MRSA ซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์ HA-MRSA (7, 10-11) และจากการศึกษาความชุกของเชื้อ CA-MRSA ในผู้ป่วยที่รับการรักษาในโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนพฤษภาคม ปีพ.ศ. 2548 จากเชื้อ 669 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย 448 คน พบการติดเชื้อ CA- MRSA เพียง 3 สายพันธุ์ จาก 2 คนเท่านั้น ซึ่งยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นเชื้อ CA-MRSA (12)

ปัจจุบันมีหลายวิธีที่เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ทดสอบเชื้อ MRSA สำหรับห้องปฏิบัติการโดยใช้คุณสมบัติของเชื้อสองประการ คือ 1) การจำแนกตามลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ การทดสอบวิธี Disk diffusion การทดสอบวิธี Broth dilution การตรวจกรองด้วยอาหารวุ้น (Agar screen) การจำแนกตามลักษณะทางฟีโนไทป์เชื้อในกลุ่มของ coagulase-negative Staphylococci (CoNS) และ 2) การจำแนกตามลักษณะทางจีโนไทป์ เป็นการจำแนกสายพันธุ์

ในระดับโมเลกุล ได้แก่ วิธีการวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าชนิด Pulsed–field gel electrophoresis (PFGE) วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) วิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA-Sequencing) เป็นต้น เพื่อใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ MRSA

ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาเชื้อในกลุ่ม Staphyylococci ที่มีการดื้อยาต่อยาชนิดต่างๆ ที่มีการแพร่ระบาดในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยใช้คุณสมบัติของเชื้อสองประการคือ คุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (Phenotypic Identification) ด้วยการศึกษาการแสดงออกของเชื้อดื้อยา ด้วยวิธี Multiplex PCR เพื่อเป็นการป้องกันและเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อที่มีอยู่ในโรงพยาบาล และในชุมชน ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับยีนดื้อยาและการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล สามารถนำไปเป็นแนวทางในการปรับเปลี่ยนวิธีการให้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อในกลุ่ม Staphylococci ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม ตลอดจนเป็นข้อมูลในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลและชุมชนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี
2. เพื่อตรวจการแสดงออกของการดื้อยาชนิด MRSA, MRCoNs และ Inducible clindamycin ในเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี Disk diffusion
3. เพื่อตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mec*A, *erm*A, *erm*B และ *van*A ในเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธีพีซีอาร์

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การจำแนกชนิดเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาต้านแบคทีเรีย สำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีวิทยาคลินิก มีความสำคัญในขบวนการรักษาผู้ติดเชื้อ ทำให้ให้แพทย์ในการเลือกใช้ยาที่ถูกต้องหรือปรับแนวทางในการให้ยาต้านแบคทีเรีย เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา สามารถลดค่าใช้จ่ายและลดการแพร่กระจายของเชื้อ ตลอดจนข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและการดื้อยา ยังเป็นแนวทางสำหรับการป้อง ควบคุมการการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Staphylococcus* spp. และการก่อโรค (1-2)

เชื้อสกุล Staphylococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมมีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม (gram-positive cocci in cluster) คล้ายพวงองุ่น (grape-like cluster) จัดอยู่ในวงศ์ Staphylococcaceae ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ **เซลล์มีขนาด**เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 µm มีปริมาณกัวนีน/ไซโทซีน (Guanine/Cytosine ; GC content) 30-39 โมลเปอร์เซ็นต์ **ให้**ผลบวกต่อการทดสอบคาทาเลส (catalase) เชื้อในสกุลนี้ปัจจุบันมีสมาชิกมากกว่า 40 สปีชีส์ ส่วนใหญ่เป็น**เชื้อแฟคัล**เททีฟแอนแอโรบส์ (facultative anaerobes) โดยเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญมากที่สุด**ในกลุ่ม** coagulase positive staphylococci เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของร่างกายคน โดยพบที่บริเวณผิวหนัง (skin flora) **และ**ในโพรงจมูก (nasal carrier) ร้อยละ 20-40 ของคนปกติ เชื้อนี้มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการ**เกิดโรค** (virulence factor) ดังนี้

1) โปรตีนที่ผนังเซลล์ (cell wall protein) ได้แก่ โปรตีนเอ (protein A) ที่ป้องกันการกลืนกินของ**เม็ดเลือด**ขาวและ fibronectin-binding protein ทำหน้าที่เกาะกับไฟโบรนิกตินของเซลล์

2) สารพิษที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์หรือเอกโซทอกซิน (exotoxin)

2.1) สแตพฟีโลค็อกคัล เอนเทอโรทอกซิน (Staphylococcus enterotoxin) เป็นสารพิษที่หลั่งออก**มานอก**เซลล์

ชนิดทนความร้อน (heat-stable exotoxin) Staphylococcus enterotoxin แบ่งออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ A B C D E ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษนี้จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง ภายหลังการรับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย**เป็นเวลา** 1-6 ชั่วโมง ในโรคอาหารเป็นพิษ

2.2) ทอกซิก ช็อก ซินโดรม ทอกซิน -1 (toxic shock syndrome toxin-1 : TSST-1) พบการสร้างสาร**พิษนี้ใน**เชื้อ

S. aureus toxic shock syndrome toxin-1 จัดเป็นซูเปอร์แอนติเจน (superantigen) มีความสามารถกระ**ตุ้นระบบ**ต่างๆของร่างกาย ทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง มีผื่น เจ็บคอ อุจจาระร่วงเป็นชนิดน้ำ มีภาวะขาดน้ำ (dehydration) **คลื่นไส้ อาเจียน ในบางรายมีอาการรุนแรงอาจเกิดอาการช็อกตับและไตวายและเสียชีวิตในที่สุด**

2.3) เอกโฟลิเอทีฟ ทอกซิน (exfoliative toxin) หรือเอกโฟลิเอทิน (exfoliatin) หรืออิพิเดอร์โมไลซิน (epidermolysin) เป็นสารพิษที่มีฤทธิ์ในการทำลายผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermal layer) ทำให้หนังกำพร้าหลุดลอกออกไป ก่อให้เกิดกลุ่มอาการผิวหนังหลุดลอก (staphylococcal scalded skin syndrome) หรือโรคริตเทอร์ (Ritter's disease)

2.4) ไซโทไลทิก ทอกซิน (cytolytic toxin) เป็นกลุ่มสารพิษที่หลั่งออกมานอกเซลล์ เพื่อทำลายเซลล์ของร่างกายได้แก่ ฮีโมไลซิน (hemolysin) ชนิดแอลฟา บีตา และเดลต้า hemolysin มีฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดแดง สแตพฟีโลค็อกคัล ลิวโคซิดิน (staphylococcal leukocidin) หรือ เพนทัน-วาเลนไทน์ ลิวโคซิดิน (Penton-Valentine leukocidin) มีฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดขาวและป้องกันการกลืนกินของเม็ดเลือดขาว (anti-phagocytosis)

3) เอนไซม์ ได้แก่ โคแอกูเลส (coagulase) ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ลิเพส (lipase) ดีเอ็นเอส (DNase) อาร์เอ็นเอส (RNase) ฟอสฟาเทส (phosphatase) ไฟบริโนไลซิน (fibrinolysin) เอนไซม์เหล่านี้ มีบทบาททำให้*เชื้อ S. aureus* สามารถบุกรุกและทำลายเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น

การจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่ม Staphylococci

การจำแนกเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี การจำแนกเชื้อ *S. aureus* ออกจาก coagulase-negative Staphylococci (6) เป็นสิ่งสำคัญทางห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องแยกเชื้อให้ได้เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ การทดสอบทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกที่ใช้ในการแยกเชื้อ ดังตารางที่ 1, 2 และ 3

ตาราง 1 แสดงการจำแนกชนิดเชื้อ ในกลุ่ม Staphylococci ที่พบบ่อย

Tests	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus epidermidis*	*Staphylococcus saprophyticus*
Catalase test	+	+	+
Coagulase test	+	-	-
Staphyloslide test	+	-	-
Colour differences in colonies	Gold – yellow	White	White to yellow
Hemolysis test	Beta	None	None
Reaction to Novobiocin	Sensitive	Sensitive	Resistant

ตาราง 2 แสดงการจำแนกชนิดเชื้อ Staphylococcus species (2)

species	Result of test for																			
													Acid production (areobically) form							
	Colyne pigment	Staphylocoagulase	Clumping factor	Heat-stable	Alkaline	Pyrrolidonyl	Ornithine	Urease	B-Galactosidase	Acetoin production	Novobiocin	Polymyxin B	D_a	D-Mannitol	D-Mannose	D_a	D-Xylose	D_a	Maltase	Sucrose
S. aureus subsp. aureus	+	+	+	+	+	-	-	d	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
S. epidermidis	-	-	-	-	+	+	d	+	-	+	-	+	-	-	+	d	-	-	+	+
S. hemoluticus	d	-	-	-	-		+	-	-	+	-	-	+	d	-	d	-	-	+	+
S. lyticus (veterinary)	-	d	-	+	+	-	-	d	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
S. intermedis (veterinary)	-	+	d	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	d	+	d	-	-	±	+
S. lugdunensis	d	-	+	-	-	+	+	d	-	+	-	d	+	-	+	d	-	-	+	+
S. pseuditermedis (veterinary)	-	+	-	ND	+	+	ND	+	+	+	-	+	+	±	+	±	-	-	+	+
S. schleiferi subsp. schleiferi	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-
S. saprophyticus subsp. saprophyticus	d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	d	-	+	-	-	+	+

ตาราง 3 การทดสอบทางชีวเคมี ในการจำแนกชนิดเชื้อ Human Staphylococcus species (3)

Biochemical tests used in the second identification step of the simplified method for the identification of human *Staphylococcus* species

	Result of 1st step: sucrose (–)	
	Nitrate reduction	Urease production
S. cohnii subsp. *cohnii*	–	–
S. cohnii subsp. *urealyticum*	–	+
S. caprae	+	+
S. schleiferi subsp. *schleiferi*	+	–

	Result of 1st step: sucrose (+) mannitol (–) hemolysis (+)		
	β-D-fructose	Urease production	Ornithine decarboxylase
S. warneri	+	+	–
S. haemolyticus	+, –	–	–
S. lugdunensis	+	+, –	+

	Result of 1st step: sucrose (+) mannitol (–) hemolysis (–)
	Resistance to novobiocin
S. warneri	–
S. saprophyticus	+

	Result of 1st step: sucrose (+) mannitol (+)		
	β-D-fructose	Urease production	Resistance to novobiocin
S. saprophyticus	+	+	+
S. warneri	+	+	–
S. haemolyticus	+, –	–	–

+: positive reaction; –: negative reaction; +, –: positive or negative

การดื้อยาและการตรวจหาการดื้อยา

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (2, 4)

เชื้อ MRSA เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะในผู้ป่วยมีภูมิต้านทานต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่มีแผลผ่าตัด แผลน้ำร้อนลวก ไฟไหม้ ผู้ป่วยที่มีการใส่สายสวนปัสสาวะ การใช้เครื่องช่วยหายใจ นอกจากนี้ยังมีการติดต่อจากผู้ป่วยหนึ่งไปยังผู้ป่วยอื่นๆ หรือบุคลากรทางการแพทย์สู่ผู้ป่วยโดยการสัมผัส ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลได้ โดยที่เชื้อ MRSA เป็นเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่ม เช่น ยาเพนิซิลลิน (Penicillins) เตตราไซคลีน (Tetracyclines) ซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamides) ยาก

ลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration; MIC) ต่อยา Methicillin มากกว่าหรือเท่ากับ 16 µg/ml หรือมีค่า MIC ต่อยา Oxacillin มากกว่าหรือเท่ากับ 4 µg/ml ส่วนเชื้อที่ไวต่อยาในกลุ่ม Penicillins จะจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) เชื้อ MRSA มีกลไกที่ดื้อยาดังนี้

1. การสังเคราะห์บีตา-แล็กทาเมส (Beta-lactamase) จะมีฤทธิ์ในการทำลายยา Penicillins และยาที่มีวงแหวนแล็กแทม (lactam ring) เป็นส่วนประกอบ ทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้ได้

2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้ที่รับ (receptor site) ของยาบนผนังเซลล์เปลี่ยนจาก penicillin-binding protein (PBP) เป็น penicillin-binding protein ชนิด 2a (PBP2a) ทำให้เชื้อมีการจับยาในกลุ่ม Penicillins ลดลง ยาจึงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ เชื้อจึงดื้อยา เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำแนกออกเป็นหลายประเภทตามกลไกการดื้อยาดังนี้ (2)

