รายงานการวิจัย

การวิเคราะห์เปรียบเทียบระบาดวิทยาของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสก่อโรคบนผิวหนังสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์และมาตรการป้องกันการติดต่อจากสุนัขสู่คน

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

ณุวีร์ ประภัสระกูล และคณะ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีงบประมาณ 2558

สัญญาเลขที่ GRB_BSS_๗๒_๔๗_๓๑_๐๓

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์เปรียบเทียบระบาดวิทยาของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสก่อโรคบนผิวหนังสุนัข ผู้เลี้ยงสุนัข และสัตวแพทย์และมาตรการป้องกันการติดต่อจากสุนัขสู่คน

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

รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล	สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
รองศาสตราจารย์ นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์	สาขาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. สิริลักษณ์ สุรเชษฐพงษ์	สาขาอายุรศาสตร์ทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
อาจารย์ น.สพ.ดร. ภัทรรัฐ จันทร์ฉายทอง	สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
นางวารี นิยมธรรม	สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์

ทุนอุดหนุนโดย งบประมาณแผ่นดินที่พิจารณาจากโดยผ่านความเห็นชอบจาก
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2558

ชื่องานวิจัย การวิเคราะห์เปรียบเทียบระบาดวิทยาของเชื้อสตาฟฟิโลคอคคัสก่อโรคบนผิวหนัง สุนัข ผู้เลี้ยงสุนัขและสัตวแพทย์ และมาตรการป้องกันการติดต่อจากสุนัขสู่คน

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

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตรจารย์ น.สพ.ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล[1]
รองศาสตรจารย์ นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์[2]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. สิริลักษณ์ สุรเชษฐพงษ์[3]
อาจารย์ น.สพ.ดร. ภัทรรัฐ จันทร์ฉายทอง[1]
นางวารี นิยมธรรม[1]
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย *****งานวิจัยปีที่ 2***ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 15 มกราคม 2558**

บทคัดย่อ

งานวิจัยในปีที่ 1 ได้รายงานความชุกและการกระจายเชิงระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (CoPS) ในสุนัข เจ้าของสุนัข และสัตวแพทย์ ประกอบด้วยเชื้อ *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* and *S. aureus* พบการระบาดของเชื้อดื้อยานี้อย่างกว้างขวางในโรงพยาบาลสัตว์ในประเทศไทย หลักฐานด้านสายพันธุ์ที่มีความเชื่อมโยงกันระหว่างสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัข นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ใหญ่ในการศึกษาที่ผ่านมาด้วย ดังนั้นการตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียดื้อยานี้เป็นความจำเป็นเพื่อศึกษาแหล่งที่มาของปัญหา และนำไปปรับใช้ในการกำหนดมาตรการลดการระบาดระหว่างคนและสัตว์ และใช้เป็นแนวทางปฏิบัติการจัดการด้านสุขศาสตร์ งานวิจัยในปีที่ 2 นี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษา หาลักษณะทางพันธุกรรมของการดื้อยาจากเชื้อที่พบในปีที่ 1 ปัจจัยของคงอยู่ของเชื้อดื้อยาชนิด methicillin-resistant coagulase positive staphylococci (MRCoPS) บนผิวหนังสุนัข และประเมินประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อได้แก่ chlorhexidine gluconate in isopropanol, potassoum peroxymonosulfate oxidizing agent, silver nano products และ providone iodine จากการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพแสดงให้เห็นว่าเชื้อมากกว่า 80% ที่แยกได้จากกลุ่มประชากรที่ศึกษาแสดงการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด ได้แก่ tetracycline, aminoglycoside, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, trimethoprim, ciprofloxacin และ sulfamethoxazole ซึ่งเป็นยาพื้นฐานที่ใช้ในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ จากการติดตามสุนัขที่ได้รับยาปฏิชีวนะชนิด cephalexin monohydrate ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบการคงอยู่ของเชื้อดื้อยา MRCoPS พบว่าเพิ่มขึ้นจาก 6.12% เป็น 100% หลังการให้ยาปฏิชีวนะเพียง 1 สัปดาห์ และยังคงอยู่ภายในหกเดือนถึงหนึ่งปี เชื้อที่พบมากที่สุดคือ methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) และสามารถพบได้ตลอดทั้งการศึกษา แต่เชื้อ methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (MRSSc) พบเฉพาะในระหว่างให้ยาเท่านั้น ในการทดสอบกับสารฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นประจำในโรงพยาบาลและสารทางเลือกพบว่า 0.5 - 2% chlorhexidine gluconate ใน isopropanol และ 0.005-0.02% potassoum peroxymonosulfate oxidizing agent ให้ผลฆ่าเชื้อในกลุ่ม CoPS ภายในระยะเวลา 15 วินาที ในขณะที่การเจือจาง 10% povidone iodine ให้อยู่ในระดับ 0.1-1% จะเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้หมดในระยะเวลา 45 วินาที ในขณะที่กลุ่มผลิตภัณฑ์อนุภาคเงินระดับนาโน (silver nano) ที่นำมาทดสอบกำจัดเชื้อได้ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะมีผลกระทบกับการเพิ่มจำนวนประชากรของเชื้อดื้อยาและคงอยู่ในระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน การปรับใช้ 0.5% chlorhexidine gluconate ใน isopropanol และ 0.1% povidone iodine บนตัวสุนัข และ การใช้ 0.005% potassoum peroxymonosulfate oxidizing agent ในโรงพยาบาลสัตว์ เป็นทางเลือกเพื่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยระยะเวลาการออกฤทธิ์ กลุ่มผลิตภัณฑ์อนุภาคเงินระดับนาโน (silver nano) ที่ทดสอบไม่เหมาะสำหรับการฆ่าเชื้อทันทีหลังการใช้ ผลงานวิจัยนี้สามารถนำมาปรับใช้เพื่อวางมาตรการการแพร่กระจายของเชื้อบนตัวสุนัขและการลดการปนเปื้อนของเชื้อ MRCoPS ในโรงพยาบาลได้

คำสำคัญ : เชื้อดื้อยา, ยาปฏิชีวนะ, สตาฟฟิโลคอคคัย, สารฆ่าเชื้อ และ มาตราการควบคุมเชื้อ

(*ค*)

Abstract

Our first year study reported the prevalence and molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (CoPS) in dogs, dog owners and veterinarains including *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* and *S. aureus*. There was the high prevalence of methicillin resistant CoPS distributing in the veterinary hospitals in Thailand. The evidence of strain typing including novel sequence type sharing between dogs and dog-associated human was discovered. Therefore, monitorings of antimicrobial resistance bacteria; phenotype and genotype were needed to cope with this problem origin in order to reduce the zoonotic transmission and to set up an initial guideline for hygenic managment. In second year, the purposes were to investigate the factors associated methicillin-resistant coagulase positive staphylococci (MRCoPS) persistence on dog skin, and to evaluate the bacteriocidal efficacies of disinfectant products; chlorhexidine gluconate in isopropanol, potassoum peroxymonosulfate oxidizing agent, silver nano products and providone iodine. Over 80% of MRCoPS expressed resistance to tetracycline, aminoglycoside, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, trimethoprim, ciprofloxacin and sulfamethoxazole, which are available for human and veterinary medicine. Regarding the mornitoring of MRCoPS emerging after 4-week oral cephalexin monohydatre administration, emerging of MRCoPS were found after a week of treatment and maintained up to 12 month after treatment. The antimicrobial susceptibilities and DNA-finger printings were comfirmed the occurance of MRCoPS. The population of MRCoPS–positive dogs MRCoPS were raised from 6.12% (non-treatment) to 100% (at the 1st week after treatment). However, the number of methicillin-susceptible coagulase-positive Staphylococci (MSCoPS) and MRCoPS were not significant different (*P = 0.257*) after 6 months post-treatment. On these, methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) were the most common frequent. Methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (MRSSc) were found on dog skin at the treatment period only. For disinfectant efficacy, we found that 0.5 - 2% chlorhexidine gluconate in isopropanol and 0.005 – 0.02% potassoum peroxymonosulfate oxidizing agent could eliminate all CoPS within 15s. Whilst, 0.1-1% providone iodine could kill them within 45 second. Among silver nano products had the bacteriocidal effect at 24 hour exposure. The results revealed the occurance of persistant MRCoPS for 6 month at least after their emerging at the first week of treatment. Practically, we implied that use of 0.5% chlorhexidine gluconate in isopropanol and 0.1% povidone iodine for animal skin, 0.005% potassoum peroxymonosulfate oxidizing for environment, could the effective controller the distribution of MRCoPS in veterinary hospitals. In contrast, silver nano products did not proper in term of bacteriocidal effect at sudden used. This finding could be applied for hygienic strategy reducing number and distribution of MRCoPS in veterinary hospitals.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2557-2558 ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา (the Chulalongkorn University Graduate Scholarship to Commemorate the 72th Anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej) และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksompot Endowment Fund)

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ โรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตว-แพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทำงานวิจัย Professor Dr. Vincent Perreten, Institue of Veterinary Bacteriology, University of Bern. ผศ.นพ.อนันต์ จงเถลิง อ.พญ. ดร.ฐนิษถา ฉัตรสุวรรณ สำหรับความคิดเห็นด้านวิชาการ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์ นิสิตและบุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านในความร่วมมือด้านการปฏิบัติงานวิจัย

ณุวีร์ ประภัสระกูล และคณะ
25 กันยายน 2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข.
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค.
กิตติกรรมประกาศ.....	จ.
สารบัญตาราง.....	ฉ.
สารบัญรูป.....	ซ.
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	24
บทที่ 5 อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	32
บทที่ 6 มาตรการป้องกันการติดต่อของเชื้อ MRCoPS จากสัตว์สู่คนในโรงพยาบาลสัตว์...	36
บทที่ 7 เอกสารอ้างอิง.....	37
บทที่ 8 ประวัติผู้วิจัย.....	48
ผลงานวิจัย	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดของ *ccr* complex และ *mec* complex ที่เป็นองค์ประกอบ SCC*mec* ของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.....	10
2	ตารางแสดงชื่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้และความเข้มข้นของยาที่นำมาใช้.....	17
3	ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *lsa€*.....	18
4	ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *mecA*.....	18
5	ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนกSCC*mec* type I to V.....	19
6	ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนกSCC*mec* type II-III ที่พบในเชื้อ MRSP.....	19
7	แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* และรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข	21
8	จำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* และรูปแบบการดื้อยา (antimicrobial resistance profile) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข	22
9	แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus schleifei* subsp. *coagulans* และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข	23
10	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของเชื้อ MRSP ต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิด	24
11	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ต่อยาต้านจุลชีพ 20 ชนิด	25
12	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSSc ต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิด	26

13 การเปรียบจำนวนประชากรระหว่าง เชื้อดื้อยา MRCoPS และเชื้อที่ไวรับต่อยา MSCoPS ที่ได้จากช่องจมูก, ขาหนีบ และรอยโรคของแต่ละกลุ่ม..... 27

14 แสดงความถี่และการกระจายของเชื้อกลุ่ม MRCoPS และ MSCoPS ของสุนัขทั้งสามกลุ่มที่ตำแหน่งต่างๆ..... 34

สารบัญรูป

1	แสดงตัวอย่างการปรากฏของยีนดื้อยาจากเทคนิค DNA microarray ที่ในการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก	**29**
2	แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ DNA จาก multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหา *ccr* complex ของเชื้อ MRCoPS	**30**
3	แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ DNA จาก multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหา *mec* complex ของเชื้อ Marcos	**31**
4	แสดงขนาดของ ΨSCC*mec*$_{57395}$ และส่วนโครโมโซมด้าน 3′ ด้วยการทำ long-range PCR แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*36I	**31**
5	แสดงชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์จากการทำ long range PCR ด้วยไพรเมอร์ *orfX* และ *contig27* ที่ให้ผลิตภัณฑ์ครอบคลุมส่วน ΨSCC*mec*$_{57395}$ และโครโมโซมส่วน 3′ และชิ้นส่วนจากการทำการตัดด้วยเอนไซม *Bsu*36I	**32**
6	พันธุกรรมลักษณะ และ แบบแผนการดื้อยาของ CoPS ที่ได้จากทางช่องจมูกของสุนัข 10 ตัวที่ถูกตรวจติดตามตั้งแต่ก่อนให้ยา, ระหว่างให้ยา และ หลังหยุดยาเป็นเวลามากกว่า 8 เดือน	33
7	ค่าเฉลี่ยความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความสามารถในการฆ่าเชื้อกลุ่ม CoPS ที่ความเข้มข้นต่างๆของ povidone iodine.....	34
8	ค่าเฉลี่ยความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความสามารถในการฆ่าเชื้อกลุ่ม CoPS ที่ความเข้มข้นต่างๆของ silver nano.....	35

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

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

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) นั้นเป็นรูปแบบการดื้อยาของเชื้อในสกุล *Staphylococcus* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแทม (β-lactam) ทั้งหมด และส่วนมากมักดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistance) ประกอบกับการที่เชื้อ CoPS มีบทบาทในการก่อโรคสูงกว่าในเชื้อแบคทีเรียสกุลนี้ ดังนั้นเชื้อในกลุ่ม methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (MRCoPS) จึงมีบทบาทความสำคัญทั้งในการดื้อยาและการก่อโรค โดยสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ ได้แก่ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) และ methicillin-resistant *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (MRSSc) (Weese and van Duijkeren, 2010) โดยเชื้อ MRSA นั้นมีความสำคัญในแง่ของการเป็นเชื้อดื้อยาที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่พักฟื้นในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน(nosocomial infection) ในรูปแบบของการติดเชื้อที่บาดแผล ปอดอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เรียกว่าเป็น hospital-acquired MRSA (HA-

MRSA) ส่วนกลุ่มที่มีการระบาดในชุมชนมักทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังเรียกว่าเป็น community-acquired MRSA (CA-MRSA) (Tong et al., 2011) ทั้งนี้สุนัขสามารถติดเชื้อและเป็นพาหะของ MRSA ซึ่งได้รับมาจากมนุษย์ (reverse zoonosis) ส่วนสปีชีส์ที่มีความจำเพาะกับสุนัขคือ MRSP ซึ่งมีการรายงานเป็นครั้งแรกในปี 2007 ที่พบในสุนัขและบุคลากรด้านสัตวแพทย์ในโรงพยาบาลสัตว์ (Sasaki et al., 2007) โดยทั้งเชื้อ MRSA และ MRSP นั้นมียีนดื้อยาที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแทมคือยีน *mecA*

