การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Lipovitellin Mannitol Salt Agar Supplemented with Oxacillin ตรวจหาเชื้อ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก

The Use of Lipovitellin Mannitol Salt Agar Supplemented with Oxacillin for Direct Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Clinical Specimens

สุภาภรณ์ พัวเพิ่มพูลศิริ (Supaporn Puapermpoonsiri)[1]
จุฬารัตน์ ปริยชาติกุล (Churarut Prarichatigul)[1]
เกษแก้ว เพียรทวีชัย (Ketkaew Pientaweechai)[1]
ลำใย วงลคร (Lumyai Wonglakorn)[2]
โชคชัย วิลาชัย(Chokchai Vilachai)[2]
จันทร์เพ็ญ บัวเผื่อน(Janpen Bourpaun)[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการประเมินประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ Lipovitellin mannitol salt agar(LMS) และ LMS ที่เติม oxacillin 6 μg/ml. (LMS-OX) ในการเพาะแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ เชื้อ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ที่ใช้ในงานตรวจประจำวัน ผลการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจได้แก่ หนอง เสมหะ และเลือด จำนวน 1,926 ตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX สามารถแยกเชื้อ *S. aureus* จำนวน 387 สายพันธุ์ และ MRSA 203 สายพันธุ์ ได้จำนวนมากกว่าผลการเพาะเชื้อวิธีเดิมที่เพาะเลี้ยงบน blood agar ซึ่งแยกได้เชื้อ *S. aureus* เพียง 231 สายพันธุ์ และเชื้อ MRSA 130 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การแยกได้เชื้อ MRSA จากอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS-OX ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจหา PBP2a ของเชื้อ MRSA ด้วยวิธี slide latex agglutination ถึงร้อยละ 99.01 (201/203 สายพันธุ์) เชื้อ *S. aureus* และ MRSA เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS มีโคโลนีสีเหลืองและมีโซนทึบแสงรอบ ๆโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะ จึงช่วยให้แยกเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจได้ง่าย ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆที่ปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมากในสิ่งส่งตรวจ เช่น เสมหะ ได้ง่ายและแยกเชื้อได้จำนวนมากกว่าและเร็วกว่าวิธีเพาะเชื้อที่ใช้ blood agar 1-2 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อนี้จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* และ MRSA จากสิ่งส่งตรวจในงานตรวจประจำวันที่มีปริมาณสิ่งส่งตรวจจำนวนมาก และใช้ในการตรวจกรองหาพาหะของเชื้อในประชากรกลุ่มใหญ่ได้ดี

Abstract

The aim of this study was to evaluate the use of Lipovitellin mannitol salt agar (LMS) and LMS supplemented with oxacillin 6 μg/ml (LMS-OX) for their ability to directly isolate, recover and presumptively identify of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) from clinical specimens. We compared the use of LMS and LMS-OX with the conventional media, blood agar, to detect and recover *S. aureus* and MRSA from 1,926 samples of clinical specimens including pus, sputum and blood samples. Three hundred and eighty seven isolates of *S. aureus* and 203 isolates of MRSA were more significantly recovered from LMS and LMS-OX than from routine culture using blood agar plate which recovered only 231

[1]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*พยาบาลชำนาญการ หน่วยควบคุมโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

S. aureus and 130 MRSA, ($P < 0.05$). LMS-OX gave a 99.01 % (201/203 isolates) correlation with the detection of PBP2a by slide latex agglutination for identification of MRSA. The advantage of using LMS and LMS-OX as primary culture medium are ease and rapid recognition of typical colonies of *S. aureus* and MRSA which produced yellow colonies with opaque zone, from clinical specimens, especially from those with heavy contamination with bacterial flora such as sputum. These will shorten the time for the detection of *S. aureus* and MRSA for 1-2 days. Therefore, these media may be the alternative plating medium for the detection and isolation of *S. aureus* and MRSA in routine clinical laboratories with a large number of specimens and for screening carriers in large populations.

