I 4789829

สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

การตรวจหา *mec* A gene ใน *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาoxacillinโดยวิธี Polymerase chain reaction(PCR)

โดย
นางสาวดารุณี สิทธิการ
นางสาวสุภาวดี เล็กสมบูรณ์ไชย
นางสาวเยาวเรศ พวงพันธ์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 26 ก.ค. 2548
เลขทะเบียน 417017X
เลขเรียกหนังสือ W4 ว142ป 2548

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
มหาวิทยาลัยนเรศวร
กุมภาพันธ์ 2548

ชื่อเรื่อง	การตรวจหา mecA gene ใน *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา Oxacillin (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)
คณะผู้ดำเนินการวิจัย	นางสาวดารุณี สิทธิการ
	นางสาวสุภาวดี เล็กสมบูรณ์ไชย
	นางสาวเยาวเรศ พวงพันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ขวัญชัย รัตนมณี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ. ดร. อนันต์ อุ่นอรุณ
ภาควิชา	เภสัชกรรมปฏิบัติ
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 ต่อมาเชื้อนี้ได้กลายเป็นสาเหตุสำคัญของ nosocomial infection การดื้อยาของ MRSA ประกอบด้วย 2 กลไกหลัก กลไกแรกคือ การสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายฤทธิ์ของยา เช่น การสร้างเอนไซม์เบต้าแลคแทมเมสมาทำลายฤทธิ์ของเพนนิซิลิน หรือการสร้างเอนไซม์อะมิโนไกลโคไซด์โมดิฟายด์อิง เพื่อทำลายฤทธิ์ของเจนตามิซินเป็นต้น กลไกที่สองคือการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่จับกับยา ซึ่งในการศึกษานี้มุ่งเน้นศึกษาในกลไกที่สอง โดยทั่วไป Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) จะสร้าง penicillin binding protein (PBP) 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งมีความชอบจับกับยาออกซาซิลินสูง แต่ใน MRSA จะสร้าง PBP2a หรือ 2' ซึ่งมีความชอบจับกับยาออกซาซิลินต่ำ ซึ่งการสร้าง PBP2a หรือ 2' จะถูกถ่ายทอดโดย *mec*A gene ดังนั้นเราจึงทำการตรวจหา *mec*A gene ใน MRSA จำนวน 39 ตัวอย่างโดยใช้วิธี PCR ซึ่ง MRSA ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อตัวอย่างจากโรงพยาบาลพุทธชินราช ซึ่งพบว่าผลผลิตจาก PCR มีการปรากฏของ *mec*A gene ใน MRSA 29 ตัวอย่าง จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ากลไกหลักในการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ MRSA ในการศึกษานี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่จับยาเป็นส่วนใหญ่

Title : Identification of *mec*A gene in *Staphylococcus aureus* that resistant to oxacillin (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) by Polymerase Chain Reaction (PCR) method

By : Darunee Sittikan
Supawadee Leksomboonchai
Yaowared Phoungphun

Major Adivisor: Dr Kwanchai Rattanamanee

Co-Advisor: Assistant Professor Dr Anan Ounaroon

Department : Pharmacy Practice

Academic Year : 2004

Abstract

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a gram positive cocci bacteria. The first isolation of MRSA was detected in 1960, since then MRSA has become an important of nosocomial infection. There are two main antibiotic resistant mechanisms. First, the production of enzyme used to inactivate the antibiotics such as beta-lactamase enzyme and aminoglycoside modifying enzyme that inactivate beta-lactam antibiotics and gentamicin, respectively. Second, the alteration of antibiotic binding position. In this study, we fogus on the second mechanism of antibiotic resistance. Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) produces penicillin binding protein (PBP) 1, 2, 3 and 4 that have high affinity for oxacillin, but MRSA produces PBP 2a or 2' that have low affinity for oxacillin. PBP 2a or 2' is encoded by *mec*A gene. Thus, we investicated the presence of the *mec*A gene in 39 MRSA samples by PCR method. MRSA were provided by Buddhachinaraj hospital. The result show that *mec*A gene are presenced in 29 MRSA samples. This result suggested that the alteration of antibiotic binding position is the main mechanism of antibiotic resistance of MRSA samples in this tested.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปริญญานิพนธ์เรื่อง การตรวจหา *mec*A gene ใน *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา oxacillin (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) สำเร็จๆ ได้ด้วยดีในวันนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ขวัญชัย รัตนมณี และ อาจารย์อนันต์ อุ่นอรุณ อาจารย์ที่ปรึกษาที่รักและเคารพยิ่งของคณะผู้วิจัย ที่คอยแนะนำและให้ความรู้อันเป็นประโยชน์ สอนวิธีใช้เครื่องมือและเทคนิคในการทำการทดลอง ให้ความใส่ใจและคอยติดตามดูแลการทำงานอย่างใกล้ชิด รวมถึงช่วยแก้ปัญหาในระหว่างการทำงานวิจัยด้วยดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณอาจารย์สมชาย แสงอำนาจเดช อาจารย์เริงวิทย์ บุญโยม อาจารย์นัฐวุฒิ แซ่ลิ้ม อาจารย์นันทีทิพย์ ลิ้มเพียรชอบ อาจารย์รัตติมา จีนาพงษา เจ้าหน้าที่เทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลพุทธชินราช และเจ้าหน้าที่ห้องสมุดและห้องคอมพิวเตอร์ ที่คอยให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวก ในการค้นคว้าข้อมูล และการจัดพิมพ์ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการเบิกจ่ายอุปกรณ์ ห้องทดลอง และเครื่องมือในการทำการทดลอง รวมทั้งป้าแม่บ้านประจำตึก 4 ที่คอยเป็นธุระเปิดใช้ห้องในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคน ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการนำเสนอโครงงานวิจัยและการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จได้ด้วยดี

ขอระลึกถึงพระคุณของคุณพ่อคุณแม่ที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจให้เสมอมา ไม่ว่าจะมีปัญหาใดเกิดขึ้น รวมทั้งบุคคลอันเป็นที่รักทุกคนในครอบครัว ผู้เป็นแรงหนุนให้ก้าวต่อไปยังจุดหมายปลายทางแห่งความสำเร็จ

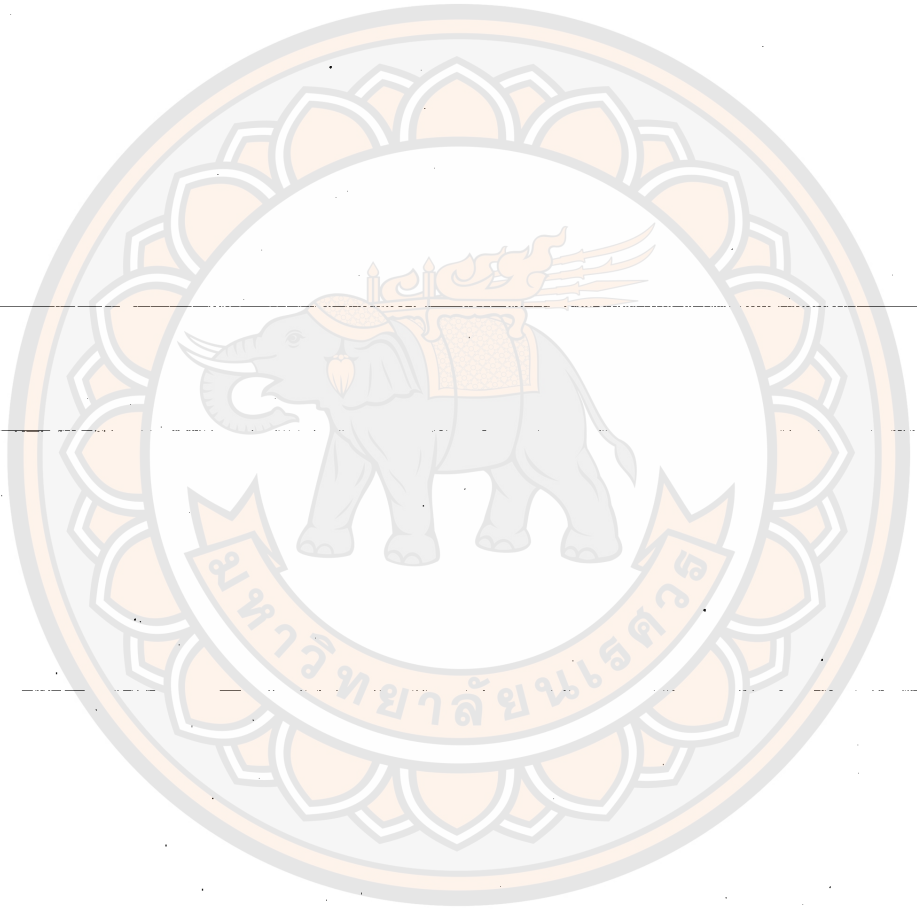
ท้ายที่สุดนี้คุณค่าและประโยชน์อันเกิดจากการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยขอมอบให้กับบุคคลข้างต้นทุกๆ ท่านที่ส่งผลให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จได้ด้วยดี

นางสาวดารุณี สิทธิการ
นางสาวสุภาวดี เล็กสมบูรณ์ไชย
นางสาวเยาวเรศ พวงพันธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
ขอบเขตการศึกษา	4
วิธีการดำเนินการศึกษาอย่างย่อ	4
บทที่ 2 การปริทัศน์วรรณกรรม	6
ลักษณะของ *Staphylococcus aureus*	6
ผนังเซลล์ของ *Staphylococcus aureus*	7
การสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนและการยับยั้ง	9
การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย	12
ประเภทของการดื้อยา	13
กลไกการดื้อยา	14
กลไกการออกฤทธิ์ของยา methicillin	14
กลไกการดื้อยาของ Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)	15
ลักษณะของ *mec* A gene	18
การทดสอบความไวต่อยา Methicillin ของ *Staphylococcus aureus*	19
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction)	21
การแยกขนาดดีเอนเอโดยวิธี Electrophoresis	24
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	28
เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง	28
การสกัดดีเอนเอจากเชื้อตัวอย่าง	29
การกำหนด PCR condition	30
การแยกขนาดดีเอนเอด้วย agarose gel electrophoresis	30
บทที่ 4 ผลการศึกษา	31

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา 34
สรุปผลการศึกษา 34
วิจารณ์ผลการศึกษา 34
เอกสารอ้างอิง 36
ภาคผนวก 39



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเป็น *Staphylococcus aureus*	6
2-2 ข้อมูลการดื้อยาของเชื้อบางชนิด	12
2-3 ยีนที่ควบคุมการดื้อยาในกลไกต่างๆ ของ MRSA	15
2-4 ค่าความไวและดื้อต่อยาจากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion	19
2-5 ค่าความไวและดื้อต่อยาจากการทดสอบด้วยวิธี agar dilution	20
2-6 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอนเอที่แยกได้โดย agarose gel	24
2-7 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอนเอที่แยกได้โดย polyacrylamide gel	25
2-8 ชนิดของบัฟเฟอร์	25
2-9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจหา *mec*A ด้วยวิธี PCR กับการดื้อต่อในเชื้อ *S. aureus*	26
3-1 PCR mixture 20 µl /reaction	29
3-2 Primers ที่ใช้ใน PCR	30
4-1 แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ ใน 10 ตัวอย่างของ *mec*A gene negative MRSA	31
4-2 แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ ใน 29 ตัวอย่างของ *mec* A gene positive MRSA	32
5-1 สรุปผลการศึกษา	34

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1 แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ	8
2-2 แสดงชีวสังเคราะห์ของเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์	10
2-3 แสดงขบวนการ transpeptidation ที่เชื่อมระหว่างสายของเปปติโดไกลแคน	11
2-4 ขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาและการแพร่กระจายการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย	13
2-5 แสดงตำแหน่งของ SCC *mec* บนโครโมโซมของ MRSA	16
2-6 แสดงตำแหน่งของ *mec* DNA บนโครโมโซม	17
2- 7 แสดงการควบคุมการแสดงออกของ *mec*A โดย *mec*I และ *mec*R1	18
2-8 เทคนิคการทำ Polymerase chain reaction	23
3-1 การเลี้ยง MRSA บน Nutrient agar plate (NA plate)	28
3-2 ลักษณะโคโลนีของ MRSA	28
3-3 การเลี้ยง MRSA ใน Nutrient broth	28
4-1 แสดง *mec*A gene products ของ MRSA	33

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคติดเชื้อ เป็นปัญหาสำคัญในทางการแพทย์ตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบัน แม้ว่าเมื่อหลายปีก่อนวงการแพทย์และองค์การอนามัยโลกได้ประมาณไว้ว่า โรคติดเชื้อหรือโรคติดต่อส่วนใหญ่จะควบคุมได้หรือลดน้อยลงและหมดไปจากโลกนี้ แต่กลับปรากฏมีโรคติดเชื้อใหม่เกิดขึ้นและมีโรคติดเชื้อที่ได้เคยหายไปนานนับสิบปีจนเราคิดว่า หมดไปจากโลกนี้ได้มาปรากฏขึ้นอีก รวมทั้งการที่เชื้อจุลชีพต่างๆ ได้เกิดการพัฒนาการดื้อยาจนขณะนี้ ดูเหมือนว่า ยาต้านจุลชีพจะพัฒนาไม่ทันการเกิดการดื้อยาของเชื้อจุลชีพต่าง ๆ

จากการศึกษาขององค์การอนามัยโลกที่รายงานไว้เมื่อปี พ.ศ. 2543 พบว่า ร้อยละ 45 ของสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั้งหมด และร้อยละ 63 ของการเสียชีวิตในเด็กเล็กยังคงเกิดจากโรคติดเชื้อ สะท้อนให้เห็นภาพแท้จริงของโรคติดเชื้อว่ายังเป็นปัญหาใหญ่ทั่วโลก

โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีกหรือโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำ (Reemerging or resurging infectious disease; RID) หมายถึง โรคติดเชื้อที่เป็นโรคเก่าเคยมีอุบัติการณ์ในมนุษย์แล้วอาจสงบหรือพบน้อยลงมากแล้วกลับมาปรากฏขึ้นใหม่หรือมีความชุกเพิ่มขึ้น ซึ่งหนึ่งในโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีกก็คือ โรคติดต่อที่เกิดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา Cloxacillin และ Glycpeptides (1)

ก่อนมียาปฏิชีวนะใช้ พบว่าอัตราตายของ bacteremia จาก *S. aureus* สูงถึงร้อยละ 90 ซึ่งอัตราการตายได้ลดลงจากการนำ Penicillin G มาใช้ในปี ค.ศ. 1940 อย่างไรก็ตาม ใน 2 ปีต่อมา ก็เริ่มพบการดื้อยา Penicillin G ใน *S. aureus* โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ Penicillinase (β - lactamase) จนกระทั่ง ค.ศ. 1948 ไม่สามารถใช้ Penicillin G รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 Methicillin ถูกคิดค้นออกมาเพื่อใช้แก้ปัญหาการดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* โดยสามารถป้องกันการย่อยสลายของวงเบต้าแลคเทม แต่ดูเหมือนว่าเชื้อจะได้ก้าวตามทันในเวลาอันรวดเร็ว เพราะหลังจากนั้นประมาณ 1 ปี เริ่มพบ *S. aureus* ดื้อต่อยา Penicillinase –resistant penicillin ซึ่งมีอุบัติการณ์ร้อยละ 0.04 - 0.2 และมีการเรียกเชื้อเหล่านี้ว่า Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (2 - 4)

MRSA เป็นหนึ่งในจำนวนเชื้อก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบบ่อยที่สุดในหอผู้ป่วยวิกฤต (ICU) ในยุโรป โดยเป็นเชื้อที่พบบ่อยใน invasive infection ที่สัมพันธ์กับการใส่สายหลอดเลือด ปอดอักเสบ การติดเชื้อของแผลผ่าตัด การติดเชื้อในกระแสเลือด การอักเสบของ ventricle (ventriculitis) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกเกิดทั้งๆ ที่มีมาตรการเข้มงวดในด้านการป้องกันและควบคุม ความชุกของ MRSA ก็ยังเพิ่มขึ้นทั้งในผู้ใหญ่และเด็ก จากการสำรวจในปี ค.ศ. 1994 แสดงให้เห็นว่า ความชุกของการดื้อ Methicillin จากเชื้อ *S. aureus* มีความแตกต่างกันมากในแต่ละประเทศ กล่าวคือ พบความชุกร้อยละ 0.1 ในประเทศเดนมาร์กถึงร้อยละ 34.4 ในประเทศอิตาลี

ประมาณร้อยละ 12 ของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (2 ล้านครั้ง) ที่ได้รับการวินิจฉัยในแต่ละปีในประเทศสหรัฐอเมริกาเกิดจาก MRSA ข้อมูลจาก National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System ซึ่งเป็นกลุ่มของโรงพยาบาลมากกว่า 200 แห่งในประเทศสหรัฐอเมริกาที่เข้าร่วมรายงานการติดเชื้อในโรงพยาบาล แสดงให้เห็นถึงการปรากฏของ MRSA โดยพบว่าการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่เกิดจาก MRSA เพิ่มขึ้น จากร้อยละ 2

ในปี ค.ศ. 1975 เป็นร้อยละ 14 ในปี ค.ศ. 1987 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 39.7 ในปี ค.ศ. 1997 อัตราการติดเชื้อ MRSA ยิ่งสูงขึ้นในหอผู้ป่วยวิกฤตบางแห่ง และในโรงพยาบาลที่มีเตียงมากกว่า 500 เตียง แนวโน้มการเพิ่มจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA ไปด้วยกันกับการใช้เครื่องมือทางหลอดเลือดดำ (intravenous device) และเป็นผลของการใช้ยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ครอบคลุมกว้างอย่างแพร่หลาย

มีรายงานจากทั่วโลกพบว่า MRSA ได้ในโรงพยาบาลทุกขนาด และในโรงเรียนแพทย์ขนาดใหญ่ในประเทศสหรัฐอเมริการ้อยละ 97 มี MRSA อยู่ สำหรับในประเทศไทย พบ MRSA ได้ในโรงเรียนแพทย์ทุกแห่งและในโรงพยาบาลศูนย์ต่างๆ ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ได้ตรวจพบว่ามี MRSA มานานกว่า 10 ปี โดยพบว่า ในจำนวนของ *S. aureus* ที่แยกได้เป็น MRSA ร้อยละ 22 ในปี พ.ศ. 2534 และเพิ่มเป็นร้อยละ 34 ในปี พ.ศ. 2542 ส่วนที่โรงเรียนแพทย์อื่นๆ ในปี พ.ศ. 2542 พบ MRSA ร้อยละ 40 ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และร้อยละ 34 ที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ส่วนที่โรงพยาบาลรามาธิบดี MRSA เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในหอผู้ป่วยอายุรกรรมร้อยละ 9.2 ในปี พ.ศ. 2535 และร้อยละ 7.61 ในปี พ.ศ. 2537 และพบร้อยละ 20.34 ในหอผู้ป่วยศัลยกรรมในปี พ.ศ. 2537 (2 - 3)

ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ซึ่งมีอยู่ในประเทศไทยนั้น คือ ยากลุ่ม glycopeptide (ปัจจุบันมีใช้ 2 ตัว ได้แก่ vancomycin และ teicoplanin), fosfomycin และ fusidic acid พบว่า การตอบสนองต่อการรักษาในแต่ละรายมีความแตกต่างกัน แม้แต่ vancomycin ซึ่งเป็นยามาตรฐานสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ที่รุนแรง ก็ยังมีอัตราการล้มเหลวของการรักษาค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 36.9 รวมทั้งเริ่มมีการรายงานว่าผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA ไวต่อ vancomycin น้อยลง (MIC 8 mcg/ml) เชื้อนี้มีชื่อว่า Vancomycin - intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) หรือ glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) เนื่องจากดื้อ teicoplanin ด้วย ต่อมามีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ VISA จากประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศในทวีปยุโรป (ฝรั่งเศส, อังกฤษ) และเอเชีย (ฮ่องกง, เกาหลี) ทำให้มีปัญหาในการรักษามากขึ้นไปอีก

สำหรับกลไกการดื้อยาของ *S. aureus* จะเป็นแบบ multiple resistance หมายถึง การดื้อยาในหลายกลไก ซึ่ง *S. aureus* จะดื้อยา Penicillin โดยการสร้าง β - lactamase, ดื้อต่อ gentamicin โดยการสร้าง aminoglycoside modifying enzyme หรือการดื้อต่อ Tetracycline โดยขัดขวางการนำเข้าของยา (4) ซึ่งการดื้อยานี้จะถ่ายทอดทาง plasmid และ transposon สำหรับ MRSA กลไกหลักของการดื้อยาจะอยู่ที่ Penicillin-binding protein (PBP) ซึ่งโดยปกติ Methicillin จะจับกับ PBPs ที่ปกติ (PBP1, 2 และ 3) แล้วทำให้เกิดการทำลาย Cross-link peptidoglycan ซึ่งมีความจำเป็นในการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แต่ใน MRSA เชื้อจะมีการสร้าง PBP2' หรือ 2a' ซึ่งมีความชอบในการจับกับยากลุ่ม β-lactams ต่ำ ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ (5) ในการสร้าง PBP2' หรือ 2a' นั้นจะถูกควบคุมโดย *mec* A gene ซึ่งอยู่บน chromosome ของ MRSA โดย *mec*A จะมีหน้าที่ในการแสงออกของ PBP2' หรือ 2a' นอกจากนี้ยังมีการควบคุมจาก *mec*I, *mec*RI และ *fem* gene โดย *mec*I จะแสดงออกให้โปรตีนที่กดการทำงานของ *mec*A ซึ่งถ้ายีน *mec*I ที่กลายพันธุ์หรือขาดหาย การกดการทำงานของ *mec*A จะบกพร่อง *mec*A จะทำงานได้ PBP2' หรือ 2a' มากขึ้น ส่วนยีน *mec*RI จะเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ และ fem gene จะเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ peptidoglycan- modifying enzyme ซึ่งถ้าเกิดความผิดปกติ เช่น กลายพันธุ์หรือการขาดหายไปของยีน จะมีผลต่อการดื้อยาของ MRSA (5 - 6)

ดังนั้น จะเห็นว่า MRSA เป็นเชื้อก่อโรคของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่สำคัญมาก โดยมีความสามารถในการเกิดโรคที่รุนแรงและดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม ทำให้การตรวจหา MRSA อย่างรวดเร็วและ

น่าเชื่อถือเป็นสิ่งที่จำเป็น อันจะเป็นการเพิ่ม clinical outcome ในการรักษา สำหรับวิธีมาตรฐานที่ใช้เพื่อบ่งชี้ว่าเป็น MRSA คือ การตรวจหาลักษณะทาง phenotype ของเชื้อ เช่น ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial susceptibility tests) ได้แก่ วิธี disc diffusion, agar dilution, broth dilution และ screening test ซึ่งจัดว่าเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ แต่ยังให้ผลการทดสอบที่ไม่ค่อยแน่นอน ทั้งนี้ เป็นผลมาจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลเกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะการดื้อยา อาทิเช่น สารเคมีที่ใช้,ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเข้มข้นของ NaCl, อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ และการอ่านผล ซึ่งกลายเป็นอุปสรรคสำคัญในการทดสอบการดื้อยาด้วยวิธีดังกล่าว (7)

ต่อมา จึงมีงานวิจัยหลายชิ้นที่ตรวจหา MRSA โดยมุ่งเน้นไปที่การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะของ MRSA ซึ่งเป็นวิธีทางโมเลกุลเช่นเดียวกัน อาทิเช่น การตรวจหา *mec*A gene ซึ่งเป็นยีนที่จะ encode ให้ PBP2a ที่มีความชอบจับกับ methicillin ต่ำ อันเป็นกลไกหลักที่ทำให้ MRSA ดื้อต่อยา methicillin

โดยในปี 1991 Murakami K และคณะ (8) ได้ทำการทดลองตรวจหา *mec*A gene ด้วยวิธี PCR เพื่อบ่งชี้ว่าเป็น MRSA เปรียบเทียบกับวิธีหา MIC ด้วยวิธี broth microdilution ผลการทดลอง พบว่า 100% ของ *S. aureus* ที่ไวต่อยา methicillin ไม่พบ *mec*A gene และ 98% ของ *S. aureus* ที่ไวต่อยา oxacillin ไม่พบ *mec*A gene และสามารถที่จะพบ *mec* A gene ใน coagulase-negative staphylococci ที่ดื้อต่อยาได้ ซึ่งจากทดลองนี้ทำให้เห็นว่า การพิสูจน์ว่าเป็น MRSA ด้วยวิธี PCR นี้มีความน่าเชื่อถือ

ต่อมาในปี 1992 Hiramatsu K (9) ได้ทำการทดลองใช้วิธี PCR ในการวิเคราะห์ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin ลักษณะ borderline resistance ทั้งนี้เนื่องมาจาก วิธีการทดสอบความไวต่อยามีปัญหาในตรวจหาเชื้อที่ดื้อต่อยาในลักษณะเช่นนี้ จากผลการทดลอง พบว่า วิธี PCR สามารถบ่งชี้เชื้อที่ดื้อต่อยา methicillin ลักษณะ borderline resistance ได้อย่างถูกต้อง และในการทดลองนี้พบว่ามี *S. aureus* 1 ตัวอย่างที่ดื้อต่อยา methicillin แต่ไม่ตรวจพบ *mec*A gene

หลังจากนั้น มีผู้วิจัยอีกกลุ่มหนึ่ง(10)ที่ศึกษาถึงความน่าเชื่อถือของวิธีการตรวจหาลักษณะทาง phenotype ของเชื้อและการตรวจหา *mec*A gene โดยตรงใน *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin ที่ระดับต่ำ ซึ่งจากการศึกษานี้ พบว่า ผลลัพธ์ที่ได้จากวิธีต่างๆ เป็นไปในทางเดียวกัน โดยการตรวจหา *mec*A gene จะเป็นวิธีมาตรฐานและวิธีการทดสอบความไวต่อยาด้วย agar ให้จุดตัดความไวที่มีความจำเพาะและความไวมากที่สุด อย่างไรก็ตาม พบว่า 44 เชื้อที่ไม่ปรากฏ *mec*A gene มี 27 เชื้อที่ดื้อต่อยา methicillin จากการทดสอบด้วยวิธี agar dilution โดย 1 ใน 4 ของเชื้อเหล่านี้มีค่า MIC > 4 mg/l แต่ไม่เกิน 32 mg/l และมี 1 เชื้อที่ปรากฏ *mec*A gene แต่ไม่ถูกจัดว่าดื้อยา โดยมีค่า MIC 8 mg/l

ดังนั้น ในการศึกษาของเราจึงมุ่งเน้นที่จะพิสูจน์ว่าเป็น MRSA ด้วยการตรวจหา *mec*A gene ด้วยวิธี PCR ซึ่งในหลายๆ การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ ใช้ความรู้พื้นฐานทั่วไปในการวิเคราะห์ และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว โดยจะนำผลลัพธ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธีทดสอบความไวต่อยา oxacillin ด้วยวิธี disc diffusion ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ทำได้ง่ายในโรงพยาบาลทุกแห่ง แต่เป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกต่ำ โดยผู้ทำการวิจัยจะทำการศึกษาเชื้อ MRSA ที่ได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ทั้งนี้เนื่องมาจาก ยังไม่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการตรวจหา *mec*A gene ใน MRSA ที่ได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช ซึ่งจากการศึกษานี้คาดว่าจะทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการดื้อยา oxacillin ของ MRSA ว่าผ่านกลไกของ *mec*A gene หรือไม่ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการตัดสินใจเลือกวิธีพิสูจน์ MRSA ของโรงพยาบาลต่อไป อันจะนำมาซึ่งแนวทางการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ทั้งนี้

เนื่องมาจาก ถ้ามีการพิสูจน์คลาดเคลื่อนจาก methicillin susceptible *S. aureus* (MSSA) ไปเป็น MRSA จะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยา vancomycin ซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการเลือกสรรเชื้อที่ดื้อยา vancomycin ได้ นอกจากนี้ ยังพบว่า การใช้ vancomycin รักษาโรคติดเชื้อ MSSA ให้ผลใกล้เคียงหรือด้อยกว่าการใช้ penicillinase-resistant penicillin โดยในการรักษาลิ้นหัวใจอักเสบติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ MSSA ในกลุ่มที่ได้รับยา vancomycin เชื้อจะหมดจากกระแสเลือดช้ากว่ากลุ่มที่ได้รับยา nafcillin ทั้งนี้เนื่องจากยา vancomycin มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อและผ่านเข้าสู่ exacellular compartment ได้จำกัด (3) นอกจากนี้ ผู้วิจัยหวังว่า การวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเกี่ยวกับ MRSA ในระดับโมเลกุลต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อตรวจหา *mec*A gene ใน MRSA ที่ดื้อต่อยา oxacillin โดยวิธี PCR

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถหากลไกการดื้อต่อยา oxacillin ของ MRSA โดยวิธี PCR
2. ได้แนวทางการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการรักษาโรคติดเชื้อจาก MRSA

ขอบเขตการศึกษา

การตรวจหา *mecA* gene ในเชื้อ MRSA ที่ได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 24 มิถุนายน 2546 ถึง 16 ตุลาคม 2546 จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 39 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disc diffusion จากโรงพยาบาลพุทธชินราช โดยยาที่ทดสอบ มีดังนี้ ampicillin, choramphenicol, erythromycin, forfomycin, gentamycin, oxacillin, penicillin, sulfamethoxazole-trimetroprim และ vancomycin

วิธีการดำเนินการศึกษาอย่างย่อ

1. เก็บรวบรวมเชื้อ MRSA และจัดทำ MRSA Stocks: รวบรวมเชื้อ MRSA จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช ระหว่างวันที่ 24 มิถุนายน 2546 หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบน nutrient agar plate แล้วจึงแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงใน nutrient broth และแบ่งเชื้อในแต่ละตัวอย่างปริมาตร 1200 ไมโครลิตรมาสกัดดีเอนเอ

2. การแยกสกัดดีเอนเอ: นำตัวอย่างเชื้อ MRSA ปริมาตร 1200 ไมโครลิตรมาสกัดแยกดีเอนเอ แล้วนำดีเอนเอที่สกัดได้มาเก็บในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ - 20°C

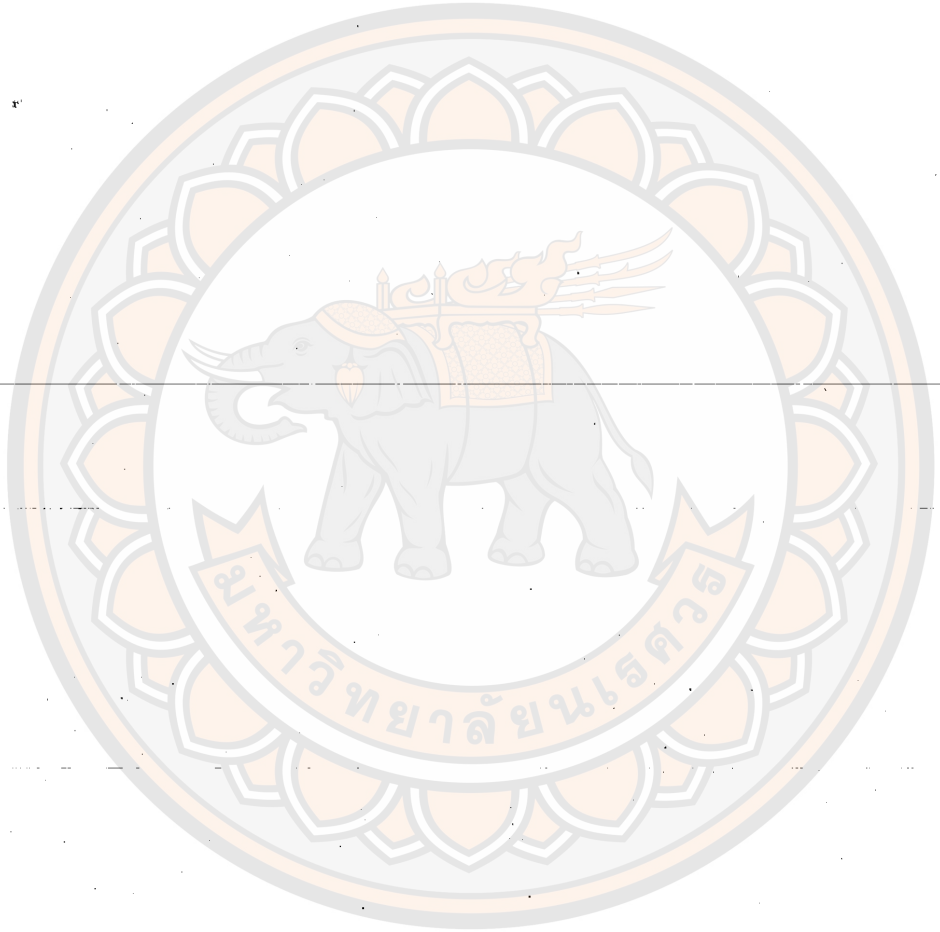
3. การทำ PCR: นำดีเอนเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งนำดีเอนเอต้นแบบมาใส่รวมกับไพรเมอร์ (Sense primer; *mecA* 01, Antisense primer; *mecA* 02), TBE buffer, Deoxyribonucleotidetriphosphate (dNTP; dATP+aGTP+dCTP+dTTP), $MgCl_2$ และ Taq polymerase หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอนเอ โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งกำหนดไว้ดังนี้

- ทำให้ดีเอนเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (Denaturation): 94°C 30 วินาที
- ทำให้ไพรเมอร์มาจับกับดีเอนเอต้นแบบ (Annealing): 55°C 30 วินาที

- เอนไซม์ Taq polymerase สังเคราะห์ดีเอนเอต่อจากไพรเมอร์ (Extention): 72°C 1 นาที

กระบวนการทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอใช้ปฏิกิริยา 30 รอบ

