สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2

เรื่อง

การพัฒนายาสังเคราะห์ชนิดใหม่ในการฆ่าเชื้อ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ระบาดในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา

Development of Novel Synthetic Compound against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Occurred in Chon Buri and Chacheongsao Provinces

โดย

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
นางสาวดวงชีวัน พึ่งสุรินทร์[1]
นางสาวศิริวัฒณา ลาภหลาย[1]
นางสาวกาญจนา หริ่มเพ็ง[1]
นายเอกรัตน์ ศรีสุข[2]
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

bod13470 7
BK01433647
17 เม.ย. 2555
301502
เริ่มบริการ
28 พ.ค. 2555
อภินันทนาการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนายาสังเคราะห์ชนิดใหม่ในการฆ่าเชื้อ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ระบาดในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา (Development of novel synthetic compound against Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* occurred in Chon Buri and Chacheongsao Provinces) สำเร็จเรียบร้อยลงได้โดยได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ข้าพเจ้าและคณะทำงานขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ

ธันวาคม 2554

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนายาสังเคราะห์ชนิดใหม่ในการฆ่าเชื้อ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ระบาดในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา" ในปีที่ 2 ของการวิจัยได้ตรวจหายีน *mec*A ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ของสารสังเคราะห์จำนวน 12 ชนิด ต่อแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อ Methicillin ที่แยกได้จากโรงพยาบาลในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา ผลการศึกษาปรากฏว่า MRSA จำนวน 150 ไอโซเลตที่ได้จากการศึกษาในปีที่ 1 สามารถตรวจพบยีน *mec*A จำนวน 58 ไอโซเลต (38.66%) เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอล12 ชนิด ได้แก่ IMC1003, IMC1004, IMC1006, IMC1010, IMC1013, IMC1014, IMC1026, IMC1007, IMC1008, IMC1011, IMC1027 และ IMC1030 ณ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ด้วยเทคนิค Disk diffusion พบว่าสารสังเคราะห์ IMC1026 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อ Methicillin (100%) และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ Methicillin (83.3%) ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 13.00 $\pm$ 0.00 ถึง 17.67 $\pm$ 0.58 และ 7.67 $\pm$ 0.58 ถึง 17.00 $\pm$ 0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสังเคราะห์ IMC1026 ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลชนิดใหม่เพิ่มเติมในโครงการวิจัยในปีที่ 3 เพื่อนำไปสู่การพัฒนาสารชนิดนี้เป็นสารต้านจุลชีพทดแทนหรือเป็นสารที่ใช้ร่วมกับสารต้านจุลชีพชนิดอื่น เพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไวต่อ Methicillin และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ Methicillin ต่อไป

Abstract

In this research entitled "Development of novel synthetic compound against methicillin – susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* occurred in Chon Buri and Chacheongsao Provinces" in the second year of work, detection of *mec*A using molecular technique and evaluation of antibacterial activity of twelve synthetic agents on MSSA and MRSA recovered from the three hospitals located in Chon Buri and Chacheongsao Provinces were established. Results showed that, *mec*A were found in 58 isolates (38.66%) out of 150 MRSA isolated from three hospitals in the first year. In the next step, antibacterial assay of twelve synthetically phenolic compounds including IMC1003, IMC1004, IMC1006, IMC1010, IMC1013, IMC1014, IMC1026, IMC1007, IMC1008, IMC1011, IMC1027 and IMC1030 at 500 ug/disk using disk diffusion technique were assayed. IMC1026 demonstrated the highest inhibitory effect on tested MSSA (100%) and MRSA (83.3%) with 13.00 $\pm$ 0.00 to 17.67 $\pm$ 0.58 and 7.67 $\pm$ 0.58 to 17.00 $\pm$ 0.00 mm, respectively. Therefore, IMC1026 which was a novel synthetic agent should be further investigated in the third year of study in order to develop this agent to be either alternative antimicrobial agent or coordinated use other antimicrobial agents for remedy of disease associated with MSSA and MRSA.

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อ		II
Abstract		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		V
สารบัญรูป		VI
บทที่		
1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในปีที่ 2	2
3	ประโยชน์ที่ได้รับ	2
4	เอกสารและรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
5	วิธีดำเนินการทดลอง	15
6	ผลการทดลอง	17
7	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	22
เอกสารอ้างอิง		24
Output จากโครงการวิจัยในปีที่ 2		29

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวน MRSA ที่ตรวจพบยีน *mecA*	17
2	ผลการทดสอบสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอล 12 ชนิด กับแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion	20

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะเชื้อ *S. aureus* เมื่อย้อมแกรม	3
2	โครงสร้างของ *S. aureus*	4
3	โครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ Methicillin	9
4	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ MRSA ที่พบปริมาณยีน *mec*A โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมจากวิธีการสกัดด้วยการเติม Lysis buffer หรือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	18
5	การยับยั้งการเจริญของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอล 12 ชนิด ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ กับแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA และ MSSA ด้วยวิธี Disk diffusion	19

1. ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Staphylococcus aureus และ Mehticillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดชนิดหนึ่ง เพราะเป็นสาเหตุของการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล (Nosocomial infection; Mann, 2008; Liu et al., 2010) ซึ่งเชื้อสามารถระบาดได้ง่ายและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญในผู้ป่วยที่มีบาดแผลไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก เนื่องจาก *S. aureus* และ MRSA อาศัยอยู่ตามผิวหนังและเซลล์เยื่อบุต่าง ๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะในจมูก จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายได้ง่ายโดยเฉพาะการติดต่อแบบสัมผัสโดยตรง (Kennedy and DeLeo, 2009) จึงทำให้เกิดการแพร่เชื้อได้อย่างรวดเร็ว โดยพบว่าการสัมผัสโดยตรงเป็นการแพร่กระจายของ MRSA ที่พบบ่อยที่สุด (Guzman-Blanco et al., 2009)

นอกจากนี้ยังสามารถแพร่ระบาดทางอากาศจากบุคคลที่เป็นพาหะของเชื้อ โดยการไอหรือจาม การติดเชื้อ MRSA มักพบในผู้ป่วยที่นอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาล (Reich-Schupke et al., 2010) โดยเฉพาะผู้ป่วยหนัก ผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยแผลกดทับ และผู้ป่วยที่ต้องใช้สายสวนปัสสาวะหรือสายให้น้ำเกลือและยาทางหลอดเลือด (Critchley, 2006) การติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลมักจะรุนแรง ซึ่งปัจจัยที่ทำให้พบการติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลมากขึ้น ได้แก่ การที่ผู้ป่วยต้องนอนโรงพยาบาลเป็นเวลานานหลายวัน (Guilbeau and Fordham, 2010) การใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง การเข้ารับการดูแลในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก (ICU; Khandavilli et al., 2009) การคลุกคลีใกล้ชิดกับผู้ติดเชื้อ MRSA ในผู้ป่วยหลังผ่าตัด (Kennedy and DeLeo, 2009) และผู้ที่เป็นพาหะมีเชื้อ MRSA ในโพรงจมูก (Critchley, 2006)

เชื้อ MRSA อาจก่อให้เกิดโรคนอกโรงพยาบาลได้เช่นกัน พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ MRSA ที่พบในชุมชน มีความสัมพันธ์กับแบบแผนการใช้ยาปฏิชีวนะ สิ่งของเครื่องใช้ที่ปนเปื้อนหรือในชุมชนที่อาศัยร่วมกันอย่างแออัด และเชื้ออาจแพร่กระจายไปยังต่างโรงพยาบาล (Abb, 2004; Miller et al., 2008) อันเนื่องมาจากการส่งตัวผู้ป่วยที่มีเชื้อ MRSA ไปรับการผ่าตัดหรือรักษา แต่อย่างไรก็ตาม *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถปรับตัวในการดื้อยาปฏิชีวนะได้อย่างต่อเนื่อง ในสมัยก่อนที่จะมียาปฏิชีวนะอัตราการตายจากการติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteriamia; Miller et al., 2008) ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *S. aureus* สูงถึงร้อยละ 80 ในช่วงของต้นปี ค.ศ.1940 มีการนำ Benzyl penicillin (Penicillin G) มาใช้รักษา ทำให้ลดอัตราการตายของผู้ที่เป็นโรคติดเชื้อ *S. aureus* ได้มาก อย่างไรก็ตาม ในปี ค.ศ.1942 เริ่มพบว่า *S. aureus* มีการดื้อต่อยา Penicillin G โดยที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Penicillinase (β-lactamase) ทำให้เพิ่มอุบัติการณ์การดื้อยา Penicillin ของ *S. aureus* ที่แยกจากผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Cavalcanti et al., 2005) จนถึงปี ค.ศ.1948 พบว่าไม่สามารถใช้ Penicillin G รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Japoni et al., 2004; Kennedy and DeLeo, 2009) ต่อมาในปี ค.ศ.1959 มีการค้นพบ 6-Aminopenicillanic acid ที่เป็น Penicillin precursor ในการผลิต Penicillin กึ่งสังเคราะห์ (Methicillin, Nafcillin และ Oxacillin) ซึ่งสามารถป้องกันการย่อยสลายวงแหวนเบต้า-แลคแตม (β-lactam ring) โดยเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส (β-lactamase) ได้ (Japoni et al., 2004) มีรายงานในปี ค.ศ.1961 พบว่ามีสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ดื้อยา Methicillin และเรียกเชื้อเหล่านี้ว่า Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA; Guzman-Blanco et al., 2009) ซึ่งสามารถแพร่กระจายและทำให้เกิดโรครุนแรง (Enright et al., 2002) โดยที่เชื้อนี้ยังดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นนอกเหนือจากยากลุ่มเบต้า-แลคแตม (β-lactam) เช่น กลุ่ม Aminoglycosides, Macrolides, Tetracyclines (Tenover et al., 2001; Mann, 2008) ทำให้มียาน้อยชนิดที่สามารถนำมาใช้รักษาได้ผลดีและยาเหล่านี้ก็มักจะมีราคาแพง

จากผลการศึกษาในปีที่ 1 ได้ศึกษาการระบาดวิทยา ความไวต่อยาต้านจุลชีพและการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสของ *S. aureus* ซึ่งประกอบด้วย Methicillin - susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) และ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 400 ไอโซเลต จาก 3 โรงพยาบาล คือ โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา ในช่วงเดือนมกราคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2550 ผลการศึกษาปรากฏว่าการระบาดของ MSSA ในทั้ง 3 โรงพยาบาลมีปริมาณการระบาดสูงกว่า MRSA ซึ่งการระบาดของ MSSA และ MRSA ณ โรงพยาบาลชลบุรี (55.32% และ 45.68%) โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา (62.75% และ 37.25%) และโรงพยาบาลฉะเชิงเทรา (70.81% และ 29.19%) โดยสิ่งส่งตรวจประเภทปัสสาวะตรวจพบ MSSA มากที่สุด (85.71%) ในขณะที่สิ่งส่งตรวจประเภทเลือด หนองและเสมหะตรวจพบ MRSA ใกล้เคียงกัน (36.26% - 39.46%) และสูงกว่าสิ่งส่งตรวจประเภทอื่น เมื่อทดสอบความไวของ MSSA และ MRSA ต่อยาต้านจุลชีพ 14 ชนิด ได้แก่ ยากลุ่มเบต้า-แลคแตมจำนวน 7 ชนิด และยากลุ่มอื่นจำนวน 7 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า MSSA ไวต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 2 กลุ่มที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ในปริมาณสูง (90.00-100%) ยกเว้นดื้อต่อยาในกลุ่มยากลุ่มเบต้า-แลคแตมจำนวน 2 ชนิดคือ Penicillin G (96.00%) และ Ampicillin (90.80%) และยากลุ่มอื่นคือ Gentamicin (78.80%) ในขณะที่ MRSA ดื้อต่อยาทั้ง 2 กลุ่มโดยดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแตมในปริมาณสูงถึง 97.33-100.00% และยากลุ่มอื่นทุกชนิดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ในปริมาณสูงเช่นกัน (81.34-97.33%) ยกเว้นไวต่อยา Vancomycin (100.00%) และ Chloramphenicol (94.00%) เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสของ MRSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาลทั้ง 3 แห่ง พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสจำนวน 92.00% ทำให้สามารถสรุปได้ว่ากลไกการดื้อต่อยาในกลุ่มเบต้า-แลคแตมของ MRSA ในการศึกษานี้น่าจะเกิดจากการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ต้องตระหนักถึงการรักษาโรคติดเชื้อในกลุ่ม *S. aureus* เพราะถ้า *S. aureus* เหล่านี้เป็นกลุ่ม MRSA จะทำให้การรักษาโรคยุ่งยากและซับซ้อนมากขึ้นและทำให้เกิดอัตราเสี่ยงต่อผู้ป่วยที่ติดเชื้อดังกล่าว

