

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การกระจาย การจำแนกชนิดเชิงโมเลกุลและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ในการผลิตสุกรและผู้เลี้ยงสุกรใน เขตภาคกลางของประเทศไทย

ผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.น.สพ.ดร. ภัทรรัฐ จันทน์ฉายทอง	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ผศ.น.สพ.ดร. นันทิ อ่าอินทร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ศ.น.สพ.ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. รศ.น.สพ.ดร. ญวีร์ ประภัสระกุล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5980024

ชื่อโครงการ: การกระจาย การจำแนกชนิดเชิงโมเลกุลและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ในการผลิตสุกรและผู้เลี้ยงสุกรในเขตภาคกลางของประเทศไทย

### ชื่อนักวิจัย และสถาบัน

ผศ.น.สพ.ดร. ปัทรรัฐ	จันทร์ฉายทอง	คณะสัตวแพทยศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.น.สพ.ดร. นันทิ	อำอินทร์	คณะสัตวแพทยศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.น.สพ.ดร. เมตต์จ	ธรรมรักษ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.น.สพ.ดร. ญวีร์	ประภัสระกุล	คณะสัตวแพทยศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: patrrat.c@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: พฤษภาคม 2559 ถึง เมษายน 2561

### บทคัดย่อ:

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาการกระจาย คุณลักษณะทางพันธุกรรมและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่พบในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรในเขตภาคกลางของประเทศไทย ผลการศึกษาพบความชุกเชื้อ MRSA ร้อยละ 9.72 (59 จาก 607 ตัวอย่าง) จากตัวอย่างจากเยื่อช่องจมูกสุกร พบความชุกสูง ร้อยละ 37.02 (10 จาก 27 ฟาร์ม) และพบความชุกในผู้เลี้ยงสุกร ร้อยละ 7.89 (3 จาก 38 คน) เชื้อ MRSA จำนวนทั้งหมด 63 เชื้อมี staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) V (41 เชื้อ) SCC*mec* IX (9 เชื้อ) SCC*mec* composite island ชนิดใหม่ (12 เชื้อ) และ SCC*mec* ที่จำแนกไม่ได้ (1 เชื้อ) โดย SCC*mec* IX พบใน MRSA-ST9-t337, MRSA-ST398-t034 และ MRSA-ST4576-t034 ซึ่งเป็น ST ใหม่ที่เปลี่ยน 1 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของ ST9 ส่วน SCC*mec* รูปแบบอื่นๆพบใน MRSA-ST398-t034 เท่านั้น ยกเว้น 1 เชื้อที่ไม่พบยีน *spa* เชื้อ MRSA ทุกเชื้อที่พบแสดงการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดและมียีนดื้อยาต้านจุลชีพที่พบได้บ่อยในสายพันธุ์ที่แยกได้จากปศุสัตว์ ได้แก่ *lsa*(E), *lnu*(B), *cfr*, *fexA*, *vga*(A) และ *spw* จากคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบลายพิมพ์นิวมีโอ DNA แสดงหลักฐานการส่งผ่านเชื้อระหว่างสุกรและมนุษย์และการแพร่กระจายในห่วงโซ่การผลิตสุกร การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่พบ MRSA ST398 ในผู้เลี้ยงสุกรและผู้เลี้ยง และยีนดื้อยา *cfr* ใน MRSA-ST9 ในประเทศไทย คุณลักษณะทางพันธุกรรมแยกย่อยและยีนดื้อยาที่แตกต่างกันแสดงถึงกลุ่มประชากรเชื้อ MRSA ที่หลากหลายและวิวัฒนาการของเชื้อที่กระจายในเขตภาคกลางของประเทศไทย การตรวจติดตามและการจัดการฟาร์มร่วมกับการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุสมผลมีความจำเป็นในการลดการอุบัติและแพร่กระจาย เช่นเดียวกับการรักษาสุขาศาสตร์และการป้องกันตนเองของบุคลากรเป็นสิ่งที่ต้องปฏิบัติเพื่อป้องกันการได้รับเชื้อจากปศุสัตว์

คำหลัก: ภาคกลาง ประเทศไทย ผู้เลี้ยงสุกร สุกร MRSA

## Abstract

---

**Project Code:** MRG5980024

**Project Title:** Investigation molecular characterization and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig production and people associated with pigs in Central Thailand

### Investigator

Asst.Prof.Dr Pattrarat	Chanchaithong	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
Asst.Prof.Dr Nutthee	Am-in	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
Prof.Dr Padet	Tummaruk	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
Assoc.Dr. Nuvee	Prapasarakul	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

**E mail Address:** pattrarat.c@chula.ac.th

**Project Period:** May 2016 – April 2018

### Abstract:

The study aimed to detect distribution and characterize genotype and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonizing pigs and swine workers in central Thailand. MRSA were recovered from 59 of 607 (9.72%) pig samples with 37.03% herd prevalence (10/27 farms) and from 3 of 38 (7.89%) swine workers. Of 63 isolates, MRSA carried staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) V (n=41), SCCmec IX (n=9), a SCCmec composite island (n=12) and non-typeable SCCmec (n=1). SCCmec IX was associated with MRSA-ST9-t337, MRSA-ST398-t034 and MRSA-ST4576-t034, a new single locus variant of ST9. Other SCCmec were carried by MRSA-ST398-t034 only, except one negative *spa* amplification. The isolates exerted multidrug resistance and carried common resistance genes found in livestock-associated MRSA such as *lsa(E)*, *lnu(B)*, *cfr*, *fexA*, *vga(A)* and *spw*. With molecular characteristics, resistance and PFGE patterns supported evidence of pig-to-human transmission and spreading in pig production chain. This is also the first findings of MRSA-ST398 distributing in swine herds and workers and presence of multidrug resistance *cfr* in MRSA-ST9 in Thailand. Minor variation of molecular features and resistance gene carriage in both STs represented heterogenous population and evolution of endemic clones. Monitoring program and farm management with prudent antimicrobial uses are needed to reduce the emergence and spreading. Together, strict hygiene and personal protection are necessary to prevent the acquired LA-MRSA.

**Keyword:** Central part, Thailand, MRSA, Pigs, Swine workers

บทสรุปผู้บริหาร  
(Executive summary)

---

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นแบคทีเรียดื้อยาชนิดที่มีความสำคัญทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนแบบฉวยโอกาสและการเลือกยาต้านจุลชีพในการรักษาเป็นได้อย่างจำกัด (Rodvold and McConeghy, 2014) การใช้ยาต้านจุลชีพในการผลิตปศุสัตว์เป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการอุบัติของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA ที่เกี่ยวข้องกับปศุสัตว์หรือ livestock-associated MRSA (LA-MRSA) ซึ่งมีการกระจายตัวเป็นกลุ่มสายพันธุ์จำเพาะที่มีอยู่ทั่วโลก (Barton, 2014) สุกอร์จัดว่าเป็นแหล่งรังโรคหนึ่งของ LA-MRSA และเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการส่งผ่านมายังคน โดยเฉพาะผู้เลี้ยงสุกรและบุคคลในครอบครัว รวมถึงการปนเปื้อนในอาหารจากผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรทำให้ส่งผ่านมายังผู้บริโภคได้ (Vestergaard et al., 2012) LA-MRSA มีกลุ่มสายพันธุ์จำแนกโดยเทคนิค multilocus sequence typing (MLST) ที่มีความจำเพาะเป็น sequence type (ST) 398, ST9 และ ST49 เป็นต้น (Cuny et al., 2015; Overesch et al., 2011) นอกจากการดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactams แล้ว LA-MRSA มักมีคุณสมบัติการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดจากการได้รับและสะสมสารพันธุกรรมที่เคลื่อนย้ายได้ (mobile genetic element หรือ MGE) ที่มียีนดื้อยาและมักเป็นชนิดที่ไม่พบใน MRSA สายพันธุ์ที่พบในมนุษย์ MRSA-ST398 มีการรายงานครั้งแรกในประเทศฝรั่งเศสและต่อมามีรายงานเพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศต่างๆทั่วโลกจากทั้งในทวีปยุโรป ทวีปอเมริกาเหนือ แต่ในทวีปเอเชียพบได้ที่ประเทศเกาหลีใต้ อีกทั้งยังไม่เคยมีการรายงานการพบในสุกรในประเทศไทยมาก่อนหน้านี้ ส่วน MRSA-ST9 เป็นกลุ่มสายพันธุ์ที่มีการแพร่กระจายในประเทศแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ จีน ฮองกง ไต้หวัน มาเลเซีย และไทย (Chuang and Huang, 2015) จากการรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศไทยพบเชื้อ MRSA-ST9 ในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรที่ภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ (Anukool et al., 2009; Larsen et al., 2012; Patchanee et al., 2014; Sinlapasorn et al., 2015) และพบการติดเชื้อในผู้ป่วยนอกแสดงถึงการกระจายของเชื้อในชุมชน (Lulitanond et al., 2013) MRSA-ST398 มีการรายงานการพบเชื้อในคนและสุนัขในประเทศไทยเท่านั้นและยังไม่เคยมีรายงานแหล่งที่มาจากปศุสัตว์ (Chanchaithong et al., 2014; Li et al., 2011) เขตภาคกลางของประเทศไทยเป็นแหล่งอุตสาหกรรม

ผลิตสุกร แต่ยังมีข้อมูลของเชื้อ LA-MRSA ที่ค่อนข้างน้อย การทราบการกระจายและคุณลักษณะของเชื้อ LA-MRSA ในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรเป็นประโยชน์ในทางระบาดวิทยาในการตรวจติดตามและเฝ้าระวัง และทราบหลักฐานความเป็นไปได้ที่อาจมีการส่งผ่านมายังมนุษย์

### บททวนวรรณกรรม

Staphylococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (gram-positive bacteria) ที่อาศัยอยู่บนผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ในบทบาทของเชื้อประจำถิ่น *S. aureus* เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญจากความสามารถในการก่อโรคแบบฉวยโอกาสทั้งการติดเชื้อเฉพาะแห่งจนถึงตามระบบที่ทำให้ถึงแก่ชีวิต MRSA เป็นแบคทีเรียดื้อยาที่อุบัติขึ้นหลังจากการใช้ยา methicillin ซึ่งเป็น penicillinase-resistant penicillin (Hiramatsu et al., 2001) และแสดงการดื้อต่อยากลุ่ม  $\beta$ -lactam ทุกชนิด พบการกระจายและระบาดในโรงพยาบาลทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เรียกว่า hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) ตามมาด้วยการพบการระบาดในชุมชน community-acquired MRSA (CA-MRSA) (Naimi et al., 2003) ปศุสัตว์จัดเป็นแหล่งรังโรคหนึ่งของเชื้อ MRSA และอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อได้ เช่น โรคเต้านมอักเสบในโค และข้อต่ออักเสบในสัตว์ปีก (Vanderhaeghen et al., 2010) การพบเชื้อดื้อยานี้ในปศุสัตว์นั้นมีความสำคัญในเชิงสาธารณสุข โดยเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากปศุสัตว์มีสายพันธุ์จากการจำแนกทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะ เรียกว่า livestock-associated MRSA ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MRSA จึงมีความสำคัญในการจำแนกแหล่งที่มาของเชื้อในเชิงระบาดวิทยา (Cuny et al., 2010) LA-MRSA มีการรายงานครั้งแรกจากสุกรในประเทศฝรั่งเศสและตามมาด้วยรายงานจากหลายประเทศทั่วโลกใน ความชุกที่อาจสูงถึง 99% ดังนั้นสุกรจึงจัดเป็นแหล่งรังโรคหนึ่งของเชื้อ MRSA และเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในสิ่งแวดล้อมของฟาร์มและส่งผ่านมายังผู้ปฏิบัติงานในฟาร์ม (Armand-Lefevre et al., 2005) ประเทศในแถบทวีปเอเชียมีการรายงานพบ MRSA-ST9 เป็นสายพันธุ์หลักรวมถึงประเทศไทยและพบในผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มสุกรด้วยเช่นกัน (Chuang and Huang, 2015; Larsen et al., 2012; Patchanee et al., 2014; Sinlapasorn et al., 2015)

ความชุกของเชื้อ MRSA ที่พบได้ในสุกรมีความแปรผันได้ในช่วง 0.9-99% และในผู้เลี้ยงสุกร 0-45% (Broens et al., 2011; Conceição et al., 2017; Crombé et al., 2012; Khanna et al., 2008; Larsen

et al., 2012; Patchanee et al., 2014; Smith et al., 2009) การพบเชื้อ MRSA ในผู้เลี้ยงสุกรอาจพบได้ในความชุกที่สูงถึง 80% ในฟาร์มสุกรที่เป็นพาหะ (Cuny et al., 2009) การตรวจติดตามอย่างต่อเนื่องในสุกรที่จะนำไปผ่านกระบวนการชำแหละจากการศึกษาในประเทศสวีเดนแลนด์พบความชุกเพิ่มสูงขึ้นถึง 3 เท่าในระยะเวลา 2 ปี (Overesch et al., 2011) ทั้งนี้ผู้เลี้ยงสุกรที่มีขนาดใหญ่ การจัดการฟาร์มแบบครบวงจร เป็นปัจจัยที่ทำให้พบความชุกของ MRSA สูงในผู้เลี้ยงสุกร (Alt et al., 2011) รวมถึงการส่งสุกรที่เป็นพาหะของเชื้อ MRSA เข้ารวมฝูงเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของ MRSA-ST398 ในวงจรการผลิตสุกร (Broens et al., 2012; Broens et al., 2011) การนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการอธิบายระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ MRSA เป็นประโยชน์ในแง่ของการตรวจติดตามทำให้ทราบการระบาด แหล่งที่มา และวิวัฒนาการของเชื้อ เทคนิค multilocus sequence typing (MLST) อาศัยการจำแนกความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรมของยีน *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* และ *yqjL* (Enright et al., 2000) ทำให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อในรูปแบบ sequence type (ST) ที่สามารถจำแนก ST ที่เกี่ยวข้องกับทางปศุสัตว์ ได้แก่ ST398, ST97 และ ST9 กับ ST1 ที่มาจากมนุษย์กระจายตัวปนกันในสุกรที่เลี้ยงในฟาร์ม (Battisti et al., 2010) การจำแนกรูปแบบ *spa* อาศัยความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรมของส่วน polymorphic X region ซึ่งเป็นบริเวณซ้ำเรียงต่อกัน (tandem repeat) ที่ทำให้จำแนกความแตกต่างได้มากขึ้น (Koreen et al., 2004) เช่นเดียวกันกับการหาลายพิมพ์นิ้วมือ DNA (DNA fingerprinting) ด้วยเทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ที่มีความจำแนกแยกแยะสายพันธุ์แบคทีเรียจากชิ้นส่วนโครโมโซมของแบคทีเรียที่ผ่านการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) (Tenover et al., 1995) โดย LA-MRSA-ST398 ต้องอาศัยเอนไซม์ *Cfr9I* ในการตัดสายโครโมโซม จากการมีกลไกการปรับเปลี่ยนตำแหน่งตัดจำเพาะที่ทำให้เกิดการทนต่อการตัดย่อยของ *SmaI* ซึ่งใช้สำหรับ *S. aureus* สายพันธุ์อื่น (Argudín et al., 2010) การรายงานคุณลักษณะทางพันธุกรรมจากแหล่งต่างๆทั่วโลกและการสร้างฐานข้อมูลการกระจายของเชื้อทำให้เกิดประโยชน์ในการตรวจติดตามการระบาดและการเปลี่ยนแปลงเชิงระบาดวิทยาของเชื้อต่อไป

Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) เป็นชุดสารพันธุกรรมเคลื่อนย้ายได้ (mobile genetic element หรือ MGE) สำหรับ methicillin-resistant staphylococci เนื่องจากมีชุดยีนที่ใช้ในการตัดต่อเข้าสู่สายโครโมโซมของแบคทีเรียหรือ cassette chromosome recombinase (*ccr*) และมียีน *mec* ที่เป็นยีนสำหรับการดื้อยาในรูปแบบ methicillin resistance อันเป็นกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม

$\beta$ -lactam (Katayama et al., 2000) ปัจจุบันมีการจัดจำแนกรูปแบบของ SCCmec ของ MRSA เป็น 12 ชนิด (I-XII) จากชนิดของ *ccr* complex และ *mec* complex ที่เป็นองค์ประกอบของ SCCmec (IWG-SCC, 2009) แต่ละรูปแบบมีการกระจายใน MRSA หลากหลายสายพันธุ์และมีความจำเพาะบางส่วน โดย LA-MRSA มักมี SCCmec IV, V และ IX ซึ่งแตกต่างจาก HA-MRSA ที่มักพบ SCCmec II และ III เป็นต้น (Li et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการรายงาน SCC ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมใน *Staphylococcus* spp. มากขึ้นเรื่อยๆ เช่น pseudo ( $\Psi$ ) SCCmec ที่ไม่มี *ccr* เป็นองค์ประกอบ และ SCCmec composite island (CI) ที่มี *ccr* เป็นองค์ประกอบสองชุดขึ้นไป เป็นต้น (Chanchaithong et al., 2016; Perreten et al., 2013) SCCmec IX เป็นชนิดที่พบได้ทั้งใน MRSA-ST9 และ MRSA-ST398 ที่แยกได้จากสุกรและผู้ปฏิบัติงานเกี่ยวกับสุกรในประเทศไทย (Li et al., 2011; Sinlapasorn et al., 2015) และพบวิวัฒนาการของ SCCmec IX ใน MRSA-ST9 ที่ติดเชื่อในผู้ป่วยนอกจากการแทรกเพิ่มของ Tn916 และ  $\Psi$ SCCmec ภายใน SCCmec (Lulitanond et al., 2013) จากหลักฐานเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการกระจายของชุดสารพันธุกรรมการดื้อยาของเชื้อ MRSA ใน LA-MRSA ในประเทศไทยและการเปลี่ยนจากวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย จึงจำเป็นที่ต้องศึกษาเพื่อตรวจติดตามและเฝ้าระวังต่อไป

MRSA มักมีคุณสมบัติดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistance) จากการคัดเลือกสายพันธุ์และสะสมยีนดื้อยา อันทำให้เกิดกลไกการดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในทางการแพทย์และสัตวแพทย์อย่างแพร่หลาย เช่น tetracyclines, macrolides, lincosamides, aminoglycosides, phenicols, sulfonamides และ dihydrofolate reductase inhibitors เป็นต้น LA-MRSA มักมีคุณสมบัติการดื้อยาบางกลุ่มที่ใช้หรือเคยใช้ทางปศุสัตว์ ได้แก่ tiamulin และ streptogramin เป็นต้น ทำให้สามารถพบยีนดื้อยาบางชนิดที่ไม่พบใน MRSA ที่มีแหล่งที่มาจากมนุษย์ และยีนเหล่านี้มักมีแหล่งที่มาจากแบคทีเรียที่พบในปศุสัตว์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันซึ่งทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรีย (Wendlandt et al., 2013a) ยีนดื้อยาที่พบ LA-MRSA มักทำให้เกิดกลไกการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดจากการดื้อข้าม (cross resistance) เช่น *vga* และ *lsa* ที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม lincosamide-pleuromutilin-streptogramin A ด้วยการสร้างโปรตีนขับยาออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ (efflux pump) (Kadlec and Schwarz, 2009; Wendlandt et al., 2013c) หรือ *cfr* ที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม phenicols, streptogramin A, lincosamides และ oxazolidinones ด้วยการเปลี่ยนแปลง 23S ribosomal RNA ที่ทำให้ยากกลุ่มออกฤทธิ์

ตำแหน่งนี้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่ได้ (Kehrenberg and Schwarz, 2006) การพัฒนาการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดของ LA-MRSA เกิดจากการสะสมสารพันธุกรรมที่เคลื่อนย้ายได้ที่บรรจุยีนดื้อยาโดยมีการคัดเลือกจากปัจจัยการใช้ยาต้านจุลชีพในทางปศุสัตว์ (Kadlec et al., 2012) ดังนั้นการทราบถึงคุณสมบัติการดื้อยา การตรวจติดตามการพัฒนาการดื้อยา และกลไกที่เกี่ยวข้องทำให้ทราบถึงสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เคลื่อนย้ายได้ที่ทำให้เกิดการส่งผ่านยีนดื้อยาในทางปศุสัตว์ที่อาจส่งผ่านมายังมนุษย์ได้

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความชุกและการกระจายของเชื้อ MRSA ในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรเขตภาคกลางของประเทศไทย
2. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MRSA ที่พบในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรในเขตภาคกลางของประเทศไทยด้วยคุณลักษณะทางพันธุกรรมและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

### วิธีทดลอง

#### 1. กลุ่มประชากรและการเก็บตัวอย่าง

กลุ่มประชากรประกอบด้วยสุกรที่เลี้ยงในฟาร์มและผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มสุกรในเขตภาคกลางของประเทศไทย การเก็บตัวอย่างสุกรทำการสุ่มเก็บจากสุกรตามช่วงอายุของการเลี้ยงที่มีในแต่ละฟาร์ม โดยแบ่งตามช่วงและแบบการเลี้ยง ได้แก่ แม่สุกร ลูกสุกรดูนม (ระยะตั้งแต่แรกคลอดถึงก่อนหย่านมที่อายุ 3 สัปดาห์) สุกรอนุบาล (หลังหย่านมตั้งแต่อายุ 3 สัปดาห์ถึง 8 สัปดาห์) และสุกรขุน (ตั้งแต่อายุ 8 สัปดาห์เป็นต้นไป) ฟาร์มสุกรแบ่งตามรูปแบบการผลิตและการจัดการการเลี้ยงประกอบด้วย

- (1) ฟาร์มแบบครบวงจร (farrow-to-finish หรือ FF) มีสุกรตั้งแต่แม่สุกร ลูกสุกรดูนม สุกรอนุบาล และสุกรขุน
- (2) ฟาร์มผลิตลูกสุกร (farrow-to-wean หรือ FW) มีแม่สุกรและลูกสุกรดูนม
- (3) ฟาร์มสุกรขุน (wean-to-finish หรือ WF) มีสุกรระยะอนุบาลจนถึงระยะขุนก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์

การเก็บตัวอย่างทำโดยใช้ก้านไม้พันสำลีไร้เชื้อเก็บตัวอย่างจากเยื่อหูช่องจมูกทั้งสองข้างของสุกร ในลูกสุกรระยะดูนมทำการเก็บตัวอย่างจากลูกสุกรจำนวน 3 ตัวต่อครอก และทำการเก็บตัวอย่างจากผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มสุกรที่ยินยอมเข้าร่วมในการวิจัยจากเยื่อหูช่องจมูกเช่นกัน ทำการเก็บตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อขนส่ง



(Stuart's transport medium) กระบวนการเก็บตัวอย่างในคนได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่ 198.1/59) และในสุกรผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่ 1631051)

## 2. การเพาะแยกและระบุเชื้อ *S. aureus*

ทำการบ่มตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth ที่มี NaCl 6.5% และ cefoxitin เข้มข้น 4 µg/mL ที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ 0.5 mL เพาะต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ phenol red mannitol salt broth ที่มี cefoxitin 3.5 mg/mL ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาเท่ากัน (Böcher et al., 2008) ก่อนนำไปเพาะลงบน tryptic soy agar ผสมเลือดแกะ หลังบ่มสังเกตการเจริญของโคโลนี *S. aureus* ที่มีการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วนำไปทดสอบด้วยการทดสอบแกรม การสร้าง catalase และการทำให้เกิดการแข็งตัวของพลาสมา ทำการสกัด DNA ด้วยชุดสำเร็จ Nucleospin<sup>®</sup> Tissue DNA Extraction kit (Machery-Nagel, Germany) ตามด้วยการยืนยันสปีชีส์ *S. aureus* ด้วย PCR ที่จำเพาะต่อยีน *nuc* (Sasaki et al., 2010) ทั้งนี้กระบวนการเพาะเชื้อแบคทีเรียและกระบวนการอื่นที่เกี่ยวข้องได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลความปลอดภัยทางชีวภาพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่อนุญาต IBC1631037)

## 3. การตรวจลักษณะ methicillin resistance

ทำการทดสอบหาคุณลักษณะการดื้อยาแบบ methicillin resistance ด้วยวิธี cefoxitin disk diffusion เชื้อที่ให้บริเวณยับยั้ง (clear inhibition zone) น้อยกว่า 22 mm แสดงลักษณะการเป็น methicillin resistance (EUCAST, 2018) และตรวจหายีน *mecA* ด้วย PCR (Strommenger et al., 2003)