1) True Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (True MRSA) มีกลไกการดื้อยาคือ บริเวณผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเป็น PBP2a มีค่าMIC ต่อยา Methicillin มากกว่าหรือเท่ากับ 16 µg/ml และมีค่า MIC ต่อยา Oxacillin มากกว่าหรือเท่ากับ 4 µg/ml

2) Borderline-Staphylococcus aureus (BORSA) มีการดื้อยาคือ สังเคราะห์เอนไซม์บีตา-แล็กทาเมสในปริมาณที่สูงมากมีค่า MIC ต่อยา Methicillin มากกว่าหรือเท่ากับ 1 µg/ml และมีค่า MIC ต่อยา Oxacillin มากกว่าหรือเท่ากับ 2 µg/ml

3) Modified-resistant Staphylococcus aureus (MODSA) เชื้อในกลุ่มนี้ที่ผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มจำนวนหรือปริมาณของ PBP อื่นที่ไม่ใช่ PBP2a MODSA มีค่า MIC ต่อยา Methicillin และ Oxacillin อยู่ในระดับเดียวกันกับ BORSA

4) Methicillin-aminoglycosides-resistant Staphylococcus aureus (MARSA) หมายถึง เชื้อ S. aureus ที่ผลิตเอนไซม์ aminoglycosides-modifying ชนิดที่เรียกว่า bifunctional enzyme โดยมีการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC (6') และ APH (2') ร่วมกับมีการเปลี่ยนแปลงเป็น PBP2a ทำให้เชื้อในกลุ่มดื้อต่อยา Methicillin และยากลุ่ม aminoglycosides

การวินิจฉัยเชื้อ MRSA ทางห้องปฏิบัติการ (2, 5-6)

1) สิ่งส่งตรวจ ทำการเก็บสิ่งส่งตรวจจากรอยโรคบริเวณต่างๆ ได้แก่ ฝี หนอง บริเวณบาดแผล แผลน้ำร้อนลวก ไฟไหม้ รวมทั้งแผลผ่าตัด ปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ หรือโรคกรวยไตอักเสบ เสมหะจากผู้ป่วยโรคปอดบวม อุจจาระหรือสิ่งอาเจียนจากผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ โลหิตจากผู้ป่วยโลหิตเป็นพิษ รวมทั้งสิ่งส่งตรวจป้ายจากโพรงจมูก (nasal swab)

2) การตรวจจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง โดยวิธีการย้อมแกรม นำสิ่งส่งตรวจได้แก่ หนอง เสมหะ มาทำการย้อมแกรม เชื้อ *S. aureus* ให้ผลเป็นแกรมบวก รูปกลม การเรียงตัวเป็นกลุ่ม (gram-positive cocci in cluster)

3) การเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture media) เชื้อกลุ่มนี้จะเจริญได้ดีบนอาหารที่สารอาหารครบถ้วน (enriched media) ได้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar (BA) trypticase soy agar (TSA) brain heart infusion (BHI) agar ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกเชื้อ (selective media) ได้แก่ phenyl alcohol agar (PEA) Columbia CNA agar mannital salt agar (MSA) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PEA และ Columbia CNA agar จะมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมลบ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลแมนนิทอลร้อยละ 1 มีฟีนอลเรด (phenol red) เป็น indicator มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในปริมาณที่สูงถึงร้อยละ 7.5 ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นได้ เชื้อ *S. aureus* มีความสามารถทนเกลือได้ดี จึงเจริญได้บนอาหาร MSA นอกจากนี้เชื้อ *S. aureus* สามารถหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอลให้กรด จึงเปลี่ยนสี phenol red จากสีส้มเป็นสีเหลือง ทำให้โคโลนีของเชื้อ *S. aureus* เป็นสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA วิธีการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง เป็นการทดสอบที่ใช้ในการตรวจคัดกรองเชื้อ *S. aureus* เพื่อการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ เช่น การตรวจหาเชื้อ *S. aureus* จากดิน อุจจาระ รวมทั้งการตรวจการเป็นพาหะของเชื้อที่บริเวณโพรงจมูก อย่างไรก็ตามเมื่อพบลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 mm จะต้องนำโคโลนีที่ได้มาทดสอบชีวเคมี เพื่อยืนยันเชื้อ *S. aureus* ต่อไป เชื้อ *S. aureus* จะให้โคโลนี สีขาว–เหลือง ขอบเรียบ มันวาว มีลักษณะคล้ายเนย ขนาด 1-2 mm บางสายพันธุ์ให้รงควัตถุ สีเหลืองทอง จะพบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ บีต้า-ฮีโมไลซิส (β-hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar

4) การทดสอบทางชีวเคมี ทำภายหลังจากวินิจฉัยแยกเชื้อว่าเป็น *S. aureus* ต้องทำการแยกเชื้อ *S. aureus* ออกเป็นเชื้อที่ไวต่อยา Methicillin (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ; MSSA) หรือเชื้อที่ดื้อต่อยา Methicillin (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ; MRSA) เนื่องจากผลที่ได้จะมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วย นอกจากนี้จะต้องทำการจำแนกเชื้อ MRSA ออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งเป็นการช่วยวินิจฉัยโรคเพื่อประโยชน์ในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ MRSA ต่อไป การวินิจฉัยแยกเชื้อ *S. aureus* ออกเป็นเชื้อ MRSA และ MSSA ทำได้ดังนี้

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยา Oxacillin โดยวิธีการแพร่ของยา (Disk diffusion method) นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5 × 108 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller–Hinton Agar (MHA) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 2 (MHA + 2% NaCl) และมีความหนา 4 mm วางแผ่นยาออกซาซิลลิน (Oxacillin disk) ที่มียาขนาด 1 μg ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 24 ชั่วโมง ถ้าพบว่ามีวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 mm หรือไม่มีวงใสเลย อ่านผลว่าดื้อต่อยา Oxacillin แปลผล

ว่าเป็นเชื้อ MRSA แต่ถ้ามีวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 13 mm จะถูกจัดว่าเป็นเชื้อ MSSA แต่ในปัจจุบันวิธีนี้ไม่ใช้แล้ว ซึ่ง Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) กำหนดให้ใช้ Oxacillin ในการทดสอบโดยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) แทน ถ้ามีค่า MIC ≥ 4 µg/ml จะถือว่าเป็นเชื้อ MRSA (15) นอกจากการใช้ยา Oxacillin ในการทดสอบเชื้อ MRSA แล้วในปัจจุบัน CLSI แนะนำให้ใช้ยาเซฟฟอกซิทิน (Cefoxitin) 30 µg แทนยา Oxacillin 1 µg เนื่องจากพบว่าให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือมากกว่า โดยถ้าพบว่ามีวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 mm อ่านผลว่าดื้อต่อยา Cefoxitin แปลผลว่าเป็นเชื้อ MRSA แต่ถ้ามีวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 22 mm อ่านผลว่าไวต่อยา Cefoxitin แปลผลว่าเป็นเชื้อ MSSA (15)

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (6) เพื่อประโยชน์ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ แบ่งออกเป็นการจำแนกตามคุณสมบัติทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ ดังนี้

1) การจำแนกตามลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ การศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ (antibiogram) ด้วยวิธีการแพร่ของยา (Disk diffusion) โดยนำเชื้อมาปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard จะมีเชื้อประมาณ 1.5 x 108 CFU/ml แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller –Hinton Agar ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 2 จากนั้นวางแผ่นยาชนิดต่างๆ จำนวน 10–12 ชนิด ได้แก่ Erythromycin Fosfomycin Gentamycin Tetracycline Trimethoprim-sulfamethoxazole; SXT Amikacin Clindamycin Chloramphenicol Teicoplanin Ciprofloxacin Vancomycin Rifampicin ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) รอบแผ่นยา นำไปเปรียบเทียบกับตารางการแปรผลตามมาตรฐานของ CLSI แปลผลเป็นไว (susceptible) ไวปานกลาง (intermediate) หรือดื้อ (resistant) ต่อยา ซึ่งเชื้อ MRSA แต่ละสายพันธุ์จะมีความไวหรือดื้อต่อยาในรูปแบบที่แตกต่างกันไป ทำให้สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MRSA ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

2) การจำแนกตามลักษณะทางจีโนไทป์ เป็นการจำแนกสายพันธุ์ในระดับโมเลกุล ได้แก่

2.1) การวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าชนิด Pulsed–field gel electrophoresis (PFGE) มีหลักการดังนี้ ทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งจีโนม (genomic DNA) ของเชื้อ MRSA นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *Sma*I จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอออกตามขนาดโดยนำมาทำ Pulsed–field gel electrophoresis วิธีนี้จัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในระดับโมเลกุล มีความจำเพาะสูง มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงเมื่อเทียบกับวิธีอื่น แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูง เครื่องมือมีราคาแพง สิ้นเปลืองเวลาและจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในเรื่องนี้โดยเฉพาะ

2.2) Polymerase Chain Reaction (PCR) มีหลักการดังนี้ ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อ MRSA แล้วนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนต่างๆ เช่น hyper variable region (HVR) ของ mecA gene ซึ่งเป็นยีนที่นำรหัสการสร้าง PBP2a มีผลทำให้เชื้อนั้นดื้อยา หรือ spa gene เป็นยีนที่นำรหัสการสร้าง Protein A ที่เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค หรือ coa gene เป็นยีนที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์ coagulase ทำให้เปลี่ยนไฟบริโนเจนให้เป็นก้อนลิ่มไฟบรินได้ โดยวิธี PCR ซึ่งยีนดังกล่าวเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันของขนาดดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์จึงมีประโยชน์ในการจำแนกเชื้อได้

2.3) วิธี Polymerase Chain Reaction- Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) มีหลักการดังนี้ ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อ MRSA แล้วนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนต่างๆ ได้แก่ *mec*A gene spa gene และ coa gene โดยวิธี PCR จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น HaeII AluI หรือ NdeI เป็นต้น แล้วนำมาวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า จะได้แบบแผนของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ

2.4) การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) เป็นการหาลำดับเบสของ DNA เพื่อใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ MRSA เช่น การหาลำดับเบสของ spa gene Community-Associated MRSA (CA-MRSA) (10, 11, 16) CA-MRSA คือเชื้อ MRSA ที่เกิดขึ้นในชุมชน โดยมีคุณสมบัติที่สำคัญ ดังนี้

1) เชื้อมียีนควบคุมปัจจัยความรุนแรง (virulence factor) อยู่ใน Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec) ด้วย ยีนที่สำคัญได้แก่ PVL staphylococcal enterotoxin C, H คณะวิจัยของ Bowden พบว่า เชื้อที่พบในโรงพยาบาล (Hospital-associated MRSA ; HA-MRSA) ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแทบทั้งหมดที่ใช้รักษา แต่เชื้อที่พบตามชุมชน (Community associated MRSA ; CA-MRSA) ดื้อต่อยา Methicillin และยาปฏิชีวนะอื่นอีก 2-3 ชนิดเท่านั้น แม้จะดื้อต่อยาน้อยชนิดกว่า แต่เชื้อที่พบในชุมชนกลับมีความรุนแรงมากกว่า เพราะผลิตโปรตีนที่ชื่อ Panton Valentine Leucocidin (PVL) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้ภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่ำลง เพราะเข้าไปโจมตีเซลล์เม็ดเลือดขาวชื่อ ลิวโคไซต์ (Leukocyte) ที่ทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อโรค หรือ สิ่งแปลกปลอมจากภายนอก และโปรตีนนี้ยังเข้าไปสนับสนุนโปรตีนที่มีชื่อว่า Protein A ซึ่งเป็นช่องทางให้เชื้อที่บุกรุกร่างกายเกาะติดกับเซลล์เนื้อเยื่อ และบุกรุกไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ง่าย จนผู้ติดเชื้อล้มป่วยเป็นโรคปอดอักเสบอย่างรุนแรง ที่เรียกว่า "necrotizing pneumonia" ซึ่งพบได้ 2% ของผู้ป่วยจากเชื้อ S. aureus ทั้งหมด แม้จะเป็นจำนวนที่ถือว่าไม่มาก แต่ความรุนแรงมีมาก เพราะผู้ป่วยถึง 75% มักอาการทรุดลงอย่างรวดเร็วและเสียชีวิตในเวลาต่อมา

2) การกำกับการดื้อยาอยู่ใน SCCmec type IV เป็นที่ทราบว่า PBP2a มีการควบคุมโดยยีน mecA ในอดีตพบว่ายีน mecA อยู่ในโครโมโซมของเชื้อและทั้งส่วนที่เกี่ยวข้องเรียกว่า mec locus ในปี ค.ศ. 1999 Ito และคณะ พบว่าส่วนดังกล่าวเป็น mobile genetic element ให้ชื่อว่า Staphylococcal Cassette

Chromosome (SCCmec) ปัจจุบันพบว่ามี SCCmec 4 ชนิด เรียกเป็นตัวเลขตามลำดับเวลาการค้นพบ โดย SCCmec type IV นี้ได้รับการค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 2002 มีขนาดเล็กมียีนบรรจุอยู่น้อย

3) เชื้อ (CA-MRSA) ดื้อยาเฉพาะกลุ่มบีต้าแลกแทมเท่านั้น แต่จะไวต่อยาชนิดอื่น เช่น Clindamycin Fluroquinolone และยังไวต่อยาต้าน MRSA ทั้งหลายด้วย เกณฑ์การวินิจฉัย CA-MRSA ของ CDC (17) ได้แก่

1. การวินิจฉัยพบเชื้อที่เกิดในผู้ป่วยนอก หรือเพาะเชื้อได้จากผู้ป่วยภายใน 48 ชั่วโมงหลังรับการรักษาในโรงพยาบาล

2. ไม่เคยมีประวัติติดเชื้อหรือมีการสร้างโคโลนีจากเชื้อ MRSA

3. ในรอบปีที่ผ่านมา ไม่เคยเป็นผู้ป่วยในของโรงพยาบาลหรือสถานพักฟื้นใดๆ และไม่เคยได้รับการผ่าตัดหรือทำการฟอกไต

4. ไม่มีสายสวนคา หรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ติดตัวถาวรผ่านทางผิวหนัง

Vancomycin Intermediate *S. aureus* (VISA) และ Vancomycin Resistance S. aureus (VRSA) และการทดสอบ (7-10)

แวนโคมันซิน เป็นยาต้านแบคทีเรียในกลุ่ม glycopeptide ที่ค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 2958 ที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก โดยใช้กันมากขึ้นเมื่อเริ่มมีการดื้อยา Methicillin ในเชื้อ coagulase-negative staphylococci และ *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะเชื้อ MRSA และได้นำมาใช้รักษาการติดเชื้อดื้อยาเหล่านี้ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1979 และ 1983 ได้มีรายงานการพบเชื้อ coagulase-negative staphylococci ที่ดื้อยาต่อ Vancomycin และรายงานกพบเชื้อ MRSA ที่เริ่มต้านยา Vancomycin ในระดับปานกลาง (MIC ≥ 6 µg/ml) ที่เรียกว่า Vancomycin Intermediate *S. aureus* (VISA) โดยพบ VISA เป็นครั้งแรกในผู้ป่วยโรคปอดบวมที่ติดเชื้อ MRSA ในประเทศญี่ปุ่น หลังจากนั้นพบการระบาดในหลายทวีปทั้งเอเชีย ยุโรป และอเมริกา และในปี พ.ศ. 2545 ตรวจพบเชื้อ S. aureus ที่ดื้อยา Vancomycin ในระดับสูง (MIC≥ 16 µg/ml) ที่เรียกว่า Vancomycin Resistance S. aureus (VRSA) กลไกการดื้อยาของ MRSA, VISA และ VRSA เชื้อ MRSA เกิดจากเชื้อ *S. aureus* มีวิวัฒนาในการดื้อยาต่อยาในกลุ่มเพนนิซิลินกึ่งสังเคราะห์ โดยสร้างสามารถเอนไซม์ PBP2a ซึ่งถูกควบคุมด้วยกลุ่มยีน mec และจากการระบาดของเชื้อ MRSA ทำให้มีการพัฒนายาในกลุ่ม glycopeptide คือ Vancomycin และต่อมาเชื้อ MRSA สามารถปรับตัวทำให้ดื้อยา Vancomycin โดยการที่เชื้อสามารถสร้าง D- alanyl-D-alanine residue ซึ่งเป็น precursor ของการสร้างผนังเซลล์ให้มีจำนวนมากกว่าปกติ ทำหใผนังเซลล์หนาขึ้นและจะมี D- alanyl-D-alanine residue ส่วนหนึ่งที่ไปจับกับยาทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปภายในเซลล์ได้ VISA จึงสามารถต้านยา Vancomycin ที่ระดับปานกลางได้เท่านั้น และหากมีประมาณยาเพิ่มมากขึ้นมากกว่า D- alanyl-D-alanine residue จะจับกับยาได้ ทำให้ VISA ไม่สามารถต้านยา Vancomycin ที่ความเข้มข้นสูงได้ ในขณะที่เชื้อ VRSA มียัน van ซึ่งสันนิษฐานว่าได้รับการ

ถ่ายทอดมาจากแบคทีเรียชนิด Enterococcus spp. สามารถต้านยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดรวมถึงยา Vancomycin และยาในกลุ่ม Glycopeptide อื่นๆ ด้วย ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลง precursor ของโครงสร้างผนังเซลล์จาก D-alanyl-D-alanine residue เป็น D-alanyl-D-lactate โดยการควบคุมของยีน vanA ทำให้ยา Vancomycin มาสามารถจับกับโมเลกุลเห้าหมายได้ และนอกจากนี้ยีน vanA ยังสามารถถ่ายทอดสู่พลาสมิดและแพร่สู่แบคทีเรียอื่นอีก

การตรวจหาการดื้อยา Vancomycin ทางห้องปฏิบัติการ (7)

ห้องปฏิบัติการได้มีการตรวจหาการดื้อยาโดยวิธี Disk diffusion โดยใช้แผ่นยา 30 µg Vancomycin ซึ่งปัจจุบันพบว่า 75% ที่ไม่มีการรายงานผลการเกี่ยวกับการพบ glycopeptide-intermediate strain of Staphylococcus epidermidis และเนื่องจากปัญหาในการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวทำให้ผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อน ซึ่ง Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) จึงได้มีการใช้ค่า Minimum Inhibitory concentration ; MIC มาแทนการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion ทั้งในเชื้อ *S. aureus* และ Co-NS และต่อมาให้มีการทดสอบด้วยการใช้ E-strip ในการอ่านค่า MIC ซึ่งสามารภทำได้ง่ายและสะดวก จึงนิยมกันมากขึ้น และควรมีการตรวจยืนยันด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ซึ่งไม่สะดวกสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป

การชักนำให้ดื้อยา Clindamycin และการทดสอบ (6, 11-12)

ปัญหาของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและชุมชนอันเนื่องมากจากเชื้อ *S. aureus* ทำให้มีปัญหาการดื้อยาโดยเฉพาะเชื้อ MRSA ทำให้มีการใช้ยาใหม่เพิ่มขึ้น ซึ่งคือ ยาในกลุ่ม macrolide–lincosamide–streptogramin B (MLSB) ซึ่งสามารถใช้ได้ผลดี และต่อมาพบเชื้อที่ดื้อยาต่อยาในกลุ่มนี้ โดยมีกลการดื้อยา 2 กลไก คือ 1) active efflux mechanism ซึ่งควบคุมโดยยีน msrA (macrolides Streptogramin B resistance) และ 2) ribosomal target ซึ่งควบคุมโดยยีน erm gene และการแสดงออกของการดื้อยาในกลุ่มนี้ขึ้นกับระดับของยาที่เป็นตัวกระตุ้น เช่น ยา erythromycinสำหรับเชื้อ iMLSB (inducible clindamycin) ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพมาตรฐาน หรือวิธี broth-based หรือวิธี agar dilution susceptibility (Fiebelkorn et al. 2003) รวมถึงวิธี Vitek system (Schreckenberger et al. 2004) ได้มีรายงานการศึกษาการตรวจหา iMLSB ด้วยวิธี D-test โดยการวางแผ่นยา 15 µg Erythromycin (E) และแผ่นยา 2 µg Clindamycin (CL) (double discs; in nonadjacent positions ซึ่ง CLSI ได้กำหนดให้เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบหา

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อในโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2557 ถึงเดือนสิงหาคม 2557 และเก็บข้อมูลเพิ่มในส่วนของชนิดของสิ่งส่งตรวจที่มีการพบเชื้อ *Staphylococcus* spp. โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากยอดโคโลนีของเชื้อที่ขึ้น มาใส่ลงในหลอดอาหารที่จะเก็บตัวอย่างเชื้อ (sterile technique) และไม่ระบุที่มา/ชื่อผู้ป่วยของตัวอย่างที่มีเชื้อขึ้น

3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อ และตรวจหาการดื้อยา

3.2.1 การจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังตาราง 4

ทำการจำแนกชนิดเชื้อด้วยการนำเชื้อที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar โดยทำการย้อมสีแกรมแล้วให้ผลเป็นแกรมบวก รูปร่างกลม และทำการทดสอบ catalase test แล้วให้ผลบวก จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด trypticase soy broth (TSB) และบ่มเพาะเชื้อที่ 35 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อมาทำการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ ประกอบด้วย

การทดสอบ coagulase ทำการทดสอบโดยการเพาะเชื้อแบคทีเรียกับพลาสมา ในหลอดทดลอง และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง โดยอ่านผลการจับกลุ่มของก้อน fibrin ที่ 4 ชั่วโมง ถ้าให้ผลลบให้ทำการอ่านผลที่ 24 ชั่วโมงอีก 1 ครั้ง

การทดสอบความไวต่อยา novobiocin ทำการทดสอบโดยนำเชื้อที่ได้ทำการเตรียมให้ มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/ml) และทำการลงเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton agar จากนั้นใช้ แผ่นยา novobiocin 5 µg วางลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลความไวต่อยาของเชื้อโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ถ้ามีขนาดน้อยกว่า 16 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อดื้อต่อยา novobiocin

Nitrate reduction test ทำการทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม *N,N*-dimethyl-α-naphthylamine และ sulfanilic acid โดย ผลบวกจะให้สารประกอบสีแดงเกิดขึ้น โดยถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นให้ทำการเติม zinc dust ถ้า

ให้สารประกอบสีแดงเกิดขึ้น หมายถึงเชื้อไม่มีการสร้างเอนไซม์ nitrate reductase แต่ถ้า nitrite ถูก reduce ไปเป็น nitrogen gas nitric oxide หรือ nitrous oxide หมดแล้ว หลังจากการเติม zinc dust เข้าไปจะไม่มีกาเปลี่ยนแปลงของสี

Urease test ทำการทดสอบโดยเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มี urea เป็นองค์ประกอบ จากนั้นบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลโดยผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูจนถึงแดง

Ornithine decarboxylase test ทำการทดสอบโดยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีส่วนผสมของ L-ornithine dihydrochloride ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็น เวลา 8 ชั่วโมง โดยผลบวกจะมีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วง

การทดสอบการใช้สารคาร์โบไฮเดรต (น้ำตาล) ทำการทดสอบกับน้ำตาลชนิด maltose lactose D-mannitol D-mannose D-trehalose และ D-xylose โดยทำการเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและอ่านผล โดยผลบวกจะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

Mannitol salt agar (MSA) ทำการทดสอบโดยเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและอ่านผล โดยเชื้อในกลุ่ม coagulase positive Staphylococci จะเกิดโคโลนีสีเหลืองและโซนใสสีเหลือง ในขณะที่ coagulase negative Staphylococci จะให้โคโลนีขนาดเล็กสีชมพูหรือแดงโดยไม่เปลี่ยนสีของอาหาร

ตาราง 4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ของเชื้อในกลุ่ม Staphylococci (ดัดแปลงวิธีการจากวิธีของ Kloos and Schleifer) (13-15)

Staphylococcus Species	Coagulase	Novobiocin resistance	Urease	Nitrate reductase	Mannitol salt agar	Ornithine decarboxylase	Acid production from Maltose	Lactose	D-mannitol	D-Mannose	D-Trehalose	D-Xylose
S.aureus	+	S	v	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S.epidermidis	-	S	+	+	-	v^{sl}	+	v	-	+sl	-	-
S.haemolyticus	-	S	-	+	-	-	+	v	v	-	+	-
S.hominis	-	S	+	v	-	-	+	v	-	-	v	-
S.capitis	-	S	-	v	-	-	-	-	+	+	-	-
S.warneri	-	S	+	v	-	-	+sl	v	v	-	+	-
S.lugdunensis	-	S	v	+	-	+	+	+	-	+	+	-
S.saprophyticus	-	R	+	-	-	-	+	v	v	-	+	-
S.cohnii	-	R	-	-	-	-	v^{sl}	-	v	v^{sl}	+	-
S.xylosus	-	R	+	v	-	-	+	v	+	+	+	+