ดังนั้นการวิจัยในปีที่ 2 นี้จึงทำการศึกษาต่อเนื่องคือ การศึกษาถึงยีนดื้อยาใน MRSA ที่ทำการคัดแยกและศึกษาในปีที่ 1 รวมทั้งทำการศึกษาหายาสังเคราะห์ราคาถูกที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (MSSA) และ MRSA เพื่อให้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการนำสารสังเคราะห์ชนิดใหม่มาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในปีที่ 2

2.1 เพื่อศึกษาถึงยีนดื้อยาใน MRSA ที่ระบาดในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา

2.2 เพื่อศึกษาหายาสังเคราะห์ราคาถูกที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MSSA และ MRSA

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

ทราบถึงยีนที่ดื้อยาใน MRSA ที่พบระบาดในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา และสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการนำสารสังเคราะห์ชนิดใหม่มาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันที่อาจจะรักษาโรคที่เกิดจาก *S. aureus* และ MRSA ไม่ได้ผล

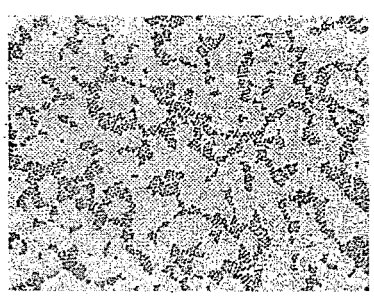
4. เอกสารและรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

4.1 *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์สกุล *Staphylococcus* คือ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์มาก เพราะสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อกับทุก ๆ บริเวณของร่างกาย การติดเชื้อที่ผิวหนังสามารถทำให้ติดเชื้ออย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรง ก่อให้เกิดหนองและการติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) รุนแรง และอาจก่อให้เกิดอาการของโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบและเป็นหนอง เป็นต้น การติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม Staphylococci จะเรียกว่า "Scalded-skin syndrome" นอกจากนี้การติดเชื้อ *S. aureus* อาจเริ่มต้นจากการติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่และคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องสามารถติดเชื้อ *S. aureus* ได้ อีกทั้ง *S. aureus* บางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) จากการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนก *S. aureus* ออกจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ คือ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Coagulase ที่มีคุณสมบัติทำให้ซีรัม (Serum) เกิดการแข็งตัว แต่ก็มี Staphylococci ชนิดอื่นบางชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้เช่นกันคือ *S. intermedius* และ *S. hyicus* subsp. *hyicus* แต่ยังไม่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคในคน (Volk and Wheeler, 1988; Atlas, 1995)

4.1.1 สัณฐานและสรีรวิทยา

S. aureus จัดอยู่ในตระกูลสแตปไฟโรคอกคาซีอี (Staphylococcaceae) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1881 จากสิ่งส่งตรวจประเภทฝีหนอง มีการดำรงชีวิตแบบ Facultative anaerobe จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มีการเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่หรือเป็นสายสั้น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลมนูน โคโลนีมีสีขาว สีเหลืองจนถึงสีเหลืองทอง ในบางสายพันธุ์สร้างแคปซูลช่วยให้เชื้อเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค (Kenneth, 2008; Willey et al., 2009) แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเกือบทุกชนิด เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 7 - 47 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ช่วงอุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ที่ pH 4.5-9.3 แต่ดีสุดที่ pH 7-7.5 ปัจจุบันเชื้อในสกุลนี้มีสมาชิก 32 สปีชีส์ และ 15 ซับสปีชีส์ (Lowy, 1998; Bello and Qahtani, 2005; Bremer et al., 2004; Todar, 2008)



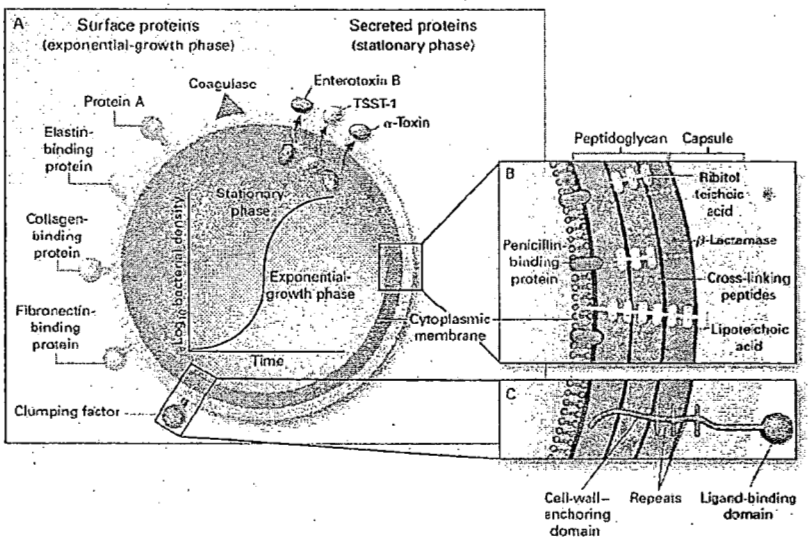
รูปที่ 1 ลักษณะเชื้อ *S. aureus* เมื่อย้อมแกรม (ภาพโดย พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์)

โดยทั่วไปเชื้อ *S. aureus* ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีและสามารถมีชีวิตรอดได้เป็นสัปดาห์ แม้จะอยู่ในหนองหรือเสมหะแห้ง รวมทั้งสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลายเดือนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น

วุ้นเอียง นอกจากนั้นยังมีความสามารถที่ค่อนข้างทนต่อความร้อนและทนต่อสารเคมีฆ่าเชื้อ เช่น ฟีนอลเมอร์คิวริกคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ 9% แต่อย่างไรก็ตาม *S. aureus* ถูกยับยั้งด้วยสารเคมีบางชนิด เช่น เฮกซาคลอโรฟีน 3% และกรดไขมันเข้มข้น *S. aureus* บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส และทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่มเบต้าแลคแตม โดยเฉพาะยากลุ่ม Penicillin (Kim, 2009)

4.1.2 สรีรวิทยาและปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรค

โครงสร้างเซลล์ของ *S. aureus* มีโครงสร้างเช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป บางสายพันธุ์อาจพบชั้นแคปซูล (Capsule) ซึ่งเป็นชั้นเมือกของสาร Polysaccharide ล้อมรอบเซลล์ แคปซูลมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (Antigen) ทำให้สามารถแบ่งเชื้อ *S. aureus* ออกได้เป็น 11 Serotype โดย Serotype 5 และ 8 พบว่าเป็นสาเหตุในการก่อโรคติดเชื้อได้บ่อยที่สุด (Lowy, 1998) ชั้นผนังเซลล์ (Cell wall) ประกอบด้วยสายเพปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) เรียงตัวและสานต่อกันเป็นร่างแหหลายชั้น ด้วยพันธะ β - 1,4 (1,4 - β linkages) ของ *N* – acetylglucosamine และ *N* – acetylmuramic acid (Lowy, 1998) ซึ่งจะช่วยเสริมความแข็งแรงและปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตราย ในชั้นผนังเซลล์ยังมีโครงสร้างของกรด Teichoic (Teichoic acid) ซึ่งจะเชื่อมต่อกับสายเพปติโดไกลแคนด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) หรือกรด Lipo-teichoic (Lipoteichoic acid) โดยจะอาศัยอนุมูลไขมันในการเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ ดังรูปที่ 2 ชนิดของกรด Teichoic มีความจำเพาะต่อสปีชีส์ เช่น กรด Ribitol teichoic จะพบได้ในเชื้อ *S. aureus* ส่วนกรด Glycerol teichoic พบได้ในเชื้อ *S. epidermidis* (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)



รูปที่ 2 โครงสร้างของ *S. aureus* (Lowy, 1998)

ส่วน A แสดงโปรตีนที่ผิวเซลล์และโปรตีนที่หลั่งออกมา การสังเคราะห์โปรตีนต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญ และควบคุมโดยยีนควบคุม เช่น *agr*

ส่วน B และ C แสดงภาพตัดขวาง Cell envelope ซึ่งโปรตีนต่าง ๆ ที่ผิวเซลล์มีการเรียงตัวของโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน

โปรตีนที่ผิวเซลล์ (Surface proteins) ได้แก่ โปรตีนเอ (Protein A) ซึ่งจะยึดกับจับชั้นเพปติโดไกลแคนด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่วนประกอบนี้ทำหน้าที่จับกับส่วน F_c receptor ของ IgG1 IgG2 และ IgG4 ซึ่งป้องกันตัวเชื้อจากการถูกทำลายและการจับกินได้ คุณสมบัตินี้ทำให้โปรตีนเอถูกนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจแอนติเจนแบคทีเรียโดยวิธี Coagglutination โดยอาศัย IgG ที่ปลายด้าน F_c จับอยู่กับโปรตีนเอ ส่วนปลายด้าน F_{ab} จะจับกับแอนติเจนจำเพาะของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายและทำให้เกิดการตกตะกอนร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียทั้งสอง และยังมีเอนไซม์ Bound coagulase หรือ Clumping factor ซึ่งสามารถเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ให้เป็นไฟบริน (Fibrin) ที่ไม่ละลายน้ำและทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการจับกลุ่มกันได้ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549; Lowy, 1998)

(1) เอนไซม์นอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ที่ผลิตโดย *S. aureus*

1.1 เอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัวโดยการเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นไฟบริน (Fibrin) ในปฏิกิริยานั้น Coagulase ต้องการองค์ประกอบที่อยู่ในพลาสมาอาจเป็นโพรทรอมบิน (Prothrombin) หรือ Coagulase-reacting factor (CRF) ซึ่งมีอยู่ในพลาสมามนุษย์และสัตว์บางชนิดเท่านั้น เมื่อรวมกันเป็น Coagulase-CRF complex แล้วจะเปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบรินได้ จึงทำให้พลาสมาแข็งตัว นอกจากนี้ยังมี Bound coagulase (Clumping factor) ที่เปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบรินทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกัน บทบาทของ Coagulase ทำให้เกิดไฟบรินมาล้อมรอบเชื้อ จึงป้องกันไม่ให้เกิดกระบวนการ Phagocytosis ได้ (Henderson and Brodie, 1963; Brooks et al., 2001) สำหรับกลไกของ Coagulase ในร่างกายมีดังนี้

Coagulase + CRF
↓
Coagulase–CRF complex
↓
Fibrinogen
↓
Fibrin
↓
Coagulation of plasma

1.2 เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เป็นเอนไซม์ที่ *Staphylococcus* มีไว้เพื่อใช้ย่อย Substrate หลายชนิด เช่น พลาสมาและไขมันที่สะสมอยู่ที่ผิวหนัง การที่เชื้อใช้สารเหล่านี้ได้ทำให้มันอยู่รอดและเป็นสาเหตุของการรวมกลุ่มของเชื้อที่บริเวณต่อมเหงื่อ การสร้างเอนไซม์ไลเปสจำเป็นต่อการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่ผิวหนัง (Rollof and Normark, 1992)

1.3 เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase) เป็นเอนไซม์ย่อยกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) ซึ่งเป็น Acid mucopolysaccharide ที่อยู่ที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เชื้อแพร่กระจายไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น *S. aureus* มากกว่าร้อยละ 90 สร้างเอนไซม์นี้ได้

1.4 เอนไซม์สแตปไฟโรไคเนส (Staphylokinase) เชื้อส่วนใหญ่ของ *S. aureus* แสดง Plasminogen activator ที่เรียกว่า Staphylokinase สามารถย่อยไฟบรินได้ สารประกอบระหว่าง Staphylokinase กับ Plasminogen จะกระตุ้น Plasmin-like proteolytic activity ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ไฟบรินที่จับตัวเป็นก้อนนั้นละลายได้ จึงนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเกิดลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดของหัวใจ (Coronary thrombosis) ได้ (Todar, 2008)