## 4. การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพโดยการหาค่าความเข้มข้นยาต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration หรือ MIC) ต่อยาต้านจุลชีพ cefoxitin (FOX), penicillin

(PEN), tetracycline (TET), gentamicin (GEN), kanamycin (KAN), streptomycin (STR), erythromycin (ERY), clindamycin (CLI), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CHL), rifampicin (RIF), tiamulin (TIA), sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), mupirocin (MUP), fusidic acid (FUS), quinupristin/dalfopristin (SYN), linezolid (LZD) และ vancomycin (VAN) ด้วยวิธี broth microdilution ด้วยชุด EUST customized plate (Trek Diagnostic Systems Ltd, UK). การดื้อยา CLI แบบเหนี่ยวนำตรวจด้วยวิธีการหา D-zone การแปลผลความไวรับต่อยาต้านจุลชีพอาศัยค่าวิกฤติมาตรฐาน ตาม The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ([www.EUCAST.org](http://www.EUCAST.org))

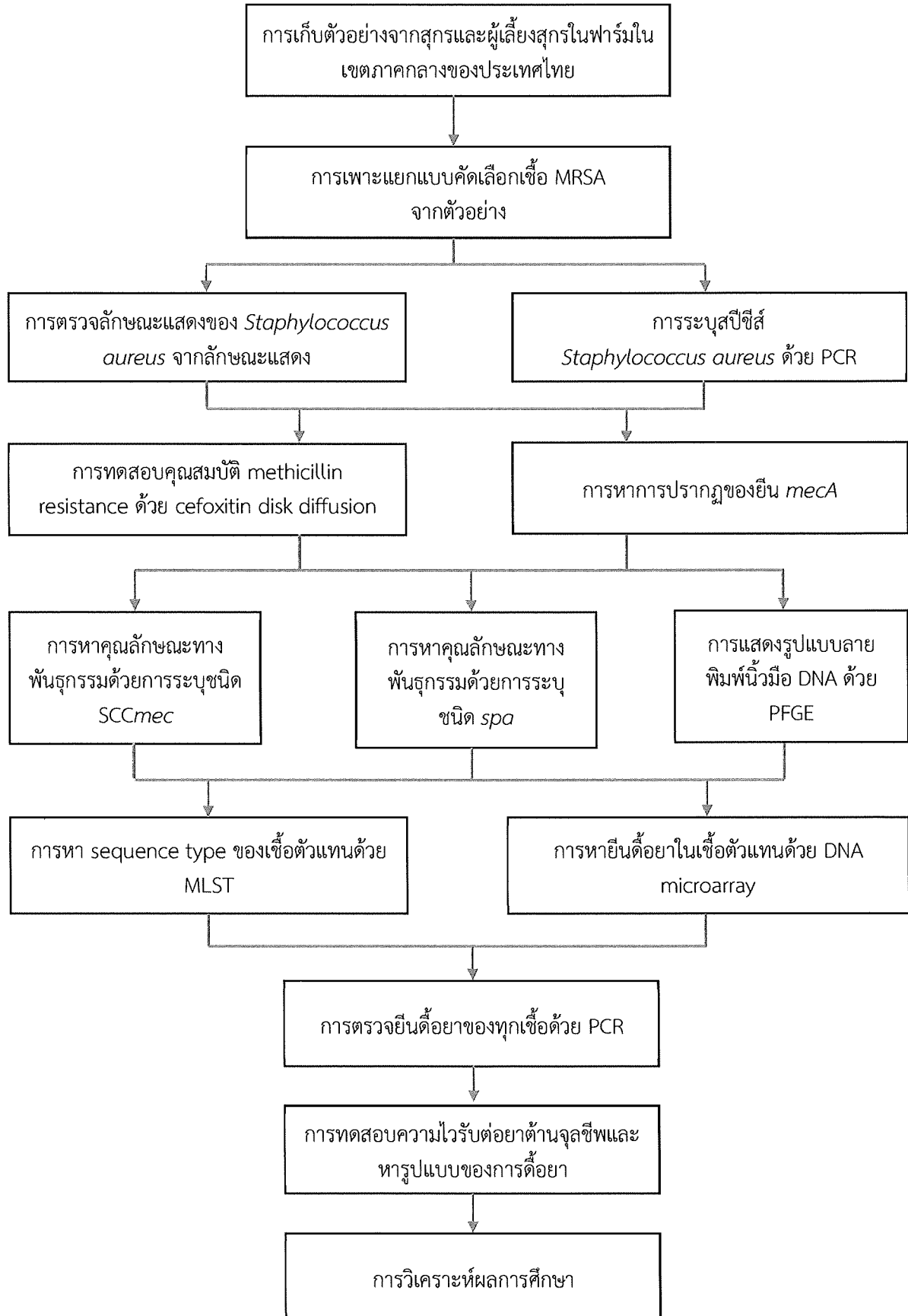
#### 5. การหาชนิดของ staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) และคุณลักษณะทางพันธุกรรม

ตรวจหาชนิดของ SCC*mec* ด้วยวิธี multiplex PCR เพื่อหาชนิดของ *mec* gene complex และ *ccr* gene complex อันเป็นองค์ประกอบ (Kondo et al., 2007) ทำการแสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ของเชื้อด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Cfr9I* (New England Biolab, UK) (Argudin et al., 2010) ในการตัดสารพันธุกรรมของโครโมโซมของ *S. aureus* แล้วแยกขนาดด้วย CHEF-DRILL PFGE (Bio-Rad, Hercules, CA) แล้วทำการจัดกลุ่มรูปแบบของชิ้นส่วน DNA ด้วยโปรแกรม Gene Directory (Syngene, UK) เป็น dendrogram อาศัย unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) เชื้อที่มีรูปแบบชิ้นส่วน DNA ที่เหมือนกันมากกว่า 80% ขึ้นไปจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน การระบุชนิด *spa* อาศัยการเพิ่มจำนวนของส่วน polymorphic X region ของยีน *spa* ด้วย PCR และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (<http://spaserver.ridom.de>) (Harmsen et al., 2003) เชื้อจากแหล่งที่มาต่างกันทั้งฟาร์มและโฮสต์และมีการแสดงคุณสมบัติทางพันธุกรรมข้างต้นจำเพาะเพียงเชื้อเดียวจะเป็นเชื้อตัวแทนที่ถูกนำไปหา ST ด้วย multilocus sequence typing (MLST) ด้วยการหาลำดับสารพันธุกรรมของ 7 ยีน ประกอบด้วย *arc*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* และ *yqiL* แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในเว็บไซต์ [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org) (Enright et al., 2000)

## 6. การหายีนดื้อยาต้านจุลชีพ

ทำการหายีนดื้อยาที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมบวกของเชื้อตัวแทนด้วย DNA microarray (version AMR+ve 5) (Alere Technologies GmbH, Germany) (Perreten et al., 2005) จากนั้นทำการหายีนดื้อยาที่ปรากฏจากผล DNA microarray ในทุกเชื้อด้วยวิธี PCR (ภาคผนวก)

แผนการดำเนินงาน



## ผลการทดลอง

### กลุ่มตัวอย่างในการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างประกอบด้วยสุกรจากฟาร์มในเขตภาคกลางของประเทศไทยและจังหวัดนครราชสีมา ด้านที่ติดเขตภาคกลางจำนวน 27 ฟาร์ม ประกอบด้วยจังหวัดนครปฐม 2 ฟาร์ม (NP1 และ NP2) กาญจนบุรี 2 ฟาร์ม (KB1 และ KB2) นครราชสีมา 4 ฟาร์ม (NR1-NR4) ปราจีนบุรี 8 ฟาร์ม (PB1-PB8) ราชบุรี 1 ฟาร์ม (RB1) และสุพรรณบุรี 10 ฟาร์ม (SB1-SB10) โดยเก็บตัวอย่างจากสุกรแต่ละระยะในแต่ละฟาร์มแสดงดังตารางที่ 1 และเก็บตัวอย่างจากผู้เลี้ยงสุกรจำนวน 38 คน จาก 16 ฟาร์ม (ตารางที่ 1) โดยฟาร์มแบ่งตามรูปแบบการเลี้ยง ประกอบด้วย ฟาร์มแบบครบวงจร (FF) จำนวน 2 ฟาร์ม ฟาร์มผลิตลูกสุกร (FW) จำนวน 12 ฟาร์ม และฟาร์มสุกรขุน (WF) จำนวน 13 ฟาร์ม

ตารางที่ 1 แสดงฟาร์ม รูปแบบ จังหวัด ระยะการเลี้ยง จำนวนสุกรและคนเลี้ยงที่ทำการเก็บตัวอย่าง ตัวอย่างที่พบ MRSA

ฟาร์ม	จังหวัด	รูปแบบฟาร์ม*	ระยะและชนิดสุกร	จำนวน (ตัวหรือครอก)#	จำนวนตัวอย่างที่พบ MRSA (ตัวหรือครอก)
NP1	นครปฐม	WF	สุกรอนุบาล	25	0
RB1	ราชบุรี	FF	ลูกสุกรอนุบาล	10	1 (10.00%)
			สุกรขุน	20	4 (20.00%)
			คนเลี้ยงสุกร	1	0
NR1	นครราชสีมา	FW	แม่สุกร	20	0
			ลูกสุกรดูนม	20	0
PB1	ปราจีนบุรี	FW	แม่สุกร	10	2 (20.0%)
			ลูกสุกรดูนม	9	1 (11.11%)
			คนเลี้ยงสุกร	4	0
PB2	ปราจีนบุรี	FW	แม่สุกร	10	0
			ลูกสุกรดูนม	10	0
			คนเลี้ยงสุกร	2	0
PB3	ปราจีนบุรี	FW	แม่สุกร	10	0
			ลูกสุกรดูนม	10	0
			คนเลี้ยงสุกร	2	0

ฟาร์ม	จังหวัด	รูปแบบฟาร์ม*	ระยะและชนิดสุกร	จำนวน (ตัวหรือครอก)#	จำนวนตัวอย่างที่พบ MRSA (ตัวหรือครอก)
NR2	นครราชสีมา	WF	สุกรอนุบาล	45	15 (33.33%)
			คนเลี้ยงสุกร	2	0
NR3	นครราชสีมา	WF	สุกรอนุบาล	16	10 (62.50%)
			คนเลี้ยงสุกร	4	0
NR4	นครราชสีมา	WF	สุกรขุน	15	0
			คนเลี้ยงสุกร	0	0
PB4	ปราจีนบุรี	WF	สุกรขุน	15	0
			คนเลี้ยงสุกร	4	1 (25.00%)
PB5	ปราจีนบุรี	WF	สุกรขุน	15	0
			คนเลี้ยงสุกร	0	0
NP2	นครปฐม	FF	ลูกสุกรดูดนม	21	3 (14.29%)
			สุกรอนุบาล	20	2 (10.00%)
			สุกรขุน	47	6 (12.77%)
			คนเลี้ยงสุกร	3	1
SB1	สุพรรณบุรี	FW	แม่สุกร	15	2 (13.33%)
			ลูกสุกรดูดนม	15	1 (6.66%)
			คนเลี้ยงสุกร	3	1
SB2	สุพรรณบุรี	FW	แม่สุกร	15	0
			ลูกสุกรดูดนม	15	0
			คนเลี้ยงสุกร	3	0
SB3	สุพรรณบุรี	FW	ลูกสุกรดูดนม	15	0
			คนเลี้ยงสุกร	1	0
SB4	สุพรรณบุรี	FW	ลูกสุกรดูดนม	15	0
			คนเลี้ยงสุกร	1	0
PB6	ปราจีนบุรี	WF	สุกรขุน	14	2 (14.28%)
PB7	ปราจีนบุรี	WF	สุกรอนุบาล	5	1 (20.00%)
			สุกรขุน	5	1 (20.00%)
PB8	ปราจีนบุรี	WF	สุกรอนุบาล	5	4 (80.00%)
KB1	กาญจนบุรี	FW	ลูกสุกรดูดนม	20	0
			คนเลี้ยงสุกร	1	0
KB2	กาญจนบุรี	FW	ลูกสุกรดูดนม	20	0
			คนเลี้ยงสุกร	2	0
SB5	สุพรรณบุรี	FW	ลูกสุกรดูดนม	20	0
			คนเลี้ยงสุกร	3	0

ฟาร์ม	จังหวัด	รูปแบบฟาร์ม*	ระยะและชนิดสุกร	จำนวน (ตัวหรือครอก)#	จำนวนตัวอย่างที่พบ MRSA (ตัวหรือครอก)
SB6	สุพรรณบุรี	FW	ลูกสุกรดูนม	20	0
			คนเลี้ยงสุกร	2	0
SB7	สุพรรณบุรี	WF	สุกรอนุบาล	15	4 (26.66%)
SB8	สุพรรณบุรี	WF	สุกรอนุบาล	15	0
SB9	สุพรรณบุรี	WF	สุกรขุน	15	0
SB10	สุพรรณบุรี	WF	สุกรขุน	15	0

\*WF, wean-to-finish; FW, farrow-to-wean; FF, farrow-to-finish

#ลูกสุกรดูนมทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 1-3 ตัวต่อครอก

### ความชุกและการกระจายของเชื้อ MRSA

พบความชุกของ MRSA เท่ากับร้อยละ 9.72 จากตัวอย่างจากสุกรทั้ง 607 ตัวอย่าง ใน 10 ฟาร์มจากทั้งหมด 27 ฟาร์ม คิดเป็นความชุกของฝูงเท่ากับร้อยละ 37.04 โดยฟาร์มที่มีสุกรที่เป็นพาหะของ MRSA พบในทุกจังหวัดประกอบด้วย นครปฐม (NP2<sup>FF</sup>) ราชบุรี (RB1<sup>FF</sup>) สุพรรณบุรี (SB1<sup>FW</sup> และ SB7<sup>WF</sup>) ปราจีนบุรี (PB1<sup>FW</sup>, PB6<sup>WF</sup>, PB7<sup>WF</sup> และ PB8<sup>WF</sup>) และนครราชสีมา (NR2<sup>FW</sup> และ NR3<sup>WF</sup>) และพบเชื้อ MRSA จากผู้เลี้ยงสุกรจำนวน 3 คนจาก 38 คน คิดเป็นร้อยละ 7.89 จากฟาร์ม NP2<sup>FF</sup> และ SB1<sup>FW</sup> ซึ่งพบ MRSA ในฝูงสุกรและ PB4<sup>WF</sup> ที่ไม่พบ MRSA จากสุกรในฟาร์ม เมื่อจำแนกฟาร์มตามรูปแบบการเลี้ยงพบว่าฟาร์มแบบครบวงจรทั้งสองฟาร์ม (NP2<sup>FF</sup> และ RB1<sup>FF</sup>) พบเชื้อ MRSA จากสุกรในฟาร์ม ส่วนฟาร์มผลิตลูกสุกรพบ MRSA จำนวน 2 จาก 12 ฟาร์ม (SP1<sup>FW</sup> และ PB1<sup>FW</sup>) และฟาร์มสุกรขุนพบ MRSA จำนวน 6 จาก 13 ฟาร์ม (PB6<sup>WF</sup>, PB7<sup>WF</sup>, PB8<sup>WF</sup>, SB7<sup>WF</sup>, NR2<sup>WF</sup> และ NR3<sup>WF</sup>) โดยฟาร์มผลิตลูกสุกรทั้งสองฟาร์มมีประวัติการส่งลูกสุกรหย่านมไปยังฟาร์มสุกรขุนที่พบเชื้อ MRSA การกระจายของเชื้อ MRSA ในสุกรแต่ละระยะและฟาร์ม และในผู้เลี้ยงสุกรแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราการพบเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ในสุกรตามระยะการเลี้ยง และผู้เลี้ยงสุกร

แหล่งที่มา	ช่วงอายุ	อัตราที่พบเชื้อใน ฟาร์ม	อัตราที่พบเชื้อใน สุกร/ผู้เลี้ยง	ฟาร์มที่พบเชื้อ	จำนวนเชื้อ ที่ได้
สุกร					
	แม่สุกร	2/6	4/80	SB1, PB1	4
	ลูกสุกรคูดนม*	3/13	5/210	SB1, PB1, NP2	5
	สุกรอนุบาล	7/9	37/156	NP2, RB1, SB7, PB7, PB8, NR2, NR3	38
	สุกรขุน	4/9	13/161	NR2, RB1, PB6, PB7	13
ผู้เลี้ยงสุกร		3/16	3/38	NP2, SB1, PB1	3

\*ทำการเก็บตัวอย่างจากลูกสุกร 3 ตัวต่อคอกเป็น 1 ตัวอย่าง

### คุณลักษณะทางพันธุกรรม

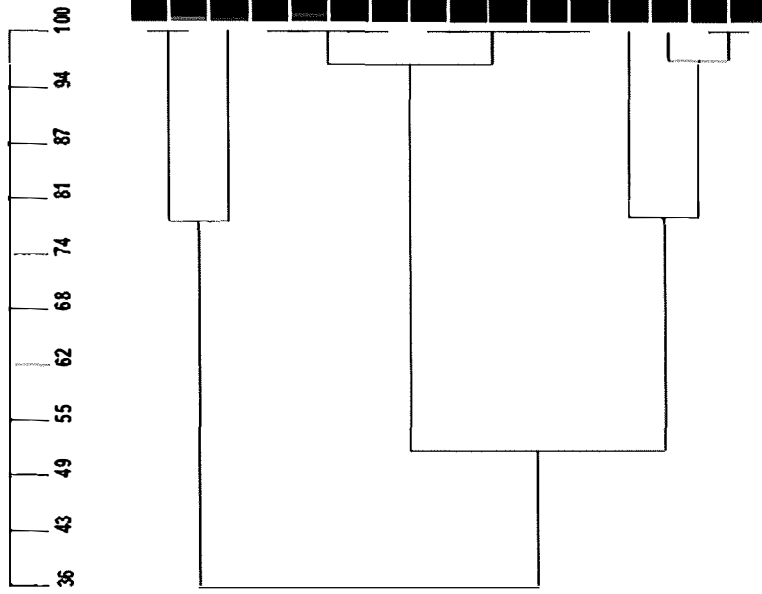
เชื้อ MRSA ทั้งหมด 63 เชื้อประกอบด้วยเชื้อที่เพาะแยกมาจากสุกรจำนวน 60 เชื้อและผู้เลี้ยงสุกรจำนวน 3 เชื้อ แสดงคุณลักษณะทางพันธุกรรมในตารางที่ 3 จากเชื้อทั้งหมดสามารถจำแนกชนิดของ *SCCmec* ได้ 3 ชนิด ประกอบด้วย *SCCmec V* (n=41) *SCCmec IX* (n=9) และ *SCCmec CI* ที่ประกอบด้วย *ccr complex* 2 ชนิด ได้แก่ *ccrA1B1* และ *ccrC* กับ class C *mec complex* (n=12) และ *SCCmec* ที่ไม่สามารถทราบชนิดได้เนื่องจากให้ผลลบในการจำแนกด้วย PCR (n=1)

ผลการระบุรูปแบบ *spa* พบเพียง 2 รูปแบบ ได้แก่ t034 (n=55) และ t337 (n=7) ส่วนอีก 1 เชื้อไม่พบ *spa* ในการเพิ่มสารพันธุกรรมส่วน polymorphic X region ของยีน *spa* ด้วย PCR

รูปที่ 1 แสดงการจัด dendrogram จากรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ของเชื้อ MRSA ที่แยกได้ แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (A, B, C, D และ E) โดยรูปแบบของเชื้อที่ *SCCmec* ชนิดเดียวกันและ *spa* รูปแบบเดียวกันจากฟาร์มเดียวกันนั้นแสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือ DNA ไม่แตกต่างกัน เชื้อตัวแทนที่แสดงคุณลักษณะทางพันธุกรรมจาก *SCCmec*, *spa* และลายพิมพ์นิ้วมือ DNA จากสุกรและผู้เลี้ยงจากฟาร์มต่างกันถูกนำไปหาสาย



พันธุ์ด้วย MLST (allelic profile เป็น *arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tpi-yqiL*) พบ 3 STs ประกอบด้วย ST398 (3-35-19-2-20-26-39), ST9 (3-3-1-1-1-1-10) และ ST4576 (3-3-625-1-1-1-10) โดย ST4576 เป็น ST ใหม่ที่เกิดจากการผ่าเหล่าที่ยีน *glpF* ของ ST9 เปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 335 จาก C เป็น T (C335T) ทำให้เกิดเป็น allele ใหม่ของยีน *glpF* (allelic number = 625) ทำให้เกิดเป็น ST ใหม่ ซึ่งเป็น single locus variant (SLV) ของ ST9 และอยู่ใน clonal complex (CC) 9 เชื้อ MRSA-ST9 และ MRSA-ST4576 มี *spa* แบบ t337 และ t034 ตามลำดับ ทั้ง 2 STs มี SCCmec IX เท่านั้น จัดอยู่ใน PFGE dendrogram กลุ่ม A และ B ส่วน MRSA-ST398 มี *spa* แบบ t034 เท่านั้น ยกเว้น 1 เชื้อที่ไม่มี *spa* ทั้งหมดจัดอยู่ใน PFGE dendrogram กลุ่ม C, D และ E ทั้งนี้ MRSA-ST398 มี SCCmec ทั้ง SCCmec V, SCCmec IX, SCCmec CI และ SCCmec ที่จำแนกชนิดไม่ได้



Farm	Origin	ST	PFGE cluster	SCCmec	spa	No. of isolate
PB6	Pig	9	A	IX	t337	2
PB8	Pig	4576	A	IX	t034	1
PB1	Pig	9	B	IX	t337	5
NR3	Pig	398	C	V	t034	10
SB1	Pig	398	C	V	t034	1
SB1	Human	398	C	V	t034	1
PB7	Pig	398	C	V	t034	1
PB7	Pig	398	C	IX	negative	1
PB8	Pig	398	C	V	t034	4
SB7	Pig	398	C	V	t034	4
PB1	Pig	398	C	V	t034	3
NR2	Pig	398	C	V	t034	15
PB4	Human	398	D	CI	t034	1
NP2	Pig	398	E	NT	t034	1
NP2	Pig	398	E	CI	t034	11
NP2	Human	398	E	CI	t034	1

รูปที่ 1 แสดง dendrogram จากลายพิมพ์นิวมีโอ DNA ด้วย pulsed-field gel electrophoresis ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากสุกรและผู้เลี้ยงสุกร จากฟาร์มในเขตภาคกลางของประเทศไทย

## ลักษณะแสดงการดื้อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยา

ลักษณะแสดงการดื้อยาของเชื้อ MRSA แสดงเป็นรูปแบบการดื้อยาในตารางที่ 2 เชื้อ MRSA ทุกเชื้อ (100%) แสดงการดื้อยา PEN, FOX, CLI, TET, STR, CIP, TMP และ TIA และไม่พบการดื้อยา VAN, RIF, FUS, MUP และการดื้อยา CLI แบบเหนี่ยวนำ การดื้อยาต้านจุลชีพอื่นพบในอัตราที่แตกต่างกัน ได้แก่ SYN ในจำนวน 61 จาก 63 เชื้อ (96.83%) ERY, GEN และ KAN ในจำนวน 21 จาก 63 เชื้อ (33.33%) CHL ในจำนวน 8 จาก 63 เชื้อ (12.70%) และ SMX ในจำนวน 5 จาก 63 เชื้อ (7.94%)