***หมายเหตุ ; +, ≥ 90% of strains positive; -, ≥ 90% of strains negative,

$+^{sl}$, ≥ 90% of strains positive, reaction slow; v, 11-89% of strains positive

v^{sl},11-89% of strains positive, reaction slow

3.2.2 การทดสอบหาความไวต่อยาของเชื้อ (Antimicrobial susceptibility testing) โดยวิธี Disk diffusion (16)

เตรียมเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard โดยใช้ sterile loop เขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์ (pure colony) จำนวน 1-4 โคโลนี ลงใน TSB จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อในหลอดที่ปรับความขุ่นแล้วบิดให้หมาดๆ กับข้างหลอด แล้วนำมาป้ายบน MHA ที่ผึ่งผิวหน้าให้แห้งแล้ว ป้ายเป็น 3 ระนาบ ตั้งไว้ประมาณ 3-5 นาที จากนั้นทำการวางแผ่นยาลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ sterile forceps และกดเบาเบาเพื่อให้แผ่นยาไม่หลุด วางแผ่นยาโดยให้ระยะห่างจากขอบแผ่นยาถึงอีกขอบแผ่นยาประมาณ 15-20 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ก่อนนำเข้าไปบ่มเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่ 35°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่นยาที่ไม่มีเชื้อเจริญขึ้น (inhibition zone) และแปลผลโดยใช้ตารางมาตรฐาน

3.2.3 การตรวจการแสดงออกของการดื้อยาชนิดต่างๆ ในเชื้อ *Staphylococcus* spp. ชนิด MRSA, MRCoNs และ Inducible clindamycin ด้วยวิธี Disk diffusion (17-18)

การทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ทำโดยนำเชื้อจาก TSB และเตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/ml) และทำการลงเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton agar จากนั้นทำการทดสอบดังต่อไปนี้

ทดสอบหาเชื้อในกลุ่ม methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) และ methicillin resistant coagulase negative Staphylococci (MRCoNS) โดยมีวิธีการทดสอบ ใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC® 43300 (zone ≤ 21 mm) เป็นแบคทีเรียควบคุมผลบวก และเชื้อ *S. aureus* ATCC® 25923 (zone 23-29 mm) เป็นแบคทีเรียควบคุมผลลบ

ทดสอบการชักนำให้เชื้อดื้อต่อยา clindamycin (inducible clindamycin resistance) ในเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี D-test สามารถทำการทดสอบได้ โดยการวางแผ่นยา erythromycin 15 µg กับแผ่นยา clindamycin 2 µg ห่างกันระหว่างขอบของแผ่นยาประมาณ 15 มิลลิเมตร บนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar ที่ผ่านการเพาะเชื้อทดสอบที่ทราบความเข้มข้น (1.5×10^8 CFU/ml) จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *S. lugdunensis* และ 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อในกลุ่ม CoNS อื่นๆ ทำการอ่านผลการทดสอบ โดยถ้าบริเวณที่ยาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบแผ่นยา clindamycin มีลักษณะ D shape หมายถึง เชื้อถูกชักนำให้ดื้อต่อยา clindamycin แต่ถ้าไม่ปรากฏบริเวณที่ยาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบแผ่นยา clindamycin หมายถึง เชื้อดื้อต่อยา clindamycin (26) ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ inducible clindamycin resistance (D-shape) จาก

ห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก เป็นแบคทีเรียควบคุมผลบวก และเชื้อ *S. aureus* ATCC® 25923 (no D-shape) เป็นแบคทีเรียควบคุมผลลบ

3.2.4 การตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mec*A, *erm*A, *erm*B และ *van*A ในเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธีพีซีอาร์

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) โดย phenol-chloroform (18)

นำเชื้อจาก trypticase soy broth โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มลงในอาหารที่มีเชื้อให้ได้ปริมาตร 1 loop ful แล้วใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Luria Bertani broth (LB broth) ปริมาตร 2 ml จากนั้นทำการบ่มเพาะเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C โดยทำการบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มที่สามารถเขย่าได้ แล้วนำเชื้อหลังการบ่มเพาะเชื้อทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบน (supernatant) แล้วทำการละลายตะกอนเซลล์ (cell pellet resuspension) โดยใช้ lysis solution ปริมาตร 100 µl (ที่มี lysostaphin เป็นองค์ประกอบ) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จึงทำการเติม phenol-chloroform ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ลงไป แล้วนำไปผสมกันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นถ่ายส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่ แล้วทำการเติม 3 M sodium acetate และ isopropanol ที่เย็นจัด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วเทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำการเติม 70% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบนออก แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 – 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 50 µl จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

การตรวจหายีนดื้อยาชนิด โดยวิธี multiplex PCR (18)

เพิ่มจำนวนยีนที่ควบคุมการดื้อยา *mec*A ยีน *erm*A ยีน *ermB* และยีน *van*A โดยทำการดูดสาร 2X RBC blue Taq Mastermix (20mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 20mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mg/ml BSA, 20mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.4 mM dNTP mix, 0.15 U/µl, RBC Taq DNA polymerase, stabilizers, blue dye) จากบริษัท RBC Bioscience forward primers 10 µM reverse primers 10 µM (primer ดังตาราง 5 และ DNA template 1 µg โดยปรับปริมาตรรวมเป็น 20 µl จากนั้นใส่ลงใน PCR tube ที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำใส่ในเครื่อง thermocycler ที่ตั้งสภาวะในการเพิ่มจำนวน DNA ดังตาราง 6

ตาราง 5 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในเทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจสอบยีนที่ส่งผลต่อการดื้อยาต้านจุลชีพ

Genes	Oligonucleotide (5'-3')	Size of amplified product (bp)	Reference
*mec*A	5 ' TGGCTATCGTGTCACAATCG 3' 5' CTGGAACTTGTTGAGCAGAG 3'	310	(34)
*fem*A	5' AAAAAAGCACATAACAAGCG 3' 5' GATAAAGAAGAAACCAGCAG 3'	132	(9)
*van*A	5' GGGAAAACGACAATTGC 3' 5' GTACAATGCGGCCGTTA 3'	732	(35)
*erm*A	5 '-AAG CGG TAA ACC CCT CTG A-3 ' 5'-TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC-3'	190	(9)
*erm*B	5 '-CTATCTGATTGTTGAAGA AGGATT-3 ' 5 '-GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA-3 '	142	(9)
*erm*C	5'-CTTGTTGATCACGATAATTTCC-3' 5'-ATCTTTTAGCAAACCCGTATTC-3'	190	(33)

หมายเหตุ : *fem*A เป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. aureus* ดังนั้น เชื้อที่ให้ผลบวกกับยีน *mec*A และ *fem*A ถือว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม MRSA

โดยขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยวิธี multiplex PCR แบ่งเป็น 2 ชุดการทดสอบ คือ

ชุดการทดสอบ A ; ทำการตรวจสอบยีน *mec*A ยีน *fem*A และยีน *erm*C

ชุดการทดสอบ B ; ทำการตรวจสอบยีน *van*A ยีน *erm*A และยีน *erm*B

ตาราง 6 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ สำหรับชุดการทดสอบ A และ B

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	
Initial denaturation	94°C	4 นาที	
Denaturation	94°C	2 นาที	30 รอบ
Annealing	54°C	2 นาที	
Extension	72°C	90 วินาที	
Final extension	72°C	4 นาที	

การตรวจสอบผลผลิตของ PCR โดยกระบวนการแยกด้วยไฟฟ้าโดยวิธี gel electrophoresis (18)

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.7% โดยละลาย agarose gel ใน 0.5X TBE buffer แล้วนำไปหลอมในเตาไมโครเวฟ แล้วทิ้งให้เจลเย็นตัวลงที่อุณหภูมิประมาณ 55 °C แล้วเทลงในถาดเตรียมเจล จากนั้นวางหวี (comb) ลงไปเพื่อทำให้เกิดช่อง (well) สำหรับเติมผลผลิตของ PCR ทิ้งให้เจลแข็งตัวแล้วดึงหวีออก นำเจลที่ได้ใส่ลงไปในแท็งค์ จากนั้นเติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ทำการผสม PCR product และ DNA marker เข้ากับ 6X gel-loading buffer บนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นหยดลงในช่องเจล โดยใช้ 100 bp DNA ladder marker ในการเทียบขนาดของ PCR product จากนั้นต่อสายไฟโดยให้ด้านของผลผลิตของ PCR อยู่ที่ขั้วลบ (cathode) ปรับความต่างศักย์ที่ 1-5 Volt/cm นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (EtBr) ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/mL เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet light; UV) จะเห็นแถบ DNA เรืองแสง UV โดยสังเกตแถบ DNA ที่เกิดขึ้นเทียบกับแถบ DNA marker ภายใต้แสง UV จากนั้นบันทึกผล

เชื้อแบคทีเรียควบคุม (17-18)

เชื้อแบคทีเรียควบคุมของยีน *mec*A : *S. aureus* ATCC® 43300

เชื้อแบคทีเรียควบคุมผลลบ : *S. aureus* ATCC® 25923

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหาความชุกของชนิดของเชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *S. hominis* เชื้อ *S. haemolyticus* เชื้อ *S. capitis* เชื้อ *S. warneri* เชื้อ *S. lugdunensis* เชื้อ *S. saprophyticus* เชื้อ *S. cohnii*

เชื้อ *S. xylosus* และแบคทีเรียดื้อยาชนิด MRSA MRCoNS และ inducible clindamycin resistance รวมถึงยีนดื้อยาชนิด *mec*A ยีน *erm*A ยีน *erm*B ยีน *erm*C และยีน *van*A โดยใช้สถิติร้อยละในการวิเคราะห์ข้อมูล

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยนี้ประกอบด้วย การเก็บตัวอย่างเชื้อ การเพาะเลี้ยงเชื้อ และนำเชื้อที่ได้มาจำแนกชนิดเชื้อโดยการทดสอบทางชีวเคมี และทดสอบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อด้วยวิธี disk diffusion รวมถึงตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี multiplex polymerase chain reaction (multiplex-PCR) โดยเชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้จากห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 280 ไอโซเลต โดยเชื้อดังกล่าวผ่านการจำแนกชนิดของเชื้อเบื้องต้นเป็นเชื้อ *S. aurues* และเชื้อในกลุ่ม CoNS รวมถึงผ่านการทดสอบความไวต่อยา

4.1 การจำแนกชนิดเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี

จากการจำแนกชนิดของเชื้อจำนวน 280 ไอโซเลต ด้วยการย้อมสีแกรม การทดสอบ catalase test ทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อทั้งสิ้น 12 การทดสอบ และใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ในการทดสอบยืนยันผลสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม CoNS โดยผลการจำแนกชนิดของเชื้อสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) coagulase positive Staphylococci จำนวน 168 isolates 2) coagulase negative Staphylococci จำนวน 94 ไอโซเลต 3) เชื้อที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ รวมถึงเชื้อที่อยู่ในจีนัสอื่นๆ จำนวน 18 ไอโซเลต โดยแสดงดังตาราง 7

4.1.1 Coagulase positive staphylococci

จากการทดสอบ coagulase test พบเชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 168 ไอโซเลต โดยเชื้อที่ให้ผลบวกทางคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบกับ mannitol salt agar พบว่าให้ผลบวกทั้ง 168 ไอโซเลต ทางคณะผู้วิจัยจึงสรุปว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด

ตาราง 7 แสดงจำนวนเชื้อที่จำแนกตามสายพันธุ์ โดยแยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 262 ไอโซเลต

กลุ่มเชื้อ/สปีชีส์	จำนวน (%)
Coagulase positive Staphylococci	
- *S. aurues*	168 (64.12)
Coagulase negative Staphylococci	94 (35.88)
- *S. haemolyticus*	33 (12.60)
- *S. epidermidis*	30 (11.45)
- *S. hominis*	13 (4.96)
- *S. capitis*	4 (1.53)
- *S. saprophyticus*	4 (1.53)
- *S. equorum*	4 (1.53)
- *S. warneri*	2 (0.76)
- *S. sciuri*	2 (0.76)
- *S. kloosii*	1 (0.38)
- *S. pettenkoferi*	1 (0.38)