1.5 เอนไซม์ไฟบริโนไลซิน (Fibrinolysin) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยไฟบรินทำให้เลือดไม่แข็งตัว มีสมบัติทางแอนติเจนและเอนไซม์แตกต่างจาก Streptokinase ของเชื้อ *Streptococcus* การสร้าง Staphylokinase ขึ้นอยู่กับจีโนมของฟาจ เชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้

1.6 เอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease) เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อน ประกอบด้วย Globular proteins ที่มี Polypeptide สายเดี่ยว เมื่อให้ความร้อน 65 องศาเซลเซียส จะทำลายโครงสร้างนี้ได้ แต่ปฏิกิริยานี้สามารถกลับคืนได้ เอนไซม์นี้เป็น Phosphodiesterase ที่สามารถย่อยได้ทั้ง DNA และ RNA

1.7 เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) เป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) เพื่อปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากการถูกทำลายในเซลล์เม็ดเลือดขาว ภายหลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจับกินเชื้อแบคทีเรียโดยขบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) จะเกิดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระที่เป็นพิษเพื่อทำลายเชื้อแปลกปลอม

1.8 เอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส (β-lactamase) เป็นเอนไซม์ที่สร้างจากยีนบนพลาสมิดและทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเบต้าแลคแตมอื่นอีกหลายชนิด โดยเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสจะย่อยสลายวงแหวนเบต้า-แลคแตมของยาปฏิชีวนะทำให้ยาปฏิชีวนะเสียสภาพและไม่สามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ (Stapleton and Taylor, 2002)

(2) สารพิษ (Toxin) ที่ผลิตโดย *S. aureus*

2.1 Cytolycin toxins เป็นทอกซินที่ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ ทอกซินส่วนใหญ่เป็นโปรตีนนอกเซลล์ และกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง Neutralizing antibody ทอกซินที่สร้างโดย *S. aureus* ได้แก่ ฮีโมไลซิน (Hemolysin) และลิวโคซิดิน (Leukocidin) ซึ่งฮีโมไลซินจำแนกเป็น 4 ชนิด คือ α- Hemolysin, β- Hemolysin, δ- Hemolysin และ γ- Hemolysin

2.1.1 α- Hemolysin หรือ α- Toxin เป็นโปรตีนที่ย่อยเม็ดเลือดแดง และทำลายเกล็ดเลือด แอลฟาทอกซินจะย่อยไลโซโซมและเป็นพิษกับเซลล์โดยแมคโครฟาจ (Macrophage) และเกล็ดเลือดจะถูกทำลายแต่ไม่ทำลายโมโนไซต์ (Monocytes) ผลของทอกซินจะทำลายกล้ามเนื้อเรียบและเซลล์ผิวหนังทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดหดเกร็ง ทอกซิน บริสุทธิ์เป็นโมโนเมอร์ (Monomer) ที่ละลายน้ำได้ มีขนาด 33,200 ดาลตัน (Gouaux, 1998) เมื่อมาสัมผัสกับตัวรับบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์จะเรียงตัวกันเป็นเฮกซะเมอร์ (Hexamer; Todar, 2008) ดังนั้นกลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ มีลำดับดังนี้

ทอกซินในรูป Monomer ไปจับผิวเซลล์

↓

รวมตัวกันใหม่เป็นรูป Hexamer เพื่อเป็นช่องขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 นาโนเมตร

↓

เกิดการรั่วของไอออนขนาดเล็กผ่านช่องนั้น

↓

เกิดการแตกของเซลล์เนื่องจากออสโมซิส

2.1.2 β- hemolysin เป็นโปรตีนที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแกะ แต่ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงกระต่าย เป็นสารพวกฟอสโฟไลเปส ซี (Phospholipase C) สามารถทำลายสารสฟิงโกไมอิลิน (Sphingomyelin) และไลโซเลซิติน (Lysolecitin) บนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของแกะและวัว ไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดของคนและกระต่าย ความจำเพาะของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสฟิงโกไมอิลิน (Sphingomyelin) และไลโซเลซิติน (Lysolecitin; Parker and Duerden, 1990)

2.1.3 δ- hemolysin เป็นเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) ชนิดสฟิงโกไมอิลิเนส (Sphingomyelinase) มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่ออีกหลายชนิด ค่อนข้างทนความร้อน (Parker and Duerden, 1990)

2.1.4 γ- hemolysin เป็นสารพิษที่มีฤทธิ์น้อยกว่าชนิดอื่น ๆ ประกอบด้วย โปรตีน 2 ส่วนแยกกัน ทอกซินชนิดนี้สามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย คน และแกะ แต่ไม่มีผลกับเม็ดเลือดแดงของม้าและสัตว์ปีก (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

2.2 Leukocidin หรือ Panton-Valentine leukocidin ซึ่ง *S. aureus* ส่วนใหญ่สร้าง Leukocidin ที่ทำลายเม็ดเลือดขาวชนิดพอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ลิวโคไซด์และ Macrophage แต่ไม่มีผลกับเซลล์ชนิดอื่น Leukocidin ประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วน คือ Luk F และ Luk S เมื่อ Luk F 4 subunits จับกับ Luk S 4 subunits จะจับตัวเป็น Hetero-oliogmeric transmembrane pore (Octameric pore) แล้วจับกับผนังเซลล์ ทำให้เกิดช่องว่างที่ผนังเซลล์และทำให้เซลล์แตก (Todar, 2008)

2.3 Enterotoxin เป็น Exotoxin ที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ ซึ่งมีอาการอุจจาระร่วงรุนแรงและอาเจียน Enterotoxin นี้ประกอบด้วย Globular proteins ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28,000-35,000 ดาลตัน ดังนี้ ชนิด A-E, G, H, I และ J ปัจจุบันพบชนิดใหม่คือ Enterotoxin F ซึ่งแยกได้จาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิด Toxic shock syndrome จึงเรียกว่า Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST1) จะทำให้เกิดอาการไข้และช็อก ทอกซินสามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และทนต่อน้ำย่อยในทางเดินอาหาร การทำให้เกิดอาหารเป็นพิษพบว่าจะเกิดเมื่อ *S. aureus* เจริญในอาหารที่มีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ โดยทอกซินอาจมีผลไปกระตุ้นศูนย์กลางการอาเจียนที่ระบบประสาทส่วนกลางและไปยับยั้งการดูดน้ำกลับจากลำไส้จึงทำให้ขับถ่ายของเหลวออกมามาก (Levinson and Jawetz, 2002)

2.4 Epidermolytic toxin หรือ Exfoliative toxin เป็นทอกซินที่ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลล์ที่เกาะติดกันระหว่างเซลล์ของชั้นหนังกำพร้า (Stratum granulosum) จึงทำให้ผิวหนังหลุดออก แต่ไม่ทำให้เกิดการอักเสบหรือไม่ทำให้เซลล์ตาย เรียกว่า โรค Staphylococcal scalded skin syndrome (Greenwood et al., 2002; Todar, 2008)

4.2 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

S. aureus เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางการแพทย์เป็นอย่างมาก (Gnanmani et al., 2003) เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในมนุษย์และสามารถทำให้เกิดโรคได้เกือบทุกระบบของร่างกาย (Talaro, 2008) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากแบคทีเรียชนิดนี้ โดยเฉพาะผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยที่มีบาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ผู้ป่วยอาการหนักและผู้ป่วยที่มีบาดแผลผ่าตัดหรือมีสายสวนหลอดเลือด เมื่อได้รับยาต้านจุลชีพหลายขนานในโรงพยาบาลเป็นเวลานานจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ *S. aureus* มีความไวต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาโรคลดลง (Duijkeren et al., 2004) ผลดังกล่าวทำให้เกิด *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Methicillin หรือเรียกว่าMethicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลในปัจจุบันและนับวันจะมีอุบัติการณ์ความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ก)

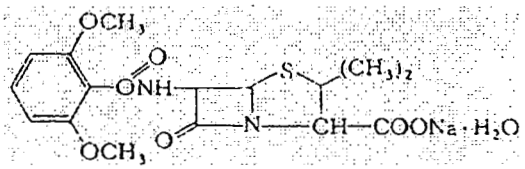
ในปัจจุบันมีรายงานที่แสดงถึงการแพร่ระบาดของ MRSA ในชุมชนด้วย แสดงให้เห็นว่ามีการกระจายของเชื้อไปทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จากการศึกษาของคณะแพทยศาสตร์ในโรงพยาบาลรามาธิบดีในปี พ.ศ. 2528-2529 มีอัตราการพบ MRSA 6 % (มาลัย วรจิตร, 2532) ส่วนปี พ.ศ. 2530 พบมากขึ้นถึง 128 ราย เพิ่มเป็น 14% ซึ่งถือว่าเป็นการระบาดที่เพิ่มมากกว่าปกติ (สภาวะปกติพบ 0-5%) สำหรับที่โรงพยาบาลศิริราชเกิดปัญหาประปราย กระทั่งในราวเดือนเมษายน พ.ศ. 2534 รายงานอุบัติการณ์ของการพบ MRSA เพิ่มขึ้นเป็น 12.86% โดยแยกเชื้อได้จากผู้ป่วยทั้งในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก (ICU) และที่พบมากคือ จากผู้ป่วยไฟไหม้ น้ำร้อนลวก โดยพบอุบัติการณ์ของเชื้อนี้สูงถึง 60% จึงนับว่า MRSA เป็นปัญหาในทางด้านการแพทย์อย่างมาก (อิทธิพันธ์ เจริญผล, 2535)

ส่วนปี พ.ศ. 2532 พบอุบัติการณ์ของ MRSA ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 27% ภาคหนือ 20% และมีค่าเฉลี่ยการพบ MRSA ทั่วประเทศถึง 23% มีรายงานการตรวจหา Phage type ของ *S. aureus* จากโรงพยาบาล 5 แห่งในประเทศไทยพบว่า Phage type 85 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของ MRSA ได้มีการตรวจพบมากถึงร้อยละ 31.8 ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2532 – มีนาคม พ.ศ. 2534 ในเดือนสิงหาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2533 พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA จากโรงพยาบาลศิริราช ประมาณ 29.17% และเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2533 พบ 87.50% (สมหวัง ด่านชัยวิจิตร และคณะ, 2535)

ดังนั้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา MRSA กลายเป็นปัญหาที่สำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลทั้งในด้านการรักษา การดูแลผู้ป่วย และระบาดวิทยาทั่วโลก จึงได้มีการนำยา Vancomycin มาใช้เป็นยาหลักในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA อย่างแพร่หลาย จนกระทั่ง Hiramatsu (1997) ได้รายงานผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA ซึ่งมีความไวต่อ Vancomycin น้อยลง (MIC 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นครั้งแรก เชื้อนี้มีชื่อเรียกว่า Vancomycin – Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) หรือ Glycopeptides – Intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) เนื่องจากดื้อยา Teicoplanin ด้วย ต่อมามีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ VISA จากประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศในทวีปยุโรป (ฝรั่งเศส และอังกฤษ) และเอเชีย (ฮ่องกง และเกาหลีใต้) ทำให้มีปัญหาในการรักษามากขึ้นต่อไป (Berger, 2002)

4.2.1 กลไกการดื้อยา Methicillin ของ MRSA

Methicillin เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มที่นำมาใช้รักษา *S. aureus* กลุ่มที่ดื้อต่อยากลุ่ม Penicillin เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ Penicillinase แต่ยา Methicillin จะทนทานต่อเอนไซม์ Penicillinase และมีโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 3 (Stapleton and Taylor, 2002)



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ Methicillin (Stapleton and Taylor, 2002)

S. aureus สายพันธุ์ที่ดื้อยา Methicillin มีกลไกในการดื้อต่อยา Methicillin โดยสร้างโปรตีนที่จับกับยา Penicillin (Penicillin–binding protein หรือ PBP) ที่ผิดปกติเรียกว่า PBP2' หรือ PBP2a (น้ำหนักโมเลกุล 72 กิโลดาลตัน) ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับยากลุ่มเบต้าแลคแตมได้ไม่ดี จึงเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Low affinity penicillin – binding protein จากการศึกษาพบว่าเชื้อ MRSA ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีการสร้าง PBP2a ทั้งหมด และเมื่อทำการ Clone DNA ที่ควบคุมการสร้าง PBP2a เข้าไปในเซลล์ของ MSSA พบว่าทำให้ MSSA ทุกสายพันธุ์เปลี่ยนเป็น MRSA ทั้งหมด (Stapleton and Taylor, 2002)