4. การทำ Electrophoresis: นำดีเอนเอที่ถูกเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR แล้ว มาทำการแยกโมเลกุลของดีเอนเอออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า เพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของดีเอนเอที่ได้กับดีเอนเอมาตรฐาน



บทที่ 2
การปริทัศน์วรรณกรรม

ลักษณะของ *Staphylococcus aureus*

S .aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (gram-positive cocci) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 – 1.0 μm มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เป็นพวกที่ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตแต่จะเจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่เคลื่อนที่ พบได้บนผิวหนังและเยื่อบุเมือก (mucous membrane) ของคนและสัตว์เลือดอุ่น (11)

ตารางที่ 2-1 การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเป็น *Staphylococcus aureus* (12)

วิธีการตรวจ	กระบวนการทำ	หมายเหตุ
การย้อมสีแกรม	นำสิ่งส่งตรวจป้ายลงบนแผ่นสไลด์ และย้อมสีแกรม แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10×100 เท่า จะเห็น *S. aureus* มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ไมครอน ติดสีแกรมบวกอยู่เป็นคู่ เป็นสี่หรือเป็นกลุ่ม อาจหลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยวได้	*Staphylococcus* sp. สายพันธุ์อื่นให้ลักษณะเช่นเดียวกัน
การเพาะแยกเชื้อ	นำสิ่งส่งตรวจเพาะบนอาหารวุ้นปนเลือด (blood agar) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37° C นาน 18-24 ชั่วโมง S. aureus จะให้โคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร มีลักษณะทึบแสง ขอบเรียบ มี hemolysis zone แคบๆ รอบโคโลนี ให้โคโลนีสีเหลืองทอง	
Catalase test	เขี่ยเชื้อจากอาหารที่ไม่มีเลือด ละเลงบนสไลด์ที่สะอาด หยด 30% H_2O_2 1 หยดลงบนเชื้อ ดูว่ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นหรือไม่ ถ้าเกิดฟองแก๊ส แสดงว่าให้ผลบวก เนื่องจากเอนไซม์ catalase จะไปทำให้ H_2O_2 แตกตัวเป็น $H_2O+ O_2$	*Staphylococcus* sp. ทุกสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ catalase
Coagulast test	หยดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อบนสไลด์สะอาด 1 หยด ใช้ลูปตักเชื้อละลายในหยดน้ำกลั่น เติมพลาสม่า 1 หยด คนให้เข้ากัน ดูการจับกันของพลาสม่าภายในเวลา 1 นาที	Coagulase negative Staphylococci (CNS) เช่น *S. epidermidis*

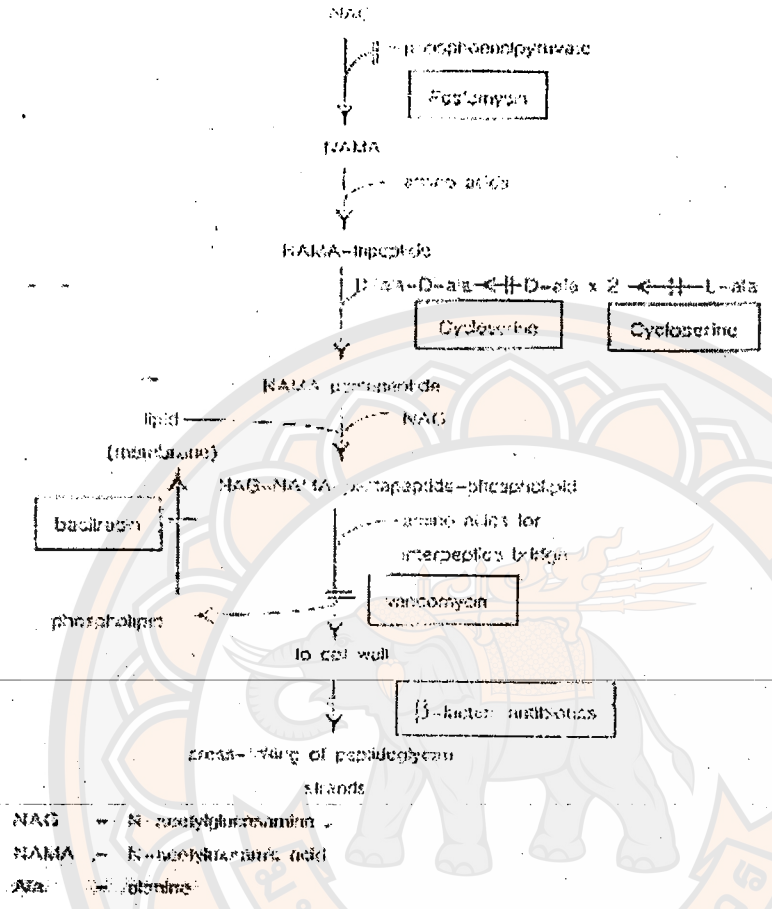
ผนังเซลล์ของ *S. aureus*

ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นส่วนที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย มีหน้าที่ในการปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยจะยอมให้สารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียผ่านเข้าไปในเซลล์ได้เท่านั้น ผนังเซลล์ของ *S. aureus* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ประมาณ 60 – 100% โดยเปปติโดไกลแคน เป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ มีองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ

1. ส่วนที่เป็น back bone หรือ สายกลัยแคน(glycan strands) ซึ่งเป็น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นสายยาว ประกอบด้วย *N*-acetylglucosamine สลับกับ *N*-acetlymuramic acid
2. เปปไทด์ 1 ชุดที่มี 4 ตัว (tetapeptide) ห้อยต่ออยู่กับ *N*-acetlymuramic acid
3. เปปไทด์อีกชุดที่เชื่อมในทางขวาง

เปปไทด์ 4 ตัวที่ห้อยต่ออยู่กับ *N*-acetlymuramic acid เรียงตามลำดับ คือ L-alanine-D-Glutamine-L-diamino acid-D-alanine ตำแหน่งที่ 1, 2 และ 4 ของเปปไทด์ชุดนี้จะคงตัว ยกเว้นตำแหน่งที่ 3 ซึ่งเป็น diamino acid จะแตกต่างกันออกไปในแบคทีเรียแกรมบวก ใน *S. aureus* เป็น L-lysine (11)

เปปติโดไกลแคนมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับรูปร่างและความแข็งแกร่งของผนังเซลล์ ถ้ายาปฏิชีวนะใดสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนได้อย่างเฉพาะเจาะจง จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อรูปร่างแบคทีเรียหลายอย่าง และในที่สุดจะทำให้แบคทีเรียตายได้เนื่องจากเกิดการแตกของเซลล์ มียาปฏิชีวนะอยู่หลายชนิดที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ที่ขั้นตอนต่างๆ กัน (13) (ดังรูปที่ 2-1)



รูปที่ 2-1 แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ(13)

การสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนและการยับยั้ง

การสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนโดยทั่วไป มี 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 เกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาซึม (cytoplasm) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สารตั้งต้น (precursor) โดยโมเลกุลของกรดอะมิโน L-alanine จำนวน 2 โมเลกุล จะเปลี่ยนไปเป็น D-forms โดยอาศัยเอนไซม์ isomerase ที่มีอยู่ในไซโตพลาซึมของแบคทีเรีย จากนั้น D-alanine ทั้ง 2 ตัว จะมาเชื่อมกันเป็น dipeptide โดยอาศัยเอนไซม์ ligase ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ จะถูกยับยั้งได้ด้วยยา cycloserine (ดังรูปที่ 2-2) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ D-alanine โดย cycloserine จะจับกับ pyridoxal phosphate ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ เป็นการยับยั้งการเกิด D-alanyl-D-alanine ในขั้นตอนปกติ D-alanyl-D-alanine dipeptide ที่สร้างขึ้นมาจะไปควบคู่กับกรดอะมิโนอีก 3 ตัวซึ่งต่ออยู่กับ sugar nucleotide หรือ uridine diphosphate- *N*-acetylmuramic acid (UDP-M) ได้เป็น sugar pentapeptide

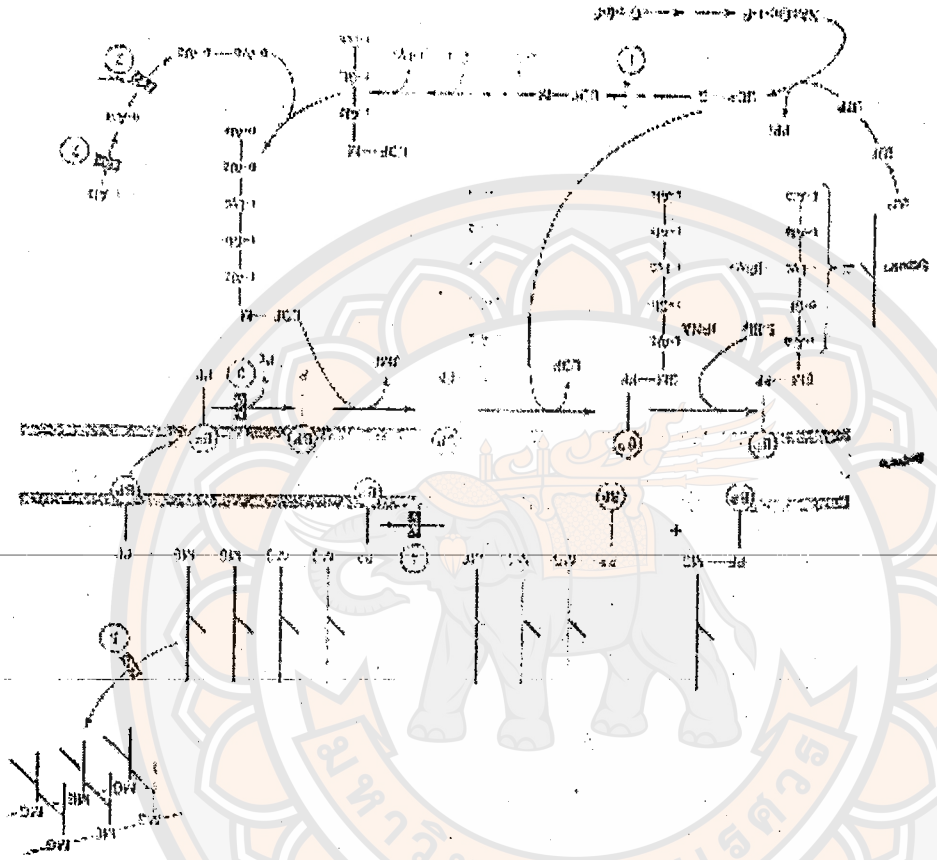
การจะเกิด UDP-M ได้นั้น UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-G) ต้องไปรวมตัวกับกรด phosphoenolpyruvic โดยอาศัยเอนไซม์ enolpyruvyl transferase ก่อนจึงจะเปลี่ยนแปลงเป็น UDP-M แต่เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งได้โดยยา fosfomycin

ขั้นตอนที่ 2 sugar pentapeptide จะถูกส่งให้กับลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเรียกว่า bactoprenol (BP) โดยที่ nucleotideuridine monophosphate (UMP) จะยังคงอยู่ในไซโตพลาซึม ส่วนสารตั้งต้นอีกชนิดหนึ่ง คือ UDP-G จะถูกสร้างในไซโตพลาซึมเช่นกัน และถูกส่งให้กับลิพิดที่เป็นตัวพาที่อยู่ที่เมมเบรนรวมกันได้เป็น disaccharide pentapeptide โดยจะเรียกการรวมตัวกันแบบนี้ว่า glycosidation เกิดพันธะ β-1,4 glycosidic ขึ้นระหว่างน้ำตาลที่เป็นอนุพันธ์ของกลูโคส 2 หน่วย ในแบคทีเรียชนิด S.aureus จะมีการเชื่อม glycines 5 ตัวเข้าไปด้วยได้เป็น disaccharide decapeptide ซึ่ง disaccharide decapeptide จะถูกส่งผ่านไปยังด้านนอกของผนังเซลล์ตรงจุดที่กำลังมีการสร้าง (growing point) ซึ่งลิพิดตัวพานั้นแยกออกและคงอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำหน้าที่ต่อไปได้อีก โดยมันจะสูญเสียหมู่ฟอสเฟตไป 1 หมู่ขณะที่กลับสู่ผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อที่จะคอยรับ disaccharide pentapeptide จากไซโตพลาซึมต่อไป

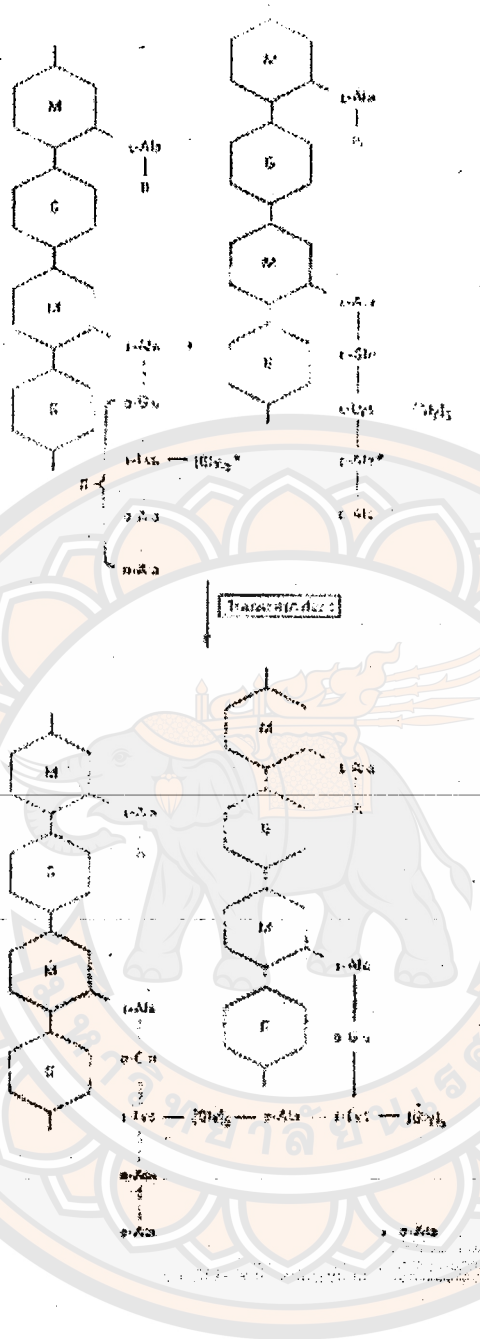
ขั้นตอนการรวมตัวเข้าด้วยกันของ disaccharide pentapeptide จะถูกยับยั้งได้โดยกลุ่ม glycopeptide เช่นยา vancomycin จะเข้าไปจับกับ D-alanly-D-alanine ที่อยู่ส่วนปลายของแต่ละ pentapeptide ทำให้เกิด dimer ชนิด back-to-back เพื่อเชื่อมระหว่าง pentapeptides เป็นการป้องกันการต่อของเปปติโดไกลแคนต่อไป ในขณะที่ teicoplanin ซึ่งเป็น lipoglycopeptide อาจมีกลไกที่แตกต่างออกไปโดยยาชนิดนี้จะแทรกตัวมันเองอยู่ที่ผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับ pentapeptide คล้ายกับสารตั้งต้นที่ถูกลำเลียงผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นแล้ว ยา bacitracin ซึ่งเป็นยากลุ่ม polypeptide สามารถที่จะยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนในขั้นตอนนี้ได้ โดยตัวยาจะจับกับลิพิด bactoprenol ทำให้ขบวนการแยกตัวออกของลิพิด (pyrophosphatase cleavage) ถูกยับยั้ง

ขั้นตอนสุดท้าย คือ การเชื่อมระหว่างสาย (crosslinking stage) ซึ่งเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์โดยสายของ glycan แต่ละสายจะถูกเชื่อมด้วยโซ่เปปไทด์ เพื่อต่อกันกับส่วนของเปปติโดไกลแคนที่สร้างสมบูรณ์แล้วในผนังเซลล์ ซึ่งขั้นตอนนี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ transpeptidases เอนไซม์เหล่านี้จะอยู่ที่ผิวชั้นนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยในขั้นแรกจะมีการกำจัด D-alanine ตัวสุดท้ายจากแต่ละ pentapeptide บนสายของ glycan ออก

โดยที่พลังงานที่ปล่อยออกมาจะถูกนำมาใช้ในการเกิดพันธะเปปไทด์ใหม่ระหว่าง D-alanine ที่คงอยู่บน glycan กับหมู่อะมิโนของ L-lysine ที่อยู่บนเปปติโดไกลแคนที่เชื่อมกันอยู่ (13) (ดังรูปที่ 2-3)



รูปที่ 2-2 แสดงขีวสังเคราะห์ของเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ (1=fosfomycin, 2=cycloserine, 3=bacitracin, 4=vancomycin, 5=beta-lactam antibiotics, M=*N*-acetylmuramic acid, NAcGlc หรือ G= *N*-acetylglucosamine)