ผลการตรวจหายีนดื้อยาพบว่าทุกเชื้อ (100%) มียีน *mecA* และ *blaZ* ทำให้เกิดกลไกการดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam และ *dfpG* ที่ทำให้เกิดกลไกการดื้อ TMP ตามลำดับ พบยีนดื้อยา tetracycline 3 ชนิด ได้แก่ *tet(M)* ที่ทำให้เกิดกลไกการดื้อด้วย ribosomal protective protein ในทุกเชื้อ ชนิด *tet(K)* ในจำนวน 55 จาก 63 เชื้อ (87.30%) และ *tet(L)* ในจำนวน 5 จาก 63 เชื้อ (7.94%) โดยสองชนิดหลังเป็นการดื้อแบบการสร้างโปรตีนที่ผิวเซลล์ในการขับยาออก (tetracycline efflux protein) ทั้งนี้มีเพียง 3 เชื้อที่มีเพียง *tet(M)* อย่างเดียว เชื้อที่เหลือมียีน *tet* มากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ *tet(M)+tet(L)* ในจำนวน 5 จาก 63 เชื้อ (7.94%) และ *tet(M)+tet(K)* ในจำนวน 55 จาก 63 เชื้อ (87.30%) ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside เป็นยีนที่สร้างเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลยา (aminoglycoside modifying enzymes) ประกอบด้วย *aadD* เป็นยีนสร้าง aminoglycoside nucleotidyl transferase ทำให้เกิดการดื้อยา kanamycin พบใน MRSA จำนวน 60 จาก 63 เชื้อ (95.24%) ยีน *aadE* ทำให้เกิดการดื้อยา streptomycin พบในจำนวน 55 จาก 63 เชื้อ (87.30%) และยีน *aacA-aphD* ที่พบคู่กันสร้างเป็น aminoglycoside acetyltransferase และ phosphotransferase ตามลำดับ ทำให้เกิดการดื้อยา gentamicin และ kanamycin ตามลำดับ พบในจำนวน 21 จาก 63 เชื้อ (33.33%) ยีน *erm* ที่ทำให้เกิดกลไกการดื้อแบบ erythromycin resistance methylase ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม macrolide-lincosamide-streptogramin B 3 ชนิด พบในเชื้อ MRSA ได้แก่ *erm(B)* เดี่ยวในจำนวน 5 จาก 63 เชื้อ (7.94%) และ *erm(C)* เดี่ยวในจำนวน 34 จาก 63 เชื้อ (53.97%) และทั้ง *erm(B)+erm(C)* จำนวน 8 จาก 63 เชื้อ (12.70%) และ *erm(A)+erm(B)* จำนวน 13 จาก 63 เชื้อ เชื้อ MRSA จำนวน 55 เชื้อ (87.30%) มียีน *lnu(B)* (lincosamide nucleotidyl transferase), *spw* (spectinomycin adenyltransferase) และ *lsa(E)* (ABC transporter) ยีน *spc*, *vga(A)* และ *cfr* พบในเชื้อจำนวน 21 (33.33%) , 8 (12.70%) และ 5

(7.94%) จากทั้งหมด 63 เชื้อตามลำดับ และยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม phenicols 2 ชนิด ได้แก่ *fexA* ในจำนวน 5 จาก 63 เชื้อ (7.94%) และ *cat<sub>pc221</sub>* ในจำนวน 3 จาก 63 เชื้อ (4.76%)

### ความสัมพันธ์ของกลุ่มสายพันธุ์ MRSA จากแหล่งต่างๆ

ตารางที่ 3 แสดงคุณลักษณะทางพันธุกรรมและการดื้อยาของเชื้อ MRSA ที่แสดงถึงความสัมพันธ์กับแหล่งที่มา MRSA-ST398 พบได้ในฟาร์มสุกรจำนวน 9 ฟาร์ม เมื่อจำแนกด้วยคุณลักษณะทางพันธุกรรม ST398-V-t034-C (ST-SCC*mec-spa*-PFGE pattern) เป็นสายพันธุ์หลักที่พบมากที่สุด แยกได้จากสุกรใน 7 ฟาร์ม ได้แก่ PB1<sup>FW</sup>, PB7<sup>WF</sup>, PB8<sup>WF</sup>, NR2<sup>WF</sup>, NR3<sup>WF</sup>, SB1<sup>FW</sup> และ SB7<sup>WF</sup> โดยเชื้อจากฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรี (SB1<sup>FW</sup> และ SB7<sup>WF</sup>) มีความแตกต่างด้วยการมียีน *erm(A)* และ *spc* เพิ่มเติม ซึ่งไม่พบในเชื้อที่ได้จากฟาร์มในจังหวัดปราจีนบุรีและนครราชสีมา โดยฟาร์มผลิตลูกสุกร PB1<sup>FW</sup> และ SB1<sup>FW</sup> มีการส่งลูกสุกรไปยังฟาร์มสุกรขุน PB7<sup>WF</sup>, PB8<sup>WF</sup>, NR2<sup>WF</sup> และ NR3<sup>WF</sup> และ SB7<sup>WF</sup> ตามลำดับ (รูปที่ 2) ดังนั้นฟาร์มเหล่านี้อาจมีการส่งผ่านเชื้อ MRSA ได้จากหลักฐานคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยาที่เหมือนกัน รวมถึงเชื้อสายพันธุ์นี้ในฟาร์ม PB1<sup>FW</sup> และ SB1<sup>FW</sup> ที่แสดงรูปแบบลายพิมพ์นิ้วมือ DNA และรูปแบบมียีนดื้อยาเหมือนกันในคูแม่สุกรและลูกสุกรดูดนมแสดงถึงหลักฐานการส่งผ่านเชื้อจากแม่สุกรมายังลูกสุกรระยะดูดนม นอกจากนี้ยังพบ MRSA-ST398 ที่ไม่มียีน *spa* (MRSA-ST398-IX-negative-C) จากสุกรในฟาร์ม SB7<sup>WF</sup> ด้วย ส่วน MRSA-ST398-CI-t034-E พบได้ในฟาร์ม NP2<sup>FF</sup> เท่านั้นเช่นเดียวกับ ST398 ที่ไม่สามารถจำแนกชนิด SCC*mec* ได้ (MRSA-ST398-NT-t034-E) และพบ MRSA-ST398-CI-t034-D ที่สามารถแยกได้จากผู้เลี้ยงสุกรในฟาร์ม PB4<sup>WF</sup> เท่านั้น แต่ไม่พบในสุกร เชื้อที่แยกได้จากผู้เลี้ยงสุกร MRSA-ST398-V-t034-C และ MRSA-ST398-CI-t034-E มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยาเหมือนกับเชื้อที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มเดียวกันคือ SB1<sup>FW</sup> และ NP2<sup>FF</sup> ตามลำดับ

ส่วน MRSA CC9 แยกได้จากสุกรเท่านั้นใน 3 ฟาร์ม ได้แก่ RB1<sup>FF</sup>, PB6<sup>WF</sup> และ PB8<sup>WF</sup> โดย MRSA-ST9-IX-t337-A จากฟาร์ม RB1<sup>FF</sup> มียีนดื้อยา *erm(B)*, *fexA* และ *cfr* ประกอบกับการดื้อยา linezolid ซึ่งไม่พบใน MRSA-ST9-IX-t337-A จากฟาร์ม PB6<sup>WF</sup> ส่วน MRSA-ST4576-IX-t034-A พบเพียงเชื้อเดียวในฟาร์ม PB8<sup>WF</sup> เท่านั้นและแสดงรูปแบบการดื้อยาเช่นเดียวกับ MRSA-ST9-IX-t337-A จากฟาร์ม PB6<sup>WF</sup>

**ตารางที่ 3** แสดงคุณลักษณะทางพันธุกรรม การดื้อยาและยีนดื้อยาในเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากสุกรและผู้เลี้ยงสุกรจากฟาร์มในเขตภาคกลางของประเทศไทย

คุณลักษณะทางพันธุกรรม			รูปแบบยีนดื้อยา <sup>a</sup>						
Sequence type*	SCCmec <sup>b</sup>	spa	PFGE	จังหวัด <sup>b</sup>	จำนวนเชื้อ	ฟาร์ม (จำนวน)	แหล่งที่มา (จำนวน)	คุณลักษณะแสดง/รูปแบบการดื้อยา <sup>c</sup>	รูปแบบยีนดื้อยา <sup>a</sup>
9	IX	t337	A	RB	5	RB1 (5)	สุกร (5)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CHL-LZD-SMX-CIP	<i>blaZ-mecA-tet(L)-tet(M)-aadD-aacA-aphD-dffG-erm(B)-vgd(A)-cfi-fexA-str</i>
9	IX	t337	A	PB	2	PB6 (2)	สุกร (2)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-TRI-CLI-TIA-CHL-CIP <sup>d</sup>	<i>blaZ-mecA-tet(M)-aacA-aphD-dffG-vgd(A)-cat<sub>pcz21</sub>-str</i>
4576	IX	t034	A	PB	1	PB8 (1)	สุกร (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-TRI-CLI-TIA-SYN-CHL-CIP	<i>blaZ-mecA-tet(M)-aacA-aphD-dffG-vgd(A)-cat<sub>pcz21</sub>-str</i>
398	IX	Neg.	C	PB	1	PB7 (1)	สุกร (1)	PEN-FOX-TET-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA-blaZ-tet(M)-tet(K)-aacD-aadE-dffG-erm(C)-lnu(B)-isa(E)-spw</i>
398	V	t034	C	NR, PB	33	NR2 (15), NR3 (10), PB1 (3), PB7 (1), PB8 (4)	สุกร (33)	PEN-FOX-TET-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA-blaZ-tet(M)-tet(K)-aacD-aadE-dffG-erm(C)-lnu(B)-isa(E)-spw</i>
398	V	t034	C	SB	8	SB1 (4), SB7 (4)	สุกร (7), ผู้เลี้ยง (1)	PEN-FOX-TET-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA-blaZ-tet(M)-tet(K)-aadD-aadE-dffG-erm(C)-lnu(B)-isa(E)-spw-spc</i>
398	CI	t034	E	NP	11	NP2 (11)	สุกร (10), ผู้เลี้ยง (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA-blaZ-tet(M)-tet(K)-aacD-aadE-aacA-aphD-dffG-erm(A)-erm(B)-lnu(B)-isa(E)-spc-spw</i>
398	NT	t034	E	NP	1	NP2 (1)	สุกร (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA-blaZ-tet(M)-tet(K)-aacD-aadE-aacA-aphD-dffG-erm(A)-erm(B)-lnu(B)-isa(E)-spc-spw</i>
398	CI	t034	D	NP	1	PB4 (1)	ผู้เลี้ยง (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA-blaZ-tet(M)-tet(K)-aadD-aadE-aacA-aphD-dffG-erm(A)-erm(B)-lnu(B)-isa(E)-spc-spw</i>

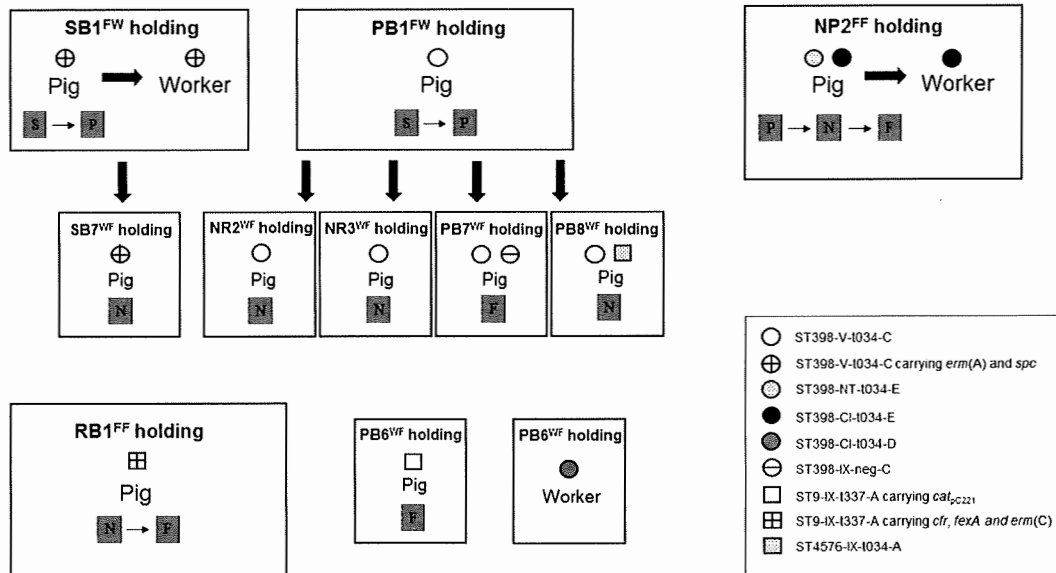
<sup>a</sup> SCCmec จำนวนรูปแบบโดย multiplex PCR. CI คือ SCCmec composite island ที่ประกอบด้วย *ccrA1B1*, *ccrC* และ class C mec complex และ NT เป็น SCCmec ที่ไม่สามารถจำแนกรูปแบบได้

<sup>b</sup> สัญลักษณ์ย่อของแต่ละจังหวัดเป็นดังนี้ NP นครปฐม NR นครราชสีมา PB ปราจีนบุรี RB ราชบุรี และ SB สุพรรณบุรี

<sup>c</sup> รูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพจากการทดสอบความไวรับด้วย broth microdilution มียาด้านจุลชีพตามอักขรยอดังนี้ PEN, penicillin; FOX, cefoxitin; TET, tetracycline; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TIA, tiamulin; SYN, synergid หรือ dalfoprintin/quinuprintin; CIP, ciprofloxacin

<sup>d</sup> ยีนดื้อยาด้านจุลชีพชื่อและกลไกการดื้อยา ได้แก่ *mecA*, penicillin-binding protein; *blaZ*,  $\beta$ -lactamase; *tet(K)* และ *tet(L)*, tetracycline efflux protein; *blaZ*, ribosomal protective protein; *aadE* และ *aadD*, aminoglycoside nucleotidyl transferase; *aacA*, aminoglycoside acetyltransferase; *aphD*, aminoglycoside phosphotransferase; *erm(A)*, *erm(B)* และ *erm(C)*, erythromycin resistance methylase; *dffG*, dihydrofolate reductase; *lnu(B)*, incosamide nucleotidyltransferase; *vgd(A)* และ *isa(E)*, ATP-binding cassette (ABC) transporter; *fexA*, florfenicol exporter; *cfi*, ribosomal RNA methyltransferase; *spc* และ *spw*, spectinomycin adenylyltransferase; *cat<sub>pcz21</sub>*, chloramphenicol acetyltransferase; *str*, streptomycin adenylyltransferase

<sup>e</sup> ชื่อแสดงความไวรับแบบกึ่งดื้อ (intermediate resistance) ต่อ dalfoprintin/quinupristin



รูปที่ 2 แสดงการกระจายของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมรูปแบบต่างๆในฟาร์มสุกรที่พบเชื้อและความเป็นไปได้ในการส่งผ่านเชื้อจากการพบเชื้อที่มีคุณลักษณะเหมือนกัน [ฟาร์มในจังหวัด PB, ปราจีนบุรี; SB, สุพรรณบุรี; RB, ราชบุรี; NR, นครราชสีมา; NP, นครปฐม รูปแบบของฟาร์ม FF, farrow-to-finish; FW, farrow-to-wean; WF, wean-to-finish ชนิดสุกรในกล่องสี่เหลี่ยมสีเทา S, sow; P, suckling piglet; N, nursery pig; F, fattening pig]

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอสำหรับงานวิจัยในอนาคต

---

การทดลองนี้แสดงการกระจายของเชื้อ MRSA ในสุกรที่เลี้ยงในเขตภาคกลางของประเทศไทยใน ความชุกเท่ากับ 9.72% และความชุกสูง 37.03% การศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทยพบความชุกสูงอยู่ในช่วง ระหว่าง 9.61-25.00% และความชุกในสุกรอยู่ในช่วงระหว่าง 0.62-10.00% (Anukool et al.; Larsen et al., 2012; Patchanee et al., 2014; Sinlapasorn et al., 2015) การศึกษาจากฟาร์มสุกรในเขตภาคกลาง ที่จังหวัดสมุทรสงครามเพียงฟาร์มเดียวพบว่ามีความชุกของเชื้อ MRSA เท่ากับ 40% จาก 15 ตัวอย่างในสุกร (Vestergaard et al., 2012) สุกรจัดเป็นแหล่งรังโรคหนึ่งของเชื้อ LA-MRSA ซึ่งมีการรายงานการกระจายทั้ง ในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ และเอเชีย (Chuang and Huang, 2015; Graveland et al., 2011) จากรายงาน หนึ่งพบความชุกสูงสุดถึง 99% ในลูกสุกรในประเทศโปรตุเกส (Conceição et al., 2017) ความแตกต่างของ ความชุกของเชื้อ MRSA ที่พบจากหลายการศึกษานั้นขึ้นกับหลายปัจจัยทั้งกลุ่มประชากร ขั้นตอนในการเพาะ แยกเชื้อ และการกระจายตัวในแต่ละตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ หลักฐานหนึ่งแสดงให้เห็นว่าสุกรช่วงอายุ 9-12 เดือน 100% เป็นพาหะของเชื้อ MRSA ในขณะที่สุกรอายุมากกว่าพบเชื้อเพียง 36% (Smith et al., 2009) อัตราการพบเชื้อในสุกรช่วงอายุน้อยกว่า 12 สัปดาห์นั้นสูงกว่าในช่วงอายุอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ (Fang et al., 2014; Smith et al., 2009) เช่นเดียวกับผลการศึกษานี้ที่พบเชื้อสูงในสุกรอนุบาล แสดงให้เห็นว่าสุกรในช่วง ต้นของการเลี้ยงนั้นจัดเป็นช่วงที่มีความไวรับทำให้พบได้ในอัตราที่สูง ทั้งนี้สามารถเกิดได้จากการส่งผ่านเชื้อใน ฝูงจากการรวมฝูงลูกสุกรและการได้รับยาต้านจุลชีพผสมในอาหารเพื่อป้องกันโรคอันเป็นปัจจัยที่ช่วยในการ คัดเลือกให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อดื้อยาขึ้นในร่างกายสัตว์ (Broens et al., 2012) ส่วนความชุกของ MRSA ที่พบในผู้เลี้ยงสุกรที่ 7.89% จัดว่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบความชุก ในช่วง 20-80% (Conceição et al., 2017; Khanna et al., 2008; Oppliger et al., 2012; Smith et al., 2009) ทั้งนี้ฟาร์มที่มีขนาดใหญ่และบริเวณที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นจัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการ ส่งผ่านเชื้อ MRSA จากสุกรมายังมนุษย์ (Battisti et al., 2010; Fang et al., 2014) โดยสามารถส่งผ่านได้ทั้ง จากการสัมผัสโดยตรง การกระจายเชื้อหมุนเวียนในฟาร์มผ่านทางอากาศและการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Broens et al., 2012; Broens et al., 2011; Friese et al., 2012) ถึงแม้ว่ามีการพบเชื้อ MRSA ในสุกรขุน

ในอัตราที่ต่ำกว่า แต่ก็อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อในกระบวนการฆ่าและผลิตรัดเนื้อสุกรได้ (Vestergaard et al., 2012) ดังนั้นการตรวจติดตามเชื้อในผลิตภัณฑ์จากสุกรจึงมีความจำเป็นในการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบความเป็นไปได้ของการส่งผ่านเชื้อผ่านทางอาหาร จากการพบเชื้อ MRSA ในผู้เลี้ยงสุกร จึงควรสนับสนุนให้เกิดการปฏิบัติตามหลักสุขศาสตร์อย่างเคร่งครัดและการป้องกันตนเองในการปฏิบัติงานเพื่อลดความเสี่ยงการได้รับเชื้อจากการปฏิบัติงาน ร่วมกับการตรวจติดตาม การจัดการฟาร์มและการควบคุมและกำจัดเชื้ออย่างเหมาะสม

เชื้อ MRSA ที่พบในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรในเขตภาคกลางของประเทศไทยจัดอยู่ใน CC398 และ CC9 ซึ่งถือว่าเป็นกลุ่มสายพันธุ์หลักของ LA-MRSA ที่มีการกระจายในหลายภูมิภาคของโลกและทวีปเอเชีย ตามลำดับ การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่พบเชื้อ MRSA-ST398 ที่มีแหล่งที่มาจากสุกรในประเทศไทยและพบการกระจายของเชื้อสายพันธุ์นี้ในฟาร์มสุกรเขตภาคกลางของประเทศไทย ในขณะที่รายงานก่อนหน้าจากเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ MRSA-ST9 เท่านั้น (Larsen et al., 2012; Sinlapasorn et al., 2015) ทั้งนี้ MRSA-ST398 เป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่กระจายอยู่หลายภูมิภาคทั่วโลกและจัดว่าเป็นสายพันธุ์หลักของเชื้อที่พบในทวีปยุโรป ทวีปอเมริกาเหนือและบางประเทศในทวีปเอเชีย ได้แก่ เกาหลีใต้ และสิงคโปร์ เท่านั้น (Lim et al., 2012; Sergio et al., 2007) จากการจัดจำแนกชนิด *spa* พบเพียงชนิดเดียวคือ t034 ในเชื้อ MRSA-ST398 จากการศึกษาเป็นชนิดเดียวกับที่พบในเกาหลีใต้และสิงคโปร์แสดงว่าเชื้อ MRSA-ST398-t034 ที่พบในประเทศไทยและประเทศในเอเชียข้างต้นนี้มีสายพันธุ์ต้นกำเนิดเดียวกันและกระจายอยู่ในทวีปเอเชีย นอกจากนี้ถึงแม้ว่า *spa* ชนิด t034 จะเป็นชนิดหลักที่พบใน MRSA-ST398 ที่ทวีปยุโรป เช่นเดียวกัน แต่ก็มักพบชนิดอื่น ๆ รวมด้วย ได้แก่ t011, t108 และ t889 (Battisti et al., 2010; Conceição et al., 2017; Kadlec et al., 2009; Mroczkowska et al., 2017; van Duijkeren et al., 2008) อีกทั้งผลการศึกษานี้พบเชื้อ MRSA-ST9-t337 ในฟาร์มสุกรเขตภาคกลางเช่นเดียวกับที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Patchanee et al., 2014; Sinlapasorn et al., 2015) แต่พบในจำนวนที่น้อยกว่าโดยทั่วไปแล้ว MRSA-ST9 เป็นสายพันธุ์ที่มีการกระจายในสุกรในประเทศแถบทวีปเอเชียเป็นส่วนมาก แต่ในแต่ละประเทศก็มีรูปแบบ *spa* ที่แตกต่างกัน ได้แก่ จีนและฮ่องกง (t899) ไต้หวัน (t337 และ t1430) และมาเลเซีย (t4358) (Fang et al., 2014; Guardabassi et al., 2009; Neela et al., 2009; Wagenaar et al., 2009) ส่วน ST9 ที่พบในสุกรในทวีปยุโรปมักเป็น methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) เป็นส่วนใหญ่ (Kehrenberg et al., 2009; Mroczkowska et al., 2017) แต่ก็มีรายงานการพบ MRSA-ST9-



t4794 ในสุกรขุนที่ประเทศอิตาลีเป็นครั้งแรก (Battisti et al., 2010) โดยรวมจากผลการศึกษาด้วยคุณลักษณะทางพันธุกรรมพบเชื้อ MRSA 2 กลุ่มสายพันธุ์ ได้แก่ CC398 และ CC9 ที่มี *spa* ในรูปแบบที่ค่อนข้างมีความจำเพาะคือ t034 และ t337 ตามลำดับ ซึ่งเป็นสองสายพันธุ์หลักที่มีการกระจายตัวอยู่ในฝูงสุกรในฟาร์มในเขตภาคกลางของประเทศไทย

