

ABSTRACT

Five clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were subjected on increasing concentrations of vancomycin to select for laboratory-derived *S. aureus* strains with reduced susceptibility to vancomycin that were then characterized. The passage selection resulted in two groups of laboratory-derived strains. First, hVISA for which vancomycin MICs were 4 µg/ml and VISA derivatives with the vancomycin MICs of 7 µg/ml. Population analysis profiles revealed all hVISA derivatives contained subpopulations that were able to grow at various levels of vancomycin concentration implying the presence of heterogeneous resistance. While the laboratory-derived strains with vancomycin MICs of 7 µg/ml had population profiles that were classified as VISA. All hVISA derivatives but UH35-8 with the vancomycin MICs of 4 µg/ml retained nearly all whole cell autolytic activities of their parental strains. However, increasing of the MICs to 7 µg/ml, VISA derivatives had decreased whole cell autolytic activities comparing to those of their parental susceptible strains. Similarly, most VISA with the MICs of 7 µg/ml expressed reduced autolytic activities as revealed by zymographic studies. However, vancomycin had different effects on autolysis of hVISA and VISA tested. The finding implied the complex regulation of autolytic activity of the bacteria. Transmission electron microscopy revealed that most VISA strains had thickened cell walls and slight roughened surfaces comparing to their parental strains. These results indicate that decreased autolytic activities and thickened cell walls are correlated with the increased of vancomycin resistance level of the bacteria.

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ลดความไวต่อยาปฏิชีวนะเมทิซิลลิน (methicillin) จำนวน 5 สายพันธุ์ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซิน (vancomycin) เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อลดความไวต่อแวนโคมัยซินลงในห้องปฏิบัติการ ผลของการเลี้ยงเชื้อทำให้ได้แบคทีเรียที่ลดความไวต่อแวนโคมัยซิน 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ *S. aureus* ที่มีความไวต่อแวนโคมัยซินเป็นแบบ heterogeneous vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA) ซึ่งมีระดับความไวต่อแวนโคมัยซินที่ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และกลุ่มที่สองคือ *S. aureus* ที่มีความไวต่อแวนโคมัยซินเป็นแบบ vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) ซึ่งมีระดับความไวต่อแวนโคมัยซินที่ 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร การวิเคราะห์กลุ่มประชากร (population analysis) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มที่มีระดับความไวต่อแวนโคมัยซินที่ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรแสดงลักษณะของการต้านทานต่อแวนโคมัยซินเป็นแบบ hVISA คือแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีกลุ่มประชากรที่สามารถต้านทานต่อแวนโคมัยซินในหลายระดับ ขณะที่กลุ่มประชากรของแบคทีเรียที่มีระดับความไวต่อแวนโคมัยซินที่ 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แสดงกลุ่มประชากรในรูปแบบของ VISA แบคทีเรียในกลุ่มของ hVISA เกือบทั้งหมดยกเว้น UH35-8 แสดงการแตกสลายของโฮลเซลล์ด้วยเอนไซม์ออโตไลซิน (whole cell autolytic activity) ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อแม่ อย่างไรก็ตามเมื่อระดับความไวต่อแวนโคมัยซินของแบคทีเรียลดลงอยู่ที่ 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แบคทีเรียแสดงการแตกสลายของโฮลเซลล์ด้วยเอนไซม์ออโตไลซินได้น้อยลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ออโตไลซินด้วยไซโมแกรม (zymographic analysis) เมื่อตรวจสอบผลของแวนโคมัยซินต่อการสลายเซลล์พบว่าให้ผลที่แตกต่างกันต่อ hVISA และ VISA แสดงให้เห็นว่าการสลายเซลล์มีกลไกควบคุมการทำงานที่ซับซ้อน การตรวจสอบลักษณะของผนังเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope) พบว่า VISA เกือบทั้งหมดแสดงลักษณะของผนังเซลล์ที่ต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่คือผนังเซลล์มีความหนามากขึ้นและผิวนอกมีลักษณะขรุขระเล็กน้อย ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการสลายเซลล์ที่ลดลงและการมีผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับความไวที่ลดลงต่อยาแวนโคมัยซินของแบคทีเรีย