

การสร้างไบโอฟิล์ม และ Adhesin Genes ใน *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากชุมชน และ  
โรงพยาบาลในจังหวัดพัทลุง

Biofilm Formation and Adhesin Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from  
Community and Hospital Settings in Phatthalung Province, Thailand

นุรายณี ดาโอะ<sup>1</sup> มณฑล เลิศวรปรีชา<sup>2</sup> และชัยสิทธิ์ นียะสม<sup>2\*</sup>  
Nurainee Daod<sup>1</sup>, Monthon Lertworapreecha<sup>2</sup> and Chaisit Niyasom<sup>2\*</sup>

บทคัดย่อ

การสร้างไบโอฟิล์ม และโปรตีนที่ผิวเซลล์เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในการศึกษาี้ ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม และตรวจสอบยีน *icaAD*, *fnbA* และ *cna* ใน MSSA 21 ไอโซเลทและ MRSA 14 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จาก ชุมชนและโรงพยาบาลในจังหวัดพัทลุง พบว่าตรวจพบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจำนวน 30 ไอโซเลท (85.71%) และ 32 ไอโซเลท (91.43%) เมื่อตรวจด้วยวิธี congo red agar (CRA) และ microtiter plate (MTP) ตามลำดับ ทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน 31 ไอโซเลท (88.57%) ยีน *icaAD* ตรวจพบใน *S. aureus* 28 ไอโซเลท (80%) พบความไม่สอดคล้องกันในเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลท (11.43%) และ 4 ไอโซเลท (11.43%) ที่ตรวจไม่พบยีน *icaAD* แต่ให้ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTP และ CRA ตามลำดับ มีเพียง 15 ไอโซเลท (42.86%) ที่ตรวจพบยีน *cna* ตรงกันข้ามกับ *fnbA* ซึ่งพบในเกือบทุกไอโซเลทของ *S. aureus* ยีน *icaAD* และ *fnbA* พบได้ในเกือบทุกไอโซเลทของเชื้อที่ทดสอบ ซึ่งให้เห็นว่ามีการกระจายของยีนชนิดนี้ในระดับที่สูง และยีนเหล่านี้ มีการแพร่กระจายอย่างใกล้เคียงกันในกลุ่มของ MRSA และ MSSA ท้ายที่สุดไม่พบความแตกต่างของการกระจายตัวของยีน Adhesin ระหว่างสายพันธุ์ที่แยกได้จากชุมชนและโรงพยาบาล

**คำสำคัญ:** MRSA ความไวต่อยาต้านจุลชีพ ไบโอฟิล์ม ยีน Adhesin

Abstract

Biofilm formation and surface proteins are associated with *Staphylococcus aureus* pathogenesis. This study, 21 MSSA and 14 MRSA isolates from community and hospital settings in Phatthalung were determined for biofilm production and the presence of *icaAD*, *fnbA* and *cna* genes. Biofilm was detected in 30 (85.71%) and 32 (91.43%) isolates by congo red agar (CRA) and microtiter plate (MTP), respectively. Both methods correlated in 31 (88.57%) isolates. The *icaAD* gene was detected in 28 (80%) isolates. Unexpectedly, 4 (11.43%) and 4 (11.43%) isolates were *icaAD* negative while MTP and CRA positive, respectively. Only 15 (42.86%) strains were found to be *cna* positive. Conversely, the *fnbA* gene was present in almost of isolates. *icaAD* and *fnbA* were found to be present in almost of isolates tested indicating a high prevalence, and these genes were equally distributed among MSSA and MRSA. Finally, there was no difference in adhesin genes distribution among community and clinical strains.

**Keywords:** MRSA, Sensitivity, Biofilm, Adhesin Gene

<sup>1</sup> นิสิตปริญญาโท สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

<sup>2</sup> อ.ดร., หน่วยงานการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