คำสำคัญ: *S. aureus*, MRSA, อาหารเลี้ยงเชื้อ lipovitellin mannitol salt agar (LMS)

Keywords: *S. aureus*, MRSA, Lipovitellin mannitol salt agar (LMS)

บทนำ

เชื้อ *S. aureus* ดื้อต่อยา methicillin หรือที่เรียกว่า methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ปัจจุบันพบผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA จำนวนมากขึ้นและมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากเชื้อ MRSA มักดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (Perry et al.,1998; Speller et al., 1997) จึงต้องรักษาด้วยยา vancomycin ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ผู้ป่วยและโรงพยาบาลต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลมากขึ้น จึงมีความจำเป็นต้องมีมาตรการในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อ MRSA อย่างได้ผล ซึ่งแนวทางหนึ่งที่สำคัญ ได้แก่ มีการเฝ้าระวังและตรวจค้นหาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ MRSA รวมทั้งตรวจหาพาหะของเชื้อ MRSA ในบุคลากรทางการแพทย์และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องตรวจแยกและวินิจฉัยเชื้อ MRSA ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำและเชื่อถือได้

มีการประยุกต์โดยเติม egg yolk suspension ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น lipovitellin mannitol salt agar (LMS) พบว่าเชื้อ *S. aureus* มีเอนไซม์ lipase สามารถย่อยสลาย lipovitellin ในไข่แดงได้ทำให้เกิดเป็นโซนทึบแสงรอบ ๆโคโลนีของเชื้อ (Gunn et al., 1972) ช่วยให้สังเกตโคโลนีสีเหลืองที่เกิดจากการเฟอร์เมนท์ (ferment) น้ำตาลแมนนิทอลของ *S. aureus* ได้ง่ายขึ้น ส่วน NaCl 7.5% ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อ Gram negative bacilli ได้ แต่การวินิจฉัยเชื้อ MRSA ยังต้องทำการทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ต่อยา oxacillin (Merlino et al., 1996) ดังนั้นหากเติมยา oxacillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS จะสามารถตรวจกรองเชื้อ MRSA ได้โดยตรงเพียงขั้นตอนเดียว ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดเวลาอย่างน้อย 1-2 วัน และค่าใช้จ่ายในการทดสอบเชื้อ MRSA ลงได้อย่างมากและยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อนทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนั้นในการศึกษานี้จะประเมินประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS-OX ในการตรวจแยกเชื้อ MRSA จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีเดิมที่ใช้ในงานตรวจประจำวันและวิธีตรวจหา PBP2a ด้วยวิธี slide latex agglutination

วิธีการวิจัย

แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ศึกษาได้แก่ stock culture ของเชื้อ Staphylococci จำนวน 200 สายพันธุ์ แยกเป็นเชื้อ *S. aureus* 68 สายพันธุ์ MRSA 89 สายพันธุ์ Methicillin Susceptible Coagulase Negative Staphylococci (MSCoNS) 25 สายพันธุ์ และ Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci (MRCoNS) 18 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บบน Nutrient agar slant ที่ 4°C

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทางคลินิก

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการศึกษาเพื่อตรวจหาเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ได้แก่ หนอง เสมหะ และ

จากขวดเพาะเชื้อจากเลือดที่ส่งมาเพาะเชื้อที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิกโรงพยาบาลศรีนครินทร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในระหว่างเดือนมิถุนายน 2546 - มีนาคม 2547 จำนวนรวมทั้งหมด 1,926 ตัวอย่าง

อาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS โดยเติม 50% egg yolk suspension ใน NSS ลงในmannitol salt agar (เตรียมตามฉลากข้างขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ) หลังจาก autoclave แล้วให้มีความเข้มข้น 20% ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS-OX โดยเติม oxacillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS หลังจาก autoclave แล้วให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของยา 6 μg/ml

การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX

นำเชื้อ Staphylococci มาเตรียมเป็น bacterial suspension ใน NSS ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland Standard No. 0.5 แล้วนำไป inoculate บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX โดยใช้ multipoint inoculator นำจานอาหารไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง อ่านและบันทึกผลการเจริญของเชื้อ