ยีนควบคุมการสร้าง PBP2a ถูกกำหนดโดยยีน *mec*A มีขนาดเท่ากับ 2 กิโลเบส ที่อยู่บน Staphycoccal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) สามารถถ่ายทอดแบบแนวนอน (Horizontals transfer) ได้ง่าย นั่นคือสามารถถ่ายทอดจาก MRSA ไปยัง MSSA ได้และยังมียีนดื้อยาชนิดอื่น ๆ แทรกอยู่ (Kim, 2009) การควบคุมการแสดงออกของการดื้อยา Methicillin อาศัยยีนควบคุม (Regulatory element) 2 ชนิด คือ *mec*RI และ *mec*I โดยยีนทั้งสองชนิดนี้จะยับยั้งขั้นตอนการถอดรหัส (Transcription; Stapleton and Taylor, 2002)

นอกจากนี้ยังมียีนอีกชนิดเรียกว่า ยีน *bla* ยีนชนิดนี้มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดของ *S. aureus* ประกอบด้วยยีน *bla*RI และ *bla*I ทำหน้าที่เป็นยีนควบคุม (Regulatory gene) และ *blaZ* ทำหน้าที่เป็นยีนโครงสร้างควบคุมการสร้างเอนไซม์ Penicillinase หรือเบต้า-แลคตาเมส ซึ่งยีน *bla* นี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของการดื้อต่อยา Methicillin (Methicillin – Resistance phenotype) ใน *S. aureus* ยีนเหล่านี้เมื่อแทรกในบริเวณยีน *mec*A จะสามารถเปลี่ยนการสร้าง PBP2a จากสภาพ Inducible เป็นสภาพ Constitutive ได้ (Fernandez et al., 2004)

ลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของ MRSA คือ การดื้อยาแบบ Heterogeneous resistance คือมีเพียงบางเซลล์เท่านั้นที่แสดงลักษณะการดื้อยา Methicillin (1 ใน 10^2 – 10^8) และการดื้อยาแบบ Homogeneous resistance ซึ่งเซลล์ทุกเซลล์ของ *S. aureus* จะมีการดื้อยาเหมือนกันหมดทุกเซลล์ การดื้อยาในลักษณะนี้ถูกควบคุมโดยยีนที่มีชื่อว่า Auxillary (*aux*) หรือยีน Factor essential for the expression of methicilline resistant (*fem*) ประกอบด้วยยีนโครงสร้าง 4 ชนิด คือ *fem*A, *fem*B และ *fem*D โดยยีน *fem*A เป็นยีนที่มีความสำคัญที่สุดในการแสดงออกของการดื้อยา Methicillin ซึ่งทำงานร่วมกับยีน *mec*A ทำให้เกิดการดื้อยา Methicillin ในระดับสูง (Ryffel et al., 1994)

4.2.2 ลักษณะการดื้อยาของ MRSA

จากรายงานที่ได้กล่าวถึงระดับและกลไกการดื้อยาทำให้จำแนกชนิดของ MRSA ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม

(1) กลุ่ม True หรือ Intrinsic methicillin resistant *S. aureus* เป็นกลุ่ม MRSA ที่พบได้บ่อยที่สุดทางคลินิก เชื้อนี้มีการดื้อยา Methicillin ในระดับของ MIC ของยา Methicillin > 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ MIC ต่อยา Oxacillin 2 - 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ กลุ่มที่มีการแสดงออกของการดื้อยา Methicillin แบบ Heterogeneous resistance และกลุ่มที่มีการแสดงออกแบบ Homogeneous resistance (NCCLS, 2007)

(2) Borderline methicillin resistant *S. aureus* (BORSA) การดื้อยาแบบนี้เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ที่มีการสร้าง Staphylococcal penicillinase ที่ปกติในปริมาณมาก ทำให้สามารถทำลาย Methicillin อย่างช้า ๆ ได้และไม่พบการสร้าง PBP2a ที่ผนังเซลล์ มี MIC ของยา Methicillin 2 – 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ MIC ของ Oxacillin 1-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กลไกดังกล่าวนี้ถูกควบคุมโดยยีนบนพลาสมิด (Zaher et al., 1997)

(3) Methicillin intermediate *S. aureus* (MORSA) เกิดจากการที่เชื้อสร้าง Modified PBPs ซึ่งเป็นแบบปกติ ชนิด PBP1 และ PBP2 ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับยาได้น้อยลง MORSA มีค่า MIC ของ Oxacillin 2 - 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Tomasz et al., 1989)

4.2.3 โรคติดเชื้อที่เกิดจาก MRSA

บริเวณที่พบการติดเชื้อโดยมี *S. aureus* เป็นสาเหตุ คือ บริเวณผิวหนัง เนื้อเยื่ออ่อน กระดูก ข้อ ปอดและหลอดเลือด ทำให้เกิดความโรครุนแรงและมีอันตรายสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในแผลผ่าตัด แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกและแผลอื่น ๆ นอกจากนี้การใช้สายสวนหลอดเลือดและสิ่งแปลกปลอม เช่น Central line, Central nervous system shunt, Pace maker, Peritoneal dialysis catheter และลิ้นหัวใจเทียม การติดเชื้อที่ปอดอาจเกิดจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ โดยพบการติดเชื้อ MRSA สามารถแบ่งได้ดังนี้ (Harbarth et al., 1999)

(1) โรคติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) พบว่าทำให้มีอัตราการตายที่สูงโดยพบในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 50 ปี มีโรคเดิมที่เกี่ยวข้องกับหัวใจ ระบบประสาท หรือระบบการหายใจ ซึ่งอัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยเชื้อ *S. aureus* สูงร้อยละ 11–53 (Harbarth et al., 1999)

(2) โรคลิ้นหัวใจอักเสบ (Endocarditis) การเกิดโรคลิ้นหัวใจอักเสบจาก *S. aureus* พบว่ามีอัตราเพิ่มสูงขึ้น ร้อยละ 25–35 ซึ่งเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ฉีดยาเสพติดเข้าทางหลอดเลือดดำ ผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยที่มีลิ้นหัวใจเทียม และผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาล โดยในผู้ที่ฉีดยาเสพติดเข้าหลอดเลือดดำ มักมีลิ้นหัวใจอักเสบของห้องหัวใจซีกขวา ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอายุน้อย ส่วนใหญ่ไม่มีลิ้นหัวใจผิดปกติมาก่อน และมีอัตราตายต่ำ ส่วนรายที่ไม่ได้ฉีดยาเสพติดมักเกิดลิ้นหัวใจอักเสบเป็นกับห้องหัวใจซีกซ้าย เป็นผู้ป่วยสูงอายุ มักมีลิ้นหัวใจชำรุดเดิม (Fowler et al., 1999)

(3) โรคติดเชื้อชนิดแพร่กระจาย (Metastatic infection) พบการแพร่กระจายในตำแหน่งเฉพาะ เช่น กระดูก ข้อ ไต และปอด การอักเสบเป็นหนองที่ตำแหน่งเหล่านี้เป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกลับซ้ำ (Recurrent infection; Fowler et al., 1999)

(4) โรคปอดอักเสบ ผู้ป่วยที่มีอาการปอดอักเสบที่เกิดในชุมชนพบได้ร้อยละ 1 – 10 ซึ่งเกิดจาก *S. aureus* และเพิ่มสูงเป็นร้อยละ 16 ในผู้ป่วยปอดอักเสบที่ติดเชื้อในโรงพยาบาล ซึ่งลักษณะอาการและการตรวจภาพถ่ายรังสีทรวงอกของปอดอักเสบจาก *S. aureus* พบว่าไม่มีความแตกต่างจากปอดอักเสบจากแบคทีเรียชนิดอื่นแต่โรคปอดอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อโดย *S. aureus* มีอันตรายและอัตราการตายสูงกว่า (พรรณทิพย์ ฉายากุล, 2540)

4.2.4 การใช้ยารักษาโรคติดเชื้อ MRSA

ยาที่นำมารักษาโรคติดเชื้อ MRSA ที่ใช้รักษาในประเทศไทยได้ผลดีคือ Glycopeptides, Fusidic acid, Fosfomycin, Fluoroquinlone, Trimethoprim–sulfamethoxazole และ Linezolid

4.2.4.1 ยาต้านเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มไกลโคเพปไทด์ (Glycopeptides) ปัจจุบันมีการใช้อยู่ 2 ชนิด คือ Vancomycin และ Teicoplanin

(1) ยาแวนโคไมซิน (Vancomycin) เป็นยามาตรฐานสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ที่รุนแรง ได้มีการนำ Vancomycin มาใช้นานกว่า 40 ปีแล้ว แต่ยานี้ยังเป็นยาที่ใช้กันน้อยจนกระทั่งมีปัญหาการติดเชื้อ MRSA ขึ้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1982 เป็นต้นมาจึงมีการใช้ยานี้มากขึ้น การใช้ Vancomycin รักษาโรคติดเชื้อ MRSA ยาออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยการยับยั้งการสร้าง Peptidoglycan โดยจะจับกับส่วน D-alanine-Dalanine ที่ปลายสาย Pentapeptide ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างต้นกำเนิดของ Peptiglycan ทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Tranglycosylase ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการใช้ยากลุ่ม Penicillinase – resistant penicillin ข้อเสียของยา Vancomycin คือมีความเป็นพิษต่อหูและไต ซึ่งขนาดของยา Vancomycin ที่ใช้ทั่วไปคือ 750 – 1,000 มิลลิกรัม ทุก 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงอายุ น้ำหนักเพื่อการคำนวณขนาดของยา

(2) ยาไทโคพลานิน (Teicoplanin) เป็นยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้ง MRSA ที่รุนแรงได้ผลใกล้เคียงกับ Vancomycin กลไกการออกฤทธิ์ของ Teicoplanin เหมือนกับ Vancomycin คือ ยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยจับกับ Terminal D–ala–D–sequence ของ Peptide ในการสร้าง Peptidoglycan มีฤทธิ์ฆ่า *S. aureus* ได้น้อยกว่า Vancomycin และออกฤทธิ์ฆ่า Coagulase–negative staphylococci (CNS) เท่าเทียมกับ Vancomycin และเนื่องจาก Teicoplanin และ Vancomycin มีกลไกในการออกฤทธิ์เหมือนกัน ดังนั้นเชื้อที่ดื้อต่อ Vancomycin ก็จะดื้อต่อ Teicoplanin ด้วย (Lowy, 2003)

4.2.4.2 กรดฟูสิดิก (Fusidic acid) เป็นยาในกลุ่มฟูสิเดน (Fusidane) มีฤทธิ์แคบครอบคลุมเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* รวมทั้ง MRSA ด้วย ยานี้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียและมีฤทธิ์เป็นเพียงการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเท่านั้น (Bacteriostatic) แต่ที่ความเข้มข้นสูงยาอาจออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (Bactericide) ได้ ไม่มีการดื้อยาข้ามกลุ่มกับยากลุ่มอื่น ๆ กรดฟูสิดิกมีทั้งในรูปยาฉีดและยากิน ข้อเสียของกรดฟูสิดิกคือ จับกับโปรตีนสูง (ร้อยละ 95 – 97) และเกิดการดื้อยาในระหว่างการรักษา จึงต้องใช้ร่วมกับยาตัวอื่นเสมอ เช่น Gentamicin, Rifampin และ Vancomycin เป็นต้น เมื่อใช้กรดฟูสิดิกร่วมกับยาดังกล่าวสามารถใช้รักษาโรคติดเชื้อจาก MRSA ได้ (นลินี อัศวโภค, 2547)