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

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

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

โดยทั่วไปเชื้อดื้อยา MRCoPS สามารถถูกพัฒนาให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นภายหลังจากการให้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีที่เรียกว่า selective pressure โดยการคงอยู่ของเชื้อจะขึ้นกับความเหมาะสมของสายพันธุ์ดั้งเดิม (genetic fitness of the wild type) และความสามารถในการปรับตัวของเชื้อกลายพันธุ์ (impaired fitness of the mutant) (Horvath et al., 2012) เชื้อดื้อยา MRSP เป็นเชื้อที่สำคัญที่พบบนผิวหนังสัตว์ เชื้อมักพบปรากฏขึ้น หลังจากการที่สัตว์ได้รับปฏิชีวนะจนทำให้เกิดการคงอยู่บนผิวหนังเป็นระยะเวลานานกว่า 6 เดือน แต่อย่างไรก็ดี มีรายงานน้อยมากที่จะยืนยันว่าเชื้อเหล่าเป็นเชื้อที่มีอัตลักษณ์เดียวกันทั้งหมด (Bemis et al., 2012) จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการคงอยู่ของเชื้อบนผิวหนังของสุนัข

ในปัจจุบันมีสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อบนผิวหนังสัตว์มากมาย ซึ่ง povidone iodine และ chlorhexidine gluconate เป็นสารฆ่าเชื้อบนผิวหนังที่ได้รับความนิยมในการใช้มากทั้งในโรงพยาบาลสัตว์และโรงพยาบาลคน povidone iodine มีไอโอดีนที่เป็นสารฆ่าเชื้อที่เก่าแก่ที่สุดในโลกชนิดหนึ่ง แต่อย่างก็ดีกระบวนการทั้งหมดฆ่าเชื้อของสารชนิดนี้ยังไม่ถูกค้นพบ (McDonnell and Russell, 1999) โดยทั่วไปความเข้มข้นของ povidone iodine ที่ขายตามท้องตลาดมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 – 10% ซึ่งความเข้มข้นของ povidone iodine จะขึ้นกับการรักษาที่ใช้ อย่างเช่น 10% povidone iodine มักนิยมใช้ในการทำความสะอาดแผลที่ติดเชื้อ ร่างกายของเด็กทารกและบริเวณที่ต้องการผ่าตัด (Abdeyazdan et al., 2014) เป็นต้น ข้อดีของ povidone iodine คือสามารถทำความสามารถได้แม้ในจุดที่บอบบางอย่างเช่น ดวงตา ช่องปาก และ เส้นประสาท แต่เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของ chlorhexidine ก็ฆ่าเชื้อค่อนช้ากว่าและไม่สามารถฆ่าspore ของเชื้อได้ (McDonnell and Russell, 1999) อย่างไรก็ดี ข้อจำกัดของ chlorhexidine คือไม่สามารถใช้ทำความสะอาดในบิเวณที่จุดที่บอบบางต่างๆของร่างกายได้โดยเฉพาะเส้นประสาท โดยทั่วไป

แล้ว chlorhexidine มักจะถูกผสมลงในแอลกอฮอล์เพื่อเพิ่มให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อให้รวดเร็วยิ่งขึ้น (Sakuragi et al., 1995)

Virusnip™ เป็นสารฆ่าเชื้อที่มักนิยมใช้ในสิ่งแวดล้อม สามารถฆ่าเชื้อได้หลากหลายชนิดอย่างเช่น Avian Influenza, FMD, SARS coronavirus, Newcastle Disease Virus,PRRS, PCV-2, Salmonella *spp*., Campylobacter *spp*. และ *E.coli* 0157:H7 ซึ่งความแตกต่างจะขึ้นอยู่การใช้งานกับเชื้อแต่ละชนิด โดยทั่วไปจะอยู่ราว 1:100 ถึง 1:200 ในประเทศไทยมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อชนิดนี้กับ *E. coli*, Salmonella *spp*. *Candida albicans* และ *Trichophyton mentagophytes* (Kramomtong et al., 2010) ทดสอบกับสารที่ผสมน้ำยาฆ่าเชื้อไว้ 1, 2 และ 7 วัน พบว่าที่ 7 วัน สารยังสามารถให้ประสิทธิภาพการฆ่าได้ดีเทียบเท่ากับในแรก ในกรณีของการฆ่าเชื้อ CoPS สารนี้มักนิยมใช้อยู่ที่ 1:640 ถึง 1:300(http://www.ah.novartis.nl/cs/groups/public/@nch_com_ah/documents/document/n_prod_196602.pdf)

สารทางเลือกอย่างเช่น น้ำผึ้ง และ Silver nano เป็นสารที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน โดยสารฆ่าเชื้อที่มีในน้ำผึ้งนั้นได้แก่ hydrogen peroxide, propolis และ non-hydrogen peroxide substances (Schneider et al., 2012) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง hydrogen peroxide ที่พบว่าสามารถทำลายชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลาย DNA และสารประกอบสำคัญต่างๆของเซลล์ได้ (McDonnell and Russell, 1999) ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าน้ำผึ้งแบบ ointments สามารถใช้รักษาแผลในกระต่ายและแผลหนองของสุนัขได้มากกว่านั้นถ้าใช้ร่วมกับ 3% of chlorhexidine shampoo ก็จะมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Mueller et al., 2012) ส่วน silver nano เป็นสารทางเลือกที่นิยมใช้กันทั่วไป เป็นสารอ้างอิงถึงประสิทธิภาพความปลอดภัยที่สูง แต่ยังไม่มีรายงานยืนยันที่แน่ชัดถึงประสิทธิภาพเมื่อใช้จริงในสัตว์หรือระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารนี้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 ศึกษาติดตามอุบัติการณ์ของเชื้อ methicillin resistant coagulase-positive staphylococci ที่พบบนผิวหนังสุนัข ภายหลังจากการได้รับยาปฏิชีวนะ

2.2 ศึกษาระดับการดื้อยาและยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

2.3 ประเมินระดับความไวรับของเชื้อ coagulase–positive Staphylococci ชนิดต่างๆที่แยกจากสุนัขต่อสารทางเลือกต้านจุลชีพอย่างน้อย 2 ชนิด รวมถึงต่อสารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อในโรงพยาบาล

2.4 เพื่อกำหมดมาตรการเบื้องต้นในการลดความเสี่ยงของการแพร่กระจายของเชื้อ coagulase–positive staphylococci เพื่อใช้ในโรงพยาบาลสัตว์ในประเทศไทย

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลเชิงระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อ MRCoPS ที่พบในสุนัขหลังให้ยาปฏิชีวนะ cephlaxin monohydrate และความเกี่ยวข้องของเชื้อเกิดขึ้นในช่วงก่อน ระหว่าง และ หลังให้ยา เพื่อพิสูจน์แหล่งที่มาของเชื้อ นอกจากนี้การทดสอบเชื้อ CoPS กับสารฆ่าเชื้อต่างๆยังนำไปสู่การวางแผนการใช้

สารฆ่าเชื้อเพื่อควบคุมเชื้อชนิดนี้โรงพยาบาล ทั้งนี้การวางมาตราการป้องกันการติดต่อจากสัตว์สู่คน ยังสามารถนำไปเป็นแนวทางในการปฏิบัติจริงในโรงพยาลสัตว์ต่างๆในประเทศไทย

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่เอกสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

4.1 เพื่อทราบอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรของเชื้อ MRCoPS ภายหลังจากที่สุนัข รับยาปฏิชีวนะ cephalexin monohydrate

4.2 เพื่อทราบระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารฆ่าเชื้อที่ใช้ฆ่าเชื้อกลุ่ม CoPS

4.3 เพื่อสร้างมาตราฐานในการป้องกันการติดต่อจากสัตว์สู่คน

5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

5.1 การจัดอบรม สัมมนา การนำเสนอผลงาน และการบรรยายในการประชุมวิชาการ

5.2 เผยแพร่บทความลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

5.3 เพิ่มข้อมูลทางระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อลงในฐานข้อมูลออนไลน์

6 วิธีการดำเนินงานวิจัย

6.1 ขออนุญาตทำการเก็บตัวอย่างในสัตว์จากกรรมการจริยธรรม

6.2 เก็บเชื้อจากสัตว์

6.3 ทำการคัดแยกเชื้อ

6.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

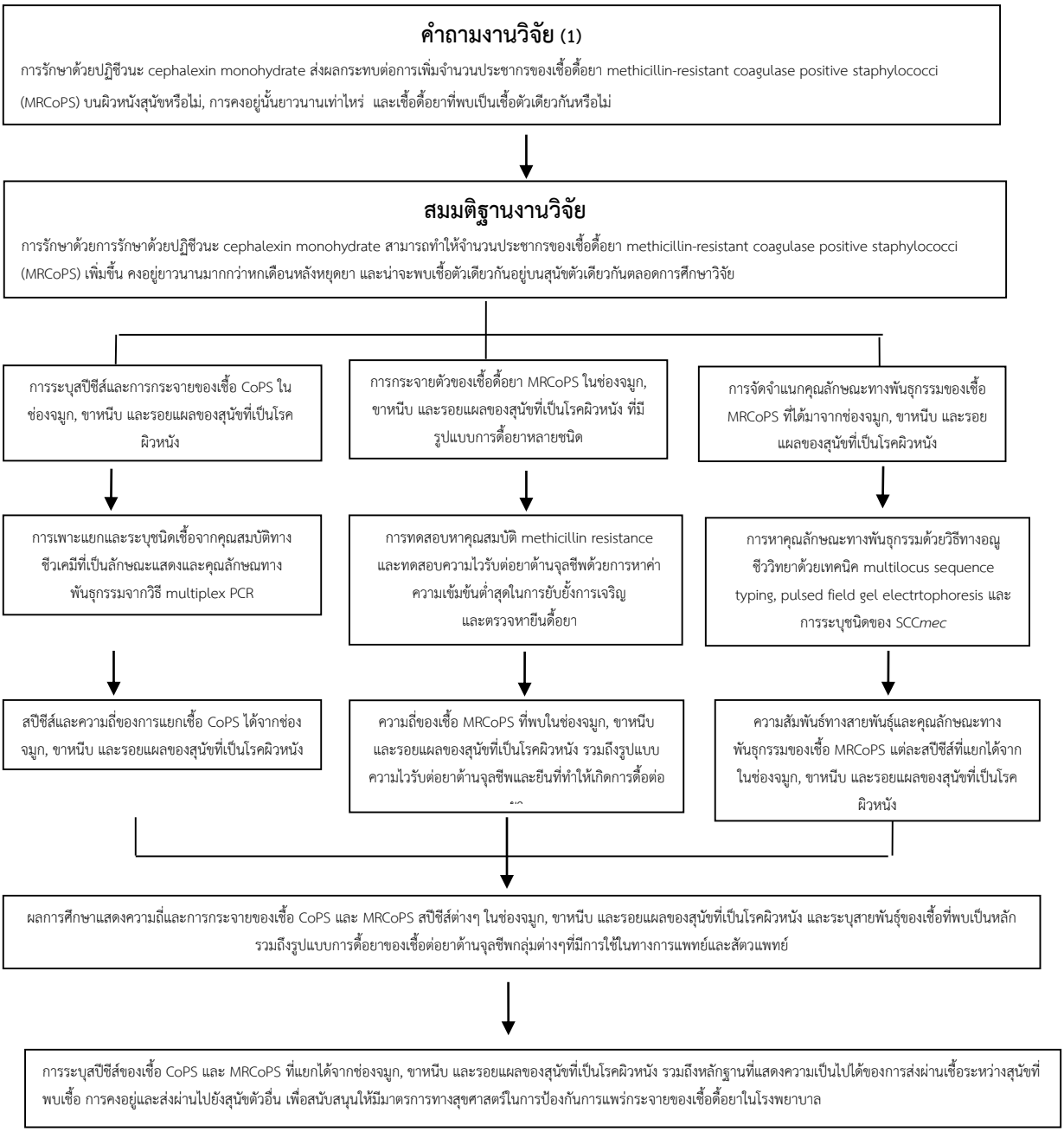
6.5 นำเชื้อที่ได้จากการทดลองมาทดสอบกับสารฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นประจำในโรงพยาบาลและสารทางเลือก