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

## บทนำ

*Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวก ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ก่อโรคติดเชื้อสำคัญทั้งกับผู้ป่วยในชุมชนและในโรงพยาบาล ทำให้เกิดโรคตั้งแต่การติดเชื้อที่ผิวหนัง อาหารเป็นพิษ กลุ่มอาการช็อกจากสารพิษ ปอดอักเสบ ไปจนถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) นอกจากนี้ยังพบเป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ในช่องจมูก ลำคอ และผิวหนังของมนุษย์ *S. aureus* ที่ไวต่อยา Penicillin เรียกว่า Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) สำหรับ *S. aureus* ตื้อต่อยา Penicillin เรียกว่า Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) โดยมีการสร้าง Penicillin-Binding Protein (PBP) 2a ที่มีคุณสมบัติจับกับยาในกลุ่มเบต้าแลคแตมได้ไม่ดี ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ซึ่งควบคุมโดยยีน *mecA* พบอยู่ที่ mobile genetic element ที่เรียกว่า Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) ขนาด 21-67 kb *S. aureus* พบได้ในโพรงจมูกของคนปกติประมาณร้อยละ 20-35 การพบเชื้อในโพรงจมูกมีความสัมพันธ์กับโอกาสในการก่อโรคของเชื้อ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของการแพร่เชื้ออีกด้วย [1] *S. aureus* อาศัยโมเลกุลโปรตีนผิวเซลล์ (surface protein) ชนิดต่าง ๆ เพื่อเกาะติดกับเนื้อเยื่อ ได้แก่ Fibronectin-binding protein (FnB), Fibrinogen binding protein (ClfA และ ClfB) และ Collagen-binding protein (Cna) เป็นต้น [2] นอกจากนี้ *S. aureus* ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันและมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ [3] และทำให้เชื้อสามารถยึดเกาะกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ กลไกการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มกลไกหนึ่งของ *S. aureus* พบว่ามีการควบคุมผ่าน *ica* locus (*icaADBC*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มที่มีองค์ประกอบเป็น Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) หรือ Polymeric N-acetyl-Glucosamine (PNAG) [4] ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและความชุกของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนผิวเซลล์ (Adhesins) ได้แก่ *cna*, *fnbA* และ *icaAD* ใน *S. aureus* ที่แยกได้จากชุมชน และโรงพยาบาลในจังหวัดพัทลุง นอกจากนี้ยังศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเชิงวิทยาการระบาดของเชื้อในจังหวัดพัทลุง นำไปสู่แนวทางในการเฝ้าระวังของเชื้อต่อไป

## วิธีการวิจัย

### 1. ตัวอย่าง *S. aureus* การพิสูจน์ยืนยัน และการจัดจำแนก

ตัวอย่าง *S. aureus* ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากโพรงจมูกนิสิตมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จำนวน 6 ไอโซเลท [5] โพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียนจำนวน 9 ไอโซเลท [6] และ *S. aureus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เช่น เสมหะ หนอง และเลือดจากโรงพยาบาลพัทลุง จำนวน 16 ไอโซเลท และจากโรงพยาบาลอานันทมหิดลจำนวน 4 ไอโซเลท แล้วนำมาพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อโดยการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา และจัดจำแนก *S. aureus* สายพันธุ์ MSSA และ MRSA ด้วยการทดสอบความไวต่อยา oxacillin และ cefoxitin ด้วยวิธี Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility แล้วยืนยันด้วยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวโมเลกุล โดยการตรวจหายีน *nuc* ซึ่งจำเพาะต่อ *S. aureus* และ *mecA* ซึ่งจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่ตื้อต่อ methicillin ด้วยวิธี PCR [7] รายละเอียดของเชื้อในการศึกษาค้นคว้านี้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่าง *S. aureus* ที่ใช้ในการวิจัย

กลุ่ม	ตัวอย่าง (จำนวนตัวอย่าง)	จำนวน <i>S. aureus</i> ที่แยกได้จากตัวอย่าง	
		MSSA (%)	MRSA (%)
ชุมชน	นิสิต ม.ทักษิณวิทยาเขตพัทลุง (6)	5	1
	เด็กก่อนวัยเรียน (9)	6	3
โรงพยาบาล	โรงพยาบาลพัทลุง (16)	10	6
	โรงพยาบาลอานันทมหิดล (4)	-	4
รวม		21	14

2. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* ด้วยวิธี Disk diffusion และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยา oxacillin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี Broth microdilution

