ความชุกและความไวต่อยาต้านจุลชีพของสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส ที่แยกได้จากโพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดพัทลุง

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

ชัยสิทธิ์ นิยะสม*, จันทร์ฉาย กฤษณะทรัพย์, ปาริชาติ คงศรีทอง และ นูรอัยนี ดาโอ๊ะ

Chaisit Niyasom*, Janchai Kritsanasup, Parichat Kongsritong and Nooraainee Daoh

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างจากโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนจำนวน 90 คน จากโรงเรียนอนุบาล 3 แห่งในจังหวัดพัทลุง เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อสแตฟฟิโลคอคคัสออเรียส โดยเพาะเชื้อบน Mannitol Salt Egg Yolk Agar พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา พบเชื้อที่โพรงจมูกจำนวน 47 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 52.22 เชื้อที่พบในโพรงจมูกเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อเมธิซิลลิน (MSSA) 44 ตัวอย่าง และดื้อต่อเมธิซิลลิน (MRSA) 3 ตัวอย่าง ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทตรวจพบยีน *mecA* และ *nuc* โดยมีค่า MIC ต่อยา oxacillin เท่ากับ 16 32 และ 256 µg/ml ตามลำดับ MRSA ที่พบดื้อต่อยาเพนนิซิลลิน ออกซาซิลลิน เซโฟซิติน อีริโธรมัยซิน และเตตร้าซัยคลิน จากการตรวจหาชนิดของ SCC*mec* ใน MRSA พบว่าเป็น SCC*mec* ชนิดที่ 3 จำนวน 2 ไอโซเลท (R24 และ S13) และ SCC*mec* เป็นทั้งชนิดที่ 2 และ 3 จำนวน 1 ไอโซเลท (R9) เป็นที่น่าสนใจเมื่อพบว่ามี 1 ไอโซเลทที่ตรวจพบยีน *pvl* การพบ MRSA ในโพรงจมูกของกลุ่มตัวอย่างเด็กก่อนวัยเรียนแสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของเชื้อในชุมชนและจำเป็นที่ต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อนี้ในชุมชนต่อไป

คำสำคัญ : สแตฟฟิโลคอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลิน / ความชุก / ความไวต่อยาต้านจุลชีพ / ชนิดของ SCC*mec*

Abstract

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

Keywords : methicillin-resistant *S. aureus* / prevalence / antimicrobial susceptibility / SCC*mec* Type

***Corresponding author.** E-mail: nchaisit@yahoo.com Tel. 086-6402-9830

1. บทนำ

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

2. วิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่าง

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

2.2 การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *S. aureus*

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

2.3 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disk diffusion

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

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

ทำการเจือจางยา Oxacillin ในอาหารเหลว MHB แล้วเตรียมเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 (10^8 cfu/ml) จากนั้นเจือจาง 1:100 (10^6 cfu/ml) แล้วเติมใส่ในหลุมสารละลายยา Oxacillin ที่เจือจางหลุมละ 50 µl ($5x10^4$ cells/well) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC

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

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

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

3. ผลและอภิปราย

3.1 การแยก *S. aureus* จากตัวอย่างในโพรงจมูก

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

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในโพรงจมูกแยกตามโรงเรียน

โรงเรียนอนุบาล (จำนวนตัวอย่าง)	**จำนวน *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่าง**	
	MSSA	MRSA
เรวดีศึกษา (30)	18	2
สุวรรณภักดี (30)	9	1
ป่าพะยอม (30)	17	0
รวม (90)	**44**	**3**

3.2 แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ (antibiogram)

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

ตารางที่ 2 แสดงแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากโพรงจมูก

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

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

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

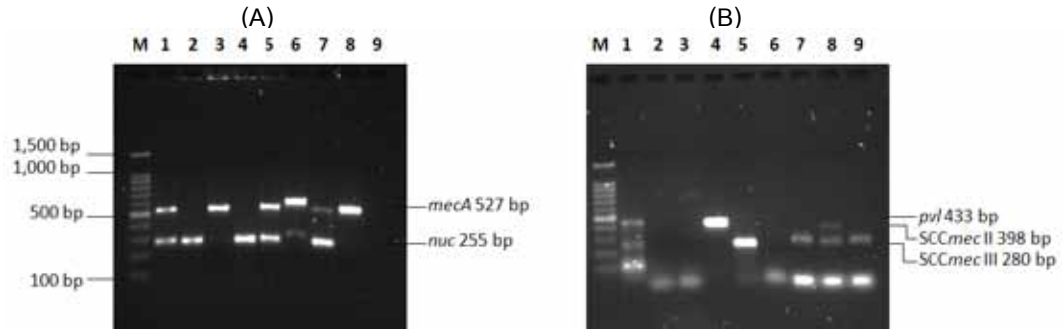
จากผลการทดลองหาค่า MIC ของยา Oxacillin ต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ MRSA R9, R24 และ S13 พบว่า ค่า MIC ของยา Oxacillin ต่อเชื้อ มีค่าเท่ากับ16, 32 และ 256 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทจัดเป็น MRSA ที่แท้จริง (true MRSA) เนื่องจากมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 4 µg/ml

3.4 การตรวจยีน *nuc*, *mecA*, *pvl* และการตรวจหาชนิดของ SCC*mec* ในเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากโพรงจมูกด้วยเทคนิค PCR

จากการศึกษาในระดับพันธุกรรม พบว่า MRSA ทั้ง 3 ไอโซเลทที่พบ มียีน *mecA* และ *nuc* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไอโซเลทที่พบเป็น MRSA ที่แท้จริง (ภาพที่ 1A) จากการตรวจหายีน *pvl* และการตรวจหาชนิดของ SCC*mec* ด้วยวิธี PCR ใน MRSA ดังกล่าว โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ MRSA ANT04 (*pvl*$^{+}$) เป็น positive control และสายพันธุ์ MSSA ANT01 (*pvl*$^{-}$) เป็น negative control ผลการทดลองพบว่า MRSA S13 และ MRSA R24 ให้ผล *pvl* เป็นลบ แต่ MRSA R9 ให้ผล *pvl* เป็นบวก (ภาพที่ 1B) ส่วนการตรวจหาชนิดของ SCC*mec* ใช้เชื้อสายพันธุ์ MRSA ANT02 (SCC*mec* Type III) เป็น positive control และสายพันธุ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

MSSA ANT01 (ไม่มี SCC*mec*) เป็น negative control พบว่า MRSA S13 และ MRSA R24 มี SCC*mec* เป็นชนิด SCC*mec* Type III ส่วน MRSA R9 พบทั้งชนิด SCC*mec* Type II และ III (ภาพที่ 1B)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจหายีน *mecA nuc pvl* และการตรวจสอบชนิดของ SCC*mec* ด้วยวิธี PCR
(A) M, 100 bp DNA Marker; 1, MRSA TSU02 (*nuc*$^{+}$, *mecA*$^{+}$); 2, MSSA ANT01 (*nuc*$^{+}$); 3, Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci (MRCoNS) ANT01 (*mecA*$^{+}$); 4, MSSA R27; 5, MRSA S13; 6, MRSA R24; 7, MRSA R9; 8, MRCoNS R29; และ 9, Blank control
(B) M, 100 bp DNA Marker; 1, MRSA ANT04 (*pvl*$^{+}$); 2, MSSA ANT01 (*pvl*$^{-}$); 3, MRSA S13; 4, MRSA R9; 5, MRSA ANT02 (SCC*mec* Type III); 6, MSSA ANT01 (ไม่มี SCC*mec*); 7, MRSA S13; 8, MRSA R9; และ 9, MRSA R24

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

สถานพยาบาลทั่วโลก ซึ่งแตกต่างจากการติดเชื้อ MRSA ในชุมชน ที่เกิดจาก CA-MRSA โดยการติดเชื้อชนิดหลังนี้พบในคนที่มีสุขภาพแข็งแรงปกติ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่สายพันธุ์ CA-MRSA มีความรุนแรงกว่าและสามารถติดต่อได้ง่ายกว่าสายพันธุ์ HA-MRSA ถึงแม้ว่าเชื้อ CA-MRSA ยังไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย แต่ในยุคของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และ/หรือโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำ CA-MRSA อาจเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อชนิดใหม่สำหรับประเทศไทยก็ได้ถ้าไม่มีการเฝ้าระวังและป้องกันที่ดีพอ

4. บทสรุป

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

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงเรียนอนุบาลป่าพะยอม โรงเรียนอนุบาลเวดีศึกษา และโรงเรียนอนุบาลสุวรรณภักดี จังหวัดพัทลุง ที่กรุณาให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่สนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน

6. เอกสารอ้างอิง

ภัทรชัย กีรติสิน. (2551). ตำราแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์. (พิมพ์ครั้งที่ 2). มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, รุ่งฤทัย ทองแสง, สกลฐกฤษณ์ โพธิขำ และฮาซีซ๊ะ ลาโห๊ะยา. (2549). การตรวจหาเชื้อแสตบฟิลโลคอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินในหอพักนักศึกษามหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์จังหวัดนครศรีธรรมราช. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์-การแพทย์, 20*(2), 129-142.

ยีสมานี เจ๊ะหะ และ ชัยสิทธิ์ นิยะสม. (2555). ความชุกและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อสแตฟฟิโล-คอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินซึ่งแยกได้จากโพรงจมูกของนิสิตมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*, *15*(3), 24-32.

สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์. (2554). วิทยาการระบาดของการติดเชื้อ Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* ที่เกิดจากชุมชน. *ธรรมศาสตร์เวชสาร, 11*(1), 62-73.

DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N. and Chambers, H.F. (2010). Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet, 375*(9725), 1557-1568.

Dhiraputra, C., Pongpech, P., Rimpranee, S., and Danchaivijitr, S. (1996). Methicillin-resistnat *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) carriers among Thai patients and medical personnel. *Journal of Infectious Disease and Antimicrobial Agents, 13*(3), 101-106.

Kitti, T., Boonyonying, K., and Sitthisak, S. (2011). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among university students in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 42*(6), 1498-1504.

Mainous, A.G., Hueston, W.J., Everett, C.J., and Diaz, V.A. (2006). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *Annual of Family Medicine, 4*(2), 132-137.

Nor Shamudin, M., Sekawi Z., van Belcom A., and Needla, V. (2008). First community-acquired *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *Journal of Medical Microbiology, 57*(9), 1180-1181.

Ramana, K.V., Mohanty, S.K., and Wilson , C.G. (2009). *Staphylococcus aureus* Colonization of Anterior Nares of School Going Children. *Indian Journal of Pediatrics, 76*(8), 813-816.

Poulsen, A.B., Skov, R. and Pallesen, L.V. (2003). Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51*, 419-421.

McClure, J.A., Conly, J. M., Lau, V., Elsayed, S., Louie, T., Hutchins, W., et al. (2006). Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology, 44*(3), 1141-1144.

Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Louie T. and Conly, J.M. (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology, 43*(10), 5026-5033.