6.6 วางมาตราการป้องกันการติดต่อจากสัตว์สู่คนจากผลที่การทดลองทั้งหมด

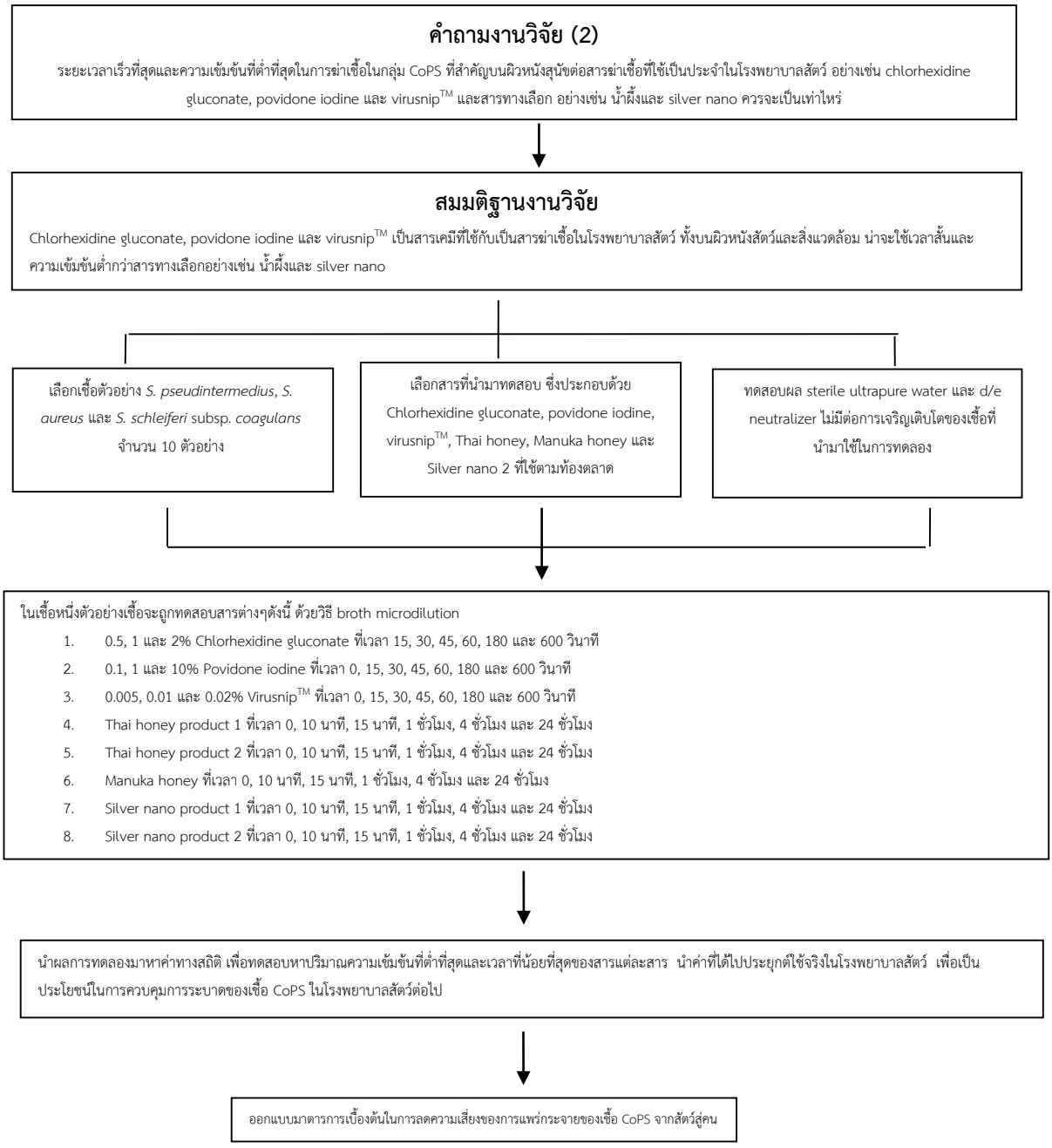
7. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



กรอบแนวคิดในการวิจัย(ต่อ) (Conceptual framework) (continue)



บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น อาศัยอยู่บนผิวหนังและเยื่อเมือกของสัตว์ในบทบาทของเชื้อประจำถิ่นและมักก่อให้เกิดโรคได้ในรูปแบบฉวยโอกาสเมื่อสัตว์มีปัจจัยโน้มนำ CoPS เป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการก่อโรค (Baird-Parker, 1963) เนื่องจากมีการสร้างปัจจัยที่ก่อความรุนแรงที่มากกว่าและสามารถหลบเลี่ยงการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ โดย *S. aureus* เป็นสปีชีส์ที่มีพบได้ในมนุษย์ในความชุก 10-30% ส่วนในอดีต CoPS ในสุนัขถูกจัดเป็น *S. intermedius* (Hajek, 1976) แต่ถูกนำมาจัดลำดับอนุกรมวิธานใหม่ในปี 2005 เป็น *S. pseudintermedius* เนื่องจากความแตกต่างของสารพันธุกรรม (Devriese et al., 2005) นอกจากนี้ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* เป็นอีกสปีชีส์หนึ่งที่พบได้ในสุนัข โดยแยกได้ครั้งแรกในสุนัขที่มีปัญหาช่องหูส่วนนอกอักเสบ (Igimi et al., 1990) เชื้อ CoPS ทั้ง 3 สปีชีส์นี้มีคุณลักษณะแสดงที่มีความคล้ายคลึงกัน ทำให้สามารถทำการแยกสปีชีส์ได้จากการใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีจากชุดทดสอบสำเร็จรูป แต่ก็สามารถนำมาหาคุณสมบัติชีวเคมีบ่งชี้ที่สามารถใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของ CoPS ที่สามารถแยกจากสุนัขได้ (Chanchaithong and Prapasarakul, 2011) แล้วจึงทำการยืนยันด้วยคุณลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น การทำ multiplex PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *nuc* ที่มีความจำเพาะกับ CoPS ทั้ง 7 สปีชีส์ ได้แก่ *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus* และ *S. lutrae* (Sasaki et al., 2010) หรือ polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism (Bannoehr et al., 2008) ที่มีความสามารถในการจำแนก *S. intermedius* และ *S. pseudintermedius* แต่อย่างไรก็ตามจากการรายงานที่ผ่านมาพบเชื้อ CoPS ที่แยกได้จากสุนัข ได้แก่ *S. pseudintermedius, S. schleiferi subsp. coagulans* และเชื้อ *S. pseudintermedius* เป็นสปีชีส์ที่พบเป็นหลักและมักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง ส่วน *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ก็มีบทบาทเป็นเชื้อประจำถิ่นที่สามารถแยกได้จากผิวหนังของสุนัขปกติและรอยโรคได้เช่นกัน

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *S. aureus* โดยการศึกษาติดตามระยะยาว พบว่ามนุษย์ประมาณ 20% เป็นโฮสต์ถาวรของ *S. aureus* และประมาณ 60% มีบทบาทในการเป็นพาหะเป็นช่วง (intermittent carrier) (Peacock et al., 2001) โดยเยื่อบุช่องจมูกจัดว่าเป็นบริเวณที่เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อ *S. aureus* (Toshkova et al., 2001) โดยบุคลากรทางการแพทย์ที่ปฏิบัติหน้าที่ใน

โรงพยาบาลเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการเป็นพาหะของเชื้อ MRSA ในความชุกประมาณ 1.6-15.5% (Albrich and Harbarth, 2008) นอกจากนี้สุนัขจัดเป็นแหล่งกักโรคของเชื้อ MRSA ได้ในรายที่อาศัยร่วมบริเวณกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA และอาจมีการส่งผ่านเชื้อระหว่างคนและสุนัข (Manian, 2003) S. pseudintermedius เป็นสปีชีส์หลักที่พบได้ในสุนัขและสามารถแยกได้จากสุนัขสุภาพปกติสูงถึง 90% จากบริเวณเยื่อเมือกและตำแหน่งที่มีความอับชื้น ได้แก่ เยื่อบุช่องจมูกและช่องปาก ขาหนีบ ฝีเย็บ และรอบทวารหนัก (Bannoehr and Guardabassi, 2012) และสุนัขสามารถเป็นพาหะของเชื้อดื้อยา MRSP ได้ตั้งแต่ความชุก 0-66.5% (van Duijkeren et al., 2011) โดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็นโรคผิวหนังอักเสบแบบเป็นตุ่มหนองพบในความถี่ที่สูงที่สุด (Kawakami et al., 2010) ที่ผ่านมามีการรายงานเพิ่มมากขึ้นว่ามนุษย์สามารถเป็นพาหะของเชื้อ MRSP ได้ โดยเฉพาะในบุคลากรที่ปฏิบัติงานด้านสัตว์เลี้ยงที่และผู้ที่เลี้ยงสุนัข (Boost et al., 2009; Morris et al., 2010; van Duijkeren et al., 2008) และพบการรายงานการก่อโรคของเชื้อ *S. pseudintermedius* ในมนุษย์ (Campanile et al., 2007; Chuang et al., 2010; Kempker et al., 2009; Stegmann et al., 2010) *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และ MRSSc นั้นสามารถพบได้ในสุนัขในความถี่ที่ต่ำกว่า *S. pseudintermedius* และ MRSP (Griffeth et al., 2008; Hanselman et al., 2008; Yamashita et al., 2005) และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ในมนุษย์มีการรายงานในผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่หัวใจทำให้เกิดเยื่อบุด้านในของหัวใจอักเสบ (endocarditis) และเกิดการแพร่กระจายของเชื้อตามส่วนต่างๆของร่างกาย (metastatic infection) (Kumar et al., 2007)

เชื้อดื้อยา MRS มีคุณสมบัติในการดื้อยากลุ่มเบต้า-แลคแทม มีการรายงานครั้งแรกในเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) โดยเชื้อจะสามารถสร้าง PBP2a ที่ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยยากลุ่มเบต้า-แลคแทม ทำให้เชื้อยังคงสังเคราะห์ peptidoglycan และสร้างผนังเซลล์ต่อไปได้ (Chambers, 1988) ทั้งนี้รูปแบบการดื้อยานี้สามารถพบได้ใน *S. pseudintermedius* ซึ่งมีการรายงานเชื้อ MRSP ครั้งแรกในปี 2007 (Sasaki et al., 2007) โดยมีกลไกในการดื้อยาเช่นเดียวกันกับ MRSA ซึ่งสร้าง PBP2a มาจาก *mecA* ซึ่งอยู่ใน SCC*mec* ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุลนี้ โดย SCC*mec* ถูกค้นพบในครั้งแรกในเชื้อ MRSA N315 (Katayama et al., 2000) ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญคือ *mec* complex ที่มียีน *mecA* และระบบควบคุมการแสดงออกของยีน และกลุ่มยีน *ccr* complex ที่ทำหน้าที่ในการตัดต่อเข้าสู่โครโมโซมของ staphylococci โดย SCC*mec* จะมีตำแหน่งที่มีความจำเพาะบนโครโมโซมที่ *attBSCC* นอกจากนี้ใน SCC*mec* ยังประกอบด้วยยีนอื่นๆที่ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพและโลหะหนักได้ด้วยแล้วแต่ชนิดของ SCC*mec* (Hiramatsu et al., 2001) ทั้งนี้การจัดจำแนก SCC*mec* นั้นอาศัยชนิดและความแตกต่างของ *mec* complex และ *ccr* complex

เป็นหลักตาม International Working Group on Staphylococcal Cassette Chromosome (IWG-SCC, 2009) ซึ่งปัจจุบันพบได้ทั้งหมด 11 ชนิดใน MRSA ดัง**ตาราง 1**

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของ *ccr* complex และ *mec* complex ที่เป็นองค์ประกอบ SCC*mec* ทั้งหมด 11 ชนิดที่พบในเชื้อ MRSA

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

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

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

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

นอกจากเชื้อ MRS จะมีคุณสมบัติดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแทมแล้วยังสามารถดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่มอื่นๆ ได้ด้วย จากการที่มียีนดื้อยาที่ทำให้เกิดกลไกการดื้อยาหลากหลายกลุ่มในเชื้อ MRSA และ MRSP ส่วนมากแล้วเชื้อจะมีการดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam, tetracycline, aminoglycosides, macrolides, lincosamides, chloramphenicol, trimethorprim และ fluoroquinolones ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม β-lactam

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

สารฆ่าเชื้อที่มักนิยมใช้ในโรงพยาบาลมีหลากหลายชนิด วิธีการใช้หรือเลือกใช้ขึ้นกับหน้าที่และตำแหน่งที่ใช้อย่างเช่น povidone iodine และ chlorhexidine gluconate มักนิยมใช้ในการทำความสะอาดผิวหนังและอุปกรณ์ที่ใช้ในการแพทย์, สารทางเลือกอย่างเช่น น้ำผึ้ง และ silver nano ไว้สำหรับรักษาแผลติดเชื้อ และ Virusnip™ มักนิยมใช้กับพื้นผิวที่มีความสกปรกมาก อย่าง พื้นโรงเรือน, รองเท้าบูท หรือรถที่ใช้ในการเคลื่อนย้ายสัตว์

Povidone iodine มีกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ไอออน สามชนิดที่เกิดจากปฏิกิริยาเมื่อผสมกับน้ำคือ iodine (I_2), hypoiodous acid (HOI) and iodide (I^-)(Rackur, 1985) กระบวนการฆ่าเชื้อของ povidone iodine ได้แก่ ไอออนต่างๆจะเข้าทำปฏิกิริยากับตำแหน่ง N-H ในเอนไซม์ที่ในการหายใจของเชื้อ, เกิดปฏิกิริยา

ออกซิไดซ์กับ S-H group ใน cysteine และ รบกวนไขมันไม่อิ่มตัวที่อยู่ในชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์จนทำให้เซลล์ตาย (Gottardi, 1985) อย่างไรก็ดีกระบวนการฆ่าเชื้อทั้งหมดที่มีอยู่ใน povidone iodine ยังไม่ถูกเปิดเผยมาจนถึงปัจจุบัน ในการศึกษาก่อนหน้านี้ 0.1-1% povidone iodine ถือว่าเป็นความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อ MRSA และ MSSA ได้เร็วที่สุด (Berkelman et al., 1982; Haley et al., 1985) เป็นเพราะ I_2 ที่เป็นสารฆ่าเชื้อหลักของ povidone iodine มีจำนวนเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นลดลงจนถึง 0.1-1% ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า dilution phenomenon แต่เมื่อความเข้มข้นต่ำกว่านี้ ความสามารถในการฆ่าเชื้อก็จะช้าลงเช่นกัน (Rackur, 1985) ส่วน 10% povidone iodine มักนิยมใช้ในงานทำความสะอาดผิวหนังที่สกปรกทั่วไป (Abdeyazdan et al., 2014) ข้อดีของ povidone iodine คือสามารถทำความสะอาดในบริเวณที่บอบบางได้และ ณ ปัจจุบันยังไม่พบเชื้อดื้อต่อสารชนิดนี้ทั้งกายภาพและพันธุกรรม

chlorhexidine gluconate มักนิยมใช้แผลผ่าตัดที่มีโอกาสติดเชื้อสูง ฆ่าเชื้อได้หลายชนิดอย่างเช่น gram-positive, gram-negative bacteria, fungi และ enveloped virus โดยใช้ประจุลบของ Cl^- ในการทำลายผนังเซลล์ (McDonnell and Russell, 1999) ในโรงพยาบาล สารตัวนี้มันนิยมใช้ร่วมกับแอลกอฮอล์มากกว่า 60% เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ 0.5 - 2% chlorhexidine gluconate เป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้กันในโรงพยาบาล สามารถทำความสะอาดได้ทุกที่ยกเว้นบริเวณเส้นประสาท(Henschen and Olson, 1984) ณ ปัจจุบัน พบว่าเชื้อที่มีสายพันธุกรรม qacA/B จะสามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อชนิดได้ (Gann et al., 2013)