MRSA ในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรนี้มี SCCmec จำนวน 3 รูปแบบที่สามารถจำแนกได้ ได้แก่ SCCmec V, SCCmec IX และ SCCmec CI โดยสามารถพบ SCCmec V และ SCCmec CI ใน MRSA-ST398-t034 ทั้งนี้ SCCmec V ประกอบด้วย class C *mec* complex และ type 5 *ccr* complex ซึ่งพบได้ใน MRSA-ST398 ที่มีการระบาดอยู่ทั่วโลก และพบใน MRSA-ST398 ที่แยกได้ในสุนัขและสัตว์แพทย์ในประเทศไทย และ *Staphylococcus* สปีชีส์อื่นๆ (Chanchaithong et al., 2014) แสดงว่าเป็น SCCmec รูปแบบที่แพร่หลายอยู่ใน staphylococci ที่มีแหล่งที่มาจากสัตว์ในประเทศ และพบได้ทั้งจากเชื้อที่แยกได้จากสุกรและผู้เลี้ยงสุกรจากการศึกษานี้ด้วย ส่วน SCCmec CI พบใน MRSA-ST398 ประกอบด้วย class C *mec* complex และ *ccr* complex 2 ชุด (type 1 และ type 5 *ccr* complex) รูปแบบ SCCmec CI นี้แสดงความเป็นไปได้ของการเป็น SCCmec ลูกผสม (hybrid) ระหว่าง SCCmec V และ SCCmec IX ที่พบทั้งสองชนิดได้ในประเทศ SCCmec IX ถูกรายงานครั้งแรกพบใน MRSA-ST398 ที่แยกได้จากสัตว์แพทย์ชาวไทยที่ปฏิบัติงานด้านสุกรและมีการรายงานตามมาอย่างแพร่หลายใน MRSA-ST9 ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยและผู้ปฏิบัติงานเกี่ยวกับสุกร (Larsen et al., 2012; Sinlapasorn et al., 2015) ดังนั้นอาจมีความเป็นไปได้ว่า SCCmec V, IX และ CI ที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกันนี้มีวิวัฒนาการร่วมกันอยู่ในเชื้อ MRSA-ST398 และ MRSA-ST9 ที่มีอยู่ในประเทศไทย แต่จากการรายงานที่ผ่านมา SCCmec<sub>AI16</sub> ซึ่งเป็น composite island ที่พบใน *S. pseudintermedius* ในประเทศไทยมีชนิดของ *ccr* complex จากการทำการหารูปแบบด้วย PCR ให้ผลแตกต่างไปจากผลที่ได้จากการหาลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมด เนื่องจากการ PCR ใช้ primer สำหรับเพิ่มจำนวน *ccr* จับที่ตำแหน่ง *ccrB* อย่างไม่จำเพาะ (Chanchaithong et al., 2016) ดังนั้นการหาองค์ประกอบและกระบวนการเกิด SCCmec CI และ SCCmec ที่ไม่สามารถจำแนกรูปแบบได้ด้วย PCR จึงจำเป็นต้องอาศัยการหาลำดับพันธุกรรมทั้งหมด (complete sequence) ในการอธิบายในลำดับต่อไป MRSA-ST9-t337 จากสุกรในเขตภาคกลางมี SCCmec IX เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า อีกทั้งยังพบใน ST ใหม่ คือ MRSA-ST4576 ที่มี *spa* รูปแบบ t034 ซึ่งพบมากใน CC398 ด้วยเป็นครั้งแรก ทั้งนี้การพบรูปแบบ *spa* ของเชื้อต่างกลุ่มสายพันธุ์นั้นมีความเป็นไปได้จากหลักฐานการพบ t889 ที่พบใน MRSA-ST398 เป็น

ส่วนมากในทวีปยุโรป มาพบใน ST9 ที่มี SCCmec IV และ SCCmec V ในทวีปเอเชียได้เช่นกัน (Fang et al., 2014; Guardabassi et al., 2009) ด้วยหลักฐานการพบ SCCmec IX และ t034 ที่มีอยู่ทั้งใน MRSA-ST9 และ MRSA-ST398 อาจสนับสนุนได้ว่ามีกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนสารพันธุกรรมขนาดใหญ่ของเชื้อบริเวณยีน *spa* และ SCCmec ระหว่างเชื้อสองสายพันธุ์เช่นเดียวกับกระบวนการเกิดขึ้นส่วนสารพันธุกรรมลูกผสมของ MRSA-ST239 ที่ประกอบด้วยสารพันธุกรรมเหมือนของ MRSA-ST8 และ MRSA-ST30 (Price et al., 2012; Robinson and Enright, 2004) นอกจากนี้ MRSA-ST9 ในประเทศไทยมี *spa* รูปแบบจำเพาะคือ t337 และ SCCmec ที่จำเพาะส่วนมากคือ SCCmec IX แสดงให้เห็นว่า MRSA-ST9-IX-t337 อาจได้รับ SCCmec IX จากการกระจายในฝูงสุกรในประเทศและเป็นสายพันธุ์จำเพาะในสุกรในประเทศไทย การค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึง MRSA ที่พบในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและกลุ่มประชากรของเชื้อทั้งในแง่ของสายพันธุ์จาก ST รูปแบบ SCCmec หลากหลายชนิดและรูปแบบ *spa* ซึ่งบ่งชี้ถึงวิวัฒนาการของเชื้อ MRSA ที่กระจายอยู่ในฝูงสุกรภายในประเทศ

เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดแสดงลักษณะการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดและมียีนดื้อยาหลากหลายซึ่งเป็นยีนดื้อยาที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมบวกและสกุล *Staphylococcus* ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ทั้งในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ การดื้อยาต้านจุลชีพบางกลุ่มเกิดจากการที่ MRSA เหล่านี้มียีนดื้อยาที่ทำให้เกิดมากกว่า 1 กลไกดื้อยา เช่น การดื้อต่อ tetracycline, erythromycin และ clindamycin แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีการได้รับและสะสมยีนดื้อยาหลากหลายมากมาย เชื้อ MRSA ที่แยกได้จากการศึกษานี้มียีน *tet* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม tetracycline มากกว่า 1 ชนิด ดังเช่นที่พบได้ใน LA-MRSA ทั่วไป ประกอบด้วย *tet(M)* ที่มักมีตำแหน่งบน transposon และ *tet(K)* กับ *tet(O)* ที่มักมีตำแหน่งบน plasmid เช่นเดียวกันกับยีน *erm* ที่มีมากกว่า 1 ชนิดเช่นกัน ได้แก่ *erm(A)*, *erm(B)* และ *erm(C)* ที่มีการกระจายทั่วไปในเชื้อ LA-MRSA (Wendlandt et al., 2013a) ยีนสร้างเป็น dihydrofolate reductase *dfpG* เป็นชนิดที่พบในเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากสุกรทั้ง MRSA-ST9 และ MRSA-ST398 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า MRSA-ST398 ที่แยกได้จากสุนัขและสัตวแพทย์ในประเทศไทยมี *dfpA* (Chanchaithong et al., 2014) ความแตกต่างของยีนนี้อาจบ่งชี้ได้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้จากแหล่งแตกต่างกันได้มีการรับสารพันธุกรรมที่มียีนดื้อยาแตกต่างกัน แล้วมีการกระจายตัวในสัตว์ต่างชนิดกันและบุคลากรที่เกี่ยวข้องที่แตกต่างกัน รูปแบบของการดื้อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาที่มีของเชื่อนั้นมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์คุณลักษณะทางพันธุกรรมและแหล่งที่มาของเชื้อ ยีน *aacA-aphD* พบใน MRSA-ST9, MRSA-ST4576 และ

MRSA-ST398 ที่มี SCCmec CI เท่านั้น แต่ไม่พบใน MRSA-ST398 ที่มี SCCmec V อีกทั้งเชื้อใน CC9 เท่านั้นที่แสดงการดื้อต่อยา CHL แล้วเมื่อจำแนกตามแหล่งที่จากฟาร์มที่แตกต่างกัน พบว่า MRSA-ST9 จากฟาร์ม RB1<sup>FF</sup> มียีนดื้อยา CHL ได้แก่ *cfr* และ *fexA* ซึ่งมีรายงานตำแหน่งอยู่บนสารพันธุกรรมชุดเดียวกันคือ Tn558 (Kehrenberg and Schwarz, 2006) แต่ MRSA-ST9 จากฟาร์มอื่นและ MRSA-ST4576 นั้นมียีน *cat*<sub>pC221</sub> ที่มีตำแหน่งอยู่บน plasmid การศึกษานี้เป็นรายงานแรกพบการปรากฏของยีน *cfr* ซึ่งเป็นยีนดื้อยาที่มีความสำคัญและได้รับความตระหนักจากทั่วโลกในเชิงสาธารณสุข เพราะสามารถทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ที่ตำแหน่ง 23S ribosomal RNA มากกว่า 1 กลุ่ม ได้แก่ lincosamides, phenicols, pleuromutilins, streptogramin A และ oxazolidinones โดยทำให้เกิดการดื้อยา dalbapristin และ linezolid ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม streptogramin A และ oxazolidinone ตามลำดับ ทั้งสองยานี้จัดเป็นยากลุ่มท้ายที่สงวนใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดซึ่งรวมถึง MRSA ด้วย ในทางการแพทย์ อีกทั้ง MRSA-ST9 และ MRSA-ST398 มียีน *vga(A)* และ *lsa(E)* ตามลำดับที่ทำให้เกิดการดื้อยา lincosamide-streptogramin A-pleuromutilin ด้วยการขับยาออก โดย *lsa(E)* มักมีตำแหน่งอยู่ร่วมกับ *lnu(B)* ซึ่งพบครั้งแรกบน plasmid pV7037 ที่มียีน *aadE*, *aacA-aphD* และ *erm(B)* อยู่ด้วยในเชื้อ MRSA-ST9-t899 ทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิด (Li et al., 2013) ยีนเหล่านี้สามารถพบได้ใน MRSA-ST398-CI และ MRSA-ST398-V จากฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรีเท่านั้น ด้วยความแตกต่างของยีนดื้อยาที่มีในแต่ละสายพันธุ์ย่อยที่แตกต่างกัน การพบยีน *erm(B)* และ *aacA-aphD* ในเพิ่มเติมใน MRSA-ST398 แต่ไม่พบใน MRSA-ST398-V จากบางแหล่งที่มา แสดงให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงเชิงพันธุกรรมของกลุ่มสายพันธุ์ ST398 ที่ได้รับยีนดื้อยาเพิ่มหรือการมีวิวัฒนาการจากการเพิ่มชุดสารพันธุกรรมที่เคลื่อนย้ายได้ นอกจากนี้ MRSA-ST398 ยังมียีน *spw* และกลุ่มที่มี SCCmec CI ยังมี *erm(A)* ที่มีตำแหน่งอยู่ร่วมกับ *spc* อีกด้วย (Feßler et al., 2010) ทั้งนี้ยีน *vga(A)*, *lsa(E)*, *lnu(B)*, *cfr*, *fexA*, *spc* และ *spw* มักพบเฉพาะในเชื้อ MRSA ที่มีแหล่งที่มาจากปศุสัตว์ มักไม่พบได้เป็นปกติใน MRSA สายพันธุ์ที่มีแหล่งที่มาจากมนุษย์ และมีความคล้ายคลึงกับยีนดื้อยาหรือมีแหล่งที่มาจากแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆที่พบได้ในปศุสัตว์ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในการพัฒนาการดื้อยากับแบคทีเรียอื่นๆ (Kadlec et al., 2012) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบการดื้อต่อยา vancomycin และ rifampicin ซึ่งเป็นยาตามระบบที่ใช้รักษาในทางการแพทย์ รวมถึง fusidic acid และ mupirocin ซึ่งเป็นยาใช้ภายนอกที่ใช้ในการรักษาและกำจัดเชื้อ MRSA

ในคนที่เป็นพาหะโดยเฉพาะในบุคลากรทางการแพทย์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับในหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ไม่พบการดื้อยาเหล่านี้ในเชื้อ LA-MRSA

การกระจายของเชื้อ MRSA อย่างเป็นทางการเป็นกลุ่มสายพันธุ์ (clonal) การพบเชื้อที่มีคุณลักษณะเดียวกันในฟาร์มและระหว่างฟาร์มที่มีความเกี่ยวข้องกัน และการส่งผ่านเชื้อระหว่างสุกรและคน สามารถอธิบายได้ด้วยคุณลักษณะทางพันธุกรรมและการดื้อยาที่เหมือนกัน เชื้อ MRSA-ST9-IX-t337-A ที่มี *cfr* และ *fexA* นั้นพบได้ในฟาร์มครบวงจร RB1<sup>FF</sup> เท่านั้น ส่วน MRSA-ST398-CI-t034-E พบได้ในฟาร์มครบวงจร NP2<sup>FF</sup> เท่านั้น แสดงถึงกลุ่มประชากรย่อยในแต่ละ ST ที่มีความจำเพาะและกระจายในสุกรวนเวียนในฟาร์ม คุณลักษณะจำเพาะของเชื้อที่แยกได้จากสุกรและผู้เลี้ยงสุกรในฟาร์มเดียวกัน ได้แก่ NP2<sup>FF</sup> และ SB1<sup>FW</sup> ที่สนับสนุนหลักฐานการส่งผ่านเชื้อ LA-MRSA ระหว่างสุกรและมนุษย์ เชื้อ MRSA-ST398-NT-t034-E ที่ไม่สามารถจำแนกรูปแบบ SCCmec ได้และ MRSA-ST398-IX-negative-C ที่ไม่พบยีน *spa* แยกได้จากสุกรในฟาร์ม NP2<sup>FF</sup> และ PB7<sup>WF</sup> ร่วมกับสายพันธุ์หลัก MRSA-ST398-CI-t034-E และ MRSA-ST398-V-t034-C จากฟาร์มทั้งสองตามลำดับ แสดงถึงความแตกต่างปลีกย่อยของเชื้อมาจากสายพันธุ์หลักที่พบในฟาร์มเดียวกันที่ตำแหน่งที่มักพบความแปรผันสูงอย่าง SCCmec ซึ่งเป็นชุดสารพันธุกรรมที่เคลื่อนย้ายได้และ *spa* ส่วนที่เป็น polymorphic hypervariable region เช่นเดียวกันกับ MRSA CC9 ที่มีเชื้อ MRSA-ST9-IX-t337 และ MRSA-ST4576-IX-t034 จากสุกรในฟาร์ม PB8<sup>WF</sup> ซึ่งแสดงความแตกต่างปลีกย่อยการผ่าเหล่าของยีนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่ง รูปแบบ *spa* และชนิดยีนดื้อยา การส่งผ่านเชื้อระหว่างฟาร์มผลิตลูกสุกรไปยังฟาร์มสุกรขุนสามารถบ่งชี้ได้จากหลักฐานการพบเชื้อที่มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมและรูปแบบการดื้อยาทางลักษณะแสดงและยีนดื้อยาที่มีเหมือนกัน โดยฟาร์มผลิตลูกสุกร PB1<sup>WF</sup> และ SB1<sup>WF</sup> มีประวัติการส่งลูกสุกรหลังหย่านมไปขุนยังฟาร์มที่พบเชื้อที่คุณลักษณะเดียวกันนี้ เชื้อ MRSA-ST398-CI-t034 นั้นนอกจากมี *ccr* complex เพิ่มมาอีกชุดแล้วยังมียีนดื้อยา *erm(A)*, *erm(B)*, *aacA-aphD* และ *spc* เพิ่มเติมมาจาก MRSA-ST398-V-t034 นั้น แสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมจากการได้รับและตัดต่อสารพันธุกรรม (genetic recombination) และการส่งผ่านสารพันธุกรรม เชื้อ MRSA-ST398 เท่านั้นที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างจากผู้เลี้ยงสุกรในการศึกษานี้ แต่จากการรายงานก่อนหน้านี้ก็พบ MRSA-ST9 ในผู้ปฏิบัติงานเกี่ยวกับสุกรเช่นกันในประเทศไทย เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ได้และมีรายงานเพิ่มมากขึ้น ส่วนในประเทศไทยพบการติดเชื้อ MRSA-ST9 ในผู้ป่วยนอกแสดงว่าอาจมีการกระจายของเชื้อที่มีแหล่งที่มาจากปศุสัตว์ในชุมชนด้วยเช่นกัน

การศึกษานี้มีข้อมูลแสดงรายละเอียดทางระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ LA-MRSA ที่กระจายอยู่ใน  
สุกรและผู้เลี้ยงสุกรในเขตภาคกลางของประเทศไทย จากคุณลักษณะทางพันธุกรรมแสดงว่าเชื้อ MRSA-  
ST398 มีการกระจายอยู่ในฟาร์มสุกรในภูมิภาคนี้ร่วมกับ MRSA-ST9 และมีความแตกต่างปลีกย่อยในแต่  
ละสายพันธุ์จากวิวัฒนาการ อีกทั้งยังแสดงหลักฐานความเป็นไปได้ในการส่งผ่านเชื้อระหว่างสุกรและมนุษย์ซึ่ง  
จัดเป็นความเสี่ยงทางอาชีพหนึ่งของผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มสุกรที่จะได้รับเชื้อดื้อยา การพบยีนดื้อยา *cftr* ครั้ง  
แรกในประเทศไทยบ่งชี้ถึงการปรากฏซึ่งอาจทำให้เกิดการแพร่กระจายและการอุบัติของการดื้อต่อยาต้านจุล-  
ชีพที่มีความสำคัญในการรักษาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในทางการแพทย์ การศึกษาในระดับพันธุกรรมเชิงลึกเพื่อดู  
คุณลักษณะของชุดสารพันธุกรรม *SCCmec* ที่ไม่สามารถจำแนกได้และชนิดเชิงประกอบใหม่ที่พบนี้จะช่วย  
อธิบายกลไกการเกิดและที่มา รวมถึงเข้าใจวิวัฒนาการเชิงพันธุกรรมของเชื้อที่ทำให้เกิดการพัฒนาการและ  
แพร่กระจายการดื้อยา การตรวจติดตามในกระบวนการฆ่าและและผลิตภัณฑ์จากสุกร การกระจายของเชื้อ  
ในปศุสัตว์อื่นๆ และตัวอย่างเชื้อจากการติดเชื้อในคนจะช่วยเพิ่มเติมข้อมูลปัจจุบันที่มีอยู่เชิงระบาดวิทยาเพื่อ  
ใช้ในการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยานี้มาสู่คนตามหลักสุขภาพหนึ่งเดียว การป้องกัน  
ตนเองและรักษาสุขอนามัยในการปฏิบัติงานทั้งการใช้อุปกรณ์ป้องกันขณะปฏิบัติงาน ได้แก่ ชุดคลุม หน้ากาก  
หรือ ถุงมือ เป็นต้น การล้างมือ การแยกบริเวณพักอาศัย เป็นสิ่งที่พึงปฏิบัติของผู้ปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับสุกร  
เพื่อลดโอกาสการได้รับเชื้อจากสุกรสู่คน การจัดการฟาร์ม การควบคุมการติดเชื้อ และการลดการใช้ยาต้านจุล  
ชีพอ่างไม่จำเป็นก็เป็นสิ่งที่พึงปฏิบัติเช่นกันเพื่อการอุบัติและการกระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา

## กิตติกรรมประกาศ

---

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (รหัสทุน MRG5980024) และทุนเมธีวิจัยอาวุโส โดยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ (รหัสทุน RTA6080012) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษก สมโภช สำนักบริหารวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รหัสทุน DNS 60-003-31-001-2) ทุนสนับสนุนจาก โครงการขับเคลื่อนการวิจัยการวินิจฉัยและตรวจติดตามเชื้อก่อโรคในสัตว์ (Special Task Force for Activating Research-Diagnosis and Monitoring of Animal Pathogen) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอบคุณการสนับสนุนในการตรวจหายีนดื้อยาด้วย DNA microarray โดย Professor Dr Vincent Perreten จาก Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland และการจัด allelic number และ sequence type ของเชื้อ *S. aureus* โดย Dr Keith Jolley จาก University of Oxford, UK อีกทั้งขอขอบคุณความช่วยเหลือในกระบวนการทางห้องปฏิบัติการ จาก Alexandra Collaud (University of Bern, Switzerland) และนางสาวจิตราภา ยินดี นายปวรุศม์ ณรงค์พันธ์ นายนิติสิทธิ์ ดอกขັນ นายศตายุ ต้นธนะสาร และนายธนภพ ธรรมกิตติคุณ (คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และความร่วมมือและการเอื้ออำนวยความสะดวกจากศูนย์เชี่ยวชาญ เฉพาะทางโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สัตวแพทย์ ผู้ดูแลฟาร์มสุกรและผู้เลี้ยงสุกรในการเก็บตัวอย่าง

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้สำหรับการตรวจหายีน *nuc* ที่จำเพาะของ *S. aureus* ด้วย PCR

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ยีน (ขนาดคู่เบส)	เอกสารอ้างอิง
au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	<i>nuc</i> (359 bp)	Sasaki et al., 2010
au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC		

ตารางที่ 2 Primers ที่ใช้สำหรับการตรวจหายีน *mecA* ด้วย PCR

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ยีน (ขนาดคู่เบส)	เอกสารอ้างอิง
<i>mecA1</i>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	<i>mecA</i> (532 bp)	Strommenger et al., 2003
<i>mecA2</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		

ตารางที่ 3 ชุด primer สำหรับเทคนิค multiplex PCR ที่ใช้ในการจำแนกรูปแบบ SCC*mec* I-V (Kondo et al., 2007)

Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ยีนตำแหน่งจับ	ยีนที่มีการเพิ่มจำนวน	ขนาด (คู่เบส)
Multiplex PCR ชุด 1 สำหรับจำแนกชนิด <i>ccr</i> complex และยืนยันการปรากฏของ <i>mecA</i>				
<i>mA1</i>	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i>	<i>mecA</i> ( <i>mA1-mA2</i> )	286
<i>mA2</i>	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	<i>mecA</i>		
$\alpha$ 1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1</i>	<i>ccrA1-ccrB</i> ( $\alpha$ 1- $\beta$ c)	695
$\alpha$ 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2</i>	<i>ccrA2-ccrB</i> ( $\alpha$ 2- $\beta$ c)	937
$\alpha$ 3	AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3</i>	<i>ccrA3-ccrB</i> ( $\alpha$ 3- $\beta$ c)	1,791
$\beta$ c	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrB1</i> , <i>ccrB2</i> , <i>ccrB3</i>		
$\alpha$ 4.1	GTATCAATGCACCAGAACTT	<i>ccrA4</i>	<i>ccrA3-ccrB</i> ( $\alpha$ 1- $\beta$ c)	1,287
$\beta$ 4.2	TTGCGACTCTCTTGCGGTTTT	<i>ccrB4</i>		
$\gamma$ R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	<i>ccrC</i>	<i>ccrC</i> ( $\gamma$ F- $\gamma$ R)	518
$\gamma$ F	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	<i>ccrC</i>		
Multiplex PCR ชุดที่ 2 สำหรับจำแนกชนิด <i>mec</i> complex				
<i>mI6</i>	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecI</i>	<i>mecA-mecI</i> ( <i>mA7-mI6</i> )	1,963
<i>IS7</i>	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	<i>IS1272</i>	<i>mecA-IS1272</i> upstream of <i>mecA</i> ( <i>mA7-IS7</i> )	2,827
<i>IS2</i> ( <i>iS-2</i> )	TGAGGTTATTAGATATTTTCGATGT	<i>IS431</i>	<i>mecA-IS431</i> upstream of <i>mecA</i> ( <i>mA7-IS2</i> ( <i>iS-20</i> ))	804
<i>mA7</i>	ATATACCAAACCCGACAACACTACA	<i>mecA</i>		

ตารางที่ 4 Primers ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวน polymorphic X region ของยีน *spa*

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ยีน	เอกสารอ้างอิง
1095F	AGACGATCCTTCGGTGAGC	<i>spa</i>	Shopsin et al., 1999
1517R	GCTTTTGCAATGTCATTTACTG		



ตารางที่ 5 Primers ที่ใช้สำหรับตรวจการปรากฏของยีนด้อยยาด้านจุลชีพต่างๆ

Gene	Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>blaZ</i>	blaZ-F	CAGTTCACATGCCAAAGAG	772	Schnellmann et al., 2006
	blaZ-R	TACTACTCTTGCGGTTTC		
<i>tet(K)</i>	tet(K)-1	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	697	Aarestrup et al., 2000
	tet(K)-2	GCAAACCTATTCCAGAAGCA		
<i>tet(L)</i>	tet(L)-1	CATTTGGTCTTATTGGATCG	456	Aarestrup et al., 2000
	tet(L)-2	ATTACTTCCGATTTCCGG		
<i>tet(M)</i>	tet(M)-1	GTAAATAGTGTCTTGGAG	576	Aarestrup et al., 2000
	tet(M)-2	CTAAGATATGGCTCTAACAA		
<i>aadA-aphD</i>	aacA-aphD-1	CCAAGAGCAATAAGGGCATA	220	Van de Klundert and Vliegthart, 1993
	aacA-aphD-2	CACTATCATAACCACTACCG		
<i>aadD</i>	aadD-1	GCAAGGACCGACAACATTTTC	165	Van de Klundert and Vliegthart, 1993
	aadD-2	TGGCACAGATGGTCATAACC		
<i>aadE</i>	aadE-pS1	GCAGAACAGGATGAACGTATTCG	373	This study from GenBank nucleotide accession No. KF421157.1
	aadE-R	CTATATCAGTCGGAACATATGTCCC		
<i>str</i>	str-pS194-F	TATTGCTCTCGAGGGTTC	646	Schnellmann et al., 2006
	str-pS194-R	CTTTCTATATCCATTCATCTC		
<i>spc</i>	spc_fw	ACCAAATCAAGCGATTCAAA	561	Fefler et al., 2010
	spc_rv	GTCACGTGTTGCCACATTCG		
<i>spw</i>	spw-fw	CGGCAGTAATGGGTGGTTTA	630	Wendlandt et al., 2013b
	spw-rv	CAGCCACCTCAGATTCCATT		
<i>erm(A)</i>	erm(A)-F	TCTAAAGCATGTAAAGAA	645	Sutcliffe et al., 1996
	erm(A)-R	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT		
<i>erm(B)</i>	erm(B)-F	GAAAAGGTAACAACCAATA	639	Sutcliffe et al., 1996
	erm(B)-R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
<i>erm(C)</i>	erm(C)-F	TCAAACATAATATAGATAAA	642	Sutcliffe et al., 1996
	erm(C)-R	GCTAATATTTAAATCGTCAAT		
<i>lnu(B)</i>	lnuB-F	CCTACCTATTGTTGTGGAA	925	Bozdogan et al., 1999
	lnuB-R	ATAACGTTACTCTCCTATTC		
<i>lsa(E)</i>	lsaE-F	ACGGACGCGTAAACTACT	693	Chanachithong et al., 2014
	lsaE-R	TTGGCACGTTTCATCGCTTT		
<i>vga(A)</i>	vgaA-F	AGTGGTGGTGAAGTAACACG	1,287	Li et al., 2013
	vgaA-R	CTCTTGTTCTAATTCCTCCG		
<i>cfr</i>	cfr-fw	TGAAGTATAAAGCAGGTGGGAGTCA	746	Kehrenberg and Schwarz, 2006
	cfr-rv	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC		
<i>cat<sub>pC221</sub></i>	catpC221-F	ATTTATGCAATTATGGGAGTTG	435	Schoenfelder et al., 2017
	catpC221-R	TGAAGCATGGTAACCATCAC		
<i>fexA</i>	fexA-fw	GTAATGTAGGTGCAATTACGGCTGA	1,272	Kehrenberg and Schwarz, 2005
	fexA-rv	CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC		
<i>dfr(G)</i>	dfrG-1	TCGGAAGAGCCTTACCTGACAGAA	323	Gómez-Sanz et al., 2010
	dfrG-2	CCCTTTTTGGCAAATACCTCATTCCA		

ลำดับสารพันธุกรรมของยีนในการหาสายพันธุ์ของ *Staphylococcus aureus* ด้วย multilocus sequence typing

*Staphylococcus aureus* sequence type 9 (ST9)

Allelic profile (*arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tpi-yqiL*) = 3-3-1-1-1-10

>acrC\_allelic\_number\_3

```
TTATTAATCCAACAAGCTAAATCGAACAGTGACACAACGCCGGCAATGCCATTGGATACTTGTGGTGCAATGTCACAGGGTAT
GATAGGCTATTGGTTGGAACTGAAATCAATCGCATTTTAACTGAAATGAATAGTGATAGAAGTGTAGGCACAATCGTTACAC
GTGTGGAAGTAGATAAAGATGATCCACGATTTGATAACCCAATAACCAATTGGTCCTTTTTATACGAAAGAAGAAGTTGAA
GAATTACAAAAGAACAGCCAGACTCAGTCTTTAAAGAAAGATGCAGGACGTGGTTATAGAAAAGTAGTTGCGTCACCACTACC
TCAATCTATACTAGAACACCGATTAAATTCGAACTTTAGCAGACGGTAAAAATATTGTCATTGCATGCGGTGGTGGCGGTATTC
CAGTTATAAAAAAGAAAATACCTATGAAGGTGTTGAAGCG
```

>aroE\_allelic\_number\_3

```
AATTTTAATTCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAAATTAT
TTCGAAAAAGAATTAGAAGGCTTTAATATCACAAATCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATTATGTTGATGAAC
AAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGATGGTATTGGTTAT
GTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAAATTTGGGCGCAGGTGGTGCAAGTAAAGGTAT
TGCTTATGAATTAGCAAATTTGTAAGCCAAATTAAGTGTGCGAATAGAACGATGGCTCGTTTTGAATCTTGGAATTTAA
ATATAAACCAATTTTCATTAGCAGATGCTGAAAAGTATTTA
```

>glpF\_allelic\_number\_1

```
GGTGCTGATTGGATTGTCATCAGCTGGATGGGGATTAGCGGTTACAATGGGTGTGTTGCTGTGCGTCAATTCTCAGGTGC
ACATTTAAACCCAGCGGTGCTTTTAGCTCTTGCAATGACGGAAGTTTTGATTGGTCATTAGTTCCGGTTATATTGTTGCTC
AAATGTTAGGTGCAATTGTCGGAGCAACAATTGTATGGTTAATGTACTTGCCACATTGGAAGCGACAGAAGAAGCTGGCGCG
AAATTAGGTGTTTTCTCTACAGCACCGGCTATTAAGAATTACTTTGCCAACTTTTTAAGTGAGATTATCGGAACAATGGCATT
AACTTTAGGTATTTTATTTATCGGTGTAACAAAATTTGCCGATGGTTTAAATCCTTTAATTGTCGGAGCATTAAATTGTTGCAA
TCGGATTAAGTTTAGCGGTGCTACTGGTTATGCAATCAACCCAGCACGT
```

>gmk\_allelic\_number\_1

```
CGAATATTTGAAGATCCAAGTACATCATATAAGTATTCTATTTCAATGACAACACGTCAAATGCGTGAAGGTGAAGTTGATGG
CGTAGATTACTTTTTTAAACTAGGGATGCGTTTTGAAGCTTTAATCAAAGATGACCAATTTATAGAATATGCTGAATATGTAG
GCAACTATTTATGGTACACCAGTTCAATATGTTAAAGATACAATGGACGAAGGTCATGATGATTTTTTGAAGTGAAGTAGAA
GGTGCAAAGCAAGTTAGAAAGAAATTTCCAGATGCGCTATTTATTTTCTTAGCACCTCCAAGTTTGAACACTTGAGAGAGCG
ATTAGTAGGTAGAGGAACAGAATCTGATGAGAAAATACAAGTCGTATTAACGAAGCGGTAAGAAGTTGAAATGATGAATT
TA
```

>pta\_allelic\_number\_1

```
GCAACACAATTACAAGCAACAGATTATGTTACACCAATCGTGTTAGGTGATGAGACTAAGGTTCAATCTTTAGCGCAAAAAC
TGATCTTGATATTTCTAATATTGAATTAATTAATCCTGCGACAAGTGAATTGAAAGCTGAATTAGTTCAATCATTGTTGAAC
GACGTAAGGTAAAGCGACTGAAGAACAAGCACAAGAATTTAACAATGTGAACACTTTCGGTACAATGCTTGTGTTATGCT
GGTAAAGCAGATGGTTTAGTTAGTGGTGCAGCACATTTCAACAGGAGACACTGTGCGTCCAGCTTTACAAAATCATCAAAACGAA
ACCGGTGATCAAGAACATCAGGTATCTCTTTATGATTAAGGTAAGTATACAATACATCTTTGGTGATGTGCAATCAATC
CAGAACTTGATTACAAGGACTTGCAGAAATTGCAGTAGAAAGTGCAAAATCAGCATT
```

>tpi\_allelic\_number\_1

```
CACGAAACAGATGAAGAAATTAACAAAAAGCGCACGCTATTTTCAAACATGGAATGACTCCAATTATTTGTGTTGGTGAAC
AGACGAAGAGCGTGAAGTGGTAAAGCTAACGATGTTGTAGGTGAGCAAGTTAAGAAAGCTGTTGCAGGTTTATCTGAAGATC
AACTAAATCAGTTGTAATTGCTTATGAGCCAATCTGGGCAATCGGAACTGGTAAATCATCAACATCTGAAGATGCAAAATGAA
ATGTGTGCAATTTGTCAGTCAAGTCAAGTATGCTGACTTACAGCAAAAGTATCAGAAGCAACTCGTATTCAATATGGTGGTAG
TGTTAAACCTAACAACTTAAAGAATACATGGCACAACTGATATTGATGGGGCATTAGTAGGTGGCGCA
```

>yqiL\_allelic\_number\_10

```
GCGTTTTAAAGACGTGCCAGCTATGATTTAGGTGCGACTTTAATAGAACATATTATTAAGAGACGGGTTTGAATCCAAGTGA
GATTGATGAAGTTATCATCGGTAACGTAACAAGCAGGACAAGGCAAAAATCCAGCACGAATTGCTGCTATGAAAGGTGGCT
TGCCAGAAACAGTACTGCAATTTACAGTGAATAAAGTATGTTGTTCTGGTTAAAGTCAATCAATTAGCATATCAATCTAT
GTGACTGGTGAATAATGACATCGTGTAGCTGGCGGTATGGAGAATATGCTCAGTACCATGCTTGTCAACAACAGTGGCTT
CGGTTTTAAATGGGACATCAATCAATGGTTGATAGCATGGTATATGATGGTTTAAACAGATGATTTAATCAATATCATATGG
GTATTACTGCTGAAAATTTAGTAGAGCAATATGGTATTTCAAGAGAAGAACAAGATACATTTGCTGTAAACTCACAACTAAA
CGAGTACGTGCACAGCAA
```

*Staphylococcus aureus* sequence type 4576 (ST4576)

Allelic profile (*arcC-aroE-glpF-gmk-pti-yqiL*) = 3-3-625-1-1-1-10

>arcC\_allelic\_number\_3

```
TTATTTAATCCAACAAGCTAAATCGAACAGTGACACAACGCCGCAATGCCATTGGATACTTGTGGTGCAATGTCACAGGGTAT
GATAGGCTATTGGTTGGAACTGAAATCAATCGCATTTTAACTGAAATGAATAGTGATAGAACTGTAGGCACAATCGTTACAC
GTGTGGAAAGTAGATAAAGATGATCCACGATTTGATAACCCAATAACCAATTGGTCCTTTTTATACGAAAGAAGAAGTTGAA
GAATTACAAAAGAACAGCCAGACTCAGTCTTTAAAGAAGATGCAGGACGTGGTTATAGAAAAGTAGTTGCGTCACCACTACC
TCAATCTATACTAGAACACCAGTTAATTCGAACCTTTAGCAGACGGTAAAAATATTGTCATTGCATGCGGTGGTGGCGGTATTC
CAGTTATAAAAAAGAAAATACCTATGAAGGTGTTGAAGCG
```

>aroE\_allelic\_number\_3

```
AATTTTAAATCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATTAT
TTCGAAAAAGAATTAGAAGGCTTTAATATCACAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATTATGTTGATGAAC
AAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGATGGTATTGGTTAT
GTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTAATTTTGGGCGCAGGTGGTCAAGTAAAGGTAT
TGCTTATGAATTAGCAAAATTTGTAAAGCCCAATTAAGTGTGCGAATAGAACGATGGCTCGTTTTGAATCTTGGAAATTTAA
ATATAACCAATTTTCATTAGCAGATGCTGAAAAGTATTTA
```

>glpF\_allelic\_number\_625

```
GGTGTGATTGGATTTGCATCACAGCTGGATGGGGATTAGCGGTTACAATGGGTGTGTTTGTGTCGGTCAATTCCTCAGGTGC
ACATTTAAACCCAGCGGTGTCTTTAGCTCTTGCATTAGACGGAAGTTTGGATTGGTCATTAGTTCCTGGTTATATTGTTGCTC
AAATGTTAGGTGCAATTGTCGGAGCAACAATTGTATGGTTAATGTACTTGCCACATTGGAAAGCGACAGAAGAAGCTGGCGCG
AAATTAGGTGTTTTCTCTACAGCACCGGCTATTAAGAATTAAGTGTGCAACTTTTTAAGTGAGATTATCGGAACAATGGCATT
AATTTTAGGTATTTTATTTATCGGTGTAACAAAATTTGCCGATGGTTAAATCCTTTAATTGTCGGAGCATTAAATTGTTGCAA
TCGGATTAAGTTTAGCGGTGCTACTGTTATGCAATCAACCCAGCACGT
```

>gmk\_allelic\_number\_1

```
CGAATATTGAAGATCCAGTACATCATATAAGTATTCTATTTCAATGACAACACGTCAAATGCGTGAAGGTGAAGTTGATGG
CGTAGATTACTTTTTTAAACTAGGGATGCGTTTTGAAGCTTTAATCAAAGATGACCAATTTATAGAATATGCTGAATATGTAG
GCAACTATTATGGTACACCAGTTCAATATGTTAAAGATACAATGGACGAAGGTGATGATGATTTTTTAGAAATGAAGTAGAA
GGTGCAAAGCAAGTTAGAAAGAAATTTCCAGATGCGCTATTTATTTCTTAGCACCTCCAAGTTTAGAACACTTGAGAGAGCG
ATTAGTAGGTAGAGGAACAGAATCTGATGAGAAAATACAAGTCTGATTAACGAAGCGGTAAAGAAGTTGAAATGATGAATT
TA
```

>pti\_allelic\_number\_1

```
GCAACACAATTACAAGCAACAGATTATGTTACACCAATCGTGTAGGTGATGAGACTAAGGTTCAATCTTTAGCGCAAAAAC
TGATCTTGATATTTCTAATATTGAATTAATTAATCCTGCGACAAGTGAATTGAAAGCTGAATTAGTTCAATCATTTGTTGAAC
GACGTAAAGGTAAAGCGACTGAAGAACAAGCACAAGAATTTAACAATGTGAACACTTCGGTACAATGCTTGTTTATGCT
GGTAAAGCAGATGGTTTAGTTAGTGGTGCAGCACATTTCAACAGGAGACACTGTGCGTCCAGCTTTACAAATCATCAAAACGAA
ACCAGGTGATCAAGAACATCAGGTATCTCTTTATGATTAAGGTGATGTACAATACATCTTTGGTGAATGTTGCAATCAATC
CAGAACCTGATTCACAAGGACTTGCAGAAATTGCAGTAGAAAAGTGCAAAATCAGCATTAA
```

>tpi\_allelic\_number\_1

```
CACGAAACAGATGAAGAAATTAACAAAAAGCGCACGCTATTTTCAAACATGGAATGACTCCAATTTTGTGTTGGTGAAC
AGACGAAGAGCGTGAAAGTGGTAAAGCTAACGATGTTGTAGGTGAGCAAGTTAAGAAAGCTGTTGCAGGTTTATCTGAAGATC
AACTTAAATCAGTTGTAATTTGCTTATGAGCCAATCTGGGCAATCGGAACCTGGTAAATCATCAACATCTGAAGATGCAAAATGAA
ATGTGTGCAATTTGTACGTCAAACACTATTGCTGACTTATCAAGCAAAGAAGTATCAGAAGCAACTCGTATTCAATATGGTGGTAG
TGTTAAACCTAACACATTAAGAATACATGGCACAAAACGATATTGATGGGGCATTAGTAGGTGGCGCA
```

>yqiL\_allelic\_number\_10

```
GCGTTTTAAAGACGTGCCAGCTATGATTTAGGTGCGACTTTAATAGAACATATTATTAAGAGACGGGTTGAATCCAAGTGA
GATTGATGAAGTTATCATCGGTAACGTAACAAGCAGGACAAGGACAAAATCCAGCAGCAATTTGCTGCTATGAAAGGTGGCT
TGCCAGAAACAGTACCTGCATTTACAGTGAATAAAGTATGTGGTCTGGGTTAAAGTTCGATTCAATTAGCATATCAATCTATT
GTGACTGGTGAATAATGACATCGTGTAGCTGGCGGTATGGAGAATATGTCAGTCACCAATGCTTGTCAACAACAGTGGCTT
CGGTTTTAAATGGGACATCAATCAATGGTTGATAGCATGGTATATGATGGTTTAAACAGATGATTTTAAATCAATATCATATGG
GTATTACTGCTGAAAATTTAGTAGAGCAATATGGTATTTCAAGAGAAGAACAAGATACATTTGCTGTAAACTCACAACATAAA
CGAGTACGTGCACAGCAA
```

*Staphylococcus aureus* sequence type 398 (ST398)

Allelic profile (*arcC-aroE-glpF-gmk-pti-yqiL*) = 3-35-19-2-20-26-39

>*arcC*\_allelic\_number\_3

```
TTATTTAATCCAACAAGCTAAATCGAACAGTGACACAACGCCGGCAATGCCATTGGATACTTGTGGTGCAATGTCACAGGGTAT
GATAGGCTATTGGTTGGAAACTGAAATCAATCGCATTTTAACTGAAATGAATAGTGATAGAAGCTAGGCACAATCGTTACAC
GTGTGGAAGTAGATAAAGATGATCCACGATTTGATAACCCAATAAACCAATTGGTCCTTTTATACGAAAGAAGAAGTTGAA
GAATTACAAAAAGAACAGCCAGACTCAGTCTTTAAAGAAGATGCAGGACGTGGTTATAGAAAAGTAGTTGCGTCACCACTACC
TCAATCTATACGACACCAGTTAATTCGAACTTTAGCAGACGGTAAAAATATGTTCATTGCATGCGGTGGTGCCGGTATTCC
CAGTTATAAAAAAAGAAAATACCTATGAAGGTGTTGAAGCG
```

>*aroE*\_allelic\_number\_35

```
AATTTTAAATCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATTAT
TTCAAAAAAAGAATTAGATGGCTTAAATATCACAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATCATGTTGATGAAC
AAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGATGGTATTGGTTAT
GTAAAAGGATTGCACAGCTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAAATTTTGGGAGCAGGTGGTGCAAGTAAAGGTAT
TGCTTATGAATTAGCAAAATTTGTAAGCCCAAATTAAGTGTGCGAATAGAACGTTGGCTCGTTTTGAATCTTGAATTTAA
ATATAAATCAAATTTTCATTGGCAGATGCTGAAAAGTATTTA
```

>*glpF*\_allelic\_number\_19

```
GGTGTGATTGGATTGTCATCAGCTGGATGGGGATTAGCGGTTACAATGGGTGTGTATGCTGTGCGGTCAATTTCTCAGGTGC
ACATTTAAACCCAGCGGTGTCTTTAGCTCTTGCATTAGACGGAAGTTTTGATTGGTCATTAGTTCCTGGTTATATTGTTGCTC
AAATGTTAGGTGCAATTGTCGGAGCAACAATTGTATGGTTAATGTACTTCCACATTGGAAAGCGACAGAAGAAGCTGGCGCG
AAATTAGGTGTTTTCTCTACAGCACCAGCTATTAAGAATTACTTTGCCAATTTTAAAGTGAATATCGGAACAATGGCATT
AACTTTAGGTATTTTATTTATCGGTGTAACAAAATTCGCCGATGTTTAAATCCTTTAATTGTCGGAGCATTAAATGTTGCAA
TCGGATTAAGTTTAGGCGGTGCTACTGTTTATGCAATCAACCCAGCACGT
```

>*gmk*\_allelic\_number\_2

```
CGAATATTTGAAGATCCAAGTACATCATATAAGTATTCTATTTCAATGACAACAGTCAAATGCGTGAAGGTGAAGTTGATGG
CGTAGATTACTTTTTTAAACTAGGGATGCGTTTTGAAGCTTTAATTAAGATGACCAATTTATAGAATATGCTGAATATGTAG
GCAACTATTATGGTACACCAGTTCAATATGTTAAAGATACAATGGACGAAGTCATGATGATTTTTAGAAATTGAAGTAGAA
GGTGCAAAGCAAGTTAGAAAGAAATTTCCAGATGCGTTATTTATTTCTTAGCACCTCCAAGTTTAGATCACTTGAGAGAGCG
ATTAGTAGGTAGAGGAACAGAATCTGATGAGAAAATACAAAGTCTGATTAACGAAGCACGTAAGAAAGTCGAAATGATGAATT
TA
```

>*pta*\_allelic\_number\_20

```
GCAACACAATTACAGCAACAGATTATGTTACACCAATCGTGTAGGTGATGAGACTAAGGTTCAATCTTTAGCGCAAAAAC
TAATCTTGATATTTCTAATATTGAATTAATTAATCTGCGACAAGTGAATTGAAAGCTGAATTAGTTCATCATTGTTGAAC
GACGTAAAGGTAAAGCGACTGAAGAACAAGCACAAGAATTATTAACAATGTGAACACTCTCGGTACAATGCTTGTATTATGCT
GGTAAAGCAGATGGCTTAGTTAGTGGTGCAGCACATTCAACAGGCGCACACTGTGCGTCCAGCATTACAAATCATCAAAACGAA
ACCAGGTGTATCAAGAACATCAGGTATCTTCTTTATGATTAAGGTGATGAACAATACATCTTTGGTGAATGTTGCAATCAATC
CAGAACTTGATTCACAAGGACTTGCAAGAAATTGCAGTAGAAAGTGCAAAATCAGCATT
```

>*yqiL*\_allelic\_number\_26

```
GCGTTTAAAGACGTGCCAGCCTATGATTTAGGTGCGACTTTAATAGAACATATTTAAAGAGACGGGTTTGAATCCAAGTGA
GATTAATGAAGTCATCATCGGTAACGTAACAAGCAGGACAAGGACAAAATCCAGCACGAATTGCTGCTATGAAAGGTGGCT
TGCCAGAAAACAGTACCTGCATTTACAGTGAATAAAGTATGTGGTTCTGGGTTAAAGTCGATTCAATTAGCATATCAATCTATT
GTGACTGGTGAAAATGACATCGTGTAGCTGGCGGTATGGAGAATATGTCTCAATCACCAATGCTTGTCAACAACAGTCGCTT
TGTTTTTAAATGGGACATCAGTCAATGGTTGATAGCATGGTATATGATGGTTTTAACAGATGATTTAATCAATATCATATGG
GTATTACTGCTGAAAATTTAGTAGAGCAATATGGTATTTCAAGAGAAGAACAAGATACATTTGCTGTAAACTCACACAAAAA
GCAGTACGTGCACAGCAA
```

>*tpi*\_allelic\_number\_39

```
CACGAAAACAGATGAAAGAAATTAACAAAAAGCGCATGCTATTTTCAAACATGGTATGACACCAATTTTGTGTTGGTGAAAC
AGATGAAGAGCGTGAAGTGGTAAAGCTAACGATGTTGTAGGTGAGCAAGTTAAGAAAGCTGTTGCAGGTTTATCTGAAGAGC
AACTTAAATCAGTTGTAATTGCTTATGAACCAATCTGGGCAATCGGAACTGGTAAATCATCAACATCTGAAGATGCGAATGAA
ATGTGTGCATTTGTACGTCAAATATTGCTGACTTATCAAGCAAAGAAGTATCAGAAGCAACTCGTATTCAATATGGTGGTAG
TGTTAAACCTAACACATTAAGAATACATGGCACAACCTGATATTGATGGGCGATTAGTAGGTGGCGCA
```

ลำดับสารพันธุกรรมส่วน polymorphic X region ของยีน *spa* ของ *S. aureus*

t034 = 08-16-02-25-02-25-34-24-25

r08-GAGGAAGACAACAACAAGCCTGGT  
 r16-AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT  
 r02-AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC  
 r25-AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT  
 r02-AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC  
 r25-AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT  
 r34-AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT  
 r24-AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGT  
 r25-AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT

Primer 1095F binding

TTAGACGATCCTTCGGTGAGCAAAGAAATTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAACGATGCTCA  
 5' signature r08 r16  
**AGCACCAAAA**GAGGAAGACAACAACAAGCCTGGT**AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT**TAAAG  
 r02 r25 r02  
 AAGACAACAAAAACCTGGC**AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT**TAAAGAAGACAACAAAAA  
 r25 r34  
 CCTGGC**AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT**TAAAGAAGACAACAAAAACCTGGT**AAAGAAGA**  
 r24 r25 18-19 bp distance to repeat  
**TGGCAACAAGCCTGGT**TAAAGAAGATGGCAACAAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACGGAA**TAC**  
 3' signature Primer 1157-R binding  
**ATGTCGT**TAAACCTGGTGATACAGTAAATGACATTGCAAAAGCAA

t337 = 07-16-23-23-02-12-23-02-34

r07-GAGGAAGACAACAACAAACCTGGT  
r16-AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT  
r23-AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGC  
r23-AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGC  
r02-AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC  
r12-AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT  
r23-AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGC  
r02-AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC  
r34-AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT

Primer 1095F binding

TTAGACGATCCTTCGGTGAGCAAAGAAATTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAACGATGCTCA  
5' signature r07 r16  
**AGCACCAAAA**GAGGAAGACAACAACAAACCTGGT**AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT**TAAAG  
r23 r23 r02  
AAGACGGCAACAAACCTGGC**AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGC**AAAGAAGACAACAAAA  
r12 r23  
CCTGGC**AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT**TAAAGAAGACGGCAACAAACCTGGC**AAAGAAGA**  
r02 r34 18-19 bp distance to repeat  
**CAACAAAAACCTGGC**AAAGAAGACAACAAAAACCTGGTAAAGAAGATGGTAACGGGG**TAC**  
3' signature Primer 1157-R binding  
**ATGTCGT**TAAACCTGGTGATACAGTAAATGACATTGCAAAGCAA

## เอกสารอ้างอิง

- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M and Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 37: 127-137.
- Alt K, Fetsch A, Schroeter A, Guerra B, Hammerl JA, Hertwig S, Senkov N, Geinets A, Mueller-Graf C, Braeunig J, Kaesbohrer A, Appel B, Hensel A and Tenhagen B-A. 2011. Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany. *BMC Vet Res.* 7: 69.
- Anukool U, O'Neill CE, Butr-Indr B, Hawkey PM, Gaze WH and Wellington EMH. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs from Thailand. *Int J Antimicrob Agents.* 38: 86-87.
- Argudin MA, Rodicio MR and Guerra B. 2010. The emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 clone can easily be typed using the *Cfr9I Smal*-neoschizomer. *Lett Appl Microbiol.* 50: 127-130.
- Armand-Lefevre L, Ruimy R and Andremont A. 2005. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis.* 11: 711-714.
- Barton MD. 2014. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol* 19: 9-15.
- Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Feltrin F, Zini M, Aarestrup FM. 2010. Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Vet Microbiol* 142: 361-366.
- Böcher S, Smyth R, Kahlmeter G, Kerremans J, Vos MC and Skov R. 2008. Evaluation of four selective agars and two enrichment broths in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 46: 3136-3138.
- Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo M-S, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ and Leclercq R. 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 925-929.
- Broens EM, Espinosa-Gongora C, Graat EA, Vendrig N, Van Der Wolf PJ, Guardabassi L, Butaye P, Nielsen JP, De Jong MC and Van De Giessen AW. 2012. Longitudinal study on transmission of MRSA CC398 within pig herds. *BMC Vet Res.* 8: 58.
- Broens EM, Graat EAM, van der Wolf PJ, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Wagenaar JA, van Nes, A, Mevius DJ and de Jong MCM. 2011. MRSA CC398 in the pig production chain. *Prev Vet Med.* 98: 182-189.
- Chanchaithong P, Perreten V, Schwendener S, Tribuddharat C, Chongthaleong A, Niyomtham W and Prapasarakul N. 2014. Strain typing and antimicrobial susceptibility of

- methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal species in dogs and people associated with dogs in Thailand. *J Appl Microbiol.* 117: 572-586.
- Chanchaithong P, Prapasarakul N, Perreten V and Schwendener S. 2016. Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Thailand. *Antimicrob Agents Chemother.* 60: 1153-1157.
- Chuang Y-Y and Huang Y-C. 2015. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia: An emerging issue? *Int J Antimicrob Agents.* 45: 334-340.
- Conceição T, de Lencastre H and Aires-de-Sousa M. 2017. Frequent isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 among healthy pigs in Portugal. *PLOS ONE.* 12: e0175340.
- Crombé F, Willems G, Dispas M, Hallin M, Denis O, Suetens C, Gordts B, Struelens M and Butaye P. 2012. Prevalence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs in Belgium. *Microb Drug Resist* 18: 125-131.
- Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nübel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L and Witte W. 2010. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol* 300: 109-117.
- Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D and Witte W. 2009. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLOS ONE* 4: e6800.
- Cuny, C., Wieler, L., Witte, W., 2015. Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans. *Antibiotics* 4, 521.
- Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ and Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38: 1008-1015.
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2018; Version 8.0.
- Fang H-W, Chiang P-H and Huang Y-C. 2014. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST9 in pigs and related personnel in Taiwan. *PLOS ONE* 9, e88826.
- Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S and Schwarz S. 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother.* 65: 619-625.
- Friese A, Schulz J, Hoehle L, Fetsch A, Tenhagen B-A, Hartung J and Roesler U. 2012. Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns. *Vet Microbiol.* 158: 129-135.
- Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, 2010. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-



- resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog Dis.* 7: 1269-1277.
- Graveland H, Duim B, van Duijkeren E, Heederik D and Wagenaar JA. 2011. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int J Med Microbiol.* 301: 630-634.
- Guardabassi L, O'Donoghue M, Moodley A, Ho J and Boost M. 2009. Novel lineage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Hong Kong. *Emerg Infect Dis.* 15: 1998-2000.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D and Vogel U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol.* 41: 5442-5448.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M and Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9: 486-493.
- International Working Group on Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 4961-4967.
- Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J and Schwarz S. 2009. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother.* 64: 1156-1164.
- Kadlec K, Feßler AT, Hauschild T and Schwarz S. 2012. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 18: 745-755.
- Kadlec K and Schwarz S. 2009. Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 3589-3591.
- 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: 1549-1555.
- 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: 779-781.
- Kehrenberg C and Schwarz S. 2005. Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn558. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 813-815.

- Kehrenberg C and Schwarz S. 2006. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant staphylococcus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1156-1163.
- Khanna T, Friendship R, Dewey C and Weese JS. 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol.* 128: 298-303.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, 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.
- Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM and Kreiswirth BN. 2004. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: Implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol.* 42: 792-799.
- Larsen J, Imanishi M, Hinjoy S, Tharavichitkul P, Duangsong K, Davis MF, Nelson KE, Larsen AR and Skov RL. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST9 in pigs in Thailand. *PLOS ONE.* 7: e31245.
- Li B, Wendlandt S, Yao J, Liu Y, Zhang Q, Shi Z, Wei J, Shao D, Schwarz S, Wang S and Ma Z. 2013. Detection and new genetic environment of the pleuromutilin–lincosamide–streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of swine origin. *J Antimicrob Chemother.* 68: 1251-1255.
- Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørnum M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K and Ito T. 2011. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 3046-3050.
- Lim S-K, Nam H-M, Jang G-C, Lee H-S, Jung S-C and Kwak H-S. 2012. The first detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs in Korea. *Vet Microbiol.* 155: 88-92.
- Lulitanond A, Ito T, Li S, Han X, Ma XX, Engchanil C, Chanawong A, Wilailuckana C, Jiwakanon N and Hiramatsu K. 2013. ST9 MRSA strains carrying a variant of type IX SCC*mec* identified in the Thai community. *BMC Infect Dis.* 13: 214.
- Mroczkowska A, Zmudzki J, Marszałek N, Orczykowska-Kotyła M, Komorowska I, Nowak A, Grzesiak A, Czyżewska-Dors E, Dors A, Pejsak Z, Hryniewicz W, Wyszomirski T and Empel J. 2017. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* on Polish pig farms. *PLOS ONE* 12: e0170745.
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SF, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandanesch F, Fridkin S, O’Boyle C, Danila RN and Lynfield R. 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Am Med Assoc.* 290: 2976-2984.

- Neela V, Mohd Zafrul A, Mariana NS, van Belkum A, Liew YK and Rad EG. 2009. Prevalence of ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs and pig handlers in Malaysia. *J Clin Microbiol.* 47: 4138-4140.
- Oppliger A, Moreillon P, Charrière N, Giddey M, Morisset D and Sakwinska O. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains acquired by pig farmers from pigs. *Appl Environ Microbiol* 78: 8010-8014.
- Overesch G, Büttner S, Rossano A and Perreten V. 2011. The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland. *BMC Vet Res.* 7: 30.
- Patchanee P, Tadee P, Arjkumpa O, Love D, Chanachai K, Alter T, Hinjoy S and Tharavichitkul P, 2014. Occurrence and characterization of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig industries of northern Thailand. *J Vet Sci.* 15: 529-536.
- Perreten V, Chanchaithong P, Prapasarakul N, Rossano A, Blum SE, Elad D and Schwendener S. 2013. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome *mec* element ( $\Psi$ SCC $mec_{57395}$ ) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 5509-5515.
- 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.
- Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, Pearson T, Waters AE, Foster JT, Schupp J, Gillece J, Driebe E, Liu CM, Springer B, Zdovc I, Battisti A, Franco A, Zmudzki J, Schwarz S, Butaye P, Jouy E, Pomba C, Porrero MC, Ruimy R, Smith TC, Robinson DA, Weese JS, Arriola CS, Yu F, Laurent F, Keim P, Skov R and Aarestrup FM. 2012. *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio* 3.
- Robinson, D.A., Enright, M.C., 2004. Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements. *J Bacteriol.* 186: 1060-1064.
- Rodvold KA and McConeghy KW. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: Past, present, and future. *Clin Infect Dis.* 58: S20-S27.
- 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.
- Schnellmann C, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr MG, Thomann A, Straub R and Perreten V. 2006. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J Clin Microbiol.* 44: 4444-4454.

- Schoenfelder SMK, Dong Y, Feßler AT, Schwarz S, Schoen C, Köck R and Ziebuhr W. 2017. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Vet Microbiol.* 200: 79-87.
- Sergio DMB, Koh TH, Hsu L-Y, Ogden BE, Goh ALH and Chow PKH. 2007. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *J Med Microbiol.* 56: 1107-1109.
- Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S and Kreiswirth BN. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 37: 3556-3563.
- Sinlapasorn S, Lulitanond A, Angkititrakul S, Chanawong A, Wilailuckana C, Tavichakorntrakool R, Chindawong K, Seelaget C, Krasaesom M, Chartchai S, Wonglakorn L and Sribenjalux P. 2015. SCCmec IX in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from pigs and workers at pig farms in Khon Kaen, Thailand. *J Med Microbiol.* 64: 1087-1093.
- Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, Capuano AW, Herwaldt LA and Diekema DJ. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLOS ONE.* 4: e4258.
- 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.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A and Wondrack L. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 2562-2566.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B, 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33: 2233-2239.
- van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ, Allaart JG, van Nes A, Wagenaar JA and Fluit AC. 2008. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol.* 126: 383-389.
- van de Klundert JAM and Vliegenthart JS. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* Persing DH, Smith TF, Tenover FC, and White TJ (eds.). Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993, pp. 547–552.
- Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F and Butaye P. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidem Infect.* 138: 606-625.

- Vestergaard M, Cavaco L, Sirichote P, Unahalekhakac A, Dangsakul W, Svendsen C and Aarestrup F and Hendriksen R. 2012. SCCmec type IX element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus spa* type t337 (CC9) isolated from pigs and pork in Thailand. *Front Microbiol.* 3.
- Wagenaar JA, Yue H, Pritchard J, Broekhuizen-Stins M, Huijsdens X, Mevius DJ, Bosch T and Van Duijkeren E. 2009. Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol.* 139: 405-409.
- Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S and Kadlec K. 2013a. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int J Med Microbiol.* 303: 338-349.
- Wendlandt S, Li B, Lozano C, Ma Z, Torres C and Schwarz S. 2013b. Identification of the novel spectinomycin resistance gene *spw* in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 68: 1679-1680.
- Wendlandt S, Lozano C, Kadlec K, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C and Schwarz S. 2013c. 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: 473-475.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Chanchaithong P, Perreten V, Am-in N, Lugsomya K, Thummaruk P and Prapasarakul P. 2018.

First detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 with a composite staphylococcal cassette chromosome *mec* and heterogenous strains in pigs and swine workers from Central Thailand. Zoonoses and Public Health.

(Manuscript in Preparation)

2. ผลงานที่จะนำไปเสนอในงานประชุมวิชาการ The 9<sup>th</sup> International Conference on Antimicrobial

Agents in Veterinary Medicine (AAVM) ซึ่งจะจัดในวันที่ 16-19 ตุลาคม 2561 ณ กรุงโรม

ประเทศอิตาลี

1 **Journal**

2 Zoonoses and Public Health

3

4 **Original Article**

5 **Title**

6 First detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type

7 398 with a composite staphylococcal cassette chromosome *mec* and

8 heterogeneous strains in pigs and swine workers from Central Thailand

9

10 **Short running title**

11 First swine MRSA ST398 detected in Thailand

12

13 **Authors**

14 Pattrararat Chanchaithong<sup>1</sup>, Vincent Perreten<sup>2</sup>, Nutthee Am-in<sup>3</sup>, Kittitat

15 Lugsomya<sup>1</sup>, Padet Tummaruk<sup>3</sup> and Nuvee Prapasarakul<sup>1</sup>

16

17 **Author's affiliation institution**

18 <sup>1</sup>Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science,

19 Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

20 <sup>2</sup>Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse Faculty, University of Bern,

21 Bern CH-3001, Switzerland

22 <sup>3</sup>Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of

23 Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

24

25

26 **Summary**

27           The study aimed to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus*  
28 *aureus* (MRSA) colonizing pigs and swine workers in Central Thailand. MRSA  
29 were recovered from 59 of 607 (9.72%) from pig samples with 37.03% herd  
30 prevalence (10/27 farms) and from 3 of 38 swine workers. Of 63 isolates, the  
31 MRSA carried staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) V  
32 (n=41), SCC*mec* IX (n=9), a composite SCC*mec* (n=12) and non-typeable  
33 SCC*mec* (n=1). SCC*mec* IX was associated with MRSA-ST9-t337, MRSA-  
34 ST398-t034 and MRSA-ST4576-t034, a new single locus variant of ST9.  
35 Other SCC*mec* were carried by MRSA-ST398-t034 only, except one negative  
36 *spa* amplification. The isolates exerted multidrug resistance and carried  
37 common resistance genes found in livestock-associated MRSA such as  
38 *Isa*(E), *Inu*(B), *cfr*, *fexA*, *vga*(A) and *spw*. With molecular characteristics,  
39 resistance and PFGE patterns supported evidence of clonal spreading and  
40 pig-to-human transmission. This is also the first report of MRSA ST398  
41 distributing in swine herds and workers and the presence of multidrug  
42 resistance *cfr* in ST9 in Thailand. Minor variation of molecular features and  
43 resistance gene carriage in both STs represented heterogeneous population  
44 and evolution of endemic clones. Monitoring program and farm management  
45 with prudent antimicrobial uses are needed to reduce the emergence and  
46 spreading. Together, strict hygiene and personal protection are necessary to  
47 prevent the acquired LA-MRSA in humans.

48

49 **Keywords:**

50 Central Thailand; Heterogeneity; Pigs; MRSA; Swine workers



## 51 **Impact**

- 52 • Swine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 was  
53 firstly detected in Thailand presenting the spread of major livestock-  
54 associated (LA-) MRSA clone in the country.
- 55 • Heterogeneous MRSA clonal complex (CC) 398 and CC9 containing  
56 various staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types  
57 and resistance genes illustrated endemic evolution of the LA-MRSA.
- 58 • Identical characteristics supported evidences of pig-to-worker  
59 transmission and distribution in pigs in this region.
- 60 • The first finding of *cf*r in the swine MRSA alarmed an emergence of  
61 resistance to critically-important antimicrobials in human medicine.

## 63 **Introduction**

64 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of major  
65 resistance bacteria opportunistically causes serious infections with limited  
66 antimicrobial treatment option (Rodvold & McConeghy, 2014). Antimicrobial  
67 uses in livestock production were associated with emergence of livestock-  
68 associated MRSA (LA-MRSA) specifically clonally spreading worldwide  
69 (Barton, 2014). Pigs are recognized as a reservoir of LA-MRSA that can be a  
70 source of transmission to humans, especially in swine workers and their  
71 household members, and foodborne transmission by contamination in meat  
72 products (Vestergaard *et al.*, 2012). By multilocus sequence typing (MLST),  
73 LA-MRSA is commonly specific to sequence type (ST) 398, ST9 and ST49  
74 (Cuny *et al.*, 2015, Overesch *et al.*, 2011). In addition to resistance to  $\beta$ -  
75 lactams, LA-MRSA can usually mediate multidrug resistance by accumulation

76 of mobile elements encoding multiple resistance mechanisms and commonly  
77 contains uncommon resistance genes, which are not found in human MRSA.  
78 MRSA-ST398 is firstly detected in France and has increasingly reported in  
79 Europe and North America, but in Asia this clone is endemic only in few  
80 countries, and has not been detected in livestock in Thailand. In Asian  
81 countries, MRSA-ST9 is endemic in China, Hong Kong, Taiwan, Malaysia and  
82 Thailand (Chuang & Huang, 2015). Previous studies proposed pigs and swine  
83 workers in northern and northeastern parts of Thailand carry MRSA-ST9  
84 (Sinlapasorn *et al.*, 2015, Larsen *et al.*, 2012, Patchanee *et al.*, 2014, Anukool  
85 *et al.*, 2011), and infection by this clone was found in community (Lulitanond  
86 *et al.*, 2013). Evidences of MRSA-ST398 colonizing human and canine hosts  
87 were reported (Li *et al.*, 2011, Chanchaithong *et al.*, 2014), but livestock origin  
88 of this ST is still unknown in the country. The central part of Thailand is a  
89 region for swine production, but epidemiological information of LA-MRSA is  
90 relatively rare. Thus, the objectives of this study were to detect MRSA in pigs  
91 and swine workers in Central Thailand and to reveal its genotypic  
92 characteristics as well as antimicrobial resistance phenotypes and genes.

93

## 94 **Materials and Methods**

### 95 *Sources of sample*

96 From May 2015 to April 2017, 607 swine samples were obtained by  
97 nasal swabbing from pigs in 27 farms located in Central Thailand, including  
98 Nakhon Pathom (2 farms, NP1-NP2) , Ratchaburi (1 farm, RB1),  
99 Kanchanaburi (2 farms, KB1-KB2), Suphanburi (10 farms, SB1-SB10) and  
100 Prachinburi (8 farms, PB1-PB8) Provinces, and Nakhon Ratchasima Province

101 (4 farms, NR1-NR4). Two farms were farrow-to-finish (FF) holdings, and 12  
102 and 13 farms were farrow-to-wean (FW) and wean-to-finish (WF) holdings,  
103 respectively. Pigs in different age-group included 80 sows, 210 suckling  
104 piglets aged <3 weeks (S-piglets), 156 nursery pig aged 3-8 weeks (N-pigs)  
105 and 161 fattening pigs aged >8 weeks (F-pigs). All FF and WF farms used in-  
106 feed antimicrobials consisting of amoxicillin and tiamulin in nursery period,  
107 and no in-feed antimicrobial was prescribed in sows, S-piglets and F-pigs in  
108 all farms. Samples from three piglets per litters were pooled, and individual  
109 sampling was performed in other age-groups. Sampling protocol was  
110 approved by The Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee  
111 (CU-ACUC) with the Animal Use Protocol No. 1631051.

112         Thirty-eight swine workers from 16 farms were consented for human  
113 sampling by nasal swabbing at the same period. The protocol was approved  
114 by The Ethics Review Committee for Research Involving Human Research  
115 Subjects, Health Sciences Group, Chulalongkorn University (No. 198.1/59).  
116 Preserved swabs in Stuart's transport medium (Difco, France) at 4 °C were  
117 sent for culture within 24 h. The Chulalongkorn University Faculty of  
118 Veterinary Science Biosafety Committee (CU-VET-BC) certified biosafety of  
119 the study providing the Biosafety Use Protocol No. IBC1631037.

120

#### 121 *MRSA isolation and identification*

122         Swabs were inoculated in 5 mL of Müller-Hinton Broth (Difco, France)  
123 with 6.5% NaCl and 4 µg/ml cefoxitin. The 0.5 mL of first inoculum was  
124 transferred into 4.5 mL of phenol red mannitol broth with 3.5 µg/ml cefoxitin  
125 before plating onto tryptic soy agar with 5% sheep blood. Each step required

126 incubation at 32°C for 48 h. Hemolytic *S. aureus* colonies were selected and  
127 primarily identified by gram-positive coccal staining, positive catalase and  
128 coagulase production. Presence of 359-bp *nuc* amplification by PCR  
129 genotypically identified *S. aureus* (Sasaki *et al.*, 2010). Bacterial DNA was  
130 isolated using Nucleospin® Tissue DNA extraction kit (Machery-Nagel,  
131 Germany). Cefoxitin disk diffusion test and *mecA* PCR were employed for  
132 methicillin resistance detection (EUCAST, 2017) (Strommenger *et al.*, 2003).

133

#### 134 *Antimicrobial susceptibility*

135 Minimal inhibitory concentration (MIC) of 19 drugs including cefoxitin  
136 (FOX), penicillin (PEN), tetracycline (TET), gentamicin (GEN), kanamycin  
137 (KAN), streptomycin (STR), erythromycin (ERY), clindamycin (CLI),  
138 ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CHL), rifampicin (RIF), tiamulin (TIA),  
139 sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), mupirocin (MUP), fusidic acid  
140 (FUS), dalfopristin/quinupristin (SYN), linezolid (LZD) and vancomycin (VAN)  
141 were determined by broth microdilution assay using EUST customized plate  
142 (Trek Diagnostic Systems Ltd, UK). Inducible clindamycin (iCLI) resistance  
143 was detected by D-zone test. Resistance was interpreted according to  
144 breakpoints recommended by The European Committee on Antimicrobial  
145 Susceptibility Testing ([www.EUCAST.org](http://www.EUCAST.org)).

146

#### 147 *Molecular typing*

148 All MRSA isolates were characterized by staphylococcal cassette  
149 chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)  
150 and *spa* typing. SCC*mec* were typed by two multiplex PCR panels classifying

151 *ccr* complex and *mec* complex (Kondo *et al.*, 2007). DNA fingerprint analysis  
152 was performed using *Cfr9I*-macrorestricted PFGE. Briefly, bacterial cells  
153 embedded in 0.9% Seakem Gold agarose (Lonza, Rockland, ME) were lysed  
154 by lysostaphin, lysozyme and detergents before chromosomal DNA digestion  
155 by 50U of *Cfr9I* (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) (Argudín *et al.*,  
156 2010). Macrorestriction fragments were separated using CHEF-DRIII PFGE  
157 (Bio-Rad, Hercules, CA) with a switch time 5–40 s and a voltage of 6 V cm<sup>-1</sup>  
158 for 21 h). Dendrogram was constructed to illustrate genetic relatedness by  
159 Gene Directory Software (Syngene, Cambridge, UK), using Dice coefficient  
160 with unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) and  
161 position tolerance at 1.0%, and more than 80% band similarity were clustered  
162 in the same group (Figure 1). Polymorphic X region of *spa* gene was amplified  
163 and sequenced for *spa* typing (<http://spaserver.ridom.de>) (Harmsen *et al.*,  
164 2003). Representative isolates from different host and farm origins exhibiting  
165 different SCC*mec* types, *spa* types and DNA fingerprint patterns were  
166 selected for MLST analysis (Enright *et al.*, 2000). Seven housekeeping genes  
167 were sequenced for MLST as described ([www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)).

168

#### 169 *Resistance gene detection*

170 Gram-positive resistance genes were screened in representative  
171 isolates by customized DNA microarray tube version AMR+ve-5 (Alere  
172 Technologies GmbH, Jena, Germany) (Perreten *et al.*, 2005). PCR were used  
173 to illustrate the presence of specific resistance genes in all MRSA isolates  
174 (Supplementary Table).

175

176 **Results**

177 *MRSA distribution*

178 Of 607 pig samples, 59 (9.72%) were MRSA-positive from 10 of 27  
179 farms (NP2<sup>FF</sup>, RB1<sup>FF</sup>, SB1<sup>FW</sup>, SB7<sup>WF</sup>, PB1<sup>FW</sup>, PB6<sup>WF</sup>, PB7<sup>WF</sup>, PB8<sup>WF</sup>, NR2<sup>WF</sup>  
180 and NR3<sup>WF</sup>). MRSA were isolated from three of 38 swine workers from three  
181 farms (NP2<sup>FF</sup>, SB1<sup>FW</sup> and PB4<sup>WF</sup>). Two positive swine workers were from  
182 farms with MRSA-positive pigs, and another was from a farm with negative  
183 MRSA isolation from pig (PB4<sup>WF</sup>). MRSA were found in pigs from 2/2 FF  
184 farms (NP2<sup>FF</sup> and RB1<sup>FF</sup>), 2/12 FW farms (SP1<sup>FW</sup> and PB1<sup>FW</sup>) and 6/13 WF  
185 farms (PB6<sup>WF</sup>, PB7<sup>WF</sup>, PB8<sup>WF</sup>, SP7<sup>WF</sup>, NR2<sup>WF</sup> and NR3<sup>WF</sup>). Both MRSA-  
186 positive FW farms had history of supplying piglets to the MRSA-positive WF  
187 farms. Table 1 summarizes MRSA carriage in different age-groups of pig and  
188 worker from the positive farms.

189

190 *Molecular characteristics*

191 A total of 63 MRSA isolates, including 60 swine and three human  
192 MRSA isolates were included for SCC*mec* typing, *spa* typing and DNA  
193 fingerprint analysis (Table 1). Three SCC*mec* types were identified in the  
194 MRSA isolates including SCC*mec* V (n=41), IX (n=9) and a novel SCC*mec*  
195 composite island (CI) (n=12), consisting of *ccrA1B1*, *ccrC* and class C *mec*  
196 complex, and one isolate was non-typeable having negative *ccr* and *mec*  
197 amplification. *Spa* types of the isolates were t034 (n=55) and t337 (n=7), and  
198 one isolate presented negative X-region of *spa* amplification.

199 PFGE dendrogram illustrated 5 clusters (A to E) in Figure 1. Band  
200 patterns of the isolates from the same farm with the same SCC*mec* type, *spa*

201 type and antimicrobial resistance profile were identical. PFGE cluster analysis  
202 was consistent with MLST, *SCCmec* and *spa* typing. The representative  
203 isolates belonged to three STs including ST398, ST9 and ST4576. The  
204 ST4576 was a new single locus variant (SLV) of ST9 by a substitution  
205 mutation (C335T) of *glpF*, resulting in allelic profile 3-3-625-1-1-1-10 which  
206 belonged to clonal complex (CC) 9. MRSA-ST9 and MRSA-ST4576 harbored  
207 *SCCmec* IX and had *spa* t337 and t034, respectively. MRSA-ST398 were  
208 associated with *spa* t034 only and grouped in PFGE cluster C, D and E, but  
209 one isolate was *spa*-negative and carried *SCCmec* IX. *SCCmec* V and the  
210 *SCCmec* CI were found in MRSA-ST398 isolates, and *SCCmec* of one ST398  
211 isolate could not be classified.

212

### 213 *Antimicrobial resistance phenotypes and genes*

214 Antimicrobial resistance phenotypes and genes are illustrated in Table  
215 2. All MRSA isolates exhibited resistance to PEN, FOX, CLI, TET, STR, CIP,  
216 TIA and TMP. Resistance to VAN, RIF, FUS and MUP and iCLI resistance  
217 were not found in all isolates. The isolates showed resistance to ERY (60/63),  
218 GEN and KAN (21/63), CHL (8/63), SYN (61/63) and SMX (5/63). By gene  
219 detection, most of isolates had *mecA*, *blaZ* and *dfrG*. Three *tet* genes were  
220 detected including *tet(M)* (63/63), *tet(K)* (55/63) and *tet(L)* (5/63). Only three  
221 isolates carried single *tet(M)*, but 60 isolates carried two *tet* genes, including  
222 *tet(M)+tet(L)* (5/63) and *tet(M)+tet(K)* (55/63). Genes encoding  
223 aminoglycoside-modifying enzymes were found including *aadD* (60/63), *aadE*  
224 (55/63) and bifunctional *aacA-aphD* (21/63). Sixty isolates carried  
225 erythromycin resistance methylase gene including single *erm(B)* (5/63) or

226 *erm(C)* (34/63) and *erm(A)+erm(C)* (8/63) and *erm(A)+erm(B)* (13/63). The  
227 same 55 isolates contained genes encoding lincosamide-nucleotidyl  
228 transferase (*Inu(B)*), ABC exporter (*Isa(E)*) and spectinomycin  
229 adenylyltransferase (*spw*), and *spc* and *vga(A)* and *cfr* gene was found in 21, 8  
230 and 5 isolates, respectively. Two genes encoding phenicol resistance  
231 mechanisms were detected including *fexA* (5/63) and *cat<sub>pC221</sub>* (3/63), and *cfr*  
232 mediating ribosomal methylase was detected in the same *fexA*-positive  
233 isolates.

234

#### 235 *Clonal relatedness of MRSA from different origins*

236 MRSA ST398 distributed in nine swine farms in Central Thailand. With  
237 genotypic characteristics, MRSA-ST398-V-t034-C (ST-SCC*mec-spa*-PFGE  
238 cluster) colonizing pigs in PB1<sup>FW</sup>, PB7<sup>WF</sup>, PB8<sup>WF</sup>, NR2<sup>WF</sup>, NR3<sup>WF</sup>, SB1<sup>FW</sup> and  
239 SB7<sup>WF</sup> was the most prevalent characteristics. Isolates from SB farms  
240 contained additional *erm(A)* and *spc* which were not found in those from PB  
241 and NR farms. The SB1<sup>FW</sup> and PB1<sup>FW</sup> supplied piglets to SB7<sup>WF</sup> and PB7<sup>WF</sup>,  
242 PB8<sup>WF</sup>, NR2<sup>WF</sup> and NR3<sup>WF</sup>, respectively that shared the strains with same  
243 genotypic and antimicrobial resistance characteristics. These particular strains  
244 from sows and piglets in each FW farm also had identical characteristics. One  
245 MRSA ST398-IX-neg-C was also found in a pig from PB7<sup>WF</sup>. MRSA ST398-  
246 CI-t034-E and MRSA-ST398-NT-t034-E were recovered from NP2<sup>FF</sup> only. A  
247 closely-related ST398-CI-t034-D was isolated the swine MRSA-negative  
248 PB4<sup>WF</sup>. MRSA CC9 isolates were found in pigs in three farms (RB1, PB6 and  
249 PB8). MRSA-ST9-IX-t337-A expressing linezolid resistance was found in  
250 RB1<sup>FF</sup>, but those from PB6<sup>WF</sup> were susceptible to linezolid and lacked *cfr*,



251 *fexA* and *erm(B)*. The MRSA-ST4576-IX-t034-A from PB8<sup>WF</sup> shared the same  
252 resistance phenotype and gene pattern with MRSA-ST9-IX-t337-A isolates  
253 from PB6<sup>WF</sup>. Human MRSA-ST398-V-t034-C and ST398-CI-t034-E isolates  
254 had the identical characteristics with the swine isolates from the same farm  
255 origins.

256

## 257 **Discussion**

258 This study presents the prevalences of MRSA-positive swine herds  
259 (37.03%) and pigs (10.21%) in Central Thailand and the distribution in this  
260 area. Previous studies reported herd prevalences of MRSA ranged 9.61-  
261 25.00% and prevalences in pigs are 0.62-10% in northern and northeastern  
262 parts of Thailand (Anukool et al., Patchanee et al., 2014, Larsen et al., 2012,  
263 Sinlapasorn et al., 2015). High up to 40% (6/15) of MRSA-positive pigs in a  
264 farm in Samuth Songkhram province of central Thailand is indicated  
265 (Vestergaard et al., 2012). Pigs in swine industry are considered as a  
266 reservoir for LA-MRSA in Europe, the US and Asian countries (Graveland et  
267 al., 2011, Chuang & Huang, 2015, Smith, 2015). A recent study from Portugal  
268 showed the highest prevalence up to 99% in piglets (Conceição et al., 2017).  
269 The variation of proportion might be affected by many factors of the studies  
270 such as isolation procedures, sampled populations and geographical areas.  
271 Evidence showed 100% of 9-12-week-old pigs are MRSA carrier, and 36% of  
272 adults are colonized (Smith et al., 2009). Colonization rates in pigs younger  
273 than 12 weeks are significantly higher (Fang et al., 2014, Smith et al., 2009).  
274 Accordingly, colonization was higher in early stage of cultivation that seemed  
275 to be the most susceptible period. Transmission and proliferation in this period

276 could be promoted by pooled grouping of pigs and in-feed antimicrobial  
277 selective pressure (Broens *et al.*, 2012). The 7.89% prevalence in swine  
278 workers were relatively low, compared to 20-80% from previous studies  
279 (Smith *et al.*, 2009, Conceição *et al.*, 2017, Khanna *et al.*, 2008, Oppliger *et*  
280 *al.*, 2012). High density and large-scale farming are indicated as a risk for  
281 human colonization by LA-MRSA (Fang *et al.*, 2014, Battisti *et al.*, 2010).  
282 Several transmission routes can promote MRSA circulation in endemic farms  
283 including direct and indirect contact, airborne and environmental  
284 contamination (Broens *et al.*, 2012, Friese *et al.*, 2012, Broens *et al.*, 2011).  
285 Even lower colonization in fattening stage, presence of MRSA in slaughtering  
286 processes and pork has been evidenced (Vestergaard *et al.*, 2012, Beneke *et*  
287 *al.*, 2011). Contamination in products should be further investigated to know  
288 current possibility for foodborne transmission. As an occupational risk, strictly  
289 personal hygiene, monitoring and infection control program are highly  
290 recommended to reduce the risk of swine MRSA colonization in related  
291 personnel.

292         The MRSA isolates belonged to CC398 and CC9 which are major  
293 livestock-associated clones distributing worldwide and Asia, respectively. This  
294 is the first detection of swine MRSA-ST398 distribution in Thailand, whilst  
295 MRSA-ST9 have been previously isolated (Larsen *et al.*, 2012, Sinlapasorn *et*  
296 *al.*, 2015). Widespread MRSA-ST398 is the predominant LA-MRSA  
297 disseminating in many parts of the world. Over a decade, this is recognized as  
298 the major LA-MRSA clone in Europe, North America and can be found only in  
299 some Asian countries including South Korea and Singapore (Lim *et al.*, 2012,  
300 Sergio *et al.*, 2007). Only a single *spa* t034 was associated in Thai MRSA-

301 ST398 strains representing shared common ancestral subtype of this clone  
302 disseminating in the country and Asia (Lim et al., 2012, Asai *et al.*, 2012).  
303 Despite t034 is one of the predominant *spa* types found in MRSA CC398 in  
304 Europe, others such as t011, t108 and t889 are also prevalent and  
305 heterogeneous (Battisti et al., 2010, Conceição et al., 2017, Mroczkowska *et*  
306 *al.*, 2017, Kadlec *et al.*, 2009, van Duijkeren *et al.*, 2008). MRSA-ST9 was  
307 also found in as same as in the northern and northeastern provinces  
308 (Patchanee et al., 2014, Sinlapasorn et al., 2015), but was less prevalent than  
309 ST398 in central Thailand. Likewise, MRSA ST9 distributed in many Asian  
310 countries, but different *spa* types associated with this clone in mainland China  
311 and Hong Kong (t899), Taiwan (t337, t1430) and Malaysia (t4358) (Wagenaar  
312 *et al.*, 2009, Fang et al., 2014, Guardabassi *et al.*, 2009, Neela *et al.*, 2009).  
313 Swine *S. aureus*-ST9 usually are methicillin-susceptible from European  
314 reports (Mroczkowska et al., 2017, Kehrenberg *et al.*, 2009). Not at all,  
315 MRSA-ST9-t4794 strains was firstly detected in Italian finishing herds (Battisti  
316 et al., 2010). Indeed, only two *spa* types (t034 and t337) were detected and  
317 were virtually specific to MRSA-ST398 and MRSA-ST9 in our study,  
318 respectively. These represented dual endemic major LA-MRSA clones spread  
319 in Thai swine herds in the central part.

320 SCC*mec* V and SCC*mec* CI were identified in MRSA ST398-t034. The  
321 SCC*mec* V, consisting of class C *mec* complex and type 5 *ccr* complex, is  
322 more common in MRSA CC398 (Vanderhaeghen *et al.*, 2010). MRSA-ST398  
323 and other staphylococcal species isolated from canine and human sources in  
324 Thailand also carried SCC*mec* V suggesting the most common SCC*mec* of  
325 strains derived from animals in the country (Chanchaithong et al., 2014). The

326 novel SCC*mec* CI classified by the presence of two *ccr* sets (*ccrA1B1* and  
327 *ccrC*) was harbored by swine and human MRSA-ST398-t034. These *ccr*  
328 components possibly illustrated a hybrid form between SCC*mec* V and  
329 SCC*mec* IX that both are commonly found in MRSA from Thailand. The  
330 SCC*mec* IX is firstly identified from the MRSA-ST398 strain from a Thai swine  
331 practitioner and were widely reported in MRSA-ST9 from swine and related  
332 workers (Sinlapasorn et al., 2015, Li et al., 2011). It is speculated that type V  
333 and IX SCC*mec* and the CI could be evolved in the endemic strains in the  
334 country. The complete structure of SCC*mec* CI<sub>AI16</sub> in *S. pseudintermedius* was  
335 firstly misclassified as a single combination between class A *mec* complex  
336 and type 1 *ccr* complex using multiplex PCR with non-specific *ccrB* primer  
337 (Chanchaithong et al., 2014, Chanchaithong et al., 2016). Therefore, the  
338 formation of new SCC*mec* CI or structure of non-typeable SCC*mec* need to  
339 be described by complete cassette sequencing in further study. The MRSA-  
340 ST9-t337 carried SCC*mec* IX distributing in central Thailand were consistent  
341 with the previous reports, but association between ST4576 in CC9 carrying  
342 SCC*mec* IX and t034 was firstly identified. A common *spa* t899 in European  
343 MRSA-ST398 is also found in MRSA-ST9 carrying SCC*mec* IV or V  
344 (Guardabassi et al., 2009, Fang et al., 2014). With the shared SCC*mec* IX  
345 and *spa* t034, a supporting evidence suspects that horizontal transfer of large  
346 fragment including *spa* region and SCC*mec* between ST9 and ST398 could  
347 be possible as well as a hybridization of ST8-like and ST30-like chromosome  
348 in ST239 (Price et al., 2012, Robinson & Enright, 2004). Besides, many  
349 reports show major *spa* t337 associated with methicillin-susceptible *S.*  
350 *aureus*-ST9, and MRSA-ST9 from other countries carry IV and V suggest that

351 the endemic Thai MRSA-ST9 had a specific acquisition of SCC*mec* IX in  
352 swine population in the country. The current findings of heterogeneous  
353 characteristics by STs, various SCC*mec* and ectopic *spa* could infer  
354 continuous evolution of LA-MRSA in Thai swine herds.

355 All MRSA expressed multidrug resistance phenotypes and carried  
356 multiple resistance genes. Most of resistance gene families are found in  
357 staphylococci and gram-positive species, conferring resistance to common  
358 available antimicrobial classes used in human and veterinary medicine.  
359 Resistance to some drugs could be mediated by more than a single  
360 mechanism or gene such tetracycline, erythromycin and clindamycin,  
361 reflecting high accumulation of acquired resistance determinants. Liked LA-  
362 MRSA isolated previously, *tet* genes were carried in the isolates, including  
363 transposon-borne *tet*(M) and plasmid-borne *tet*(K) or *tet*(O), and *erm*(A),  
364 *erm*(B) and *erm*(C) abundantly disseminated in LA-MRSA (Wendlandt *et al.*,  
365 2013). Dihydrofolate reductase gene *dhfr*G was found in both CC9 and CC398  
366 from pigs and swine workers, but MRSA-ST398 from canine and veterinarians  
367 from our previous study contained *dhfr*A (Chanchaithong *et al.*, 2014). This  
368 minor difference possibly means distinct events of gene acquisition and  
369 different spreading of ST398 subpopulation among pigs, dogs and related  
370 humans in Thailand. Resistance gene carriage and resistance phenotypes of  
371 were mostly specific to molecular characteristics and origins of the isolates.  
372 Bifunctional *aacA-aphD* was carried in the MRSA CC9 and MRSA-ST398-  
373 SCC*mec* CI, but not in MRSA-ST398-SCC*mec* V. The CC9 isolates exhibited  
374 CHL resistance from different resistance genes from different farms. Those  
375 from RB1<sup>FF</sup> carried *fexA* and *cfr*, which having genetic linkage on Tn558

376 (Kehrenberg & Schwarz, 2006), whereas other CC9 isolates had the plasmid-  
377 borne *cat*<sub>pC221</sub>. Presence of *cfr* is highly concerned as a public health threat  
378 due to the cross-resistance activity to streptogramin A and oxazolidinones,  
379 last-resort antimicrobial groups for treatment of serious MRSA infections. All  
380 CC9 and ST398 isolates harbored *vga(A)* and *lsa(E)* mediating lincosamide-  
381 pleuromutilin-streptogramin A resistance, respectively. The co-localization of  
382 *lsa(E)* and *Inu(B)* is firstly detected on the multidrug resistance plasmid  
383 pV7037 carrying *aadE*, *aacA-aphD* and *erm(B)* of MRSA-ST9-t899 (Li *et al.*,  
384 2013). These genes could be found in MRSA-ST398-SCC*mec* CI and ST398-  
385 SCC*mec* V from Suphanburi. The difference of resistance gene carriage in  
386 MRSA-ST398 lineage in this study supported different and continuous genetic  
387 alteration for the evolution of mobile elements in LA-MRSA strains. Also,  
388 MRSA-ST398 strains had *spw*, while only SCC*mec* CI-carrying strains carried  
389 physically-linked *erm(A)* and *spc* (Feßler *et al.*, 2010). The *vga(A)*, *lsa(E)*,  
390 *Inu(B)*, *cfr*, *fexA*, *spc* and *spw* are uncommon resistance genes in human  
391 MRSA but widespread in MRSA from animal origins that are acquired by  
392 bacteria in the same niches and antimicrobial exposure in livestock (Kadlec *et*  
393 *al.*, 2012). Resistance to VAN, RIF, FUS and MUP were absent as well as  
394 rarely found in other studies. However, *ileS2*-carrying ST398 exhibiting high-  
395 level mupirocin resistance is found reflecting the risk of introduction of this  
396 drug in small animal medicine (Chanchaithong *et al.*, 2014). As evidenced,  
397 these MRSA CC9 and ST398 from different sources showed heterogeneous  
398 accumulation of acquired resistant determinants to be successful clones in  
399 animals in the country.

400 Clonal distribution, endemic circulation and pig-to-human transmission  
401 in among these populations could be supported by their identical features.  
402 MRSA-ST9-IX-t337-A carrying *cfr* and *fexA* and MRSA-ST398-CI-t034-E  
403 could be recovered from RB1<sup>FF</sup> and NP2<sup>FF</sup> presenting specific subclonal  
404 lineages circulating in the farms. Also, identical characteristics of swine and  
405 human strains from NP2<sup>FF</sup> and SB1<sup>FW</sup> demonstrated possible pig-to-human  
406 transmission of LA-MRSA (Table 2). MRSA-ST398-NT-t034-E and MRSA-  
407 ST398-IX-neg-C were heterogeneously recovered and were in the same  
408 PFGE cluster with the major strains from pigs in NP2<sup>FF</sup> and PB7<sup>WF</sup>,  
409 respectively, presenting minor changes from the main lineages in  
410 hypervariable regions as *SCCmec* and *spa*. Also in CC9, MRSA-ST9-IX-t337  
411 in PB6<sup>WF</sup> and MRSA-ST4576-IX-t034 in PB8<sup>WF</sup> had minor variant by a single  
412 locus mutation, *spa* type and acquisition of resistance genes. Identical  
413 characteristics of MRSA-ST398-V-t034-C with the resistance gene patterns  
414 supported transmission between farms having history of supplying from  
415 PB1<sup>FW</sup> and SB1<sup>FW</sup>. MRSA-ST398-CI-t034 also contained *erm(A)*, *erm(B)*,  
416 *aacA-aphD* and *spc* which were not found in MRSA-ST398-V-t034 suggesting  
417 divergent evolution in this clone mediated by genetic recombination and  
418 horizontal transfer. Only ST398 was recovered from swine workers in our  
419 population, but human colonization by MRSA-ST9 is also demonstrated in  
420 Thailand. Both associated with infection have been increasingly reported  
421 worldwide that are suspected as livestock-to-community spreads (Lulitanond  
422 et al., 2013).

423 This study provides more details about molecular epidemiological  
424 information of LA-MRSA spreading in swine herds and workers in Thailand.

425 MRSA ST398 was also endemic in the country and illustrated heterogeneous  
426 features as well as MRSA ST9. Transmission to human was also possible that  
427 considered as an occupational risk. Presence of *cf* alarmed an emergence of  
428 resistance to critically-important drugs in human medicine. Monitoring in  
429 products, other livestock, and human clinical cases can fulfill the current  
430 situation in one health concept in the country. Personal protection and strict  
431 hygiene, farm management and judicious antimicrobial use need to be  
432 promoted to reduce the emergence and spread to human.

433

#### 434 **Acknowledgements**

435 This study was supported by the TRF Grant of New Scholar (No.  
436 MRG5980024) and TRF Senior Scholarship to Alongkorn Amonsin (No.  
437 RTA6080012) from The Thailand Research Fund and the Grant for  
438 Development of New Faculty Staff, Ratchadaphiseksomphot Endowment  
439 Fund (No. DNS 60-003-31-001-2) from Chulalongkorn University. We thank  
440 Alexandran Collaud from University of Bern, Switzerland and Jitrapa Yindee,  
441 Nitisit Dokkhan, Nuttaphop Thamkittikhun, Pawarut Narongpun and Stayu  
442 Tantanasarn from Chulalongkorn University, Thailand for the technical  
443 assistance. The authors gratefully acknowledge Keith Jolley from University of  
444 Oxford, UK for assigning a new allelic number and sequence type and the  
445 cooperation of pig farmers for participating this study.

446

#### 447 **Conflict of Interest Statement**

448 None

449



450 **References**

- 451 Anukool, U., O'Neill, C. E., Butr-Indr, B., Hawkey, P. M., Gaze, W. H. &  
452 Wellington E. M. H. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
453 *in pigs from Thailand*. International Journal of Antimicrobial Agents, 38,  
454 86-87. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.018
- 455 Argudín, M. A., Rodicio, M. R. & Guerra B. (2010). The emerging methicillin-  
456 resistant *Staphylococcus aureus* ST398 clone can easily be typed  
457 using the *Cfr9I Smal*-neoschizomer. Letters in Applied Microbiology,  
458 50, 127-130. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02742.x.
- 459 Asai, T., Hiki, M., Baba, K., Usui, M., Ishihara K. & Tamura, Y. (2012).  
460 Presence of *Staphylococcus aureus* ST398 and ST9 in swine in Japan.  
461 Japanese Journal of Infectious Diseases, 65, 551-552.
- 462 Barton, M. D. (2014). Impact of antibiotic use in the swine industry. Current  
463 Opinion in Microbiology, 19, 9-15. doi:10.1016/j.mib.2014.05.017.
- 464 Battisti, A., Franco, A., Meriardi, G., Hasman, H., Iurescia, M., Lorenzetti, R.,  
465 Feltrin, F., Zini, M. & Aarestrup, F. M. (2010). Heterogeneity among  
466 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing  
467 holdings. Veterinary Microbiology, 142, 361-366.  
468 doi:10.1016/j.vetmic.2009.10.008.
- 469 Beneke, B., Klees, S., StÜhrenberg, B., Fetsch, A., Kraushaar, B. and  
470 Tenhagen, B.-A. (2011). Prevalence of methicillin-resistant  
471 *Staphylococcus aureus* in a fresh meat pork production chain. Journal  
472 of Food Protection, 74, 126-129. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-250.
- 473 Broens, E. M., Espinosa-Gongora, C., Graat, E. A., Vendrig, N., van Der Wolf,  
474 P. J., Guardabassi, L., Butaye, P., Nielsen, J. P., De Jong, M. C. & van

475 De Giessen, A. W., 2012: Longitudinal study on transmission of MRSA  
476 CC398 within pig herds. BMC Veterinary Research, 8, 58.  
477 *doi:10.1186/1746-6148-8-58.*

478 Broens, E. M., Graat, E. A. M., van der Wolf, P. J., van de Giessen, A. W.,  
479 van Duijkeren, E., Wagenaar, J. A., van Nes, A., Mevius, D. J. & de  
480 Jong M. C. M. (2011). MRSA CC398 in the pig production chain.  
481 Preventive Veterinary Medicine, 98, 182-189.  
482 *doi:10.1016/j.prevetmed.2010.10.010.*

483 Chanchaithong, P., Perreten, V., Schwendener, S., Tribuddharat, C.,  
484 Chongthaleong, A., Niyomtham, W. & Prapasarakul, N., 2014: Strain  
485 typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant coagulase-  
486 positive staphylococcal species in dogs and people associated with  
487 dogs in Thailand. Journal of Applied Microbiology, 117, 572-586.  
488 *doi:10.1111/jam.12545.*

489 Chanchaithong, P., Prapasarakul, N., Perreten, V. & Schwendener, S. (2016).  
490 Characterization of a novel composite staphylococcal cassette  
491 chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus*  
492 *pseudintermedius* from Thailand. Antimicrobial Agents and  
493 Chemotherapy, 60, 1153-1157. *doi:10.1128/AAC.02268-15.*

494 Chuang, Y.-Y. & Huang, Y.-C. (2015). Livestock-associated methicillin-resistant  
495 *Staphylococcus aureus* in Asia: An emerging issue? International  
496 Journal of Antimicrobial Agents, 45, 334-340.  
497 *doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.12.007.*

498 Conceição, T., de Lencastre, H. & Aires-de-Sousa, M. (2017). Frequent  
499 isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398

500 among healthy pigs in Portugal. PLOS ONE, 12, e0175340.  
501 [doi:10.1371/journal.pone.0175340](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175340).

502 Cuny, C., Wieler, L. & Witte, W. (2015). Livestock-associated MRSA: The  
503 impact on humans. *Antibiotics*, 4, 521-543.  
504 [doi:10.3390/antibiotics4040521](https://doi.org/10.3390/antibiotics4040521)

505 Enright, M. C., Day, N. P. J., Davies, C. E., Peacock, S. J. & Spratt B. G.  
506 (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-  
507 resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*.  
508 *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1008-1015.

509 Fang, H.-W., Chiang P.-H. & Huang, Y.-C. (2014). Livestock-associated  
510 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST9 in pigs and related  
511 personnel in Taiwan. PLOS ONE, 9, e88826.  
512 [doi:10.1371/journal.pone.0088826](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088826).

513 Feßler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S. & Schwarz, S.  
514 (2010). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
515 ST398 from cases of bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial*  
516 *Chemotherapy*, 65, 619-625. [doi:10.1093/jac/dkq021](https://doi.org/10.1093/jac/dkq021).

517 Friese, A., Schulz, J., Hoehle, L., Fetsch, A., Tenhagen, B.-A., Hartung, J. &  
518 Roesler, U. 2012: Occurrence of MRSA in air and housing environment  
519 of pig barns. *Veterinary Microbiology*, 158, 129-135.  
520 [doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.019](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.019).

521 Graveland, H., Duim, B., van Duijkeren, E., Heederik, D. & Wagenaar, J. A.  
522 (2011). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus*  
523 *aureus* in animals and humans. *International Journal of Medical*  
524 *Microbiology*, 301, 630-634. [doi:10.1016/j.ijmm.2011.09.004](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.004).

525 Guardabassi, L., O'Donoghue, M., Moodley, A., Ho, J. & Boost, M. (2009).  
526 Novel lineage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Hong  
527 Kong. Emerging Infectious Diseases, 15, 1998-2000.  
528 doi:10.3201/eid1512.090378

529 Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D. &  
530 Vogel, U. (2003). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
531 in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat  
532 determination and database management. Journal of Clinical  
533 Microbiology, 41, 5442-5448.

534 Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S., Steinacker, U., Kaspar, H., Mankertz, J.  
535 & Schwarz, S. (2009). Diversity of antimicrobial resistance pheno- and  
536 genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from  
537 diseased swine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 64, 1156-  
538 1164. doi:10.1093/jac/dkp350.

539 Kadlec, K., Feßler, A. T., Hauschild, T. & Schwarz, S. (2012). Novel and  
540 uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated  
541 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and  
542 Infection, 18, 745-755. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03842.x.

543 Kehrenberg, C., Cuny, C., Strommenger, B., Schwarz, S. & Witte, W. (2009).  
544 Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of  
545 clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug  
546 resistance gene *cfr*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53, 779-  
547 781.

548 Kehrenberg, C. and Schwarz, S. (2006). Distribution of florfenicol resistance  
549 genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus*

550 isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1156-1163.  
551 [doi:10.1128/AAC.50.4.1156-1163.2006](https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1156-1163.2006)

552 Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C. & Weese, J. S. (2008). Methicillin  
553 resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers.  
554 *Veterinary Microbiology*, 128, 298-303.  
555 [doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.006](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.006)

556 Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J. &  
557 Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for  
558 staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: Rapid  
559 identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard  
560 regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 264-274.  
561 [doi:10.1128/AAC.00165-06](https://doi.org/10.1128/AAC.00165-06)

562 Larsen, J., Imanishi, M., Hinjoy, S., Tharavichitkul, P., Duangsong, K., Davis,  
563 M. F., Nelson, K. E., Larsen, A. R. & Skov, R. L. (2012). Methicillin-  
564 Resistant *Staphylococcus aureus* ST9 in pigs in Thailand. *PLOS ONE*,  
565 7, e31245. [doi:10.1371/journal.pone.0031245](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031245).

566 Li, B., Wendlandt, S., Yao, J., Liu, Y., Zhang, Q., Shi, Z., Wei, J., Shao, D.,  
567 Schwarz, S., Wang, S. & Ma, Z. (2013). Detection and new genetic  
568 environment of the pleuromutilin–lincosamide–streptogramin A  
569 resistance gene *Isa(E)* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of  
570 swine origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 1251-1255.  
571 [doi:10.1093/jac/dkt015](https://doi.org/10.1093/jac/dkt015).

572 Li, S., Skov, R. L., Han, X., Larsen, A. R., Larsen, J., Sørum, M., Wulf, M.,  
573 Voss, A., Hiramatsu, K. & Ito, T. (2011). Novel types of staphylococcal  
574 cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398

575 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrobial  
576 Agents and Chemotherapy, 55, 3046-3050. doi:10.1128/AAC.01475-  
577 10.

578 Lim, S.-K., Nam, H.-M., Jang, G.-C., Lee, H.-S., Jung, S.-C. & Kwak, H.-S.  
579 (2012). The first detection of methicillin-resistant *Staphylococcus*  
580 *aureus* ST398 in pigs in Korea. Veterinary Microbiology, 155, 88-92.  
581 doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.011.

582 Lulitanond, A., Ito, T., Li, S., Han, X., Ma, X. X., Engchanil, C., Chanawong,  
583 A., Wilailuckana, C., Jiwakanon, N. & Hiramatsu, K. (2013). ST9 MRSA  
584 strains carrying a variant of type IX SCCmec identified in the Thai  
585 community. BMC Infectious Diseases, 13, 214. doi:10.1186/1471-  
586 2334-13-214.

587 Mroczkowska, A., Żmudzki, J., Marszałek, N., Orczykowska-Kotyńska, M.,  
588 Komorowska, I., Nowak, A., Grzesiak, A., Czyżewska-Dors, E., Dors,  
589 A., Pejsak, Z., Hryniewicz, W., Wyszomirski, T. & Empel, J. (2017).  
590 Livestock-associated *Staphylococcus aureus* on Polish pig farms.  
591 PLOS ONE, 12, e0170745. doi:10.1371/journal.pone.0170745

592 Neela, V., Mohd Zafrul, A., Mariana, N. S., van Belkum, A., Liew, Y. K. & Rad,  
593 E. G. (2009). Prevalence of ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus*  
594 *aureus* among pigs and pig handlers in Malaysia. Journal of Clinical  
595 Microbiology, 47, 4138-4140. doi:10.1128/JCM.01363-09

596 Oppliger, A., Moreillon, P., Charrière, N., Giddey, M., Morisset, D. &  
597 Sakwinska, O. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus*  
598 *aureus* strains acquired by pig farmers from pigs. Applied and

599 Environmental Microbiology, 78, 8010-8014. doi:10.1128/AEM.01902-  
600 12.

601 Overesch, G., Büttner, S., Rossano, A. & Perreten, V. (2011). The increase of  
602 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence  
603 of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland.  
604 BMC Veterinary Research, 7, 30. doi:10.1186/1746-6148-7-30.

605 Patchanee, P., Tadee, P., Arjkumpa, O., Love, D., Chanachai, K., Alter, T.,  
606 Hinjoy, S. & Tharavichitkul, P. (2014). Occurrence and characterization  
607 of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in  
608 pig industries of northern Thailand. Journal of Veterinary Science, 15,  
609 529-536. doi:10.4142/jvs.2014.15.4.529.

610 Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P. & Frey, J.  
611 (2005). Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of  
612 gram-positive bacteria. Journal of Clinical Microbiology, 43, 2291-2302.  
613 doi:

614 Price, L. B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P. S.,  
615 Pearson, T., Waters, A. E., Foster, J. T., Schupp, J., Gillece, J., Driebe,  
616 E., Liu, C. M., Springer, B., Zdovc, I., Battisti, A., Franco, A., Żmudzki,  
617 J., Schwarz, S., Butaye, P., Jouy, E., Pomba, C., Porrero, M. C.,  
618 Ruimy, R., Smith, T. C., Robinson, D. A., Weese, J. S., Arriola, C. S.,  
619 Yu, F., Laurent, F., Keim, P., Skov, R. & Aarestrup, F. M. (2012).  
620 *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of  
621 methicillin resistance in livestock. mBio, 3, e00305-11.  
622 doi:10.1128/mBio.00305-11.

623 Robinson, D. A. and Enright, M. C. (2004). Evolution of *Staphylococcus*  
624 *aureus* by large chromosomal replacements. *Journal of Bacteriology*,  
625 186, 1060-1064.

626 Rodvold, K. A. and McConeghy, K. W. (2014). Methicillin-resistant  
627 *Staphylococcus aureus* therapy: Past, present, and future. *Clinical*  
628 *Infectious Diseases*, 58, S20-S27. doi:10.1093/cid/cit614

629 Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki,  
630 S., Kawakami, T., Fukata, T. & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR  
631 method for species identification of coagulase-positive staphylococci.  
632 *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 765-769. doi:10.1128/JCM.01232-  
633 09.

634 Sergio, D. M. B., Koh, T. H., Hsu, L.-Y., Ogden, B. E., Goh, A. L. H. & Chow,  
635 P. K. H. (2007). Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus*  
636 *aureus* in pigs used for research. *Journal of Medical Microbiology*, 56,  
637 1107-1109. doi:10.1099/jmm.0.47283-0

638 Sinlapasorn, S., Lulitanond, A., Angkititrakul, S., Chanawong, A.,  
639 Wilailuckana, C., Tavichakorntrakool, R., Chindawong, K., Seelaget,  
640 C., Krasaesom, M., Chartchai, S., Wonglakorn, L. & Sribenjalux, P.  
641 (2015). SCCmec IX in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and  
642 methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from pigs and  
643 workers at pig farms in Khon Kaen, Thailand. *Journal of Medical*  
644 *Microbiology*, 64, 1087-1093. doi:10.1099/jmm.0.000119

645 Smith, T. C. (2015). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: The United  
646 States experience. *PLOS Pathogens*, 11, e1004564.  
647 doi:10.1371/journal.ppat.1004564.



648 Smith, T. C., Male, M. J., Harper, A. L., Kroeger, J. S., Tinkler, G. P., Moritz,  
649 E. D., Capuano, A. W., Herwaldt, L. A. & Diekema, D. J. (2009).  
650 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is  
651 present in midwestern U.S. swine and swine workers. PLOS ONE, 4,  
652 e4258. doi:10.1371/journal.pone.0004258.

653 Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G. & Witte, W. (2003). Multiplex PCR  
654 assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic  
655 resistance genes in *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical  
656 Microbiology, 41, 4089-4094.

657 van Duijkeren, E., Ikawaty, R., Broekhuizen-Stins, M. J., Jansen, M. D.,  
658 Spalburg, E. C., de Neeling, A. J., Allaart, J. G., van Nes, A.,  
659 Wagenaar, J. A. & Fluit, A. C. (2008). Transmission of methicillin-  
660 resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig  
661 farms. Veterinary Microbiology, 126, 383-389.  
662 doi:doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.021

663 Vanderhaeghen, W.R., Hermans, K., Haesebrouck, F. & Butaye, K. (2010).  
664 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production  
665 animals. Epidemiology and Infection, 138, 606-625.  
666 doi:10.1017/S0950268809991567.

667 Vestergaard, M., Cavaco, L., Sirichote, P., Unahalekhakac, A., Dangsakul,  
668 W., Svendsen, C., Aarestrup, F. & Hendriksen, R. (2012). SCCmec  
669 type IX element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus spa* type  
670 t337 (CC9) isolated from pigs and pork in Thailand. Frontiers in  
671 Microbiology, 3, 103. doi:10.3389/fmicb.2012.00103

672 Wagenaar, J. A., Yue, H., Pritchard, J., Broekhuizen-Stins, M., Huijsdens, X.,  
673 Mevius, D. J., Bosch, T. & van Duijkeren, E. (2009). Unexpected  
674 sequence types in livestock associated methicillin-resistant  
675 *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant  
676 of ST9 in pig farming in China. *Veterinary Microbiology*, 139, 405-409.  
677 doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.014.

678 Wendlandt, S., Feßler, A. T., Monecke, S., Ehricht, R., Schwarz, S. & Kadlec,  
679 K. (2013). The diversity of antimicrobial resistance genes among  
680 staphylococci of animal origin. *International Journal of Medical*  
681 *Microbiology*, **303**, 338-349. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.006.

682  
683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698 Table 1. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and swine workers

Origin	Age-group	Proportion of MRSA-positive farm	Proportion of MRSA-positive pig	Positive farm <sup>†</sup>	Studied isolates
Pig	Sows	2/6	4/80	SB1, PB1	4
	S-piglets <sup>‡§¶</sup>	3/13	5/210	SB1, PB1, NP2	5
	N-pigs	7/9	37/156	NP2, RB1, SB7, PB7, PB8, NR2, NR3	38
	F-pigs	4/9	13/161	NR2, RB1, PB6, PB7	13
Swine worker		3/16	3/38	NP2, SB1, PB1	3

699 MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; F-pigs, fattening pigs; N-  
700 pigs, nursery pigs; S-piglets, suckling piglets

701 <sup>†</sup>SB, Suphanburi; PB, Prachinburi; NP, Nakhon Pathom; RB, Ratchaburi; NR,  
702 Nakhon Ratchasima

703 <sup>‡</sup>Three S-piglets per litter

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718 **Table 2** Molecular characteristic and antimicrobial resistance phenotypes and genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
 719 isolated from pigs and swine workers in Central Thailand

Molecular characteristics		Province*	No. of isolate	Farm (No.)	Origin (No.)	Resistance phenotype <sup>§</sup>	Resistance genes <sup>†</sup>
Sequence type	SCCmec <sup>†</sup>	spa type	PFGE cluster				
9	IX	RB	5	RB1 (5)	Pig (5)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CHL-LZD-SMX-CIP	<i>blaZ-mecA</i> - <i>tet</i> (L)- <i>tet</i> (M)- <i>aadD</i> - <i>aacA</i> - <i>aphD</i> - <i>dfgG</i> - <i>erm</i> (B)- <i>vga</i> (A)- <i>cfr</i> - <i>fexA</i> - <i>str</i>
9	IX	PB	2	PB6 (2)	Pig (2)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-TRI-CLI-TIA-CHL-CIP <sup>††</sup>	<i>blaZ-mecA</i> - <i>tet</i> (M)- <i>aacA</i> - <i>aphD</i> - <i>dfgG</i> - <i>vga</i> (A)- <i>cat</i> <sub>6</sub> <i>c221</i> - <i>str</i>
4576	IX	PB	1	PB8 (1)	Pig (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-TRI-CLI-TIA-SYN-CHL-CIP	<i>blaZ-mecA</i> - <i>tet</i> (M)- <i>aacA</i> - <i>aphD</i> - <i>dfgG</i> - <i>vga</i> (A)- <i>cat</i> <sub>6</sub> <i>c221</i> - <i>str</i>
398	IX	PB	1	PB7 (1)	Pig (1)	PEN-FOX-TET-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA</i> - <i>blaZ</i> - <i>tet</i> (M)- <i>tet</i> (K)- <i>aadD</i> - <i>aadE</i> - <i>dfgG</i> - <i>erm</i> (C)- <i>lnu</i> (B)- <i>lsa</i> (E)- <i>spw</i>
398	V	NR, PB	33	NR2 (15), NR3 (10), PB1 (3), PB7 (1), PB8 (4)	Pig (33)	PEN-FOX-TET-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA</i> - <i>blaZ</i> - <i>tet</i> (M)- <i>tet</i> (K)- <i>aadD</i> - <i>aadE</i> - <i>dfgG</i> - <i>erm</i> (C)- <i>lnu</i> (B)- <i>lsa</i> (E)- <i>spw</i>
398	V	SB	8	SB1 (4), SB7 (4), NP2 (11)	Pig (7), Worker (1)	PEN-FOX-TET-STR-TRI-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA</i> - <i>blaZ</i> - <i>tet</i> (M)- <i>tet</i> (K)- <i>aadD</i> - <i>aadE</i> - <i>dfgG</i> - <i>erm</i> (A)- <i>erm</i> (C)- <i>lnu</i> (B)- <i>lsa</i> (E)- <i>spw</i> - <i>spc</i>
398	CI	NP	11	NP2 (11)	Pig (10), Worker (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA</i> - <i>blaZ</i> - <i>tet</i> (M)- <i>tet</i> (K)- <i>aadD</i> - <i>aadE</i> - <i>aacA</i> - <i>aphD</i> - <i>dfgG</i> - <i>erm</i> (A)- <i>erm</i> (B)- <i>lnu</i> (B)- <i>lsa</i> (E)- <i>spc</i> - <i>spw</i>
398	NT	NP	1	NP2 (1)	Pig (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA</i> - <i>blaZ</i> - <i>tet</i> (M)- <i>tet</i> (K)- <i>aadD</i> - <i>aadE</i> - <i>aacA</i> - <i>aphD</i> - <i>dfgG</i> - <i>erm</i> (A)- <i>erm</i> (B)- <i>lnu</i> (B)- <i>lsa</i> (E)- <i>spc</i> - <i>spw</i>
398	CI	NP	1	PB4 (1)	Worker (1)	PEN-FOX-TET-GEN-KAN-STR-ERY-CLI-TIA-SYN-CIP	<i>mecA</i> - <i>blaZ</i> - <i>tet</i> (M)- <i>tet</i> (K)- <i>aadD</i> - <i>aadE</i> - <i>aacA</i> - <i>aphD</i> - <i>dfgG</i> - <i>erm</i> (A)- <i>erm</i> (B)- <i>lnu</i> (B)- <i>lsa</i> (E)- <i>spc</i> - <i>spw</i>

720

721 † SCCmec was identified by two multiplex PCR panels. CI was a novel SCCmec composite island consisting of *ccrA1B1*, *ccrC* and class C *mec*  
 722 complex and NT was a non-typeable SCCmec presenting negative amplification of *ccr* complex and *mec* complex.

723 ‡Abbreviation of the provinces are as follows: NP, Nakhon Pathom; NR, Nakhonratchasima; PB, Prachinburi; RB, Ratchaburi; Suphanburi,  
 724 Suphanburi

725 §Antimicrobial resistance phenotype was determined by microbroth dilution. Abbreviation of antimicrobial agents are as follows: PEN, penicillin;  
 726 FOX, cefoxitin; TET, tetracycline; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TIA, tiamulin;  
 727 SYN, synergid or dalfoprintin/quinupristin; CIP, ciprofloxacin

728 ¶Antimicrobial resistance genes and mechanisms are as follows: *mecA*, penicillin-binding protein; *blaZ*, β-lactamase; *tet*(K) and *tet*(L),  
 729 tetracycline efflux protein; *tet*(M), ribosomal protective protein; *aadE* and *aadD*, aminoglycoside nucleotidyl transferase; *aacA*, aminoglycoside  
 730 acetyltransferase; *aphD*, aminoglycoside phosphotransferase; *erm*(A), *erm*(B) and *erm*(C), erythromycin resistance methylase; *dfgG*,  
 731 dihydrofolate reductase; *lnu*(B), lincosamide nucleotidyltransferase; *vga*(A) and *lsa*(E), ATP-binding cassette (ABC) transporter; *fexA*, florfenicol  
 732 exporter; *cfr*, ribosomal RNA methyltransferase; *spc* and *spw*, spectinomycin adenylyltransferase; *cat*<sub>6</sub>*c221*, chloramphenicol acetyltransferase; *str*,  
 733 streptomycin adenylyltransferase

734 ††The isolates exhibited intermediate resistance to dalfoprintin/quinupristin

735 **Figure legends**

736

737 **Figure 1**

738 Dendrogram constructed by *Cfr*9I-macrorestricted pulsed-field gel  
739 electrophoresis using unweighted pair group method using arithmetic  
740 averages, 1% position tolerance and 80% similarity grouped in the same  
741 cluster and molecular typing illustrating genetic relatedness of methicillin-  
742 resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs and swine workers in  
743 central Thailand

744

745 **Figure 2**

746 Diagram demonstrating possible distribution and transmission of methicillin-  
747 resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by genetic characteristics in pigs  
748 and swine workers in MRSA-positive farms in central Thailand in this study  
749 (Farm and province: PB, Prachinburi; SB, Suphanburi; RB, Ratchaburi; NR,  
750 Nakhon Ratchasima; NP, Nakhon Pathom. Holding operation: FF, farrow-to-  
751 finish; FW, farrow-to-wean; WF, wean-to-finish. Grey box: S, sow; P, suckling  
752 piglet; N, nursery pig; F, fattening pig)

753

Figure 1

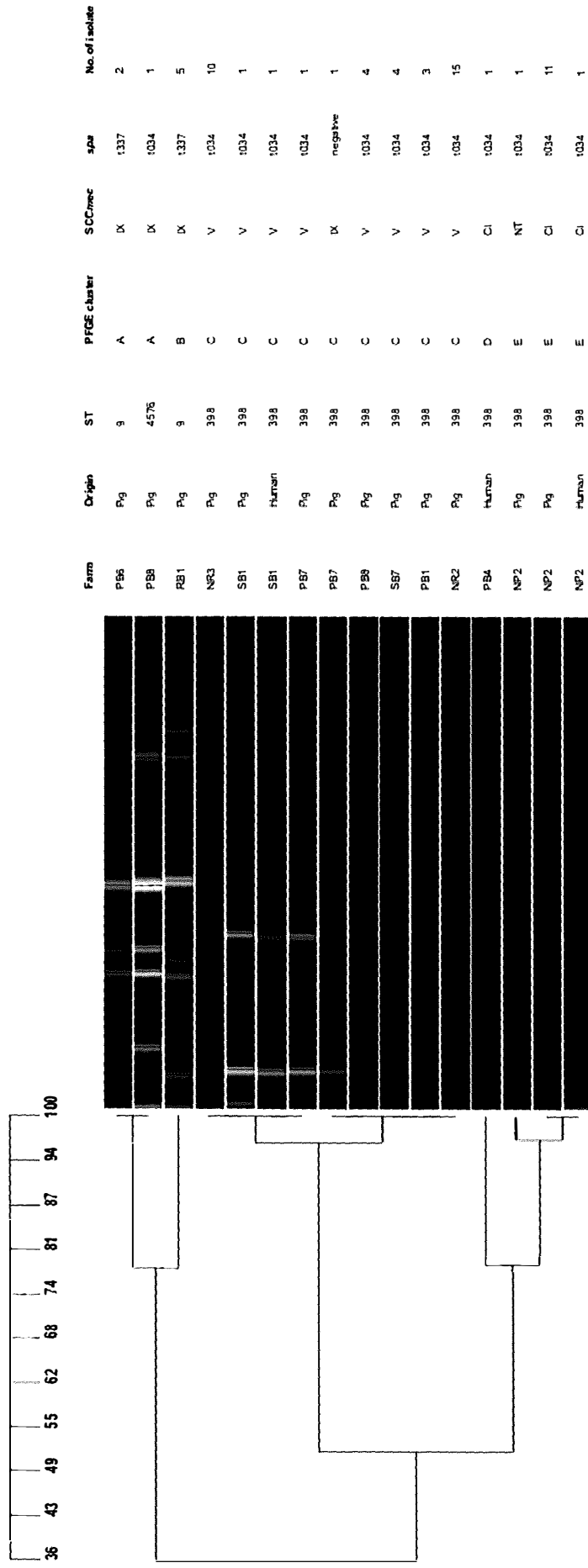


Figure 2