4.1.2 Coagulase negative staphylococci

จากการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ พบเชื้อที่ให้ผลลบกับการทดสอบ coagulase test จำนวน 103 ไอโซเลต และทำการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติม โดยผลการทดสอบสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่สามารถระบุสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์จำนวน 42 ไอโซเลต และกลุ่มที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์จำนวน 61 ไอโซเลต จากนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ทำการส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อทั้ง 103 ไอโซเลตด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยพบว่าเป็นเชื้อ *S. heamolyticus* 33 ไอโซเลต เชื้อ *S. epidermidis* 30 ไอโซเลต เชื้อ *S. hominis* 13 ไอโซเลต เชื้อ *S. capitis* 4 ไอโซเลต เชื้อ *S. saprophyticus* 4 ไอโซเลต เชื้อ *S. equorum* 4 ไอโซเลต เชื้อ *S. warneri* 2 ไอโซเลต เชื้อ *S. sciuri* 2 ไอโซเลต เชื้อ *S. pettenkoferi* 1 ไอโซเลต เชื้อ *S. kloosii* 1 ไอโซเลต เชื้อ *S. aureus* 6 ไอโซเลต และเชื้อจีนัสอื่นๆ จำนวน 3 ไอโซเลต โดยจากผลการทดสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อข้างต้น ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบผลกับการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ (กลุ่มที่สามารถระบุสาย

พันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์จำนวน 42 ไอโซเลต) โดยใช้ผลการทดสอบจากเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นมาตรฐาน ให้ผลดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงผลการจำแนกชนิดเชื้อระหว่างวิธี Biochemical test กับ MALTI-TOF

กลุ่มเชื้อ/สปีชีส์	MALTI-TOF จำนวน	การทดสอบทางชีวเคมี จำนวน
Coagulase negative Staphylococci		
- *S. haemolyticus* (19)	19/19	16/19
- *S. epidermidis* (12)	12/12	8/12
- *S. hominis* (3)	3/3	1/3
- *S. capitis* (3)	3/3	1/3
- *S. sciuri* (1)	1/1	0/1
- *S. pettenkoferi* (1)	1/1	0/1
Coagulase positive Staphylococci		
- *S. aurues* (3)	3/3	0/3

จากตาราง 8 พบว่าการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อให้ผลตรงกับการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ทั้งสิ้น 26 ไอโซเลตจาก 42 ไอโซเลต โดยคิดเป็น 61.90% โดยเชื้อที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีตรงกับผลกับการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นเชื้อ *S. haemolyticus* มากที่สุด รองลงมาเป็นเชื้อชนิด *S. epidermidis* เชื้อ *S. hominis* และเชื้อ *S. capitis* ตามลำดับ

4.1.3 เชื้อที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้และเชื้อที่อยู่ในจีนัสอื่น

พบเชื้อที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar ได้จำนวน 9 ไอโซเลต โดยทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำแล้วยังให้ผลดังเดิม และพบเชื้อในจีนัสอื่นจำนวน 9 ไอโซเลต โดยทราบผลจากการทดสอบเบื้องต้น ได้แก่ การย้อมสีแกรม และการทดสอบ catalase test

4.2 การทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ชนิด MRSA MRCoNS และ inducible clindamycin resistance ด้วยวิธี disk diffusion

ผลการทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Staphylococcus* spp. จำนวน 262

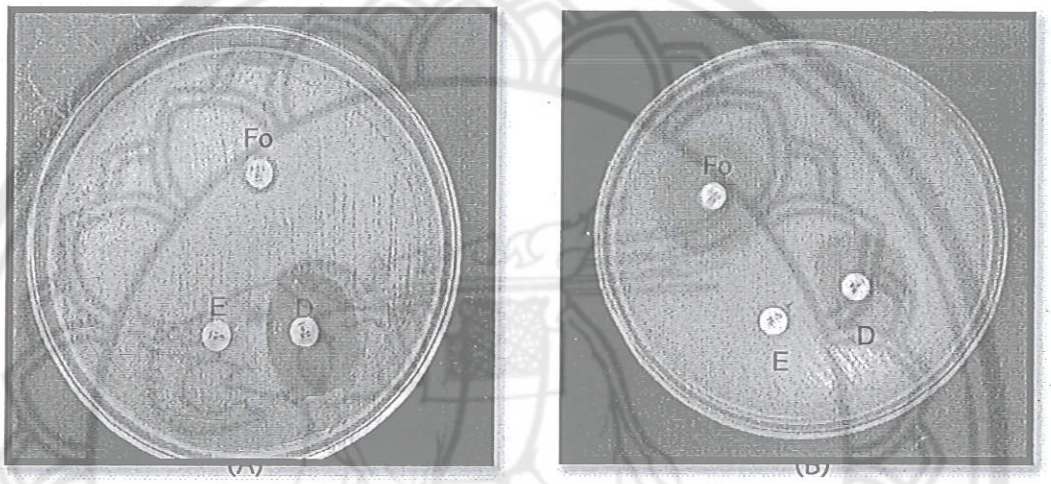
QR
81
.M5
ม4845
2558

1691533 ๑

สำนักหอสมุด

1 ต.ค. 2559

ไอโซเลต ด้วยวิธี disk diffusion โดยใช้แผ่นยา cefoxitin 30 µg ในการทดสอบเชื้อในกลุ่ม MRSA/MRCoNS และใช้แผ่นยา erythromycin 15 µg ร่วมกับแผ่นยา clindamycin 2 µg ในการทดสอบเชื้อ inducible clindamycin resistance โดยใช้เกณฑ์การทดสอบและอ่านผลการทดสอบตาม clinical and laboratory standards institute (CLSI) ปี 2013 โดยได้ผลการทดสอบดังตาราง 9



ภาพ 1 แสดงตัวอย่างการทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 2 วิธี

โดย ภาพ (A) แสดงถึง เชื้อ *S. aurues* ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอบแผ่นยา cefoxitin (Fox) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 มิลลิเมตร จึงถือเป็นเชื้อในกลุ่ม MRSA และมีลักษณะโซนใสรอบแผ่นยา erythromycin (E) และ clindamycin (DA) เป็นแบบ D-shape จึงถือเป็นเชื้อชนิด inducible clindamycin resistance

ภาพ (B) แสดงถึง เชื้อ *S. aurues* ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอบแผ่นยา cefoxitin (Fox) มากกว่าหรือเท่ากับ 21 มิลลิเมตร จึงถือว่าไม่เป็นเชื้อในกลุ่ม MRSA และมีลักษณะโซนใสรอบแผ่นยา erythromycin (E) และ clindamycin (DA) เป็นแบบ D-shape จึงถือเป็นเชื้อชนิด inducible clindamycin resistance

ตาราง 9 สรุปผลการทดสอบการดื้อต่อยาทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์

Staphylococcus spp. n (%)	การทดสอบการดื้อยาทางฟีโนไทป์ n (%)		การทดสอบการดื้อยาทางจีโนไทป์ n (%)				
	mecA-mediated oxacillin resistance	Inducible clindamycin resistance	*mec*A gene	*erm*A gene	*erm*B gene	*erm*C gene	*van*A gene
Coagulase positive Staphylococci							
- *S. aurues* (168)	25 (14.88)	3 (1.79)	29 (17.26)	25 (14.88)	0 (0)	52 (30.95)	0 (0)
Coagulase negative Staphylococci (94)	60 (63.83)	7 (7.45)	75 (79.79)	21 (22.34)	0 (1.06)	43 (45.74)	0 (0)
- *S. haemolyticus* (33)	29 (87.89)	7 (21.21)	29 (87.89)	9 (27.27)	0 (0)	19 (57.58)	0 (0)
- *S. epidermidis* (30)	12 (40)	0 (0)	23 (76.67)	6 (20)	0 (0)	15 (50)	0 (0)
- *S. hominis* (13)	9 (69.23)	0 (0)	10 (76.92)	1 (7.69)	0 (0)	3 (23.08)	0 (0)
- *S. capitis* (4)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	0 (0)
- *S. saprophyticus* (4)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	0 (0)
- *S. equorum* (4)	2 (50)	0 (0)	4 (100)	1 (25)	0 (0)	3 (75)	0 (0)
- *S. warneri* (2)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)
- *S. sciuri* (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
- *S. pettenkoferi* (1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
- *S. kloosii* (1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total : 262	85 (32.44)	10 (3.82)	104 (39.69)	46 (17.56)	1 (0.38)	95 (36.26)	0 (0)

4.2.1 การทดสอบการดื้อยาชนิด *mecA*-mediated oxacillin resistance หรือเชื้อในกลุ่ม MRSA/MRCoNS

ในการทดสอบเชื้อในกลุ่ม MRSA หรือ MRCoNS พบเชื้อทั้งหมด 85 ใน 262 ไอโซเลต คิดเป็น 32.44% ที่จัดอยู่ในกลุ่ม MRSA/MRCoNS โดยเป็น coagulase positive Staphylococci ที่จัดอยู่ในเชื้อกลุ่ม MRSA จำนวน 25 ใน 168 ไอโซเลต คิดเป็น 14.88% ของเชื้อในกลุ่มนี้ โดยเป็นเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด และพบเชื้อ coagulase negative Staphylococci ที่จัดอยู่ในกลุ่ม MRCoNS จำนวน 60 ใน 94 ไอโซเลต คิดเป็น 63.83% ของเชื้อในกลุ่มนี้ โดยแสดงแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อดังตาราง 9

4.2.2 การทดสอบการดื้อยาชนิด inducible clindamycin resistance

ในการทดสอบเชื้อ inducible clindamycin resistance หรือเชื้อที่มีสามารถชักนำให้มีการดื้อต่อยา clindamycin นั้น พบเชื้อทั้งหมด 10 ใน 262 ไอโซเลต คิดเป็น 3.81% โดยเป็นเชื้อ coagulase positive Staphylococci ที่จัดอยู่ในเชื้อ inducible clindamycin resistance จำนวน 3 ใน 168 ไอโซเลต คิดเป็น 1.79% โดยเป็นเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด และพบเชื้อ coagulase negative Staphylococci ที่จัดอยู่ในเชื้อ inducible clindamycin resistance จำนวน 7 ใน 94 ไอโซเลต คิดเป็น 7.45% โดยมีเพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นเชื้อ *S. haemolyticus* จำนวน 7 ใน 33 ไอโซเลต คิดเป็น 21.21%

4.3 การตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mec*A ยีน *erm*A ยีน *erm*B ยีน *erm*C และยีน *van*A ด้วยวิธี multiplex polymerase chain reaction (multiplex-PCR)

การทดสอบการตรวจหายีนดื้อยาทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ยีน *mec*A ยีน *erm*A ยีน *erm*B ยีน *erm*C และยีน *van*A ของเชื้อ *Staphylococcus* spp. จำนวน 262 ไอโซเลต โดยใช้เทคนิค multiplex-PCR โดยประกอบด้วย 2 ชุดการทดสอบ ได้แก่ ชุด A และ ชุด B ได้ผลดังนี้

4.3.1 การตรวจหายีน *mec*A

พบเชื้อที่มียีน *mec*A ทั้งหมด 104 ใน 262 ไอโซเลต คิดเป็น 39.69% โดยเป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase positive Staphylococci จำนวน 29 ใน 168 ไอโซเลต คิดเป็น 17.26% ซึ่งเป็นเชื้อ *S. aurues* ทั้งหมด และเป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase negative Staphylococci จำนวน 75 ใน 94 ไอโซเลต คิดเป็น 79.79% โดยผลการตรวจหายีน *mec*A ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงดังตาราง 9

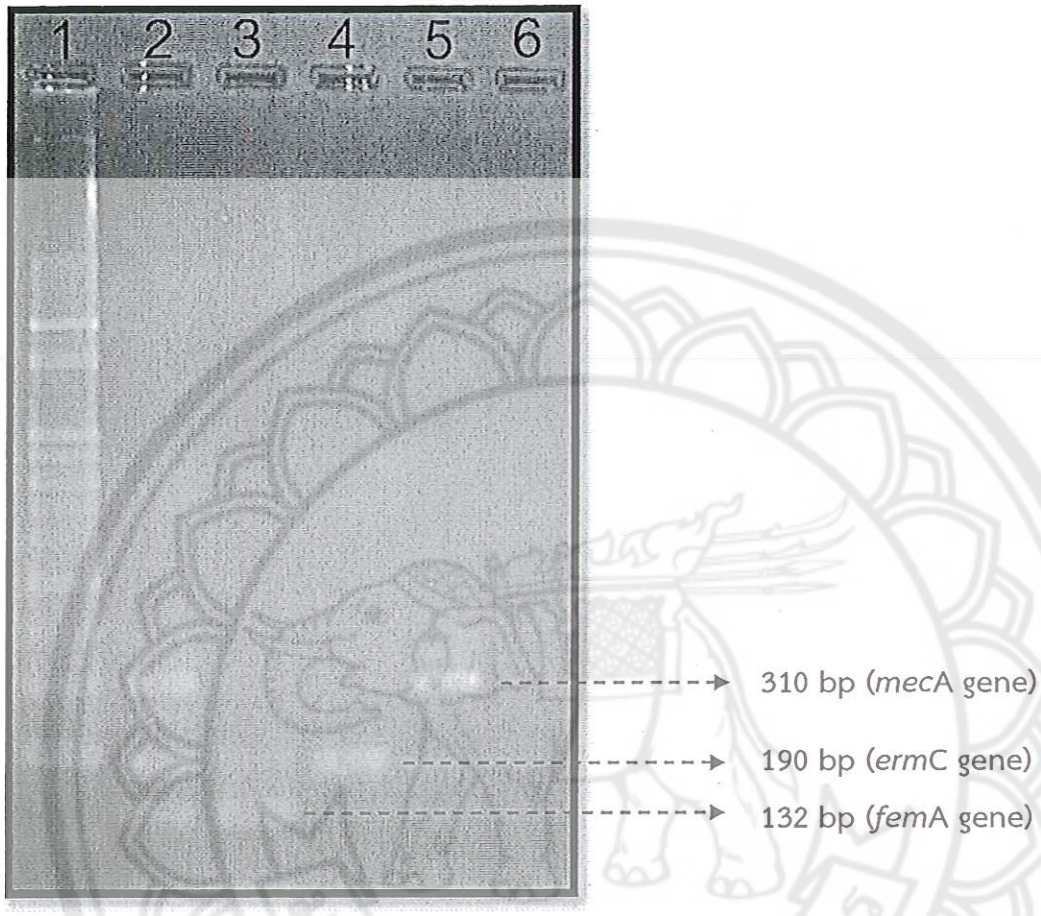
4.3.2 การตรวจหายีน *erm*A ยีน *erm*B และยีน *erm*C

