

Abstract

Objectives

To characterize genetic background of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Thailand by Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC*mec*) typing, virulence genes, variable numbers of tandem repeats typing associated with direct repeat units (*dru*) in hypervariable region of SCC*mec*, *spa* gene, Staphylococcal Interspersed Repeat Units (SIRUs) and sequence-based typing methods including multilocus sequence typing (MLST), and *spa* sequencing and to evaluate the discriminatory power of PCR-based typing techniques for differentiation.

Materials and Methods

One hundred and six MRSA isolates were randomly selected from MRSA isolates collected from patients of 18 hospitals of Thailand during 2006-2007 under Antimicrobial Resistance Surveillance Program, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. PCR-based typing methods such as SCC*mec* typing, VNTR typing associated with *dru*, *spa* gene and SIRUs, were performed in order to characterize MRSA into subspecies level. Heteroduplex PCR for identification of ST239 and its lineage, multilocus sequence typing and *spa* sequencing were also applied for the evolutionary study among Thai MRSA isolates. In addition, presence of 14 virulence genes were also determined in these MRSA samples.

Results

Seven SCC*mec* types were identified among MRSA isolates. Ninety six percentages of them carried SCC*mec* type III (41.6%), and its subtypes, including type IIIA (40.6%), type III-DCS (12.3%), and type IIB (1.9%). All of them were classified into ST239 and its lineage by the heteroduplex PCR. ST5-MRSA-IV.1 and ST30-MRSA-IV.2 harboring *lukSF-PV*, were also identified. In addition, we also detected 2 strains of ST9-MRSA-I with class C *mec* complex isolated from Northern of Thailand. MRSA isolates were additionally classified into 11, 5, and 9 subtypes by PCR-VNTR typing methods based on *dru*, *spa* and SIRUs typing, respectively. The *sak* and *sea* were common virulence gene found in Thai MRSA isolates; the 75% and 58% of them harbored *sak* and *sea*, respectively. Overall genetic markers could differentiate MRSA samples into 34 subtypes with discriminatory power of 0.93.

Discussion and Conclusion

Genetic diversity of Thai MRSA was elucidated by molecular characterization. The three major clones of highly clonal ST239-MRSA-III and its subtypes were identified by various typing methods. PCR-based typing techniques were feasible for differentiation of MRSA in our country. SCC*mec*, *dru*, SIRUs typing and detection of *sea* and *sak* genes might be the principal PCR-based typing for differentiation of MRSA. Molecular characteristic of MRSA obtained from this study may lead to develop multiplex PCR for distinguishing MRSA, and for further study why these clones have been widely spread over our country.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Molecular typing, SCC*mec*, virulence genes, VNTR typing

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่เรียกดื้อยา methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่แพร่กระจายในประเทศไทย โดยเน้นการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีพีซีอาร์ ประกอบด้วย Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC*mec* typing), การตรวจหายีนก่อโรค, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) typing ใน direct repeat unit (*dru*) region ใน SCC*mec*, *spa* typing, Staphylococcal Interspersed Repeat Units (SIRUs), multilocus sequencing typing (MLST) และ *spa* sequencing และประเมินอำนาจการจำแนกของเทคนิคการจำแนกสายพันธุ์ MRSA ที่แยกได้ในประเทศไทย

วิธีทดลอง

สุ่มเชื้อตัวอย่าง MRSA 106 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ จำนวน 18 โรง ที่ส่งตรวจยืนยัน ณ ศูนย์ติดตามการดื้อยา สถาบันวิจัยสาธารณสุขแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 นำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ชนิดของ SCC*mec* ตรวจหายีนก่อโรค 14 ยีน ตรวจวิเคราะห์จำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี VNTR ใน *dru* region, *spa* gene, SIRUs รวมทั้งทำ heteroduplex PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ clone ST239 lineage, MLST และ *spa* sequencing วิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมและอำนาจการจำแนกของวิธีจำแนกของแต่ละวิธีและร่วมกันหลายวิธี

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ ตรวจพบ SCC*mec* 7 ชนิด ชนิดที่พบมากที่สุด เป็น SCC*mec* type III (41.6%), type IIIA (40.6%), type III-DCS (12.3%), type IIIB (1.9%) ทั้งหมดจัดอยู่ใน ST239 lineage ส่วนชนิดอื่นที่ตรวจพบคือ ST5-MRSA-IV.1 และ ST30-MRSA-IV.2 ซึ่งตรวจพบยีนก่อโรครุนแรง *lukSF-PV* (ชนิดละ 1 ตัวอย่าง; 0.9%) และยังตรวจพบ type I-class C *mec* complex (1.9%) ซึ่งอาจเป็น SCC*mec* ชนิดใหม่จากจังหวัดทางภาคเหนือ การจำแนกสายพันธุ์ด้วย VNTR ประกอบด้วย *dru* typing, *spa* typing และ SIRUs จำแนกตัวอย่าง MRSA ได้เป็น 11, 5 และ 9 subtypes ตามลำดับ และตรวจพบยีนก่อโรค *sak* (75%) และ *sea* (58%) มากกว่ายีนก่อโรคอื่น ๆ ลักษณะทางพันธุกรรมทั้งหมดที่ตรวจวิเคราะห์ในการศึกษานี้สามารถจำแนก MRSA 106 ตัวอย่างได้เป็น 34 subtype โดยมีค่าอำนาจการจำแนกเท่ากับ 0.93 เทคนิคจำแนกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับจำแนก MRSA ประเทศไทย ประกอบด้วย SCC*mec*, *dru* typing, SIRUs typing และการตรวจหายีน *sea* และ *sak*

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคอูว์ซีโมเลกุลแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของ MRSA ในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ST239-MRSA-III และ subtype และยังช่วยให้พบ clone สำคัญ 3 clone การจำแนกสายพันธุ์โดย PCR-based typing เป็นเทคนิคที่เป็นไปได้อย่างยิ่งสำหรับห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงในประเทศไทย SCC*mec*, *dru*, SIRUs typing และการตรวจหายีน *sea* และ *sak* อาจเป็นเทคนิคสำคัญสำหรับจำแนก MRSA ในประเทศไทย นำมาเป็นแนวทางพัฒนา multiplex PCR ที่เหมาะสมและใช้ทรัพยากรน้อยที่สุดสำหรับจำแนก MRSA และยังเป็นแนวทางศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาและวิทยาการระบาดของ clone สำคัญของ MRSA ในประเทศไทย

คำสำคัญ: สแตฟิโลคอคคัส ออเรียสดื้อยาเมธิซิลลิน, การจำแนกสายพันธุ์, ยีนก่อโรค