Virusnip™ มักนิยมใช้ทำความสะอาดในโรงเรือนเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อภายในฟาร์ม เป็นสารอินทรีย์ที่หลั่งคลอรีน ในรูปแบบของผงแป้ง ซึ่งภายในประกอบด้วย potassium monopersulphate (PMP) ที่ทำหน้าที่เป็น oxidizing agent และ sodium dichloroisocyanurate (SDIC) ที่ทำหน้าที่เป็น organic releasing chlorine กระบวนการฆ่าเชื้อของสารนี้คือการที่ SDIC ปล่อย chlorine ออกมาเป็นจำนวนมาก เพื่อไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนภายในเซลล์ และยับยั้งการสร้างสายพันธุกรรม (McDonnell and Russell, 1999) และเมื่อแบคทีเรียสารประกอบของแบคทีเรียจะถูกนำมาเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา SDIC ใหม่ โดย PMP เป็นลูกโซ่ จนกระทั่ง monopersulphate ถูกใช้จนหมด(Kramomtong et al., 2010)

Silver nano เป็นสารทางเลือกชนิดหนึ่ง ที่มีความสามารในการฆ่าเชื้อมีหลายรูปแบบอย่างเช่น ความสามารถในการเกี่ยวติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเกาะอยู่อย่างถาวรจำให้เซลล์ขาดอาหารตายในที่สุด, ใช้ free radicals ก่อกวนผนังเซลล์จนทำให้เซลล์แตก, จับกับ thiol groups ของเอนไซม์สำคัญต่างๆในแบคทีเรียเพื่อหยุดการทำงาน และ การเปลี่ยนแปลงภาวะกรด-เบสภายในเซลล์ซึ่งส่งผลกับสารต่างๆภายในเซลล์และการสร้างสารพันธุกรรม (Prabhu and Poulose, 2012)

น้ำผึ้งเป็นสารทางเลือกที่มักนิยมใช้ในปัจจุบันโดยการักษาแผลผุผองในโรงพยาบาลคน สารฆ่าเชื้อที่มีในน้ำผึ้งนั้นอย่างเช่น hydrogen peroxide, propolis และ non-hydrogen peroxide substances (Schneider et al., 2012) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง hydrogen peroxide ที่พบว่าสามารถทำลายชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลาย DNA และสารประกอบสำคัญต่างๆของเซลล์ได้ (McDonnell and Russell, 1999) Manuka

honey เป็นน้ำผึ้งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีสารพิเศษที่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อนั่นคือ methylglyoxal (MGO) (Adams et al., 2009) ทำให้น้ำผึ้งชนิดถูกนำไปใช้ในการรักษาแผลในโรงพยาบาล อย่างเช่น แผลที่ติดเชื้อ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

การเก็บตัวอย่าง (Sample collection)

อาสาสมัครสุนัขจำนวน 62 ตัวที่เป็นสัตว์ป่วยของแผนกโรคผิวหนัง โรงพยาบาลสัตว์เล็กจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างปี 2553 ถึง 2557 ได้นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยสุนัขที่นำมาร่วมโครงการเป็นสุนัขไม่จำกัดเพศและพันธุ์ ที่มีอายุระหว่าง 3 เดือนถึง 2 ปี สุนัขจะถูกเก็บเชื้ออย่างน้อย 1 ถึง 3 ครั้งต่อตัว ขึ้นอยู่กับความร่วมมือของเจ้าของ

ในการศึกษาครั้งนี้เก็บเชื้อได้ทั้งหมด 110 ตัวอย่าง จากสุนัข 62 ตัว ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นสามกลุ่มได้ดังนี้

1.) กลุ่มสุนัขที่ไม่เคยได้รับยาปฏิชีวนะใดๆมาอย่างน้อย 1 ปี (prior to treatment (PT)) จำนวน 49 ตัวอย่าง

2.) กลุ่มสุนัขเป็นที่ติดตามต่อจากกลุ่มแรกจำนวน 38 ตัวอย่าง (on-drug) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรของ methicillin-resistant staphylococci (MRS) ภายหลังจากการรับประทานยา cephalexin monohydrate ปริมาณ 22 ถึง 30 มก ต่อ กก สองครั้งต่อวัน โดยไม่ให้รับประทานปฏิชีวนะอื่นร่วมด้วยหรือมีการให้ยาปฏิชีวนะอื่นทางผิวหนัง ทั้งนี้สุนัขจะถูกเก็บตัวอย่างทุก 1, 2, 3 และ 4 ถึง 8 สัปดาห์หลังการให้ยา ซึ่งจำนวนครั้งที่เก็บต่อตัวขึ้นอยู่กับความร่วมมือของเจ้าของสุนัข

3.) สุนัขที่กลับคืนสภาพเป็นปกติหลังการรักษาโดยปราศจากการให้ยาปฏิชีวนะซ้ำภายใน 6 ถึง 12 เดือน จำนวน 23 ตัว ซึ่งอ้างอิงจากการสัมภาษณ์และเวชระเบียน (off-drug)

ทั้งนี้มีเพียงสุนัข 10 ตัวจากทั้งหมด 62 ตัว ที่สามารถตรวจติดตามได้ตั้งแต่ก่อนที่จะให้ยาปฏิชีวนะ (PT) รักษา (on-drug) และหยุดให้ยาไป 8 ถึง 12 เดือน (off-drug)

การเก็บตัวอย่างจะเก็บจากทางช่องจมูก ขาหนีบ และรอยโรค ตัวอย่างจะถูกเก็บจากก้านไม้พันสำลีฆ่าเชื้อ และเก็บลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดขนส่ง บรรจุลงบนน้ำแข็ง ก่อนนำมาเพาะแยกเชื้อภายใน ๑๘ ชั่วโมง

การเพาะแยกเชื้อ และการวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย (bacterial isolation and identification)

ทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% และอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกเชื้อดื้อยา mannitol salt agar ผสม ยาปฏิชีวนะ oxacillin จำนวน 0.5 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาว-เหลือง ขนาด 1 ถึง 2 มิลลิเมตร จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5 % และเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวนวล มันวาว ขอบเรียบกลมขนาด 1 ถึง 2 มิลลิเมตร จากอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกเชื้อดื้อยา ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus* sp.

มาอย่างน้อย 3 โคโลนีต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% จนแยกได้เชื้อที่บริสุทธิ์

การทดสอบแยกชนิดของเชื้อด้วยชีวเคมีขั้นปฐมภูมิ (Primary test) ประกอบด้วย การย้อมเชื้อด้วยสีแกรม (Gram's staining) เชื้อในสกุล *Staphylococcus* จะมีเซลล์รูปร่างกลม (cocci) ติดสีแกรมบวกเป็นสีม่วง เรียงตัวกันเป็นกลุ่ม หรืออยู่เซลล์เดี่ยว, การทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility test) เชื้อในสกุลนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากไม่มีออร์แกเนลล์ที่ใช้ในการเคลื่อนที่, การทดสอบคุณสมบัติการมีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) เชื้อในสกุลนี้มีเอนไซม์คะตะเลส (+) แต่ไม่มีเอนไซม์ออกซิเดส (-), การทดสอบคุณสมบัติในการใช้น้ำตาลทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (oxidation and fermentation) เชื้อในสกุล Staphylococci จะสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน

การทดสอบเชื้อขั้นทุติยภูมิ (secondary test) ประกอบด้วย การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของซีรั่ม (coagulation test) ทดสอบโดยการผสมเชื้อลงในซีรั่มของแกะ เชื้อในกลุ่ม coagulase-positive Staphylococci จะให้ผลบวกคือการเกิดการแข็งตัวของซีรั่ม จากคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ coagulase, การทดสอบการสร้าง acetoin ด้วย Voges-Proskauer (VP) test, การทดสอบการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลมอลโทส (maltose), การทดสอบการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลกาแลคโตส (galactose), การทดสอบการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 7% (mannitol salt agar), การทดสอบการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลแมนิทอลในสภาวะไร้ออกซิเจน, การสร้างกรดจากการใช้น้ำตาล β-genitobiose และ การสร้างเอนไซม์ Arginine dihydrolase (Sasaki et al., 2007; Chanchaithong and Prapasarakul, 2011) จากนั้นได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อแยกสปีชี่ของเชื้อด้วย Primers ที่จำเพาะกับเชื้อทั้งสิ้น 7 คู่ (Sasaki et al., 2010)

การตรวจคัดกรองเชื้อ MRS ด้วยวิธี oxacillin disk screening test (CLSI, 2013)

เป็นการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ oxacillin 1 ไมโครกรัม ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดกรองเชื้อ MRS วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) ที่มีเชื้อ coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดวงใสที่ไม่มีการเจริญของเชื้อรอบแผ่นยา (clear zone) แล้วนำมาแปลผลโดยยึดตามหลักของ Clinical Laboratory Standard Institute (Schissler et al., 2009)

สารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

กลุ่มยาปฏิชีวนะ การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพใช้วิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) ต่อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 10 ชนิด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 2 ตารางแสดงชื่อยาปฏิชีวนะที่ในการทดลองครั้งนี้และความเข้มข้นของยาที่นำมาใช้

Antibiotic drug	Code	Concentration (µg)
cephalexin	CFZ	30
amoxicillin/clavulanic acid	AMC	20/10
imipenem	IMP	5
mupirocin	MUP	5
erythromycin	ERY	15
clindamycin	CLI	2
doxycycline	DOX	30
gentamicin	GEN	30
enrofloxacin	ENR	5
sulfamethoxazole/trimethroprim	SXT	1.25/23.75

การทดสอบหายีนดื้อยาทำโดยการใช้เทคนิคไมโครแอเรย์ (microarray)

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

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *lsa*(E)

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

การตรวจหายีน *mecA*

mecA เป็นยีนที่ใช้เป็นตัวแทนของการดื้อยาในกลุ่ม β lactam ที่สำคัญ ปฏิกิริยาลูกโซ่ใช้ gold standard เป็นการแยกแยะกลุ่มเชื้อ MRS (Strommenger et al., 2003) **ตารางที่ 4**

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจหายีน *mecA*

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

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

การจัดจำแนกชนิด SCC*mec* ที่พบใน MRCoPS ทำโดยวิธี multiplex PCR (Kondo et al., 2007) ซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนก SCC*mec* type I ถึง V ประกอบด้วย 2 ชุด ได้แก่ การตรวจชนิดของ *ccr* complex และ *mec* complex โดยใช้ไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR ดัง**ตารางที่ 5** และการจำแนก SCC*mec* type II-III ที่พบใน *S. pseudintermedius* ทำโดยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดัง**ตารางที่ 6** ส่วนชนิดที่ไม่สามารถทำการจัดจำแนกชนิดได้โดยวิธี multiplex PCR ได้ถูกนำมาระบุชนิดของ ΨSCC*mec*$_{57395}$ ด้วยวิธี long range PCR ด้วยไพรเมอร์ orfX-R3 (5′- AGATGAAAAAGCACCCGAAAC-3′) และ contig27-F3 (5′- CTTAAATGTCCAATATGTAAACACTC-3′) ทำให้ผลิตภัณฑ์ขนาด ๒๑,๖๖๗ คู่เบส แล้วจึงนำมาทำวิเคราะห์รูปแบบขนาดผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Bsu*36I) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 627 คู่เบส, 1,866 คู่เบส, 3,207 คู่เบส, 5,406 คู่เบส และ 10,571 คู่เบส โดยมีเชื้อ MRSP stain 57,395 เป็นเชื้อควบคุม (Perreten et al., 2013)

ตารางที่ 5 ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนก SCC*mec* I to V (Kondo et al., 2007)

Primer for PCR	Oligonucleotide primer (5'→3')	Gene target	Gene detected by primer pair	Size of product (bp)
Multiplex PCR panel 1 for *ccr* complex identification with *mecA* confirmation				
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	*mecA*	*mecA* (mA1-mA2)	286
mA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	*mecA*		
α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	*ccrA1*	*ccrA1-ccrB* (α1-βc)	695
α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	*ccrA2*	*ccrA2-ccrB* (α2-βc)	937
α3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	*ccrA3*	*ccrA3-ccrB* (α3-βc)	1,791
βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	*ccrB1,ccrB2,ccrB3*		
α4.1	GTATCAATGCACCAGAACTT	*ccrA4*	*ccrA3-ccrB* (α1-βc)	1,287
β4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT	*ccrB4*		
γR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	*ccrC*	*ccrC* (γF-γR)	518
γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	*ccrC*		
Multiplex PCR panel 2 for *mecA* complex identification				
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	*mecI*	*mecA-mecI* (mA7-mI6)	1,963
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	IS*1272*	*mecA*-IS*1272* upstream of *mecA* (mA7-IS7)	2,827
IS2 (iS-2)	TGAGGTTATTCAGATATTTCGATGT	IS*431*	*mecA*-IS*431* upstream of *mecA* (mA7-iS2(iS-20))	804
mA7	ATATACCAAACCCGACAACTACA	*mecA*		

ตารางที่ 6 ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการจัดจำแนก SCC*mec* type II-III ที่พบในเชื้อ MRSP (Descloux et al., 2008)

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

การเลือกตัวอย่าง

ในการทดลองนี้ได้เลือกเชื้อกลุ่ม CoPS ที่แยกได้จากสุนัข จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อที่ได้จาก *S. pseudintermedius* 5 ตัวอย่าง, *S. aureus* 2 ตัวอย่าง และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* จำนวน 3 ตัวอย่าง เชื้อทั้งหมดได้ทำการตรวจยืนยันอัตลักษณ์ จากการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย โดยใช้ *S. aureus* ATCC 6538 เป็นเชื้อควบคุม เชื้อทั้งหมดจะถูกเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมงก่อนจะนำมาใช้ในการทดสอบ