รูปที่ 2-3 แสดงขบวนการ transpeptidation ที่เชื่อมระหว่างสายของเปปติโดไกลแคน

การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย

ในราวทศวรรษ 1940 มีการนำ sulfonamide และ penicillin มาใช้อย่างแพร่หลาย และมีสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย จนราวปี 1950 เริ่มมีปัญหาที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* เกิดดื้อต่อยา penicillin และยังคงเป็นปัญหาต่อมาจนกระทั่งพบ penicillin ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อที่ดื้อยานี้ในราวปี ค.ศ. 1960 ปัจจุบันการดื้อยาเป็นปัญหาที่ซับซ้อนมาก โดยขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพและข้อมูลการดื้อยาของเชื้อบางชนิดแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2-2 ข้อมูลการดื้อยาของเชื้อบางชนิด (14)

Organism	Pen	Cep	Ami	Tet	Mac	Chl	Qui	Sul	Tri	Met	Gly
Gram-positive bacteria											
Staphylococcus aureus	V	S	(S)	(S)	(S)	S	V	(S)	(S)	R	S
Streptococcus pyogenes	S	S	R	(S)	S	S	V	(S)	S	R	S
Other streptococci	V	S	R	(S)	S	S	V	(S)	S	R	S
Enterococci	S	R	R	(S)	S	S	V	(S)	(S)	R	(S)
Clostridium spp.	S	S	R	S	S	S	R	(S)	R	S	S
Gram-negative bacteria											
Escherichia coli	V	V	(S)	(S)	R	(S)	S	(S)	(S)	R	R
Other enterobacteria	V	V	(S)	(S)	R	(S)	S	(S)	(S)	R	R
Pseudomonas aeruginosa	V	V	V	R	R	R	S	R	R	R	R
Haemophilus influenzae	V	V	R	(S)	S	S	S	(S)	(S)	R	R
Neisseria spp.	V	S	R	(S)	S	S	S	(S)	R	R	R
Bacteroides spp.	R	V	R	(S)	S	S	R	(S)	R	S	R
Other organisms											
Mycobacteria	R	R	V	R	R	R	S	R	R	R	R
Chlamydia	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Mycoplasmas	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R
Fungi	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

หมายเหตุ Pen=Penicillins, Cep=Cephalosporins, Ami=Aminoglycosides, Tet=Tetracyclines, Mac=Macrolides, Chl=Chloramphenicol, Qui=Quinolones, Sul=Sulphonamides, Tri=Trimethoprim, Met=Metronidazole, Gly=Glycopeptides,

S=โดยทั่วไปถือว่าไวต่อยา, R=โดยทั่วไปถือว่าดื้อยา, (S)=สายพันธุ์ที่แปรปรวนในความไวต่อยา, V=ให้การตอบสนองที่ไม่แน่นอนต่อฤทธิ์ของยา

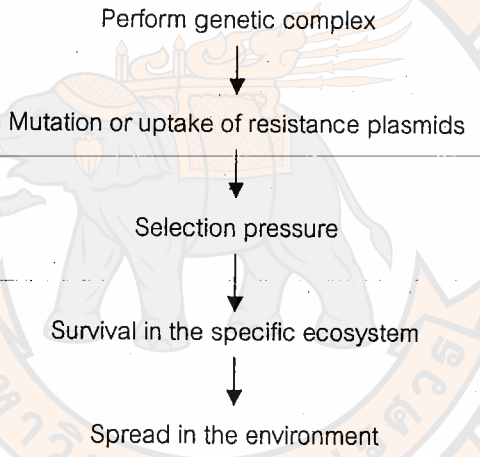
ประเภทของการดื้อยา (14)

การดื้อยาของเชื้ออาจแบ่งได้ตามจุดกำเนิดของการดื้อยา ได้แก่

1. Intrinsic resistance เป็น genetic resistance และเป็นการดื้อยาตามธรรมชาติ ที่เกิดขึ้นเองในตัวเชื้อแต่ละชนิด เกิดได้กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ การดื้อยาชนิดนี้สามารถคาดการณ์ได้ และไม่ค่อยก่อให้เกิดปัญหาในการเลือกใช้ยาการที่เชื้อเกิดการดื้อยาในลักษณะเช่นนี้อาจเรียกได้ว่าเชื้อไม่ไวต่อยา

2. Acquired resistance เป็นการดื้อยาที่เกิดขึ้นกับเชื้อที่เคยไวต่อยามาก่อน แต่ต่อมามีการดื้อต่อยานั้น เกิดขึ้นด้วยกลไกลหลายอย่างรวมทั้งการกลายพันธุ์ การดื้อยาแบบนี้ก่อให้เกิดปัญหาในการเลือกใช้ยาอย่างมาก ทำให้ต้องมีการคิดค้นยาใหม่ขึ้นมา อาจแบ่งได้เป็น

3. Mutation resistance ในเชื้อแบคทีเรียส่วนมาก จะมีบางตัวที่เคยไวต่อยาแล้ว เกิดการ กลายพันธุ์ ทำให้ดื้อยาเกิดขึ้นมาเองได้ เชื้อที่กลายพันธุ์นี้ไม่มีบทบาทใดในภาวะปกติที่ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่เมื่อมีการใช้ยาไปทำลายเชื้อที่ไวต่อยาเหลือแต่เชื้อดื้อยาที่สามารถขยายพันธุ์สู่เซลล์รุ่นลูกรุ่นหลานต่อไป เกิดเป็นกระบวนการเลือกสรรเชื้อที่ดื้อยา และทำให้เกิดการแพร่กระจายมากขึ้น ดังรูปที่ 2-4



รูปที่ 2-4 ขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาและการแพร่กระจายการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย (14)

4. Transmissible resistance การดื้อยาเกิดขึ้นโดยถ่ายทอดผ่านยีนจากเชื้อที่ดื้อยาไปยังเชื้อที่ไวต่อยา โดยวิธี transduction, transformation และ conjugation การดื้อยาชนิดนี้แพร่กระจายได้รวดเร็วกว่าแบบ Mutation resistance

กลไกการดื้อยา (14)

1. การสร้างเอนไซม์มาทำลายฤทธิ์ยา หรือดัดแปลงฤทธิ์ยา

เชื้ออาจสร้างเอนไซม์ขึ้นมาทำลายฤทธิ์ยา หรือดัดแปลงโครงสร้างยา ทำให้ไม่สามารถผ่านเข้าไปในตัวเชื้อ หรือไม่สามารถจับกับตำแหน่งที่เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ กลไกนี้มีบทบาทสำคัญมาก เนื่องจากเป็นกลไกที่เชื้อแบคทีเรียใช้ในการต้านฤทธิ์ยากลุ่ม penicillins และ cephalosporins

2. การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่จับกับยา

ตำแหน่งที่ยาไปจับเพื่อการออกฤทธิ์ (target site) ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์หรือโปรตีนที่สำคัญชนิดอื่น เชื้อมีการการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งดังกล่าว ทำให้ชอบจับกับยาลดลง การดื้อยาแบบนี้อาจเกิดจากเชื้อกลายพันธุ์ ทำให้ตำแหน่งที่ยาไปจับเกิดการเปลี่ยนแปลง หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในฤทธิ์ของเอนไซม์ อาจทำให้ดื้อยาได้หลายชนิดที่ไม่สัมพันธ์กัน การดื้อยาแบบนี้เกิดได้เร็ว ในการรักษาจึงป้องกันการดื้อยาแบบนี้ด้วยการให้ยาร่วมกันหลายชนิด

3. การรบกวนการนำยาเข้าสู่ภายในเซลล์

การที่ยาต้านแบคทีเรียจะออกฤทธิ์ได้จะต้องผ่านผนังเซลล์และเมมเบรนรอบนอก เพื่อไปยังตำแหน่งที่ยาจะไปออกฤทธิ์ภายในเซลล์ของเชื้อ การทำให้ยาผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ยากขึ้น จะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ การที่เชื้อไวต่อยาต่างกัน อาจเนื่องมาจากมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน

4. การใช้ metabolic pathway อื่น

เชื้อบางชนิดเกิดการดื้อยาโดยใช้ metabolic pathway อื่น ทดแทน pathway ที่ถูกยายับยั้ง

กลไกการออกฤทธิ์ของยา Methicillin

Methicillin เป็นยาในกลุ่ม beta-lactam ซึ่งยาในกลุ่มนี้ทุกตัว (penicillins, cephalospolins, carbapenem และ monobactams) จะออกฤทธิ์ในลักษณะเดียวกัน คือ ยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ โดยยากลุ่มนี้จะทำหน้าที่เป็น substrate ไปจับกับเอนไซม์ transpeptidase ที่ตำแหน่ง serine แทน D-alanyl-D-alanine

เอนไซม์ transpeptidase มักจะถูกจัด หรือเรียกว่า โปรตีนที่จับกับเพนนิซิลิน (penicillin-binding proteins; PBPs) เนื่องจากมันถูกแยกออกมาได้หลังจากให้ทำปฏิกิริยากับ C-labelled penicillin เอนไซม์ชนิดนี้ถูกแยกออกเป็นกลุ่มตามขนาดซึ่งอาศัยเทคนิค electrophoresis โดยเรียกเป็น PBP1, PBP2 ไปเรื่อยๆ ซึ่งจะเริ่มจากชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (13)

S. aureus สร้าง PBPs 4 ชนิด คือ PBP1, PBP2, PBP3 และ PBP4 โดย PBP1, PBP2 และ PBP3 เป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับยากลุ่ม beta-lactam (3) PBPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำหน้าที่เกี่ยวกับปฏิกิริยา transpeptidation (เป็นปฏิกิริยา cross-linking ของเปปติโดไกลแคน) และ transglycosylation (การขยายสายไกลแคน) ส่วน PBPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีฤทธิ์เป็น carboxylation คือ ทำหน้าที่กำจัดเอา D-alanine ตัวสุดท้ายจาก pentapeptide บนสายไกลแคนในผนังเซลล์ออก ดังนั้น การที่ยากลุ่ม beta-lactam ออกฤทธิ์ทำให้ PBPs ทำงานไม่ได้ จะมีผลทำให้ไม่เกิดการ cross-linking ของเปปติโดไกลแคน ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะไม่แข็งแรง สารในไซโทพลาซึมหลั่งออกมานอกเซลล์ และในที่สุดเซลล์แบคทีเรียตาย (15)

กลไกการดื้อต่อยาของ Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

MRSA ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 ในประเทศอังกฤษซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด nosocomial infection MRSA เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกไม่สามาเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจน (aerobic)และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) (16)

MRSA สามารถก่อโรค โดยการสร้างสารพิษหลายๆ ชนิดเช่น การสร้าง enterotoxcin ซึ่งทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ หรือการสร้าง toxic shock syndrome toxin 1 (TSST 1) ซึ่งทำให้เกิดภาวะช็อคในผู้ป่วยได้(16)

MRSA นอกจากจะก่อโรครุนแรงแล้ว ยังก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการดื้อต่อยาในกลุ่ม Methylpenicillin และอนุพันธ์ (methicillin, oxacillin และ nafcillin) (16,17) และยังสามารถดื้อต่อยากลุ่มอื่นได้ (14,16,17) โดยอาศัยกลไกการดื้อยาต่างๆ ซึ่งจะถูกควบคุมโดยยีนบนจีโนมของ MRSA (มีทั้งหมด 2,813,641 bp) ซึ่งในแต่ละกลไกจะถูกควบคุมโดยยีนที่ต่างกัน

ตารางที่ 2-3 ยีนที่ควบคุมการดื้อยาในกลไกต่าง ๆ ของ MRSA (16)

Product	Gene name	Location	Function
Bleomycin resistance protein	*Ble o*(18)	SCC mec (IS431)	Resistance to bleomycin
Penicillin-binding protein 2a	*mecA*	SCC mec (MecA)	Resistance to beta-lactam
Beta-lactamase	*blaZ*	PN 315	Hydrolysis of penicillin
rRNA methylase Erm A	*ermA*	Tn 544 in SCC mec	MLS resistance
rRNA methylase Erm A	*ermA*	Tn 544	MLS resistance
O-nucleotidyltransferase (4′)	*ant (4′)*	SCC mec	Modification of aminoglycoside
Bifunctional AAC/APH protein	*aacA-aphD* (19)	Tn4001 in pMu50	Modification of aminoglycoside
Tetracyclin resistance protein Tet M	*tet M gene*	Putative conjugative transposon Tn 5801	Resistance to Tetracycline
QacA protein	*gacA*	pMu50	Efflux-mediated antiseptic resistance

หมายเหตุ MLS=macrolide, licosaminde, streptcgraminin

AAC=5′-aminoglycoside N-acetyltransferase

APH=2′ aminoglycoside phospotransferase

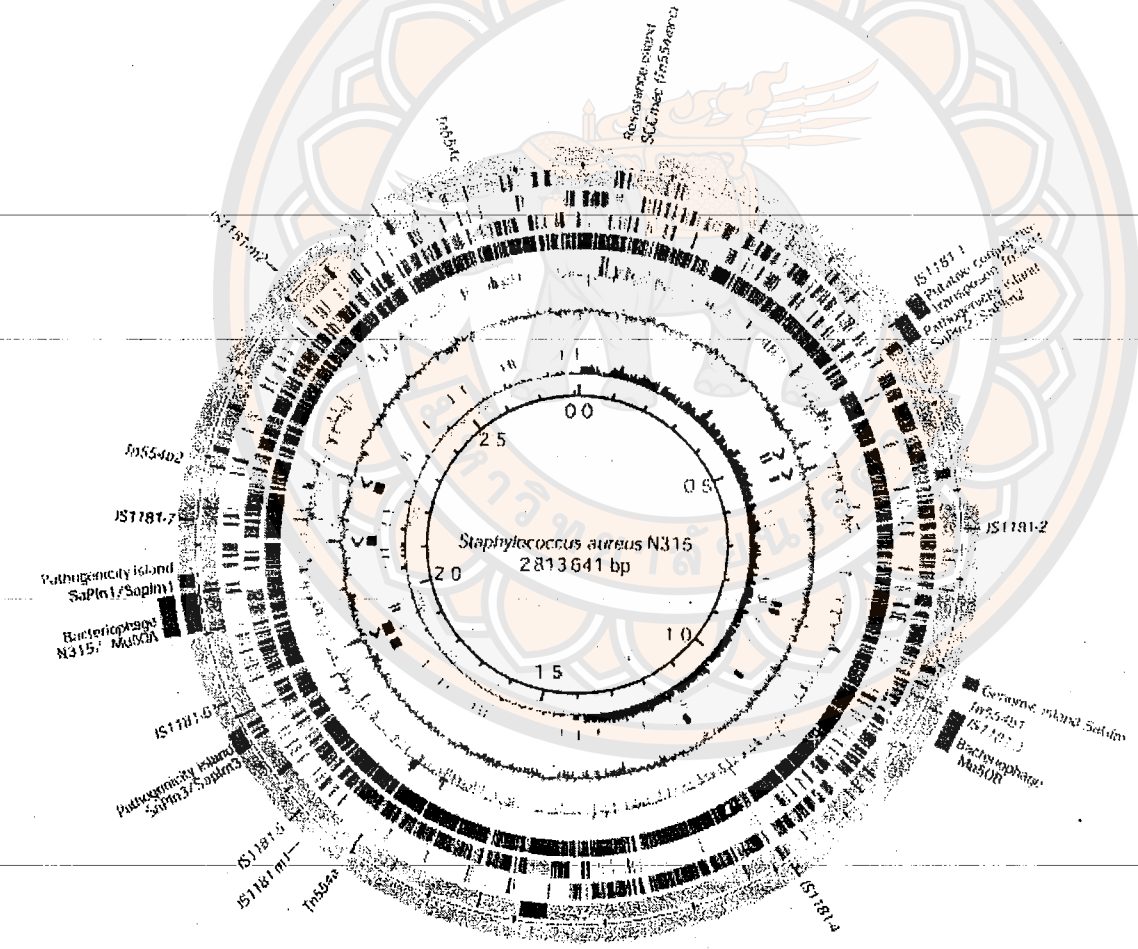
สำหรับในการศึกษานี้ได้มุ่งเน้นไปที่กลไกการดื้อยาโดยการสร้าง MRSA-specific penicillin binding protein (PBP2a หรือ 2′) ซึ่งมีความชอบจับกับยากลุ่ม beta-lactam น้อย โดย PBP2a จะถูกถ่ายทอดโดยยีน *mecA* ซึ่งเป็นยีนหนึ่งในกลุ่มของ *mec* DNA (SCC*mec*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของ DNA โดยยีน *mecA* จะถูกควบคุมด้วย *mecI* และ *mecR1* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม *mec* DNA (SCC*mec*) เช่นกัน นอกจากนี้ยังมียีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนในกลุ่ม *mec* DNA (SCC *mec*) ที่มีผลต่อการดื้อยา methicillin ของ *S. aureus* เช่นกัน เช่น *fem* A B, *fem* C, *fem* D, *fem* E และ *fem* F

