

**DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR FOR DETECTION OF  
METHICILLIN RESISTANCE AND  $MLS_B$  RESISTANCE GENES  
IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(CLINICAL PATHOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by 2015 Mahidol University

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR FOR DETECTION OF METHICILLIN RESISTANCE AND MLS<sub>B</sub> RESISTANCE GENES IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

NETILUK TANTAVUTT 5436413 RACP/M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PITAK SANTANIRAND, Ph.D., PUTTHAPOOM LUMJIAKTASE, Ph.D.

ABSTRACT

Nosocomial infection caused by multidrug resistant staphylococci such as methicillin or macrolide-lincosamide-streptogramins B (MLS<sub>B</sub>) resistance is a growing problem for many health care institutions. Of all species of staphylococci, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) has the greatest pathogenic potential. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections are associated with increased morbidity and mortality. Rapid identification of the organism as well as drug resistance is crucial for infected patients. Therefore, in this study, a new multiplex PCR for identification of *S. aureus* and detection of certain antimicrobial resistant genes was developed, in order to improve the speed of detection from suspected bacterial colonies. New specific primers of five target genes, *femA* (for *S. aureus* identification), *mecA* (for oxacillin or methicillin resistance), *ermA*, B and C (for MLS<sub>B</sub> resistance) were designed and tested against 250 clinical isolates of *Staphylococcus* spp. comparing with the conventional identification and susceptibility test in routine process. All five primers revealed 100% specificity to their target genes and the results showed 100% concordance with the phenotypic testings. All methicillin resistant isolates contained the *mecA* gene. The prevalence of the *ermA*, *ermB* and *ermC* genes in erythromycin resistant *S. aureus* were 53.4%, 1.1% and 12.6% respectively while prevalence of the *ermA*, *ermB*, and *ermC* in coagulase negative staphylococci (CoNS) were 6.6%, 1.3%, and 46.1% respectively. In contrast to *S. aureus*, the *ermC* was found to be predominated among erythromycin resistant CoNS isolates. With this specific multiplex PCR, the identification of *S. aureus* and CoNS as well as two groups of most important resistant genes could be performed rapidly and reduced approximately 24 hr of turnaround time comparing to the routine process.

KEY WORDS: METHICILLIN RESISTANCE AND MLS<sub>B</sub> RESISTANCE / MULTIPLEX PCR

67 pages

Copyright by Mahidol University

การพัฒนาชุดการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin และ ยีนดื้อยา MLS<sub>B</sub> โดยวิธี Multiplex PCR

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR FOR DETECTION OF METHICILLIN RESISTANCE AND MLS<sub>B</sub> RESISTANCE GENES IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

เนติลักษณ์ ตันทวาท 5436409 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: พัทธ์ชัย สันตนิรันดร์, Ph.D., พุทธภูมิ สำเจียกเทศ, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

การติดเชื้อในโรงพยาบาลโดยเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่ดื้อยาหลายขนานเช่น Methicillin หรือ macrolide-lincosamide-streptograminsB (MLS<sub>B</sub>) เป็นปัญหาที่เพิ่มขึ้นในสถานพยาบาลจำนวนมาก โดยในบรรดาสายพันธุ์ของ Staphylococci ทั้งหมด *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) มีความสามารถในการก่อโรคได้มากที่สุด การติดเชื้อกลุ่ม Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ก่อให้เกิดพยาธิสภาพและอัตราการเสียชีวิตที่สูง การตรวจวินิจฉัยเชื้อและการทราบการดื้อยาที่รวดเร็วจึงมีความสำคัญต่อผู้ป่วยเป็นอย่างมาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้พัฒนาการตรวจเพื่อหาเชื้อ *S. aureus* และ ยีนดื้อยาของเชื้อดังกล่าวโดยวิธี Multiplex PCR เพื่อให้เกิดความรวดเร็วขึ้นในการตรวจวิเคราะห์จากโคโลนิของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ การทดสอบนี้ใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายจำนวน 5 ยีน ได้แก่ *femA* (สำหรับการวิเคราะห์ *S. aureus*), *mecA* (สำหรับการวิเคราะห์ยีนดื้อยา oxacillin หรือ methicillin), *ermA*, B และ C (สำหรับการวิเคราะห์ยีนดื้อยา MLS<sub>B</sub>) การทดสอบได้ใช้เชื้อ *Staphylococcus* Spp. จากตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 250 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลกับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาในงานประจำของห้องปฏิบัติการ ซึ่งจากการทดลองพบว่า ทั้ง 5 primers ที่สร้างขึ้นมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย และแสดงผลไปในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ 100% เชื้อที่ที่มีการดื้อยา methicillin ทั้งหมด สามารถตรวจพบยีน *mecA* นอกจากนี้เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา erythromycin ตรวจพบยีนดื้อยาได้แก่ *ermA*, *ermB* *ermC* จำนวน 53.4%, 1.1% และ 12.6% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ กลุ่ม coagulase negative staphylococci (CoNS) ตรวจพบเฉพาะยีน *ermA* 6.6%, *ermB* 1.3%, and *ermC* 46.1% โดยตรวจพบยีน *ermC* มากที่สุด และด้วยวิธี Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ ทำให้สามารถลดเวลาของการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* และ CoNS ลงได้ประมาณ 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการตรวจวิเคราะห์โดยการเพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยาทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน