รายงานการวิจัย

การวิเคราะห์เปรียบเทียบระบาดวิทยาของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสก่อโรคบนผิวหนังสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์และมาตรการป้องกันการติดต่อจากสุนัขสู่คน

Comparative analysis for epidemiology of pathogenic staphylococci in dogs, owners and veterinarians and preventive strategies from dog to human transmission

ณุวีร์ ประภัสระกูล และคณะ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีงบประมาณ 2557

สัญญาเลขที่ GRB_BSS_๗๒_๔๗_๓๑_๐๓

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์เปรียบเทียบระบาดวิทยาของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสก่อโรคบนผิวหนังสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์และมาตรการป้องกันการติดต่อจากสุนัขสู่คน

Comparative analysis for epidemiology of pathogenic staphylococci in dogs, owners and veterinarians and preventive strategies from dog to human transmission

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ น.สพ.ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล	สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
ผู้ช่วยศาสตรจารย์ นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์	สาขาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
อาจารย์ สพ.ญ.ดร. สิริลักษณ์ ดิษเสถียร	สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
อาจารย์ น.สพ.ดร. ภัทรรัฐ จันทร์ฉายทอง	สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
นางวารี นิยมธรรม	สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์

ทุนอุดหนุนโดย ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา /ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย /งบประมาณแผ่นดินที่พิจารณาจากโดยผ่านความเห็นชอบจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2557

ชื่องานวิจัย การวิเคราะห์เปรียบเทียบระบาดวิทยาของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสก่อโรคบนผิวหนัง สุนัข ผู้เลี้ยงสุนัขและสัตวแพทย์ และมาตรการป้องกันการติดต่อจากสุนัขสู่คน

Comparative analysis for epidemiology of pathogenic staphylococci in dogs, owners and veterinarians and preventive strategies from dog to human transmission

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตรจารย์ น.สพ.ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล[1]
ผู้ช่วยศาสตรจารย์ นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์[2]
อาจารย์ สพ.ญ.ดร. สิริลักษณ์ ดิษเสถียร[3]
อาจารย์ น.สพ.ดร. ภัทรรัฐ จันทร์ฉายทอง[1]
นางวารี นิยมธรรม[1]

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย *****งานวิจัยปีที่ 1***ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 1 ตุลาคม 2557**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวและระบาดวิทยาโมเลกุล รวมถึงรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (CoPS) สปีชีส์ต่างๆในสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัขและสัตวแพทย์ ได้แก่ *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และ *S. aureus* ด้วยการระบุสปีชีส์ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีและพันธุกรรมของเชื้อ

วิธีการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ได้แบ่งออกเป็น 1) ขออนุญาตทำการเก็บตัวอย่างในคนและในสัตว์จากกรรมการจริยธรรม 2) เก็บเชื้อจากสัตว์และในคน 3) ทำการคัดแยกเชื้อ 4) วิเคราะห์ผลการทดลอง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้คือสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัขและสัตวแพทย์ สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ เปอร์เซ็นต์ไทล์

โดยเชื้อ *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* เป็นสปีชีส์ที่สามารถแยกได้จากผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข ได้แก่ ผู้เลี้ยงสุนัขและสัตวแพทย์ แต่ไม่พบในผู้ที่ไม่สัมผัสใกล้ชิดสุนัข อีกทั้งสามารถแยกเชื้อ methicillin-resistant CoPS (MRCoPS) ได้จากสุนัขและผู้ที่สัมผัสใกล้ชิดสุนัขด้วย โดยเชื้อ methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) แยกได้มากที่สุด ตามด้วย methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และ methicillin-resistant *S. aureus* ตามลำดับ จากการหาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยคุณลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) และการจำแนกชนิด staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) พบเชื้อ MRSP หลากหลายสายพันธุ์ และพบสายพันธุ์ร่วมกันในกลุ่มสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข อันแสดงถึงหลักฐานของการส่งผ่านเชื้อระหว่างคนและสุนัข จากการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพแสดงให้เห็นว่าเชื้อมากกว่า 80% ที่แยกได้จากกลุ่มประชากรที่ศึกษาแสดงการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ได้แก่ tetracycline, aminoglycoside, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, trimethoprim, ciprofloxacin และ sulfamethoxazole ซึ่งเป็นยาพื้นฐานที่ใช้ในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ ดังนั้นจึงควรมีการสร้างมาตรการทางสุขศาสตร์ การวินิจฉัย และการส่งเสริมให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุสมผล รวมถึงการติดตามการดื้อยาอย่างต่อเนื่องเพื่อรับมือกับปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในสัตว์เลี้ยงและลดโอกาสการแพร่กระจายเชื้อสู่คน

คำสำคัญ : งานวิจัยม งานบริการวิชการ

Abstract

This research aimed to study about distribution and molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (CoPS) in dogs, dog owners and veterinarains including *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* and *S. aureus*. The species was identified using biochemical and genotypic characteristics. The results show that S. pseudintermedius and *S. schleriferi* subsp. *coagulans* could be isolated from dogs and people associated with dog, but these could not be isolated from people without dog association. Furthermore, methicillin-resistant CoPS could be founded in dogs and people associated with dog. Methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) is a predominant species followed by methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (MRSSc) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), respectively. By genetic chatacterization using MLST, PFGE and SCCmec typing, various clones of MRSP were identified and shared among dogs and dog associated people. This showed an evidence of possible transmission of antimicrobial resistance bacteria between dog and human. Over 80% of MRCoPS expressed resistance to tetracycline, aminoglycoside, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, trimethoprim, ciprofloxacin and sulfamethoxazole, which are available for human and veterinary medicine. Therefore, Policies about hygienic management, diagnosis and prudent use of antimicrobials should be promoted, and monitoring of antimicrobial resistance bacteria should be continued to cope with this problem in order to decrease the zoonotic transmission.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2557 ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา (the Chulalongkorn University Graduate Scholarship to Commemorate the 72th Anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej) และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksompot Endowment Fund)

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ โรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทำงานวิจัย Professor Dr. Vincent Perreten, Institue of Veterinary Bacteriology, University of Bern. ผศ.นพ.อนันต์ จงเถลิง อ.พญ.ดร.ฐนิษถา ฉัตรสุวรรณ และ สพ.ญ. พรรณพิชญา ฟุ้งวิทยา สำหรับความคิดเห็นด้านวิชาการ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์ นิสิตและบุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านในความร่วมมือด้านการปฏิบัติงานวิจัย

ณุวีร์ ประภัสระกูล และคณะ
4 กุมภาพันธ์ 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลการทดลอง	18
บทวิจารณ์	48
สรุปการดำเนินงานในภาพรวม	53
เอกสารอ้างอิง	54
ประวัติผู้วิจัย	64

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดของ *ccr* complex และ *mec* complex ที่เป็นองค์ประกอบSCC*mec* ของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*	7
2	ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *mecA*	14
3	ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *lsa*(E)	14
4	ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนกSCC*mec* type I to V	15
5	ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนกSCC*mec* type II-III ที่พบในเชื้อ MRSP	16
6	เปรียบเทียบความถี่และการกระจายของ coagulase positive staphylococci ที่ผิวหนังตำแหน่งต่างๆของสุนัข	19
7	เปรียบเทียบความถี่และการกระจายของ coagulase positive staphylococci ในกลุ่มประชากรสุนัข สัตวแพทย์ ผู้ที่เลี้ยงสุนัขและผู้ที่ไม่เลี้ยงสุนัข	20
8	อัตราการแยกเชื้อ CoPS และ MRCoPS จากสุนัข สัตวแพทย์ ผู้ที่เลี้ยงสุนัขและผู้ที่ไม่เลี้ยงสุนัข และจำนวนเชื้อ MRCoPS ที่นำไปทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ	21
9	แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* และรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข	22
10	จำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* และรูปแบบการดื้อยา (antimicrobial resistance profile) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข	23
11	แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus schleifei* subsp. *coagulans* และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข	24

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของเชื้อ MRSP ต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิด	25
13	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ต่อยาต้านจุลชีพ 20 ชนิด	26
14	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSSc ต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิด	27
15	แสดงจำนวน แหล่งที่มาของเชื้อ และ sequence type ของเชื้อ MRSP จากการทำ multilocus sequence typing ด้วย 4 ยีน	33
16	แสดงจำนวน แหล่งที่มาของเชื้อ และ sequence type ของเชื้อ MRSP จากการทำ multilocus sequence typing ด้วย 7 ยีน	34
17	แสดงการเปรียบเทียบ sequence type ของเชื้อ MRSP จากการทำ multilocus sequence typing ด้วย 4 ยีน และ 7 ยีน	35
18	จำนวนเชื้อ, คุณลักษณะเชิงโมเลกุล และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ที่แยกได้จากสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์	39
19	จำนวนเชื้อ, คุณลักษณะเชิงโมเลกุล และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* ที่แยกได้จากสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์	40
20	จำนวนเชื้อ, คุณลักษณะเชิงโมเลกุล และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากสุนัข ผู้เลี้ยง สุนัข และสัตวแพทย์	41
21	จำนวนสุนัขที่แยกเชื้อได้มากกว่า 1 สปีชีส์หรือ MRSP มากกว่า 1 sequence type ด้วยวิธี MLST-7	47

(*๛*)

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงตัวอย่างการปรากฏของยีนดื้อยาจากเทคนิค DNA microarray ที่ในการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก	29
2	แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ DNA จาก multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหา *ccr* complex ของเชื้อ MRCoPS	30
3	แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ DNA จาก multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหา *mec* complex ของเชื้อ MRCoPS	31
4	แสดงขนาดของ ΨSCC*mec*$_{57395}$ และส่วนโครโมโซมด้าน 3′ ด้วยการทำ long-range PCR แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*36I	31
5	แสดงชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์จากการทำ long range PCR ด้วยไพรเมอร์ *orfX* และ *contig27* ที่ให้ผลิตภัณฑ์ครอบคลุมส่วน ΨSCC*mec*$_{57395}$ และโครโมโซมส่วน 3′ และชิ้นส่วนจากการทำการตัดด้วยเอนไซม *Bsu*36I	32
6	แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSP จากการทำ *Sma*I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา	42
7	แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSP จากการทำ *Cfr*9I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา	43
8	แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSSc จากการทำ *Sma*I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา	44
9	แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSA จากการทำ *Cfr*9I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา	45
10	แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและประชากรของเชื้อ *Staphylococcus pseudinteremedius* สายพันธุ์ต่างๆ ที่จัดจำแนกด้วยวิธี multilocus sequence typing จาก 7 ยีน	46

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

สตาฟฟิโลคอคคัส [*Staphylococcus (S.)* spp.] เป็นแบคทีเรียที่พบได้บนผิวหนังของสัตว์และมนุษย์ในบทบาทของเชื้อประจำถิ่น เชื้อในกลุ่ม coagulase-positive staphylococci (CoPS) เป็นกลุ่มที่พบว่ามีความสามารถในการก่อโรคในรูปแบบของการติดเชื้อแบบฉวยโอกาส จากการที่เชื้อมีปัจจัยความรุนแรง (virulence factors) ปัจจุบันเชื้อ CoPS แบ่งออกเป็น 7 สปีชีส์ ประกอบด้วย S. aureus, S. intermedius, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus* และ *S. lutrae* (Baird-Parker, 1965; Devriese et al., 1978; Devriese et al., 2005; Foster et al., 1997; Hajek, 1976; Igimi et al., 1990; Varaldo et al., 1988) โดย CoPS ที่มีความจำเพาะในมนุษย์และจัดเป็นสปีชีส์ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นคือ *S. aureus* และยังมักก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังทำให้เกิดการอักเสบแบบเป็นหนองในผู้ป่วยที่มีปัจจัยโน้มนำให้เกิดโรค (Lin et al., 2007) ส่วน *S. pseudintermedius* เป็นสปีชีส์ที่พบเป็นหลักในสุนัขโดยเฉพาะที่บริเวณเยื่อเมือและบริเวณผิวหนังที่มีความอับชื้น เช่น รอบทวารหนัก ฝีเย็บ รักแร้และขาหนีบ อีกทั้ง *S. pseudintermedius* ยังมีบทบาทในการก่อให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบแบบเป็นตุ่มหนอง (pyoderma) ช่องหูส่วนนอกอักเสบ (otitis externa) และการติดเชื้อที่บาดแผลในสุนัข (Mason et al., 1996) นอกจากนี้ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ยังเป็นอีกสปีชีส์หนึ่งที่สามารถแยกได้จากสุนัขที่มีสุขภาพปกติและสามารถแยกได้จากรอยโรคผิวหนังอักเสบเช่นกัน แต่สามารถพบได้ในความถี่ที่ต่ำกว่าเชื้อ *S. pseudintermedius* โดยเชื้อในกลุ่ม CoPS ที่พบในสุนัขนั้นมีลักษณะแสดงที่มีความคล้ายคลึงกันทั้งลักษณะรูปร่างโคโลนี การเกิดการย่อยเม็ดเลือดแดงและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ (Jousson et al., 2007) ดังนั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคที่มีความแม่นยำและการตรวจคุณลักษณะทางพันธุกรรมในการระบุสปีชีส์ร่วมด้วย

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) นั้นเป็นรูปแบบการดื้อยาของเชื้อในสกุล *Staphylococcus* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแทม (β-lactam) ทั้งหมด และส่วนมากมักดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistance) ประกอบกับการที่เชื้อ CoPS มีบทบาทในการก่อโรคสูงกว่าในเชื้อแบคทีเรียสกุลนี้ ดังนั้นเชื้อในกลุ่ม methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (MRCoPS) จึงมีบทบาทความสำคัญทั้งในการดื้อยาและการก่อโรค โดยสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ ได้แก่ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),

methicillin-resistant *S. pseudintermedius* และ methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (MRSSc) (Weese and van Duijkeren, 2010) โดยเชื้อ MRSA นั้นมีความสำคัญในแง่ของการเป็นเชื้อดื้อยาที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่พักฟื้นในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน (nosocomial infection) ในรูปแบบของการติดเชื้อที่บาดแผล ปอดอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เรียกว่าเป็น hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) ส่วนกลุ่มที่มีการระบาดในชุมชนมักทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง เรียกว่าเป็น community-acquired MRSA (CA-MRSA) (Tong et al., 2011) ทั้งนี้สุนัขสามารถติดเชื้อและเป็นพาหะของ MRSA ซึ่งได้รับมาจากมนุษย์ (reverse zoonosis) ส่วนสปีชีส์ที่มีความจำเพาะกับสุนัขคือ methicillin-resistant S. pseudintermedius (MRSP) ซึ่งมีการรายงานเป็นครั้งแรกในปี 2007 ที่พบในสุนัขและบุคลากรด้านสัตวแพทย์ในโรงพยาบาลสัตว์ (Sasaki et al., 2007) โดยทั้งเชื้อ MRSA และ MRSP นั้นมียีนดื้อยาที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแทมคือยีน *mecA*

ยีน *mecA* นั้นมีตำแหน่งอยู่ในชุดยีนดื้อยาที่ส่งผ่านได้ (mobile genetic element) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อในสกุล *Staphylococcus* ที่เรียกว่า staphylococcal cassette chromocome *mec* หรือ SCC*mec* (Katayama et al., 2000) ยีนนี้ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแทมจากการที่สร้าง penicillin-binding protein 2a (PBP2a) ที่ทำหน้าที่สร้าง peptidoglycan ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียในสภาวะที่มีการรักษาด้วยยากลุ่มนี้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็นเอนไซม์ transpeptidase ชนิดที่ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยยากลุ่มเบต้า-แลคแทม การวินิจฉัยเชื้อ MRS จากลักษณะแสดงทำได้โดยการทดสอบความไวรับต่อยา oxacillin แต่ก็มีความแตกต่างของการแปลผลระหว่างเชื้อ MRSA และ MRSP (Bemis et al., 2009; Brown et al., 2005; Papich, 2010; Schissler et al., 2009) และการทดสอบด้วย cefoxitin นั้นให้ผลความแม่นยำในการวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus* แต่ไม่แนะนำสำหรับเชื้อ *S. pseudintermedius* (Papich, 2010) ส่วนการทดสอบการสร้าง PBP2a จากวิธีทางซีโรวิทยาด้วยการทำ latex agglutination test นั้นสามารถใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ MRSA ได้ แต่ให้บวกลวงกับเชื้อ *S. intermedius* ที่แยกได้จากสุนัข (Pottumarthy et al., 2004) เนื่องจากการทดสอบคุณสมบัติการดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ด้วยลักษณะแสดงทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาดได้ในเชื้อที่มีแหล่งที่มาจากสัตว์ ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้การหายีน *mecA* ซึ่งเป็นคุณลักษณะทางพันธุกรรมในการยืนยันการดื้อยาของเชื้อในรูปแบบนี้ ดังนั้นเชื้อ staphylococci ที่มียีนดื้อยา *mecA* จึงจัดว่าเป็นเชื้อ MRS (Bemis et al., 2009; Brown et al., 2005) และส่วนมากเชื้อ MRS มักมีการดื้อยาต้านจุลชีพหลากหลายชนิด เนื่องจากการสะสมยีนที่ทำให้เกิดดื้อยาไว้หลากหลายชนิด

ในทางสัตวแพทย์แล้วยาต้านจุลชีพหลายนิดได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์ (Morley et al., 2005) การใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังของสุนัขมักถูกใช้กันตามประสบการณ์หรือข้อแนะนำ (empirical treatment) (White, 1996) โดย cephalexin monohydrate เป็นยาที่แนะนำในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. ที่ผิวหนังของสุนัข (Dowling, 1996; Mason and Kietzmann, 1999) ในทางสัตวแพทย์การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งเพาะเชื้อแบคทีเรียและทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพมักทำเมื่อไม่เกิดการตอบสนองต่อการรักษา (Umber and Bender, 2009) อย่างไรก็ตามการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างยิ่งยวดและระยะยาวเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการคัดเลือกเชื้อดื้อยาในกลุ่ม MRS เพิ่มจำนวนบนผิวหนังสุนัข (Guardabassi et al., 2004; Lloyd, 2007; Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001) ซึ่งอาจถือว่าเป็นแหล่งกักของเชื้อดื้อยาที่สามารถส่งผ่านไปยังคนโดยเกี่ยวข้องกับสัตว์เลี้ยง (pet-associated MRS, PA-MRS) (Epstein et al., 2009)

การรายงานเกี่ยวกับการส่งผ่านเชื้อ CoPS ระหว่างสุนัขและมนุษย์นั้นมีเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน (Cohn and Middleton, 2010) ซึ่งในปัจจุบันสุนัขเป็นสัตว์เลี้ยงที่ได้รับความแพร่หลายและเป็นส่วนหนึ่งของครอบครัวซึ่งอาศัยอยู่ร่วมในสิ่งแวดล้อมเดียวกับคน จึงมีโอกาสทำให้เกิดการส่งผ่านเชื้อ จากการรายงานที่ผ่านมาพบว่าผู้เลี้ยงสุนัขติดเชื้อ MRSA ซ้ำซ้อน และมีการส่งผ่านเชื้อไปยังสุนัขทำให้สุนัขเป็นแหล่งกักโรคของเชื้อ MRSA แล้วเกิดการติดเชื้อกลับไปยังผู้เลี้ยงทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำซ้อน (Manian, 2003) ยิ่งไปกว่านั้นมีการรายงานการติดเชื้อ *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ในผู้เลี้ยงสุนัขทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรง (Chuang et al., 2010; Kumar et al., 2007; Stegmann et al., 2010) สัตวแพทย์เป็นอาชีพหนึ่งที่มีการสัมผัสกับสุนัขเป็นประจำจึงมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อจากสุนัขและมีการรายงานว่าสัตว์แพทย์มีบทบาทเป็นแหล่งของเชื้อดื้อยา MRSP แล้วทำให้เกิดการติดเชื้อกลับไปยังสุนัขป่วย (van Duijkeren et al., 2008) ส่วนข้อมูลเกี่ยวกับ MRSSc ในคนยังไม่มีการรายงาน ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับสปีชีส์คุณลักษณะทางพันธุกรรมและการดื้อยาของเชื้อ MRCoPS ทำให้ได้มาซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับระบาดวิทยาเพื่อใช้ในการสร้างมาตรการและการจัดการเพื่อป้องกันการส่งผ่านเชื้อดื้อยาระหว่างสุนัขและมนุษย์

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ coagulase-positive staphylococci ที่พบบนผิวหนังสุนัข ใน โพรงจมูกของผู้ที่มีปฏิสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสุนัข และในสิ่งแวดล้อม

2.2 เพื่อประเมินระดับความไวรับของเชื้อ coagulase–positive staphylococci ชนิดต่างๆที่แยกจากสุนัขต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 10 ชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในโรงพยาบาลสัตว์

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลเชิงระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci ที่พบในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข ได้แก่ ผู้เลี้ยงสุนัขและสัตวแพทย์ในประเทศไทย ที่สามารถเชื่อมโยงกับข้อมูลการระบาดของเชื้อในภูมิภาคอื่นๆทั่วโลก และแสดงหลักฐานความเป็นไปได้ของการส่งผ่านเชื้อดื้อยาระหว่างสุนัขและมนุษย์ รวมถึงรูปแบบการดื้อยาของเชื้อที่แสดงถึงสถานภาพการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาสุนัขในปัจจุบันและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาลและคลินิกรักษาสัตว์

หน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้แก่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยต่างๆ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ โรงพยาบาลและคลินิกรักษาสัตว์ ฐานข้อมูลทางระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ *Staphylococcus pseudintermedius* (www.pubmlst.org) และ *S. aureus* (www.mlst.net)

4. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวคิด (conceptual framework) ของโครงการวิจัย

แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น อาศัยอยู่บนผิวหนังและเยื่อเมือกของสัตว์ในบทบาทของเชื้อประจำถิ่นและมักก่อให้เกิดโรคได้ในรูปแบบฉวยโอกาสเมื่อสัตว์มีปัจจัยโน้มนำ CoPS เป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการก่อโรค (Baird-Parker, 1963) เนื่องจากมีการสร้างปัจจัยที่ก่อความรุนแรงที่มากกว่าและสามารถหลบเลี่ยงการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ โดย *S. aureus* เป็นสปีชีส์ที่มีพบได้ในมนุษย์ในความชุก 10-30% ส่วนในอดีต CoPS ในสุนัขถูกจัดเป็น *S. intermedius* (Hajek, 1976) แต่ถูกนำมาจัดลำดับอนุกรมวิธานใหม่ในปี 2005 เป็น *S. pseudintermedius* เนื่องจากความแตกต่างของสารพันธุกรรม (Devriese et al., 2005) นอกจากนี้ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* เป็นอีกสปีชีส์หนึ่งที่พบได้ในสุนัข โดยแยกได้ครั้งแรกในสุนัขที่มีปัญหาช่องหูส่วนนอกอักเสบ (Igimi et al., 1990) เชื้อ CoPS ทั้ง 3 สปีชีส์นี้มีคุณลักษณะแสดงที่มีความคล้ายคลึงกัน ทำให้สามารถทำการแยกสปีชีส์ได้จากการใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีจากชุดทดสอบสำเร็จรูป แต่ก็สามารถนำมาหาคุณสมบัติชีวเคมีบ่งชี้ที่สามารถใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของ CoPS ที่สามารถแยกจากสุนัขได้ (Chanchaithong and Prapasarakul, 2011) แล้วจึงทำการยืนยันด้วยคุณลักษณะ

ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น การทำ multiplex PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *nuc* ที่มีความจำเพาะกับ CoPS ทั้ง 7 สปีชีส์ ได้แก่ *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus* และ *S. lutrae* (Sasaki et al., 2010) หรือ polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism (Bannoehr et al., 2008) ที่มีความสามารถในการจำแนก *S. intermedius* และ *S. pseudintermedius* แต่อย่างไรก็ตามจากการรายงานที่ผ่านมาพบเชื้อ CoPS ที่แยกได้จากสุนัข ได้แก่ *S. pseudintermedius, S. schleiferi subsp. coagulans* และเชื้อ *S. pseudintermedius* เป็นสปีชีส์ที่พบเป็นหลักและมักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง ส่วน *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ก็มีบทบาทเป็นเชื้อประจำถิ่นที่สามารถแยกได้จากผิวหนังของสุนัขปกติและรอยโรคได้เช่นกัน

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *S. aureus* โดยการศึกษาติดตามระยะยาว พบว่ามนุษย์ประมาณ 20% เป็นโฮสต์ถาวรของ *S. aureus* และประมาณ 60% มีบทบาทในการเป็นพาหะเป็นช่วง (intermittent carrier) (Peacock et al., 2001) โดยเยื่อบุช่องจมูกจัดว่าเป็นบริเวณที่เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อ *S. aureus* (Toshkova et al., 2001) โดยบุคลากรทางการแพทย์ที่ปฏิบัติหน้าที่ในโรงพยาบาลเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการเป็นพาหะของเชื้อ MRSA ในความชุกประมาณ 1.6-15.5% (Albrich and Harbarth, 2008) นอกจากนี้สุนัขจัดเป็นแหล่งกักโรคของเชื้อ MRSA ได้ในรายที่อาศัยร่วมบริเวณกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA และอาจมีการส่งผ่านเชื้อระหว่างคนและสุนัข (Manian, 2003) S. pseudintermedius เป็นสปีชีส์หลักที่พบได้ในสุนัขและสามารถแยกได้จากสุนัขสุภาพปกติสูงถึง 90% จากบริเวณเยื่อเมือกและตำแหน่งที่มีความอับชื้น ได้แก่ เยื่อบุช่องจมูกและช่องปาก ขาหนีบ ฝีเย็บ และรอบทวารหนัก (Bannoehr and Guardabassi, 2012) และสุนัขสามารถเป็นพาหะของเชื้อดื้อยา MRSP ได้ตั้งแต่ความชุก 0-66.5% (van Duijkeren et al., 2011) โดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็นโรคผิวหนังอักเสบแบบเป็นตุ่มหนองพบในความถี่ที่สูงที่สุด (Kawakami et al., 2010) ที่ผ่านมามีการรายงานเพิ่มมากขึ้นว่ามนุษย์สามารถเป็นพาหะของเชื้อ MRSP ได้โดยเฉพาะในบุคลากรที่ปฏิบัติงานด้านสัตว์เลี้ยงที่และผู้ที่เลี้ยงสุนัข (Boost et al., 2009; Morris et al., 2010; van Duijkeren et al., 2008) และพบการรายงานการก่อโรคของเชื้อ *S. pseudintermedius* ในมนุษย์ (Campanile et al., 2007; Chuang et al., 2010; Kempker et al., 2009; Stegmann et al., 2010) *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และ MRSSc นั้นสามารถพบได้ในสุนัขในความถี่ที่ต่ำกว่า *S. pseudintermedius* และ MRSP (Griffeth et al., 2008; Hanselman et al., 2008; Yamashita et al., 2005) และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ใน

มนุษย์มีการรายงานในผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่หัวใจทำให้เกิดเยื่อบุด้านในของหัวใจอักเสบ (endocarditis) และเกิดการแพร่กระจายของเชื้อตามส่วนต่างๆของร่างกาย (metastatic infection) (Kumar et al., 2007)

เชื้อดื้อยา MRS มีคุณสมบัติในการดื้อยากลุ่มเบต้า-แลคแทม มีการรายงานครั้งแรกในเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) โดยเชื้อจะสามารถสร้าง PBP2a ที่ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยยากลุ่มเบต้า-แลคแทม ทำให้เชื้อยังคงสังเคราะห์ peptidoglycan และสร้างผนังเซลล์ต่อไปได้ (Chambers, 1988) ทั้งนี้รูปแบบการดื้อยานี้สามารถพบได้ใน *S. pseudintermedius* ซึ่งมีการรายงานเชื้อ MRSP ครั้งแรกในปี 2007 (Sasaki et al., 2007) โดยมีกลไกในการดื้อยาเช่นเดียวกันกับ MRSA ซึ่งสร้าง PBP2a มาจาก *mecA* ซึ่งอยู่ใน SCC*mec* ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุลนี้ โดย SCC*mec* ถูกค้นพบในครั้งแรกในเชื้อ MRSA N315 (Katayama et al., 2000) ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญคือ *mec* complex ที่มียีน *mecA* และระบบควบคุมการแสดงออกของยีน และกลุ่มยีน *ccr* complex ที่ทำหน้าที่ในการตัดต่อเข้าสู่โครโมโซมของ staphylococci โดย SCC*mec* จะมีตำแหน่งที่มีความจำเพาะบนโครโมโซมที่ *attBSCC* นอกจากนี้ใน SCC*mec* ยังประกอบด้วยยีนอื่นๆที่ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพและโลหะหนักได้ด้วย แล้วแต่ชนิดของ SCC*mec* (Hiramatsu et al., 2001) ทั้งนี้การจัดจำแนก SCC*mec* นั้นอาศัยชนิดและความแตกต่างของ *mec* complex และ *ccr* complex เป็นหลักตาม International Working Group on Staphylococcal Cassette Chromosome (IWG-SCC, 2009) ซึ่งปัจจุบันพบได้ทั้งหมด 11 ชนิดใน MRSA ดัง**ตาราง 1**

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของ *ccr* complex และ *mec* complex ที่เป็นองค์ประกอบ SCC*mec* ทั้งหมด 11 ชนิดที่พบในเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

SCC*mec* type	*ccr* complex	*mec* complex
I	1 (A1/B1)	B (IS*431-mecA*-Δ*mecR1*-ΨIS*1272*)
II	2 (A2/B2)	A (IS*431-mecA-mecR1-mecI*)
III	3 (A3/B3)	A (IS*431-mecA-mecR1-mecI*)
IV	2 (A2/B2)	B (IS*431-mecA*-Δ*mecR1*-ΨIS*1272*)
V	5 (C)	C2 (IS*431-mecA*-Δ*mecR1*-IS*431*)
VI	4 (A4/B4)	B (IS*431-mecA*-Δ*mecR1*-ΨIS*1272*)
VII	5 (C)	C1 (IS*431-mecA*-Δ*mecR1*-IS*431*)
VIII	4 (A4/B4)	A (IS*431-mecA-mecR1-mecI*)
IX	1 (A1/B1)	C2 (IS*431-mecA*-Δ*mecR1*-IS*431*)
X	7 (A1/B6)	C1 (IS*431-mecA*-Δ*mecR1*-IS*431*)
XI	8 (A1/B3)	E (*blaZ-mecA-mecR1-mecI*)

SCC*mec* หลายชนิดที่พบใน MRSA เคยมีการรายงานการพบใน MRSP เช่นกันได้แก่ SCC*mec* III, IV, V และ V_T (Black et al., 2009; Perreten et al., 2010) นอกจากนี้ MRSP มี SCC*mec* ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนใน MRSA เช่น SCC*mec* II-III ที่มีลักษณะลูกผสมของ SCC*mec* II และ SCC*mec* III ที่พบได้เป็นหลักในเชื้อ MRSP ที่มีการระบาดในทวีปยุโรป (Descloux et al., 2008) การจัดจำแนกชนิดของ SCC*mec* เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ MRS

การศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อแบคทีเรียทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทั้งในทางอนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ และพันธุศาสตร์เชิงประชากร (van Belkum et al., 2001) ทั้งนี้สามารถทำได้หลายวิธี ในเชื้อ MRSA สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอ (pulsed-field gel electrophoresis หรือ PFGE) อาศัยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ย่อยโครโมโซมที่ตำแหน่งจำเพาะ (recognition site) ให้ได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดต่างๆ แล้วนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าทำให้ได้รูปแบบของลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งวิธีนี้มักใช้ในการระบุและเปรียบเทียบสายพันธุ์ MRSA ที่มีการระบาดในโรงพยาบาล เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกแยกแยะที่สูง (Goering, 2010) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในเชื้อ *Staphylococcus* sp. คือ

SmaI แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานเชื้อ MRSA ที่ไม่สามารถทำการจำแนกด้วยการใช้ *Sma*I ได้ (Argudín et al., 2010) นอกจากนี้ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียและการหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เชื้อที่มีความเกี่ยวข้องกันในสปีชีส์เดียวกัน สามารถใช้เทคนิค multilocus sequence typing (MLST) ที่อาศัยความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรมของยีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย (housekeeping genes) ทั้งหมด 7 ยีน แล้วทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลระดับนานาชาติบนเว็บไซต์ที่มีการรายงานผ่านมา โดยในปัจจุบันมีการพัฒนาระบบ MLST ของเชื้อ MRSA จากการหาลำดับสารพันธุกรรมของ 7 ยีน ได้แก่ carbamate kinase (*arcC*), shikimate dehydrogenase (*aroE*), glycerol kinase (*glpF*), guanylate kinase (*gmk*), phosphate acetyltransferase (*pta*), triosephosphate isomerase (*tpi*) และ acetyl coenzyme A acetyltransferase (*yqiL*) เช่นเดียวกันมีการพัฒนาระบบ MLST ของเชื้อ *S. pseudintermedius* จากการใช้เพียง 4 ยีน (MLST-4) (Bannoehr et al., 2007) ในการจำแนกเบื้องต้น ประกอบด้วย elongation factor (*tuf*), chaperonin 60 (*cpn60*), phosphate acetyltransferase (*pta*) และ autoinducing peptide (*agrD*) แต่ล่าสุดมีการพัฒนาระบบ MLST แบบ 7 ยีน เพื่อความสามารถในการจำแนกที่สูงขึ้นโดยใช้ข้อมูลเดิมจาก MLST-4 จากการใช้ยีนเดิม 3 ยีนได้แก่ *tuf*, *cpn60* และ *pta* แล้วเพิ่มยีนใหม่อีก 4 ยีน ประกอบด้วย acetate kinase (*ack*), formate dehydrogenase (*fdh*), adenylsuccinate synthetase (*purA*) และ sodium sulfate symporter (*sar*) (Solyman et al., 2013) ในเชื้อดื้อยากลุ่ม MRS จะมีการใช้ผลการจำแนกชนิดของ SCC*mec* ประกอบคุณลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ ดังนั้นการใช้เทคนิค MLST, PFGE และการจำแนกชนิด SCC*mec* มีศักยภาพในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อดื้อยา MRSA และ MRSP ในหลากหลายการศึกษาที่ผ่านมา และสามารถระบุสายพันธุ์หลักที่มีการระบาดในพื้นที่ต่างๆ เช่น MRSP ST71 (MLST)-J(PFGE)-II-III(SCC*mec*) เป็นสายพันธุ์หลักที่มีการระบาดในทวีปยุโรปและพบการติดเชื้อในผู้เลี้ยงสุนัข (Stegmann et al., 2010) และ MSLT ST398 เป็นสายพันธุ์ของเชื้อ MRSA ที่มีการระบาดในปศุสัตว์ทั่วโลก (Wulf and Voss, 2008) เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนาระบบ MLST ในการจัดจำแนกเชื้อ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* แต่ก็สามารถใช้เทคนิค PFGE เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อร่วมกับจัดจำแนกชนิด SCC*mec* เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อ MRSSc ได้

นอกจากเชื้อ MRS จะมีคุณสมบัติดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแทมแล้วยังสามารถดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่มอื่นๆได้ด้วย จากการที่มียีนดื้อยาที่ทำให้เกิดกลไกการดื้อยาหลากหลายกลุ่มในเชื้อ MRSA และ MRSP ส่วนมากแล้วเชื้อจะมีการดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam, tetracycline, aminoglycosides, macrolides,

lincosamides, chloramphenicol, trimethorprim และ fluoroquinolones ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม β-lactam นอกจาก *mecA* ที่พบใน staphylococci คือ กลุ่มยีน β-lactamase (*blaZ-blaI-blaR*) ยีนที่ทำให้ดื้อต่อ tetracycline ได้แก่ ยีน *tet*(M) และ *tet*(K) ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม macrolide, lincosamide และ streptogramin B ได้แก่ ยีน *erm*(A), *erm*(B) และ *erm*(C) ยีนที่ทำให้ดื้อต่อ aminoglycoside ได้แก่ *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* ที่ทำให้ดื้อต่อยา gentamicin และ kanamycin ยีน cat_{pC221} and cat_{pC223} ที่ทำให้ดื้อยา chloramphenicol เป็นต้น รวมถึงยีน *dfrA* และ *dfrG* ที่ทำให้เกิดการดื้อยา trimethoprim (Kadlec et al., 2012; Kadlec and Schwarz, 2012) ยิ่งไปกว่านั้นมีการรายงานการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin ของเชื้อ MRSA (Hiramatsu, 1998) และยาหลายชนิดที่เป็นยาที่สำคัญในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ MRSA และกำจัดเชื้อ MRSA ในคนที่เป็นพาหะ ได้แก่ linezolid (oxazolidone), rifampicin (rifamycin), quinupristin/dalfoprintin (streptogramin A และ B), fusidic acid และ mupirocin แต่ปัจจุบันมีการรายงานการดื้อต่อยาที่สำคัญเหล่านี้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งจากการเกิดการผ่าเหล่าของยีน *23S rRNA* หรือได้รับยีนที่สร้างเอนไซม์ 23S methyl transferase (*cfr*) (Morales et al., 2010; Pillai et al., 2002) ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม lincosamide, streptogramin A และ phenicol ร่วมด้วย (Roberts, 2008) จัดเป็นกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่มที่มีการรายงานในเชื้อ MRSA ST398 และ ST9 ที่มีแหล่งที่มาจากปศุสัตว์ (Kehrenberg et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีการดื้อยาในรูปแบบการสร้าง efflux pump ที่ทำให้เกิดการกำจัดยาปฏิชีวนะกลุ่ม streptogramin A และ pleuromutilin ออกจากเซลล์ โดยยีน *vga* และ *lsa* (Kadlec and Schwarz, 2009; Schwendener and Perreten, 2011; Wendlandt et al., 2013) แต่ยังไม่พบการดื้อยาในรูปแบบนี้ในเชื้อ MRSP และ MRSSc แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานเชื้อ MRSP ที่ดื้อต่อยา rifampicin ซึ่งเป็นยาหนึ่งที่มีความสำคัญ จากกลไกการเกิดการผ่าเหล่าของยีน *rpoB* หลังจากการใช้ยานี้ในการรักษาสุนัขที่ติดเชื้อ MRSP เพียงไม่นาน (Kadlec et al., 2011)

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่เอกสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

5.1 เพื่อได้มาซึ่งข้อมูลทางระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci ที่มีพบในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในประเทศไทยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากนานาชาติ

5.2 เพื่อนำรูปแบบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อไปเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาสัตว์เลี้ยง และรายงานสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อในปัจจุบัน เพื่อสนับสนุนให้บุคลากรทางสัตวแพทย์ได้มีการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุสมผล

6. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

6.1 การจัดอบรม สัมมนา การนำเสนอผลงาน และการบรรยายในการประชุมวิชาการ

6.2 เผยแพร่บทความลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

6.3 เพิ่มข้อมูลทางระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อลงในฐานข้อมูลออนไลน์

7. วิธีการดำเนินงานวิจัย

7.1 การกำหนดกลุ่มตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

7.2 การเพาะแยกระบุสปีชีส์ของเชื้อ coagulase-positive staphylococci

7.3 การทดสอบหาคุณสมบัติการดื้อยา methicillin และการหายีน *mecA*

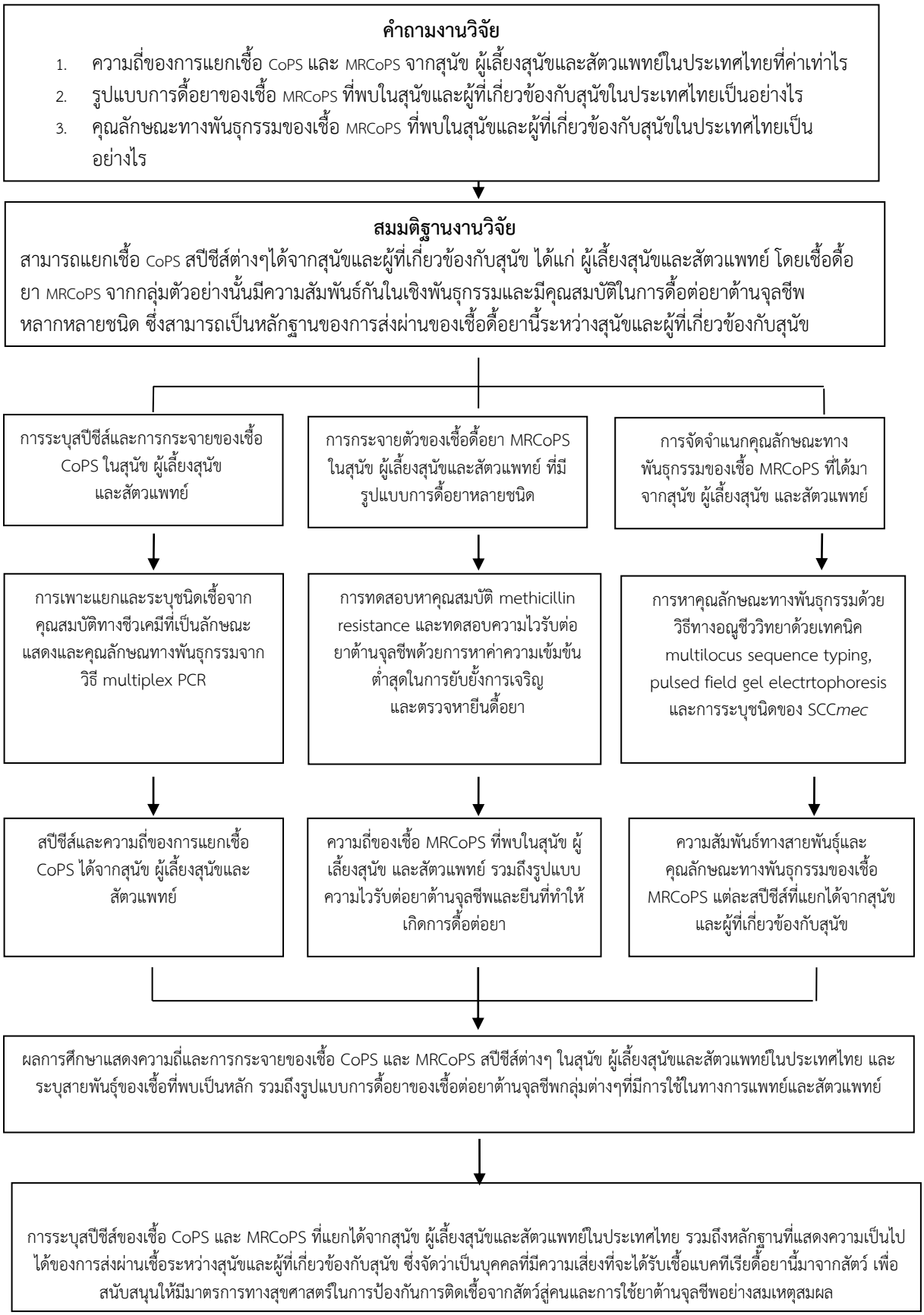
7.4 การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพและหายีนดื้อยา

7.5 การจัดจำแนกชนิดเชิงโมเลกุลด้วยการหาชนิดของ SCC*mec*, pulsed-field gel electrophoresis และ multilocus sequence typing

8. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



อุปกรณ์และวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่างการเก็บตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย 4 กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ (1) กลุ่มควบคุม คือ บุคคลที่ไม่ได้สัมผัสหรือใกล้ชิดกับสัตว์เลี้ยง จำนวน 100 คน (2) กลุ่มอาสาสมัครบุคลากรที่ทำงานเกี่ยวกับการรักษาสุนัข ได้แก่ สัตวแพทย์จำนวน 200 คน (3) กลุ่มผู้เลี้ยงและสัมผัสใกล้ชิดกับสุนัข จำนวน 100 คน ในกลุ่มบุคคลทั้งสามกลุ่มทำการเก็บตัวอย่างจากช่องจมูกเท่านั้น และ (4) สุนัข 100 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างที่บริเวณเยื่อบุโพรงจมูก รอบก้น และขาหนีบ

การเก็บตัวอย่างทั้งในคนและสุนัขใช้ก้านไม้พันสำลีฆ่าเชื้อ เก็บลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดขนส่ง (Stuart's transport medium) (Difco®, France) เก็บลงในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง แล้วนำมาทำการเพาะแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

2. การเพาะแยกเชื้อ และระบุสปีชีส์ของเชื้อ coagulase-positive *Staphylococcus* sp.

ทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soya agar (TSA) ที่ผสมเลือดแกะ 5% และอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก Baird-Parker agar แล้วบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส และอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol salt agar (MSA)ที่ผสมยาปฏิชีวนะ oxacillin ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาว-เหลือง ขนาด 1-2 มิลลิเมตร จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5 % และเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีเทาดำ มันวาว ขอบเรียบกลมขนาด 1-2 มิลลิเมตร จาก Baird-Parker agar ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus* sp. และโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA แล้วนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% จนแยกได้เชื้อที่บริสุทธิ์เพื่อนำไปทำการทดสอบเพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อต่อไป

การทดสอบเชื้อขั้นปฐมภูมิ (primary test) ประกอบด้วย การย้อมเชื้อด้วยสีแกรม (Gram's staining) เชื้อในสกุล *Staphylococcus* จะมีเซลล์รูปร่างกลม (cocci) ติดสีแกรมบวกเป็นสีม่วง เรียงตัวกันเป็นกลุ่ม หรืออยู่เซลล์เดี่ยว, การทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility test) เชื้อในสกุลนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากไม่มีออร์แกเนลล์ที่ใช้ในการเคลื่อนที่, การทดสอบคุณสมบัติการมีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) เชื้อในสกุลนี้มีเอนไซม์คะตะเลส (+) แต่ไม่มีเอนไซม์ออกซิเดส (-), การทดสอบคุณสมบัติในการใช้น้ำตาลทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน

(oxidation and fermentation) เชื้อในสกุล staphylococci จะสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (Freney et al., 1999)

การทดสอบเชื้อขั้นทุติยภูมิ (Secondary test) ประกอบด้วย การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของซีรั่ม (coagulation test) ทดสอบโดยการผสมเชื้อลงในซีรั่มของแกะ เชื้อในกลุ่ม coagulase-positive staphylococci จะให้ผลบวกคือการเกิดการแข็งตัวของซีรั่ม จากคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ coagulase การทดสอบการสร้าง acetoin ด้วย Voges-Proskauer (VP) test การทดสอบการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลมอลโทส (maltose) กาแลคโตส (galactose) ทรีฮาโลส (trehalose) และแลคโตส (lactose) และการทดสอบการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Chanchaithong and Prapasarakul, 2011) จากนั้นได้ทำการยืนยันสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR ที่มีความจำเพาะต่อ ยีน nuc ของ coagulase-positive staphylococci แต่ละสปีชีส์ด้วย primer ที่จำเพาะทั้งสิ้น 7 คู่ (Sasaki et al., 2010)

3. การตรวจคัดกรองเชื้อ MRCoPS ด้วยวิธี oxacillin disk screening test

เป็นการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ oxacillin 1 ไมโครกรัม ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดกรองเชื้อ MRS วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) ที่มีเชื้อ coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ไม่มีการเจริญของเชื้อรอบแผ่นยา (clear zone) แล้วนำมาแปลผลโดยยึดตามหลักของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2011; Schissler et al., 2009)

4. การตรวจหายีน *mecA*

ทำการตรวจหายีนนี้ด้วย PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการแยกแยะกลุ่มเชื้อ MRS ที่ได้จากสัตว์ (Strommenger et al., 2003) โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงใน**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *mecA*

Primer names	Oligonucleotide sequences (5'→ 3')	Product size (bp)
mecA 1	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	532
mecA 2	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	

5. การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพและการทดสอบหายีนดื้อยา (antimicrobial susceptibility testing and antimicrobial resistance gene detection)

ทำการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้วิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) ต่อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 19 ชนิด ได้แก่ oxacillin, penicillin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole, trimethoprim, mupirocin, vancomycin, rifampicin, linezolid, fusidic acid, quinupristin/dalfopristin, linezolid, fusidic acid และ tiamulin ด้วยวิธี broth microdilution assay ตามขั้นตอนของ Clinical Laboratory Standard Institute

การทดสอบหายีนดื้อยาทำโดยการใช้เทคนิคไมโครแอเรย์ (microarray) ที่ตรวจยีนที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพในแบคทีเรียแกรมบวก (AMR+ve-3) (Perreten et al., 2005) และการตรวจหายีน *lsa*(E) ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม pleuromutilin และ streptogramin A ทำโดยวิธี PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ (primer) จากยีน *lsa*(E) รหัส nucleotide accession no. AF408195 จากฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) ดัง**ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *lsa*(E)

Primer names	Oligonucleotide sequences (5'→ 3')	Product size (bp)
lsaE-F	ACGGACGCGGTAAAACTACT	693
lsaE-R	TTGGCACGTTTCATCGCTTT	

6. การจัดจำแนกชนิดของ staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) ของเชื้อ MRCoPS (SCC*mec* typing)

การจัดจำแนกชนิด SCC*mec* ที่พบใน MRCoPS ทำโดยวิธี multiplex PCR (Kondo et al., 2007) ซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนก SCC*mec* type I ถึง V ประกอบด้วย 2 ชุด ได้แก่ การตรวจชนิดของ *ccr* complex และ *mec* complex โดยใช้ไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR ดัง**ตารางที่ 4** และการจำแนก SCC*mec* type II-III ที่พบใน *S. pseudintermedius* ทำโดยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดัง**ตารางที่ 5** ส่วนชนิดที่ไม่สามารถทำการจัดจำแนกชนิดได้โดยวิธี multiplex PCR ได้ถูกนำมาระบุชนิดของ ΨSCC*mec*$_{57395}$ ด้วยวิธี long range PCR ด้วยไพรเมอร์ orfX-R3 (5′-AGATGAAAAAGCACCCGAAAC-3′) และ contig27-F3 (5′-CTTAAATGTCCAATATGTAAACACTC-3′) ทำให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 21,667 คู่เบส แล้วจึงนำมาทำวิเคราะห์รูปแบบขนาดผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Bsu*36I) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 627 คู่เบส, 1,866 คู่เบส, 3,207 คู่เบส, 5,406 คู่เบส และ 10,571 คู่เบส โดยมีเชื้อ MRSP stain 57395 เป็นเชื้อควบคุม (Perreten et al., 2013)

ตารางที่ 4 ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนก SCC*mec* I to V (Kondo et al., 2007)

Primer for PCR	Oligonucleotide primer (5'→3')	Gene target	Gene detected by primer pair	Size of product (bp)
Multiplex PCR panel 1 for *ccr* complex identification with *mecA* confirmation				
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	*mecA*	*mecA* (mA1-mA2)	286
mA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	*mecA*		
α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	*ccrA1*	*ccrA1-ccrB* (α1-βc)	695
α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	*ccrA2*	*ccrA2-ccrB* (α2-βc)	937
α3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	*ccrA3*	*ccrA3-ccrB* (α3-βc)	1,791
βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	*ccrB1,ccrB2,ccrB3*		
α4.1	GTATCAATGCACCAGAACTT	*ccrA4*	*ccrA3-ccrB* (α1-βc)	1,287
β4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT	*ccrB4*		
γR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	*ccrC*	*ccrC* (γF-γR)	518
γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	*ccrC*		

ตารางที่ 4 ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนก SCC*mec* I to V (Kondo et al., 2007) (ต่อ)

Multiplex PCR panel 2 for *mecA* complex identification				
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	*mecI*	*mecA-mecI* (mA7-mI6)	1,963
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	IS*1272*	*mecA*-IS*1272* upstream of *mecA* (mA7-IS7)	2,827
IS2 (iS-2)	TGAGGTTATTCAGATATTTCGATGT	IS*431*	*mecA*-IS*431* upstream of *mecA* (mA7-iS2(iS-20))	804
mA7	ATATACCAAACCCGACAACTACA	*mecA*		

ตารางที่ 5 ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนก SCC*mec* type II-III ที่พบในเชื้อ MRSP (Descloux et al., 2008)

Primer name	Oligonucleotide primer (5'→3')	Size of product (bp)	Interpretation
sccmecIII-F4	AACAGCCATGACAAGCAC	831	absence of cadmium resistant operon (SCC*mec* type II or type II-III)
scc241-F6	AAGACTTAGCAGGAAAACGC	1,118	presence of cadmium resistant operon (SCC*mec* type III)
sccmecIII-R3	TAATGCCCATCATTTCAC		

7. การจัดจำแนกชนิดเชิงโมเลกุลด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ของเชื้อ MRCoPS ทั้งหมด 113 เชื้อ โดย PFGE (Black et al., 2009) จากการเตรียมสารละลายเซลล์แบคทีเรียให้มีค่า optical density ที่ 1.0-1.1 ที่ 610 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นทำการผสมเซลล์แบคทีเรียใน 1.8% SeaKem Gold agarose gel เพื่อให้ได้ PFGE plug ที่มีเซลล์แบคทีเรีย แล้วจึงทำการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ lysostaphin และ lysozyme ใน TE buffer (0.1 M Tris-HCl and 0.01 M EDTA, pH 8.0) และเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย cell lysis buffer (6

mM Tris HCl, 1M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij-58, 0.2% Sodium deoxycholate and 0.5% Sodium laurylsarcosine) แล้วจึงนำ PFGE plug มาล้างด้วย DNAse free water และ TE buffer ก่อนทำการตัดสารพันธุกรรมในโครโมโซมของแบคทีเรียด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I (30 unit/ตัวอย่าง) ที่อุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกด้วยการตัดด้วย *Sma*I จะใช้ Cfr9I (40 unit/ตัวอย่าง) ในการทำ PFGE จากนั้นชิ้นส่วนสารพันธุกรรมใน PFGE plugs ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเครื่อง PFGE CHEF-DR III (Biorad, USA) ที่ pulse time 5-40 วินาที ความต่างศักย์ 6 โวลต์ต่อเซนติเมตร อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บันทึกภาพภายใต้แสง UV และทำการวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียด้วย UPGMA (optimitization ที่ 0.5% และ position tolerance 0.5%) โดยใช้โปรแกรม InfoQuest version 4.5 (Biorad, USA) เชื้อที่มีรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ที่มากกว่า 85% ขึ้นไปจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยการวิเคราะห์จะทำการแยกสปีชีส์เชื้อ MRCoPS และชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตัดสายพันธุกรรม

8. การจัดจำแนกเชื้อ MRSP และ MRSA ด้วยวิธี multilocus sequence typing (MLST)

ทำการจัดจำแนกเชื้อ MRSP ทั้งหมด 83 เชื้อ ด้วยวิธี MLST 2 ระบบ ประกอบด้วย MLST-4 และ MLST-7 โดย MLST-4 ประกอบด้วย ยีน *tuf, cpn60, pta* และ *agrD* (Bannoehr et al., 2007) และ MLST-7 ประกอบด้วยยีน *ack, cpn60, fdh, pta, purA, sar* และ *tuf* (Solyman et al., 2013) จากการทำ PCR ของแต่ละยีน แล้วจึงทำการหาลำดับสารพันธุกรรมด้วยวิธี capillary sequencing ด้วยเครื่อง BigDye Terminator (Qiagen, USA) จากนั้นทำการวิเคราะห์ผ่านผู้ดูแลฐานข้อมูล (Professor Vincent Perreten, Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland) และทำการบันทึกข้อมูลลงในฐานข้อมูล (www.pubmlst.org) เพื่อระบุ allelic profile และ sequence type (ST)

การจัดจำแนกเชื้อ MRSA ด้วยวิธี MLST ทำโดยการหาลำดับสารพันธุกรรมของ 7 ยีน ได้แก่ *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* และ *yqiL* (Enright et al., 2000) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมกับฐานข้อมูล (www.mlst.net) เพื่อระบุ allelic profile และ sequence type

ผลการทดลอง

1. อัตราการเป็นพาหะของเชื้อ MRCoPS (MRCoPS carriage rate) ของสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข

จากการเก็บตัวอย่างจากเยื่อบุช่องจมูก ขาหนีบ และบริเวณฝีเย็บ (perineum) จากสุนัข 100 ตัว โดยสามารถแยกเชื้อ CoPS ได้จากสุนัขทุกตัว ที่อย่างน้อย 1 ตำแหน่งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เยื่อบุช่องจมูกเป็นตำแหน่งที่สามารถแยกเชื้อ CoPS ได้มากที่สุด โดยเชื้อที่สามารถแยกได้ในความถี่ที่มากที่สุด คือ *S. pseudintermedius* (100%) ตามมาด้วย *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (28%) และ *S. aureus* (4%) ตามลำดับ จากผลการทดสอบเพื่อหาคุณสมบัติ methicillin resistance พบเชื้อ MRSP, MRSSc และ MRSA ในความถี่ 45%, 17% และ 1% ตามลำดับ ผลความถี่ในการแยกเชื้อ CoPS ทั้ง 3 สปีชีส์ที่ตำแหน่งต่างๆ และคุณสมบัติ methicillin resistance แสดงดัง**ตารางที่ 6**

จากการเก็บตัวอย่างจากเยื่อบุช่องจมูกของกลุ่มประชากรที่เกี่ยวข้องกับสุนัข ได้แก่ สัตว์แพทย์ ผู้ที่เลี้ยงสุนัข และผู้ที่ไม่เลี้ยงสุนัข พบความถี่ของการแยกเชื้อ CoPS ที่ 25%, 37% และ 25% ตามลำดับ โดยผลการศึกษาที่น่าสนใจคือพบเชื้อ *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. coagulans ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นในสุนัข ในกลุ่มสัตว์แพทย์ (21% และ 8% ตามลำดับ) และผู้ที่เลี้ยงสุนัข (13% และ 4%) แต่ไม่พบเชื้อสองสปีชีส์นี้ในกลุ่มคนที่ไม่เลี้ยงสุนัข (กลุ่มควบคุม) นอกจากนี้สามารถแยกเชื้อ MRCoPS ได้จากกลุ่มสัตวแพทย์และผู้ที่เลี้ยงสุนัข แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุมอีกเช่นกัน ผลความถี่ของการแยกเชื้อ CoPS ทั้ง 3 สปีชีส์ และคุณสมบัติ methicillin resistance ในกลุ่มประชากรสุนัขและคนแสดงดัง**ตารางที่ 7**

เมื่อทำการตรวจคุณสมบัติ methicillin resistance ทั้งลักษณะแสดงและการมียีน *mec*A ทำให้ได้เชื้อ MRCoPS จำนวนทั้งหมด 113 เชื้อ แบ่งเป็นเชื้อ MRSP จำนวน 83 เชื้อ MRSSc จำนวน 26 เชื้อ และ MRSA จำนวน 4 เชื้อ เพื่อนำไปทำการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิดต่อไป แหล่งที่มาของเชื้อและจำนวนเชื้อ MRCoPS ทั้ง 3 สปีชีส์แสดงดัง**ตารางที่ 8**

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความถี่และการกระจายของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสที่ให้ผลบวกกับการทดสอบโคแอกกูเลส (coagulase positive staphylococci หรือ CoPS) ที่ผิวหนังตำแหน่งต่างๆของสุนัข

สปีชีส์*	จำนวนสุนัขที่พบเชื้อ (ร้อยละ)			
	ทุกตำแหน่ง	เยื่อบุช่องจมูก	ฝีเย็บ	ขาหนีบ
จำนวนรวม	100	100	90	16
CoPS	100 (100)	86 (86.0)	78 (86.7)	16 (100)
Single MSCoPS	52 (52.0)	47 (47.0)	40 (44.4)	4 (25.0)
Single MRCoPS	29 (29.0)	32 (32.0)	30 (33.3)	9 (56.3)
Mixed MRCoPS and MSCoPS	19 (19.0)	7 (7.0)	8 (8.9)	3 (18.75)
S. pseudintermedius	100(100)	83 (83.0)	73 (81.1)	16 (100)
Single MSSP	55 (55.0)	47 (47.0)	37 (41.1)	4 (25.0)
Single MRSP	29 (29.0)	32 (32.0)	29 (32.2)	9 (56.3)
Mixed MRSP and MSSP	16 (16.0)	4 (4.0)	7 (7.8)	3 (18.8)
S. schleiferi subsp. *coagulans*	29 (29.0)	18 (18.0)	18 (20.0)	6 (37.5)
Single MSSSc	12 (12.0)	6 (6.0)	6 (6.7)	2 (12.5)
Single MRSSc	17 (17.0)	12 (12.0)	12 (13.3)	4 (25.0)
Mixed MRSSc and MSSSc	0	0	0	0
S. aureus	4 (4.0)	4 (4.0)	0	0
Single MSSA	3 (3.0)	3 (3.0)	0	0
Single MRSA	1 (1.0)	1 (1.0)	0	0
Mixed MRSA and MSSA	0	0	0	0

*CoPS, coagulase-positive staphylococci; MSCoPS, methicillin-susceptible coagulase-positive staphylococci; MRCoPS, methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci, MRSP, methicillin-resistant *S. pseudintermedius*; MSSP, methicillin-susceptible *S. pseudintermedius*, MRSSc, methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; MSSSc, methicillin-susceptible *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; and MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความถี่และการกระจายของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสที่ให้ผลบวกกับการทดสอบโคแอกกูเลส coagulase positive staphylococci (CoPS) ในกลุ่มประชากรสุนัข สัตวแพทย์ ผู้ที่เลี้ยงสุนัข และผู้ที่ไม่เลี้ยงสุนัข (กลุ่มควบคุม)

	จำนวนสุนัขที่พบเชื้อ (ร้อยละ)	จำนวนบุคคลที่พบเชื้อ (ร้อยละ)		
		ผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องกับสุนัข	ผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข	
			สัตวแพทย์	ผู้เลี้ยงสุนัข
จำนวนรวม	100	100	200	100
S. pseudintermedius	100 (100)	0	21(10.50)	13 (13.00)
Single MSSP	55 (55.00)	0	5 (2.50)	10 (10.00)
Single MRSP	29 (29.00)	0	16 (8.00)	2 (2.00)
Mixed MR and MSSP	16 (16.00)	0	0	1 (1.00)
S. schleiferi subsp. *coagulans*	29 (29.00)	0	8 (4.00)	4 (4.00)
Single MSSSc	12 (12.00)	0	2% (4)	2 (2.00)
Single MRSSc	17 (17.00)	0	2% (4)	2 (2.00)
Mixed MR and MSSP	0	0	0%	0
S. aureus	4 (4.00)	25 (25.00)	24 (12.00)	20 (20.00)
Single MSSA	3 (3.00)	25 (25.00)	21 (10.50)	20 (20.00)
Single MRSA	1 (1.00)	0	3 (1.50)	0
Mixed MR and MSSA	0	0	0	0

*CoPS, coagulase-positive staphylococci; MSCoPS, methicillin-susceptible coagulase-positive staphylococci; MRCoPS, methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci, MRSP, methicillin-resistant *S. pseudintermedius*; MSSP, methicillin-susceptible *S. pseudintermedius*, MRSSc, methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; MSSSc, methicillin-susceptible *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; and MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*

ตารางที่ 8 อัตราการแยกเชื้อ CoPS และ MRCoPS จากสุนัข สัตวแพทย์ ผู้ที่เลี้ยงสุนัขและผู้ที่ไม่เลี้ยงสุนัข (กลุ่มควบคุม) และจำนวนเชื้อ MRCoPS ที่นำไปทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

	จำนวนสุนัขที่พบเชื้อ (ร้อยละ)	บุคคลที่พบเชื้อ (ร้อยละ)		
		ผู้ไม่เลี้ยงสุนัข	ผู้สัมผัสเกี่ยวข้องกับสุนัข	
	n=100	n=100	สัตวแพทย์ n=200	ผู้เลี้ยงสุนัข n=100
S. pseudintermedius	100 (100.0)	0	21 (10.5)	13 (13.0)
MRSP	45 (45.0)	0	16 (8.0)	3 (3.0)
No. of MRSP isolate	64	0	16	3 (3.0)
S. schleiferi subsp. *coagulans*	29 (29.0)	0	8 (4.0)	4 (4.0)
MRSSc	17 (17.0)	0	4 (2.0)	2 (2.0)
No. of MRSSc isolate	20	0	4	2
S. aureus	4 (4.0)	25 (25.0)	24 (12.0)	20 (20.0)
MRSA	1 (1.0)	0	3 (1.5)	0
No. of MRSA isolate	1	0	3	0

MRSA, methicillin-resistant *Staph.aureus*; MRSP, methicillin-resistant *Staph. pseudintermedius*; MRSSc, methicillin-resistant *Staph. schleiferi* subsp. *coagulans*

2. ผลการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพและรูปแบบของการดื้อยาของเชื้อ MRCoPS

การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ MRSP จำนวน 83 เชื้อ ให้ผลรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial resistance profile) ทั้งหมด 16 รูปแบบ ดัง**ตารางที่ 9** และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSP แสดงดัง**ตารางที่ 12** โดยเชื้อ MRSP มากกว่า 90% แสดงการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ oxacillin, penicillin, tetracycline, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin และ sulfamethoxazole นอกจากนี้เชื้อ MRSP ยังมีการดื้อต่อยา ciprofloxacin, chloramphenicol, trimethoprin และ mupirocin แต่ไม่พบการดื้อต่อยา vancomycin, rifampicin, linezolid, fusidic acid, quinupristin/dalfopristin และ tiamulin

เชื้อ MRSA จำนวน 4 เชื้อ แสดงรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 3 แบบ ดัง**ตารางที่ 10** โดยเชื้อทุกตัวดื้อต่อยา oxacillin, penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin,

streptomycin, clindamycin, tiamulin และ quinupristin/dalfopristin เชื้อ MRSA 2 ตัว ดื้อต่อยา chloranphenicol และ 1 ตัวดื้อต่อยา mupirocin ไม่พบเชื้อ MRSA ดื้อต่อยา erythromycin, vancomycin, rifampicin, linezolid และ fusidic acid โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA แสดงดัง **ตารางที่ 13**

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* และรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข

จำนวนเชื้อ	**รูปแบบของการดื้อยา**	**ที่มาของเชื้อ**		
n=83		**สุนัข**	**สัตวแพทย์**	**ผู้เลี้ยงสุนัข**
		n=100	**n=200**	**n=100**
36	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-CIP-SMX	28	4	0
22	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX	12	7	3
8	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX	7	0	0
4	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CHL-CIP-SMX	2	2	0
2	OXA-PEN-TET-SMX	2	0	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-SMX	1	0	0
1	OXA-PEN-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-CIP-SMX	1	0	0
1	TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-CIP-SMX	1	0	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-CIP-SMX	0	1	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-SMX-MUP	1	0	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX-MUP	0	1	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-CIP-SMX	0	1	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-SMX	1	0	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-TMP-CIP	1	0	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN	1	0	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX-MUP	1	0	0

OXA, oxacillin; PEN, penicillin; TET, tetracycline; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CLIi; inducible resistance to clindamycin; CHL, chloramphenicol; TMP, trimethoprim; CIP, ciprofloxacin; SMX, sulfamethoxazole; MUP, mupirocin.

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* และรูปแบบการดื้อยา (antimicrobial resistance profile) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข

จำนวนเชื้อ	**รูปแบบของการดื้อยา**	**ที่มาของเชื้อ**		
n=4		สุนัข n=100	สัตวแพทย์ n=200	ผู้เลี้ยงสุนัข n=100
2	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-CLI-TIA-TMP-CIP-SYN	0	2	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-CLI-TIA-TMP-CHL-CIP-SYN-MUP	1	0	0
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-CLI-TIA-TMP-CHL-CIP-SYN	0	1	0

OXA, oxacillin; PEN, penicillin; TET, tetracycline; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; CLI, clindamycin; TIA, tiamulin; CHL, chloramphenicol; TMP, trimethoprim; CIP, ciprofloxacin; SYN, quinuprintin/dalfopristin; MUP, mupirocin.

เชื้อ MRSSc จำนวน 26 เชื้อ ให้รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ 11 แบบ ดัง**ตารางที่ 11** โดยเชื้อ MRSSc แสดงการดื้อต่อยา oxacillin, penicillin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, sulfamethoxazole และ mupirocin แสดงในตารางดังกล่าว ไม่พบเชื้อ MRSSc ดื้อต่อยา chloramphenicol, trimethoprim, vancomycin, rifampicin, linezolid, fusidic acid, quinupristin/dalfopristin และ tiamulin ค่าวามเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSSc แสดงใน**ตารางที่ 14**

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus schleifei* subsp. *coagulans* และรูปแบบการดื้อยา (antimicrobial resistance profile) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข

จำนวนเชื้อ	**รูปแบบของการดื้อยา**	**ที่มาของเชื้อ**		
n=26		สุนัข	สัตวแพทย์	**ผู้เลี้ยงสุนัข**
		n=100	n=200	n=100
7	OXA-TET	6	1	0
1	OXA-TET-SMX	1	0	0
1	TET-SMX	0	1	0
2	OXA-PEN	1	1	0
4	OXA-SMX	4	0	0
2	OXA-PEN-TET-KAN-STR-ERY-CLI	0	1	1
1	PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-MUP	0	0	1
1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CIP-SMX	1	0	0
4	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI	4	0	0
2	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP	2	0	0
1	OXA-PEN-TET	1	0	0

OXA, oxacillin; PEN, penicillin; TET, tetracycline; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CIP, ciprofloxacin; SMX, sulfamethoxazole; MUP, mupirocin.

ตารางที่ 12 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของเชื้อ MRSP ต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิด

	ค่าที่แปลผลว่ามีการดื้อยา (mg/l)*	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (mg/l)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (mg/l)																จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา (%)
			≤0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	≥2	≥4	≥8	≥16	≥32	≥64	≥128	≥256	≥512	
Oxacillin with 2% NaCl	>0.25	0.25-8					1	11	13	1		57							82 (98.8%)
Penicillin	>0.25	0.012-2				1				82									82 (98.8%)
Ciprofloxacin	>1	0.25-8					2	10	2	1		68							69 (83.1%)
Tetracycline	>2	0.5-16						1					82						82 (98.8%)
Gentamicin	>1	1-16							2	3	8	9	61						81 (97.6%)
Kanamycin	>16	4-64									2				81				81 (97.6%)
Streptomycin	>16	4-32									3			80					80 (96.4%)
Erythromycin	>2	0.25-8					3					80							80 (96.4%)
Clindamycin	>0.5	0.12-4				10	2	3			70								80* (96.4%)
Chloramphenicol	>8	4-64									14	23			46				46 (55.4%)
Sulfamethoxazole	>256	64-512															1	82	82 (98.8%)
Trimethoprim	>4	2-32								30	14			39					39 (47.0%)
Mupirocin	>256	0.5-2 and 256						79		1							3		3 (3.6%)
Vancomycin	>2	1-16							83										0
Rifampicin	>0.5	0.015-0.5	83																0
Linezolid	>4	1-8							83										0
Fusidic acid	>1	0.5-4						83											0
Quinupristin/dalfopristin	>2	0.5-4						83											0
Tiamulin	NA	0.5-4						83											0

*ค่าการแปลผลการดื้อยาตาม European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing version 2.0 และ การแปลผลค่าความไวรับต่อยา kanamycin, streptomycin and sulfamethoxazole แปลตาม French Society for Microbiology in 2010.; แถบสีเทาแสดงระดับแสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา, NA; ไม่มีค่าสำหรับการแปลผล, ND; ไม่ได้ทำการทดสอบ เชื้อจำนวน 10 เชื้อแสดงคุณสมบัติ inducible clindamycin resistan

25

ตารางที่ 13 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของเชื้อ MRSA ต่อยาต้านจุลชีพ 20 ชนิด

	ค่าที่แปลผลว่ามีการดื้อยา (mg/l)*	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (mg/l)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (mg/l)																จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา (%)
			≤0.0 15	0.0 3	0.06	0.12	0.25	0.5	1	≥ 2	≥ 4	≥ 8	≥ 16	≥ 32	≥ 64	≥12 8	≥25 6	≥512	
Oxacillin with 2% NaCl	>0.25	0.25-8										4							4 (100%)
Penicillin	>0.25	0.012-2								4									4 (100%)
Ciprofloxacin	>1	0.25-8										4							4 (100%)
Tetracycline	>2	0.5-16											4						4 (100%)
Gentamicin	>1	1-16									1	2	1						4 (100%)
Kanamycin	>16	4-64												2	2				4 (100%)
Streptomycin	>16	4-32												4					4 (100%)
Erythromycin	>2	0.25-8					2	2											0
Clindamycin	>0.5	0.12-4									4								4 (100%)
Chloramphenicol	>8	4-64										2			2				2 (50.0%)
Sulfamethoxazole	>256	64-512													3	1			0
Trimethoprim	>4	2-32												4					4 (100%)
Mupirocin	>256	0.5-2 and 256						3									1		1 (25.0%)
Vancomycin	>2	1-16							4										0
Rifampicin	>0.5	0.015-0.5	4																0
Lizenolid	>4	1-8							2	2									0
Fusidic acid	>1	0.5-4						4											0
Quinupristin/dalfopristin	>2	0.5-4									4								1 (25.0%)
Tiamulin	NA	0.5-4									4								NA
Virginiamycin M1	NA	0.12-512															4		NA

*ค่าการแปลผลการดื้อยาตาม European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing version 2.0 และ การแปลผลค่าความไวรับต่อยา kanamycin, streptomycin and sulfamethoxazole แปลตาม French Society for Microbiology in 2010.; แถบสีเทาแสดงระดับแสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา; NA; ไม่มีค่าสำหรับการแปลผล, ND; ไม่ได้ทำการทดสอบ

26

ตารางที่ 14 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของเชื้อ MRSSc ต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิด

	ค่าที่แปลผลว่ามีการดื้อยา (mg/l)*	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (mg/l)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (mg/l)															จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา (%)
			≤0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	≥2	≥4	≥8	≥16	≥32	≥64	≥128	≥256	≥512	
Oxacillin with 2% NaCl	>0.25	0.25-8					2	14	10										24 (92.3%)
Penicillin	>0.125	0.0125-2				13	1	12											13 (50.0%)
Ciprofloxacin	>1	0.25-8					9	6	10	1									1 (3.8%)
Tetracycline	>2	0.5-16						6			1		19						20 (76.9%)
Gentamicin	>1	1-16							18		1	1	6						8 (30.8%)
Kanamycin	>16	4-64									16				10				10 (38.5%)
Streptomycin	>16	4-32									16			10					10 (38.5%)
Erythromycin	>2	0.25-8					16					10							10 (38.5%)
Clindamycin	>0.5	0.12-4				16					10								10 (38.5%)
Sulfamethoxazole	>256	64-512													1	9	8	8	8 (30.8%)
Mupirocin	>256	0.5-2 and 256						18		2							6		6 (23.1%)
Chloramphenicol	>8	4-128									26								0
Trimethoprim	>4	2-32								21	5								0
Vancomycin	>2	1-16							12	14									0
Rifampicin	>0.5	0.015-0.5	26																0
Linezolid	>4	1-8							26										0
Fusidic acid	>1	0.5-4						26											0
Quinupristin/dalfopristin	>2	0.5-4						26											0
Tiamulin	NA	0.5-4						26											0

*ค่าการแปลผลการดื้อยาตาม European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing version 2.0 และ การแปลผลค่าความไวรับต่อยา kanamycin, streptomycin and sulfamethoxazole แปลตาม French Society for Microbiology in 2010.

แถบสีเทาแสดงระดับแสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา

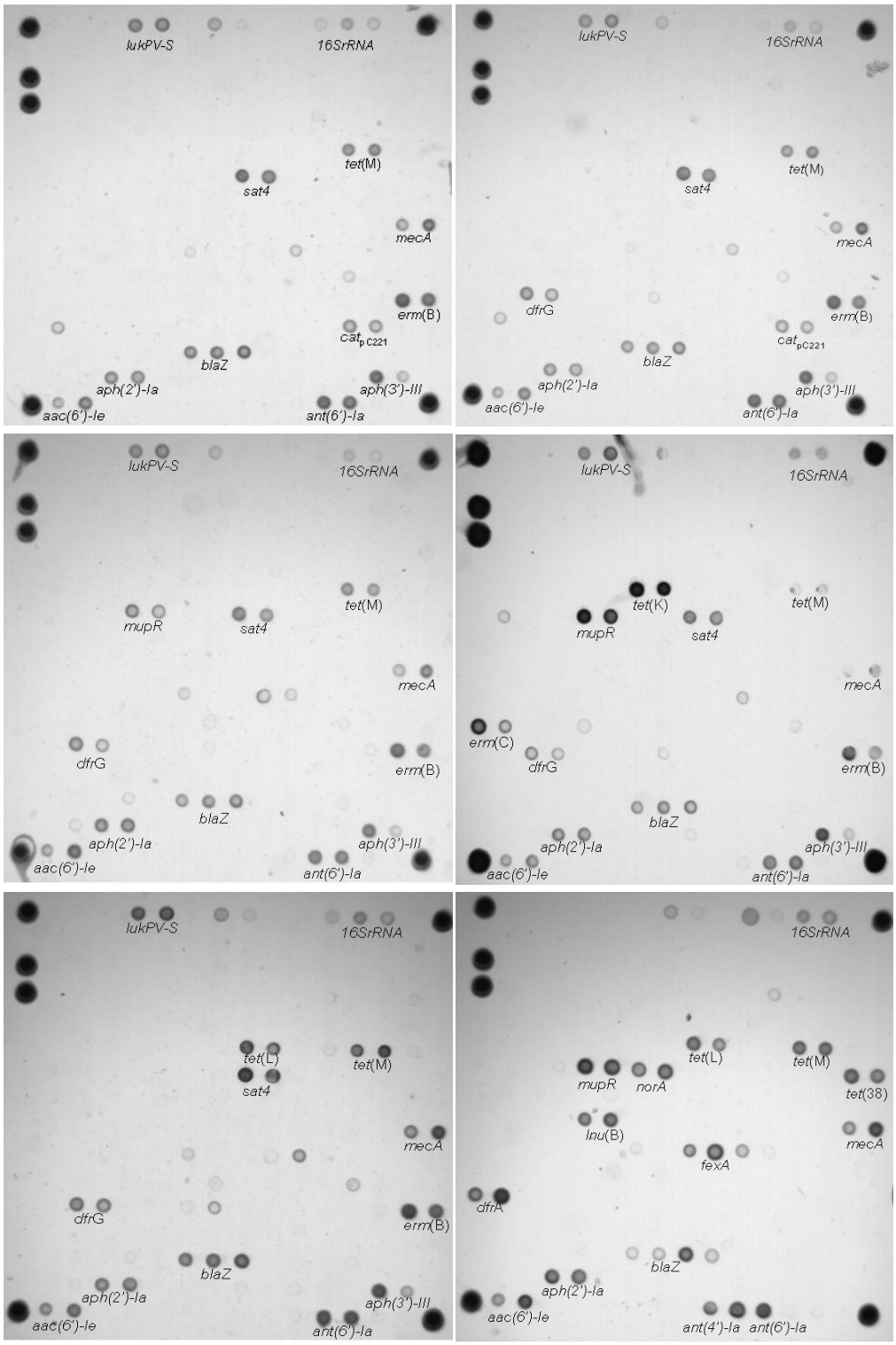
27

3. ยีนดื้อยาที่ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ

จาก DNA microarray พบว่าเชื้อ MRSP ที่แสดงการดื้อยาจากการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ มียีน *mecA*, *blaZ* ที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม β-lactam นอกจากนี้พบยีน *tet*(M), *tet*(K) และ *tet*(L) ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยา tetracycline ยีน *aac(6')-Ie, aph(2')-Ia, aph(3')-III* และ *ant(6')-Ia* ที่ทำให้เกิดกลไกการดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycoside ชนิดต่างๆ (gentamicin, kanamycin, streptomycin) ยีน *erm* ที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม macrolide (erythromycin) และ lincosamide (clindamycin) รวมถึง $cat_{pC}221$, *dfrG* และ *mupR* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม chloramphenicol, trimethoprim และ mupirocin ตามลำดับ โดยจำนวนเชื้อและร้อยละของเชื้อที่มียีนแต่ละชนิดแสดงดัง**ตารางที่ 18**

ในเชื้อ MRSA สามารถพบยีนดื้อยาได้หลากหลายชนิดเช่นกัน พบว่าเชื้อ MRSA มียีน *mecA, blaZ*, *aac(6')-Ie, aph(2')-Ia, ant(6')-Ia, ant(6')-Ia, tet*(M), *tet*(L), *lnu(B), fexA* และ *mupR* ที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม β-lactam, aminoglycoside, tetracycline, lincosamide, phenicol และ muirocin ตามลำดับ จาก DNA microarray นอกจากนี้ยังพบยีน *lsa*(E) จากการทำ PCR ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยา tiamulin และ quinupristin/dalfopristin ด้วย โดยจำนวนเชื้อและร้อยละของเชื้อที่มียีนแต่ละชนิดแสดงดัง**ตารางที่ 19**

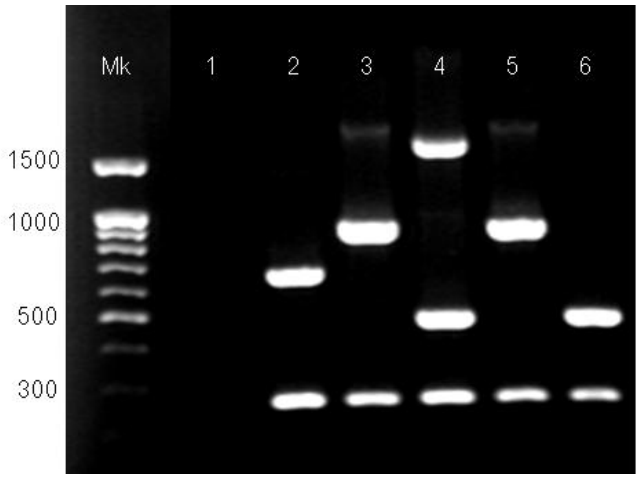
ส่วนเชื้อ MRSSc พบว่ามียีนที่คล้ายคลึงกับ MRSP แต่พบได้ในความถี่ที่น้อยกว่า ได้แก่ *mecA, blaZ*, *aac(6')-Ie, aph(2')-Ia, tet*(K), *tet*(O), *erm*(C) และ *mupR* โดยจำนวนเชื้อและร้อยละของเชื้อที่มียีนแต่ละชนิดแสดงดัง**ตารางที่ 20**



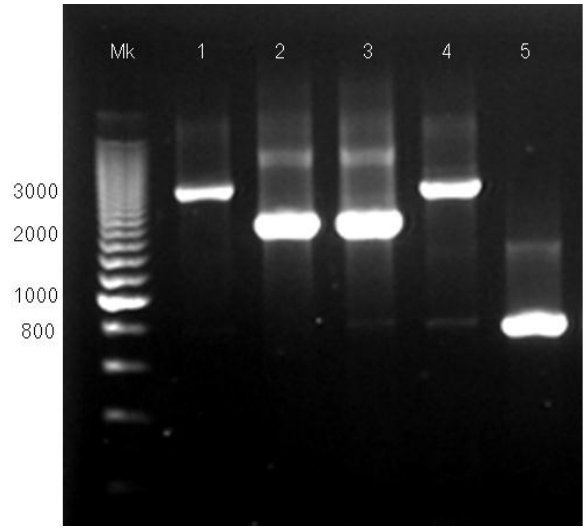
รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างการปรากฏของยีนดื้อยาจากเทคนิค DNA microarray ที่ในการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก

4. ชนิดของ SCC*mec* ที่พบใน MRCoPS

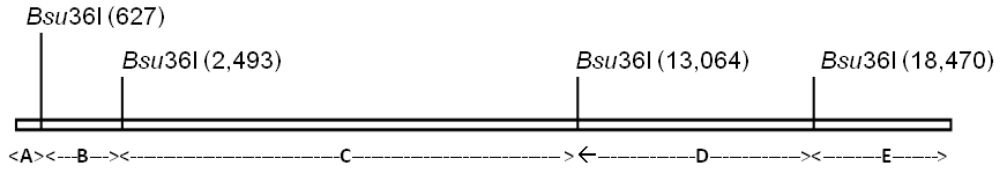
เชื้อ MRSP ทั้งหมด 35 เชื้อ สามารถถูกจัดจำแนกชนิดของ SCC*mec* ได้ด้วยวิธี multiplex PCR ประกอบด้วย SCC*mec* V ซึ่งมีการปรากฏของ *ccrC* (518 คู่เบส) และ class C *mec* complex (804 คู่เบส) จำนวน 22 เชื้อ SCC*mec* A1 ที่ประกอบด้วย class A *mec* complex (1,963 คู่เบส) และ *ccrA1B1* (698 คู่เบส) จำนวน 11 เชื้อ, SCC*mec* II-III ที่มีการปรากฏของ class A *mec* complex (1,963 คู่เบส), *ccrA3B3* (1,791 คู่เบส) และ *ccrC* (518 คู่เบส) แต่ไม่มีการปรากฏของ cadmium resistance operon จำนวน 2 เชื้อ ส่วน MRSP อีก 47 เชื้อ ไม่สามารถจำแนกชนิดของ SCC*mec* ด้วยวิธี multiplex PCR ได้ จึงนำไปทำการระบุชนิดด้วย long-range PCR และ restriction analysis **(ดังรูปที่ 5)** ได้ผลว่า 46 เชื้อมี ΨSCCmec_{57395} ส่วนอีก 1 เชื้อไม่สามารถระบุชนิดได้ (non typeable SCC*mec*) ส่วนเชื้อ MRSA จำนวน 4 เชื้อและ MRSSc จำนวน 26 เชื้อ ทั้งหมดมี SCC*mec* V ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์จาก multiplex PCR เช่นเดียวกับ MRSP ที่มี SCC*mec* V



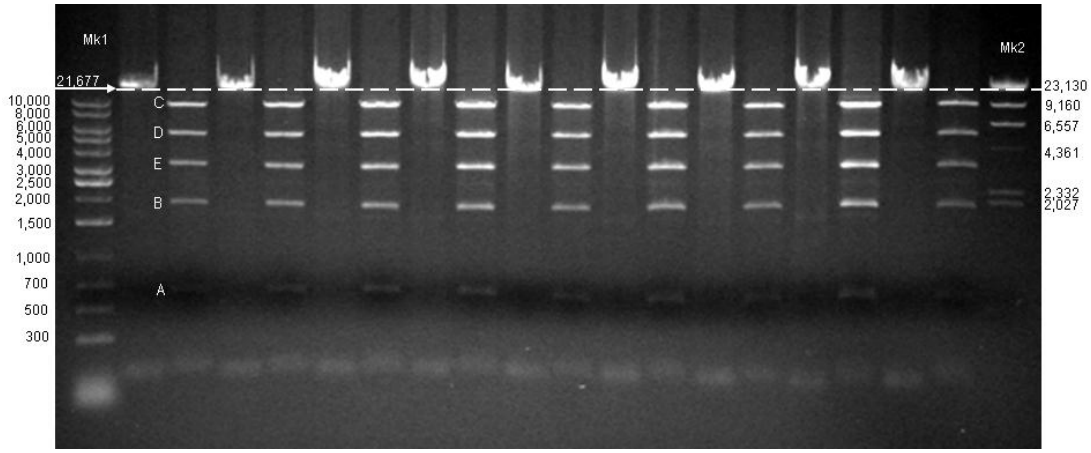
รูปที่ 2 แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ DNA จาก multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหา *ccr* complex ของเชื้อ MRCoPS ประกอบด้วย internal control *mecA* (286 คู่เบส); Mk, ladder marker, แถวที่ 1 *S. aureus* ATCC 25923; แถวที่ 2, MRSA NCTC 10442 (type 1 *ccr* complex, 695 bp); แถวที่ 3 MRSA N315 (type 2 *ccr* complex, 937 bp); แถวที่ 4 MRSA 8512082 (type 3 *ccr* complex, 1793 bp and type 5 *ccr* complex, 518 bp); แถวที่ 5 MRSA SCC*mec* type IV (type 4 *ccr* complex, 1, 287 bp); and แถวที่ 6 MRSA WIS (type 5 *ccr* complex, 518 bp)]



รูปที่ 3 แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ DNA จาก multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหา *mec* complex ของเชื้อ MRCoPS [Mk, ladder marker; แถวที่ 1 MRSA NCTC 10442 (class B *mec* complex, 2,827 bp); แถวที่ 2 MRSA N315 (class A *mec* complex, 1,963 bp); แถวที่ 3 MRSA 8512082 (class A *mec* complex, 1,963 bp); แถวที่ 4 MRSA SCC*mec* type IV (class B *mec* complex, 2,827 bp); and แถวที่ 5 MRSA WIS (class C *mec* complex, 804 bp)]



รูปที่ 4 แสดงขนาดของ ΨSCC*mec*$_{57395}$ และส่วนโครโมโซมด้าน 3′ ด้วยการทำ long-range PCR แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*36I ได้จำนวน 5 ส่วน (A, 627 bp; B, 1,866 bp; C, 10,571 bp; D, 5,406 bp and E, 3,207 bp)



รูปที่ 5 แสดงชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์จากการทำ long range PCR ด้วยไพรเมอร์ *orfX* และ *contig27* ที่ให้ผลิตภัณฑ์ครอบคลุมส่วน ΨSCC*mec*$_{57395}$ และโครโมโซมส่วน 3′ ขนาด (21,677 คู่เบส) และชิ้นส่วนจากการทำการตัดด้วยเอนไซม *Bsu*36I [Mk1, 1 kb ladder marker; Mk2, *Hind*III-digested λ marker; lane 1, *orfX* to *contig27* amplicon of MRSP 57395; lane 2 digested products of MRSP 57395; lane 3-18 *orfX* to *contig27* amplicon (21,677 bp) of MRSP samples with their digested products (A, 627 bp; B, 1,866 bp; C, 10,571 bp; D, 5,406 bp and E, 3,207 bp)]

5. ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี MLST

จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ MRSP จำนวน 83 เชื้อ ด้วยวิธี MLST จากยีน 4 ชนิด ได้ 13 sequence types (ST_4) โดยเชื้อ MRSP $ST_4$5, 26, 29, 71, 131, 133 และ 191 เป็นเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและผู้ที่สัมผัสกับสุนัข โดยเป็นที่น่าสนใจว่า MRSP $ST_4$133 และ 191 สามารถแยกได้จากสุนัขและผู้ที่เลี้ยงสุนัขที่อยู่ในบ้านเดียวกัน จำนวนเชื้อแต่ละ ST_4 และแหล่งที่มาของเชื้อแสดงดัง**ตารางที่ 15**

ส่วนผลจากการทำ MLST ของเชื้อ MRSP ด้วย 7 ยีน (MLST-7) นั้นให้ความสามารถในการจำแนกแยกแยะสายพันธุ์ของเชื้อได้สูงกว่าการใช้เพียง 4 ยีน ทำให้พบได้ทั้งหมด 17 sequence types (ST_7) พบว่า 6 STs ประกอบด้วย $ST_7$45, 112, 169, 178, 181 และ 183 สามารถแยกได้จากสุนัขและผู้ที่สัมผัสกับสุนัขโดย MRSP $ST_7$181 และ 183 สามารถแยกได้จากสุนัขและผู้ที่เลี้ยงสุนัขที่อยู่ในบ้านเดียวกัน จำนวนเชื้อแต่ละ ST_7 และแหล่งที่มาของเชื้อแสดงดัง**ตารางที่ 16** โดย allelic profile ของเชื้อ MLST ทั้งจาก MLST-4 และ MLST-7 แสดงดัง**ตารางที่ 17**

ในเชื้อ MRSA จำนวน 4 เชื้อ จากสุนัข 1 เชื้อและจากสัตวแพทย์ 3 เชื้อ ทั้งหมดเป็น MRSA ST398 ที่มี allelic profile 3-35-19-2-20-26-39

ตารางที่ 15 แสดงจำนวน แหล่งที่มาของเชื้อ และ sequence type ของเชื้อ MRSP จากการทำ multilocus sequence typing ด้วย 4 ยีน

Sequence type จาก	แหล่งที่มาของเชื้อ			จำนวนเชื้อรวม
MLST-4 (ST_4)	สุนัข	สัตวแพทย์	ผู้เลี้ยงสุนัข	(ร้อยละ)
รวม	64	16	3	83
2	1	0	0	1 (1.2)
4	0	1	0	1 (1.2)
5	9	2	0	11 (13.3)
6	3	0	0	3 (3.6)
26	1	2	0	3 (3.6)
29	3	2	0	5 (6.0)
71	1	1	0	2 (2.4)
100	2	0	0	2 (2.4)
103	2	0	0	2 (2.4)
131	34	4	0	38 (45.8)
133	5	4	1	10 (12.1)
163	1	0	0	1 (1.2)
191	2	2	0	4 (4.8)

ตารางที่ 16 แสดงจำนวน แหล่งที่มาของเชื้อ และ sequence type ของเชื้อ MRSP จากการทำ multilocus sequence typing ด้วย 7 ยีน

Sequence type จาก MLST-7 (ST_7)	แหล่งที่มาของเชื้อ			จำนวนเชื้อรวม (ร้อยละ)
	สุนัข	สัตวแพทย์	ผู้เลี้ยงสุนัข	
รวม	64	16	3	83
45	36	6	0	42 (50.6)
55	1	0	0	1 (1.2)
110	0	1	0	1(1.2)
111	1	0	0	1(1.2)
112	8	2	0	10 ()
113	0	1	0	1 (1.2)
114	1	0	0	1 (1.2)
115	0	1	0	1 (1.2)
116	1	0	1	1 (1.2)
121	1	0	1	1 (1.2)
125	1	0	1	1 (1.2)
169	1	1	0	2 (2.4)
178	1	1	0	2 (2.4)
181	5	3	1	9 (1.1)
182	3	0	0	3 (3.6)
183	2	0	2	4 (4.8)
185	2	0	0	2 (2.4)

ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบ sequence type ของเชื้อ MRSP จากการทำ multilocus sequence typing ด้วย 4 ยีน และ 7 ยีน

MLST-7	*ack*	*cpn60*	*fdh*	*pta*	*purA*	*sar*	*tuf*	*agrD**	MLST-4
45	3	2	2	1	2	1	2	2	131
45	3	2	2	1	2	1	2	1	29
55	16	2	2	1	13	1	2	1	29
110	3	9	2	1	2	1	2	1	6
111	2	2	1	1	1	2	1	2	5
112	2	2	2	1	1	2	1	2	5
113	2	11	3	1	11	2	2	3	4
114	2	7	2	1	2	5	2	3	100
115	3	11	2	24	11	1	1	3	133
116	3	7	2	1	2	2	2	3	100
121	2	9	3	1	1	2	1	1	2
125	2	10	2	1	1	1	1	4	163
169	2	9	1	2	1	1	1	1	71
178	3	9	4	1	1	1	2	1	6
181	3	11	2	24	20	1	1	3	133
182	7	10	1	1	11	1	2	4	26
183	1	45	2	1	22	1	1	4	191
185	1	9	2	1	2	1	2	3	103

Highlight, genes used for MLST-4 analysis

**agrD* used for only MLST-4 analysis

6. การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ MRCoPS ด้วยลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอด้วยวิธี PFGE

จากการวิคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ของเชื้อ MRSP จำนวน 83 เชื้อ ด้วยวิธี PFGE จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I (*Sma*I-PFGE) พบว่าเชื้อ MRSP จำนวน 39 เชื้อเท่านั้นที่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ด้วย *Sma*I-PFGE แบ่งออกได้เป็น 16 กลุ่ม (A ถึง P) โดยกลุ่ม *Sma*I-A เป็นกลุ่มที่มีจำนวนเชื้อมากที่สุด ประกอบด้วย 14 เชื้อ [(16.9%); 10 เชื้อจากสุนัข, 2 เชื้อจากสัตวแพทย์ และ 2 เชื้อจากผู้เลี้ยงสุนัข] รองลงมาคือกลุ่ม *Sma*I-N ประกอบด้วย 6 เชื้อ [(7.2%); 3 เชื้อจากสุนัข และ 3 เชื้อจากสัตวแพทย์] ส่วน *Sma*I-E ประกอบด้วย 3 เชื้อจากสุนัข และกลุ่ม *Sma*I-L และ *Sma*I-O ประกอบด้วย 2 เชื้อจากสุนัข โดย เชื้อใน *Sma*I-P และ *Sma*I-O ประกอบด้วย 2 เชื้อที่มาจากสุนัขและผู้ที่เลี้ยงสุนัขที่อาศัยในบ้านเดียวกัน นอกจากนั้นกลุ่ม *Sma*I- B, C, D, F, G, H, I, J, K and M ประกอบด้วยเชื้อที่ได้มาจากสุนัขกลุ่มละ 1 เชื้อเท่านั้น

เชื้อ MRSP ที่ไม่สามารถถูกย่อยสาย DNA ด้วย *Sma*I ได้ถูกนำมาทำการวิเคราห์ลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ด้วย PFGE จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cfr*9I จำนวน 44 เชื้อ [(53.0%); 37 เชื้อจากสุนัขและ 7 เชื้อจากสัตวแพทย์] กลุ่มหลักจำแนกสายพันธุ์ด้วย *Cfr*9I-PFGE คือ กลุ่ม *Cfr*9I-A ประกอบด้วยจำนวน 34 เชื้อ [(41.0%); 31 เชื้อจากสุนัข and 3 เชื้อจากสัตวแพทย์] ตามมาด้วยกลุ่ม *Cfr*9I-B ประกอบด้วย 7 เชื้อ [(8.4%); 4 เชื้อจากสุนัขและ 3 เชื้อจากสัตวแพทย์] และกลุ่ม *Cfr*9I-C ประกอบด้วย 3 เชื้อ [(3.6%); 2 เชื้อจากสุนัขและ 1 เชื้อจากสัตวแพทย์]

เชื้อ MRSSc ทั้งหมด 26 เชื้อสามารถถูกจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการทำ PFGE จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I ทั้งหมด แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม (*Sma*I-A ถึง D) กลุ่ม *Sma*I-D เป็นกลุ่มที่มีจำนวนเชื้อ MRSSc มากที่สุดถึง 13 เชื้อ [(50%); 8 เชื้อจากสุนัข, 3 เชื้อจากสัตวแพทย์ และ 2 เชื้อจากผู้เลี้ยงสุนัข] ส่วน *Sma*I-D ประกอบด้วย 7 เชื้อ [(26.9%); 6 เชื้อจากสุนัข และ 1 เชื้อจากสัตวแพทย์] ส่วนกลุ่ม *Sma*I-B และ *Sma*I-C ประกอบด้วยเชื้อจากสุนัข 2 เชื้อและ 1 เชื้อตามลำดับ

ในการทำ PFGE ของเชื้อ MRSA ทั้งหมด 4 เชื้อ พบว่าไม่สามารถทำการย่อยโครโมโซมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I เช่นเดียวกันกับเชื้อ MRSP บางส่วน จึงต้องอาศัย *Cfr*9I ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ซึ่งพบว่าเชื้อที่ได้จากสัตวแพทย์ 3 เชื้อนั้นมีรูปแบบเหมือนกัน และคล้ายคลึงกับเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากสุนัขมาก แสดงมีความแตกของชิ้นส่วน DNA เพียงแค่ 3 ชิ้นเท่านั้น จากการวิเคราะห์ด้วยตาเปล่า

7. คุณลักษณะทางพันธุกรรมและคุณลักษณะการดื้อยาของเชื้อ MRCoPS ร่วมกับการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ

คุณลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ MRSP ซึ่งประกอบด้วย sequence type จากการทำ MLST ด้วย 7 ยีน การจัดกลุ่มจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอ และชนิดของ SCC*mec* ร่วมกับรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ ได้แสดงใน**ตารางที่ 18** โดยเชื้อ MRSP $ST_7$45 ($ST_7$45 และ 131) จำนวน 42 เชื้อ ซึ่งเป็นกลุ่มหลักที่พบมาที่สุดที่มีคุณลักษณะร่วมกันนี้คือไม่สามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I ในการทำ PFGE ได้ โดยต้องใช้เพียง *Cfr*9I เท่านั้น และเชื้อทั้งหมดไม่สามารถระบุชนิด SCC*mec* ด้วยวิธี multiplex PCR ได้ โดยเชื้อ 41 ตัวอย่าง มี ΨSCCmec_{57395} และมีเพียง 1 เชื้อเท่านั้นที่ไม่สามารถระบุชนิด SCC*mec* ได้ เนื่องจากรูปแบบจากการย่อยสายผลิตภัณฑ์จากการทำ long range PCR ด้วย *Bsu*36I ไม่ตรงกับรูปแบบของ ΨSCCmec_{57395} เชื้อ MRSP $ST_7$45 ($ST_4$131) นี้นั้นมีรูปแบบการดื้อยาที่เหมือนกัน โดยแสดงการดื้อต่อยา oxacillin, penicillin, tetracycline gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol และ sulfamethoxazole ส่วนเชื้อ MRSP $ST_7$45 ($ST_4$29) จะแสดงการดื้อต่อยา trimethoprim เพิ่มด้วย นอกจากนี้ยังมี MRSP $ST_7$113 ($ST_4$6) และ MRSP $ST_7$116 ($ST_4$100) ที่ไม่สามารถใช้ *Sma*I-PFGE ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอได้และมี ΨSCCmec_{57395} และพบ MRSP $ST_7$114 ($ST_4$100) และ MRSP $ST_7$185 ($ST_4$103) ที่มี ΨSCCmec_{57395} แต่สามารถจำแนกชนิดด้วย *Sma*I-PFGE ได้

MRSP ที่สามารถจัดจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอด้วย PFGE จากการใช้ *Sma*I นั้นและมี SCC*mec* V ประกอบด้วยทั้งหมด 7 sequence types จากการทำ MLST-7 ประกอบด้วย $ST_7$55, 110, 115, 121, 178, 181, 182 และ 183 และ MRSP $ST_7$111 และ 112 ($ST_4$5) นั้นมี SCC*mec* A1 ซึ่ง 2 sequence types นี้จะแสดงคุณลักษณะการดื้อยาในรูปแบบของ inducible clindamycin resistance นอกจากนี้พบ SCC*mec* II-III ในเชื้อ MRSP $ST_7$169 ($ST_4$71) ส่วน MRSP $ST_7$125 ($ST_4$163) นั้นมี SCC*mec* ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ พบเพียงการปรากฏของ class A *mec* complex เท่านั้น แต่ไม่มีการปรากฏของ *ccr* จากการทำ multiplex PCR

MRSSc สามารถใช้ *Sma*I-PFGE นั้นมี SCC*mec* V ทั้งหมด โดย *Sma*I-D เป็นกลุ่มที่แสดงคุณลักษณะการดื้อยาหลายชนิด (multiple resistance) โดยแสดงการดื้อยามากกว่า 3 ชนิดขึ้นไป ส่วนกลุ่ม *Sma*I-A, B และ D นั้นดื้อยาเพียง 1-3 ชนิด เท่านั้น คุณลักษณะทางพันธุกรรมและการดื้อยาของเชื้อ MRSSc แสดงดัง **ตารางที่ 19 และรูปที่ 8**

MRSA ST398 ทั้งหมดมี SCCmec V ซึ่งจำเป็นต้องใช้ Cfr9I ในการทำ PFGE ซึ่งแสดงคุณลักษณะการดื้อยา oxacillin, penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, kanamycin, streptomycin, clindamycin, trimethoprim, quinupristin/dalfopristin และ tiamulin คุณลักษณะทางพันธุกรรมและการดื้อยาของเชื้อ MRSSc แสดงดัง**ตารางที่ 20 และรูปที่ 9**

8. ความหลากหลายของสายพันธุ์ของ MRCoPS และสายพันธุ์หลักที่มีการกระจายในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในประเทศไทย

MRSP $ST_7$45(MLST-7)-*Cfr*9I-A(PFGE)-ΨSCC*mec*$_{57395}$ เป็นสายพันธุ์หลักที่พบได้ในประเทศไทย สามารถพบได้ในสุนัขจำนวน 27 ตัว (27%) และสัตวแพทย์ 3 คน (1.5%) รองลงมาคือ MRSP $ST_7$112 -*Sma*I-A-A1 ซึ่งพบในสุนัข 8 ตัว (8%) และสัตวแพทย์ 2 คน (1%) ส่วน MRSP $ST_7$181 นั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Sma*I-PFGE ที่มีความเกี่ยวข้องกัน (*Sma*I-N, O และ P) และทั้งหมดมี SCC*mec* V ถูกแยกได้จากสุนัข 5 ตัว (5%) สัตวแพทย์ 3 คน (1.5%) และผู้เลี้ยงสุนัข 1 คน (1%) และ MRSP $ST_7$183 -*Sma*I-A-V สามารแยกได้จากสุนัข 2 ตัว (2%) และผู้เลี้ยงสุนัข 2 คน (2%) โดยเชื้อ MRSP $ST_7$181 และ 183 นั้นแยกได้จากสุนัขและผู้เลี้ยงสุนัขที่อาศัยในบ้านเดียวกันและเชื้อ MRSP ของแต่ละ ST แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอที่เหมือนกัน นอกจากนี้ MRSP $ST_7$169 และ 178 พบ SCC*mec* II-III และ V ตามลำดับ สามารถถูกแยกได้จากสุนัข 1 ตัว และสัตวแพทย์ 1 คน ในแต่ละ ST ส่วน MRSP ST อื่นๆ ได้แก่ $ST_7$55, 111, 114, 116, 121, 125, 182 และ 185 นั้นมีการกระจายตัวในสุนัข แต่ไม่พบในผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข และ $ST_7$110, 113 และ 115 สามารถแยกได้จากสัตวแพทย์เท่านั้น จำนวนของเชื้อ MRSP ที่แสดงคุณลักษณะต่างๆและแหล่งที่มาแสดงใน**ตารางที่ 18**

เชื้อ MRSSc จำนวน 10 เชื้อที่ถูกจัดอยู่ใน *Sma*I_{SSc}-D นั้นสามารถแยกได้จากสุนัขจำนวน 7 ตัว ผู้เลี้ยงสุนัข 2 คน และสัตวแพทย์ 1 คน นอกจากนี้ยังพบเชื้อมากกว่า 1 สปีชีส์ ได้แก่ MRSP และ MRSSc รวมถึง MRSP ที่มีมากกว่า 1 ST จากสุนัขตัวเดียวกันด้วยแสดงดัง**ตารางที่ 21** จำนวนของเชื้อ MRSSc ที่แสดงคุณลักษณะต่างๆและแหล่งที่มาแสดงใน**ตารางที่ 19** ส่วนเชื้อ MRSA ST398-*Cfr*9I_{SA}-V ที่แยกได้จากสุนัขจำนวน 1 ตัวและสัตวแพทย์ 1 คนนั้นแสดงใน**ตารางที่ 20**

ตารางที่ 18 จำนวนเชื้อ, คุณลักษณะเชิงโมเลกุล และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ที่แยกได้จากสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์

จำนวนเชื้อ	จำนวนที่แยกเชื้อได้ (ร้อยละ)			ST_7	ST_4	PFGE type	SCC*mec* type	คุณลักษณะการดื้อยา (ค่าที่ใช้แปลผลว่าดื้อยา (mg/L) และยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา)												
	สุนัข	สัตวแพทย์	ผู้เลี้ยงสุนัข					OXA (>0.25)	PEN (>0.125)	TET (>2)	GEN/KAN (>1/>16)	KAN (>16)	STR (>16)	STH*	ERY/CLI (>2/>0.5)	TMP (>4)	CHL (>8)	MUP (>256)	CIP (>1)	SMX (>256)
รวม, N=83	N=100	N=200	N=100					*mecA*	*blaZ*	*tet*	*aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*	*aph(3')-III*	*ant(6')-Ia*	*sat4*	*erm*	*dfrG*	cat_{pC221}	*mupR*	ND	ND
34	31 (31.00)	3 (1.50)	0	45	131	*Cfr*9I-A	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	45	131	*Cfr*9I-B	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	45	131	*Cfr*9I-B	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	-	+
1	0	1 (0.50)	0	45	131	*Cfr*9I-C	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	45	131	*Cfr*9I-C	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	-	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	+	+
3	2 (2.00)	1 (0.50)	0	45	29	*Cfr*9I-C	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	+	-	+	+
1	0	1 (0.50)	0	45	29	*Cfr*9I-C	NT	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	+	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	55	29	*Sma*I-M	V	+†	+†	+(M)	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	+	+
1	0	1 (0.50)	0	110	4	*Sma*I-G	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	111	5	*Sma*I-C	A1	+	+	+(K)	+	+	+	+	+(B)§	+	-	-	-	+
4	4 (4.00)	0	0	112	5	*Sma*I-A	A1	+	+	+(M),(K)	+	+	+	+	+(B)§	+	-	-	-	+
3	3 (3.00)	0	0	112	5	*Sma*I-A	A1	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)§	+	-	-	-	+
1	0	1 (0.50)	0	112	5	*Sma*I-A	A1	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)§	+	-	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	112	5	*Sma*I-A	A1	+	+	+(M),(K)	+	+	+	+	+(B),(C)	+	-	+	-	+
1	0	1 (0.50)	0	112	5	*Sma*I-A	A1	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)§	+	-	+	+	+
1	0	1 (0.50)	0	113	6	*Cfr*9I-B	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	114	100	*Sma*I-P	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	0	1 (0.50)	0	115	133	*Sma*I-H	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	116	100	*Cfr*9I-E	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	-	+	-	-	+
1	1 (1.00)	0	0	121	2	*Sma*I-B	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	+	-	+	-
1	1 (1.00)	0	0	125	163	*Sma*I-D	A	+	+	+(M),(L)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	0	1 (0.50)	0	169	71	*Sma*I-I	II-III	+	+	+(M),(K)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	169	71	*Sma*I-F	II-III	+	+	+(M)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1 (1.00)	0	0	178	6	*Sma*I-J	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	0	1 (0.50)	0	178	6	*Sma*I-K	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
6	3 (3.00)	3 (1.50)	0	181	133	*Sma*I-N	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
2	2 (2.00)	0	0	181	133	*Sma*I-O	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	0	0	1 (1.00)	181	133	*Sma*I-P	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
2	2 (2.00)	0	0	182	26	*Sma*I-E	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	182	26	*Sma*I-E	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	+	+	+
4	2 (2.00)	0	2 (2.00)	183	191	*Sma*I-A	V	+	+	+(M)	+	+	+	+	+(B)	+	-	-	+	+
2	2 (2.00)	0	0	185	103	*Sma*I-N	Ψ$SCCmec_{57395}$	+	+	+(M)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวก								83	83	81	81	80	80	80	80	39	46	3	69	81
(ร้อยละ)								(100)	(100)	(97.59)	(97.59)	(96.38)	(96.38)	(96.38)	(96.38)	(46.98)	(55.42)	(3.61)	(83.13)	(97.59)

MRSP ทุกเชื้อแสดงความไวรับต่อยา vancomycin, rifampicin, linezolid, fusidic acid, quinupristin/dalfopristin และ tiamulin.; +, ผลบวก; -, ผลลบ; ND, ไม่ได้ทดสอบด้วยการหายีนดื้อยา; NT, ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้; A1, มีการปรากฏของ class A mec complex และ type 1 ccr; A, มีการปรากฏของ class A mec complex เท่านั้น; แถบสีเทา, MRSP ST7181 (ST4133) และ ST7183 (ST4191) แยกได้จากสุนัขและผู้เลี้ยงสุนัขที่อาศัยในบ้านเดียวกัน; *มีการปรากฏของยีน sat4 ด้วยเทคนิคไมโครแอเรย์; †มีการตรวจพบยีนดื้อยาแต่ไม่มีการแสดงออกของการดื้อยา; §แสดงคุณสมบัติ inducible clindamycin resistance

ตารางที่ 19 จำนวนเชื้อ, คุณลักษณะเชิงโมเลกุล และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* ที่แยกได้จากสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์

จำนวนเชื้อ	จำนวนที่แยกเชื้อได้ (ร้อยละ)			PFGE	SCC*mec*	คุณลักษณะการดื้อยา (ค่าที่ใช้แปลผลว่าดื้อยา (mg/L) และยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา)										
	สุนัข	สัตวแพทย์	ผู้เลี้ยงสุนัข	type	type	OXA (>0.25)	PEN (>0.125)	TET (>2)	GEN/KAN (>1/>16)	KAN (>16)	STR (>16)	STH *	ERY/CLI (>2/>0.5)	MUP (>256)	CIP (>1)	SMX (>256)
รวม, N=83	N=100	N=200	N=100			*mecA*	*blaZ*	*tet*	*aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*	*aph(3')-III*	*ant(6')-Ia*	*sat4*	*erm*	*mupR*	ND	ND
5	5 (5.00)	0	0	A	V	+		+(K)								
2	1 (1.00)	1 (0.50)	0	A	V	+†		+(K)								+
1	1 (1.00)	0	0	B	V	+	+									
4	4 (4.00)	0	0	C	V	+										+
1	1 (1.00)	0	0	C	V	+		+(K)								+
2	0	1 (0.50)	1 (1.00)	D	V	+	+	+(O)		+	+	+	+(B)			
1	0	0	1 (1.00)	D	V	+†	+	+(O)	+	+	+	+	+(B),(C)	+		
1	1 (1.00)	0	0	D	V	+	+	+(O)	+	+	+	+	+(B)	+§	+	+
1	0	1 (0.50)	0	D	V	+		+(K)								
1	0	1 (0.50)	0	D	V	+	+									
4	4 (4.00)	0	0	D	V	+	+	+(O)	+	+	+	+	+(B)	+§		
2	2 (2.00)	0	0	D	V	+	+	+(K),(O)	+	+	+	+	+(B)	+		
1	1 (1.00)	0	0	D	V	+	+¶	+(K)								
จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวก						26	13	20	8	10	10	10	10	8	1	8
(ร้อยละ)						(100)	(50.00)	(76.92)	(30.76)	(38.46)	(38.36)	(38.46)	(38.46)	(30.76)	(3.84)	(30.76)

MRSSc ทุกเชื้อแสดงความไวรับต่อยา chloramphenicol, trimethoprim, vancomycin, rifampicin, linezolid, fusidic acid, quinupristin/dalfopristin และ tiamulin.

+, ผลบวก; -, ผลลบ; ND, ไม่ได้ทดสอบด้วยการหายีนดื้อยา ; *มีการปรากฏของยีน *sat4* ด้วยเทคนิคไมโครแอเรย์ ;† เชื้อได้มาจากคนไม่แสดงการดื้อยา oxacillin

§ มีการปรากฏของยีน *mupR* แต่มีค่า mupirocin MIC = 2 mg/L ; ¶ แสดงการดื้อยา penicillin แต่ไม่พบการปรากฏของยีน *blaZ*

40

ตารางที่ 20 จำนวนเชื้อ, คุณลักษณะเชิงโมเลกุล และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จาสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์

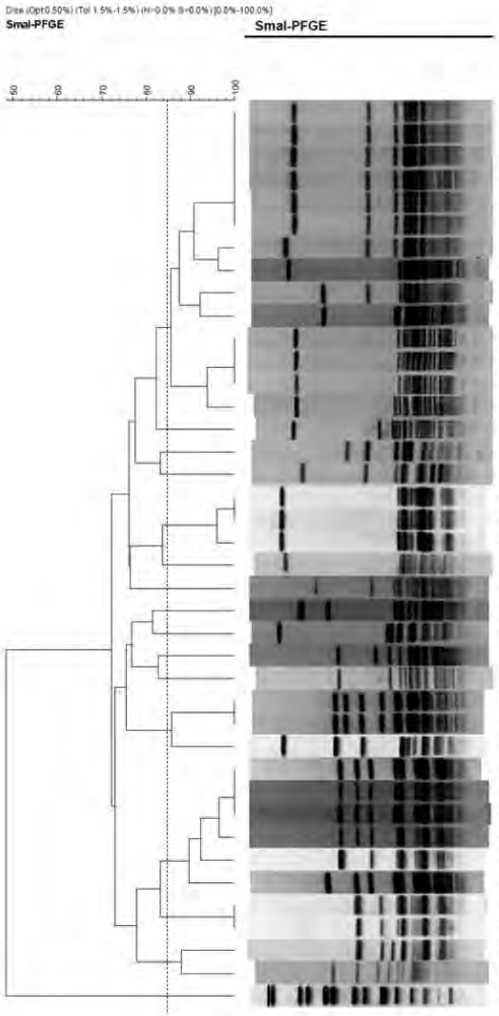
จำนวนเชื้อ	จำนวนที่แยกเชื้อได้ (No.)			MLST	PFGE type	SCC*mec* type	คุณลักษณะการดื้อยา (ค่าที่ใช้แปลผลว่าดื้อยา (mg/L) และยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา)												
	สุนัข	สัตวแพทย์	ผู้เลี้ยงสุนัข				OXA (>0.25)	PEN (>0.125)	TET (>2)	GEN/KAN (>1/>16)	KAN (>16)	STR (>16)	CLI (>0.5)	TIA (NA)	TMP (>4)	CHL (>8)	MUP (>256)	CIP (>1)	SYN (>2)
รวม N=4	N=100	N=200	N=100				*mecA*	*blaZ*	*tet*	*aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*	*ant(4')-Ia*	*ant(6')-Ia*	*lnu*(B)	*lsa*(E)	*dfrA*	*fexA*	*mupR*	ND	ND
2	0	2 (1.00)	0	398	*Cfr*9I	V	+	+	+(L),(M)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
1	1 (1.00)	0	0	398	*Cfr*9I	V	+	+	+(L),(M)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	0	1 (0.50)	0	398	*Cfr*9I	V	+	+	+(L),(M)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวก (ร้อยละ)							4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	2 (50.00)	1 (25.00)	4 (100)	4 (100)

เชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* ทุกเชื้อแสดงความไวรับต่อยา erythromycin, vancomycin, rifampicin, linezolid และ fusidic acid.

+, ผลบวก; -, ผลลบ; ND, ไม่ได้ทดสอบด้วยการหายีนดื้อยา

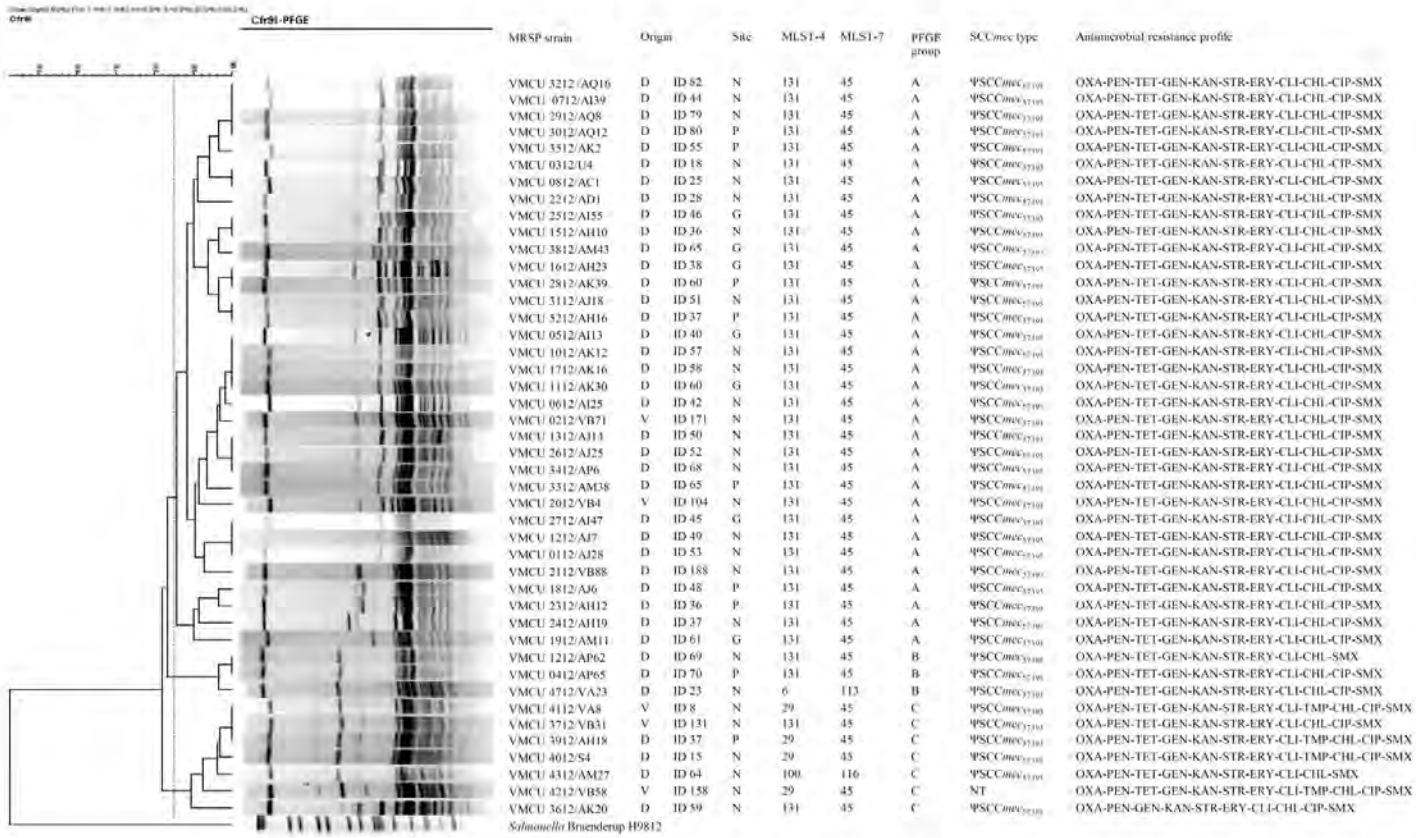
NA, ไม่มีการรายงานค่าในการแปลผล

41

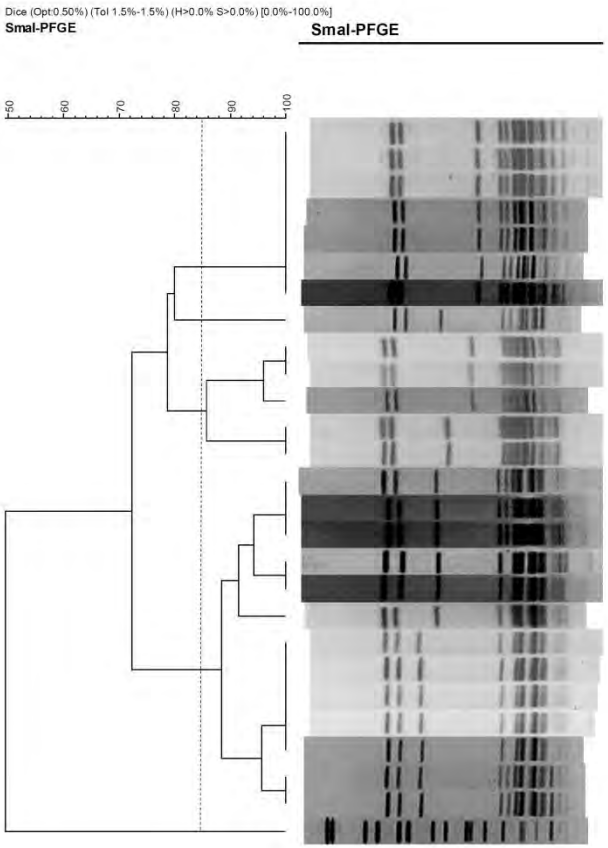


MRSP strain	Origin		Site	MLST-4	MLST-7	PFGE group	SCC*mec* type	Antimicrobial resistance profile
VMCU 6312/AI3	D	ID 39	N	5	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 5812/AI6	D	ID 40	N	5	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 5912/AI16	D	ID 41	G	5	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 6012/AI46	D	ID 45	P	-	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 6112/AK9	D	ID 56	G		112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 6212/AK23	D	ID 59	P		112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 5712/AK5	D	ID 56	N	5	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 5312/VA26	V	ID 26	N	5	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-CIP-SMX
VMCU 5512/AJ1	D	ID 47	P	5	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-SMX-MUP
VMCU 5412/VB16	V	ID 116	N	5	112	A	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-CIP-SMX-MUP
VMCU 6712/AQ17	D	ID 82	N	191	183	A	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 6512/AQ25	O	ID 100	N	191	183	A	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 6612/AQ30	O	ID 99	N	191	183	A	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 6812/AH22	D	ID 38	P	191	183	A	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 6412/AH1	D	ID 35	N	2	121	B	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-TMP-CHL-CIP
VMCU 5612/AM33	D	ID 64	P	5	111	C	SCC*mec* A1	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLIi-TMP-SMX
VMCU 4812/AP54	D	ID 77	N	163	125	D	SCC*mec* A	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7012/AM6	D	ID 61	P	26	182	E	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7112/AM35	D	ID 65	N	26	182	E	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7212/AM21	D	ID 63	N	26	182	E	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX-MUP
VMCU 8312/AM25	D	ID 63	P	71	169	F	SCC*mec* II-III	OXA-PEN-TET-GEN-KAN
VMCU 6912/VA36	V	ID 36	N	4	110	G	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 8212/VB62	V	ID 162	N	133	115	H	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 11312/VB66	V	ID 166	N	71	169	I	SCC*mec* II-III	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 5012/VA77	V	ID 77	N	6	178	J	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 4912/AE1	D	ID 30	N	6	178	K	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 4512/A2	D	ID 1	P	103	185	L	Ψ SCC*mec*$_{57395}$	OXA-PEN-TET-SMX
VMCU 4612/B5	D	ID 2	N	103	185	L	Ψ SCC*mec*$_{57395}$	OXA-PEN-TET-SMX
VMCU 5112/AP47	D	ID 76	P	29	55	L	SCC*mec* V	TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CHL-CIP-SMX
VMCU 7612/AQ45	D	ID 85	P	133	181	M	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7412/VB45	V	ID 145	N	133	181	M	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7512/VB98	V	ID 198	N	133	181	M	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7712/VA82	V	ID 82	N	133	181	M	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 8112/AI14	D	ID 40	G	133	181	M	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7312/AT21	D	ID 100	P	133	181	M	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7912/AP64	D	ID 70	P	133	181	N	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 8012/AP84	D	ID 77	P	133	181	N	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 7812/AP20	O	ID 91	N	133	181	O	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
VMCU 4412/AP11	D	ID 69	N	100	114	O	Ψ SCC*mec*$_{57395}$	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TMP-CIP-SMX
Salmonella Braenderup H9812								

รูปที่ 6 แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSP จากการทำ *Sma*I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา



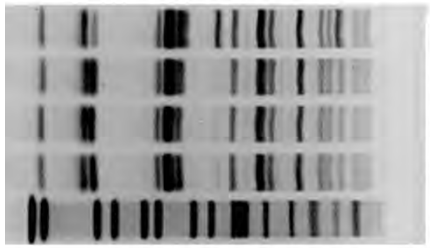
รูปที่ 7 แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSP จากการทำ *Cfr*9I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา



MRSSc strain	Origin		Site	PFGE group	SCC*mec* type	Antimicrobial resistance profile
VMCU 8412/AI1	D	ID 39	N	A	SCC*mec* V	OXA-TET
VMCU 8512/AI9	D	ID 40	G	A	SCC*mec* V	OXA-TET
VMCU 8612/AI15	D	ID 42	N	A	SCC*mec* V	OXA-TET-SMX
VMCU 8712/AK3	D	ID 56	N	A	SCC*mec* V	OXA-TET
VMCU 8812/AK22	D	ID 59	P	A	SCC*mec* V	OXA-TET
VMCU 8912/AM36	D	ID 65	N	A	SCC*mec* V	OXA-TET
VMCU 9012/VB65	V	ID 165	N	A	SCC*mec* V	TET-SMX
VMCU 9112/AT24	D	ID 100	P	B	SCC*mec* V	OXA-PEN
VMCU 9212/AH17	D	ID 37	P	C	SCC*mec* V	OXA-SMX
VMCU 9312/AH27	D	ID 38	G	C	SCC*mec* V	OXA-SMX
VMCU 9412/AJ26	D	ID 52	N	C	SCC*mec* V	OXA-TET-SMX
VMCU 9512/AI7	D	ID 40	P	C	SCC*mec* V	OXA-SMX
VMCU 9612/AI17	D	ID 42	P	C	SCC*mec* V	OXA-SMX
VMCU 9712/O68	O	ID 68	N	D	SCC*mec* V	PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP
VMCU 9812/VA11	V	ID 11	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN
VMCU 9912/VB3	V	ID 103	N	D	SCC*mec* V	OXA-TET
VMCU 10012/O1	O	ID 1	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-KAN-STR-ERY-CLI
VMCU 10112/VB83	V	ID 183	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-KAN-STR-ERY-CLI
VMCU 11412/AQ43	D	ID 85	P	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-CIP-SMX
VMCU 10212/AI28	D	ID 43	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP
VMCU 10312/AI42	D	ID 44	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP
VMCU 10412/AI49	D	ID 45	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET
VMCU 10512/AI62	D	ID 46	P	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP
VMCU 10612/AM18	D	ID 63	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP
VMCU 10712/AM4	D	ID 61	N	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP
VMCU 10812/AM12	D	ID 64	G	D	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-MUP
Salmonella Braenderup H9812						

รูปที่ 8 แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSSc จากการทำ *Sma*I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา

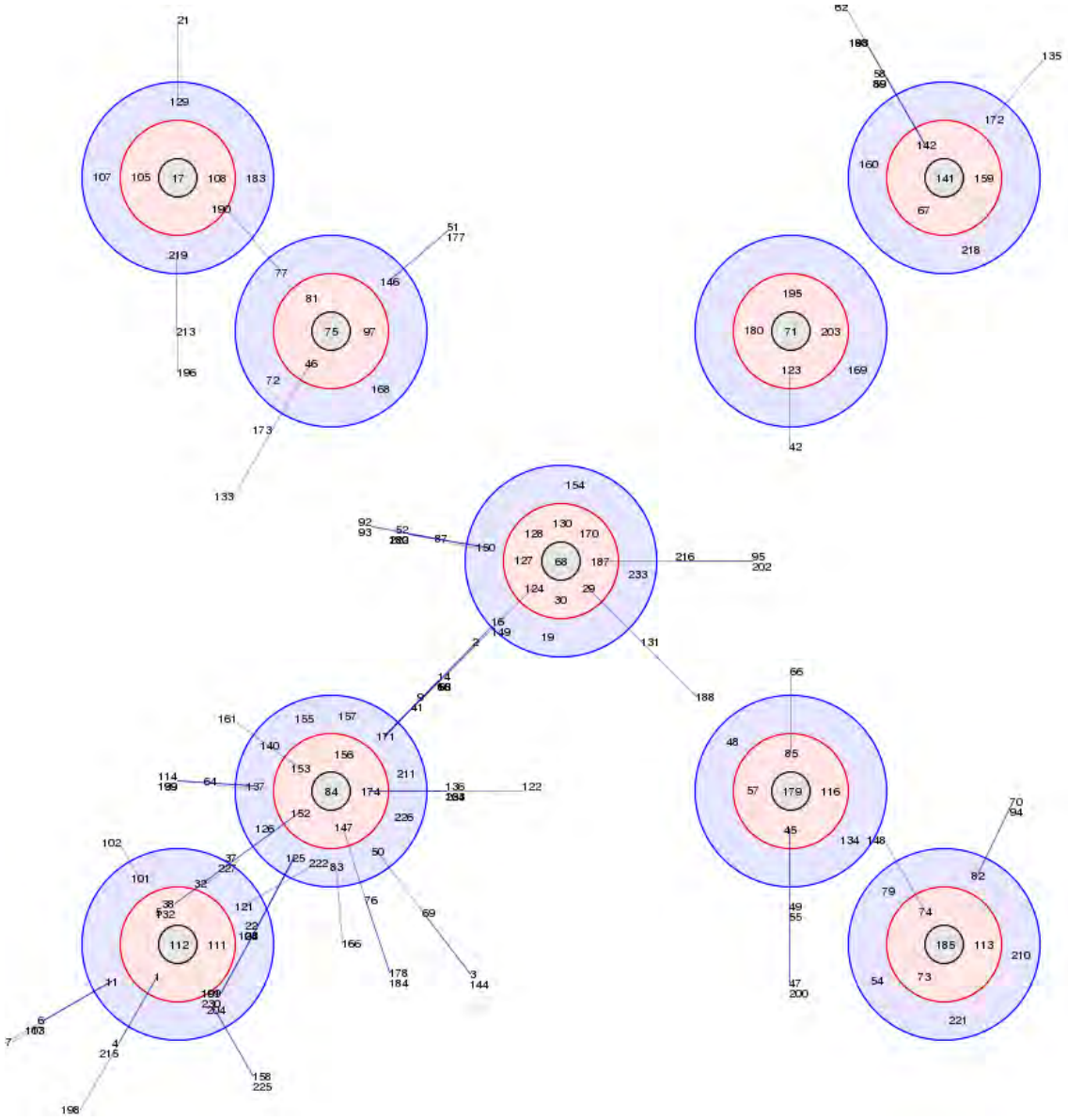
44



MRSA strain	Origin		Site	MLST	SCC*mec* type	Antimicrobial resistance profile
VMCU 10912/AF1	D	ID 31	N	398	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-CLI-CHL-TMP-CIP-SYN-TIA-MUP
VMCU 11012/VB50	V	ID 150	N	398	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-CLI-TMP-CIP-SYN-TIA-MUP
VMCU 11112/VB51	V	ID 151	N	398	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-CLI--TMP-CIP-SYN-TIA
VMCU 11212 /VB77	V	ID 177	N	398	SCC*mec* V	OXA-PEN-TET-GEN-KAN-STR-CLI-CHL-TMP-CIP-SYN-TIA-SMX
Salmonella Braenderup H9812						

45

รูปที่ 9 แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของเชื้อ MRSA จากการทำ *Cfr*9I-PFGE ร่วมกับคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยา



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและประชากรของเชื้อ *Staphylococcus pseudinteremedius* สายพันธุ์ต่างๆ ที่จัดจำแนกด้วยวิธี multilocus sequence typing จาก 7 ยีน แต่ละกลุ่มแสดง ST ที่มีความสัมพันธ์กัน โดยแผนภูมินี้สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากประชากรเชื้อ *S. pseudintermedius* ทั้งหมดในฐานข้อมูล www.pubmlst.org โดยใช้โปรแกรม BURST แต่ละกลุ่มมียีนที่มีความเหมือนกันมากกว่า 5 ยีนขึ้นไป

ตารางที่ 21 จำนวนสุนัขที่แยกเชื้อได้มากกว่า 1 สปีชีส์หรือ MRSP มากกว่า 1 sequence type ด้วยวิธี MLST-7

เชื้อหลายสปีชีส์หรือหลาย ST	จำนวนสุนัข (%)
จำนวนรวม	100
MRSP ST45 and MRSSc	5 (5%)
MRSP ST112 and MRSSc	3 (3%)
MRSP ST181 and MRSSc	1 (1%)
MRSP ST45, ST182 and MRSSc	2 (2%)
MRSP ST169, ST182 and MRSSc	1 (1%)
MRSP ST45, ST112/ST181 and MRSSc	1 (1%)
MRSP ST45 and ST112	1 (1%)
MRSP ST45 and ST114	1 (1%)
MRSP ST45 and ST181	1 (1%)
MRSP ST111 and ST116	1 (1%)
MRSP ST125 and ST181	1 (1%)
MRSP ST133 and ST181	1 (1%)

บทวิจารณ์

เชื้อ CoPS ที่ถูกแยกได้จากสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในประเทศไทยในครั้งนี้ประกอบด้วย 3 สปีชีส์ ได้แก่ *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และ *S. aureus* โดย *S. pseudintermedius* ซึ่งเป็นสปีชีส์หลักที่พบได้บนผิวหนังและเยื่อเมือกของสุนัข (Devriese et al., 2009) นั้นพบได้ในถวามถี่ที่มากที่สุด ส่วน *S. schleiferi* subsp. *coagulans* เป็นสปีชีส์ที่พบรองลงมา และ *S. aureus* พบได้น้อยที่สุด ทั้งนี้ความถี่ในการแยกเชื้อแต่ละสปีชีส์นั้นสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ในความถี่ที่ต่ำในสุนัขนั้นมีโอกาสเกิดการส่งผ่านเชื้อมาจากมนุษย์ (Manian, 2003; Simoons-Smit et al., 2000) โดยเชื้อ S. aureus ที่สามารถจับเกาะและเพิ่มจำนวนได้น้อยบนผิวหนังของสุนัขนั้นอาจจะเกิดจากการที่ทั้ง *S. aureus* และ *S. pseudintermedius* มีการแข่งขันการจับเกาะโดยใช้ตัวรับเดียวกัน (Geoghegan et al., 2009) สำหรับตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างในสุนัขที่ช่องจมูก บริเวณฝีเย็บ และขาหนีบ เป็นตำแหน่งที่น่าจะเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างเชื้อกลุ่มนี้ได้ดีทำให้ได้เชื้อความถี่ที่สูง เนื่องจากตำแหน่งเหล่านี้เป็นบริเวณที่มีความอับชื้น มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Mason et al., 1996) โดยเฉพาะที่ช่องจมูกซึ่งให้ผลการเพาะแยกเชื้อที่มีความหลากหลายของสปีชีส์เมื่อเทียบกับตำแหน่งอื่นๆ และการเลือกเก็บตัวอย่างจากหลากหลายตำแหน่งทำให้เพิ่มความไวของการเก็บตัวอย่าง นำมาซึ่งโอกาสที่จะได้ตัวอย่างเชื้อ CoPS ที่มากขึ้นด้วย

ในเชื้อที่มีคุณสมบัติดื้อยารูปแบบ methicillin resistance พบว่าสุนัขเป็นพาหะของเชื้อ MRSP สูงถึง 45% ซึ่งจัดว่าเป็นความถี่ที่สูงมาก จัดเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งทางสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับการที่สัตว์เลี้ยงเป็นพาหะของเชื้อดื้อยานี้ (pet-associated methicillin-resistant staphylococci) ที่มีการกระจายตัวในสุนัขในชุมชน นอกจากนี้ MRSSc สามารถแยกได้จากสุนัขอีกเช่นกันทั้งจากสุนัขปกติและสุนัขที่มีรอยโรคที่ผิวหนังจากการรายงานที่ผ่านมา (May et al., 2005) การปรากฏของเชื้อ *S. psedintermedius* ที่ดื้อยาในรูปแบบ methicillin resistance และที่ไม่ดื้อยา บนผิวหนังของสุนัขตัวเดียวกับบ่งบอกได้ว่าบนผิวหนังสุนัขนั้นมีความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ (Fazakerley et al., 2010) ในทางกลับกันส่วนเชื้อ MRSA นั้นแยกได้จากสุนัขเพียง 1 ตัว อาจเกิดจากการได้รับเชื้อมาโดยบังเอิญ จากผลการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพด้วยการตรวจความไวรับต่อยา oxacillin นั้น เชื้อ MRSA และ MRSP ใช้ค่าในการแปลผลที่แตกต่างกัน (Black et al., 2009; Papich, 2010; Schissler et al., 2009) ดังนั้นการระบุสปี

ชีส์ของเชื้ออย่างแม่นยำจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการตรวจคัดกรองเชื้อ MRCoPS อย่างไรก็ตามการตรวจหายีน *mecA* นั้นเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจเชื้อ MRS ที่แยกได้จากสัตว์ซึ่งสามารถใช้ในการยืนยันได้ (Leonard and Markey, 2008)

เชื้อทั้งสามสปีชีส์ประกอบด้วย *S. aureus*, *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* สามารถถูกแยกได้จากกลุ่มผู้ที่มีความเกี่ยวข้องกับสุนัขเช่นกัน ในทางกลับกัน *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* นั้นไม่พบในผู้ที่ไม่เลี้ยงสุนัข ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าสุนัขเป็นโฮสต์แท้ของเชื้อ *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และมนุษย์เป็นโฮสต์แท้ของ *S. aureus* นอกจากนี้เชื้อที่ดื้อยาในรูปแบบ methicillin resistance ไม่สามารถแยกได้จากผู้ที่ไม่เลี้ยงสุนัข ดังนั้นผู้ที่สัมผัสและเกี่ยวข้องกับสุนัขจึงมีความเสี่ยงในการได้รับเชื้อดื้อยา MRCoPS มากกว่า โดยเฉพาะในกลุ่มสัตวแพทย์ซึ่งพบความถี่ในการแยกเชื้อดื้อยาที่สูงกว่ากลุ่มผู้เลี้ยงสุนัข อาจจัดได้ว่าเป็นความเสี่ยงทางอาชีพรูปแบบหนึ่ง เนื่องจากสัตวแพทย์ต้องสัมผัสกับสัตว์ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเป็นประจำและต้องทำงานในโรงพยาบาลที่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาอยู่ในสิ่งแวดล้อม จึงมีโอกาสได้รับและเป็นพาหะของเชื้อดื้อยาที่มาจากสุนัข เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ *S. pseudintermedius* ที่สามารถถูกพบได้ในมนุษย์อาจจำเป็นต้องอาศัยเวลาที่เพียงพอในการได้สัมผัสกับเชื้อจากการที่อาศัยในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของเชื้อนานๆ (Morris et al., 2006; Soedarmanto et al., 2011; Walther et al., 2012) ดังนั้นกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการได้รับเชื้อจากสุนัขนั้นควรมีความตระหนักถึงสุขศาสตร์เพื่อป้องกันการส่งผ่านเชื้อดื้อยาระหว่างสุนัขและคน ส่วนเชื้อ MRSSc นั้นพบในความถี่ที่น้อยกว่า MRSP ซึ่งสอดคล้องกับความชุกของเชื้อ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ที่มีความชุกที่ต่ำว่า *S. pseudintermedius* แต่อย่างไรก็ตามการจับเกาะและเพิ่มจำนวนของเชื้อ CoPS ที่ได้มาจากสุนัขในร่างกายมนุษย์ในระยะยาว ยังไม่ได้มีการศึกษาและอธิบายซึ่งอาจจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาในระยะยาว (longitudinal study) ดังนั้นการปฏิบัติให้ถูกสุขอนามัยจึงเป็นวิธีหนึ่งที่ควรปฏิบัติในระหว่างและหลังการรักษาสัตว์เพื่อลดความเสี่ยงในการได้รับเชื้อดื้อยาจากสุนัข

คุณลักษณะเชิงโมเลกุลแสดงถึงความหลากหลายของประชากรเชิงพันธุกรรมของ MRCoPS ในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในประเทศไทย ผลจากเทคนิค MLST แสดงให้เห็นความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ MRSP จากการปรากฏของเชื้อที่มี ST ใหม่เพิ่มมาในฐานข้อมูล เมื่อเปรียบเทียบผลจาก MLST-4 พบว่า MLST-7 ให้ความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่สูงกว่าจากการเพิ่มยีนเพื่อมาใช้ในการวิเคราะห์ผลอีก 4 ยีน (Solyman et al., 2013) อีกทั้งการใช้ MLST-7 นั้นให้ผลสอดคล้อง

กับการวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอจากการทำ PFGE และการจัดจำแนกชนิด SCC*mec* เชื้อ MRSP ที่พบในประเทศไทยนี้มี SCC*mec* หลากหลายชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ ΨSCC*mec*$_{57395}$ และ SCC*mec* V โดย ΨSCC*mec*$_{57395}$ นั้นพบเป็นหลักในเชื้อ MRSP ST$_7$45 นั้นเป็นไปได้ว่าการขาดยีน *ccr* (Perreten et al., 2013) ในทางกลับกัน SCC*mec* V นั้นมีการกระจายตัวใน MRSP หลากหลาย ST อีกทั้ง MRSP ST$_7$45 ที่มี ΨSCC*mec*$_{57395}$ นั้นมีคุณสมบัติที่ไม่สามารถทำการย่อยสายโครโมโซมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I ได้เนื่องจากการปรากฏของ restriction-modification system (Perreten et al., 2013) จึงจำเป็นต้องใช้ *Cfr*9I ในการจัดจำแนกด้วย PFGE ที่จะแสดงความหลากหลายของเชื้อใน ST เดียวกันที่แยกได้จากสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข ทั้งนี้ MSRP ST$_7$45-*Cfr*9I-A-ΨSCC*mec*$_{57395}$ เป็นสายพันธุ์หลักที่พบได้ในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในระเทศไทย ซึ่งอาจมีความเกี่ยวโยงกับเชื้อ MRSP ST$_4$131 และ ST$_4$29 ที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้าในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Laarhoven et al., 2011) และ ST อื่นๆ ที่มี ΨSCC*mec*$_{57395}$ นั้นอาจมีบรรพบุรุษร่วมกันจาก clonal complex 45 (Perreten et al., 2010) นอกจากนี้ SCC*mec* A1 เป็นชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนใน MRSA โดย MRSP ST$_7$111 และ 112 (ST$_4$5) มี SCC*mec* A1 ที่มีความจำเพาะกับ ST นี้ แต่จากการรายงานที่ผ่านมาพบ MRSP ST$_4$5 ที่พบในประเทศจีนมี SCC*mec* ชนิดอื่น (Feng et al., 2012; Wang et al., 2012) ดังนั้นอาจต้องใช้ MLST-7 ในการจำแนกซึ่งมีความสามารถในการแยกแยะภายในที่สูงกว่า ส่วน SCC*mec* II-III ที่พบใน MRSP ST$_7$169 (ST$_4$71) นั้นเหมือนกับ MRSP ST$_7$71 ที่พบในทวีปยุโรป ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักในพื้นที่นั้น (Descloux et al., 2008; Perreten et al., 2010) และอีกทั้งยังเป็นสายพันธุ์ที่มีการกระจายในประเทศจีนและฮ่องกง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ามีการกระจายของเชื้อข้ามทวีป (Boost et al., 2009; Wang et al., 2012) ในทางตรงกันข้ามนั้นพบ SCC*mec* V ในเชื้อ MRSP ในหลาย ST อีกทั้งยังพบใน MRSA และ MRSSc ซึ่งบ่งบอกถึงการส่งผ่านชุดยีนดื้อยา SCC*mec* V อย่างแพร่หลายในเชื้อ staphylococci โดย MRSP ST68 ที่เป็นสายพันธุ์หลักที่พบในทวีปอเมริกาเหนือก็มี SCC*mec* V เช่นกัน (Black et al., 2009; Perreten et al., 2010) ใน MRSA นั้น SCC*mec* V นั้นมีการกระจายตัวใน MRSA ที่มีการระบาดในชุมชนหรือ community-acquired MRSA (CA-MRSA) รวมถึง MRSA ที่แยกได้จากสัตว์ (Argudin et al., 2009; Ito et al., 2004) ทั้งนี้ MRSA ST398 ที่แยกได้จากสุนัขและสัตวแพทย์ไทยในการศึกษานี้ก็มี SCC*mec* V เช่นกัน ซึ่งแสดงคุณลักษณะของ MRSA ที่มีความเกี่ยวข้องและมักแยกได้จากปศุสัตว์ (livestock-associated MRSA) จาก ST398 ที่ไม่สามารถจัดจำแนกลักษณะลายนิ้วมือดีเอ็นเอได้จาก *Sma*I-PFGE และมี SCC*mec* V (Argudín et al., 2010) ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ที่มีการกระจายของ

เชื้อจากปศุสัตว์มายังสัตว์เลี้ยงผ่านทางสัตวแพทย์ที่เป็นพาหะ แต่อย่างไรก็ตามไม่มีการพบ hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) ที่มีการระบาดในโรงพยาบาลในสัตวแพทย์และสุนัขจากการศึกษานี้ เชื้อ MRSSc นั้นมี SCCmec V เช่นกันซึ่งแตกต่างจากการศึกษาหนึ่งที่ผ่านมาพบเชื้อ MRSSc มี SCC*mec* IV (Roberts et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการพัฒนาของระบบการจำแนกด้วย MLST ของเชื้อ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* จึงสามารถทำได้เพียงการใช้ PFGE ร่วมกับการระบุชนิด SCC*mec* ของเชื้อ MRSSc ในการจำแนกสายพันธุ์ โดย MRSSc ที่มีรูปแบบของลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอในกลุ่ม *Sma*I_{SSc}-D ที่มี SCC*mec* V เป็นสายพันธุ์หลักที่น่าจะมีความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมร่วมกัน โดยสรุปแล้วจากการศึกษานี้พบ MRCoPS ที่มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่หลากหลายทั้ง MRSA ST398, MRSP หลาย ST และ MRSSc ที่มีความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมกระจายตัวอยู่ในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในประเทศไทย

จากคุณสมบัติในการดื้อยาของเชื้อพบว่ามากกว่าร้อยละ 80 ของเชื้อ MRSP นั้นมีคุณสมบัติในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด มากกว่า 3 กลุ่มขึ้นไป โดยสามารถตวจพบยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาจากเทคนิคไมโครแอเรย์ที่พบยีนดื้อยาส่วนมากมาจาก mobile genetic element จากการรายงานที่ผ่านมา (Kadlec and Schwarz, 2012) โดย MRSP ที่แยกได้ในประเทศไทยนี้มี Tn*5405*-like element จากการที่ตรวจพบ *aph(3')-III*, *ant(6')-Ia*, *sat4* and *erm*(B) ร่วมกัน ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม aminoglycoside และ macrolide ที่พบได้บ่อยในเชื้อ *S. pseudintermedius* (Boerlin et al., 2001; Perreten et al., 2010) นอกจากนี้พบยีนดื้อยาอีกหลายชนิดที่กระจายอยู่ในเชื้อ MRSP ซึ่งมีบทบาทเป็นยีนที่เป็นปัจจัยทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อดื้อยา ส่วนยีนดื้อยาบางชนิดที่มักพบบนพลาสมิดนั้นพบได้น้อยในเชื้อ MRSP เช่น *tet*(K), cat_{pC221} และ *erm*(C) อาจเกิดจากการที่ *S. pseuintermedius* มีความสามารถในการรับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้น้อยกว่าเชื้อสปีชีส์อื่นๆ (Noble et al., 1996) ทั้งนี้การปรากฏของ cat_{pC221} และไม่มี *dfrG* นั้นเป็นคุณลักษณะการดื้อยาหลักของเชื้อ MRSP $ST_{7}45$ แต่ในทางกลับกัน *dfrG* สามารถพบได้ใน MRSP ST อื่นๆมากมาย (Feng et al., 2012; Perreten et al., 2010) ส่วนเชื้อ MRSSc ที่แสดงการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดแสดงรูปแบบการดื้อยาคล้ายคลึงกับเชื้อ MRSP ซึ่งอาจมี mobile genetic element ที่เหมือนกัน แต่การดื้อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาของเชื้อ MRSA นั้นมีความแตกต่างจาก MRSP และ MRSSc เนื่องจากมีการพบยีน *tet*(L), *fexA*, *lsa*(E) และ *lnu*(B) ที่พบในเชื้อ LA-MRSA ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นยีนที่ไม่ได้พบใน *S. aureus* ปกติ (Kadlec et al., 2012) ทั้งนี้การดื้อต่อยา quinupristin/dalfopristin นั้นเป็นสิ่งที่ควรตระหนักเนื่องจากเป็นยาสำคัญที่ใช้ในการรักษา

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาล อีกทั้งเชื้อ MRSA เป็นสปีชีส์ที่มีความจำเพาะได้กับมนุษย์และเคยมีการรายงานการระบาดของเชื้อ LA-MRSA ในโรงพยาบาลมาแล้วเช่นกัน (Kock et al., 2009; Lozano et al., 2012) การแพร่ระบาดของเชื้อ MRCoPS จากสัตว์ที่ในมนุษย์มีความสำคัญในแง่ของการได้รับเชื้อดื้อยาจากสัตว์สู่คน โดยเฉพาะเชื้อดื้อยาที่มีการพัฒนาการดื้อต่อยาสำคัญที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อดื้อยารุนแรงในโรงพยาบาลทั้งจากการได้รับ mobile genetic element หรือการเกิดการผ่าเหล่า (Kadlec et al., 2011; Schwendener and Perreten, 2011) ดังนั้นการสำรวจติดตามการดื้อยาของเชื้ออย่างต่อเนื่องจึงเป็นประโยชน์ในการได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบันเกี่ยวกับการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียและการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสม

สรุปการดำเนินงานในภาพรวม

การพบเชื้อ MRCoPS ที่มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันและรูปแบบการดื้อยาที่เหมือนกันโดยมีแหล่งที่มาจากทั้งสุนัขและคน เป็นหลักฐานที่บ่งชี้ว่ามีการส่งผ่านเชื้อดื้อยานี้ระหว่างสัตว์และมนุษย์ จากการที่พบเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน และยืนยันได้โดยการใช้ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอที่เหมือนกัน โดยเฉพาะในสุนัขและคนที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบเชื้อ MRSP หลาย ST มีการกระจายตัวในสุนัข แสดงถึงการคงอยู่ของเชื้อดื้อยาหลายสายพันธุ์ในสุนัขในประเทศไทย โดยสรุปแล้วการศึกษานี้แสดงการแพร่กระจายของเชื้อ MRSP หลากหลายสายพันธุ์มีการกระจายตัวในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในประเทศไทย โดยสายพันธุ์หลักคือ MRSP $ST_{7}45$ และพบ ST ใหม่ๆจากการใช้เทคนิค MLST-7 อีกทั้งยังพบ LA-MRSA ในสุนัขและสัตวแพทย์ รวมถึงแสดงคุณลักษณะร่วมและความสัมพันธ์ของ MRSSc ในกลุ่มประชากรด้วย โดยเชื้อ MRSP ที่แยกได้นั้นแสดงการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่ใช้ในทางสัตวแพทย์ ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อ MRSA นอกจากแสดงการดื้อยาที่ใช้ในทางสัตวแพทย์แล้วยังดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีความสำคัญในการรักษาการติดเชื้อดื้อยารุนแรงในคน คือ dalfopristin/quinupristin และดื้อต่อยา mupirocin ที่ใช้ในการกำจัดเชื้อ MRSA ในคนที่เป็นพาหะของเชื้อ ซึ่งจัดว่าเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญทางสาธารณสุข ดังนั้นจึงควรมีการสร้างมาตราการและสนับสนุนการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุสมผลร่วมกับการวินิจฉัยโรคอย่างถูกวิธี รวมถึงปฏิบัติตามสุขลักษณะของสัตวแพทย์ระหว่างและหลังการรักษาสัตว์ และการอยู่ร่วมกันระหว่างผู้เลี้ยงและสุนัข เป็นสิ่งจำเป็นหนึ่งที่จำช่วยลดปัญหาการส่งผ่านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาระหว่างสัตว์และมนุษย์

เอกสารอ้างอิง

Albrich, W.C. and Harbarth, S. 2008. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? **Lancet Infect Dis.** 8(5): 289-301.

Argudin, M.A., Fetsch, A., Tenhagen, B.A., Hammerl, J.A., Hertwig, S., Kowall, J., Rodicio, M.R., Kasbohrer, A., Helmuth, R., Schroeter, A., Mendoza, M.C., Braunig, J., Appel, B. and Guerra, B. 2009. High heterogeneity within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates defined by *Cfr*9I macrorestriction-PFGE profiles, *spa*- and SCC*mec*-types. **Appl Environ Microbiol**. 76(3): 652-658.

Argudín, M.A., Rodicio, M.R. and Guerra, B. 2010. The emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 clone can easily be typed using the *Cfr9I SmaI*-neoschizomer. **Lett Appl Microbiol.** 50: 127-130.

Baird-Parker, A.C. 1963. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. **J Gen Microbiol**. 30(3): 409-427.

Baird-Parker, A.C. 1965. Staphylococci and their classification. **Ann NY Acad Sci.** . 128(1): 4-25.

Bannoehr, J., Ben Zakour, N.L., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., van den Broek, A.H. and Fitzgerald, J.R. 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. **J Bacteriol**. 189: 8685-8692.

Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A. and Fitzgerald, J.R. 2008. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **J Clin Microbiol**. 47(2): 469-471.

Bannoehr, J. and Guardabassi, L. 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Vet Dermatol.** 23(4): 253-e252.

Bemis, D.A., Jones, R.D., Frank, L.A. and Kania, S.A. 2009. Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. **J Vet Diagn Invest.** 21(1): 53-58.

Black, C.C., Solyman, S.M., Eberlein, L.C., Bemis, D.A., Woron, A.M. and Kania, S.A. 2009. Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Vet Microbiol.** 139(3-4): 333-338.

Boerlin, P., Burnens, A.P., Frey, J., Kuhnert, P. and Nicolet, J. 2001. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **Vet Microbiol.** 79: 155-169.

Boost, M.V., So, S.Y. and Perreten, V. 2009. Low rate of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal colonization of veterinary personnel in Hong Kong. **Zoonoses Public Hlth.** 58: 36-40.

Brown, D.F.J., Edwards, D.I., Hawkey, P.M., Morrison, D., Ridgway, G.L., Towner, K.J. and Wren, M.W.D. 2005. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J Antimicrob Chemother.** 56(6): 1000-1018.

Campanile, F., Bongiorno, D., Borbone, S., Venditti, M., Giannella, M., Franchi, C. and Stefani, S. 2007. Characterization of a variant of the SCC*mec* element in a bloodstream isolate of *Staphylococcus intermedius*. **Microb Drug Resist.** 13(1): 7-10.

Chambers, H.F. 1988. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1(2): 173-186.

Chanchaithong, P. and Prapasarakul, N. 2011. Biochemical markers and protein pattern analysis for canine coagulase-positive staphylococci and their distribution on dog skin. **J Microbiol Meth.** 86: 175-181.

Chuang, C.Y., Yang, Y.L., Hsueh, P.R. and Lee, P.I. 2010. Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. **J Clin Microbiol**. 48: 1497-1498.

Clinical, L.S.I. 2011. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, **CLSI document M100-S21.** Wayne, Pa: Clinical Laboratory Standard Institute.

Cohn, L.A. and Middleton, J.R. 2010. A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. **J Vet Emerg Crit Car.** 20(1): 31-45.

Descloux, S., Rossano, A. and Perreten, V. 2008. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **J Clin Microbiol.** 46: 1818-1823.

Devriese, L.A., Hajek, V., Oeding, P., Meyer, S.A. and Schleifer, K.H. 1978. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. **Int J Syst Bacteriol.** 28(4): 482-490.

Devriese, L.A., Hermans, K., Baele, M. and Haesebrouck, F. 2009. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Vet Microbiol.** 133(1-2): 206-207.

Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. and Haesebrouck, F. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **Int J Syst Evol Microbiol.** 55(4): 1569-1573.

Dowling, P.M. 1996. Antimicrobial therapy of skin and ear infections. **Can Vet J.** 37(11): 695-699.

Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J. and Spratt, B.G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** 38: 1008-1015.

Epstein, C.R., Yam, W.C., Peiris, J.S.M. and Epstein, R.J. 2009. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. **Infect Genet Evol.** 9(2): 283-285.

Fazakerley, J., Williams, N., Carter, S., McEwan, N. and Nuttall, T. 2010. Heterogeneity of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from atopic and healthy dogs. **Vet Dermatol.** 21(6): 578-585.

Feng, Y., Tian, W., Lin, D., Luo, Q., Zhou, Y., Yang, T., Deng, Y., Liu, Y.-H. and Liu, J.-H. 2012. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. **Vet Microbiol.** 160: 517-524.

Foster, G., Ross, H.M., Hutson, R.A. and Collins, M.D. 1997. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. **Int J Syst Bacteriol.** 47(3): 724-726.

Freney, J., Kloos, W.E., Hajek, V., Webster, J.A., Bes, M., Brun, Y. and Vernozy-Rozand, C. 1999. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. **Int J Syst Bacteriol.** 49(2): 489-502.

Geoghegan, J.A., Smith, E.J., Speziale, P. and Foster, T.J. 2009. *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*. **Vet Microbiol.** 138(2-4): 345-352.

Goering, R.V. 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infect Genet Evol.** 10(7): 866-875.

Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S. and Rankin, S.C. 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. **Vet Dermatol.** 19(3): 142-149.

Guardabassi, L., Schwarz, S. and Lloyd, D.H. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J Antimicrob Chemother**. 54(2): 321-332.

Hajek, V. 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **Int J Syst Bacteriol.** 26(4): 401-408.

Hanselman, B.A., Kruth, S. and Weese, J.S. 2008. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Vet Microbiol.** 126(1-3): 277-281.

Hiramatsu, K. 1998. Vancomycin resistance in staphylococci. **Drug Resistance Updates.** 1(2): 135-150.

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**. 9(10): 486-493.

Igimi, S., Takahashi, E. and Mitsuoka, T. 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. **Int J Syst Bacteriol.** 40: 409-411.

Internatinal Working Group on Staphylococcal Cassette Chromosome (IWG-SCC). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCCmec elements. **Antimicrob Agent Chemother.** 53: 4961-4967.

Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H. and Hiramatsu, K. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrob Agents Chemother.** 48(7): 2637-2651.

Jousson, O., Di Bello, D., Vanni, M., Cardini, G., Soldani, G., Pretti, C. and Intorre, L. 2007. Genotypic versus phenotypic identification of staphylococcal species of canine origin with special reference to *Staphylococcus schleifer*i subsp. *coagulans*. **Vet Microbiol.** 123(1-3): 238-244.

Kadlec, K., Feßler, A.T., Hauschild, T. and Schwarz, S. 2012. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infec.** 18: 745-755.

Kadlec, K. and Schwarz, S. 2009. Identification of a novel ABC transporter gene, *vga*(C), located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. **Antimicrob Agents Chemother.** 53(1): 3589-3591.

Kadlec, K. and Schwarz, S. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Vet Dermatol.** 23: 276-e255.

Kadlec, K., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A. and Schwarz, S. 2011. Molecular basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. **J Antimicrob Chemother.** 66(6): 1236-1242.

Katayama, Y., Ito, T. and Hiramatsu, K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** 44(6): 1549-1555.

Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T. and Fukata, T. 2010. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. **J Vet Med Sci.** 72(12): 1615-1619.

Kehrenberg, C., Cuny, C., Strommenger, B., Schwarz, S. and Witte, W. 2009. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. **Antimicrob Agents Chemother.** 53(2): 779-781.

Kempker, R., Mangalat, D., Kongphet-Tran, T. and Eaton, M. 2009. Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. **Am J Med Sci.** 338(5): 425-427

Kock, R., Harlizius, J., Bressan, N., Laerberg, R., Wieler, L.H., Witte, W., Deurenberg, R.H., Voss, A., Becker, K. and Friedrich, A.W. 2009. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 28(11): 1375-1382.

Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J. and Hiramatsu, K. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec, ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrob Agents Chemother**. 51: 264-274.

Kumar, D., Cawley, J.J., Irizarry-Alvarado, J.M., Alvarez, A. and Alvarez, S. 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. **Transpl Infect Dis.** 9: 336-338.

Laarhoven, L.M., de Heus, P., van Luijn, J., Duim, B., Wagenaar, J.A. and van Duijkeren, E. 2011. Longitudinal study on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in households. **PLoS ONE.** 6: e27788.

Leonard, F.C. and Markey, B.K. 2008. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. **Vet J.** 175(1): 27-36.

Lin, Y.T., Wang, C.T. and Chiang, B.L. 2007. Role of bacterial pathogens in atopic dermatitis. **Clin Rev Allergy Immunol.** 33(3): 167-177.

Lloyd, D.H. 2007. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. **Clin Infect Dis.** 45: 148-152.

Lozano, C., Aspiroz, C., Sáenz, Y., Ruiz-García, M., Royo-García, G., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M. and Torres, C. 2012. Genetic environment and location of the *lnu*(A) and *lnu*(B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. **J Antimicrob Chemother.** 67(12): 2804-2808

Manian, F.A. 2003. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. **Clin Infect Dis.** 36(2): 26-28.

Mason, I.S. and Kietzmann, M. 1999. Cephalosporins – pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology. **Vet Dermatol.** 10(3): 187-192.

Mason, I.S., Mason, K.V. and Lloyd, D.H. 1996. A review of the biology of canine skin with respect to the commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis* and *Malassezia pachydermatis*. ***Vet Dermatol.*** 7(3): 119-132.

May, E.R., Hnilica, K.A., Frank, L.A., Jones, R.D. and Bemis, D.A. 2005. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. **J Am Vet Med Assoc**. 227(6): 928-931.

Morales, G., Picazo, J.J., Baos, E., Candel, F.J., Arribi, A., Peláez, B., Andrade, R., de la Torre, M.-Á., Fereres, J. and Sánchez-García, M. 2010. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis.** 50(6): 821-825.

Morley, P.S., Apley, M.D., Besser, T.E., Burney, D.P., Fedorka-Cray, P.J., Papich, M.G., Traub-Dargatz, J.L. and Weese, J.S. 2005. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. **J Vet Int Med.** 19(4): 617-629.

Morris, D.O., Boston, R.C., O'Shea, K. and Rankin, S.C. 2010. The prevalence of carriage of meticillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. **Vet Dermatol.** 21: 400-407.

Morris, D.O., Rook, K.A., Shofer, F.S. and Rankin, S.C. 2006. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). **Vet Dermatol.** 17(5): 332-337.

Noble, W.C., Rahman, M., Karadec, T. and Schwarz, S. 1996. Gentamicin resistance gene transfer from *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* to *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. **Vet Microbiol.** 52: 143-152.

Papich, M.G. 2010. Proposed changes to Clinical Laboratory Standards Institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. **J Vet Diagn Invest.** 22(1): 160.

Peacock, S.J., de Silva, I. and Lowy, F.D. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? **Trends Microbiol.** 9: 605-610.

Perreten, V., Chanchaithong, P., Prapasarakul, N., Rossano, A., Blum, S.E., Elad, D. and Schwendener, S. 2013. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome *mec* element (ΨSCC*mec*$_{57395}$) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. **Antimicrob Agents Chemother.** 57(11): 5509-5515.

Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Grönlund Andersson, U., Finn, M., Greko, C., Moodley, A., Kania, S.A., Frank, L.A., Bemis, D.A., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van Duijkeren, E., Weese, J.S., Fitzgerald, J.R., Rossano, A. and Guardabassi, L. 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **J. Antimicrob Chemother.** 65(6): 1145-1154.

Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P. and Frey, J. 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. **J Clin Microbiol.** 43: 2291-2302.

Pillai, S.K., Sakoulas, G., Wennersten, C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Ferraro, M.J. and Gold, H.S. 2002. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. **J Infect Dis.** 186(11): 1603-1607.

Pottumarthy, S., Schapiro, J.M., Prentice, J.L., Houze, Y.B., Swanzy, S.R., Fang, F.C. and Cookson, B.T. 2004. Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** 42(12): 5881-5884.

Roberts, S., O'Shea, K., Morris, D., Robb, A., Morrison, D. and Rankin, S. 2005. A real-time PCR assay to detect the Panton Valentine Leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals. **Vet Microbiol.** 107: 139-144.

Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S. and Hiramatsu, K. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. **J Clin Microbiol.** 45: 1118-1125.

Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T. and Hiramatsu, K. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **J Clin Microbiol.** 48: 765-769.

Schissler, J.R., Hillier, A., Daniels, J.B., Cole, L.K. and Gebreyes, W.A. 2009. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. **J Vet Diagn Invest.** 21(5): 684-688.

Schwarz, S. and Chaslus-Dancla, E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Vet Res.** 32(3-4): 201-225.

Schwendener, S. and Perreten, V. 2011. New transposon Tn*6133* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 contains *vga*(E), a novel streptogramin A, pleuromutilin, and lincosamide resistance gene. **Antimicrob Agents Chemother.** 55(10): 4900-4904.

Simoons-Smit, A.M., Savelkoul, P.H.M., Stoof, J., Starink, T.M. and Vandenbroucke-Grauls, C.M.J. 2000. Transmission of *Staphylococcus aureus* between humans and domestic animals in a household. **Eu J Clin Microbiol Infect Dis.** 19(2): 150-152.

Soedarmanto, I., Kanbar, T., Ülbegi-Mohyla, H., Hijazin, M., Alber, J., Lämmler, C., Akineden, Ö., Weiss, R., Moritz, A. and Zschöck, M. 2011. Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. **Res Vet Sci.** 91: e25-e27.

Solyman, S.M., Black, C.C., Duim, B., Perreten, V., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., Eberlein, L.C., Sadeghi, L.N., Videla, R., Bemis, D.A. and Kania, S.A. 2013. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. **J Clin Microbiol.** 51(1): 306-310.

Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C.A. and Perreten, V. 2010. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **J Antimicrob Chemother.** 65(9): 2047-2048.

Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G. and Witte, W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** 41: 4089-4094.

Tong, S.Y.C., Steer, A.C., Jenney, A.W. and Carapetis, J.R. 2011. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections in the tropics. **Dermatol Clin.** 29(1): 21-32.

Toshkova, K., Annemuller, C., Akineden, O. and Lammler, C. 2001. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. **FEMS Microbiol Lett.** 202(1): 17-24.

Umber, J.K. and Bender, J.B. 2009. Pets and antimicrobial resistance. **Vet Clin N Am- Small.** 39(2): 279-292.

van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H. and Tibayrenc, M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clin Microbiol Rev.** 14(3): 547-560.

van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyörälä, S., Ružauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J. and Törneke, K. 2011. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **J Antimicrob Chemother.** 66(12): 2705-2714.

van Duijkeren, E., Houwers, D.J., Schoormans, A., Broekhuizen-Stins, M.J., Ikawaty, R., Fluit, A.C. and Wagenaar, J.A. 2008. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. **Vet Microbiol.** 128(1-2): 213-215.

Varaldo, P.E., Kilpler-Bälz, R., Biavasco, F., Satta, G. and Schleifer, K.H. 1988. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. **Int J Syst Bacteriol.** 38(4): 436-439.

Walther, B., Hermes, J., Cuny, C., Wieler, L.H., Vincze, S., Abou Elnaga, Y., Stamm, I., Kopp, P.A., Kohn, B., Witte, W., Jansen, A., Conraths, F.J., Semmler, T., Eckmanns, T. and Lübke-

Becker, A. 2012. Sharing more than friendship — nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. **PLoS ONE.** 7: e35197.

Wang, Y., Yang, J., Logue, C.M., Liu, K., Cao, X., Zhang, W., Shen, J. and Wu, C. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. **J Appl Microbiol.** 112: 623-630.

Weese, J.S. and van Duijkeren, E. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Vet Microbiol.** 140(3-4): 418-429.

Wendlandt, S., Lozano, C., Kadlec, K., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., Torres, C. and Schwarz, S. 2013. The enterococcal ABC transporter gene *lsa*(E) confers combined resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother.** 68(3): 473-475.

White, S.D. 1996. Systemic treatment of bacterial skin infections of dogs and cats. **Vet Dermatol.** 7(3): 133-143.

Wulf, M. and Voss, A. 2008. MRSA in livestock animals—an epidemic waiting to happen? **Clin Microbiol Infect.** 14(6): 519-521.

Yamashita, K., Shimizu, A., Kawano, J., Uchida, E., Haruna, A. and Igimi, S. 2005. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. **J Vet Med Sci.** 67(3): 263-268.

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ-นามสกุล รศ. น.สพ. ดร. ณุวีร์ ประภัสระกูล

   Assoc. Prof. Dr. Nuvee Prapasarakul

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 1006 01984 90 4
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

   ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ถนนอังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
   โทรศัพท์ 02-218-9582, E-mail : Nuvee.P@chula.ac.th
6. ประวัติการศึกษา

   สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต
   จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
   ดุษฎีบัณฑิต
   Tokyo University of Agriculture and Technology
   Graduated Fellowship
   Murdoch University
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

   Veterinary Mycology: Isolation, Pathogeneisis, Immunology
   Antimicrobial resistance in bacteria: MIC, genetic mutation and mechnism
   Intestinal Spirochetes: Isolation, protein characteristics, genetic properties
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

   8.1 ประสบการณ์การทำวิจัย

ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	สถานภาพ	บทบาท
1. การจำแนกเชื้อสไปโรคีทในสุนัขด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่	รัชดาภิเษกสมโภช	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
2. ความไวรับของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในสุกรต่อสารต้านจุลชีพ 6 ชนิด	บริษัทเอกชน	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
3. การจำแนกคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาของเชื้อสโรคีทในระบบทางเดินอาหารของสุนัขด้วยวิธีอิมมูนโนบลอท	รัชดาภิเษกสมโภช	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
4. การสำรวจระดับความไวรับของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาก 6 จังหวัดของประเทศไทย	เงินทุนวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
5. การแยกเชื้อและการนับเชื้อยีสต์จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปุสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหารในเขตจังหวัดน่าน	รัชดาภิเษกสมโภช	เสร็จสิ้น	ผู้ร่วมโครงการ
6. การจำแนกเชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหารสุนัขด้วยลำดับ 23S rDNA	เงินทุนวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
7. การจำแนกและพยาธิกำเนิดของเชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหารสุนัขโดยใช้ลูกไก่อายุ 1 วันเป็นแบบจำลอง	สำนักงานกองทุนสนันสนุนการวิจัย	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
8. การตรวจสารพิษก่อความรุนแรงใน *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรด้วยวิธี Digoxigenin probes	เงินทุนวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
9. การพิสูจน์จำแนกเชื้อยีสต์จากผิวหนังสุนัขปกติและสุนัขที่มีอาการอาโทปี	สำนักงานกองทุนสนันสนุนการวิจัย	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
10. ประสิทธิภาพของยา florfenicol ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินหายใจสุกร	บริษัทเอกชน	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
11. การศึกษาเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ ระหว่าง VIRUSNIP® AND VIRKON ต่อเชื้อ *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE*	บริษัทเอกชน	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
12. การประเมินมาตรการของการป้องกันและควบคุมเชื้อมัยโคพลาสมาในฟาร์มสุกรในประเทศไทย	งบประมาณแผ่นดิน ปี 2554	เสร็จสิ้น	หัวหน้าโครงการ
13. การพัฒนาชุดทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค	เงินทุนวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์	เสร็จสิ้น	ผู้ร่วมโครงการ
14. การเปรียบเทียบคุณลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราที่ได้จากสัตว์และผู้ป่วยในจังหวัดน่าน	สวทช	20%	ผู้ร่วมโครงการ

8.2 งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในรอบ 5 ปี

8.2.1 **Nuvee Prapasarakul*,** Padet Tummaruk, Juthamas Klinwichit, Anchana Singchan, Assawanan Srithananchai and Tongchai Chalermchaikit (2010). Surveillance of antimicrobial-resistant rate of *Escherichia coli* isolated from pigs in 7 provinces in Thailand. *The Journal of Thai Veterinary Medical Science Association Under The Royal Patronage.* 1-3(61), 1-10.

8.2.2 **Nuvee Prapasarakul***, Passana Muangkong, Pitikarn Bumpenpol**,** Mutchamon Kaewparuehaschai**,** and Pattarat Chanchaithong. (2010) Identification of canine coagulase-positive staphylococci and effects of cephalosporin treatment to their susceptibility levels. *Journal of Thai Veterinary Practitioner.* 22, 18-30.

8.2.3 **Prapasarakul N.*,** Tummaruk P, Niyomtum W, Tripipat T, and Serichantalerg O. (2010) Virulence Genes and Antimicrobial Susceptibilities of Haemolytic and Non-Haemolytic *Escherichia coli* Isolated from Post-Weaning Piglets in Central Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science.* 72, 1603-1608. IF 0.85

8.2.4 Chompoonek Yurayart, Ariya Chindamporn, Sanipa Suradhat, Padet Tummaruk, Susumu Kajiwara and **Nuvee Prapasarakul*** (2011) Comparative analysis of the frequency, distribution and population sizes of yeasts associated with canine seborrheic dermatitis and healthy skin. *Veterinary Microbiology.* 148, 356-362. IF 3.23

8.2.5 **Nuvee Prapasarakul*,** Kittitat Lugsomya, Sirilak Disatian, Thawat Lekdumrongsak, Wijit Banlunara, Prugsawon Chetanachan, and David J. Hampson. (2011) Faecal excretion of intestinal spirochaetes by urban dogs, and their pathogenicity in a chick model of intestinal spirochaetosis. *Research in Veterinary Science.* 91(3), 38-43. IF 1.8

8.2.6 Pattrarat Chanchaithong and **Nuvee Prapasarakul*** (2011) Biochemical Markers and Protein Pattern Analysis for Canine Coagulase-Positive Staphylococci and Their Distribution on Dog Skin. *Journal of Microbiological Methods.* 86 (2), 175–181. IF 2.3

8.2.7 **Nuvee Prapasarakul***, *Chaiwat* Pulsrikarn, Taksa Vasaruchapong, Pisin Lekcharoen, Pattrarat Chanchaithong, Kittitat Lugsomya, Nitiwadee Keschumras, Natthakarn Thanomsuksinchai, Kanittha Tanchiangsai, and Padet Tummaruk. (2012) *Salmonella* serovar distribution in cobras (*Naja Kaouthia*), snake feeds and farm worker at Queen Saovabha Snake Park, Thailand. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation.* Vol. 24, Number 2, 288-294. IF 1.56

8.2.8 Metta Makhanon · Padet Tummaruk · Pacharee Thongkamkoon · Roongroje Thanawongnuwech · **Nuvee Prapasarakul*** (2012) Comparison of detection procedures of *Mycoplasma hyopneumoniae, Mycoplasma hyosynoviae and Mycoplasma hyorhinis* in lungs, tonsils and synovial fluid of slaughtered pigs and their distributions in Thailand. *Tropical Animal Health and Production.* 44, 31-38. IF 1.1

8.2.9 Kittitat Lugsomya, Padet Tummaruk, David J. Hampson and **Nuvee Prapasarakul*** (2012) Development of a modified selective medium to enhance the recovery rate of porcine intestinal spirochaetes from faeces. Letters in Applied Microbiology. 54, 330-335. IF 1.8

8.2.10 Yurayart, Chompoonek; Nuchnoul, Noppawan; Moolkum, Pornsawan; Jirasuksiri, Supittcha; Niyomtham, Waree; Chindamporn, Ariya; Kajiwara, Susumu; **Prapasarakul, Nuvee*** Antifungal agent susceptibilities and interpretation of *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from dogs with and without seborrheic dermatitis skin. (2013) Medical Mycology. 51(7):721-30. IF 2.45

8.2.11 Perreten V, Chanchaithong P, **Prapasarakul N,** Rossano A, Blum SE, Elad D, Schwendener S. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome mec element (ΨSCCmec57395) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Nov;57(11):5509-15. IF 4.65

8.2.12 Chanchaithong, Pattrarat; Perreten, Vincent; Schwendener, Sybille; Tribuddharat, Chanwit; Chongthaleong, Anan; Niyomtham, Waree; **Prapasarakul, Nuvee***. (2014) Strain typing and antimicrobial

susceptibility of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal species in dogs and people associated with dogs in Thailand. J Applied Microbiol. 117, 572-586.

8.2.13 **Nuvee Prapasarakul*** (2010) Trend of porcine bacterial pathogen reacted to antimicrobials in Thailand. Pig Focus Asia 2010. (Invited speaker: Epub) 5 pages (Eng)

8.2.14 **Nuvee Prapasarakul*** (2010) How to write a case report. *The Journal of Thai Veterinary Practitioners,* (22) 2, 65-72.

8.2.15 Wandee Sirichokchatchawan, Thongchai Chaleomchaikit, and **Nuvee Prapasarakul*** (2012) Probiotics: A Chance as Feed Additive in Pig Industry. The Journal of Thai Veterinary Medical Science Association under the Royal Patronage. 4-6(62), 1-12.

8.3 รางวัล

8.3.1 Rachadapisek Sompod Fellowship (Young researcher grant), 2003-2004

8.3.2 Rachadapisek Sompod Fellowship, 2004-present

8.3.3 Fellowship of CNK Foundation, 2003- present

8.3.4 Faculty of Veterinary Science supporting fund, 2003- present.

8.3.5 The Thailand research grants 2005

8.3.6 Crawford fellowship foundation, Australia 2006

8.3.7 The Thailand research grants 2008-2012

8.3.8 The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program 14/6 2012-2015

8.4 รางวัลงานวิจัย

8.4.1 Commendable Research Award 2006, Thai Veterinary Medication Association

8.4.2 Best Research Award, International Congress of Veterinary Science, 38th, 2013

8.4.3 Very good research Award 2013, Ratchadapisek Sompoch scholarship, Thailand.

8.4.4 Best Research Award, 2014, VPAT Regional Veterinary Congress

8.5 งานประชุมวิชาการ

8.5.1 The annual congress of 129th Japanese Society of Veterinary Science, Yogohama (2000) Title: Prevalence and Isolation of canine intestinal spirochetes isolated in Japan.(Oral)

8.5.2 The annual congress of 131st Japanese Society of Veterinary Science, Ibaraki.(2001) Title: Biochemical and genetic classification of canine intestinal spirochetes isolated in Japan. (Oral)

8.5.3 The 12th annual conference of Japanese animal science. (2001) Title: Identification and serological classification of canine intestinal spirochetes. (Oral)

8.5.4 The annual conference of Japanese society of bacteriology. Yogohama. (2002) Title: Genetic and biochemical classification of 29 canine intestinal spirochetes isolated in Japan (Oral)

8.5.5 The annual congress of 133rd Japanese Society of Veterinary Science, Tokyo (2002) Title: *In vitro* activites of 24 antimicrobial agents against Japanese canine intestinal spirochete isolates. (Oral)

8.5.6 The Japanese society of mycology. Ibaraki (2002) Title: Characterization of 29 canine intestinal spirochetes isolates from Japan. (Oral)

8.5.7 The annual congress of 135th Japanese Society of Veterinary Science. Tokyo.(2003) Title: A new point mutation at 2062 base position on 23S rDNA affecting tylosin resistance of canine intestinal spirochetes. (Oral)

8.5.8 The International Pig Veterinary Society Congress. U.S.A. (2002) Title: Genetic and serological characterization of Japanese canine intestinal spirochetes. (Poster) Title: Genetic classification of canine intestinal spirochetes isolated in Japan. (Poster)

8.5.9 The International Pig Veterinary Society Congress. Germany. (2004) Title: *In vitro* activities of antimicrobial agents against *B. hyodysenteriae* isolated from pigs with recurrent dysentery in Thailand. (Poster) Title: Alternative antimicrobials in the nutrition of post weaning piglets: Impacts on feed intake, growth rate, feed conversion and mortality rate. (Poster) Title: Alternative antimicrobials in the nutrition of post weaning piglets: II Impacts

on histopathology and number of *Escherichia coli* and *Bacillus spp.* in feces and small intestine. (Poster)

8.5.10 The 30th annual conference of Thai Veterinary Medical Association (2004) Title: Effect of colistin feed additive to minimal inhibitory concentration of *E. coli* isolated from nursery pig. (Oral) Title: Subtherapeutic dose of colistin inducing antimicrobial resistance in *E. coli* (Oral) Title: Isolation and prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* in 7 provinces of Thailand (Poster) Title: Efficacy of colistin and bacitracin combination for treatment and control of colibacillosis in nursery pig. (Poster) Title: Isolation and prevalence of canine intestinal spirochetes in Thailand. (Poster) Title: Comparison of in vitro activities of 16 antimicrobial agents against *Escherichia coli* isolated from pig with diarrhea and healthy pig. (Poster) Title: Efficacy of the test kit(Vet Smart ®) for detection of Avian influenza (Poster)

8.5.11 The annual conference of Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. (2005) Title: Classification of canine intestinal spirochete using Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE). (Oral, Poster)

8.5.12 The 31th annual conference of Thai Veterinary Medical Association (2005) Title: Comparison of *in vitro* sensitivity of pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* isolated from piglets. (Poster) Title: Evaluation of susceptibility and specificity of Vet-Smart AIV Ag for diagnosis of avian influenza virus (H5N1). (Poster) Title: *Brachyspira pilosicoli* isolated from dogs in Thailand: first report. (Oral) Title: Pathogenicity of the Thai canine *Brachyspira pilosicoli* in a dia old chick. Title: Surveillance of *Escherichia coli* resistance in 7 provinces in Thailand. (Poster) Title: Prevalence of *Escherichia coli* containing virulence-associated genes in post weaning pigs. (Oral)

8.5.13 The 2nd Asian Pig Veterinary Society congress. (2005) Title: *In vitro* sensitivity of pathogenic *Escherichia coli* and non-pathogenic *Escherichia coli* against 16 antimicrobial agents. (Oral) Title: Prevalence of vilirent

factors among hemolytic and non-hemolytic *E. coli* isolated from post weaning piglets in Thailand. (Oral) Title: The efficacy of colistin and bacitracin combination on number of enteric bacteria and some productive traits in post-weaning piglets. (Oral) Title: The prevalence and biochemical properties of *Brachspira hyodysenteriae* in Thailand. (Poster)

8.5.14 The AHAT/BSAS International Conference. (2005) Title: Pathogenicity of the Thai canine *Brachyspira pilosicoli* in a day-old chick model. (Poster)

8.5.15 The international veterinary pig society congress. Denmark (2006) Title: Identification of *Brachyspira pilosicoli* isolated from dogs in Thailand. Title: *In vitro* sensitivity of porcine respiratory pathogens against Tiamulin/Amoxicillin combination. Title: Difference of resistant rate between piglets and sows to 5 antimicrobial agents

8.5.16 The 2nd Symposium of the Asian Zoo and Wildlife Medicine and the 1st Workshop on the Asian Zoo and Wildlife Pathology. (2006) Title: *Salmonella* and *Brachyspira* surveillance in feces of wild-caught snakes in Thailand. (Oral)

8.5.17 The 32th annual conference of Thai Veterinary Medical Association (2006) Title: Surveillance of secondary infection bacteria in dogs with viral infections Title: Classification of canine intestinal spirochetes by glutamate dehydrogenase gene (GDH) sequence analysis (Oral) Title: Experimental study on minimal inhibitory concentration of 5 antimicrobial agents to porcine respiratory bacterial pathogens Title: *Salmonella* and *Brachyspira* surveillance in feces of wild-caught in Thailand (Oral) Title: Synergistic efficacy of tiamulin/doxycycline combination to porcine respiratory bacterial pathogens.

8.5.18 The 32th annual conference of Thai Veterinary Medical Association (2007) Title: Isolation and classification of *Malassezia* sp. isolated from atopic and healthy dog Title: Comparative study of DNA extraction of *Malassezia* yeast Title: *In vitro* sensitivity of 6 antimicrobials against secondary bacteria in dog with viral infection Title: Comparative study of Salmonella prevalence in wild caught and farm snakes

8.5.19 The 20th IPVS Congress, Durban, South Africa (2008) Title: Efficacy of tiamulin/colistin against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Salmonella* isolated from pigs with diarrhoea.

8.5.20 World Congress of Veterinary Dermatology 6th, Hongkong (2008) Title: Isolation and Identification of *Malassezia* sp. Isolated from Atopic and Healthy Dogs in Thailand

8.5.21 VPAT Regional Veterinary Congress 3rd (2009) Title: Concurrent habitate of *Candida parapsilosis* and *Malassezia pachydermatis* on dog skin Title: Confirmation of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from nasal membrane of dogs in Thailand

8.5.22 Asian Pig Veterinary Society 3rd congress, Tsukuba, Ibaraki, Japan (2009) Title: Preliminary Study of Porcine Mycoplasma Incidence in Thai Pig Farms Title: Confirmation of phenotypic and genotypic similarities of *Brachyspira pilosicoli* isolated from human and animals (oral) Title: The *in vitro* florfenicol efficacies against porcine pathogenic bacteria

8.5.23 Asian Pig Veterinary Society 4th Congress, Pattaya, Thailand (2011) Title: Comparative study of bactericidal efficacy between VIRUNIP and VIRKON S against Brachyspira hyodysenteriae Title: *In vito* susceptibility study of two porcine mycoplamas isolated from lung lesions of slaughtered pigs in Thailand. 2011

8.5.24 WSAVA, Jeju, Korean (2011) Title: The distribution and co-existance among coagulase-positive staphylococci at different anatomical sites on dog skin Title: High skin carriage of canine methicillin resistant coagulase-positive staphylococci on dog skin during cephalexin monohydrate treatment

8.5.25 The 21th IPVS Congress, Jeju, South Korean (2012) Title: COMPARATIVE DETECTION OF BACTERIA ASSOCIATED COLITIS USING SELECTIVE MEDIA AND MULTIPLEX PCR

8.5.26 The 17th Federation of Asian Veterinary Associations (*FAVA*) *Congress* (2013) Title: Efficacy of enrofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs

8.5.27 The 38th International Conference in Veterinary Science (2013) Title: Incidence of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Bangkok and Nakhonpathom province, Thailand, during 2012 Title: Identification and distribution of *Malassezia* sp. from staff skin in a veterinary teaching school Title: A preliminary study of porcine lactic acid bacterial identification using whole-cell protein profiles

8.5.28 The 31st World Veterinary Congress (2013) Title: Dogs and dog-associated people in Thailand shared common and various clones of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (oral)

8.5.29 Asian Pig Veterinary Society 4th Congress, Pattaya, Thailand (2013) Title: Combination effect of colistin/halquinol against porcine intestinal bacteria isolated from commercial farms in Thailand Title: Combination effect of tiamulin/doxycycline against porcine respiratory bacteria isolated from commercial farms in Thailand Title: Reduction of bacterial contamination using organic releasing chlorine (VIRUSNIP®) in sanitary process of Thai pig farm: a field trial. (oral)

8.5.30 VPAT Regional Veterinary Congress 8th (2014) Title: Mutual colonization of yeasts associated canine seborrheic dermatitis enhancing biofilm production and antifungal resistance (oral)

8.5.31 The 22th IPVS Congress, Jeju, South Korean (2014) Title: A possibility of Escherichia coli plasmid reducing following flavophospholipol administration in conventional pig farms

8.5.32 The 18th Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA) Congress (2014)

ผู้วิจัยร่วม 1

1 ชื่อ – นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์
Assist Prof Dr. Chanwit Tribuddharat

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

3 หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ชั้น 4 หน่วยแบคทีเรียวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราช พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โทรศัพท์ 662-804-2221, 662-804-0246 โทรสาร 662-804-0247 e-mail; sictb@mahidol.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

April 1-30, 2002: Exchange scholar, Department of Bacteriology, Juntendo University, Tokyo, Japan.

1999-2001: Postdoctoral fellow, Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Calgary, Alberta, Canada.

1994–1999: Ph.D. student, Department of Microbiology and Immunology, Finch University of Health Sciences/The Chicago Medical School, North Chicago, Illinois, USA. (Rosalind Franklin University of Medicine and Science)

1987-1993: M.D., Faculty of Medicine-Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

แบคทีเรียวิทยา และอณุชีววิทยาขั้นสูง

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : *(ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)*

6.1.1 Srifuengfung S, **Tribuddharat C**, Chokephaibulkit K, Comerungsee S. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* from a university hospital, Thailand. J Med Assoc Thai. 2010 Nov;93 Suppl 5:S35-9.

6.1.2 Srifuengfung S, Chokephaibulkit K, **Tribuddharat C**, Comerungsee S. A description of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*-Siriraj Hospital, Thailand: 2008. J Med Assoc Thai. 2010 Nov;93 Suppl 5:S27-34.

6.1.3 **Tribuddharat C**, Polwichai P, Champreeda P, Srifuengfung S. The sequence of pbp2b from penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Thailand. J Med Assoc Thai. 2010 Nov;93 Suppl 5:S16-26.

6.1.4 Jariyasethpong T, **Tribuddharat C**, Dejsirilert S, Kerdsin A, Tishyadhigama P, Rahule S, Sawanpanyalert P, Yosapol P, Aswapokee N. MRSA carriage

in a tertiary governmental hospital in Thailand: emphasis on prevalence and molecular epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Aug;29(8):977-85.

6.1.5 Thapa B, **Tribuddharat C**, Srifuengfung S, Dhiraputra C. High prevalence of *bla*(OXA)-23 in oligoclonal carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010 May;41(3):625-35.

6.1.6 Naenna P, Noisumdaeng P, Pongpech P, **Tribuddharat C**. Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010 May;41(3):614-24.

6.2 งานวิจัยที่กำลังทำ :

6.2.1 Characterization of plasmid-borne AmpC beta-lactamase in Gram-negative bacteria.

6.2.2 Enzyme kinetics analyses of metallo-beta-lactamases, IMP-14 and IMP-15, from *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2.3 Production of antibodies against an imipenem outer membrane influx channel, OprD, protein from *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2.4 Molecular typing of pan-drug resistant nosocomial pathogens: *Acinetobacter baumannii* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

6.2.5 Characterization of Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Thai isolate.

6.2.6 Fluoroquinolone resistance via *gyrA* and *qnrA* genes in *Escherichia coli*.

6.2.7 Study of Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in Gram-negative bacteria.

6.2.8 Study of the Integron element, a multiple antibiotic resistance gene capturing elements, and their horizontal gene transfer in Gram-negative bacteria.

6.2.9 Typing and immunological study of *Leptospira interrogans*.

6.2.10 Molecular epidemiology of multi-drug resistant nosocomial pathogens.

6.2.11 Research coordinator of the CDC (USA) funded project (2006-2009): Avian Influenza Research Project: at human-animal interface.

ผู้วิจัยร่วม 2

1 ชื่อ-นามสกุล นาง สิริลักษณ์ สุรเชษฐพงษ์

Mrs. Sirilak Surachetpong

2 เลขหมายบัตรประชาชน 3 1999 00077 21 4

3 ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4 หน่วยงาน และสถาที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ

ถนนอังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

5 ประวัติการศึกษา

จบสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2545

จบปริญญาโท สาขา Clinical Science จาก Colorado State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2548

จบปริญญาเอก สาขา Clinical Science จาก Colorado State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2551

Post doctoral fellowship ณ Colorado State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2551-2552

6 สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

Veterinary Medicine, Veterinary Cardiology

7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.1 การตายของเซลล์และการปรากฏของโปรตีนในตระกูลบีซีแอลสอง และทรานสฟอร์มมิ่ง โกรว์ท แฟคเตอร์ เบต้า 1 ในโรคลิ้นหัวใจไมทรัลเสื่อมในสุนัข

7.1.2 การศึกษาความชุกของโรค Bartonellosis ที่ก่อรอยโรคลิ้นหัวใจอักเสบ

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.2.1 Larcerda CMR, Disatian S, Orton EC. Differential protein expression between normal, early -stage, late-stage myxomatous mitral valve from dogs. Proteomics 2009;3(12):1422-1429

7.2.2 Disatian S, Lacerda C, Orton EC. Tryptophan hydroxylase 1 expression is increased in phenotype-altered canine and human myxomatous mitral valves. J Heart Valve Dis 2009;19(1):71-78

7.2.3 Scruggs SM, Disatian S, Orton EC. Serotonin transmembrane transporter expression is down-regulated late-stage canine degenerative mitral valves. J Vet Cardio 2010;12(3):163-169.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.3.1 การตายของเซลล์และการปรากฏของโปรตีนในตระกูลบีซีแอลสอง และทรานสฟอร์มมิ่ง โกรว์ท แฟคเตอร์ เบต้า 1 ในโรคลิ้นหัวใจไมทรัลเสื่อมในสุนัข
แหล่งทุน สกว.
การทำวิจัยลุล่วงแล้ว ร้อยละ 85

7.3.2 การศึกษาความชุกของโรค Bartonellosis ที่ก่อรอยโรคลิ้นหัวใจอักเสบ
แหล่งทุน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
การทำวิจัยลุล่วงแล้วร้อยละ 70

ผู้วิจัยร่วม 3

1. ชื่อ-นามสกุล นางวารี นิยมธรรม
Mrs.Waree Niyomtham
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100601142539
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ (ชำนาญการพิเศษ)
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์ 02-2189581-2
โทรศัพท์มือถือ 084-6982739
โทรสาร 02-2511656
e-mail: pewwaree@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
วทม. (พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
สาขาจุลชีววิทยา
สาขากิณวิทยาทางสัตวแพทย์

7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*

8 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

8.1.1 อินทิรา กระหม่อมทอง ณุวีร์ ประภัสระกูล **วารี นิยมธรรม** ธิติมา ไตร พิพัฒน์ อภิชัย ศรีจันทร์และอรลักษณ์ เสรีฉันทฤกษ์. 2550. การจำแนกเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ด้วยวิธีวิเคราะห์โปรตีน เปรียบเทียบกับวิธีทดสอบทางชีวเคมี. วารสารสัตวแพทย์ ปีที่ 17 ฉบับที่ 3. หน้า 114-121.

8.1.2 Kramomtong, I., **Niyomtham,W**., Poonsuk, K. 2002. Determination of the Antibacterial Effectiveness of Halquinol and Tiamulin againts Vibrio Species Isolation from Black Tiger Prawns (*Penaeus monodon*).J.Thai Vet. Med. Assoc.53(3): 11-19.

8.1.3 Kesdangsakonwut, S., Banlunara,W., **Niyomtham, W.**, Chotiapisitkul,S., Thanawongnuwech, R. 2003. Disseminated Aspergillosis in a Mute Swan (Cygnusolor) in Thailand : A Case Report, The 11 th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, November 9-13; 102-103.

8.1.4 **Niyomtham, W.**, Kramomtong, I. 2003. The Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* species isolated from intestines of chickens in retail markets of Thailand. The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, November 9-13: 110-111.

8.1.5 Prapasarakul, N., Tripipat, T., **Niyomtum, W.,** Serichantalerg, O., Tummaruk, P., and Chalernchikit, T. 2005. *In vitro* sensitivity of pathogenic *Escherichia coli* and non-pathogenic *Escherichia coli* against 16 antimicrobial agents. Proceedings of the 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress. EDSA Shangri-La, Pasig City, Philippines. September 19-21: 100-103.

8.1.6 Prapasarakul N., Giwaratanon O., Paphavasit T., **Niyomtham W.,** Tripipat T., Kramomthong I. and Serichantalergs O., 2005, Prevalence of Virulent Factors among Hemolytic and Non-hemolytic *E.coli* Isolated from Post Weaning Piglets in Thailand. Proceedings of the 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress. EDSA Shangri-La, Pasig City, Philippines. September 19-21: 108-110.

8.1.7 Kramomtong, I., **Niyomtham,W**.,Punachot, S., 2006. The effects of barakol extracted from *CASSIA SIAMEA* in reducing the colonization of *Salmonella*

in young boiler chicks. Proceedings Ann. Con. Vet Sci. Chula. Meeting April 27-28: 73.

8.1.8 Kramomtong, I., Prapasarakul,N., **Niyomtham, W**., Tripipat, T. 2006. The detection of the *gyrA* point mutation from quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* isolated from broiler intestines. Proceedings Ann. Con. Vet Sci. Chula. Meeting April 27-28: 94.

8.1.9 Kramomtong, I.,Tripipat, T., **Niyomtham W**. and Angkanaporn, K., 2007. Effects Of Mixed Organic Acids On Crop And Caecal *Salmonella* Enteritidis Colonization, *Lactobacilli* Count And Growth Performance In Broiler Chicks (PN0048). Conference proceedings The 8th Asian Pacific Poultry Conference 2007 Science to Solutions. Swissotel Le Concorde Hotel, Bangkok, Thailand. March 5-6: 478-482.

8.1.10 Prapasarakul, N., Narongsak, W., **Niyomtham W.,** Tripipat, T., and Makhanon, M. 2007. Efficacy of tiamulin/haquinol combination to porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Cholerasuis. Proceedings of the 3 rd Congress of the Asian Pig Veterinary Society. Wuhan, China, April 22-25: 444-446.

8.1.11 Prapasarakul, N., Narongsak, W., **Niyomtham, W.,** Tripipat, T., and Makhanon, M. 2008. Efficacy of tiamulin/colistin against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Salmonella isolated from pigs with diarrhoea. 20th International Pig Veterinary Society Congress 22-26 June. Convention Center: Durban, South Africa. June: 454.

8.1.12 **Niyomtham, W.**, Techaarpornkul.N., Chaisupasin.V., Huangwong.S., aveephap.O.,Yurayat**.C.,** pasarakul. N. 2010. A possible epidemiological distribution of dermatophytes in pet shops and animal hospitals in Thailand. 36th The International Conference on Veterinary Science Thailand. Impact Challenger Hall, Muang Thong Thani Nothaburi,Thailand. November 2-5: 299-304.

8.1.13 Kramomtong, I., **Niyomtham,W**.,Talummuk, S., Chaiyanate P.,Sievert, K. 2010. In vitro Testing of the Efficacy of Organic Releasing Chlorine (VirusnipTM) against *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. Thai J. Vet. Med. 40(4): 419-425.