การตรวจเพาะเชื้อ *S. aureus* และ MRSA จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก

นำสิ่งส่งตรวจทางคลินิกได้แก่ หนอง และเสมหะ มาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานตรวจประจำวัน ได้แก่ blood agar และ Mac Conkey agar นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และทำการวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus* โดยการย้อมสีแกรม ทดสอบ catalase Dnase และ tube coagulase และทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ต่อยา oxacillin โดยวิธี disk agar diffusion ตามวิธีของ Kirby Bauer อ่านผลความไวและดื้อยา ตามที่ National Committee of Clinical Laboratory Standards แนะนำ (NCCLS,1997)

หลังจากนำสิ่งส่งตรวจไปเพาะเชื้อตามวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแล้ว นำ swab สิ่งส่งตรวจนั้นป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX และใช้ลูป streak เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ ส่วนสิ่งส่งตรวจจากขวดเพาะเชื้อจากเลือดที่ให้ผลบวกโดยมีสัญญาณจากเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติแสดงว่ามีเชื้อเจริญและย้อมสีแกรมพบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทรงกลม ให้ใช้เข็มเจาะจากขวดเพาะเชื้อจากเลือด (hemoculture) ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากขวด (blood broth) หยดลงบน LMS และ LMS-OX จานละ 1 หยด และ streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่ 35-37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการเพาะเชื้อ

การอ่านผล

เชื้อ MRSA เจริญได้บน LMS-OX มีโคโลนีสีเหลืองมีโซนทึบแสงรอบ ๆโคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส่วนเชื้อ MSSA และ MSCoNS ไม่เจริญบน LMS-OX นำโคโลนีสีเหลืองที่สงสัยทั้งที่มีและไม่มีโซนทึบ ไปทดสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* และ MRSAโดยการย้อมสีแกรม ทดสอบ catalase Dnase และ ทดสอบ tube coagulase

การตรวจกรองหาเชื้อ MRSA ด้วยวิธี MRSA Screen test (Van Griethuysen et al., 1999; Van Leeuwen et al., 1999)

นำโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ที่แยกได้จากการเพาะเชื้อบน blood agar LMS และLMS-OX มาตรวจหา PBP2a ด้วยวิธี MRSA Screen test (Denka Seiken Co., Ltd, Tokyo, Japan) ทำการทดสอบตามวิธีในเอกสารกำกับผลิตภัณฑ์ ในการทดสอบทำ negative และ positive control ควบคู่กันไปทุกครั้ง

การทดสอบความไวของเชื้อ MRSA ต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk agar diffusion method

นำเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมาทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี

disk agar diffusion method ตามวิธีที่ NCCLS แนะนำ (NCCLS, 1997) และใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุม ยาต้านจุลชีพที่ทดสอบได้แก่ cephalothin, erythromycin, fosfomycin, gentamicin, lincomycin, oxacillin, sulfamethoxazole-trimethoprim และ vancomycin

ผลการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อLMS และ LMS-OX

จากการนำเชื้อ Staphylococci จาก stock culture จำนวน 200 สายพันธุ์ ไปเพาะเชื้อบน LMS และ LMS-OX พบว่า เชื้อ Staphylococci ทั้งหมดเจริญได้บน LMS ส่วนเชื้อ Staphylococci ที่ไวต่อยา oxacillin ได้แก่ MSSA และ MSCoNS ไม่เจริญบน LMS-OX มีเพียง MSSA เพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่เจริญได้ พบว่าเชื้อ MRSA 87 จาก 89 สายพันธุ์ (97.75 %) เจริญได้ดีบน LMS-OX ที่มี oxacillin 6 μg/ml มีเพียง 2 สายพันธุ์ (2.25%) ที่ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS-OX และ MRCoNS ร้อยละ 78 เจริญได้บน LMS-OX ผลที่ได้ดังแสดงใน ตารางที่ 1

การตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* และ MRSA จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก

ผลการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด จำนวน 1,926 ตัวอย่างบน LMS และ LMS-OX สามารถแยกเชื้อเบื้องต้นได้เป็น เชื้อ *S. aureus* และ MRSA ซึ่งวินิจฉัยยืนยันว่าเป็น *S. aureus* และ MRSA โดยทดสอบ coagulase และทดสอบความไวต่อยา oxacillin โดยวิธี disk agar diffusion และตรวจหา PBP2a ด้วยวิธี latex agglutination ผลการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX แยกได้เชื้อ *S. aureus* จำนวน 387 สายพันธุ์ และ MRSA 203 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการเพาะเชื้อวิธีเดิมที่เพาะเลี้ยงบน blood agar พบว่าสามารถแยกเชื้อ *S. aureus* ได้เพียง 231 สายพันธุ์ และ MRSA 130 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX สามารถแยกเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ได้มากกว่าวิธีที่ใช้ในงานตรวจทั่วไปผลที่ได้ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการตรวจหา PBP2a ของเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ที่แยกได้จาก LMS-OX โดยวิธี slide latex agglutination พบว่าให้ผลบวกจำนวน 201 สายพันธุ์ (99.01%) ส่วนเชื้อ MSSA ทุกสายพันธุ์ให้ผลลบ

MIC ของเชื้อ MRSA ต่อยา oxacillin และ vancomycin โดยวิธี agar dilution พบเชื้อ MRSA 86.96% มีค่า MIC ต่อยา oxacillin $\geq$ 4 μg/ml ส่วนที่เหลือมีค่า MIC < 1 μg/ml ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจกรองเชื้อ MRSA โดยใช้ LMS-OX มีเพียงเชื้อ MRSA 2 สายพันธุ์ซึ่งตรวจไม่พบ PBP2a มีค่า MIC ต่อ oxacillin เท่ากับ 2 μg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ MRSAที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา cephalothin, erythromycin, gentamicin, oxacillin, และ sulfamethoxazole-trimethoprim แต่ไวต่อยา fosfomycin, lincomycin และ vancomycin

วิจารณ์ผล

MRSA เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล การวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้การเพาะเชื้อบน blood agar ซึ่งในกรณีที่มีเชื้อหลายชนิดและเจริญปะปนเป็นจำนวนมากทำให้เป็นปัญหาในการแยกและวินิจฉัยเชื้อซึ่งต้องอาศัยความชำนาญในการแยกลักษณะโคโลนีของเชื้อ โดยเฉพาะในกรณีที่มีเชื้อ *S. aureus* จำนวนน้อยๆ และมีเชื้ออื่นปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจนั้นด้วย อาจทำให้เกิดการผิดพลาดในการตรวจพบและวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus*

อาหารเลี้ยงเชื้อ LMS-OX สามารถตรวจกรองเชื้อ MRSAในเบื้องต้นได้ (Merlino et al., 1996) และแยกออกจากเชื้ออื่นที่มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งส่งตรวจ เช่น เสมหะ ได้ดีกว่าและง่ายกว่าการใช้ blood agar เนื่องจาก NaCl ร้อยละ 7.5 และยา

oxacillin ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MSSA และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งได้ การเจริญของเชื้อให้ลักษณะโคโลนีที่จำเพาะมีสีเหลืองจากการเฟอร์เมนท์น้ำตาลแมนนิทอลและส่วนใหญ่มีโซนทึบแสงรอบ ๆ โคโลนี ก็สามารถให้การวินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อ MRSA ได้ภายใน 24 ชั่วโมง ทำให้ตรวจพบเชื้อ MRSA ได้เร็วกว่าวิธีเดิมที่ใช้ในงานตรวจประจำวันทั่วไปถึง 2 วัน ส่วนการตรวจหา PBP2a ด้วยวิธี slide latex agglutination เป็นวิธีที่ง่าย ให้ผลเร็ว ใช้เวลาในการทดสอบเพียง 15-20 นาที (Van Griethuysen et al.,1999; Van Leewen et al., 1999) สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ MRSA โดยตรงจากโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ วิธีนี้มีความไวสูงถึง 97-100 % และมีความจำเพาะสูงถึง 100% มีความถูกต้องใกล้เคียงกับวิธีการตรวจหา *mec* A gene โดยวิธี PCR ซึ่งเป็นวิธีที่เป็น gold standard (Van Leewen et al.,1999; Cavassini et al.,1999) แต่วิธี latex agglutination ต้องแยกเชื้อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวหรือเป็น pure culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน จึงไม่สามารถลดเวลาในการตรวจพบเชื้อ MRSA ลงได้มากนัก