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* ด้วยวิธี Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility โดยทดสอบกับยาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ penicillin, cephalothin, gentamicin, erythromycin, sulphamethoxazole, tetracycline, amoxycillin-clavulanic acid, cefoxitin, clindamycin, nitrofurantoin, bacitracin, novobiocin, chloramphenicol, fosfomycin, teicoplanin และ vancomycin และหาค่า MIC ของยา oxacillin ในอาหารเหลว MHB โดยเตรียมสารละลายยาให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 - 1,024 µg/ml แล้วทดสอบสารละลายยาปริมาตร 50 µl ของแต่ละความเข้มข้นใส่ใน 96-well microtiter plate จากนั้นเตรียมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 เจือจางเชื้อ 1:100 แล้วเติมใส่ในหลุมสารละลายยา oxacillin หลุมละ 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC [8]

3. ทดสอบการสร้าง ไบโอฟิล์ม (Biofilm formation)

ทดสอบความสามารถการสร้างไบโอฟิล์ม บนอาหาร Congo Red Agar (CRA)

ฉีดเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร Congo Red Agar (CRA) (Brain-heart infusion 50 กรัม/ลิตร sucrose 36 g/l congo red 0.8 g/l และ agar 15 g/l) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี หากมีการสร้างไบโอฟิล์ม โคโลนีจะมีสีดำ และหากไม่มีการสร้างไบโอฟิล์มโคโลนีจะมีสีแดง [9-10]

ทดสอบความสามารถการสร้างไบโอฟิล์มด้วยวิธี Microtiter (MTP) plate assay

นำเชื้อ *S. aureus* มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง 1:100 ในอาหาร TSB ที่มี 2% กลูโคส ดูดเชื้อปริมาตร 200 µl ใส่ใน 96-well microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างด้วย phosphate buffered saline 2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง เติม 1% crystal violet ปริมาตร 200 µl ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเทสี crystal violet ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง แล้วเติม 95% ethanol ปริมาตร 200 µl วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (OD 570) ถ้าค่า OD<sub>570</sub> ≥ 1 หมายถึงมีการสร้างไบโอฟิล์มระดับสูง ค่า 0.1 ≤ OD<sub>570</sub> < 1 มีการสร้างไบโอฟิล์มระดับปานกลาง และ ค่า OD<sub>570</sub> < 0.1 แสดงว่าไม่มีการสร้างไบโอฟิล์ม [11]

#### 4. การตรวจยีน Adhesin (*cna*, *fnbA* และ *icaAD*) โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

สกัด DNA ของ *S. aureus* ด้วยวิธี CTAB phenol-chloroform extraction โดยใช้ Lysostaphin ความเข้มข้น 0.2 mg/ml เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบ โดยใช้ primer ดังตารางที่ 1 สำหรับปฏิกิริยา PCR ของยีน *cna* และ *fnbA* ทำตามวิธีของ Arciola และคณะ [13] ส่วนยีน *icaAD* ทำตามวิธีของ Nasr และคณะ [14] จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปแยกด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วเทียบผลผลิตผลกับ DNA มาตรฐาน และบันทึกภาพ

ตารางที่ 2 Primers ที่ใช้ในการวิจัย

Genes	Primers	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Products (bp)	References
<i>mecA</i>	<i>mecup1</i>	GGGATCATAGCGTCATTATTC	527	[7]
	<i>mecup2</i>	AACGATTGTGACACGATAGCC		
<i>nuc</i>	<i>nuc-1</i>	TCAGCAAATGCATCACAACAG	255	[7]
	<i>nuc-2</i>	CGTAAATGCACTTGCTTCAGG		
<i>icaAD</i>	<i>icaAD-F</i>	TATTCAATTTACAGTCGCAC	407	[12]
	<i>icaAD-R</i>	GATTCTCTCCCTCTCTGCCA		
<i>fnbA</i>	<i>fnbA-F</i>	GATACAAACCCAGGTGGTGG	191	[11]
	<i>fnbA-R</i>	TGTGCTTGACCATGCTCTTC		
<i>cna</i>	<i>cna-F</i>	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA	192	[13]
	<i>cna-R</i>	AGTGCCTTCCCAAACCTTTT		

#### ผลการวิจัย

##### ความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ของ *S. aureus* และค่า MIC ของ oxacillin ต่อ MRSA

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลทด้วยวิธี disk diffusion ต่อยาปฏิชีวนะทั้งหมด 15 ชนิด พบว่า MSSA ที่แยกได้จากชุมชนคือต่อยา penicillin, erythromycin, nitrofurantoin, novobiocin และ chloramphenicol ส่วน MRSA ที่แยกได้จากชุมชนคือต่อยา penicillin, erythromycin, tetracycline, bacitracin, novobiocin และ clindamycin MSSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาลคือต่อยา penicillin และ tetracycline ส่วน MRSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาลคือต่อยา penicillin, cephalothin, gentamicin, erythromycin, sulphamethoxazole, tetracycline, amoxicillin clavulanic acid, chloramphenicol, fosfomycin และ clindamycin (ตารางที่ 3) ค่า MIC ของยา oxacillin ต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากชุมชนจำนวน 4 ไอโซเลท มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 32-256 µg/ml และ MRSA จากโรงพยาบาลจำนวน 10 ไอโซเลท มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 64 - ≥ 512 µg/ml ซึ่ง MRSA ทั้ง 14 ไอโซเลท จัดเป็น MRSA ที่แท้จริง (true MRSA) เนื่องจากมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 4 µg/ml

**ตารางที่ 3** ความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *S. aureus* ที่แยกได้จากชุมชนและโรงพยาบาล

ตัวอย่าง	S. aureus (จำนวน)	% Sensitivity														
		P	KF	GEN	E	SXT	TE	AMC	NIT	B	NV	C	FOS	TEC	VA	DA
ชุมชน	MSSA(11)	9.10	100	100	63.64	90.91	100	100	72.73	100	81.82	81.82	100	100	100	100
	MRSA(4)	0	100	100	0	100	25	100	100	75	50	100	100	100	100	0
<b>รวม</b>	<b>15</b>	<b>6.67</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>46.67</b>	<b>93.33</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>93.33</b>	<b>73.33</b>	<b>86.67</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>73.33</b>
ร.พ	MSSA(10)	0	100	100	100	90	70	90	100	90	90	100	90	100	100	100
	MRSA(10)	0	20	0	0	50	60	40	100	100	100	90	80	100	100	0
<b>รวม</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>60</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>65</b>	<b>65</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	<b>95</b>	<b>95</b>	<b>85</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>50</b>

P, penicillin; KF, cephalocithin; GEN, gentamicin; E, erythromycin; SXT, sulphamethoxazole; TE, tetracycline; AMC, amoxycillin clavulanic acid; OX, oxacillin; CX, ceftioxin; NIT nitrofurantoin; B, bacitracin; NV, novobiocin; C, chloramphenicol; FOS, fosfomycin; TEC, teicoplanin; VA, vancomycin และ DA, clindamycin

### การสร้าง ไบโอฟิล์ม (Biofilm Formation)

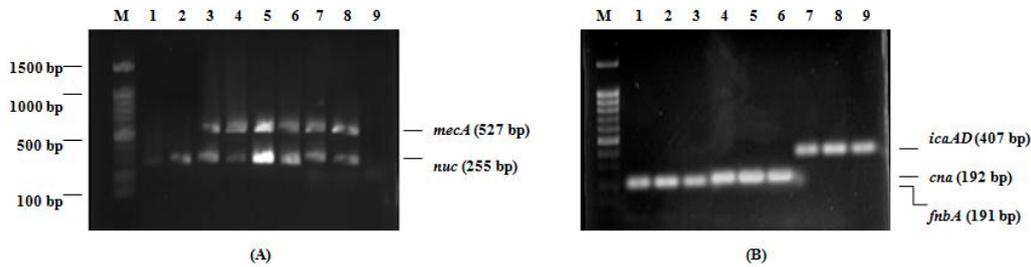
การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลตด้วยวิธี CRA และ MTP พบว่า เชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มจำนวน 30 และ 32 ไอโซเลต คิดเป็น 85.71% และ 91.43% ตามลำดับ ไม่พบการสร้างไบโอฟิล์มจำนวน 5 และ 3 ไอโซเลตคิดเป็น 14.28% และ 8.57% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับยีนการตรวจหายีน *icaAD* ด้วยวิธี PCR พบว่าวิธี CRA มีค่า Sensitivity และ Specificity เท่ากับ 89.65% และ 33.33% ตามลำดับ และวิธี MTP ค่า Sensitivity และ Specificity เท่ากับ 96.55% และ 33.33% ตามลำดับ

**ตารางที่ 4** ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบยีน *icaAD* และความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus*

Congo red agar	<i>icaAD</i>		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	positive	negative		
positive	26	4	89.65	33.33
negative	3	2		
<b>Microtiter plate</b>				
positive	28	4	96.55	33.33
negative	1	2		