4.2.4.3 ยาฟอสโฟมายซิน (Fosfomycin) เป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อและจัดอยู่ในกลุ่มกรดฟอสโฟนิค (Phosphonic acid) โดยการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ในระยะแรกของแบคทีเรียซึ่งต่างจากกลุ่มเบต้าแลคแตมซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งในขั้นตอนสุดท้าย ดังนั้นยาฟอสโฟมายซินจึงไม่มีการดื้อยาข้ามกลุ่มกับยากลุ่มเบต้าแลคแตม และยาในกลุ่มอื่น ๆ ยาฟอสโฟมายซินมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่จับกับโปรตีนในพลาสมาและละลายน้ำได้ดีสามารถเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ดี (พรรณทิพย์ ฉายากุล, 2540) ซึ่งในประเทศไทยเชื้อ MRSA ประมาณร้อยละ 70 - 80 ไวต่อยานี้ เป็นยาที่ฉีดเข้าหลอดเลือดดำในขนาด 20 - 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทุก 12 ชั่วโมง การรักษาการติดเชื้อ MRSA ควรใช้ร่วมกับยาขนานอื่น (เช่น Rifampicin ขนาด 300 มิลลิกรัมวันละ 2 ครั้ง) เพื่อหวังผลการเสริมฤทธิ์และที่สำคัญคือการป้องกันการดื้อยา Fosfomycin โดย MRSA (Lowy, 2003)

4.2.4.4 ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนส์ (Fluoroquinlone) ยา Ciprofloxacin, Ofloxacin และ Pefloxacin มีประสิทธิภาพดีปานกลางต่อ *S. aureus* (ทั้ง MSSA และ MRSA) โดยมีค่า MIC 0.5 - 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ปัญหาที่พบในการใช้ฟลูออโรควิโนโลนส์ในการรักษาการติดเชื้อของ *S. aureus* ที่รุนแรงคือ เชื้อจะดื้อต่อยากลุ่มนี้ได้ง่าย จึงไม่ควรใช้เป็นยารักษาเพียงตัวเดียวสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากเชื้ออาจเกิดการดื้อยาในระหว่างการรักษาได้ ถ้าจำเป็นต้องใช้ยากลุ่มนี้ควรให้ใช้ร่วมกับยา Rifampin หรือยาตัวอื่นเสมอ (พรรณทิพย์ ฉายากุล, 2540)

4.2.4.5 ยาไตรมิโทรพริม-ซัลฟาเมตโทซาโซล (Trimethroprim-Sulfamethoxazole, TMP-SMX) มีรายงานการใช้ยา TMP-SMX ในการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ที่รุนแรง เช่นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและลิ้นหัวใจอักเสบเนื่องจากยานี้สามารถซึมผ่านเข้าสู่น้ำไขสันหลังได้ดี (Lowy, 2003)

4.2.4.6 ยาไลน์โซลิต (Linezolid) เป็นยาในกลุ่ม Oxazolidinones มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากยากลุ่มเบต้า-แลคแตม และไกลโคเพปไทด์ ยานี้มีฤทธิ์ต่อเชื้อ MRSA ทุกสายพันธุ์รวมทั้งสายพันธุ์ของ *S. aureus* ประเภท Vancomycin - heteroresistant *S. aureus* ยานี้มีทั้งฉีดเข้าหลอดเลือดดำและยารับประทาน โดยยารับประทานจะถูกดูดซึมได้ทั้งหมด ผลข้างเคียงที่สำคัญของยานี้คือทำให้เกล็ดเลือดลดลงโดยมักพบในผู้ป่วยที่ได้รับยานานเกิน 2 สัปดาห์ และเมื่อหยุดยา จำนวนเกล็ดเลือดก็จะเพิ่มขึ้นจนปรกติได้ (Lowy, 2003)

4.3 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

นิรมล วิทิตภัทรภาคย์ (2541) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อจาก MRSA ในวชิรพยาบาล พบว่าอัตราการพบเชื้อ MRSA เพิ่มสูงขึ้นในปี พ.ศ. 2537, 2538 และ 2539 จาก 26.50% เป็น 34.57% และ 38.74% ตามลำดับ โดยสิ่งส่งตรวจที่พบ MRSA มาก ได้แก่ แผล หนอง และระบบทางเดินหายใจพบประมาณ 30 – 40% ของทั้ง 3 ปี และผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ทำให้ทราบว่า MRSA ยังคงมีความไวต่อ Vancomycin สูงมากกว่า 95.00% ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่ทำการศึกษา ส่วนยาที่มีความไวปานกลาง ได้แก่ Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Netilmicin และ Chloramphenicol

สุนิสา หนูแก้วขวัญ และคณะ (2542) ได้ทำการศึกษาอุบัติการณ์ของ *S. aureus* และ MRSA ในโรงพยาบาลชลบุรีและโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2536 ถึงเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2537 รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 8 เดือน จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 317 ตัวอย่าง พบ MSSA จำนวน 7 ตัวอย่าง (2.20%) และพบ MRSA จำนวน 5 ตัวอย่าง (71.43%) จากการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพพบว่า *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา Penicillin G และ Clindamycin ส่วน

MRSA ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา Oxacillin, Ampillin, Clindamycin และ Penicillin G แต่ทั้ง *S. aureus* และ MRSA ทุกสายพันธุ์ไวต่อ Cefotaxim และ Ciprofloxacin มากที่สุด

วาริศา ศิริประทุม (2543) ได้ทำการศึกษาอุบัติการณ์ของ MRSA ในบุคลากรของโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา โดยเก็บสิ่งส่งตรวจจากช่องจมูก (Nasal swab) โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างและอาศัยความสมัครใจของบุคลากรแต่ละแผนกจำนวน 18 แผนก รวมจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 208 ราย นำมาเพาะเชื้อและตรวจหา MRSA ทำการทดสอบความไวต่อยา Oxacillin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ดิสค์ โดยวิธี Disk diffusion และทดสอบยืนยันด้วยการเพาะเชื้อบน Mueller Hinton Agar ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 4% และ Oxacillin ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแผนกที่พบ MRSA มากที่สุดได้แก่ แผนกศัลยกรรมชาย โดยพบ MSSA จำนวน 4 สายพันธุ์ (1.92%) และพบว่าเป็น MRSA จำนวน 3 สายพันธุ์ (75.00%) ส่วนในแผนกที่ไม่พบ MRSA คือ แผนกสูติกรรมพิเศษและสูติกรรมสามัญ

จุฑามณี พูลสวัสดิ์ และมณฑล เสิศคณาวนิชกุล (2547) ได้ศึกษาตรวจหาเชื้อ MRSA จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชุมพรเขตอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร โดยการเก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อจากผู้ป่วยจำนวน 10 คน รวม 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ MRSA ในผู้ป่วยจำนวน 3 ราย (16.60%) และจากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า MRSA ดื้อต่อยา Nalidixic acid ขณะที่ MSSA ทั้งหมดดื้อยาในกลุ่ม Penicillin เช่น Oxacillin, Ampicillin และยา กลุ่มอื่น ๆ เช่น Nalidixic acid, Gentamicin, Erythromycin, Tetracycline และ Trimetroprim

ดวงชีวัน พึ่งสุรินทร์ และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2549) ได้ศึกษาการเกิดอุบัติการณ์และความไวต่อยาปฏิชีวนะของ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทราในเวลา 10 ปีที่ผ่านมา พบว่าตรวจพบ MRSA จำนวน 13 ตัวอย่าง (3.39%) จากจำนวนสิ่งส่งตรวจ 531 ตัวอย่าง และพบ MRSA มากที่สุดในสิ่งส่งตรวจประเภทช่องคลอด เสมหะและลำคอ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 13 ชนิด พบว่า MRSA มีการดื้อต่อ Penicillin G, Ampicillin และ Oxacillin สูงถึง 100% แต่ไวต่อยา Trimethoprim – sulfamethoxazole มากที่สุด

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ก) ทำการศึกษาถึงการระบาดวิทยาของ *S. aureus* โดยคัดแยกจากโรงพยาบาลสมเด็จ ณ ศรีราชา โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 400 ไอโซเลท โดยพบ *S. aureus* ในสิ่งส่งตรวจประเภทหนองมากที่สุด (36.75%) รองลงมาคือ หนอง (35.50%) เลือด (22.75%) ปัสสาวะ (3.50%) และสิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลว (1.50%) ตามลำดับ ซึ่งจัดเป็น MRSA และ MSSA จำนวน 250 และ 150 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยเสมหะเป็นสิ่งส่งตรวจที่พบ MRSA และ MSSA สูงที่สุด เป็นจำนวน 58 (39.46%) และ 89 (60.54%) ไอโซเลท ตามลำดับ รองลงมาคือ สิ่งส่งตรวจประเภทหนอง จำนวน 88 (61.97%) และ 54 (38.03%) ไอโซเลท ตามลำดับ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ข) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรสำเร็จรูปจำนวน 2 ชนิด คือ ส้มแขก และกระชายดำในการยับยั้งการเจริญของ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และ Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) กลุ่มละ 20 ไอโซเลท ด้วยวิธี Disk diffusion พบว่าสารสกัดจากส้มแขก ณ ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งจำนวน MRSA และ MSSA เท่ากับ 75% และ 60% ตามลำดับ จากจำนวน MRSA 20 ไอโซเลทและ MSSA 20 ไอโซเลท ส่วนสารสกัดกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญจำนวน MRSA และ MSSA เท่ากับ 25% และ 10% ตามลำดับ จากจำนวน MRSA 20 ไอโซเลทและ MSSA 20 ไอโซเลท ดังนั้นจากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดส้มแขกและกระชายดำ

ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูปมีความสามารถในการยับยั้ง MRSA และ MSSA ได้ และน่าจะนำมาประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะที่รักษาโรคที่เกิดจาก MRSA และ MSSA ได้ในอนาคต

พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าจำนวน 2 ชนิด คือ ขมิ้นชันและกระเทียม เปรียบเทียบกับสารสมุนไพรสกัดสดจำนวน 6 ชนิด (ขมิ้นชัน กระเทียม ขิง ข่า พริก และใบมะกรูด) และนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง MRSA และ MSSA กลุ่มละ 20 ไอโซเลท ด้วยวิธี Disk diffusion พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA และ MSSA เท่ากับ 10% และ 5% ตามลำดับ จากจำนวน MRSA และ MSSA กลุ่มละ 20 ไอโซเลท ส่วนสารสมุนไพรสกัดสดจากสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม ดังนั้นจากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรสำเร็จรูปขมิ้นชันน่าจะมีความสามารถในการนำไปใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียทดแทนยาปฏิชีวนะได้

Guilarde et al. (1996) ทำการศึกษาเพื่อประเมินการติดเชื้อ MSSA ในกระแสเลือดและปัจจัยเสี่ยงของการเสียชีวิต โดยนำข้อมูลทางการแพทย์ของกลุ่มผู้ป่วยในโรงพยาบาลแถบตะวันตกของประเทศบราซิล ระหว่างเดือนมกราคม ปี ค.ศ. 2000 ถึง เดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2001 มาเป็นแนวทางการศึกษา พบว่าจากผู้ป่วยจำนวน 111 คน ที่ระบุว่าติดเชื้อ MSSA ในกระแสเลือด (5.00%) พบ การติดเชื้อในโรงพยาบาล 83.80% และการติดเชื้อ MRSA 60.20% ผู้ป่วยที่ติดเชื้อและเสียชีวิตพบ 35.10% ซึ่งสาเหตุของการเสียชีวิตคือ การติดเชื้อขั้นรุนแรง และการไม่ได้รับการรักษาที่ดีพอ การลดอัตราการเสียชีวิต ทำได้โดยได้รับการวินิจฉัยและรับการรักษาอย่างรวดเร็ว

Kerttula et al. (2004) ทำการศึกษา MRSA ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 – 2002 ที่เมือง Helsinki ประเทศฟินแลนด์ พบว่าสามารถแยก MRSA ได้จากตัวอย่างจำนวน 1,718 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเลือด 1.90%, ปัสสาวะ 4.60% และอื่น ๆ 93.50% โดยช่วงอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่พบ MRSA จะอยู่ที่ 65 ปี และพบว่าเป็นผู้ชาย 49.00% ซึ่งในปี ค.ศ. 1997 พบ MRSA 0.23% และในปี ค.ศ. 2002 พบ 1.15% นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 65 ปีที่รักษาตัวในโรงพยาบาลที่ตั้งอยู่ในเขตเมือง Helsinki จะมีโอกาสติดเชื้อ MRSA ได้สูงกว่าช่วงอายุอื่น ๆ ส่วนโรงพยาบาลในเขตนอกเมือง Helsinki มีอัตราการเพิ่มขึ้นของ MRSA ได้สูงกว่าโรงพยาบาลในเขตเมืองโดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นจากจาก 31.00% เป็น 63.00%