การเลือกสารที่นำใช้ในการตรวจสอบ

สารที่ใช้ในการทดสอบ แบ่งออกดังนี้

1) 10% povidone iodine (Reg. No. 1A 675/31, IDS manufacturing LTD., Pathumthani, Thailand) ในสารเหลว (aqueous solution) ผลิตภัณฑ์จะมีกลิ่นที่เป็นลักษณะจำเพาะแบบอ่อนๆ สีแดงผสมน้ำตาล ความเข้มข้นที่นำมาทดสอบคือ 10, 1 และ 0.1% ซึ่งอ้างอิงมาจากการทดลองก่อนหน้า (Rackur, 1985) ในการเตรียมความเข้มข้นที่ 1 และ 0.1% นั้น จะเตรียมจาก Stock solution : 10% povidone iodine ผสมกับ ultrapure water ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 และ 0.1 ต่อ 9.9 ตามลำดับ ทุกครั้งที่ทำการทดลองสารจะถูกผสมใหม่

2) 2% chlorhexidine gluconate ใน Isopropyl Alcohol (Reg. No. 1-1-03-02-13-00463, Pose Health Care Limited, Bangkok, Thailand) ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้จะมีกลิ่นเฉพาะตัวและมีสีแดง ความเข้มข้นที่นำมาทดสอบคือ 2, 1 และ 0.5% ซึ่งอ้างอิงมาจากการทดลองก่อนหน้า (Banovic et al., 2013) ในการเตรียมความเข้มข้นที่ 1 และ 0.5% นั้น จะเตรียมจาก 2% chlorhexidine gluconate ผสมกับ ultrapure water ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 4 ตามลำดับ ทุกครั้งที่ทำการทดลอง สารจะถูกผสมใหม่

3) Virusnip™ (Novartis Ltd.) แบบผง ถูกนำมาผสมน้ำกลั้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1:50, 1:100 และ 1:200 โดยอัตราส่วนได้อ้างอิงมาจากเอกสารประกอบการใช้งานที่แนบมากับผลิตภัณฑ์

(**http://www.ah.novartis.nl/cs/groups/public/@nch_com_ah/documents/document/n_prod_**196602**.pdf)** โดยเลือกความเข้มข้นที่นิยมใช้งานทั่วไป คือ 1:100 และ 1:200 มาร่วมอยู่ในการทดสอบ

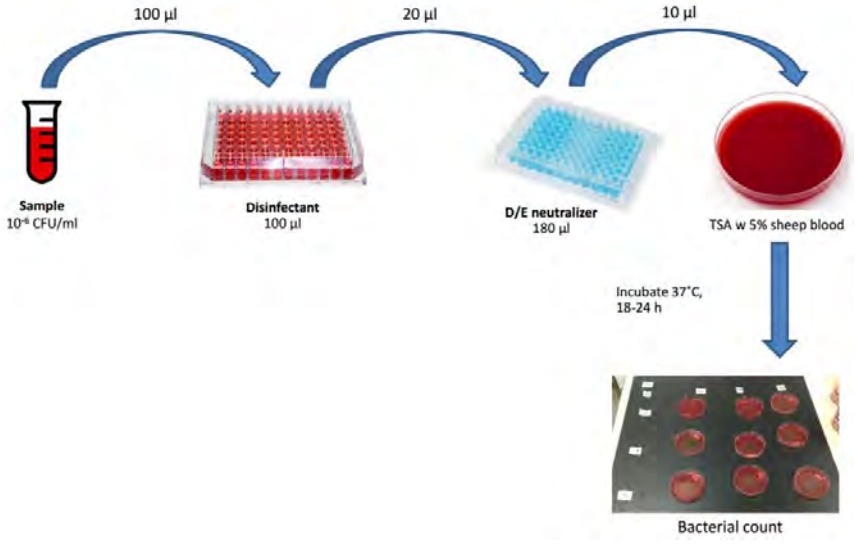
4) Silver Nano ในการทดลองนี้จะใช้ ผลิตภัณฑ์ที่มี Silver Nano 2 ชนิดที่ใช้กันทั่วไปในท้องตลาด เพื่อทำการทดสอบ ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 100%

5) น้ำผึ้ง ในการทดลองนี้จะใช้ Manuka honey และ Thai honey เพื่อทำการทดสอบ ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 100%

วิธีการทดสอบเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อต่อสารฆ่าเชื้อ

การทดสอบแบบในห้องทดลองด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งพัฒนาจากวิธีของ Swinney *et al* และ Banovic *et al*. โดยทุกการทดลองจะต้องทำซ้ำ 2 ครั้ง (Swinney et al., 2008; BSEN, 2000)

วิธีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารที่มักใช้กันในโรงพยาบาล เริ่มจากการปรับเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard โดยใช้เครื่องปรับความเข้มข้น (DEN-1B McFarland Densitometer, Grant-bio®, Cambridgeshire, UK) ในน้ำเกลือฆ่าเชื้อ (0.85% normal saline) แล้วปรับให้เชื้อแบคทีเรียมีความเข้มข้น 10^6 ถึง 10^8 CFU/mL ก่อนการทดสอบ หลังจากนั้นนำสารละลายเชื้อ 100 µL ผสมกับสารฆ่าเชื้อจำนวน 100 µL หลังจากนั้นสารละลายจำนวน 20 µL จะถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วย d/e neutralizer 180 µl หลังจากหยุดปฏิกิริยา 5 นาที สำหรับสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในโรงพยาบาลซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้รวดเร็วกว่าสารทางเลือก อย่างเช่น povidone iodine, chlorhexidine gluconate และ Virusnip™ จะถูกหยุดปฏิกิริยาด้วย d/e neutralizer (BBL®, French) ที่ 15, 30, 45, 60, 180 และ 300 วินาที หลังจากหยุดปฏิกิริยา 5 นาที สารละลายจำนวน 10 µL จะถูกนำไปเกลี่ยให้กระจายให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (**แผนภาพที่ 1**)



แผนภาพที่ 1 วิธีการทดสอบสารฆ่าเชื้อในโรงพยาบาล

วิธีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารทางเลือกอย่างเช่น silver Nano และน้ำผึ้ง เริ่มจากการปรับเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard โดยใช้เครื่องปรับความเข้มข้น (DEN-1B McFarland Densitometer, Grant-bio®, Cambridgeshire, UK) ในน้ำเกลือฆ่าเชื้อ (0.85% normal saline) แล้วปรับให้เชื้อแบคทีเรียมีความเข้มข้น 10^6 ถึง 10^8 CFU/ml ด้วย Muller Hinton broth (MHB) ก่อนนำมาทดสอบ หลังจากนั้นนำสารละลายเชื้อ 100 µL ผสมกับสารฆ่าเชื้อจำนวน 100 µL หลังจากนั้นสารละลายจำนวน 20 µL จะถูกหยุดปฏิกิริยาด้วย ultrapure water 180 µl เป็นเวลา 5 นาที ที่ 10 นาที, 15 นาที, 1 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง หลังจากหยุดปฏิกิริยา สารละลายจำนวน 10 µL จะถูกนำไปเกลี่ยให้กระจายให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการทดสอบเพื่อหาผลกระทบของ ultrapure water และ d/e neutralizer ที่มีต่อเชื้อที่นำมาทดสอบ

100 µL ของเชื้อแบคทีเรียมีความเข้มข้น 10^6 ถึง 10^8 CFU/mL ใน MHB ผสมกับ100 µL ของ ultrapure water หรือ d/e neutralizer สารละลายจำนวน 20 µL จะถูก dilute ด้วย ultrapure water จำนวน 180 µL หนึ่งครั้งก่อนที่จะ 10 µL ของสารละลายไปเกลี่ยให้กระจายให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% ที่เวลา 15 วินาที, 30 วินาที, 45 วินาที, 1 นาที, 3 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที, 1 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 4

ผลการวิจัย

เมื่อทำการตรวจคุณสมบัติ methicillin resistance ทั้งลักษณะแสดงและการมียีน *mec*A ทำให้ได้เชื้อ MRCoPS จำนวนทั้งหมด 113 เชื้อ แบ่งเป็นเชื้อ MRSP จำนวน 83 เชื้อ MRSSc จำนวน 26 เชื้อ และ MRSA จำนวน 4 เชื้อ เพื่อนำไปทำการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิดต่อไป แหล่งที่มาของเชื้อและจำนวนเชื้อ MRCoPS ทั้ง 3 สปีชีส์แสดงดัง**ตารางที่ 7-9** และ แสดงค่า minimal inhibitory concentration ของเชื้อ MRCoPS ทั้ง 3 สปีชีส์ ใน**ตารางที่ 10-12**

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* และรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข

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

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

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* และรูปแบบการดื้อยา (antimicrobial resistance profile) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข

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

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

เชื้อ MRSSc จำนวน 26 เชื้อ ให้รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ 11 แบบ ดัง**ตารางที่ 11** โดยเชื้อ MRSSc แสดงการดื้อต่อยา oxacillin, penicillin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, sulfamethoxazole และ mupirocin แสดงในตารางดังกล่าว ไม่พบเชื้อ MRSSc ดื้อต่อยา chloramphenicol, trimethoprim, vancomycin, rifampicin, linezolid, fusidic acid, quinupristin/dalfopristin และ tiamulin ค่าวามเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSSc แสดงใน**ตารางที่ 9**

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus schleifei* subsp. *coagulans* และรูปแบบการดื้อยา (antimicrobial resistance profile) ของเชื้อจากสุนัข สัตวแพทย์ และผู้เลี้ยงสุนัข

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

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

ตารางที่ 10 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของเชื้อ MRSP ต่อยาต้านจุลชีพ 19 ชนิด

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

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

แถบสีเทาแสดงระดับแสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา

NA; ไม่มีค่าสำหรับการแปลผล

ND; ไม่ได้ทำการทดสอบ

เชื้อจำนวน 10 เชื้อแสดงคุณสมบัติ inducible clindamycin resistance

ตารางที่ 11 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของเชื้อ MRSA ต่อยาต้านจุลชีพ 20 ชนิด

	ค่าที่แปลผลว่ามีการดื้อยา (mg/l)*	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (mg/l)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (mg/l)																จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา (%)
			≤0.01	0.0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	≥2	≥4	≥8	≥1	≥3	≥6	≥128	≥256	≥512	
			5	3									6	2	4				
Oxacillin with 2% NaCl	>0.25	0.25-8										4							4 (100%)
Penicillin	>0.25	0.012-2								4									4 (100%)
Ciprofloxacin	>1	0.25-8										4							4 (100%)
Tetracycline	>2	0.5-16											4						4 (100%)
Gentamicin	>1	1-16									1	2	1						4 (100%)
Kanamycin	>16	4-64												2	2				4 (100%)
Streptomycin	>16	4-32												4					4 (100%)
Erythromycin	>2	0.25-8					2	2											0
Clindamycin	>0.5	0.12-4									4								4 (100%)
Chloramphenicol	>8	4-64										2			2				2 (50.0%)
Sulfamethoxazole	>256	64-512													3	1			0
Trimethoprim	>4	2-32												4					4 (100%)
Mupirocin	>256	0.5-2 and 256						3									1		1 (25.0%)
Vancomycin	>2	1-16							4										0
Rifampicin	>0.5	0.015-0.5	4																0
Lizenolid	>4	1-8							2	2									0
Fusidic acid	>1	0.5-4						4											0
Quinupristin/dalfopristin	>2	0.5-4									4								1 (25.0%)
Tiamulin	NA	0.5-4									4								NA
Virginiamycin M1	NA	0.12-512															4		NA

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

แถบสีเทาแสดงระดับแสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา NA; ไม่มีค่าสำหรับการแปลผล ND; ไม่ได้ทำการทดสอบ

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

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

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

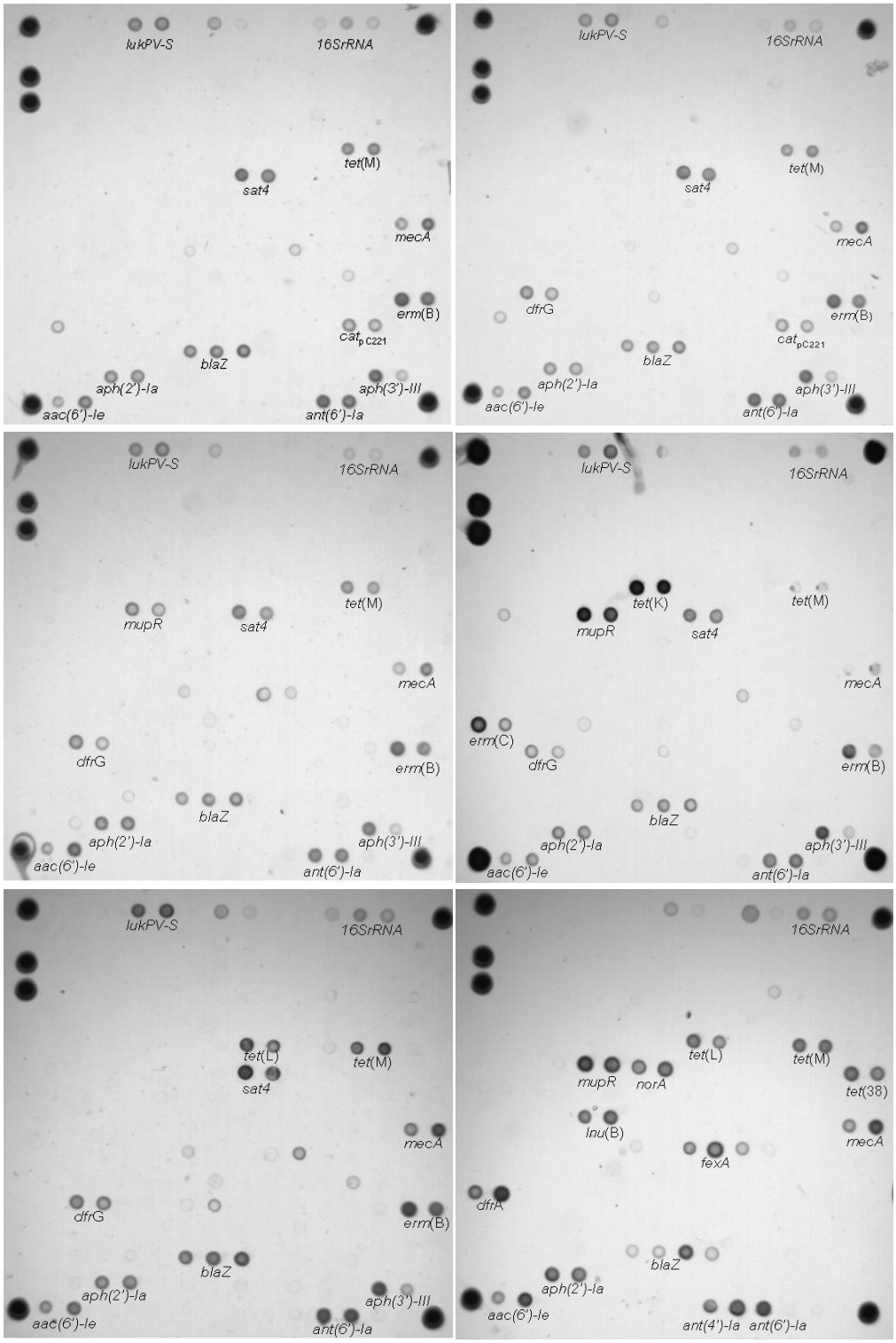
แถบสีเทาแสดงระดับแสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา

ยีนดื้อยาที่ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ (รูปที่ 1)

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

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

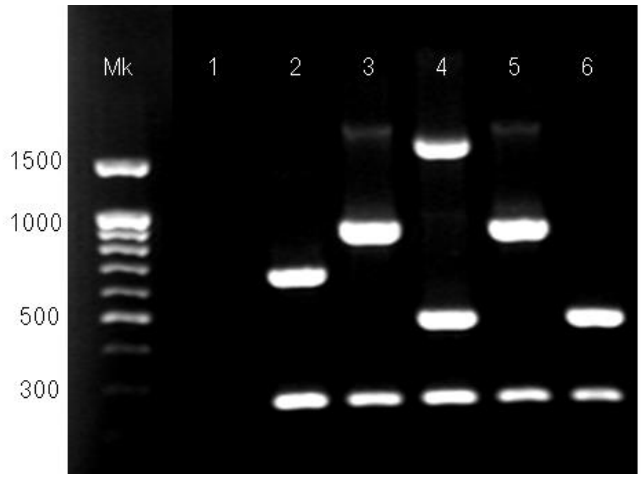
ส่วนเชื้อ MRSSc พบว่ามียีนที่คล้ายคลึงกับ MRSP แต่พบได้ในความถี่ที่น้อยกว่า ได้แก่ *mecA, blaZ*, *aac(6')-Ie, aph(2')-Ia, tet*(K), *tet*(O), *erm*(C) และ *mupR* โดยจำนวนเชื้อและร้อยละของเชื้อที่มียีนแต่ละชนิดแสดงดัง**ตารางที่ 20**



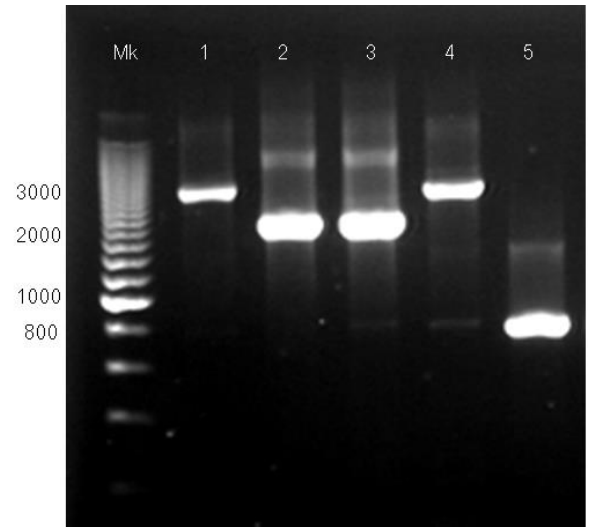
รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างการปรากฏของยีนดื้อยาจากเทคนิค DNA microarray ที่ในการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก

การจำแนกชนิดของ SCC*mec* ที่พบใน MRCoPS

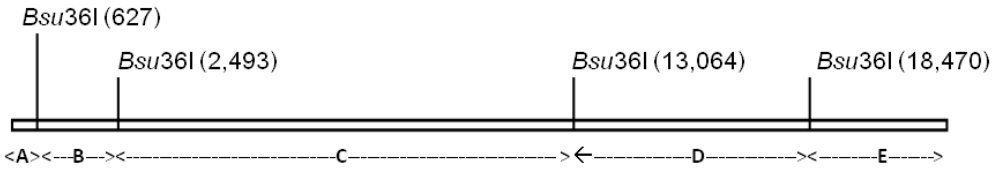
เชื้อ MRSP ทั้งหมด 35 เชื้อ สามารถถูกจัดจำแนกชนิดของ SCC*mec* ได้ด้วยวิธี multiplex PCR ประกอบด้วย SCC*mec* V ซึ่งมีการปรากฏของ *ccrC* (518 คู่เบส) และ class C *mec* complex (804 คู่เบส) จำนวน 22 เชื้อ SCC*mec* A1 ที่ประกอบด้วย class A *mec* complex (1,963 คู่เบส) และ *ccrA1B1* (698 คู่เบส) จำนวน 11 เชื้อ, SCC*mec* II-III ที่มีการปรากฏของ class A *mec* complex (1,963 คู่เบส), *ccrA3B3* (1,791 คู่เบส) และ *ccrC* (518 คู่เบส) แต่ไม่มีการปรากฏของ cadmium resistance operon จำนวน 2 เชื้อ ส่วน MRSP อีก 47 เชื้อ ไม่สามารถจำแนกชนิดของ SCC*mec* ด้วยวิธี multiplex PCR ได้ จึงนำไปทำการระบุชนิดด้วย long-range PCR และ restriction analysis **(ดังรูปที่ 5)** ได้ผลว่า 46 เชื้อมี ΨSCC*mec*$_{57395}$ (รูปที่ 4) ส่วนอีก 1 เชื้อไม่สามารถระบุชนิดได้ (non typeable SCC*mec*) ส่วนเชื้อ MRSA จำนวน 4 เชื้อและ MRSSc จำนวน 26 เชื้อ ทั้งหมดมี SCC*mec* V ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์จาก multiplex PCR เช่นเดียวกับ MRSP ที่มี SCC*mec* V (รูปที่ 2 และ รูปที่ 3)



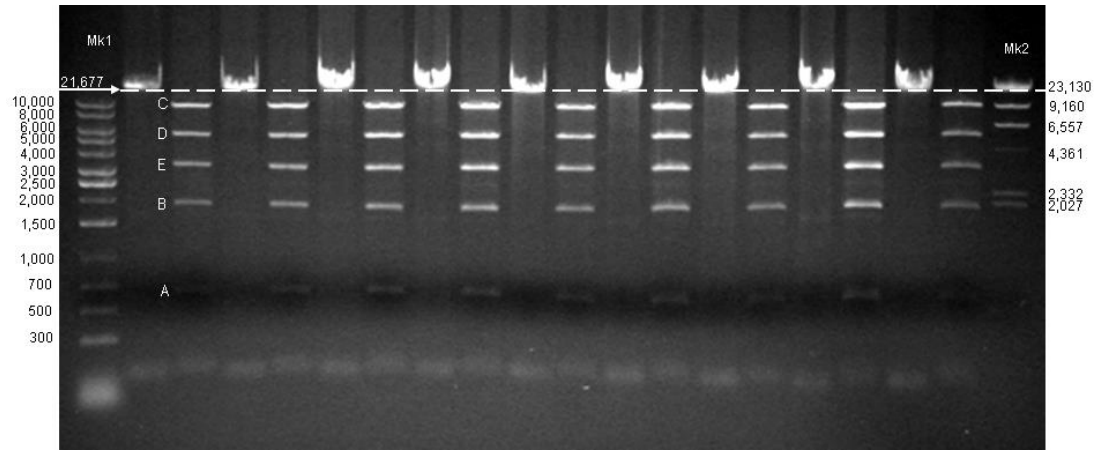
รูปที่ 2 แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ DNA จาก multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหา *ccr* complex ของเชื้อ MRCoPS ประกอบด้วย internal control *mecA* (286 คู่เบส); Mk, ladder marker, แถวที่ 1 *S. aureus* ATCC 25923; แถวที่ 2, MRSA NCTC 10442 (type 1 *ccr* complex, 695 bp); แถวที่ 3 MRSA N315 (type 2 *ccr* complex,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



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



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



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

การสำรวจติดตามการดื้อยาระหว่างการรักษา

มีการขออนุญาตการใช้ตัวอย่างจากสัตว์ ตามมติกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองหมายเลข 113/56 ในสุนัขกลุ่มที่ต้องได้รับยาปฏิชีวนะทั้ง 38 ตัว พบว่า 35 ตัวได้ป่วยเป็นโรคภูมิแพ้ผิวหนัง (Atopy), 2 ตัว เป็น โรคแพ้หมัด และ 1 ตัว เป็นโรคภูมิแพ้อาหาร ในกลุ่มนี้เป็นสุนัขที่ได้รับการติดตามต่อจากกลุ่ม PT มีจำนวน 11 ตัว หลังจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสุนัขทุกตัวได้หายจากโรคผิวหนังทั้งหมดอย่างสมบูรณ์

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสุนัขทุกตัวในกลุ่ม PT เชื้อที่ไวรับต่อยากลุ่ม MSCoPS แต่มีเพียงแค่ 3 ตัว จาก 49 ตัว (6.1%) เท่านั้นที่พบเชื้อดื้อยากลุ่ม MRCoPS ที่ตำแหน่งจมูกและขาหนีบ ส่วนกลุ่ม on-drug สามารถพบเชื้อดื้อยากลุ่ม MRCoPS ได้ในสุนัขทุกตัวโดยเฉพาะที่ตำแหน่งจมูกและขาหนีบ แต่กลับพบที่บริเวณรอยโรคเพียง 11 ตัว (28.9%) เท่านั้น อย่างไรก็ดี พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของประชากรสุนัขที่พบเชื้อดื้อยากลุ่ม MRCoPS และ เชื้อที่ไวรับต่อยากลุ่ม MSCoPS (*t*-test, *P <0.001*) ของสุนัขในกลุ่มนี้ ในขณะที่ ในกลุ่ม drug-off ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P=0.257*) ของ

จำนวนสุนัขที่พบเชื้อดื้อยา MRCoPS (15/23, 65.2%) และเชื้อไม่ดื้อยา MSCoPS (19/23, 82.6%) อัตราส่วนประชากรของเชื้อดื้อยากลุ่ม methicillin-resistant coagulase positive staphylococci (MRCoPS) และ เชื้อไวรับต่อยากลุ่ม methicillin-sensitive coagulase positive staphylococci (MSCoPS) ที่ได้รับจากแต่ละกลุ่มถูกแสดงไว้ใน**ตารางที่ 13**

ตารางที่ 13 การเปรียบจำนวนประชากรระหว่าง เชื้อดื้อยา MRCoPS และเชื้อที่ไวรับต่อยา MSCoPS ที่ได้จากช่องจมูก, ขาหนีบ และรอยโรคของแต่ละกลุ่ม

กลุ่มสุนัข (n= จำนวนสุนัข)	**เวลา**	**จำนวนของสุนัขที่พบ**	**จำนวนของสุนัขที่ให้ผลบวก**		***P-value***	**ตำแหน่ง**	**จำนวนสุนัขที่พบMRCoPS ที่ตำแหน่งนั้น**
		***MRCoPS**	***MRCoPS**	***MSCoPS**			
Pre-treatment (49)			3†	49	*<0.001*	จมูก ขาหนีบ รอยโรค	1 2 0
On-drug (38)	1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ 3 สัปดาห์ 4 สัปดาห์	11/11 7/7 10/10 10/10	38†	10	*<0.001*	จมูก ขาหนีบ รอยโรค	31 31 11
Drug-off (23)			15†	19	*0.257*	จมูก ขาหนีบ	10 11
รวม			56	78			97

*MRCoPS = methicillin-resistant coagulase positive Staphylococci; MSCoPS = methicillin-sensitive coagulase positive Staphylococci

†MRCoPS ที่พบในกลุ่ม pre-treatment และ drug-off หรือ on-drug มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA and paired t-test, $P< 0.05$)

เมื่อทำการแยกชนิดของเชื้อด้วยวิธีชีวเคมีและ PCR พบว่า สามารถแยกเชื้อได้ 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *S. aureus*, *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ซึ่งได้มีการแสดงการกระจายของเชื้อใน**ตารางที่ 14** จากการทดลองพบว่าจากเชื้อกลุ่ม coagulase-positive staphylococci (CoPS) จำนวนทั้งหมด 257 ตัวอย่าง พบเชื้อ *S. pseudintermedius* มากที่สุด (207/257, 80.54%) รองลงมาคือ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* จำนวน 46 ตัวอย่าง (17.89%) และ *S. aureus* จำนวน 3 ตัวอย่าง (1.16%)

ในการทดลองนี้พบว่า เชื้อไวรับต่อยากลุ่ม methicillin-sensitive *S. pseudintermedius* (MSSP) เป็นเชื้อที่พบมากที่สุด (71/87, 81.6%) ในสุนัขกลุ่ม PT ซึ่งตรงข้ามกับ กลุ่ม on-drug ที่พบประชากรในกลุ่มเชื้อดื้อยา methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) มากที่สุดถึง 69

(58.4%) แต่เมื่อเปรียบเทียบประชากร MRSP และ MSSP ในกลุ่ม drug-off พบว่า อัตราส่วนจำนวนประชากรของเชื้อทั้งสองชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P = 0.086*) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อดื้อยา MRSP สามารถพบได้มากที่สุด บริเวณจมูกและขาหนีบของสุนัข

ตารางที่ 14 แสดงความถี่และการกระจายของเชื้อกลุ่ม MRCoPS และ MSCoPS ของสุนัขทั้งสามกลุ่มที่ตำแหน่งต่างๆ

กลุ่ม (n= จำนวนCoPS)	**ตำแหน่ง**	***MRSP**	***MSSP**	***P-value***	***MRSSc**	***MSSSc**	**P-value**	***MRSA**	***MSSA**	**รวม**
PT (87)	จมูก (48)		40[†]			5		1	2	48
	ง่ามขา (36)	2	28	*<0.0001*		6				36
	รอยโรค (3)		3							3
	รวมย่อย 1	2	71	*<0.0001*		11		1	2	87
On-drug (118)	จมูก (46)	28[‡]	5[‡]	*<0.0001*	12	1	<0.0001			46
	ขาหนีบ (52)	30	7	*0.065*	13	2	0.001			52
	รอยโรค (20)	11	4	*<0.0001*	4	1	0.83			20
	รวมย่อย 2	69	16	*<0.0001*	29	4	<0.0001			118
Drug-off (32)	จมูก (27)	10	14	*0.043*		2		1		27
	ขาหนีบ (25)	11	14	*0.265*						25
	รวมย่อย 3	21	28	*0.033*		2		1		52
รวมย่อย 1+2+3 = รวมทั้งหมด		92	115	*0.052*	29	17		2	2	257

*MRSP = methicillin-resistant *S. pseudintermedius*, MSSP = methicillin-sensitive *S. pseudintermedius*, MRSSc = methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, MSSSc = methicillin-sensitive *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*, MSSA = methicillin-sensitive *S. aureus*

ช่องว่างคือไม่ตรวจพบตัวอย่าง.