### การตรวจยีน Adhesin ได้แก่ *cna*, *fnbA*, *icaAD* โดยเทคนิค PCR

MRSA ในการวิจัยนี้ทั้งหมด 14 ไอโซเลต พบยีน *mecA* และ *nuc* ซึ่งให้เห็นว่าไอโซเลตเหล่านี้เป็น MRSA ที่แท้จริง (ภาพที่ 1A) และจากการตรวจหายีน Adhesins ได้แก่ *icaAD*, *fnbA* และ *cna* ใน *S. aureus* ทั้งหมด 35 ไอโซเลตพบว่าสามารถตรวจพบยีน *icaAD* มากที่สุด โดยพบจำนวน 28 (80%) ไอโซเลต รองลงมาเป็น *fnbA* จำนวน 27 (77.14%) และ *cna* จำนวน 15 (42.86%) ไอโซเลต ตามลำดับ (ภาพที่ 1B และตารางที่ 5)



ภาพที่ 1 ตัวอย่างแสดงการตรวจหายีน *mecA*, *nuc*, *cna*, *fnbA* และ *icaAD* ด้วยวิธี PCR

(A) M, 100 bp DNA Marker; 1, HP1 (*nuc*<sup>+</sup>); 2, HP2 (*nuc*<sup>+</sup>); 3, HP18 (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>); 4, HP31 (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>); 5, AND02 (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>); 6, MRSA2 (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>); 7, R24/2 (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>); 8, S13/2 (*nuc*<sup>+</sup>, *mecA*<sup>+</sup>); 9, Blank, (B) M, 100 bp DNA Marker; 1, HP1 (*cna*<sup>+</sup>); 2, HP2 (*cna*<sup>+</sup>); 3, R24/2 (*cna*<sup>+</sup>); 4, HP1 (*fnbA*<sup>+</sup>); 5, HP2 (*fnbA*<sup>+</sup>); 6, R24/2(*fnbA*<sup>+</sup>); 7, HP1 (*icaAD*<sup>+</sup>); 8, HP2 (*icaAD*<sup>+</sup>); 9, R24/2 (*icaAD*<sup>+</sup>)

ตารางที่ 5 การตรวจพบยีน Adhesins (*icaAD*, *fnbA* และ *cna*) ใน *S. aureus* ที่แยกได้จากชุมชนและโรงพยาบาล

กลุ่ม	<i>S. aureus</i> (จำนวน)	<i>icaAD</i> (%)	<i>fnbA</i> (%)	<i>cna</i> (%)
ชุมชน n=15	MSSA (11)	9 (81.81)	9 (81.81)	6 (54.54)
	MRSA (4)	3 (75)	3 (75)	2 (50)
โรงพยาบาล n=20	MSSA (10)	9 (90)	8 (80)	6 (60)
	MRSA (10)	7 (70)	7 (70)	1 (10)

### อภิปรายผลการวิจัย

*S. aureus* พบได้ในโพรงจมูกของคนปกติประมาณร้อยละ 15-35 [1] ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ไม่นานมานี้มีรายงานการพบ MRSA จากตัวอย่างโพรงจมูกของนิสิตมหาวิทยาลัยนเรศวร [15] และนิสิตมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง [5] รวมทั้งการพบในโพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดเชียงราย [16] และพัทลุง [6] แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่หรือการแพร่กระจายของ MRSA ในชุมชน จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า MRSA ที่คัดแยกได้จากชุมชนจำนวน 4 ไอโซเลท ต่อยา penicillin, erythromycin, tetracycline, bacitracin, novobiocin และ clindamycin แต่ก็ยังไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบหลายชนิด ในขณะที่ MRSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาลส่วนมากจะต่อยาเกือบทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ยกเว้น teicoplanin และ vancomycin ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่พบว่า MRSA ที่แยกได้จากชุมชน มีการต่อยาปฏิชีวนะน้อยกว่า MRSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาล [17] MRSA ในการทดลองนี้มีการพิสูจน์ยืนยันว่าเป็น MRSA ที่แท้จริง โดยมีค่า MIC ต่อยา oxacillin อยู่ระหว่าง 32 – ≥ 512 µg/ml นอกจากนี้ยังพบยีน *nuc* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะต่อ *S. aureus* และยีน *mecA* ซึ่งจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่มีการต่อยา methicillin รายงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม และความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างไบโอฟิล์มกับการตรวจพบยีน *icaAD* ซึ่งความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มช่วยให้แบคทีเรียสามารถหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อ ดังนั้นวิธีที่ใช้ในการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มที่น่าเชื่อถือจึงมีความจำเป็น MTP เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งมีรายงานว่า เป็นวิธีที่มีความไว และความถูกต้องแม่นยำ และยังเป็นวิธีที่สามารถหาปริมาณของไบโอฟิล์มได้อีกด้วย จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงพยาบาลเป็นสายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม จำนวน 18 (90%) ไอโซเลทในจำนวนนี้สร้างไบโอฟิล์มระดับสูงจำนวน 4 (20%) ไอโซเลท ระดับปานกลางจำนวน 14 (70%) ไอโซเลท และไม่สร้างไบโอฟิล์มจำนวน 2 (10%) ไอโซเลท ซึ่งแตกต่าง

กับการศึกษาของ Mathur และคณะ [18] ที่พบว่า *S. aureus* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลมีการสร้างไบโอฟิล์มเพียง 57.8% และจากการศึกษา *S. aureus* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ที่พบว่ามีเพียง 44.4% เท่านั้นที่สร้างไบโอฟิล์ม [19] นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนจากสายพันธุ์ที่แยกได้จากชุมชน จากการทดลองพบว่า *S. aureus* ที่แยกได้จากชุมชนเป็นสายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มจำนวน 14 (93.33%) ไอโซเลทไม่สร้างไบโอฟิล์มจำนวน 1 (6.67%) ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tangchaisuriya และคณะ [16] ที่พบว่า *S. aureus* ที่แยกได้จากโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนมีการสร้างและไม่สร้างไบโอฟิล์ม มีจำนวน 94.87% และ 5.13% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีที่ใช้ในการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง CRA และ MTP ซึ่งให้ผลการตรวจสอบสอดคล้องกันถึง 31 (88.6%) จากทั้งหมด 35 ไอโซเลทซึ่งการตรวจด้วย CRA มีข้อดีคือทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากเหมือนกับวิธี MTP แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถวัดปริมาณของไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างได้ นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี CRA และ MTP เมื่อเทียบกับการตรวจพบ *icaAD* ซึ่งเป็นยีนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อนี้ มีค่า Sensitivity เท่ากับ 89.65% และ 96.55% ตามลำดับ และให้ค่า Specificity เท่ากับ 33.33% และ 33.33% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของ Nasr และคณะ [14] ที่รายงานว่าการสร้างไบโอฟิล์มของวิธี CRA และ MTP ค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าเท่ากับ 31.25 และ 50% ตามลำดับ การสร้างไบโอฟิล์มประกอบด้วยการควบคุมผ่าน *ica* locus (*ica*-mediated biofilm mechanism) ซึ่งกลไกนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มที่มีองค์ประกอบเป็น PIA หรือ PNAG และอีกระบบหนึ่งที่ไม่ขึ้นอยู่กับ *ica* locus (*ica*-independent biofilm mechanism) [4] ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีสายพันธุ์ที่ตรวจพบ *icaAD* แต่ไม่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ดังนั้นกลไกในการสร้างไบโอฟิล์มของสายพันธุ์ดังกล่าวอาจเกิดจากกลไกที่ไม่ขึ้นกับ *ica* locus ก็เป็นไปได้ สำหรับกลไกที่แน่ชัดต้องมีการศึกษาอื่นต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่ามีบางสายพันธุ์ที่มียีน *icaAD* แต่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าแม้ว่า *S. aureus* จะมี *ica* locus แต่ก็ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่จะสร้างไบโอฟิล์ม อาจมีความเป็นไปได้ที่ *ica* operon อาจจะมีขึ้นของสารพันธุกรรมเคลื่อนที่ได้ชนิด *IS256* ซึ่งมีขนาด 1,332 คู่เบสแทรกอยู่ในบริเวณยีนดังกล่าวทำให้ยีนเหล่านี้ถูกขัดขวางการทำงาน [20] ในการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบยีน *fnbA* ในเกือบทุกไอโซเลทของ *S. aureus* สอดคล้องกับการทดลองที่มีมาก่อนหน้านี้หลายรายงาน ซึ่งมีรายงานว่ายีนดังกล่าวมีการแพร่กระจายใน *S. aureus* [11, 13] นอกจากนี้ยีน *cna* ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะอาศัยของเชื้อ พบว่ามีการตรวจพบใน *S. aureus* ที่แยกได้จากชุมชนและโรงพยาบาลคิดเป็น 53.33% และ 35% ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับผลการทดลองของ Tangchaisuriya และคณะ [16] พบถึง 61% จากตัวอย่าง *S. aureus* ที่แยกได้จากชุมชน แต่ผลการทดลองครั้งนี้ใกล้เคียงกับผลการวิจัยในประเทศมาเลเซียซึ่งพบยีน *cna* ใน MSSA ประมาณ 46% [21] นอกจากนี้ Tangchaisuriya และคณะ [16] ยังรายงานว่า MRSA ที่แยกได้จากโพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียนที่ จังหวัดเชียงราย จำนวน 5 ไอโซเลทเป็นไอโซเลทที่ตรวจไม่พบทั้ง *icaAD*, *cna* และ *fnbA* ซึ่งแตกต่างกับการวิจัยครั้งนี้ ที่พบว่า MRSA จำนวน 3 ไอโซเลทที่แยกได้จากโพรงจมูกของเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดพัทลุง เป็นไอโซเลทที่มียีนดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อที่แยกได้นั้นแยกได้จากประชากรในพื้นที่ที่แตกต่างกันของประเทศ ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ที่แยกได้ดังกล่าว แต่ทั้งสองรายงานก็เป็นการแยก MRSA ได้จากเด็กที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยก MRSA ได้จากโพรงจมูกของนิสิตที่มีสุขภาพดีเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของ MRSA ในชุมชน ดังนั้นระบบสุขภาพ การดูแลเรื่องอนามัยในชุมชนหรือในโรงเรียนจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อลดปัญหาการแพร่กระจายของ MRSA นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยยังเป็นข้อมูลพื้นฐานเชิงวิทยาการระบาดของเชื้อในจังหวัดพัทลุง นำไปสู่แนวทางในการเฝ้าระวังของเชื้อต่อไป

### สรุปผลการวิจัย

*S. aureus* ที่แยกได้จากชุมชนและจากโรงพยาบาลทั้งหมด 35 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มด้วยวิธี CRA และ MTP พบว่าให้ผลบวกจำนวน 30 (85.71%) และ 32 (91.43%) ไอโซเลท ตามลำดับ และพบยีน *icaAD*, *fmbA* และ *cna* จำนวน 28 (80%), 27 (77.14%) และ 15 (42.86%) ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองไม่พบความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในการสร้างไบโอฟิล์มและการพบยีน Adhesins ทั้ง 3 ชนิด ระหว่างเชื้อที่แยกได้จากชุมชนและที่แยกได้จากโรงพยาบาล อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยนี้อาจจะค่อนข้างน้อยเกินไป เนื่องจาก MRSA ที่แยกได้จากชุมชนมีเพียง 4 ไอโซเลทเท่านั้น

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภทเต็มจำนวน (2556) ขอขอบคุณ นางระวีวัน นวนทอง เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ชำนาญงาน โรงพยาบาลพัทลุง ที่กรุณาให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

### เอกสารอ้างอิง

- [1] สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์. (2554). “วิทยาการระบาดของการติดเชื้อ Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* ที่เกิดจากชุมชน”, **ธรรมศาสตร์เวชสาร**. 11(1), 62-73.
- [2] Sivaraman, K., Venkataraman, N. and Cole, A.M. (2009). “*Staphylococcus aureus* Nasal Carriage and Its Contributing Factors”, **Future Microbiology**. 4(8), 999-1008.
- [3] Dolan, R.M. and Costerton, J.W. (2002). “Biofilm Survival Mechanism of Clinically Relevant Microorganism”, **Clinical Microbiology Reviews**. 15(2), 167-193.
- [4] O’Gara, J.P. (2007). “*ica* and Beyond Biofilm Mechanisms and Regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*”, **FEMS Microbiology Letters**. 270(2), 179-188.
- [5] ยีสมานี เจ๊ะหะ และชัยสิทธิ์ นิยะสม. (2555). “ความชุกและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินซึ่งแยกได้จากโพรงจมูกของนิสิตมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง”, **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ**. 15(3), 24-32.
- [6] ชัยสิทธิ์ นิยะสม จันทรฉาย กฤษณะทรัพย์ ปาริชาติ คงศรีทอง และนอร์อัยนี คาโอ๊ะ. (2557). “ความชุกและความไวต่อยาต้านจุลชีพของสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส ที่แยกได้จากโพรงจมูกเด็กก่อนวัยเรียนในจังหวัดพัทลุง”, **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**. 19(3), 13-18.
- [7] Poulsen, A.B., Skov, R. and Pallese, L.V. (2003). “Detection of Methicillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci and in Staphylococci Directly from Simulated Blood Cultures using the EVIGENE MRSA”, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 51(2), 419-421.
- [8] Sanaz, H.N., Mohammad, R. and Hadi, M. (2010). “Synergy between Phenothiazines and Oxacillin against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”, **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 9(3), 243-249.
- [9] Bekir, K., Haddad, O., Grissa, M., Chaieb, K., Bakhouf, A. and Ibrahim, S. (2012). “Molecular Detection of Adhesion Gene and Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”, **African Journal of Microbiology Research**. 6(23), 4908-4917.