ลักษณะของ *mec* DNA

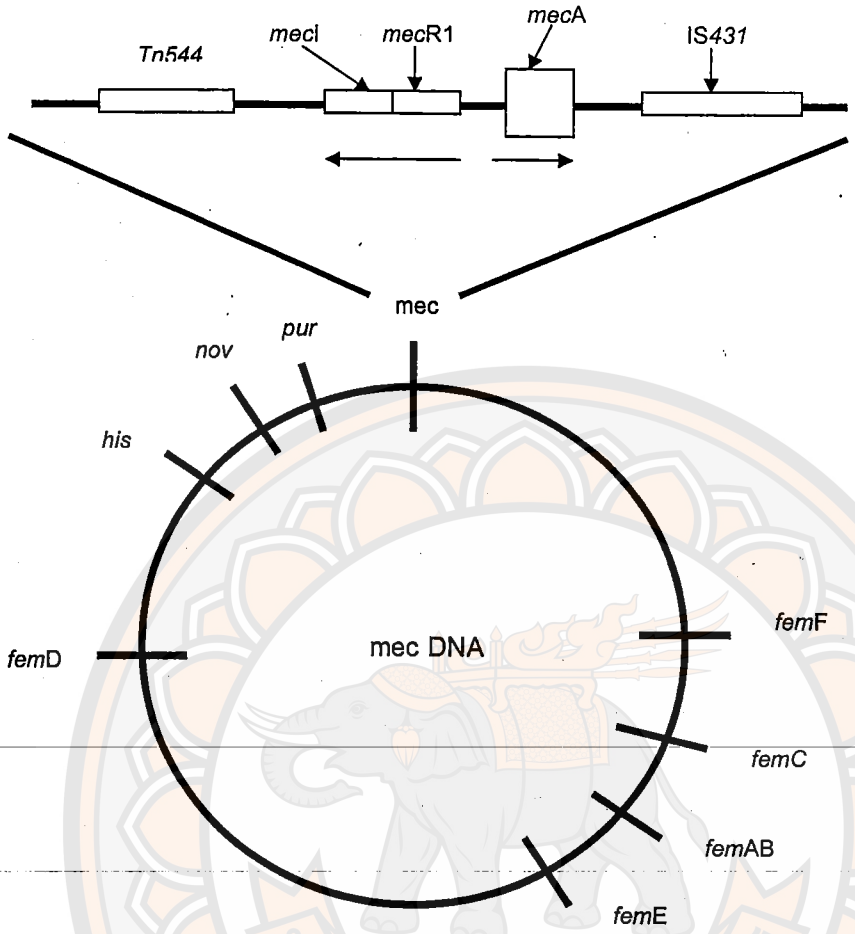
เป็นส่วนของ DNA ที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 30 – 50 kb ซึ่งไม่พบใน Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) (16, 17, 20)

mec DNA จะอยู่บนโครโมโซมของ MRSA ซึ่งใกล้กับกลุ่มยีน *pur-nor-his* โดย *mec* DNA จะประกอบด้วย(17, 20)

1. *mec*A ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมให้มีการแสดงออกของ PBP2a
2. *mec*I และ *mec*R1 ซึ่งเป็นยีนที่ถ่ายทอดโปรตีนกดการ transcription ของ *mec*A
3. *mec*-associated DNA จะประกอบด้วย transposone (Tn544) (19) และ insertion sequence (SI431) (18) ซึ่งมียีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา erythromycin และ เกิด multiple drug resistance ตามลำดับ



รูปที่ 2-5 แสดงตำแหน่งของ SCC *mec* บนโครโมโซมของ MRSA (16)



รูปที่ 2-6 แสดงตำแหน่งของ *mec* DNA บนโครโมโซม ซึ่งประกอบด้วย *mec*A gene ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง PBP2a *mec*I gene และ *mec*R1 ทำหน้าที่ในการควบคุมการ Transcription ของ *mec*A gene Tn 544 และ IS431 เป็นยีนที่ทำให้เกิดการดื้อต่อ erythromycin และ multiple drug resistance ตามลำดับ (17)

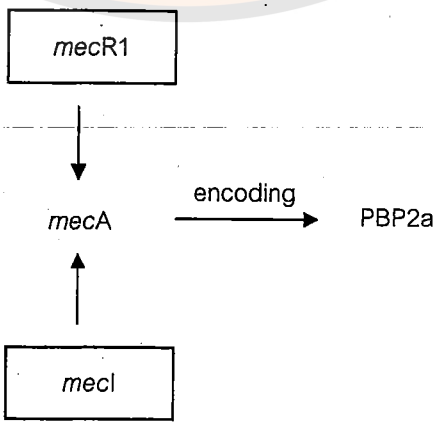
ลักษณะของ *mec*A gene

*mec*A เป็นยีนหนึ่งในกลุ่ม *mec* DNA ที่ปรากฏอยู่บนโครโมโซมของ MRSA ซึ่งพบใน MRSA มากกว่า 90% และยังสามารถพบใน methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (CNS) แต่จะไม่พบในสายพันธุ์ที่ไวต่อยา (16, 17, 20) หน้าที่ของ *mec*A คือ การ encode ให้ MRSA-specific penicillin binding protein (PBP2a) ซึ่งเป็น PBP ที่มีขนาดโมเลกุลสูง โดย PBP2a จะทำหน้าที่ในการเชื่อมสายไกลแคนบนเปปติโดไกลแคน (transpeptidation) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการสร้างผนังเซลล์ โดย PBP2a จะมีความชอบจับกับยาต่ำเมื่อเทียบกับ PBPs (PBP1, 2, 3 และ 4) ของ *S. aureus* ที่ไวต่อยากลุ่มเบต้าแลคแทม (15, 17, 20)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *mec*A พบว่า 300 นิวคลีโอไทด์แรก เป็นส่วนของ operator region ของ *mec*A และยีนควบคุมการแสดงออกของ *mec*A (*mec*I และ *mec*R1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับเบสของ beta-lactamase gene (*bla*2, *bla*I และ *bla*R1) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนพลาสมิด pMu50 ของ MRSA ดังนั้น ในการควบคุมการแสดงออกของ *mec*A จึงมีความเกี่ยวข้องกับ *bla*I และ *bla*R1 แต่ก็มีผลน้อยกว่า *mec*I และ *mec*R1 (15, 20)

การควบคุมการแสดงออกของ *mec*A จะถูกควบคุมโดยยีนสำคัญ 2 ยีน คือ *mec*I และ *mec*R1 (17, 20-23) ซึ่งทั้งสองยีนเป็นยีนในกลุ่ม *mec* DNA เช่นเดียวกันกับ *mec*A โดย *mec*I จะถอดรหัสให้ *Mec*I protein ที่ใช้ในการกดการ transcription ของ *mec*A ส่วน *mec*R1 จะถอดรหัสให้ *Mec*R1 protien ซึ่งเป็น signal tranducing PBPs ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อต่อ methicillin ของ *S.aureus* ได้ช้า โดยปกติ *mec*A จะถูกควบคุมการทำงานโดย *mec*I เป็นสำคัญ ทำให้ *mec*A ไม่สามารถ encode ให้ PBP2a ได้ จึงสามารถไวต่อยา methicillin แต่เมื่อเกิดความผิดปกติของยีนควบคุมการแสดงออกของ *mec*A (*mec*I) จะทำให้ *mec*I มาสามารถควบคุมการแสดงออกของ *mec*A ได้ ทำให้เกิดการสร้าง PBP2a เพิ่มมากขึ้น และเกิดการดื้อยาในที่สุด (17, 20-23)

จากการศึกษา พบว่าความผิดปกติของ *mec*I เกิดจากการขาดหายไปของเบส 28 เบส หรือ การกลายพันธ์โดยการแทนที่จาก C⟶T หรือ T⟶A ที่ตำแหน่งเบสที่ 203 ซึ่งจะเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนจาก gln68⟶stop codon และที่ตำแหน่งเบสที่ 206 จะเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนจาก Lys55⟶stop codon หรือการกลายพันธุ์ของ *mec*A จะทำให้ repressor binding size เปลี่ยนรูปแบบไป ซึ่งมีผลทำให้ repressor protein จับกับ *mec*A site ได้น้อยลง ซึ่งการกลายพันธุ์ของ *mec*A ทำให้มีการแสดงออกของ *mec*A มากขึ้น อันจะส่งผลต่อการสร้าง PBP2a ที่มากขึ้นจนทำให้เกิดการดื้อยาในที่สุด (24, 25)



รูปที่ 2- 7 แสดงการควบคุมการแสดงออกของ *mec*A โดย *mec*I และ *mec*R1

การทดสอบหาความไวต่อยา Methicillin ของ *S.aureus*

วิธีมาตรฐานที่ใช้ทดสอบหา MRSA คือ วิธี disc diffusion, agar dilution, broth microdilution และ screening test

Disc diffusion method ตามวิธีมาตรฐานของ The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (7)

อาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ Mueller-Hinton (MH) และเติม 2% NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (อาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีความแตกต่างกันในแต่ละบริษัท) นำไป autoclave และเทลงในจานเพาะเชื้อให้ลึกประมาณ 3-4 มิลลิเมตร จากนั้นรอให้แห้ง

การเพาะเชื้อ เลือกโคโลนีอย่างน้อย 4-5 โคโลนี เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MH broth แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้มีความขุ่นที่พอเพียง โดยจะปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน

การควบคุมคุณภาพของเชื้อ ประกอบด้วย สายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ไวต่อยา (ATCC 25923 หรือ NCTC 6571) และสายพันธุ์ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (NCTC 12493) เพื่อยืนยันได้ว่า สภาวะที่ใช้เหมาะสมต่อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา

การเตรียมเชื้อ ใช้สำลีพันปลายไม้ (swab) ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อมาป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดย Streak เป็น 3 ระนาบบน MH agar

แผ่นยาต้านแบคทีเรีย methicillin 5 μg หรือ oxacillin 1 μg วางแผ่นยาลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยต้องแน่ใจว่า แผ่นยาวางแนบสนิทกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว

การบ่มเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่งโมงที่อุณหภูมิ 30 °C

การอ่านผล วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณวงใสรอบแผ่นยาที่ไม่มีเชื้อเจริญ (inhibition zone) รวมกับเส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่นยาด้วย **หน่วยที่วัดเป็นมิลลิเมตร**

ข้อควรระวัง คือ อาจมีบางโคโลนีที่มีขนาดเล็กมากจนยากแก่การสังเกต แต่วิธีนี้จะช่วยให้เห็นโคโลนีของเชื้อที่ปนเปื้อน

การแปลผล

ตารางที่ 2-4 ค่าความไวและดื้อต่อยาจากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

Species	Compound	เส้นผ่าศูนย์กลาง (mm)	
		Susceptibility	Resistance
S. aureus	Methicillin	>15	< 14
	Oxacillin	> 15	< 14

ข้อจำกัด คือ ในสายพันธุ์ที่สร้าง penicillinase ในปริมาณที่มากเกินไป จะก่อให้เกิดวงใสจางที่ < 15 มิลลิเมตร หากไม่แน่ใจควรทำการตรวจหา *mecA* gene ด้วยวิธี PCR หรือ Probe ส่วนการใส่ clavulanic acid ลงไปด้วยเพื่อทดสอบ MRSA บางสายพันธุ์ที่ผลิต penicillinase ในปริมาณที่มากเกินไป พบว่า ไม่มีความน่าเชื่อถือ

1. การหา Minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี agar dilution

ค่า MIC ของสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา อาจมีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ใช้ นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ทำให้เชื้อที่สร้าง penicillinase ในปริมาณที่มากเกินไป จะพบว่า แสดงลักษณะดื้อต่อยา

อาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ MH agar และเติม 2% NaCl จากนั้นนำไป autoclave และเทลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารต้านจุลชีพตามวิธีของ Andrew โดยควรใช้จานเพาะเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้วภายใน 24 ชั่วโมง

การเพาะเชื้อ แตะเอา 4 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงใน MH broth จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 37°C แล้วจึงนำมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย multipoint inoculator เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^4 cfu/ inoculum spot

การบ่มเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30°C

การอ่านผล อ่านค่า MIC

การแปลผล

ตารางที่ 2-5 ค่าความไวและดื้อต่อยาจากการทดสอบด้วยวิธี agar dilution

Species	Compound	MIC (µg/ml)	
		Susceptibility	Resistance
S. aureus	Methicillin	< 4	> 8
	Oxacillin	< 2	> 4

ข้อควรระวัง จุดตัดของค่า MIC ในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ทำให้อาจเกิดความไม่แน่นอนในการแปลผลได้

การควบคุมคุณภาพ ประกอบด้วย S. aureus ที่ไวต่อยา (ATCC 29213 หรือ NCTC 6571) และ S. aureus ที่ดื้อต่อยา methicillin (NCTC 12493)

2. การหา MIC ด้วยวิธี broth dilution

ใช้ MH broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติม 2% NaCl จากนั้นเติมเชื้อที่มีความเข้มข้น 5×10^5 cfu/ml แล้วจึงนำไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. Screening method

ใช้ MH agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเติม 4% NaCl และ oxacillin 6 mg/l จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งถ้าเชื้อดื้อต่อยา oxacillin จะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้

วิธีอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยา เช่น

การหาค่า MICs ด้วยวิธี Etest เป็นวิธีที่ที่มีข้อดี คือ ทำได้ง่าย และให้ผลเช่นเดียวกันกับการตรวจด้วยวิธี dilution และ PCR แต่ทั้งนี้ยังขึ้นกับ อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น MH agar ที่เติม 2% NaCl ส่วนเชื้อบ่มจนได้ความขุ่นในช่วง 0.5-1 McFarland standard แล้วจึงนำมาป้ายบน agar และบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจหา mecA ด้วยวิธี PCR จัดเป็นเป็นวิธีมาตรฐานที่สำคัญในการตรวจหาการดื้อต่อยา methicillin โดยใช้ความรู้พื้นฐานในการวิเคราะห์ และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว ซึ่งมีหลักการดังจะกล่าวต่อไป

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

เทคนิค PCR หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาได้ไม่นานนัก เพื่อใช้เพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับ DNA ชนิดอื่นหลายชนิด โดยไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อน ช่วยให้สามารถวิเคราะห์หรือตัดแยกชิ้น DNA ที่สนใจนั้นได้ โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำมาโคลนก่อน หลักการทำ PCR แสดงดังรูปที่ 5

ขั้นแรกต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้น DNA ที่สนใจก่อนอาจทราบเฉพาะช่วงปลายของยีนนั้นก็ได้ แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 ชนิด แต่ละชนิดมีเบสเป็นคู่สมกับปลาย 3' ของเส้น DNA ที่ต้องการนั้น เพื่อใช้เป็น primer ในการสังเคราะห์ DNA โดย primer ที่ใช้จะมีความยาวประมาณ 20 – 35 เบส จากนั้นนำ primer ทั้งสองชนิดมาใส่รวมกับ DNA ที่แยกได้จากเซลล์ทั้งหมด (Genomic DNA), บัฟเฟอร์ (Buffer), Doxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ DNA เกลียวคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว (Denaturation) โดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ primer ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้น DNA เป้าหมาย และมีปริมาณมากกว่าชิ้น DNA อื่นๆ มากมาย เข้ามาจับคู่ (Annealing) กับส่วนของ DNA ที่ต้องการอย่างถูกต้อง ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับส่วนของ enzyme DNA polymerase พร้อมทั้งใส่ enzyme ลงในปฏิกิริยา enzyme จะทำหน้าที่สังเคราะห์ DNA ต่อจาก primer (Primer extension) โดยมี DNA เป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ ซึ่งถ้าเริ่มต้นมียีนที่สนใจอยู่เพียง 1 โมเลกุล เมื่อผ่านรอบที่ 1 แล้วก็จะมี 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกัน (Denaturation – Annealing - Extension) หลายๆ รอบ ปริมาณ DNA เป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เป็น 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

ถ้าใช้ enzyme polymerase จาก *Escherichia coli* หรือจากเซลล์อื่นๆ เมื่อทำให้ DNA เสียสภาพโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95° enzyme ก็จะเสียสภาพด้วย จึงต้องเติม enzyme ใหม่ลงไป ในปฏิกิริยาทุกๆ รอบของการสังเคราะห์ ต่อมามีการค้นพบ enzyme Taq DNA polymerase จากแบคทีเรียในน้ำพุร้อน *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนความร้อนที่ 95° ได้ ทำให้การดำเนินปฏิกิริยาสะดวกขึ้น ไม่จำเป็นต้องเติม enzyme ในการสังเคราะห์แต่ละรอบ และสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องอัตโนมัติได้ (26,27)

สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนนั้น ขั้นแรกคือทำให้ DNA เสียสภาพ มักใช้ที่ 94° หรือ 95° ส่วนขั้นที่สองทำให้ primer จับกับ DNA ต้นแบบ อุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วงประมาณ 25°– 65° ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบส ใน primer ที่ใช้ อุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ DNA เกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50% เรียกว่า Melting temperatura (Tm) ซึ่งสามารถคำนวณค่า Tm โดยประมาณได้จากสูตร

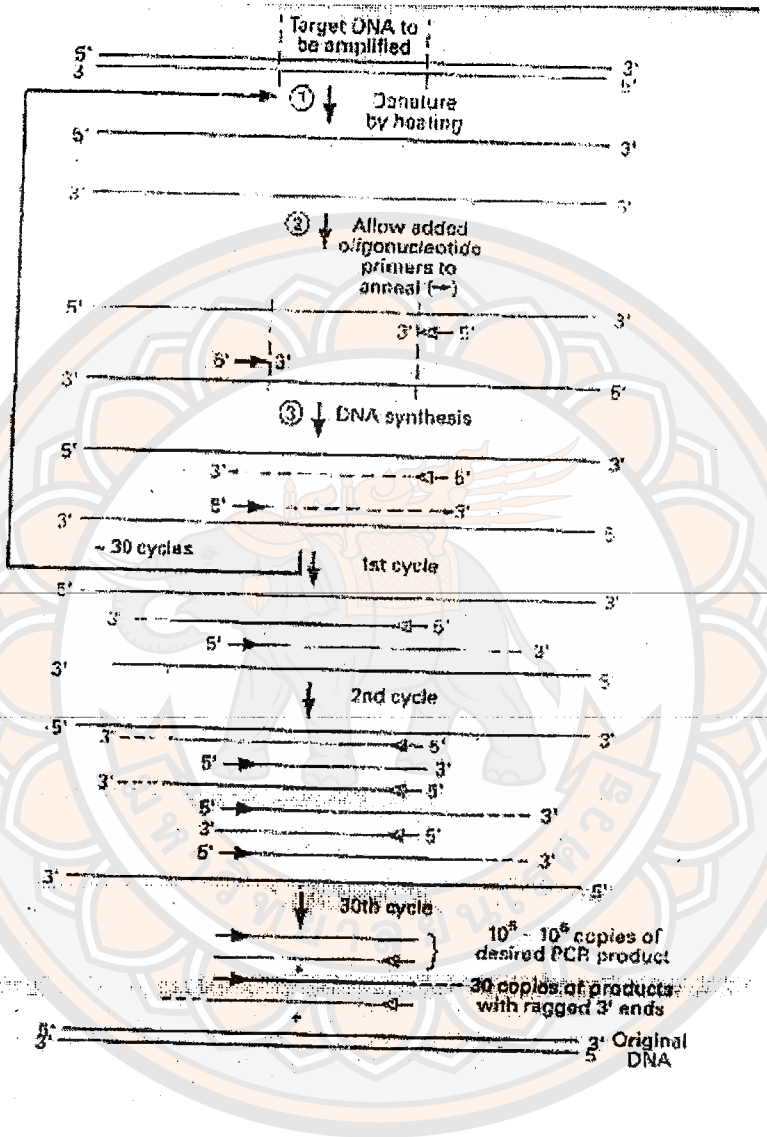
$$Tm = 4 \times (C + G) + 2 \times (A + T)$$

โดย A, C , G และ T คือจำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้น อุณหภูมิสำหรับใช้ในขั้น Annealing จะมีค่าประมาณ Tm - 5° และสามารถปรับเพิ่มหรือลดอุณหภูมิได้ครั้งละ 2° จนได้อุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับขั้นสุดท้ายคือการสังเคราะห์ DNA ต่อจาก primer จะใช้อุณหภูมิประมาณ 72° ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ enzyme Taq DNA polymerase ทำงานได้ดีที่สุด

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polymerase Chain Reaction มีดังนี้

1. บัฟเฟอร์ (Buffer) สำหรับทำปฏิกิริยา โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง (10x Buffer) ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา
2. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ (mM) ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM)
3. Primer ที่นิยมใช้คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20 – 24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40 – 60 % โดย primer ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กัน ควรมีส่วนประกอบของเบส C + G เท่ากัน เพื่อให้ค่า Tm เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรใช้ primer ที่มีลักษณะปลาย 2 ข้างเป็นคู่สมกัน (Palindrome sequence) ทั้งภายใน primer เดียวกัน และระหว่าง primer ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กัน แต่บางกรณีก็พบว่าอาจจะ ใช้ primer ที่มีลักษณะไม่เหมาะสมกันดังกล่าวได้บ้าง เมื่อสังเคราะห์ primer เรียบร้อยแล้ว จึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ให้มีความเข้มข้น 5 μM ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาคือให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 – 2.0 μM ถ้า primer ที่สังเคราะห์ขึ้น ไม่ว่าจะออกแบบเองหรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ก็ตาม ไม่สามารถใช้เพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้ ควรออกแบบปริมาณ primer ใหม่ ให้มีขนาดยาวขึ้นหรือสั้นลง หรือเปลี่ยนตำแหน่งที่สังเคราะห์ primer ไป อาจจะได้ผลดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากลำดับเบสที่บริเวณ 3' ของ primer มีความสำคัญมาก โดยถ้าจับตัวกับ DNA ต้นแบบได้ไม่ดี จะมีผลต่อปฏิกิริยามากแต่ถ้าไม่สามารถเปลี่ยน primer ได้ให้ปรับในด้านอื่นแทน
4. DNA template ใช้ได้ทั้ง DNA ที่มีคุณภาพดีและ DNA ที่มีคุณภาพไม่ดีนัก ปริมาณ DNA ที่ใช้ตั้งแต่ 5 – 500 นาโนกรัม (ng) โดยทั่วไปนิยมอยู่ในช่วง 10 – 50 ng ต่อปฏิกิริยา
5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เนื่องจาก Mg^{2+} เป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของ enzyme polymerase และมีรายงานว่า Mg^{2+} มีผลต่อปฏิกิริยามาก ซึ่งการทำปฏิกิริยา PCR จาก DNA ของสิ่งมีชีวิตหากมีความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไป จะทำให้เกิดผลผลิตต่ำ แต่ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริงมากขึ้น ดังนั้นในการทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงควรมีการทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ก่อน โดยปรับลดหรือเพิ่มครั้งละ 0.5 mM เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5 – 10 mM
6. Enzyme เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ DNA โดยเทคนิค PCR ต้องมีการทำให้ DNA เสียสภาพโดยความร้อน enzyme DNA polymerase ที่ใช้ จึงเลือก enzyme ที่ทนความร้อนได้ (Thermostable DNA polymerase) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ ชนิดแรกแยกได้จาก T.YTI ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 - 80° มีประสิทธิภาพได้สูงสุดที่ pH 7.3 – 8.3 ชนิดที่สองแยกได้จากแบคทีเรียชนิดเดียวกันซึ่งเป็นชนิดที่นิยมกันมาก รู้จักในชื่อ enzyme Taq polymerase มักอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 unit/ μL และใช้ในปฏิกิริยา 2.5 – 5 unit ต่อปฏิกิริยา 100 μL อุณหภูมิที่ใช้สำหรับทำให้ DNA เสียสภาพนั้นอาจใช้อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 94° ก็ได้ เพราะแม้ว่า enzyme Taq polymerase จะทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิดังกล่าวแต่ประสิทธิภาพจะลดลงเรื่อยๆ เช่นหลังจากที่อยู่ที่อุณหภูมิ 94° เป็นเวลา 1 นาที 30 ครั้ง enzyme จะมีประสิทธิภาพลดลงประมาณ 50 % ซึ่งโดยทั่วไปในขั้นนี้จะใช้อุณหภูมิ 94° เพียง

30 วินาทีก็พอ แต่ DNA ต้นแบบบางชนิด อาจต้องการอุณหภูมิที่สูงขึ้น เพื่อให้เกิดการเสียสภาพที่สมบูรณ์ เช่น DNA ที่มีองค์ประกอบเป็น G + C สูง ควรเพิ่มเวลาหรือเพิ่มอุณหภูมิในการทำให้เสียสภาพ หรือบางครั้งอุณหภูมิในหลอดทดลองอาจไม่สูงเท่าอุณหภูมิในเครื่อง ดังนั้นจึงต้องเพิ่มอุณหภูมิให้เหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ (26)



รูปที่ 2-8 เทคนิคการทำ Polymerase chain reaction (27)

การแยกขนาด DNA โดยวิธี Electrophoresis (Electrophoresis of DNA) (26)

อิเล็กโทรโฟเรซิส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้ว อัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับ ขนาดรูปร่าง โมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอนเอ ประกอบไปด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอนเอจึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอนเอ จะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอนเอที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้น จะพบว่า ประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอนเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอนเอจึงขึ้นกับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอนเอด้วย

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอนเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอนเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอนเอ สามารถทำได้โดยนำมาทำ Electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุลแล้ว

2. รูปแบบของดีเอนเอ (configuration)

3. เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอนเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือ polyacrylamide gel และ agarose gel

agarose gel เป็นโพลีเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจาก agarose gel จับกับสารต่างๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำ electrophoresis การเตรียมทำได้ง่ายและไม่อันตรายเมื่อเทียบกับ polyacrylamide gel โดยจะใช้ agarose gel เจลแยกดีเอนเอที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ ประมาณ 100 คู่เบสถึงกว่า 50,000 คู่เบส ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2-6 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอนเอที่แยกได้โดย agarose gel

ความเข้มข้นของเจล (%)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
0.3	5,000-60,000
0.6	1,000-20,000
0.7	800-10,000
0.9	500-7,000
1.2	400-6,000
1.5	200-4,000
2.0	100-3,000

polyacrylamide gel เกิดจากการรวมตัวของ acrylamide และ บิสอะครีลาไมด์ (N,N'-methylene bisacrylamide) โมเลกุลเดี่ยวมารวมตัวกันเกิดเป็นโพลีเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี จึงมีความสม่ำเสมอควบคุมขนาดได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมีไอออนิกสเตรงค์ (ionic strenght) กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องในโพลีเมอร์ได้ จึงเหมาะสมสำหรับเป็นตัวกลาง

I 4789829
T
W4
ง429ก
2548

ในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอนเอ acrylamide และ bisacrylamide โมเลกุลเดี่ยวที่ยังไม่แข็งตัวเป็นเจล เป็นสารที่มีพิษสูงต่อระบบประสาท และสามารถดูดซึมผ่านผิวหนังได้ โดยจะสะสมไปเรื่อยๆ จึงควรสวมถุงมือขณะเตรียมเจลหรือเกี่ยวข้องกับสารละลาย โดย acrylamide gel จะใช้แยกดีเอนเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ระหว่าง 6-1,000 คู่เบส ดังตารางที่ 3

สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ
26 ก.ค. 2548
4801378

ตารางที่ 2-7 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอนเอที่แยกได้โดย polyacrylamide gel

ความเข้มข้นของเจล (%) (ใช้อะครีลาไมด์: บิสอะครีลาไมด์ = 29: 1)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
3.5	100-1,000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
20.0	6-100

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอนเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกดีเอนเอโดยวิธี Electrophoresis จะต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่สูงเกินไป ดีเอนเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วแต่การแยกจะไม่ดี ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไป ดีเอนเอจะเคลื่อนที่ช้า แยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอนเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอนเอ

5. บัฟเฟอร์ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอนเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 2-8 ชนิดของบัฟเฟอร์

ชนิดของบัฟเฟอร์	ส่วนประกอบ	ข้อดีและข้อเสีย
TAE	Tris acetate EDTA	ใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการนำดีเอนเอกลับมาใช้อีก แต่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำ Electrophoresis นาน หรือควรให้มีการหมุนเวียนของบัฟเฟอร์
TBE	Tris borate EDTA	นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า แยกดีเอนเอได้ดี มีความสามารถแยกเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี สามารถเกิดปฏิกิริยากับ agarose gel ได้ จึงไม่เหมาะที่จะนำกลับมาใช้อีก
TPE	Tris phosphate EDTA	เป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอนเอได้รวดเร็ว แต่ไม่เหมาะถ้ามีการสกัดดีเอนเอจากเจล และตกตะกอนด้วยเอทานอล

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โดยในปี 1991 Murakami K และคณะ (8) ได้ทำการทดลองตรวจหา *mec A* gene ด้วยวิธี PCR เพื่อบ่งชี้ว่าเป็น MRSA เปรียบเทียบกับวิธีหา MIC ด้วยวิธี broth microdilution ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 9

ตารางที่ 2-9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจหา *mec*A ด้วยวิธี PCR กับการดื้อต่อในเชื้อ *S. aureus*

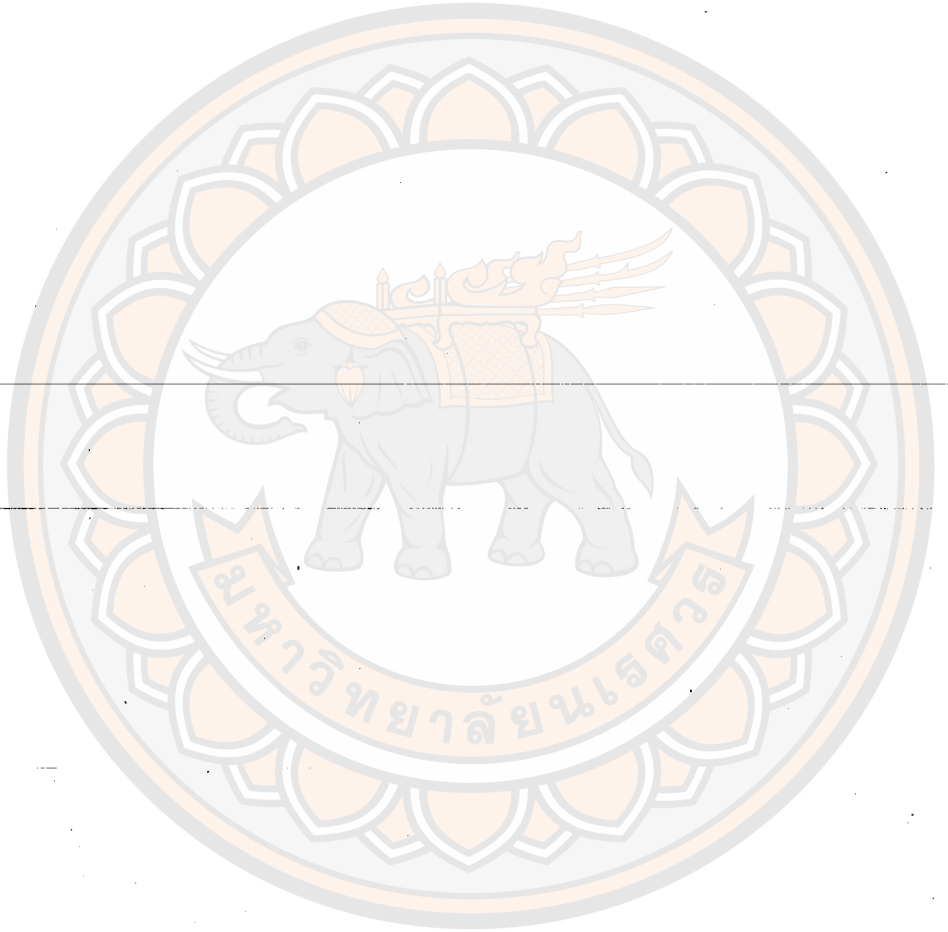
characteristic	No. of strains			
	Oxacillin		Methicillin	
	Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant
mecA negative	97	2	99	0
mecA positive	3	108	3	108

จะเห็นว่า 100% ของ *S. aureus* ที่ไวต่อยา methicillin ไม่พบ *mec* A gene และ 98% ของ *S. aureus* ที่ไวต่อยา oxacillin ไม่พบ *mec* A gene และพบ *S. aureus* จำนวน 3 ตัวอย่างใน 111 ตัวอย่างที่มี *mec*A แต่แสดงลักษณะความไวต่อยาเบต้าแลคแทมเช่นเดียวกับการไม่ปรากฏ *mec*A ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อไม่ได้สร้าง PBP2a นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่า สามารถตรวจพบ *mec*A gene ใน coagulase-negative staphylococci ที่ดื้อต่อยาได้ ซึ่งจากทดลองทำให้เห็นว่า การพิสูจน์ว่าเป็น MRSA ด้วยวิธี PCR นี้มีความน่าเชื่อถือ

ต่อมาในปี 1992 Hiramatsu K และคณะ (9)ได้ทำการทดลองใช้วิธี PCR ในการวิเคราะห์ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin ที่มีลักษณะ borderline resistance ทั้งนี้เนื่องมาจาก วิธีการทดสอบความไวต่อยาโดยพิจารณาจากการแสดงลักษณะการดื้อต่อยา มีปัญหาในตรวจหาเชื้อที่ดื้อต่อยาในลักษณะเช่นนี้ จากผลการทดลองพบว่า วิธี PCR สามารถบ่งชี้เชื้อที่ดื้อต่อยา methicillin ลักษณะ borderline resistance ได้อย่างถูกต้อง และในการทดลองนี้พบว่ามี *S. aureus* 1 ตัวอย่างที่ดื้อต่อยา methicillin แต่ตรวจไม่พบ *mec*A gene