ในการศึกษาครั้งนี้แยกเชื้อ MRSA ได้สูงถึง 34.41% ของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ทั้งหมดจากสิ่งส่งตรวจ ในจำนวนนี้สามารถวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากลักษณะโคโลนีที่จำเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS-OX ได้ถูกต้องถึงร้อยละ 99.01 ซึ่งยืนยันได้จากการตรวจพบ PBP 2a เฉพาะเชื้อที่แยกได้จาก LMS-OX เท่านั้น ดังนั้นการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ LMS-OX จึงเป็นวิธีการตรวจกรองหาเชื้อ MRSA อีกวิธีหนึ่งที่สามารถแยกเชื้อ MRSA ได้ผลเร็ว และ ถูกต้อง อีกทั้งมีความไวในการตรวจแยกได้เชื้อ MRSA มากกว่าการเพาะเชื้อบนblood agar ที่ใช้ทั่วไปในงานตรวจประจำวัน และในกรณีที่สงสัยอาจใช้วิธี MRSA Screen test ตรวจยืนยันก็จะช่วยให้ทราบผลได้ในเวลาที่รวดเร็วขึ้น

จากการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ MRSA 6 สายพันธุ์ (13.04%) ที่มีค่า MIC < 1- 4 μg/ml ทั้งนี้อาจเป็นเชื้อ borderline resistant *S. aureus* (BORSA) จากการศึกษาของ Tomasz และคณะ (Tomasz et al., 1989) พบว่าเชื้อ BORSA มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5-8 μg/ml ซึ่งเชื้อดังกล่าวอาจมีกลไกการดื้อยาจากการที่เชื้อสร้าง beta lactamase มากกว่าปกติหรือเกิดจากสร้าง PBP4 มากกว่าปกติ ทำให้เกิดการดื้อยาในระดับต่ำ ๆได้ เชื้อ MRSA ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจเชื้อทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา cephalothin, erythromycin, gentamicin, oxacillin และ sulfamethoxazole-trimethoprim แต่เชื้อยังคงมีความไวต่อ fosfomycin, lincomycin และ vancomycin ซึ่งผลการตรวจกรองหาเชื้อโดยวิธี agar screening ก็ตรวจไม่พบเชื้อ MRSA ดื้อต่อยา vancomycin เช่นกัน อย่างไรก็ตามมีรายงานเชื้อ MRSA มีความไวต่อยา vancomycin ลดลงในหลายประเทศ ทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส ฮ่องกง เกาหลี และญี่ปุ่น Hiramutsu และคณะ พบลักษณะการดื้อยา vancomycin ของ MRSA เป็นแบบ hetero-resistant (Hiramatsu et al.,1997) จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อ MRSA ดื้อต่อยา vancomycin แต่มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 1μg/ml จึงควรที่จะได้มีการเฝ้าระวังเชื้อ MRSA ที่ดื้อต่อยา vancomycin และตรวจหาค่า MIC ต่อยานี้เป็นระยะ ๆ

สรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX มีประสิทธิภาพในการตรวจเพาะเชื้อ *S. aureus* และ MRSA จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกได้จำนวนมากกว่าและได้ดีกว่าการใช้ blood agar ที่ใช้ในงานตรวจประจำวันมาก ได้ผลถูกต้อง แม่นยำสอดคล้องกับวิธีการตรวจหา PBP2a ด้วยวิธี latex agglutination สูงถึงร้อยละ 99.01 การเพาะเชื้อโดยตรงบน LMS-OX และอ่านผลจากลักษณะโคโลนีที่จำเพาะเพียงขั้นตอนเดียวช่วยให้แยกและวินิจฉัยเชื้อได้ง่าย ถูกต้องและทราบผลเร็วกว่า 1-2 วัน จึงช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบเชื้อ MRSA ลงได้อย่างมาก จึงสมควรอย่างยิ่งที่ห้องปฏิบัติการจะได้เพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ในงานตรวจประจำวัน รวมทั้งใช้ในการตรวจกรองหาพาหะของเชื้อในประชากรกลุ่มใหญ่ ๆเพื่อเฝ้าระวังและศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อนี้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป ปีงบประมาณ 2546 และขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บส่งส่งตรวจและการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Cavassini, M., Wenger, A., Jaton, K., Blanc, D.S. and Bille, J. 1999. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti- PBP2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**. 37: 1591-4.

Gunn, B.A., Dunkenberg, W.E. and Creitz, J.R. 1972. Clinical evaluation of 2% LMS medium for primary isolation and identification of staphylococci. **J Clin Pathol**. 52: 236-40.

Hiramatsu, L., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguzi, T. and Tenover, F.1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrobio Chemother**. 40: 135-136.

Merlino, J., Gill, R. and Robertson, G.J. 1996. Application of lipovitellin-salt-mannitol agar for screening, isolation, and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital. **J Clin Microbiol**. 34: 3012-3015.

National Committee for Clinical Laboratory Standards.1997. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests,6th ed.,vol.17 no.1. Approved standard M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Perry, P.L., Coombs, G.W., Boehm, J.D. and Pearman, J.W. 1998. A rapid (20h) solid screening medium for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Hosp Infect**. 40: 67-72.

Speller, D.C.E., Johnson, A.P., James, D., Marples, R.R., Charlett, A. and George, R.C. 1997. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-1995. **Lancet**. 350: 323-325.

Van Griethuysen, A., Pouw, M., van Leeuwen, N., Heck, M., Willemse, P., Buiting, A. and Kluytmans, J. 1999. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**. 37: 2789-92.

Van Leeuwen, W.B., van Pelt, C., Luuenduk, A., Verbrugh, H.A. and Goessens W.H.F. 1999. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA screen latex agglutination test. **J Clin microbiol**. 37: 3029-30.

Tomasz, A., Drugeon, B.H., Lencastre, M.H., Jabes, D., McDougall, L. and Bille, J. 1989. New mechanism for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin binding capacity. **Antimicrob Agent Chemother**. 33: 1869 -1874.

ตารางที่ 1 ทดสอบการเจริญของเชื้อ Staphylococci จำนวน 200 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS-OX

เชื้อ Staphylococci [a]	จำนวนสายพันธุ์	การเจริญของเชื้อบน LMS-OX	
		Growth	No growth
MSSA	68	2 (2.94%)	66 (97.06%)
MRSA	89	87 (97.75%)	2 (2.25%)
MSCoNS	25	0	25 (100%)
MRCoNS	18	14 (77.78%)	4 (22.22%)
รวม	200	103	97

a: เชื้อ Staphylococci ที่ทดสอบทุกตัวเจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อ LMS. MSSA : Methicillin susceptible *S. aureus*, MRSA: Methicillin resistsnt *S. aureus*, MSCoNS: Methicillin susceptible coagulase negative Staphylococci; MRCoNS: Methicillin resistant coagulase negative Staphylococci.

ตารางที่ 2 ผลการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* และ MRSA จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 1,926 ตัวอย่างจากการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMS และ LMS-OX เปรียบเทียบการเพาะเชื้อบน blood agar

สิ่งส่งตรวจ	จำนวน	จำนวนเชื้อที่เจริญบน LMS และLMS-OX		จำนวนเชื้อที่เจริญบน Blood agar	
		S. aureus	MRSA	*S. aureus*	MRSA
Pus	738	192	85	156	63
Sputum	1,125	183	107	63	56
Blood	63	12	11	12	11
รวม	1,926	387	203	231	130