Brown and Ngeno (2007) ศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพจาก MSSA ที่คัดแยกจากผู้ป่วยในชุมชนของประเทศจาไมกา โดยศึกษาจาก MSSA ที่ผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคแตมจำนวน 80 สายพันธุ์ ทำการทดสอบโดยวิธี Disk diffusion พบว่าจากสิ่งส่งตรวจพบลักษณะการดื้อยาหลายกลุ่มในสิ่งส่งตรวจประเภท ปัสสาวะ และช่องคลอด โดยพบเป็น MRSA จากโรงพยาบาล (46.00%) เมื่อศึกษาลักษณะแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า MRSA มีลักษณะการดื้อต่อยาหลายกลุ่มและไม่พบ MRSA ที่ดื้อต่อยา Vancomycin ยกเว้นยา Penicillin G และยา Trimethoprim-sulfamethoxazole ส่วนในสายพันธุ์ MSSA พบลักษณะแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพในลักษณะที่คล้ายกัน

5. วิธีดำเนินการทดลอง

จากการศึกษาในปีที่ผ่านมาได้ศึกษาถึงการระบาดวิทยา ความไวต่อยาต้านจุลชีพ และการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสของ *S. aureus* ซึ่งประกอบด้วย Methicillin - susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) และ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 400 ไอโซเลต จาก 3 โรงพยาบาล คือ โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา สำหรับในปีที่ 2 ของการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาต่อจากปีที่ผ่านมา โดยทำการตรวจหายีน *mec*A ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ของสารสังเคราะห์จำนวน 12 ชนิด ต่อแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อ Methicillin ที่แยกได้จากโรงพยาบาลในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.1 การตรวจหายีน *mec*A โดยวิธี PCR

5.1.1 การสกัด DNA (ดัดแปลงจาก Fusun et al., 2007)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Tryticase Soy agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว 5-6 โคโลนี ไปปั่นที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง ปริมาตร 100 µl หลังจากนั้นเติม Lysis solution (1 %TritonX-100, 10 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) ปริมาตร 100 µl จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วดูด Supernatant ปริมาตร 80 µl จากนั้นเติม 3 M Sodium acetate pH 8 ปริมาตร 8 µl (1:10 volume), Ice-cold absolute ethanol ปริมาตร 48 µl (6:10 volume) เพื่อตกตะกอน DNA จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Ice-cold ethanol 70 % ปริมาตร 300 µl แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นผึ่งให้แห้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 20 µl ใช้ 2 µl สำหรับเป็น template ในการทำ PCR หรือเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.1.2 Oligonucleotides (Ryffela et al., 1990)

ในการตรวจหายีน *mec*A โดยวิธี PCR จะใช้ Primer *mec*A1(5'- TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG-3' *mec*A2(5'- CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG - 3')

5.1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR; Fusun et al., 2007)

นำ DNA ของแบคทีเรียที่ทำการสกัดเรียบร้อยแล้วเตรียมสารละลายซึ่งส่วนผสมทั้งหมด 50 µl ประกอบด้วย 10x buffer 5 µl (500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl pH 9.0) dNTP mix (10 mM) 1.25 µl, Forward primer (10 µM) 1 µl, Reverse primer (10 µM) 1 µl, Template 2 µl และ *Taq* DNA polymerase (5000 U/ml) 0.5 µl และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 35.5 µl ซึ่งความเข้มข้นทั้งหมดรวมกันจะได้ 50 µl ผสมส่วนต่าง ๆ ให้เข้ากัน ปิดหลอดปฏิกิริยาให้สนิท นำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initiation denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	15 นาที

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตามขั้นตอนต่อไปนี้ จำนวน 35 รอบ

Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 วินาที
Annealing	50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 วินาที
Elongation	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Final extention	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10 นาที

5.1.4 Visualization

นำสารละสายจากปฏิกิริยา10 µl ผสมกับ Bromophenol blue (0.25% Bromophenolblue, 30% glycerol) ปริมาตร 2 µl จากนั้นนำ Load บน 2 % Agarose gel ใน TAE buffer (0.04 M Tris-Acetate, 0.01 M EDTA) ซึ่งมี Ethidium bromide (10 mg/ml) ผสมอยู่ 10 µl run gel เป็นเวลา 60 นาที ที่กำลังไฟฟ้า 80 V จากนั้นตรวจสอบโดยใช้ UV-transilluminator พร้อมบันทึกภาพ

5.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสังเคราะห์จำนวน 12 ชนิด ต่อแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* และ MRSA

5.2.1 การทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disk diffusion (NCCLS, 2004)

5.2.1.1 การเตรียมดิสก์ทดสอบของสารสังเคราะห์

คำนวณความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ที่ต้องการทดสอบและชั่งสารสังเคราะห์ให้ได้น้ำหนักที่คำนวณไว้ นำมาละลายด้วย 95% Ethanol ให้ได้ปริมาตรตามที่คำนวณไว้ หยดสารสังเคราะห์ลงบน Disk ไร้เชื้อแผ่นละ 20 ไมโครลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บใส่ใน Desiccator ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.2.1.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Disk Diffusion (Collins et al., 2004)

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มใน Suspension ของเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ และนำมาป้ายบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar เติม NaCl 4% ให้ทั่วจานอาหาร โดยป้าย 3 ระนาบแต่ละระนาบทำมุม 60 องศา ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟทิ้งไว้สักครู่ให้เย็นหยิบแผ่นดิสก์วางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่แบคทีเรียทดสอบถูกยับยั้ง (Inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตรและบันทึกผลการทดสอบ โดยเลือกสารสังเคราะห์ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญที่ดีที่สุดนำมาศึกษาต่อ

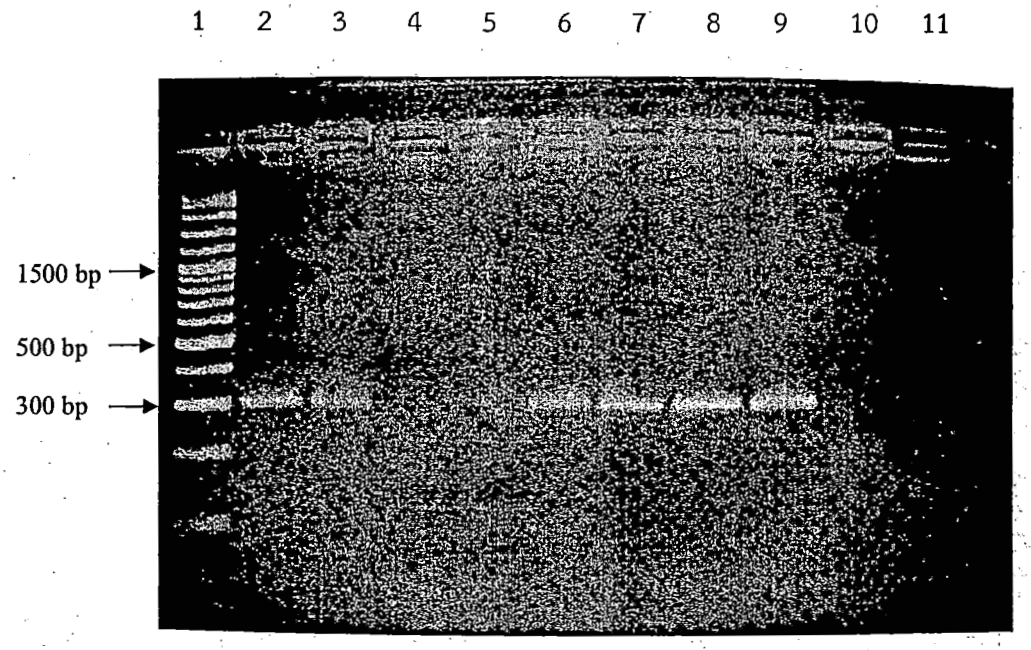
6. ผลการทดลอง

6.1 การตรวจหายีน *mec*A

จากการทดสอบพบว่า MRSA จำนวน 150 ไอโซเลต ที่ได้จากการศึกษาในปีที่ 1 สามารถตรวจพบยีน *mec*A ใน MRSA 58 ไอโซเลต (38.66%) โดยแบ่งเป็นการตรวจหาโดยวิธีการต้มด้วย Lysis buffer ซึ่ง MRSA ที่ตรวจพบยีน *mec*A จำนวน 33 ไอโซเลต (56.89%) และวิธีการต้มด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งพบยีน *mec*A ใน MRSA จำนวน 47 ไอโซเลต (81.03%) และไม่พบยีน *mec*A จาก MRSA จำนวน 92 ไอโซเลต (61.33%) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวน MRSA ที่ตรวจพบยีน *mec*A

MICs (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	จำนวน MRSA ที่ตรวจพบยีน *mec*A ด้วยเทคนิคต่างกัน (ไอโซเลท)		รวม (%)
	Lysis buffer	Distilled water	
32	2	-	2 (3.45%)
32	2	1	1 (1.72%)
64	-	3	3 (5.17%)
64	2	-	2 (3.45%)
>64	2	21	21 (36.21%)
>64	2	1	7 (12.07%)
>64	22	22	22 (37.93%)
รวม			58 (100.00%)



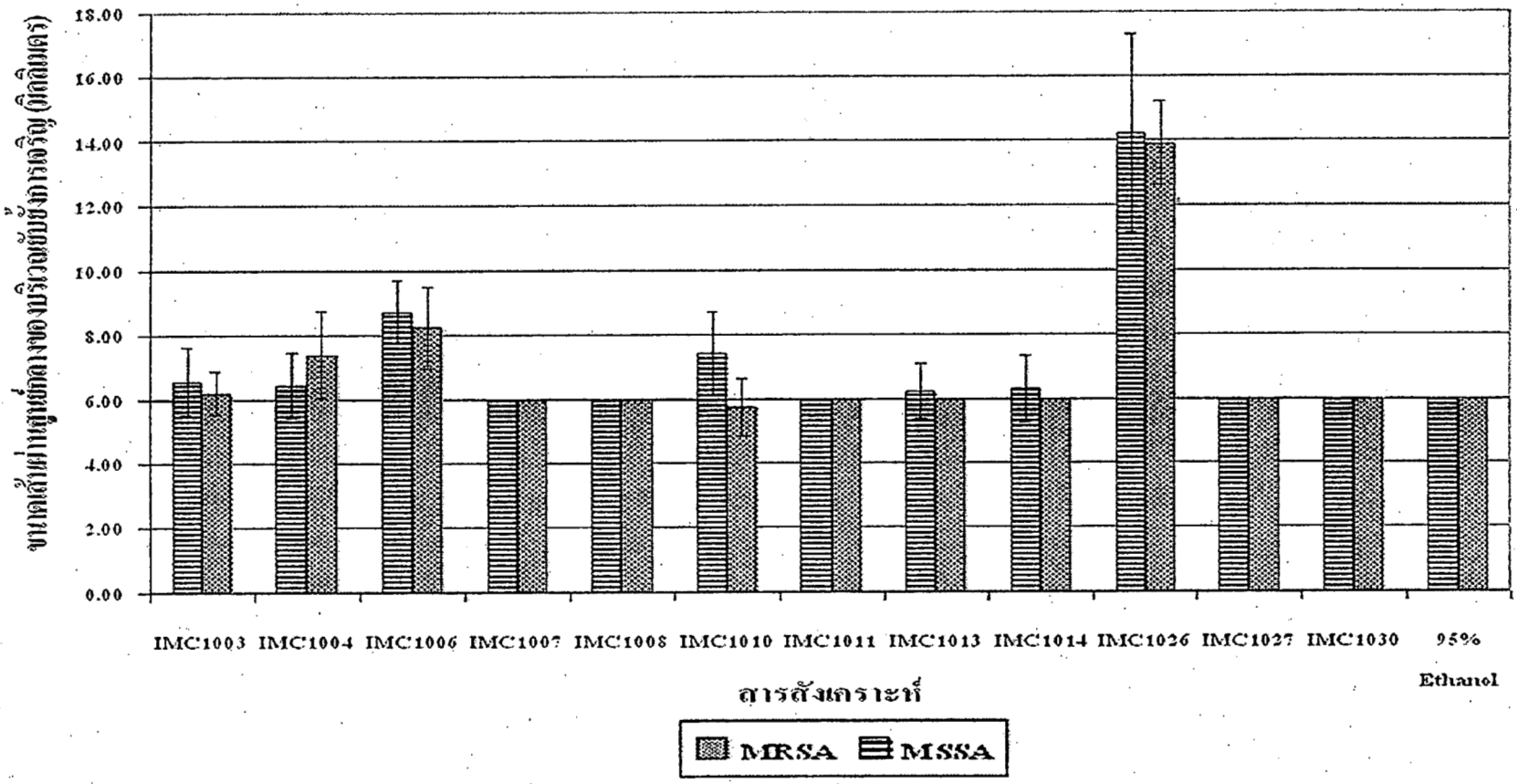
รูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ MRSA ที่พบปริมาณยีน *mec*A โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมจากวิธีการสกัดด้วยการเติม Lysis buffer หรือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ แถวที่ 1 DNA marker 100 bp, แถวที่ 2 MRSA ATCC 43300, แถวที่ 3, 5, 7, 9 เป็น MRSA ที่ต้มด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, แถวที่ 4, 6, 8 เป็น MRSA ที่ต้มด้วย Lysis buffer, แถวที่ 10 MSSA ATCC 25923, แถวที่ 11 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