ในปี 1996 ผู้วิจัยอีกกลุ่มหนึ่ง ได้ทำการตรวจหา mecA และตรวจหาความดื้อต่อยาจากลักษณะทาง phenotype ของเชื้อใน *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin ที่ระดับต่ำ ผลการศึกษา *S. aureus* จำนวน 83 ตัวอย่างที่มีค่า MIC ต่อยา methicillin 4 – 16 mg/l พบว่า ผลการตรวจหา *mec*A ด้วยวิธี PCR และ วิธี Probe ให้ผลไปในทางเดียวกัน คือ มีการตรวจพบของ *mec*A ใน 39 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบ *mec*A ใน 44 ตัวอย่าง ส่วนวิธีการตรวจหาลักษณะทาง phenotype ของเชื้อต่อยา methicillin พบว่า จุดตัดความไวจากการทดสอบด้วยวิธี agar มีความไวและความจำเพาะมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม มี 27 เชื้อตัวอย่างที่ดื้อต่อยา methicillin แต่ไม่พบ *mec*A ซึ่ง 1 ใน 4 ของเชื้อเหล่านี้มีค่า MIC เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar dilution มากกว่า 4 mg/l แต่ไม่เกิน 32 mg/l ซึ่งจากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงปัญหาความน่าเชื่อถือของการตรวจหา *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin ในระดับต่ำด้วยวิธีทาง phenotype และประโยชน์ที่ได้จากการตรวจหา *mec*A โดยตรง (10) ซึ่งการที่สามารถตรวจหา*S. aureus* ที่ดื้อยา methicillin ในระดับต่ำได้ น่าจะมีประโยชน์ เพราะได้มีการศึกษาใน in vitro ที่ได้แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ที่ดื้อยา oxacillin ในระดับต่ำได้จะไวต่อยา amoxicillin หรือ ticarcillin เมื่อใช้ร่วมกับยา clavulanic acid (28) ซึ่งอาจจะนำมาใช้ในทางคลินิกต่อไป

ในเวลาต่อมา เริ่มมีการพิสูจน์ว่าเป็น MRSA โดยการตรวจหา PBP2a ซึ่งวิธีนี้มีชื่อเรียกว่า latex agglutination ในปี 2001 (29) ได้มีการเปรียบเทียบวิธีนี้กับวิธี PCR เพื่อพิสูจน์ว่าเป็น MRSA ผลการทดลอง พบว่า วิธี latex agglutination และวิธี PCR มีความไว 92% และ 96% และมีความจำเพาะเป็น 89.5% และ 94.7% ตามลำดับ



บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง

เชื้อ MRSA จำนวน 39 ตัวอย่างและ *Staphylococcus aureus* 1 ตัวอย่างได้ทำการแยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก โดยเชื้อตัวอย่างเหล่านี้ผ่านการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ ด้วยวิธี Disk diffusion แล้ว ซึ่งข้อมูลการดื้อยาของ MRSA ตัวอย่าง และเชื้อตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก

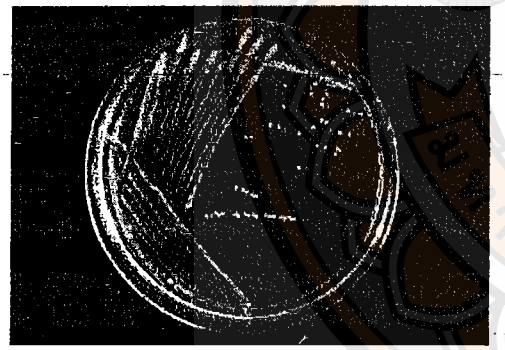
การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การเลี้ยง MRSA บน Nutrient agar plate (NA plate)

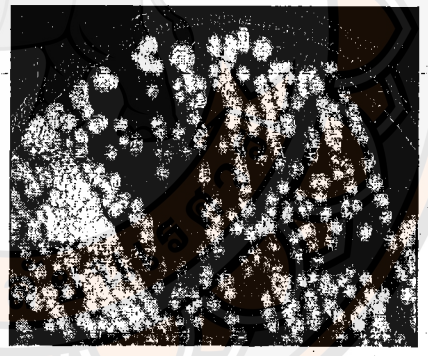
นำเชื้อ MRSA จำนวน 39 ตัวอย่างและ *Staphylococcus aureus* 1 ตัวอย่างที่ถูกตรึงไว้ใน Glycerine ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ป้ายบน NA plate แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง

การเลี้ยง MRSA ใน Nutrient broth

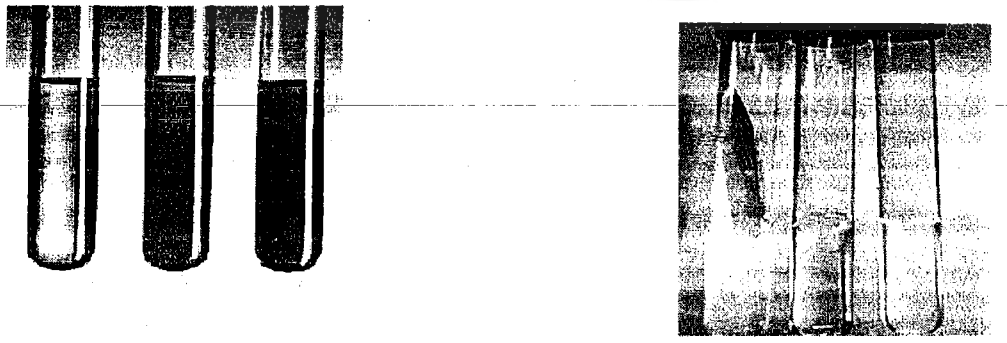
นำโคโลนีเดี่ยวของ MRSA และ S. aureus มาเลี้ยงใน Nutrient broth โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 160 rpm เป็นเวลา 12- 16 ชั่วโมง



รูปที่ 3-1 การเลี้ยง MRSA บน Nutrient agar plate (NA plate)



รูปที่ 3-2 ลักษณะโคโลนีของ MRSA



รูปที่ 3-3 การเลี้ยง MRSA ใน Nutrient broth

การสกัด DNA จากเชื้อตัวอย่าง

1. ปิเปตเชื้อตัวอย่างจาก nutrient broth 1200 µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube
2. ปั่นเหวี่ยงที่ 10800 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนเชื้อตัวอย่างจาก nutrient broth
3. เท nutrient broth ส่วนบนทิ้ง
4. เติม TE buffer pH 8.0 465 µl เขย่าด้วย vortex เพื่อกระจายและล้างเซลล์ตัวอย่าง
5. เติม 10% w/v SDS 30 µl เขย่าให้เข้ากันและนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70° C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เซลล์แตกอย่างสมบูรณ์
6. เติม Chloroform 500 µl เพื่อกำจัดโปรตีนและส่วนที่ไม่ต้องการหลังจากนั้นเขย่าจนของผสมมีสีขาวขุ่นคล้าย emulsion
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10800 rpm เป็นเวลา 5 นาที
8. จะได้ของผสมแยกชั้นเป็น 3 ชั้น โดยชั้นล่างสุดจะเป็นชั้นของ Chloroform ชั้นกลางจะมีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวขุ่นซึ่งเป็นโปรตีนและสารอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ ส่วนชั้นบนสุดจะเป็นชั้นของน้ำซึ่งมีลักษณะใส จะมี DNA อยู่ ทำการปิเปตส่วนใสด้านบน 400 µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube
9. เติม 3 M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1: 10 (40µl) ลงไป
10. เติม isopropanol 800 µl เพื่อตกตะกอน DNA
11. ผสมแบบ Inverse หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10800 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกตะกอนDNA
12. เท Isopropanol ทิ้ง
13. เติม 70% Ethanol 200 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10800 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอน DNA
14. ปิเปต 70% Ethanol ออกให้มากที่สุด
15. ทิ้งไว้ให้แห้งที่ 50° C
16. เติม ddH_2O 30 µl เก็บไว้ที่ -20° C

PCR amplification

ตารางที่ 3-1 PCR mixture 20 µl /reaction

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA template	2 µl	
10x PCR buffer + 15 mM $MgCl_2$ (QAUIGEN®)(30- 31)	2 µl	1x ; $MgCl_2$ 1.5 mM
[a]4 mM dNTPs (30-31)	1 µl	200 µM
[b]5 µM *mec*A 01 (26, 31)	1 µl	0.25 µM (26, 31)
[b]5 µM *mec*A 02 (26, 31)	1 µl	0.25 µM (26, 31)
Taq DNA polymerase (31)	0.3 µl	1.5 u / reaction
ddH_2O	12.7 µl	-

[a] dNTPs ประกอบด้วย 100 mMdCTP + 100 mMdTTP + 100 mMdATP + 100 mMdGTP

[b] ลำดับเบสแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 3-2 Primers ที่ใช้ใน PCR

Amplified gene	Oligonucleotide primers		Size of PCR product (bp)
	Pair	Sequence (5'- 3')	
*mec*A	*mec* A01	+ AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	[c]533
	mec A02	- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	

+ sense primer; - anti- sense primer

[c] ขนาดของ mec A gene PCR product ได้จากการคำนวณ ซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก

กำหนด PCR condition (31)

First denaturation	94 °C	for 5 minutes	
Denaturation	94 °C	for 30 second	30 cycles
Annealing	55 °C	for 30 second	
Extension	72 °C	for 1 minutes	
Final extension	72 °C	for 7 minutes	

การแยกขนาด DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis

แยก DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.2 % agarose gel ที่ย้อมสี DNA ด้วย ethidium bromide 0.5 µg/ ml (26)

กำหนดความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำ DNA ที่แยกได้ไปตรวจหาโดยใช้แสง UV

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การตรวจหา *mec*A gene โดยวิธี PCR ใน MRSA จำนวน 39 ตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก และผ่านการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ รวมทั้ง oxacillin ด้วยวิธี disk diffusion พบว่า MRSA จำนวน 29 ตัวอย่าง มีพบ *mec*A gene ซึ่งมีขนาด PCR products เป็น 533 bp. (*mec*A gene positive) คิดเป็น 74.36 % และ MRSA จำนวน 10 ตัวอย่าง ไม่พบ *mecA* gene (*mec*A gene negative)

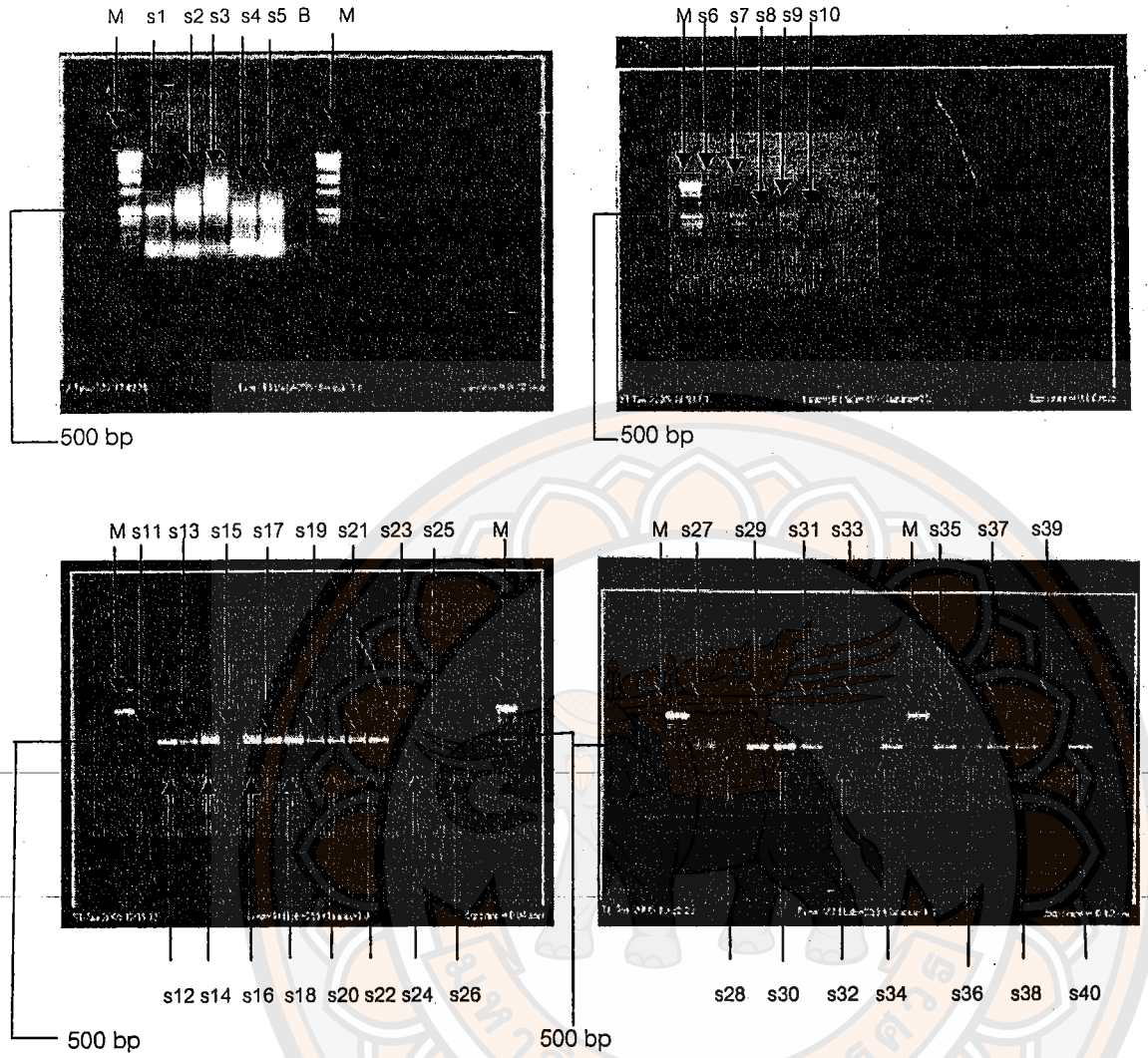
ตารางที่4-1 แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ใน 10 ตัวอย่างของ *mec*A gene negative MRSA

NO.	Code of MRSA samples	Susceptibility test								
		AMC	CHL	ERY	FOS	GEN	OXA	PEN	SXT	VAN
S6	K685	S	S	R	R	R	R	R	R	S
S11	21884	R	S	R	S	S	R	R	R	S
S15	ACTT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S23	18963	S	S	R	S	S	R	R	S	S
S24	25614	R	S	R	S	R	R	R	S	S
S25	M80	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S26	26761	R	S	R	S	R	R	R	S	S
S28	388	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S32	M367	R	R	R	S	R	R	R	S	S
S33	20510	R	R	R	S	R	R	R	S	S
S39	4112K	R	S	R	S	R	R	R	S	S

ตารางที่4-2 แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ ใน 29 ตัวอย่างของ *mec* A gene positive MRSA

NO.	Code of MRSA samples	Susceptibility test								
		AMC	CHL	ERY	FOS	GEN	OXA	PEN	SXT	VAN
S1	17503	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S2	19015	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S3	20350	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S4	18846	S	R	R	S	R	R	R	R	S
S5	01410	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S7	00539	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S8	22813	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S9	23217	R	S	R	I	R	R	R	R	S
S10	23615	R	R	R	S	R	R	R	S	S
S12	02961	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S13	04012	R	R	R	R	R	R	R	R	S
S14	04507	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S16	00709	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S17	M12291	R	R	R	S	R	R	R	S	S
S18	00688	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S19	22146	R	R	R	S	R	R	R	S	S
S20	18949	R	R	R	R	R	R	R	R	S
S21	23006	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S22	01754	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S27	18533	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S29	23614	R	R	R	S	R	R	R	S	S
S30	20093	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S31	02732	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S34	00717	R	S	R	S	R	R	R	R	S
S35	02114	R	R	R	R	R	R	R	R	S
S36	04324	R	S	R	R	R	R	R	R	S
S37	04026	R	S	R	R	R	R	R	R	S
S38	25120	R	S	R	R	R	R	R	R	S
S40	00675	R	S	R	S	R	R	R	R	S

AMC: Ampicillin, CHL: Chloramphenicol, ERY: Erythromycin, FOS: Fosfomycin, GEN: Gentamicin, OXA: Oxacillin, PEN: Penicillin, SXT: Sulfamethoxazole- trimethoprim, VAN: Vancomycim



รูปที่ 4-1 แสดง *mec*A gene products ของ MRSA

MRSA ที่เป็น *mec*A gene positive จำนวน 29 ตัวอย่างไวต่อ chloramphenicol 13 ตัวอย่าง ไวต่อ fosfomycin 21 ตัวอย่าง ไวต่อ vancomycim 29 ตัวอย่าง และไวต่อ sulfamethoxazole- trimethoprim 4 ตัวอย่าง ส่วน MRSA ที่เป็น *mec*A gene negative จำนวน 10 ตัวอย่าง ไวต่อ chloramphenicol 7 ตัวอย่าง ไวต่อ ampicillin 1 ตัวอย่าง ไวต่อ gentamicin 2 ตัวอย่าง ไวต่อ sulfamethoxazole- trimethoprim 6 ตัวอย่าง และไวต่อ vancomycim และ fosfomycin 10 ตัวอย่าง

MRSA ทั้ง 39 ตัวอย่างดื้อต่อ erythromycin oxacillin และ penicillin

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

สรุปผลการศึกษา

ตารางที่ 5-1 สรุปผลการศึกษา

	Methicillin - resistance
mec A gene positive	29
mec A gene negative	10
Total	39

ในการตรวจหา *mec*A gene ใน MRSA จำนวน 39 ตัวอย่างด้วยวิธี PCR พบว่ามีการปรากฏของ *mec*A gene ซึ่งมีขนาด 533 bp. ใน MRSA จำนวน 29 ตัวอย่าง คิดเป็น 74.36 % จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่ากลไกหลักของการดื้อต่อ oxacillin ของ MRSA ตัวอย่างมีความเกี่ยวข้องกับ *mec*A gene เป็นส่วนใหญ่

วิจารณ์ผลการศึกษา

MRSA เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด nosocomial infection เนื่องจาก MRSA ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะในหลายๆ กลุ่ม (multiple drug resistance) (14) ทำให้ยากต่อการเลือกยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA

ในการศึกษานี้มุ่งเน้นการดื้อต่อ oxacillin ของ MRSA เนื่องจากเป็นยาที่ใช้ในการทดสอบการดื้อต่อ methicillin และสามารถทำนายการดื้อยาในกลุ่ม beta- lactamase ได้ โดยกลไกการดื้อต่อ oxacillin ประกอบด้วย 3 กลไก (15, 17)

1. การสร้างเอนไซม์ beta- lactamase ในขนาดสูง ซึ่งเอนไซม์นี้จะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis กับยาทำให้ยาเกิดการสลายตัว

2. การเปลี่ยนความชอบจับกับยาของ penicillin binding protein 2 (PBP 2) ซึ่งเป็น PBP ปกติ ทำให้ความชอบจับกับยากลุ่ม beta- lactam ลดลง และเพิ่มการขับออกของยาที่จับกับ PBP แล้ว

3. การสร้าง MRSA specific Penicillin Binding Protein (PBP2a หรือ PBP2') ซึ่งเป็น PBP ผิดปกติ มีความชอบจับกับยากลุ่ม beta-lactam ต่ำ ซึ่งยีนที่ควบคุมให้มีการสร้าง PBP2a คือ *mec*A gene ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม *mec* DNA บนโครโมโซมของ MRSA

ในการศึกษานี้จะเน้นกลไกการดื้อยาผ่านการสร้าง PBP2a เนื่องจากเป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการดื้อต่อ oxacillin โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า MRSA ที่ดื้อต่อ oxacillin มี *mec*A gene 90-98% (8, 17, 31) จากผลการศึกษานี้พบว่ามี MRSA จำนวน 29 ตัวอย่าง ที่พบ *mec*A gene คิดเป็น 74.36 % ซึ่งคาดว่ากลไกหลักของการดื้อต่อ oxacillin เกิดจากการสร้าง PBP2a ส่วน MRSA ที่ดื้อต่อ oxacillin แต่ไม่พบ *mec*A gene เป็นไปได้ว่าอาจจะเกิดจากกลไกอื่น เช่น การสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ในขนาดสูง หรือทำให้ความชอบจับกับยาของ PBP2 ลดลง หรือเพิ่มการขับออกของยาที่จับกับ PBP แล้วออกไป (15)

จากการศึกษาพบว่า MRSA ที่ดื้อต่อ oxacillin เมื่อทดสอบความไวด้วยวิธี disk diffusion มีการปรากฏของ *mec*A gene 74.36% ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ Murakami K และคณะ(8) และ Byun (31) และคณะที่พบ *mec*A gene ใน MRSA ที่ดื้อต่อ Oxacillin 98.18% และ 96.50% ตามลำดับทั้งนี้อาจเกิดจากจำนวนเชื้อตัวอย่างน้อยเกินไป ทำให้โอกาสที่จะพบ *mec*A gene ใน MRSA น้อยลง หรืออาจเกิดจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผู้ป่วย เช่น จำนวนผู้ป่วยติดเชื้อ หรือเกิดจากลักษณะสายพันธุ์ของ MRSA (32) ซึ่ง MRSA ที่เป็น Heterogeniously resistant(17, 32) จะแสดงออกของการดื้อยา oxacillin เพียง $1/10^{4} - 1/10^{8}$ เท่า (17) เท่านั้น ทำให้การจัดกลุ่มผิด อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจหา *mec*A gene โดยวิธี PCR ใน MRSA แต่ MRSA ที่เป็น Heterogeniously resistant พบว่าเป็น *mec*A gene positive ซึ่ง MRSA ที่เป็น Heterogeniously resistant ที่พบ *mec*A gene นี้ แต่ไม่แสดงออกของการดื้อ oxacillin เรียกว่า Pre-MRSA แต่อย่างไรก็ตาม Pre-MRSA สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการ transcription ของ *mec*A gene เพิ่มขึ้นโดยยากลุ่ม cephalosporin เช่น cefoxim (33) ทำให้เพิ่มการสร้าง PBP2a และทำให้เกิดการดื้อต่อยา oxacillin ได้ในที่สุด ดังนั้นการใช้ disk diffusion ซึ่งมีความจำเพาะต่ำ (80%) (20) อาจทำให้เกิดการจัดกลุ่มผิด ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว นำมาซึ่งการใช้ยาที่ไม่เหมาะสม และอาจเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาภายหลังได้ ทำให้ผู้ป่วยเสียโอกาสที่จะได้ยาที่เหมาะสม

จะเห็นว่าในประเทศไทย จะใช้วิธีทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disk diffusion ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และอาจใช้ร่วมกับวิธี microdilution ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีความจำเพาะต่ำ (20) ไม่สามารถแยก *S. aureus*. ที่ดื้อต่อ oxacillin ในระดับต่ำๆ ได้ (MIC 2- 8 mg/ L) (17, 32) ซึ่งอาจทำให้เกิดการจัดกลุ่มผิดได้ ดังนั้นการใช้วิธี PCR ในการพิสูจน์MRSA จึงเป็นวิธีที่เหมาะสม เนื่องจากสามารถตรวจหา *mec*A gene ซึ่งเป็นยีนสำคัญในการควบคุมให้มีการสร้าง PBP 2a ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการดื้อต่อ oxacillin เนื่องจากวิธี PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และมีความไวสูง แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการนำวิธี PCR ใช้ในทางคลินิก เนื่องจากขั้นตอนมีความยุ่งยาก ไวต่อการปนเปื้อนจาก DNA ภายนอก และมีราคาแพงเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้กันอยู่ อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาวิธีทดสอบความไวที่ง่าย ประหยัด และสามารถแยก สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ oxacillin ในระดับต่ำได้ เช่น ATB Staph หรือ Slidex System MRSA Detection Kit (32)

เอกสารอ้างอิง

1. พรรณทิศ สุวรรณกุล. โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก. ใน: พรรณทิศ สุวรรณกุล, มาธีระพงษ์ ตัณวิเชียร, ศศิธร ลิขิตนุกูล, บรรณาธิการ. Current practice in common infectious disease. กรุงเทพ: สวิชาญ; 2546. หน้า 167-94.
2. พรรณทิพย์ ฉายากุล. โรคติดเชื้อ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*. ใน: นลินี อัศวโภคี, สรภี เทียนกริม, ศศิธร ลิขิตนุกูล, อัษฎา วิภากุล, บรรณาธิการ. ประสบการณ์ด้านโรคติดเชื้อในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง; 2542. หน้า 203-14.
3. พรรณทิพย์ ฉายากุล. สาระสำคัญเกี่ยวกับ Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. ใน: ศศิธร ลิขิตนุกูล, ชิษณุ พันธุ์เจริญ, สถาพร ธิติวิเชียรเลิศ, นลินี อัศวโภคี, ยุพิน ศุพุทธมงคล, บรรณาธิการ. โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก 1. กรุงเทพ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง; 2543. หน้า 134- 55.
4. จุฑามณี สุทธิสังข์, รัชนี เมฆมณี, บรรณาธิการ. เภสัชวิทยา เล่ม2. กรุงเทพ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2540.
5. livermore DM. Antibiotic resistance in Staphylococci. Int J Antimicrob Agents 2000:S3-S10.
6. Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. Analysis of diversity of mutations in the *mec*I gene and *mec*A promoter/ operator region of Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 1998 Mar;42(3):717-20.
7. Brow DF. Detection of methicillin/oxacillin resistance in Staphylococci. J Antimicrob Chemother 2001;48(S1):65-70.
8. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991;29:2240-4.
9. Hiramatsu K, Kihara H, Yokota T. Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction [abstracts]. Microbiol Immunol 1992;36 (5):445-53.
10. Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the *mec*A gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance [abstracts]. J Antimicrob Chemother 1996 Jan;37(1):53-63.
11. สุวณี สุภเวชย์, รูปพรรณ โครงสร้าง และหน้าที่. ใน: สุวณี สุภเวชย์, มาลัย วรจิตร, บรรณาธิการ. แบคทีเรียพื้นฐาน. กรุงเทพ: คณะกรรมการข่ายงานเพื่อพัฒนาและประสานงานในด้านการสอนและการวิจัยในสาขาจุลชีววิทยา ปรสิตวิทยาและอิมมิวโนวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล; 2536. หน้า 1-27.
12. ไพจิตร์ วราชิต. โรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่: คู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพ: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2541.

13. บุษบัน ศิริธัญญาลักษณ์. เคมียา: ยาปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย. เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2544.

14. นงลักษณ์ สุขวาณิชย์. การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย. ใน: อโนชา อุทัยพัฒน์, นงลักษณ์ สุขวาณิชย์, บรรณาธิการ เภสัชวิทยาเล่ม 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิยาลัยมหิดล; 2543. หน้า 10-25.

15. Stapleton PD, Toylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanism and modulation. Science Progress 2002;85(1):57-72.

16. Kurida M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet 2001 Apr 21;357:1225-40.

17. Glimore KS, Glimore MS, Salm DF. Methicillin resistant in Staphylococcus. In: Lewis K, Salyers AA, Taber HW, Wax RG, editors. Bacterial resistance to antimicrobials. New York: Marcel Dekker; 2002. p.331-54.

18. Sugiyama M, Yuasa K, Bhuigan MZ, Iwai Y, Masumi M, Uede K. IS431 *mec*-mediated integration of a bleomycin-resistance gene into the chromosome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Japan. App Microbiol Biotechnol 1996 Mar 30;46:61-6.

19. Derbise A, Dyke KG, Solh NE. Characterization of a *Staphylococcus aureus*. Transposon, Tn5405, Located within Tn5404 and carrying the aminoglycoside resistance gene, *aphA-3* and *aadE*. Plasmid 1996;35:174-88.

20. Henry F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basic and clinical implication. J Clin Microbial 1997 Oct;10(4);78-91.

21. Niemeyer DM, Pucci MJ, Thanassi JA, Sharma VK, Archer GL. Role of *mec*A transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacterial 1996 Jul 17;178(18):5464-71.

22. Castellanos RG, Fernandez GM, Marrero A, Potempa J, Coll M, Gomis-Ruth FX. On the transcriptional regulation of methicillin resistance MecI repressor in complex with its operator. J Biol Chem 2004 Feb 11;279(11):1788-96.

23. Weller TM. The distribution of *mec*A, *mec*R1 and *mec*I and sequence analysis of *mec*I and the *mec* promoter region in Staphylococci expressing resistance to methicillin. JAC 1998 Aug 12;43:15-22.

24. Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM, Archer GL. Interaction of native and mutant *Mec* I pressors with sequences that regulate mec A, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant Staphylococcus .J bacterial 1998 Apr; 180(8): 2160-6.

25. Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. Analysis of diversity of mutations in the *mec* I gene and *mec* A promoter/ operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 1998 Mar; 48(3): 717-20.

26. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอมแอลพี. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545.
27. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545.
28. Barry AL. Antistaphylococcal activity of oxacillin and ticarcillin when combined with clavulonic acid evaluation of oxacillin resistant and oxacillin-susceptible isolates [abstact]. 2002 Nov 13.
29. Jeong J, Chang CL, Park TS, Lee SH, Jeong SH. Early screening of oxacillin-resistant *Staphylococcus arreus* and *Staphylococcus epidermidis* from blood culture [abstract]. J Korean Med Sci 2002 Apr; 17(2); 168.
30. Kobayashi N, Taniguchi K, Kojima K, Urasama S, Uchara N, Omizu Y,et al. Genomic diversity of *mec* regulator gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphyloccus epidermidis*. Epidemiol Infect 1996; 117:289-95.
31. Byun DE, Kim SH, Shin JG, Pulh SP,Ryang DM. Molecular epidemiologic analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimen. JKMS 1997;12:190-8.
32. Petinaki E, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Pournaras S, Hatzi F, Kontos F, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the hospitals of central Greece. Int J Antimicrob Agents 2001 Jan 5;18: 61-5.
33. Kuwahara-arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-swzuki E, Hiramatsu K. Suppression of methicillin-resistance in a *mec* A –containing pre-methicillin-resistant Staphylococcus strain is caused by the *mec* I-mediated repression of PBP 2' production. J Antimicrob Chemother 1996;40(12):2680-5.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

1. TE BUFFER pH 8

   0.7 mM Tris-HCl pH 8

   0.75 mM EDTA pH 8

   ปรับ pH ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH

2. 10% Sodium Dodezyl Sulfate

Sodium Dodezyl Sulfate	10	g
Sterile water	100	ml

3. 70% Ethanol

90% Ethanol	77.78	ml
Sterile water	22.22	ml

4. TBE BUFFER (1X)

TBE powder	17	g
Sterile water	1000	ml

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth)

Nutrient for microbiology	8	g
Sterile water	1000	ml

6. Nutrient agar plate

Nutrient agar	20	g
Sterile water	1000	ml

7. 1.2% Agarose Gel

Agarose gel	1.2	g
TBE 1X buffer	100	ml
Ethidium bromide (0.5 µg/ ml)	5	µl (stock solution 10 µg/ µl)

ภาคผนวก ข

การเตรียม PCR mixture , PCR products สำหรับใช้วิเคราะห์ขนาด DNA ด้วย gel electrophoresis

1. การเตรียม 4 mM dNTPs 50 ml

100 mM dATP	2 µl	+ dd H_2O 42 µl
100 mM dGTP	2 µl	
100 mM dCTP	2 µl	
100 mM dTTP	2 µl	

2. การเตรียม 5 µM Mec A01 primer; 5 µM Mec A02 primer

100 µM Mec A01 primer 2 µl + dd H_2O 38 µl

100 µM Mec A02 primer 2 µl + dd H_2O 38 µl

3. การเตรียม DNA marker

ddH_2O	8 µl
DNA marker	2 µl
Loading dye	2 µl

4. การเตรียม PCR product

PCR product	20 µl
Laoding dye	4 µl

ภาคผนวก ค

การคำนวณขนาดของ *mec*A gene PCR products และ การคำนวณ Tm

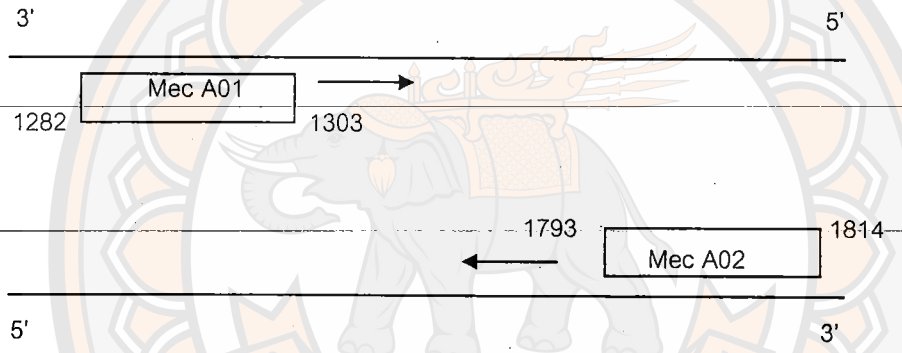
1. การคำนวณขนาดของ *mec* A gene PCR products

คำนวณได้จากไพรเมอร์ที่ใช้ ดังนี้

- Mec A01 primer: 5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3' มีทั้งหมด 22 เบส โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง1282 ถึง 1303

- Mec A02 primer: 5'AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3' มีทั้งหมด 22 เบส โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 1793 ถึง1814

ดังนั้น เมื่อเกิดการสังเคราะห์สายดีเอนเอต่อจากไพรเมอร์ในทิศทางของสายดีเอนเอสายเดิมจาก 3' ไปหา 5' ในแต่ละสาย จะทำให้ได้เบสในดีเอนเอสายใหม่ที่มีขนาดนิวคลีโอไทด์เป็น 533 คู่เบส



2. การคำนวณ Tm

$$Tm = 4 X (G + C) + 2 X (A + T)$$

Mec A01 primer: 5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3'

$Tm = 4 X (G + C) + 2 X (A + T) = 4 X (7 + 2) + 2(8 + 5) = 62 ^{\circ} C$

Annealing temperature = $62 ^{\circ} C - 5 ^{\circ} C = 57 ^{\circ} C$

Mec A02 primer: 5'AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3'

$Tm = 4 X (G + C) + 2 X (A + T) = 4 X (6 + 5) + 2(4 + 7) = 66 ^{\circ} C$

Annealing temperature = $66 ^{\circ} C - 5 ^{\circ} C = 61 ^{\circ} C$