การตรวจหา methicillin-resistant staphylococci (MRS)

สุรภี เทียนกริม

การตรวจหา MRS ทางห้องปฏิบัติการจะทดสอบโดยใช้ oxacillin disc แทน methicillin disc เนื่องจาก oxacillin มีความคงตัวมากกว่า การเสื่อมสลายจากการเก็บในห้องปฏิบัติการน้อยกว่า methicillin และปริมาณยาใน disc ของ oxacillin เพียง 1 มคก. น้อยกว่า methicillin ซึ่งมี 5 มคก. เหมาะกับการตรวจหา heterogeneous MRS ซึ่งประกอบด้วยเชื้อที่ไวและดื้อยา โดยเชื้อที่ดื้อยาจะมีเพียง 1 ในพันล้าน ถึง 1 ในหมื่นตัว นอกจากนี้เชื้อที่ดื้อยาจะเจริญช้ากว่าเชื้อที่ไว เชื้อที่ดื้อนี้จะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C >35°C>37°C ดังนั้นการตรวจหา MRS จึงควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม NaCl 2-4% และอบเพาะเชื้อที่ 35°C ให้ครบ 24 ชม. ดังตารางที่ 1

เนื่องจากปัจจุบันการติดเชื้อ MRS จากชุมชนเพิ่มมากขึ้น โดยมีการดื้อยาในระดับต่ำที่เป็น heterogeneous และไม่มีการดื้อยาข้ามกลุ่มอื่นๆร่วมด้วย ทำให้การใช้ oxacillin disc 1 มคก. ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้ จึงได้มีการศึกษาเปรียบเทียบหาวิธีใหม่ พบว่าการใช้ cefoxitin disc 30 มคก. โดยอ่านผลตามค่าเฉพาะที่กำหนด จะสัมพันธ์กับการมียีน *mec A* ได้ดีกว่าการใช้ oxacillin disc 1 มคก. นอกจากนี้ cefoxitin เองยังเป็น inducer ที่ดี จะกระตุ้นให้ MRS แสดงการดื้อยาออกมาให้ตรวจวินิจฉัยได้ดีขึ้น. คณะกรรมการแห่งชาติสำหรับค่ามาตรฐานของห้องปฏิบัติการของสหรัฐอเมริกา (National Committee for Clinical Laboratory Standard, NCCLS) ในปี ค.ศ. 2004 จึงได้กำหนดให้ใช้ cefoxitin disc 30 มคก. เป็น screening test เพื่อทำนายเชื้อ staphylococci ที่มียีน *mec A* ดังตารางที่ 2 มีการศึกษาเปรียบเทียบ วิธี phenotypic screening ที่ใช้ในการตรวจหา MRS โดยอาศัยการตรวจพบ *mec*A gene เป็น gold standard พบดังนี้

วิธี	sensitivity (%)	PPV (%)	NPV (%)
1. Oxacillin (1 μg) disk diffusion	83.5	100	87
2. Oxacillin screen agar method	91.7	100	93.1
3. Cefoxitin (30 μg) disk diffusion	99.0	100	100
4. Latex agglutination for detection of *mec*A gene	97-100 (specificity 100 %)		

การดื้อ methicillin เกิดจากการเปลี่ยนแปลง penicillin-binding protein (PBP) โดยสร้างเป็น PBP_{2A} ($PBP_{2'}$) ที่ควบคุมโดยยีน *mec* ทำให้ไม่จับกับเบต้าแลคแทม ซึ่งจะทำให้การใช้ยาในกลุ่มเพนนิซิลิน cephem และ เบต้าแลคแทมกลุ่มอื่นๆ เช่น β-lactam/β-lactamase inhibitor (BL/BI) เช่น amoxycillin-clavulanate, amplicillin-sulbactam, ticarcillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam และ imipenem ไม่ได้ผลในการรักษา ทั้งที่การทดสอบความไว จะให้ผล "ไว" นอกจากนี้ *S. aureus* อาจมีการสร้างเอ็นซัยม์เบต้าแลคแทมเมส เพิ่มขึ้น หรือมีการปรับแต่ง PBP เดิม คือ PBP_1, PBP_2 หรือ PBP_4 ทำให้การจับกับเบต้าแลคแทมไม่ดีเช่นเดิม ผลการทดสอบความไวต่อ oxacillin ของเชื้อที่มีกลไกการดื้อยาทั้งสองนี้ จะให้ผล "intermediate resistance" ซึ่งอาจแยกออกจากการดื้อด้วยการเปลี่ยนแปลง PBP ได้โดยการพิจารณาร่วมกับการใช้สารต้านเบต้าแลคแทมเมส การดื้อยากลุ่มอื่นๆ และการทดสอบ agar screen test (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 **การทดสอบหา** methicillin-resistant *Staphylococcus* spp.

Test	Media[(a)]/ antimicrobial agent	Inoculum	Incubation conditions	Interpretation[(b)]
Disk diffusion	MHA/ oxacillin disc (1 μg)	Direct colony suspension (0.5 McFarland)	35°C, ambient air, 24 h.	Inhibition zone diameter (mm) : *S. aureus* ≤ 10 = R 11-12 = I ≥ 13 = S : CNS ≤ 17 = R ≥ 18 = S
Broth dilution Agar dilution	CAMHB+2% NaCl/ Oxacillin MHA+2% NaCl/ Oxacillin	Direct colony suspension	35°C, ambient air, 24 h.	MIC (μg/ml) : *S. aureus* ≤ 2 = S ≥ 4 = R : CNS ≤ 0.25 = S ≥ 0.5 = R
Agar screening test for *S. aureus*	MHA +4%NaCl +6 μg/ml oxacillin	Direct colony suspension = 0.5 McFarland turbidity , 1 μl loop or swab	35°C, ambient air, 24 h.	> 1 colony or light film or growth = R QC strains *S.aureus* ATCC 29213 = S *S.aureus* ATCC 43300 = R

(a) MHA = Mueller-Hinton agar , CAMHB = cation-adjusted Mueller–Hinton broth,
NaCl = sodium chloride

(b) R = resistant , S = susceptible , I = intermediately resistant, CNS = coagulase-negative staphylococci

ตารางที่ 2. การทดสอบเพื่อทำนายเชื้อ Stapyhlococci **ที่มี ยีน** *mec A.*

	Condition
Test	Disc diffusion
Media	Mueller-Hinton agar
Antimicrobial agent	Cefoxitin disc (30 μg)
Inoculum	Direct colony suspension (0.5 McFarland)
Incubation conditions	35 ^{O}ซ , ambient air, 24 ชั่วโมง
Interpretation	Inhibition zone diameter (mm)

S. aureus

≤ 19 = ดื้อ ต่อ oxacillin (MRSA)

≥ 20 = ไว ต่อ oxacillin (MSSA)

Coagulase-negative staphylococci

≤ 24 = ดื้อ ต่อ oxacillin (MRCNS)

≥ 25 = ไว ต่อ oxacillin (MSCNS)

ตารางที่ 3. **การแยก** methicillin resistant phenotype **ของ** *Staphylococcus aureus.*

Resistant phenotype	Mechanism	*mecA* gene	Intermediate resistance	β-lactamase inhibitor effect	Oxacillin agar screening test	Cross-resistance
- Classical MRSA						
Homogeneous	PBP2a	+	-	-	+	+[f]
Heterogeneous	PBP2a	+	±	-	±[c]	+f
– BOR-SA[a]	Increased β-lactamase production	-	+	+	∓[d]	-
– MOD-SA[b]	Modified PBP1, 2 and 4	-	+	-	∓[e]	-

a: BOR-SA = Borderline-oxacillin resistant *S. aureus*

b: MOD-SA = Modified PBP *S. aureus*

c: ขึ้นกับสัดส่วนของเชื้อที่ดื้อและไว ถ้าเชื้อที่ดื้อมีน้อยกว่า 1 ในหมื่นตัว อาจจะไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วย oxacillin agar screening test

d: BOR-SA ส่วนมากจะมี MIC ต่อ oxacillin ≤ 6 มคก./มล. จึงไม่สามารถเจริญได้ใน oxacillin screening agar

e: MOD-SA ที่มี MIC ต่อ oxacillin > 8 มคก./มล. อาจเพาะเชื้อขึ้นได้ใน oxacillin screening agar

f: อาจไม่พบการดื้อข้ามกลุ่มของ non-β-lactams

References

1. National Committee for Clinical Laboratory Standard 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing Fourteenth informational Supplement M100-S13 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne,Pa.
2. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaecker Pand Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 ug) for detection of methicillin-rfsistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Microbiol Infec Dis. 2004 ;
3. Skov R,Smyth R,Clausen M et al. Evaluation of cefoxitin 30 ug disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. JAC. 2003 ; 52 :204-7.
4. Felten A, Grandry B,Lagrange PH and Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low –level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Clin Microbiol. 2002 ; 40 :2766-71.
5. Hartman BJ and Tomasz A.Espression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1986 ; 29 : 85-92.
6. Sabath L. Chemical and physical factor influencing methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* . J Antimicrob Chemother. 1977 ; 3 : 47-51.
7. Tomasz A, Nachman S and Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 1991 ; 35 : 124-9