จากการศึกษาระบาดวิทยาและลักษณะของ MRSA และ MSSA ที่แยกได้จากโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา ในปีที่ 1 คณะผู้วิจัยได้นำแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมาศึกษาต่อเนื่องถึงฤทธิ์การยับยั้งของสารสังเคราะห์ต่อ MRSA และ MSSA ซึ่งน่าจะมีศักยภาพในการพัฒนามาเป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ เพื่อนำมาทดแทนสารต้านจุลชีพที่ใช้ในปัจจุบันที่แบคทีเรียกลุ่มนี้ดื้อมากขึ้นในอนาคต โดยการศึกษาเบื้องต้นได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

6.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disk diffusion

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลทั้ง 12 ชนิด โดยวิธี Disk diffusion ตามมาตรฐานของ National committee for clinical laboratory standards (NCCLS, 2004) พบว่าดิสก์บรรจุสารสังเคราะห์ IMC1026 ปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของสารสังเคราะห์ชนิดอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของ MSSA และ MRSA อยู่ระหว่าง 13.00 $\pm$ 0.00 ถึง 17.67 $\pm$ 0.58 มิลลิเมตร และ 7.67 $\pm$ 0.58 ถึง 17.00 $\pm$ 0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการยับยั้งการเจริญของสารสังเคราะห์ชนิดอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แสดงดังในรูปที่ 5 และตารางที่ 2



รูปที่ 5 การยับยั้งการเจริญของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอล 12 ชนิด ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ กับแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA และ MSSA ด้วยวิธี Disk diffusion

<u>หมายเหตุ</u> ควบคุมการทดลองด้วยดิสก์ที่บรรจุ 95% Ethanol และขนาดของดิสก์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีขนาดเท่ากับ 6 มิลลิเมตร

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอล 12 ชนิด กับแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion

แบคทีเรียทดสอบ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของดิสก์ที่บรรจุสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (มิลลิเมตร)							Positive control Cefoxitin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)	Negative control 95% Ethanol
	IMC1003	IMC1004	IMC1006	IMC1010	IMC1013	IMC1014	IMC1026		
MRSA1	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 1.00	8.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	17.00 ± 1.00	10.67 ± 1.53	6.00 ± 0.00
MRSA2	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	15.33 ± 1.15	6.00 ± 0.00
MRSA3	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.33 ± 1.15	15.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MRSA4	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.33 ± 0.58	15.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00
MRSA5	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	7.67 ± 0.58	15.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00
MRSA6	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	16.00 ± 0.00	11.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MRSA7	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.33 ± 0.58	11.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00
MRSA8	8.33 ± 0.58	9.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	9.00 ± 1.00	9.67 ± 0.58	15.33 ± 0.58	14.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MRSA9	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.33 ± 0.58	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.00 ± 0.00	9.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00
MRSA10	6.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	10.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	15.00 ± 1.00	9.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MRSA11	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.67 ± 0.58	9.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	17.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MSSA1	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	14.00 ± 0.00	34.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00
MSSA2	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.00 ± 0.00	31.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	บริเวณยับยั้งการเจริญของดิสก์ที่บรรจุสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (มิลลิเมตร)							Positive control Cefoxitin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)	Negative control 95% Ethanol
	IMC1003	IMC1004	IMC1006	IMC1010	IMC1013	IMC1014	IMC1026		
MSSA3	6.00 ± 0.00	9.00 ± 1.00	9.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	33.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MSSA4	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	34.00 ± 1.73	6.00 ± 0.00
MSSA5	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	34.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00
MSSA6	6.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	8.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.00 ± 0.00	34.00 ± 1.00	6.00 ± 0.00
MSSA7	8.33 ± 0.58	8.00 ± 0.00	9.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	14.00 ± 1.00	34.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MSSA8	6.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	32.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MSSA9	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.00 ± 0.00	34.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00
MSSA10	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	7.00 ± 1.73	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	32.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00
43300	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	7.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.33 ± 0.58	16.33 ± 1.15	6.00 ± 0.00
25923	6.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.67 ± 0.58	35.33 ± 0.58	6.00 ± 0.00

หมายเหตุ 43300, *S. aureus* ATCC43300; 25923, *S. aureus* ATCC25923; สารสังเคราะห์ IMC1007, IMC1008, IMC1011, IMC1027 และ IMC1030 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทุกไอโซเลต

7. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

MRSA มีการดื้อยากลุ่มเบต้าแลคแตม รวมทั้งยากลุ่ม Penicillinase - resistant Penicillin คือ Oxacillin ซึ่งการดื้อยาของ MRSA จากการศึกษาครั้งนี้อาจจะมาจากการเปลี่ยนแปลงโปรตีนบริเวณผนังเซลล์ (PBP) ที่ปกติให้เป็น PBP2a ซึ่งควบคุมโดยยีน *mec*A (Stapleton and Taylor, 2002) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบยีน *mec*A เพียง 37.33% และจากการทดลองพบว่า MRSA ส่วนใหญ่ (96.74%) มีการดื้อยามากกว่า 4 กลุ่มขึ้นไป ได้แก่การดื้อยากลุ่ม Cephalosporins, Aminoglycosides, 4-Quinolones และ Macroline แต่ส่วนใหญ่มักจะมีความไวต่อยา Chloramphenicol (94.00%) ผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Almer et al. (2002) ที่ศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพและลักษณะทางโมเลกุลของ MRSA ที่พบว่า MRSA มีความไวต่อยา Chloramphenicol (98.00%) เช่นกัน และมีการดื้อยาตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ได้แก่ Oxacillin, Erythromycin, Clindamycin, Ciprofloxacin และ Tetracycline

กลไกในการดื้อยาในหลายกลุ่มของ MRSA อาจเนื่องมาจากกลไกดื้อยาหลายชนิดได้แก่ Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) เป็น Mobile genetic element ซึ่งจะมี *mec*A เป็นส่วนหนึ่งด้วยและ Mobile genetic element นี้อาจทำให้เกิดการดื้อยาชนิดต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Jomaa et al. (2006) ที่ศึกษาลักษณะ SCC*mec* ของ *S. aureus* จากโรงพยาบาลในประเทศตูนีเซีย พบว่าจาก MRSA จำนวน 34 ไอโซเลต มีเพียง 3 ไอโซเลตเท่านั้นที่ดื้อเฉพาะยากลุ่มเบต้าแลคแตม ส่วนที่เหลืออีก 31 ไอโซเลต แสดงลักษณะการดื้อยาหลายกลุ่ม เช่น ยากลุ่ม Aminoglycosides, Fluroquinolones, Tetracyclin, Erythromycin, Clindamycin, Chloramphenicol และ Rifampicin นอกจากนั้นการที่ MRSA มีการดื้อยาหลายชนิดอาจได้รับยีนทำให้มีการสร้าง Aminoglycosides - modifying enzymes ทำให้ดื้อยากลุ่ม Aminoglycosides, Tetracycline และยีนที่ควบคุมการดื้อยาได้แก่ Efflux genes ยีนที่ดื้อยาของ Trimethoprime-sulfamethoxazole โดยการดื้อยากลุ่ม Macrolides เกิดจากการปรับเปลี่ยนเป้าหมายของ Active effux และการสร้างสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Mandell et al., 2002) การเพิ่มขึ้นของ Active efflux เป็นกลไกที่เซลล์แบคทีเรียมี Pump อยู่ที่ผนังเซลล์ (นลินี อัศวโภค และชุษณา สวนกระต่าย, 2549)

สารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลทั้ง 12 ชนิด เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีการทางเคมี และเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จึงยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสังเคราะห์ด้วยวิธี Disk diffusion ต่อแบคทีเรียทดสอบในกลุ่ม *S. aureus* ผลการทดสอบพบว่าเมื่อเปรียบเทียบขนาดของบริเวณยับยั้งของสารสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบทั้งหมดนั้น สารสังเคราะห์ IMC1026 ($C_9H_9NO_4$) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA ได้ร้อยละ 83.3 และ MSSA ร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบของ Yingyongnarongkul และคณะ (2006) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอล คือ Hydroxycinnamic acid amides (HCAAs) และอนุพันธ์ ด้วยวิธี Disk diffusion ต่อแบคทีเรียกลุ่ม MRSA จำนวน 11 ไอโซเลท และกลุ่ม VRSA จำนวน 4 ไอโซเลท โดยใช้ยา Vancomycin และยา Oxacillin เป็นยามาตรฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ พบว่าสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์กับ Cinnamoyl (Cinnamoyl analogues) และมี Side chain แตกต่างกันเป็น OH^-, OMe^-, Cl^- และ NO_2^- ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA และกลุ่ม VRSA ได้

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Evans and Furneaux (2000) ซึ่งทำการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอนุพันธุ์ของ Totarol กับแบคทีเรียกลุ่ม MRSA และแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ พบว่าสารสังเคราะห์ 2a มี Side chain ด้าน R เป็น NO_2 เมื่อนำมาหาค่า MIC พบว่าสารสังเคราะห์ 2a มีค่า MIC ต่อแบคทีเรียกลุ่ม MRSA มากกว่า 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับแบคทีเรียทดสอบกลุ่มอื่น ๆ และใกล้เคียงกับสารสังเคราะห์อื่น ๆ ยกเว้นสารสังเคราะห์ 1, 6a, 7a และ 8a การที่สารสังเคราะห์ 2a ซึ่งมี Side chain เป็น NO_2 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม MRSA ได้ ซึ่งเกิดจากส่วน Nitro-substituent ของสารสังเคราะห์ 2a มีการดึงอิเลคตรอนที่บริเวณ C-12 ทำให้เกิดการลดการทำงานของกิจกรรมภายในเซลล์อย่างมากส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม MRSA ได้ ดังนั้นการที่สารสังเคราะห์ IMC1026 มีส่วนของ Side chain ที่เป็น NO_2 เช่นเดียวกันก็อาจจะไปลดการทำงานของกิจกรรมภายในเซลล์ได้ จึงทำให้สารสังเคราะห์ IMC1026 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งกลุ่ม MRSA และ MSSA ได้ และจากการที่สารสังเคราะห์ IMC1026 ไม่มีองค์ประกอบของ β-lactam ring ในโครงสร้าง จึงทำให้เอนไซม์ β-lactamase ที่แบคทีเรียกลุ่ม MRSA สร้างขึ้นไม่สามารถทำให้โครงสร้างของสารสังเคราะห์ IMC1026 เสียสภาพได้ ดังนั้นสารสังเคราะห์ IMC1026 อาจจะเข้าไปจับกับ PBPs ปกติได้ และส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่ม MRSA ทำให้เซลล์แตกและตายได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในกรณีของแบคทีเรียกลุ่ม MSSA ซึ่งสารสังเคราะห์ IMC1026 สามารถยับยั้งการเจริญได้ กลไกการสร้างเอนไซม์มาทำลายยาก็ไม่น่าเกี่ยวข้องเนื่องจากแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MSSA นั้นไม่สามารถสร้างเอนไซม์ β-lactamase ได้ ดังนั้นสารสังเคราะห์ IMC1026 อาจจะมีกลไกอื่น ๆ ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบซึ่งต้องทำการทดสอบต่อไป

ม15.19
ก494
ร554
ฉ.3

301502

เอกสารอ้างอิง

จุฑามณี พูลสวัสดิ์ และมณฑล เสิศคณาวนิชกุล. (2547). การเฝ้าระวังเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จากผู้ป่วยในหอผู้ป่วยศัลยกรรมชาย โรงพยาบาลชุมพรเขต อุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร. *วารสารกรมอนามัย*, 25, 61-71.