พบเชื้อที่มียีน *erm*A ทั้งหมด 46 ใน 262 ไอโซเลต คิดเป็น 17.56% โดยเป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase positive Staphylococci จำนวน 25 ใน 168 ไอโซเลต คิดเป็น 14.88% ซึ่งเป็นเชื้อ *S. aurues* ทั้งหมด และเป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase negative Staphylococci จำนวน 21 ใน 94 ไอโซเลต คิดเป็น 22.34 โดยผลการตรวจหายีน *erm*A ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงดังตาราง 9

พบเชื้อที่มียีน *erm*B ทั้งหมด 1 ใน 262 ไอโซเลต คิดเป็น 0.38% โดยเป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase negative Staphylococci คือ *S. warneri* จำนวน 1 ใน 2 ไอโซเลต คิดเป็น 50% และพบเชื้อที่มียีน *erm*C ทั้งหมด 95 ใน 262 ไอโซเลต คิดเป็น 36.26% โดยเป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase positive Staphylococci จำนวน 52 ใน 168 ไอโซเลต คิดเป็น 30.95% ซึ่งเป็นเชื้อ *S. aurues* ทั้งหมด และเป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase negative Staphylococci จำนวน 43 ใน 94 ไอโซเลต คิดเป็น 45.74 โดยผลการตรวจหายีน *erm*C ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงดังตาราง 9

4.3.3 การตรวจหายีน *van*A

จากการทำการตรวจหายีนดื้อยาจากเชื้อ *Staphylococcus* spp. จำนวน 262 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค multiplex-PCR ไม่พบเชื้อที่มียีน *van*A



ภาพ 2 แสดงผลการตรวจหายีน multiplex-PCR ชุด A

Lane 1 : 100 bp DNA ladder marker

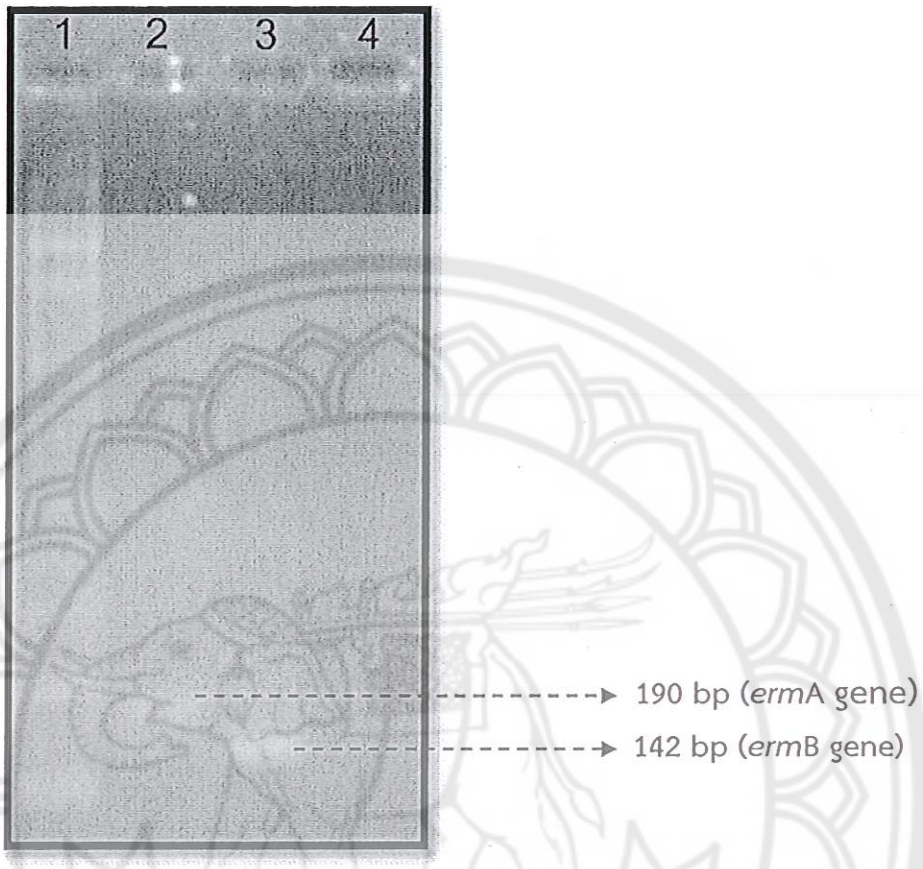
Lane 2 : positive control ของยีน *mec*A ยีน *erm*C และยีน *fem*A

Lane 3 : เชื้อตัวอย่างซึ่งพบยีน *erm*C และ *fem*A

Lane 4 : เชื้อตัวอย่างซึ่งพบยีน *erm*C

Lane 5 : เชื้อตัวอย่างซึ่งพบยีน *mec*A

Lane 6 : negative control โดยใช้เชื้อ *S. aurues* ATCC® 25923



ภาพ 3 แสดงผลการตรวจหายีน multiplex-PCR ชุด B

Lane 1 : 100 bp DNA ladder marker

Lane 2 : เชื้อตัวอย่างซึ่งพบยีน *erm*A

Lane 3 : เชื้อตัวอย่างซึ่งพบยีน *erm*B

Lane 4 : negative control โดยใช้เชื้อ *S. aurues* ATCC® 25923

บทที่ 5
อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม Staphylococci จำนวน 262 isolates ด้วยการย้อมสีแกรม การทดสอบ catalase test และการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อทั้ง 12 การทดสอบ รวมถึงทดสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ในเชื้อกลุ่ม CoNS พบเป็นเชื้อ *S. aureus* มากกว่าเชื้อในกลุ่ม CoNS โดยจำแนกได้เป็นเชื้อ *S. aureus* จำนวน 168 isolates (64.12%) และเชื้อในกลุ่ม CoNS จำนวน 94 isolates (35.88%) โดยพบว่าเชื้อในกลุ่ม CoNS ที่พบมากที่สุด ได้แก่เชื้อ *S. haemolyticus* (12.60%) เชื้อ *S. epidermidis* (11.45%) และเชื้อ *S. hominis* (4.96%) ตามลำดับ ซึ่งชนิดของเชื้อที่พบในกลุ่ม CoNS ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Usha M. G. และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 ประเทศอินเดีย โดยงานวิจัยดังกล่าวทำการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม CoNS โดยพบเชื้อ *S. epidermidis* มากที่สุด รองลงมาเป็น เชื้อ *S. haemolyticus* เชื้อ *S. lugdunensis* และเชื้อ *S. hominis* ตามลำดับ (7) โดยการพบเชื้อดังกล่าวในสายพันธุ์ที่สอดคล้องกันแสดงถึงเชื้อกลุ่ม CoNS ค่อยข้างมีความชุกในการก่อโรคที่คล้ายคลึงกันในแต่ละพื้นที่ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *S. aureus* พบมากในสิ่งส่งตรวจที่เป็นหนองจากคนไข้ ส่วนเชื้อในกลุ่ม CoNS มักพบในสิ่งส่งตรวจที่เป็น hemoculture ซึ่งจากการพิจารณาจากสิ่งส่งตรวจจะเห็นได้ว่า เชื้อ CoNS ค่อนข้างมีความรุนแรงในการก่อโรคมากกว่าเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากการติดเชื้อในกระแสเลือดก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของคนไข้มากกว่าการติดเชื้อบริเวณอื่นในร่างกาย

ในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยการทดสอบทางชีวเคมี ยังให้ผลการทดสอบที่ไม่แม่นยำและต้องใช้การทดสอบที่หลากหลาย ทำให้ทางคณะผู้วิจัยไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบเชื้อสายพันธุ์ที่มีอุบัติการณ์การก่อโรคที่ต่ำในผู้ป่วย เช่น เชื้อ *S. equorum* เชื้อ *S. sciuri* เชื้อ *S. pettenkoferi* และเชื้อ *S. kloosii* (19) จากผลการเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม CoNS ด้วยวิธีทางชีวเคมีกับเทคนิค MALDI-TOF MS ที่สอดคล้องกันเพียง 61.9% โดยเชื้อที่ให้ผลสอดคล้องกันส่วนใหญ่ ได้แก่ เชื้อ *S. haemolyticus* และเชื้อ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบมากที่สุดในกลุ่ม CoNS แต่อย่างไรก็ตาม พบเชื้อ *S. aureus* จำนวน 3 isolates ที่ให้ผลเป็นเชื้อในกลุ่ม CoNS จากการทดสอบทางชีวเคมี แต่ให้ผลเป็นเชื้อ *S. aureus* ในการทดสอบ MALDI-TOF MS ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของการทดสอบทางชีวเคมี โดยอาจเกิดความผิดพลาดในการอ่านผล เช่น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลของเชื้อแต่ละ isolates อาจมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้การจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี MALDI-TOF MS สามารถให้ผลการทดสอบที่ครอบคลุมการจำแนกชนิดเชื้อชนิด *S. aureus* โดยจากงานวิจัยของคุณ YR Wang และคณะ ในปี 2013 (20) พบว่าการทดสอบ MALDI-TOF MS สามารถให้ผลที่ถูกต้องในการจำแนกชนิดเชื้อ *S. aureus* ได้ถึง 97% ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าการทดสอบทางชีวเคมี

ดังนั้นในเบื้องต้นการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อสำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไปยังคงสามารถใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อที่มีความซุกในการก่อโรคสูงได้ แต่ยังมีประสิทธิภาพที่ด้อยกว่าการจำแนกชนิดเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rosseel และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 ประเทศฝรั่งเศส (21) ที่พบว่าจากการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม CoNS ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องถึง 78% ส่วนการทดสอบทางชีวเคมีให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องเพียง 53%

ส่วนการทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อทางฟีโนไทป์ ทั้งการทดสอบการดื้อยาชนิด *mecA*-mediated oxacillin resistance และ inducible clindamycin resistance พบเชื้อในกลุ่ม CoNS มีการดื้อยา 63.83% และ 7.45% ตามลำดับ และเชื้อ *S. aureus* มีการดื้อยา 14.83% และ 1.79% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่ม CoNS มีการดื้อยาที่มากกว่าเชื้อ *S. aureus* เช่นเดียวกับงานวิจัยของคุณ Manijeh Mehdinejad และคณะ (22) นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยพบเชื้อที่ให้ผลบวกกับการดื้อยาชนิด inducible clindamycin resistance จำนวน 10 isolates โดยเชื้อดังกล่าวยังให้ผลบวกกับการทดสอบ *mecA*-mediated oxacillin resistance จำนวน 7 isolates โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของคุณ Sureerat Chelae และคณะ และงานวิจัยของคุณ S.E. MSHANA และคณะ (23-24) พบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยาชนิด inducible clindamycin resistance มักเป็นเชื้อในกลุ่ม MRSA/MRCoNS ร่วมด้วย