- [10] Freeman, D.J., Falkiner, F.R. and Keane, C.T. (1989). "New Method for Detecting Slime Production by Coagulase Negative Staphylococci", **Journal of Clinical Pathology**. 42(8), 872-874.
- [11] Zmantar, T., Chaieb, K., Makni, H., Miladi, H., Abdallah, F.B., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. (2008). "Detection by PCR of Adhesins Genes and Slime Production in Clinical *Staphylococcus aureus*", **Journal of Basic Microbiology**. 48(4), 308-314.
- [12] Yazdani, R., Oshaghi, M., Havayi, A., Pishva, E., Salehi, R. and Sadeghizadeh, M., (2006). "Detection of *icaAD* Gene and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Wound Infections", **Iranian Journal of Public Health**. 35(2), 25-28.
- [13] Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Baldassarri, L. and Montanaro, L. (2005). "Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* Adhesin Genes among *Staphylococcus aureus* Isolated from Orthopedic Infections Associated to Different Types of Implant", **FEMS Microbiology Letters**. 246(1), 81-86.
- [14] Nasr, R.A., AbuShady, H.M. and Hussein, H.S. (2012). Biofilm Formation and Presence of *icaAD* Gene in Clinical Isolates of Staphylococci. **African Journal of Microbiology Research**. 6(23), 4908-4917.
- [15] 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.
- [16] Tangchaisuriya, U., Yotpanya, W., Kitti, T. and Sitthisak, S. (2014). "Distribution among Thai Children of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lacking *cna*, *fnbA* and *icaAD*", **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 45(1), 149-156.
- [17] DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N. and Chambers, H.F. (2010). "Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*", **Lancet**. 375(9725), 1557-1568.
- [18] Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T. and Rattan, A. (2006). "Detection of Biofilm Formation among the Clinical Isolates of Staphylococci: an Evaluation of Three Different Screening Methods", **Indian Journal of Medical Microbiology**. 24(1), 25-29.
- [19] วีรประภา บุญญา โชติชนะ วิไลลักษณ์ นิชา เจริญศรี อรุณวดี ชนะวงศ์ อรุณลักษณ์ ลุติตานนท์ โชคชัย วิชาชัย เสกสิทธิ์ สังคีรี และพิสมัย สายสุด. (2557). "การสร้างไบโอฟิล์มและยีนกำหนดโปรตีนผิวเซลล์ใน *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลินที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น", **วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด**. 26(3), 212-221.
- [20] Kiem, S., Oh, W.S., Peck, K.R., Lee, N.Y., Lee, J.Y. and Song, J.H. (2004). "Phase Variation of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* by *IS256* Insertion and Its Impact on the Capacity Adhering to Polyurethane Surface", **Journal Of Korean Medical Science**. 19(6), 779-782.
- [21] Atshan, S.S., Nor Shamsudin, M., Sekawi, Z., Lung, L.T.T., Hamat, R.A., Karunanidhi, A., Ali, A.M., Ghaznavi-Rad, E., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Seng, J.S.C., Nathan, J.J. and Pei, C.P. (2012). "Prevalence of Adhesion and Regulation of Biofilm-Related Genes in Different Clones of *Staphylococcus aureus*", **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2012, 1-10.