ดวงชีวัน พึ่งสุรินทร์ และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2549). อุบัติการณ์และแบบแผนความไวของ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). เวทีนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3 วันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2549. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). *การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์*. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง.

นิรมล วิทิตภัทรภาคย์. (2541). การศึกษา Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ในวชิรพยาบาล. *วชิรวรสาร*, 42, 73-81.

นลินี อัศวโภค. (2547). การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย. ใน พรรณพิศ สุวรรณกูล, *An update on infection disease การอบรมระยะสั้นประจำปี 2547* (หน้า 33 - 37). กรุงเทพฯ: สุวิชาญการพิมพ์.

พรรณทิพย์ ฉายากุล. (2540). โรคติดเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). ในนลินี อัศวโภค (บรรณาธิการ), *ประสบการณ์ด้านโรติดเชื้อในประเทศไทย* (หน้า 26 - 30). กรุงเทพฯ: เฮลท์ ออทอริตี้.

พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. *วารสารพิษวิทยาไทย*, 25(1): 15-28.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2549). *ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์*. กรุงเทพฯ: วี.เจ.พริ้นติ้ง.

มาลัย วรจิตร. (2532). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *การประชุมสัมมนาวิชาการและปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 13*. วันที่ 18-20 มกราคม 2532.

วาริศา ศิริประทุม. (2543). *อุบัติการณ์ของ Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ในบุคลากรของโรงพยาบาลสมเด็จบรมราชเทวี ณ ศรีราชา*. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สมหวัง ด่านชัยวิจิตร และคณะ (2535). *การประชุมฟื้นฟูวิชาการประจำปี ครั้งที่ 33*. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพ ฯ: ชวนพิมพ์

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ดวงชีวัน พึ่งสุรินทร์, กาญจนา หริ่มเพ็ง และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553ก). การระบาดวิทยาของ *Staphylococcus aureus* และ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา. *วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ*, 42(2).

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553ข). ประสิทธิภาพของกระชายดำและส้มแขกสำเร็จรูปต่อ *Staphylococcus aureus*. *วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ*, 42(1), 71-85.

สุนิสา หนูแก้วขวัญ, สุบัณฑิต เมฆขยาย และบัญญัติ สุขศรีงาม. (2542). อุบัติการณ์และแบบแผนความไวของ *Staphylococcus aureus* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ในจังหวัดชลบุรี. *วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา* 4, 1-10.

อิทธิพันธ์ เจริญผล. (2535). *การประชุมฟื้นฟูวิชาการประจำปี ครั้งที่ 33*. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์

Abb, J. (2004). Frequency and diversity of molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from patients of a South West German teaching hospital. *Journal of Hospital Infection*, 56, 232-235.

Almer, S. L., Shortridge, D. V., Nilius, M. A., Beyer, M. J., Soni, B. N., Bui, H. M., Stoneb, G. G., and Flamm, K. R. (2002). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 43*, 225–232.

Atlas, R.M. (1995). *Microorganisms in our world*. St. Louis: Mosby.

Bello, C.S.S. and Qahtani, A. (2005). Pitfalls in the routine diagnosis of *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Biotechnology*, 4, 83-86.

Berger, B.B. (2002). Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 292, 27-35.

Bremer, P.J., Fletcher, G.C. and Osborne, C. (2004). *Staphylococcus aureus*. Christ Church, New Zealand: New Zealand Institute for Crop and Research, pp. 1-8.

Brooks, G.F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (22nd ed). New York: McGraw-Hill.

Brown, D.P. and Ngeno, C. (2007). Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and community sources in southern Jamaica. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(3), 220-225.

Collins, C.H., Lyne, Patricia M., Grange, J.M. and Falkinham, J.O. (2004). *Microbiological methods* (8th ed.). The United Kingdom: Arnold, a member of the Hodder Headline Group.

Critchley, I.A. (2006). Eradication of MRSA nasal colonization as a strategy for infection prevention. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3, 189-195.

Duijkeren, E.V., Box, A.T.A., Heck, M.E.O., Wannet, W.J.B. and Fluit, A.C. (2004). Methicillin resistant staphylococci isolated from animals. *Veterinary Microbiology*, 103, 91-97.

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. and Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 7687–7692.

Evans, G.B., & Furneaux, R.H. (2000). The synthesis and antibacterial activity of Totarol derivatives. Part 2: Modifications at C-12 and O-13. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *8*, 1653-1662.

Fernandez, M.G., Marrero, A., Pique, G.S., Castellanos, G.R. and Rush, G.X. (2004). Staphylococcal methicillin resistance: Fine focus on folds and infections. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 1-4.

Fowler, V.G., Sanders, L.L. and Kong, L.K. (1999). Infective endocarditis due to *Staphylococcus aureus*: 59 prospectively identified case with follow-up. *Clinical Infectious Disease*, 56, 624-632.

Fusun, Z. A., Gulgun, B., Tinaz, O. K., Arzu, T., Ebru, T., & Salih, H. (2007). Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in and comparison of *mec*A with *fam*A, *fem*B, *fem*X positive. *Microbiologal Research*, *157* (5), 433-436.

Gnanmani, A., Shanmuga Priya, K., Radhakrishnan, N., and Babu, M. (2003). Antimicrobial activity of two plant extracts on eight burn pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 59-61.

Gouaux, E. (1998). α-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An archetype of β-barrel, channel-forming toxins. *Journal of Structural Biology*, 121, 110-122.

Greenwood, D., Slack, R.C.B. and Peuthener, J.F. (2002). *Medical microbiology* (16th ed.). The United Kingdom: Elsevier Science.

Guilarde, A.O., Turchi, M.D., Martelli, C.M. and Primo, M.G. (1996). *Staphylococcus aureus* bacteraemia: Incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *Journal of Hospital Infection,* 63, 330-336.

Guilbeau, J.R. and Fordham, P.N. (2010). Evidence-based management and treatment of outpatient community-associated MRSA. *The Journal for Nurse Practitioners*, 6, 140-145.

Guzman-Blanco, M., Mejia, C., Isturiz, R., Alvarez, C., Bavestrello, L., Gotuzzo, E., Labarca, J., Luna, C.M., Rodroguez-Noriega, E., Salles, M.J.C., Zurita, J. and Seas, C. (2009). Epidemiology of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America: Review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 304-308.

Harbarth, S., Rotschmann, O., Sudre, T. and Pittet, D. (1999). Impact of methicillin-resistance on the outcome of patients with bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Archives International Medical,* 158, 182-189.

Henderson, A. and Brodie, F. (1963). Investigations on staphylococcal coagulase. *Journal of Experiment Pathogen*, 44, 524-528.

Japoni, A., Alborzi, A., Rasouli, M. and Pourabbas, B. (2004). Modification DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant Staphylococci. *Iranian Biomedical Journal*, 8, 161-165.

Jomaa, J.B.M., Boubaker, B.I. and Redjeb, B.S. (2006). Identification of staphylococcal cassette chromosome *mec* enconding methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates at Charles Nicolle Hospital of Tunis. *Pathologie Bioligie*, 10, 2437-2439.

Kennedy, A.D. and Deleo, F.R. (2009). Epidemiology and virulence of community-associated MRSA. *Clinical Microbiology Newsletter*, 31, 153-160.

Kenneth, T. (2008). *Text book of bacteriology.* วันที่ค้นข้อมูล 6 พฤษภาคม 2552, เข้าถึงได้จาก http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html

Kerttula, A.M., Lyytilainen, O., Salmenlinna, S. and Vuopio, V.J. (2004). Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. *The Journal of Hospital Infection*, 58, 109-114

Khandavilli, S., Wilson, P., Cookson, B., Cepeda, J., Bellingan, G. and Brown, J. (2009). Utility of *spa* typing for investigating the local epidemiology of MRSA on a UK intensive care ward. *Journal of Hospital Infection*, 71, 29-35.

Kim, J. (2009). Understanding the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbial Newsletter*, 31(3), 17-23.

Levinson, W. and Jawetz, E. (2002). Medical microbiology & immunology: Examination & board review (7th ed.). The United States of America: McGraw-Hill.

Liu, Q.Z., Wu, Q., Zhang, Y.B., Liu, M.N., Hu, F.P., Xu, X.G., Zhu, D.M. and Ni, Y.X. (2010). Prevalence of clinical meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with high-level mupirocin resistance in Shanghai and Wenzhou, China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 114-118.

Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, 339, 520-532.

Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1265-1273.

Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (2002). *Staphylococcus aureus.* In Mandell, G.L., Gouglas and Bennett J.E. (Eds.), *Principles and practice of infectious diseases* (5th ed.) (pp. 1040-1061). New York: Churchill Livingstone.

Mann, N.H. (2008). The potential of phages to prevent MRSA infections. *Research in Microbiology*, 159, 400-405.

Miller, R., Esmail, H., Peto, T., Walker, S., Crook, D. and Wyllie, D. (2008). Is MRSA admission bacteraemia community-acquired? A case control study. *Journal of Infection*, 56, 163-170.

National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]. (2004). NCCLs document M2-A8 Vol. 24 No.1.

National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]. (2007). NCCLs document M2-A8 Vol. 27 No.1.

Parker, M.T. and Duerden, B.I. (1990). *Tropley and Wilsons principles of bacteriology, Virology and Immunity* (8th ed.). Britain: Butler & Tanner.

Reich-Schupke, S., Warneke, K., Altmeyer, P. and Stucker, M. (2010). Eradication of MRSA in chronic wounds of outpatients with leg ulcers is accelerated by antiseptic washes-results of a pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213, 88-92.

Rollof, J. and Normark, S. (1992). In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. *Journal of Bacteriology*, 174 (6), 1844-1847.

Ryffel, C., Strassle, A., Kayser, F.H. and Berger-Bachi, B. (1994). Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 724-728.

Ryffela, C., Tesch, W., Brich-Machin, I., Reynolds, E. P., Berberis-Maion, L., Kayser, H. F., and Berger, B. (1990). Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Brief Note, 25,* 137 - 138.

Stapleton, P.D. and Taylor, P.W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and modulation. *Science Program*, 85 (Pt 1), 57-72.

Talaro, K. (2008). *Foundation in Microbiology*. New York: The McGraw-Hill.

Tenover, F.C., Biddle, J.W. and Lancaster, M.V. (2001). Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 327-332.

Todar, K. (2008). Todar's Online textbook of bacteriology. วันที่ค้นข้อมูล 6 พฤษภาคม 2552, เข้าถึงได้จาก http://www.textbookofbacteriology.net/.

Tomasz, A., Drugeon, B.H., de Lencastre, M.H., Jabes, D., Mcdougall, L. and Bille, J. (1989). New mechamism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding capacity. *Journal of Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 33, 1869-1874.

Volk, W.A. and Wheeler, M.F. (1988). Basic microbiology (6^{th} ed.). New York: Harper and Row. Willey, J.M., Sherwood, L.K. and Woolverton, C.J. (2009). Prescott's principles of microbiology. New York: McGraw-hill

Zaher, A., Thawadi, A.L., Sahar, M. and Cimolia, N. (1997). Beta-lactamase negative, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* lacking the *mecA* gene determinant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, 108-109.

301502

Output จากโครงการวิจัยในปีที่ 2

ผลงานตีพิมพ์ในการประชุมวิชาการในประเทศ

พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ ดวงชีวัน พึ่งสุรินทร์ กาญจนา หริ่มเพ็ง วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2554) การผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสของ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่แยกได้จากโรงพยาบาลในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา. การประชุมวิชาการวิจัยรำไพพรรณี ครั้งที่ 5 และการประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 2 เรื่องการวิจัยเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืนและเศรษฐกิจพอเพียง ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี วันที่ 19-20 ธันวาคม 2554 (Submitted)

Nimrat, S., Puengsurin, D., Labhlay, S., Hrimpeng, K., Srisook, E., Vuthiphandchai, V. Novel Synthetic Compound against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Occurred in Chon Buri and Chacheongsao Provinces. (Submitted)