จากการทดสอบหายีนดื้อยาชนิด *mec*A ยีน *erm*A ยีน *erm*B และยีน *erm*C พบว่า เชื้อที่พบยีนดื้อยาส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม CoNS โดยพบมากในเชื้อ *S. haemolyticus* เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *S. hominis* เชื้อ *S. capitis* และเชื้อ *S. saprophyticus* ตามลำดับ และพบยีน *mec*A มากที่สุด รองมาเป็นยีน *erm*C ยีน *erm*A และยีน *erm*B ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Duran และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 ประเทศตุรกี (9) ที่พบยีน *mec*A มากที่สุด รองมาเป็นยีน *erm*C ยีน *erm*A และยีน *erm*B ตามลำดับ ในเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. เช่นเดียวกัน โดยจากผลการทดสอบการแสดงออกของการดื้อยาของเชื้อ รวมถึงการตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ จะเห็นได้ว่ามีการแสดงออกทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ทั้งที่สอดคล้องกันและไม่สอดคล้องกัน โดยสามารถแบ่งออกได้ 3 กรณี ได้แก่ 1) มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ที่สอดคล้องกัน อาจเกิดจากเชื้อที่ดื้อต่อยานั้นมียีนที่ควบคุมการแสดงออกของการดื้อยาแล้วแสดงผลออกมาทางฟีโนไทป์ เช่น เชื้อที่มียีน *mec*A ส่งผลให้มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ โดยให้ผลบวกต่อการทดสอบการดื้อยาชนิด *mecA*-mediated oxacillin resistance 2) มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์แต่ตรวจไม่พบยีนดื้อยา ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อมีกลไกการดื้อยาอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการแสดงออกของการดื้อยาทางฟีโนไทป์ เช่น เชื้อดื้อยาชนิด erythromycin โดยเชื้อในกลุ่มดังกล่าวมีกลไกหลักในการดื้อต่อยา 2 กลไก ได้แก่ การแสดงออกของยีน *erm* ซึ่งส่งผลให้เชื้อเกิด methylation บริเวณ 23s rRNA ทำให้ตัวยาไม่สามารถจับกับเชื้อได้ และอีกหนึ่งกลไก ได้แก่ การแสดงออกของยีน *msr*A ส่งผลให้เชื้อเกิดกระบวนการขับยาออกสู่ภายนอกเซลล์ และดื้อต่อยาในที่สุด (efflux pump) (25) โดยในงานวิจัยนี้เชื้อที่มีการดื้อต่อยาอาจเกิดจากการแสดงออกของยีน *msr*A ทำให้ทางคณะผู้วิจัยไม่สามารถตรวจพบยีน *erm* ได้ 3) ไม่มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ แต่ตรวจพบยีนดื้อยา ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อที่มียีนดื้อยาแต่ไม่มีการแสดงออกของการดื้อยา โดยจากการงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ตรวจพบยีนดื้อยาแต่ยัง

ไม่มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ที่สามารถตรวจพบได้ โดยจากงานวิจัยของคุณ Bergeron M.G. และคณะ (26) ได้นำเชื้อในกลุ่มที่ตรวจพบยีนดื้อยาแต่ให้ผลลบกับการทดสอบทางฟีโนไทป์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แล้วทำการ sub-culture ลงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้นจนครบ 3 passages และหาค่า MIC อีกครั้ง พบว่าเชื้อดังกล่าวมีค่า MIC ที่เพิ่มขึ้นจากเดิม ทำให้ทราบได้ว่าเชื้อในกลุ่มดังกล่าวหากมีการกระตุ้นด้วยยาต้านจุลชีพอาจทำให้เชื้อมีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ที่เพิ่มมากขึ้นได้ และอาจนำไปสู่การดื้อยาได้ในที่สุด

แต่อย่างไรก็ตามในการเปรียบเทียบการแสดงออกทางฟีโนไทป์และการตรวจพบยีน *erm*A ยีน *erm*B และยีน *erm*C ไม่สามารถเปรียบเทียบได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากทางคณะผู้วิจัยไม่มีข้อมูลในส่วนของการทำการทดสอบความไวต่อยา erythromycin ทำให้ข้อมูลการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของเชื้อในกลุ่มนี้มีเพียงข้อมูลที่ได้จากการทดสอบ inducible clindamycin resistance เท่านั้น โดยข้อบกพร่องของงานวิจัยนี้ คือ ทางคณะผู้วิจัยไม่สามารถหาเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. มาใช้เป็นเชื้อควบคุมผลบวกกับการทดสอบหายีนดื้อยาชนิด *erm*A, *erm*B, *erm*C และ *van*A แต่ใช้เชื้อควบคุมผลบวกจากห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ที่ให้ผลบวกต่อยีน *erm*A, *erm*B และ *erm*C มาเป็นเชื้อควบคุมผลบวกแทน รวมถึงไม่มีการใช้ primer ที่เป็น internal control ในการทำ multiplex-PCR และไม่มีการทดสอบการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของยีน *van*A เนื่องจากวิธีการทดสอบดังกล่าวตาม CLSI ได้แนะนำให้ทำการทดสอบด้วยวิธี agar dilution ซึ่งเป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก รวมถึงข้อจำกัดทางด้านเวลาทำให้ทางคณะผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบดังกล่าว ด้วยสาเหตุข้างต้นทำให้คณะผู้วิจัยไม่สามารถสรุปผลได้ว่าไม่มีเชื้อที่ให้ผลบวกกับการทดสอบหายีน *van*A ทางคณะผู้วิจัยจึงเสนอให้จัดหาเชื้อควบคุมผลบวกมาทำการทดสอบ รวมถึงทำการยืนยันผลการทดสอบการตรวจพบยีนดื้อยาในกลุ่มที่ไม่มีเชื้อควบคุมผลบวกด้วยเทคนิค DNA sequencing เพื่อให้ได้ผลที่มีความถูกต้องและมีความถูกต้องมากขึ้น

จากผลการวิจัยเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าการจำแนกชนิดของเชื้อและการทดสอบการดื้อยาถือเป็นสิ่งสำคัญในการตรวจสอบเชื้อกลุ่มนี้ในห้องปฏิบัติการ โดยห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลควรตระหนัก และให้ความสำคัญกับการจำแนกชนิดเชื้อโดยอาจใช้การทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมจากการใช้ coagulase test เพียงการทดสอบเดียว รวมถึงทดสอบการดื้อต่อยาในเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. เพื่อติดตาม คัดกรอง และเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อดื้อยา เนื่องจากพบเชื้อที่มียีนดื้อยาเป็นจำนวนมากแต่ยังไม่มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ โดยเชื้อในกลุ่มดังกล่าวมีโอกาสพัฒนานำไปสู่การเป็นเชื้อดื้อยาในอนาคต

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

การจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ที่แยกจากผู้ป่วยที่เข้ามาทำการรักษาที่โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 262 isolates ด้วยการย้อมสีแกรม การทดสอบ catalase test และการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อทั้ง 12 การทดสอบ รวมถึงทดสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม CoNS ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่าเป็นเชื้อ *S. aurues* จำนวน 168 isolates คิดเป็น 64.12% ของเชื้อทั้งหมด และเป็นเชื้อในกลุ่ม CoNS จำนวน 94 isolates คิดเป็น 35.88% ของเชื้อทั้งหมด

จากการทดสอบเชื้อดื้อยาทางฟีโนไทป์ด้วยวิธี disk diffusion ในเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ซึ่งตรวจหาเชื้อดื้อยาในกลุ่ม MRSA MRCoNS และ inducible clindamycin resistance พบเชื้อในกลุ่ม MRSA จำนวน 25 isolates คิดเป็น 14.88% เชื้อในกลุ่ม MRCoNS จำนวน 60 isolates คิดเป็น 63.83% และเชื้อ inducible clindamycin resistance จำนวน 10 isolates คิดเป็น 3.82%

จากการทดสอบยีนดื้อยาทางจีโนไทป์ด้วยวิธี multiplex PCR ซึ่งตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mec*A ยีน *erm*A ยีน *erm*B ยีน *erm*C และยีน *van*A โดยพบเชื้อที่มียีนดื้อยาชนิด *mec*A มากที่สุดจำนวน 104 isolates คิดเป็น 39.69% รองลงมาเป็นยีน *erm*C จำนวน 95 isolates คิดเป็น 36.26% ยีน *erm*A จำนวน 46 isolates คิดเป็น 17.56% และยีน *erm*B จำนวน 1 isolates คิดเป็น 0.38% โดยไม่พบยีนดื้อยาชนิด *van*A

เอกสารอ้างอิง

1. พรรณทิศ สุวรรณกุล. โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก. ใน: พรรณทิศ สุวรรณกุล, มาธีระพงษ์ ตัณวิเชียร, ศศิธร ลิขิตนุกูล, บรรณาธิการ. Current practice in common infectious disease. กรุงเทพ: สวิชาญ; 2546.

2. Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, and Moore JE. Proposed definitions of community-associatedmeticillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA). J Hosp Infect 2007; 67: 109-13.

3. อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. แบคทีเรียทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1.กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2551.

4. Anderson DJ. Epidemiologyof methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in adults. UpToDate Wolters Kluwer Health. สืบค้นเมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2556.
จาก http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-infection-in-adults

5. Clinical and Laboratory Standards Institue 2013. Peformance Standards for Antimicrobial Susceptibility: M100-S23.

6. Janwithanuchit I, Ngam-ululert S, Paungmoung P, and Rangsipanuratn W. Epidemiologic Study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by Coagulase Gene Polymorphism. Science Asia 2006; 32: 127-132. 16. Milar B, Loighrey A, Elborn J and Moore. Proposed definitions of community-associated methicillin Staphylococcus aureus (CA-MRSA). J Hos Infect 2007;67: 109-113.

7. Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin resistance Staphylococcus aureus (MRSA). Int J Antimicrob Agent 2007;30:398-408.

8. Trnover FC. Mechanism of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med. 2006;119:S3-10.

9. Courvalin P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. CID 2006;42 (Supp l): S25-S34.

10. PrubHu K, Roa S and Rao V. Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Samples. J Lab Physicians. 2011 Jan-Jun; 3(1): 25–27.

11. Sasireka B, Usha MS, Amruta AK, et al. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance among hospital-associated Staphylococcus aureus. 3 Biotech 2013.

12. Lee AS, Macedo-Vinas M, Francois P, et al. Trends in mupirocin resistance in meticillinresistant Staphylococcus aureus and mupirocin consumption at a tertiary care hospital. Letters to the Editor / Journal of Hospital Infection 2011 (77):358–371.

13. Textbook of diagnostic microbiology. 2nd ed ed. Mahon CRe, Manuselis Ge, editors. Philadelphia, Pa. : W.B. Saunders; 2000.

14. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Koneman EW, editor. Philadelphia, Pa. : J.B.Lippincott; 1997.

15. Engelkirk PG. Laboratory diagnosis of infectious diseases : Essentials of diagnostic microbiology. Duben-Engelkirk Janet L., editor. Baltimore : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

16. Performance Standards for Antimicrobila Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institutes;M100-S22;2012.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document M100-23;2012.

18. Green MR. Molecular cloning : a laboratory manual. 4th ed.Sambrook J., editor. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

19. Rahman A, Hosaain MA, Mahmud C, Paul SK, Sultana S, Haque N, et al. Species distribution of coagulase negative staphylococci isolated from different clinical specimens. Mymensingh medical journal : MMJ.2012;21(2):195-9.

20. Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ. Characterization of Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Specimens by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.

21. Rosseel P, Wybo I, Vandoorslaer K, Roebben E, Cauwenbergh IV, Bel AD, Lauwers S , et al. Rapid identification of coagulase negative staphylococci by MALDI-TOF MS in a clinical lab

22. Mehdinejad M, Sheikh AF, Jolodar A. Study of methicillin resistance in Staphylococcus aureus and species of coagulase negative Staphylococci isolated from various clinical specimens. Pakistan Journal of Medical Sciences. 2008;24(5):719-24.

23. Chelae S, Laohaprertthisarn V, Phengmak M, Kongmuang U, Kalnauwakul S. Detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci by disk diffusion induction test. Journal of the Medical Association of Thailand. 2009;92(7):947-51.

24. Mshana SE, Kamugisha E, Mirambo M, Chalya P, Rambau P, Mahalu W, et al. Prevalence of clindamycin inducible resistance among methicillin-resistant Staphylococcus aureus at Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania. Tanzania Journal of Health Research.2009;11(2): 59-64.

25. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology & Infection. 2006;12:3-8.

26. Bergeron MG, Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.2000;44(2):231-8.

ภาคผนวก

การประยุกต์จากผลการวิจัยในการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp.

การศึกษาถึงชนิดของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ที่ก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจของผู้ติดเชื้อในประเทศอินเดีย ในช่วงปี ค.ศ. 2011-2013 และจากการศึกษาการกระจายตัวของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ที่ก่อโรคในคนในประเทศญี่ปุ่น ค.ศ. 1998 พบว่าเป็นเชื้อ *S. epidermidis* มากที่สุด รองลงมาเป็นเชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. saprophyticus* เชื้อ *S. haemolyticus* และเชื้อ *S. lugdunensis* เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษานี้ พบเป็นเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด รองลงมาเป็นเชื้อ *S. haemolyticus* เชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *S. hominis*

ปัจจุบันการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial identification) จากสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลทั่วไปสำหรับเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ใช้การทดสอบ coagulase ในการจำแนกชนิดของเชื้อระหว่าง *S. aureus* และเชื้อในกลุ่ม coagulase negative Staphylococci (CoNS) เท่านั้น ทำให้โอกาสในการตรวจพบเชื้อในกลุ่ม coagulase negative Staphylococci (CoNS) สายพันธุ์ (species) อื่นลดน้อยลง และการตรวจการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อในกลุ่มนี้ พบว่ามีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น โดยเกิดจากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมทำให้มีลักษณะการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป และส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยามากขึ้น โดยเชื้อที่ดื้อยาต้านจุลชีพส่วนใหญ่พบมากในกลุ่ม coagulase negative Staphylococci (CoNS) เช่นเชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *S. saprophyticus* และเชื้อ *S. haemolyticus* เป็นต้น แต่พบว่าการตรวจการดื้อยาของเชื้อในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลทั่วไป มักจะทำการตรวจเฉพาะเชื้อ *S. aureus* หรือเลือกตรวจเชื้อสายพันธุ์อื่นในบางกรณี ทำให้เชื้อในกลุ่ม CoNS ไม่ได้รับการตรวจและยังคงระบาดต่อไป

จากปัญหาข้างต้นทำให้คณะผู้วิจัยให้ความสำคัญและสนใจในการศึกษาความชุกของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. จากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาล เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวัง และติดตามการแพร่ระบาดของเชื้อ รวมถึงใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจ เพื่อเพิ่มเติมหรือปรับปรุงแก้ไขวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) สำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปในโรงพยาบาล ตลอดจนการ

ตรวจสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ เพื่อนำไปสู่การรวบรวมข้อมูลในการเฝ้าระวัง และติดตามการระบาดของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ต่อไป

และจากผลการวิจัยเรื่องนี้ สามารถหาแนวทางในการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม Staphylococcus spp. โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวิเคมี ดังนี้

1. การทดสอบ Catalase
2. การทดสอบ Coagulation : tube method
3. การทดสอบดูการหมักน้ำตาลแมนิทอล (Mannitol salt agar)
4. การทดสอบความไวต่อยา novobiocin*
5. การทดสอบ Urease*
6. การทดสอบ PYR*
7. การทดสอบ Ornithine decarboxylase*
8. การทดสอบการใช้สารคาร์โบไฮเดรต (น้ำตาล) ชนิดต่างๆ เช่น D-mannose* D-trehalose และ D-xylose เป็นต้น

จะเห็นได้ว่า บางการทดสอบได้ถูกใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ซึ่งห้องปฏิบัติการมีและได้ใช้ในงานประจำอยู่แล้ว เพียงแต่นำการทดสอบเหล่านั้นมาเพิ่มในการทดสอบสำหรับการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม *Staphylococci* spp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ทที่อาจไม่จำเป็นต้องซื้อชุดทดสอบของบริษัท เช่น API-Staphy sinv Staph-Zym ซึ่งมีราคาที่สูงกว่า อันจะทำให้ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาสามารถเพิ่มขีดความสามารถในการจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ที่มิใช่ *Staphylococcus aureus* เพียงชนิดเดียวอีกต่อไป อีกทั้งยังลดค่าใช้จ่ายได้อีกทางหนึ่ง และจากการวิจัยของ Paulis AN และคณะ ยังได้สนับสนุนถึง การทดสอบที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่มนี้เช่นกัน คือ การทดสอบ 5 การทดสอบ (4*-8*) ที่นอกเหนือจาก การทดสอบ (1-3)

หนังสือรับรองการนำผลงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ไปใช้ประโยชน์ ปี พ.ศ. 2558

ตามที่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร อาจารย์ประจำคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้มาถ่ายทอดความรู้ / ผลงานที่ได้จากการวิจัย / งานสร้างสรรค์ เรื่อง การจำแนกชนิดและการตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อกลุ่มสแตปฟิโลคอคคัส ผ่านห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา งานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลแม่สอด เมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม 2558

ข้าพเจ้า/หน่วยงาน พยาบาลวิชาชีพชำนาญการ (Infection control nurse) นางศรีสุดา อัศวพลังกูล ได้นำผลงานดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ ในปี พ.ศ. 2558 ดังต่อไปนี้

☑ การใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ (ใช้เป็นข้อมูลในการสอน การประชุม/การสัมมนา)
โดยการ นำเสนอลักษณะเชื้อ Staphylococcus spp. ทีมพบในรพ.แม่สอด แก่ทีม ICC, ICWN ในการประชุม
ผลที่ได้รับ ที่ประชุมร่วมหารือลักษณะ incidence ของเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วย

☑ การใช้ประโยชน์เชิงบริการวิชาการ (ใช้เป็นข้อมูลในการสอน การประชุม/การสัมมนา)
โดยการ นำเสนอประเภทการสอบสวนการระบาดที่เกิดขึ้นใน รพ. ประเด็นเชื้อดื้อยา
ผลที่ได้รับ ผู้เข้าร่วมประชุมร่วมหารือแนวทาง สิ่งคุกคามของเชื้อในรพ.แม่สอด.

☑ การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะ (ทำให้ชีวิตและเศรษฐกิจของประชาชนดีขึ้น)
โดยการ สอนประชาชน และบุคลากรในเรื่องการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเหมาะสม
ผลที่ได้รับ ประชาชน และบุคลากรมีความรู้ในเรื่องเชื้อดื้อยา ที่จะก่อให้เกิดการใช้ ATB ที่ไม่เหมาะสม

☐ การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ (ทำให้เกิดรายได้ หรือเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☐ การใช้ประโยชน์ทางอ้อม (สร้างคุณค่าทางจิตใจ สร้างความสุข เกิดสุนทรียภาพ)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☑ การใช้ประโยชน์เชิงนโยบาย (ทำให้เกิดการประกาศกฎหมาย มาตรการ และกฎเกณฑ์ต่างๆ)
โดยการ นำเสนอข้อมูลลักษณะการดื้อยา จำนวนที่พบ สายพันธุ์ที่พบ
ผลที่ได้รับ นำไปสู่การวางแผน เฝ้าระวัง และติดตามการดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ต่อไป

☑ อื่นๆ (โปรดระบุ) การทำวิจัยเป็นการกระตุ้นให้เกิด การเรียนรู้ ค้นคว้า และปรับปรุง
โดยการ องค์ความรู้ใหม่ๆ โดยเฉพาะองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นในรพ.แม่สอด
ผลที่ได้รับ ปรับเปลี่ยนแนวทางการรักษาในระดับตติยภูมิ

ลงนาม ศรีสุดา อัศวพลังกูล
(นางศรีสุดา อัศวพลังกูล)
ตำแหน่ง พยาบาลวิชาชีพชำนาญการ
หน่วยงานที่สังกัด โรงพยาบาลแม่สอด
วันที่ 16 เดือน พค. พ.ศ. 2558 ที่รับรอง

ทำให้บุคลากรเกิดความตื่นตัวในการวิจารณ์อย่างเสมอ ความรู้ที่ได้สามารถนำมาใช้ในการปรับเปลี่ยนการรักษาทางการแพทย์ การใช้ Antibiotic แบบสมเหตุผล

หนังสือรับรองการนำผลงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ไปใช้ประโยชน์ ปี พ.ศ. 2558

ตามที่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร อาจารย์ประจำคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้มาถ่ายทอดความรู้ / ผลงานที่ได้จากการวิจัย / งานสร้างสรรค์ เรื่อง การจำแนกชนิดและการตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อกลุ่มสแตปฟิโลคอคคัส ผ่านห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา งานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลแม่สอด เมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม 2558

ข้าพเจ้า/หน่วยงาน.....ได้นำผลงานดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ ในปี พ.ศ. 2558 ดังต่อไปนี้

☑ การใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ (ใช้เป็นข้อมูลในการสอน การประชุม/การสัมมนา)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☐ การใช้ประโยชน์เชิงบริการวิชาการ (ใช้เป็นข้อมูลในการสอน การประชุม/การสัมมนา)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☐ การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะ (ทำให้ชีวิตและเศรษฐกิจของประชาชนดีขึ้น)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☐ การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ (ทำให้เกิดรายได้ หรือเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☐ การใช้ประโยชน์ทางอ้อม (สร้างคุณค่าทางจิตใจ สร้างความสุข เกิดสุนทรียภาพ)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☐ การใช้ประโยชน์เชิงนโยบาย (ทำให้เกิดการประกาศกฎหมาย มาตรการ และกฎเกณฑ์ต่างๆ)
โดยการ.....
ผลที่ได้รับ.....

☑ อื่นๆ (โปรดระบุ) การใช้ประโยชน์ ในการจำแนกชนิดเชื้อ *Staphylococcus spp.*
โดยการ การประยุกต์ใช้การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ที่มีในห้องปฏิบัติการ มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด
ผลที่ได้รับ.....

ลงนาม.....
(.....)
ตำแหน่ง.....
หน่วยงานที่สังกัด.....
วันที่ 16 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ที่รับรอง

กองกลาง สำนักงานอธิการบดี
เลขรับ 05386
วันที่ 30 มิ.ย. 2558
เวลา 11.07น.

"R2558C116"
R 2558C 116

บันทึกข้อความ

กองบริหารการวิจัย
รับที่ 03007
วันที่ 23 มิ.ย. 2558
เวลา 11:35น.

ส่วนราชการ คณะสหเวชศาสตร์ ภาควิชา เทคนิคการแพทย์ โทร. 6413
ที่ ศธ 0527.๒๐๑๓/ 410 วันที่ 22 มิถุนายน 2558
เรื่อง ขอปิดโครงการวิจัยและส่งผลงานตามตัวชี้วัด

(1) เรียน อธิการบดี

ตามที่ มหาวิทยาลัยอนุมัติให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบงบประมาณรายได้ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 สัญญาเลขที่ R2558C116 เรื่อง การจำแนกชนิดและการตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อกลุ่มสแตปฟิโลคอคคัส ในวงเงิน 180,000.00 บาท (หนึ่งแสนแปดหมื่นบาทถ้วน) โดยมี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร สังกัดคณะ คณะสหเวชศาสตร์ เป็นหัวหน้าโครงการ นั้น

ขณะนี้ได้ดำเนินการมาเป็นระยะเวลา ..... ปี 10 เดือน และมีผลงานวิจัยตามตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการวิจัย (รายละเอียดดังเอกสารที่แนบมาพร้อมนี้) และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน ข้าพเจ้าอนุญาตให้กองบริหารการวิจัยและสำนักหอสมุดเผยแพร่ผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์และบทคัดย่อ ในระบบสารสนเทศ ดังนี้

☐ ระบบผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (http://dra-is.research.nu.ac.th/dra-elibrary/)
☐ ฐานข้อมูล NU Digital Repository (http://obj.lib.nu.ac.th/media)
☑ ไม่ยินยอม เนื่องจาก กำลังดำเนินการเรื่องการตีพิมพ์

ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอปิดโครงการวิจัยดังกล่าว และหากมีผลงานวิจัยเกิดขึ้นภายหลังจักนำแจ้งให้มหาวิทยาลัยทราบทันที

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

งานธุรการ (หน่วยสัญญา) 25 มิ.ย. 2558
☑ ตรวจสอบและกุมยอด.....
☐ ระบบบริหารโครงการวิจัย.....
☐ ระบบ NRPM.....

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ธีระภูธร
หัวหน้าโครงการวิจัย

(2) เรียน อธิการบดี
เห็นควรอนุมัติ และให้ดำเนินการบันทึกข้อมูล

ลงชื่อ .....
(น.ส. สิรินภา ศิลาน้อย)
ผู้ประสานงานวิจัยคณะ
(วันที่ 22/มิ.ย./58)

(3) เรียน อธิการบดี
เห็นควรอนุมัติ

(4) เรียน อธิการบดี
(/) เห็นควรอนุมัติ ( ) เห็นควรไม่อนุมัติ

ลงชื่อ .....
(นางสาวสิริกร ชูแก้ว)
ผอ.กองบริหารการวิจัย
(วันที่ 29 มิ.ย. 58)

(5) เรียน อธิการบดี
(/) อนุมัติ ( ) ไม่อนุมัติ