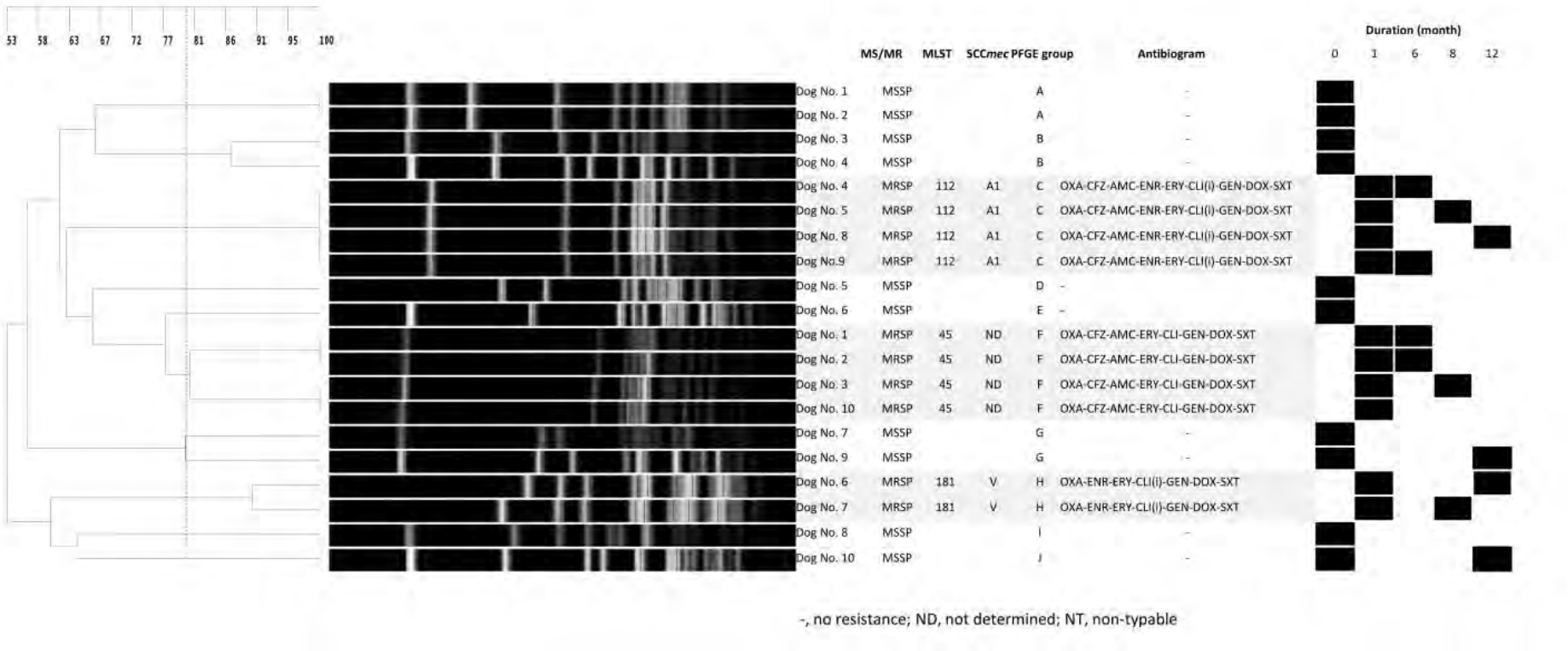
[†]ประชากรของ MRSP และ MSSP ในช่องจมูกของกลุ่ม PT และ on-drug มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (multiple comparisons, $P < 0.05$)

P-value ที่ใช้ในการตัดสินความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของประชากร MRSP และ MSSP ที่แต่ละตำแหน่งหรืออวัยวะคือ paired t-test

ในการทดลองนี้เชื้อกลุ่ม CoPS จำนวน 20 ตัวอย่างที่มาจากทางช่องจมูกของสุนัข 10 ตัวที่ติดต่อตั้งก่อนให้ยาจนถึงหยุดยาได้ถูกนำมาวินิจฉัยทางชีวโมเลกุล (molecular analysis) และแบบแผนการดื้อยา (antibiograms) ซึ่งแสดงไว้ใน **รูปที่ 6** และจากการแยกรูปแบบเชื้อด้วยวิธี PFGE พบว่า MSSP แสดงรูปแบบที่เป็นเอกลักษณ์ต่างกันถึง 8 รูปแบบในขณะที่ MRSP แสดงรูปแบบที่ต่างกันเพียง 3 รูปแบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบสัมพันธ์กับ MLST, SCC*mec* type และแบบแผนการดื้อยา (antibiograms) การดื้อยา

1. ST112 พบรูปแบบการดื้อแบบ OXA-CFZ-AMC-ENR-ERY-CLI(i)-GEN-DOX-SXT ร่วมกับ *SCCmec* A type
2. ST45 พบรูปแบบการดื้อแบบ OXA-CFZ-AMC-ERY-CLI-GEN-DOX-SXT ร่วมกับ non-typable *SCCmec*
3. ST121 พบรูปแบบการดื้อแบบ OXA-ENR-ERY-CLI(i)-GEN-DOX-SXT ร่วมกับ *SCCmec* V type.

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า MRSP ตัวเดียวกัน สามารถปรากฏได้ตั้งแต่ช่วงที่สุนัขได้รับการรักษาจนหลังยา 6 ถึง 12 เดือน



รูปที่ 6 พันธุกรรมลักษณะ และ แบบแผนการดื้อยาของ CoPS ที่ได้จากทางช่องจมูกของสุนัข 10 ตัวที่ถูกตรวจติดตามตั้งแต่ก่อนให้ยา, ระหว่างให้ยา และ หลังหยุดยาเป็นเวลามากกว่า 8 เดือน สุนัขเบอร์ 9 และ 10 ไม่ได้รับการเก็บเชื้อทางช่องจมูกหลังจากหยุดยาไป 8 เดือน แต่เก็บเฉพาะเดือนที่ 6 และ 12

ND = ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี two panel multiplex PCR.; กรอบสีดำแสดงให้เห็นเชื้อที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ทำการตรวจสอบ

ความไวรับของเชื้อกลุ่ม CoPS ต่อสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในโรงพยาบาล

จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ สารฆ่าเชื้อ chlorhexidine gluconate และ Virusnip™ ที่นิยมใช้ในโรงพยาบาล มีประสิทธิภาพ สามารถฆ่าเชื้อกลุ่ม CoPS ภายในเวลา 15 วินาที ในทุกความเข้มข้นที่นำมาทำการทดลอง ซึ่งแตกต่างจาก povidone iodine ให้ระยะเวลาการฆ่าเชื้อที่ต่างกัน ดังนี้ **รูปที่ 7**

10% povidone iodine ใช้เวลาอย่างต่ำ 3 นาทีในการฆ่าเชื้อ *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และใช้เวลาอย่างต่ำ 1 นาทีในการฆ่าเชื้อ *S. aureus*

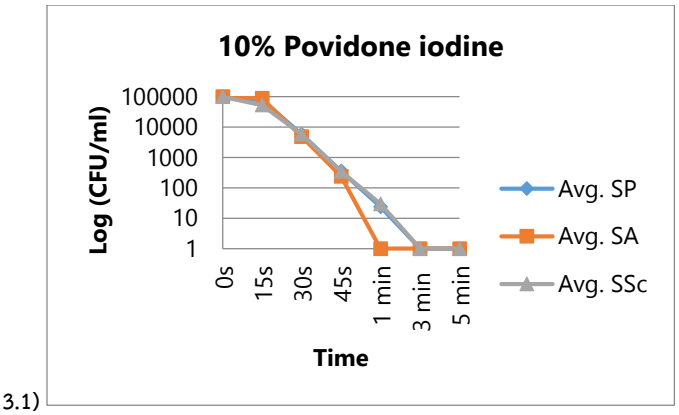
1% povidone iodine ใช้เวลาอย่างต่ำ 45 วินาที ในการฆ่าเชื้อ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และ *S. aureus* และใช้เวลาอย่างต่ำ 30 วินาที ในการฆ่าเชื้อ *S. pseudintermedius*

0.1% povidone iodine ใช้เวลาอย่างต่ำ 30 วินาที ในการฆ่าเชื้อ *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และใช้เวลาอย่างต่ำ 45 วินาทีในการฆ่าเชื้อ *S. aureus*

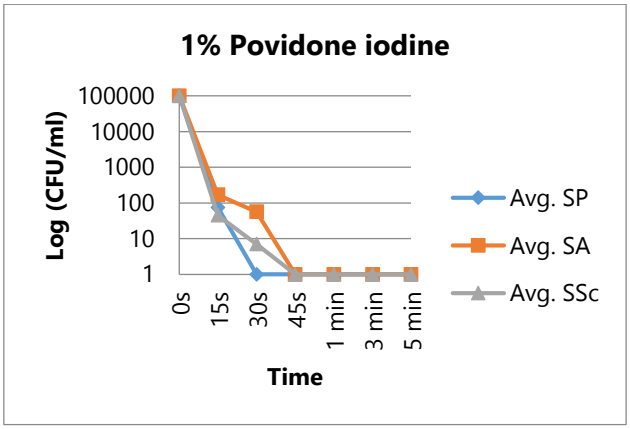
ความไวรับของเชื้อกลุ่ม CoPS ต่อสารทางเลือก

ผลจากการทำสารทางเลือกอย่างเช่น น้ำผึ้ง และ silver nano ที่นำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียพบว่า น้ำผึ้งทั้งสามชนิดที่นำมาใช้มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียซึ่งได้แก่ Enterobacterium *spp.*, Corynebacterium *spp.* และ Kurthia *spp.* จึงไม่มีความเหมาะในการนำมาทำเป็นสารยับยั้งเชื้อในการทดลองนี้

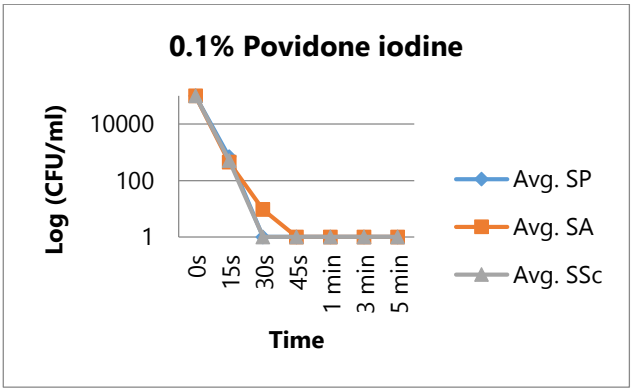
ส่วน Silver nanoเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อในกลุ่ม CoPS พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ 1 (SV1) และผลิตภัณฑ์ที่ 2 (SV2) สามารถยับยั้งเชื้อได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง **รูปที่ 8**



3.1)



3.2)

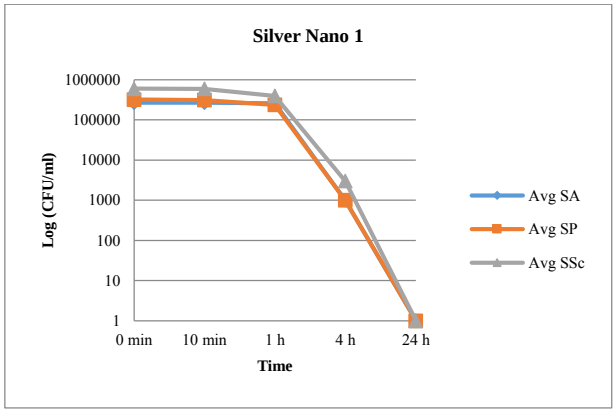


3.3)

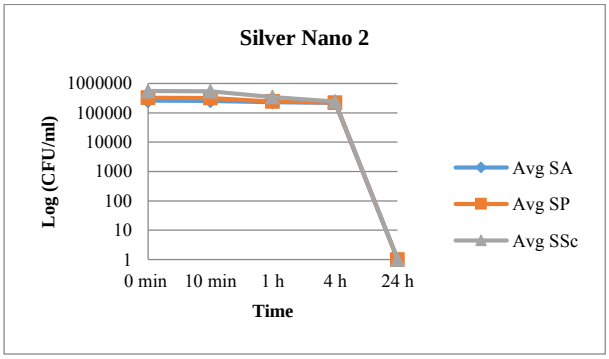
รูปที่ 7 ค่าเฉลี่ยความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความสามารถในการฆ่าเชื้อกลุ่ม CoPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ povidone iodine; 3.1) 10% povidone iodine, 3.2) 1% povidone iodine, 3.3) 0.1% povidone iodine

SP = *Staphylococcus pseudintermedius*; SSc = *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*; SA = *Staphylococcus aureus*

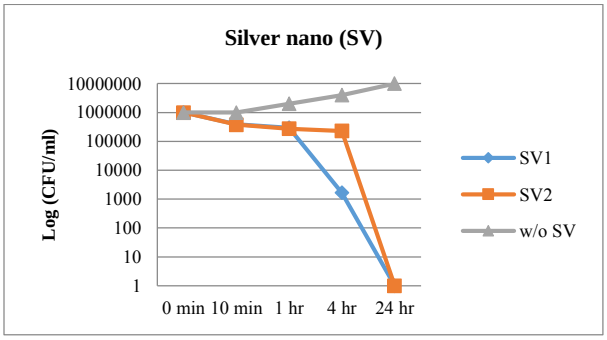
4.1)



4.2)



4.3)



รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความสามารถในการฆ่าเชื้อกลุ่ม CoPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ Silver nano 4.1) ค่าเฉลี่ยผลของ Silver nano ชนิด 1 (SV1) ต่อเชื้อทั้งสามสปีชี่ย์ 4.2) ค่าเฉลี่ยผลของSilver nano ชนิด 2 (SV2) ต่อเชื้อทั้งสามสปีชี่ย์ 4.3) การเปรียบเทียบ ผลการยับยั้งเชื้อของ Silver nanoของ ๒ ผลิตภัณฑ์ ใน MHB พร้อมทั้ง control ที่เป็น เชื้อร่วมกับ MHB w/o Silver Nano

บทที่ 5

อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1) อภิปรายผลการทดลอง

จากคุณสมบัติในการดื้อยาของเชื้อพบว่ามากกว่าร้อยละ 80 ของเชื้อ MRSP นั้นมีคุณสมบัติในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด มากกว่า 3 กลุ่มขึ้นไป โดยสามารถตวจพบยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาจากเทคนิคไมโครแอเรย์ที่พบยีนดื้อยาส่วนมากมาจาก mobile genetic element จากการรายงานที่ผ่านมา (Kadlec and Schwarz, 2012) โดย MRSP ที่แยกได้ในประเทศไทยนี้มี Tn5405-like element จากการที่ตรวจพบ aph(3')-III, ant(6')-Ia, sat4 and erm(B) ร่วมกัน ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม aminoglycoside และ macrolide ที่พบได้บ่อยในเชื้อ S. pseudintermedius (Boerlin et al., 2001; Perreten et al., 2010) นอกจากนี้พบยีนดื้อยาอีกหลายชนิดที่กระจายอยู่ในเชื้อ MRSP ซึ่งมีบทบาทเป็นยีนที่เป็นปัจจัยทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อดื้อยา ส่วนยีนดื้อยาบางชนิดที่มักพบบนพลาสมิดนั้นพบได้น้อยในเชื้อ MRSP เช่น tet(K), catpC221 และ erm(C) อาจเกิดจากการที่ S. pseuintermedius มีความสามารถในการรับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้น้อยกว่าเชื้อสปีชีส์อื่นๆ (Noble et al., 1996) ทั้งนี้การปรากฏของ catpC221 และไม่มี dfrG นั้นเป็นคุณลักษณะการดื้อยาหลักของเชื้อ MRSP ST745 แต่ในทางกลับกัน dfrG สามารถพบได้ใน MRSP ST อื่นๆมากมาย (Feng et al., 2012; Perreten et al., 2010) ส่วนเชื้อ MRSSc ที่แสดงการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดแสดงรูปแบบการดื้อยาคล้ายคลึงกับเชื้อ MRSP ซึ่งอาจมี mobile genetic element ที่เหมือนกัน แต่การดื้อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาของเชื้อ MRSA นั้นมีความแตกต่างจาก MRSP และ MRSSc เนื่องจากมีการพบยีน tet(L), fexA, lsa(E) และ lnu(B) ที่พบในเชื้อ LA-MRSA ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นยีนที่ไม่ได้พบใน S. aureus ปกติ (Kadlec et al., 2012) ทั้งนี้การดื้อต่อยา quinupristin/dalfopristin นั้นเป็นสิ่งที่ควรตระหนักเนื่องจากเป็นยาสำคัญที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาล อีกทั้งเชื้อ MRSA เป็นสปีชีส์ที่มีความจำเพาะได้กับมนุษย์และเคยมีการรายงานการระบาดของเชื้อ LA-MRSA ในโรงพยาบาลมาแล้วเช่นกัน (Kock et al., 2009; Lozano et al., 2012) การแพร่ระบาดของเชื้อ MRCoPS จากสัตว์ที่ในมนุษย์มีความสำคัญในแง่ของการได้รับเชื้อดื้อยาจากสัตว์สู่คน โดยเฉพาะเชื้อดื้อยาที่มีการพัฒนาการดื้อต่อยาสำคัญที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อดื้อยารุนแรงในโรงพยาบาลทั้งจากการได้รับ mobile genetic element หรือการเกิดการผ่าเหล่า (Kadlec et al., 2011; Schwendener and Perreten, 2011) ดังนั้นการสำรวจติดตามการดื้อยาของเชื้ออย่างต่อเนื่องจึงเป็นประโยชน์ในการได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบันเกี่ยวกับการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียและการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสม

การพบเชื้อ MRCoPS ที่มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันและรูปแบบการดื้อยาที่เหมือนกันโดยมีแหล่งที่มาจากทั้งสุนัขและคน เป็นหลักฐานที่บ่งชี้ว่ามีการส่งผ่านเชื้อดื้อยานี้ระหว่างสัตว์และมนุษย์ จากการที่พบเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน และยืนยันได้โดยการใช้ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอที่เหมือนกันโดยเฉพาะในสุนัขและคนที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบเชื้อ MRSP หลาย ST มีการกระจายตัวในสุนัข แสดงถึงการคงอยู่ของเชื้อดื้อยาหลายสายพันธุ์ในสุนัขในประเทศไทย โดยสรุปแล้วการศึกษานี้แสดงการแพร่กระจายของเชื้อ MRSP หลากหลายสายพันธุ์มีการกระจายตัวในสุนัขและผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขในประเทศไทย โดยสายพันธุ์หลักคือ MRSP ST745 และพบ ST ใหม่ๆจากการใช้เทคนิค MLST-7 อีกทั้งยังพบ LA-MRSA ในสุนัขและสัตวแพทย์ รวมถึงแสดงคุณลักษณะร่วมและความสัมพันธ์ของ MRSSc ในกลุ่มประชากรด้วย โดยเชื้อ MRSP ที่แยกได้นั้นแสดงการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่ใช้ในทางสัตวแพทย์ ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อ MRSA นอกจากแสดงการดื้อยาที่ใช้ในทางสัตวแพทย์แล้วยังดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีความสำคัญในการรักษาการติดเชื้อดื้อยารุนแรงในคน คือ dalfopristin/quinupristin และดื้อต่อยา mupirocin ที่ใช้ในการกำจัดเชื้อ MRSA ในคนที่เป็นพาหะของเชื้อ ซึ่งจัดว่าเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญทางสาธารณสุข ดังนั้นจึงควรมีการสร้างมาตราการและสนับสนุนการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุสมผลร่วมกับการวินิจฉัยโรคอย่างถูกวิธี รวมถึงปฏิบัติตามสุขลักษณะของสัตวแพทย์ระหว่างและหลังการรักษาสัตว์ และการอยู่ร่วมกันระหว่างผู้เลี้ยงและสุนัข เป็นสิ่งจำเป็นหนึ่งที่จำช่วยลดปัญหาการส่งผ่านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาระหว่างสัตว์และมนุษย์

เชื้อ MSCoPS ที่พบอยู่ในกลุ่ม PT จึงมีจำนวนมากกว่ารายงานก่อนหน้านี้ อาจเกิดจากสัตว์ป่วยที่ถูกส่งต่อและสัตว์ป่วยที่อายุเกินจะถูกตัดออกโดยไม่มีความลำเอียง จำนวนประชากรของเชื้อปรากฏจึงมาพบเชื้อที่ไม่ดื้อยาสูง (Beck *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม สุนัขเพียง 38 ตัวจากกลุ่ม PT จะถูกนำมาศึกษาต่อหลังได้รับยา เป็นเพราะความไม่สะดวกของเจ้าของ ที่ไม่สามารถทำให้ตรวจติดตามต่อได้ จากการศึกษาครั้งนี้พบ MRSP มากที่สุดในช่องจมูกและขาหนีบแต่พบเพียงจำนวนเล็กน้อยบนรอยแผลของโรค ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบเชื้อประจำ (อย่างเช่น จมูก, ช่องปาก และขาหนีบ) เป็นแหล่งสำคัญที่จะพบเชื้อ staphylococci ที่ปนเปื้อนมาจากโฮสต์อื่นๆได้ (Chanchaithong and Prapasarakul, 2011; Beck et al., 2012) อย่างไรก็ดีทดลองอาจจะให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มักพบเชื้อชนิดนี้ที่บริเวณคอหอย, มุมปากและบาดแผล (Windahl et al., 2012)

MRSA ที่พบได้ในการทดลองนี้มีจำนวนน้อย อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อที่ตรวจพบอาจจะเกิดจากการส่งผ่านเชื้อจากคนไปสู่สุนัข ซึ่งอาจจะมีความเป็นไปได้มากกว่าการส่งผ่านจากสุนัขสู่คน (Routh et al., 2009) ในขณะเดียวกัน อัตราการเจอเชื้อ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ในสุนัขค่อนข้างสูงกว่ารายงานก่อนหน้า อีกทั้งเชื้อดื้อยา MRSSc จะพบได้เฉพาะช่วงที่สุนัขได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาเท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากความอ่อนแอของเชื้อในกลุ่มนี้ จึงทำให้ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะปกติหรือปราศจาก antibiotic pressure

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าความเสี่ยงในการเจอ MRSP จะขึ้นกับ ช่วงเวลาของเชื้อที่อยู่ในโรงพยาบาล, ความถี่ในการมาโรงพยาบาลและการรักษาหูด้วยยาหยอดหูภายนอกและ glucocorticoid แต่ประเด็นที่เกี่ยวข้องกับยาปฏิชีวนะนั้นค่อนข้างน้อยและไม่ค่อยถูกกล่าวถึง (Lehner *et al.*, 2014) ถึงกระนั้น ความสัมพันธ์ระหว่างการให้ยา cephalexin monohydrate และการเจอเชื้อ MRSP ในการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก เงื่อนไขของการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง, ชนิดของยาปฏิชีวนะและช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง, ความสามารถในการตรวจพบยีนดื้อยา, การตอบสนองของเชื้อต่อยาและการวิเคราะห์อัตลักษณ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ

การคงอยู่ของเชื้อดื้อยาหลังจากการให้ยาอาจมากกว่า 6 เดือน เป็นที่เรื่องเคยมีการรายงานมาแล้วในสุนัข (Beck et al., 2012; Windahl et al., 2012) และหลังจาก 6 เดือน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของประชากรของเชื้อตามธรรมชาติ โดยอัตราส่วนของประชากรเชื้อที่ไม่ดื้อยาอาจจะกลับมามีอัตราส่วนเทียบเคียงกับประชากรเชื้อดื้อยา ตามทฤษฎีของ genetic fitness cost (Andersson et al., 1998) อย่างไรก็ตามพบว่าการได้รับยาปฏิชีวนะไม่สามารถกำจัดเชื้อ MSCoPS ให้หมดออกไปจากผิวหนังสัตว์ได้ เพียงแต่ไปรบกวนอัตราส่วนจำนวนประชากรของ MRCoPS และ MSCoPS และเป็นที่น่าสนใจว่า MRSSc ที่พบในการทดลองนี้ไม่เป็นไปตามทฤษฎีของ genetic fitness cost เพราะเนื่องจากเชื้อดื้อยาชนิดนี้จะหายไปทันทีเมื่อหยุดให้ยาในสุนัข (Nielsen *et al*., 2012)

ในการทดลองครั้งนี้ การวินิจฉัยด้วย MLST และ PFGE ถูกนำมาใช้เพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์และการคงอยู่ของเชื้อในช่วงให้ยาและหลังให้ยาปฏิชีวนะ ในครั้งนี้ PFGE pattern ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Cfr9I* เพื่อพิสูจน์อัตลักษณ์ของสารพันธุกรรม (Chanchaithong et al., 2014) พบว่า PFGE pattern ความสอดคล้องกันกับ ผลการทดลองของ antibiograms และ *SCCmec* typing ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองที่พบใน สายพันธุ์ของอักฤษและออสเตรเลีย (Maluping et al., 2014; Siak et al., 2014) ความคลึงกันของสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นน่าเกิดจากบริเวณที่ทำการเลี้ยงมากกว่ามาติดเชื้อที่โรงพยาบาลเพื่อเนื่องจากมาเพื่อตรวจรักษาเป็นระยะสั้น อย่างไรก็ดีสุนัขทุกตัวที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้หายจากอาการเจ็บป่วย ถึงแม้จะพบว่ามีเชื้อดื้อยาอยู่บนผิวหนัง ซึ่งอาจจะสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าสุขภาพร่างกายมีอิทธิพลมากในการต่อสู้กับเชื้อโรค (Bryan et al., 2012)

Povidone iodine, chlorhexidine gluconate และ Virusnip^{TM} เป็นสารที่นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อบนตัวสัตว์และในสิ่งแวดล้อม ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า 10% povidone iodine มีความสามรถในการกำจัดเชื้อในกลุ่ม MRSA และ MSSA ได้ในระยะเวลาที่ไม่แตกต่างกัน (Berkelman et al., 1982; Sakuragi et al., 1995; Block et al., 2000) แต่อย่างไรก็ดีในความเข้มข้นนี้จะต้องใช้เวลาในการกำจัดที่นานกว่าที่ความเข้มข้น 0.1-1% (Berkelman et al., 1982; Haley et al., 1985) สาเหตุเกิดมาจากผลของ dilution phenomenon ที่ปรากฏอยู่ใน povidone iodine ซึ่งได้ทำการพิสูจน์มาแล้วว่า ที่ความเข้มข้น 0.1% จะมีความเข้มข้นของ I_2 ที่เป็นสารสำคัญในการฆ่าเชื้อมากที่สุด (Rackur, 1985) ซึ่งจะทำ

ให้ในความเข้มข้นนี้ povidone iodine สามารถจะกำจัดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ดีระยะเวลที่ใช้ในการทำลาย *S. aureus* ในการทดลองนี้ยังใช้เวลามากกว่าการทดลองอื่น (Berkelman et al., 1982; Haley et al., 1985; Sakuragi et al., 1995) อาจเป็นเพราะว่าในการทดลองนี้เราได้นำเชื้อท้องถิ่นมาใช้ จึงให้มีความสามารถในการทนทานแต่ต่างกันในแต่ละพื้นที่

chlorhexidine gluconate เป็นยาสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในการทำความสะอาดก่อนผ่าตัด ในกรณีของ chlorhexidine gluconate ใน isopropyl alcohol พบว่าที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์มากกว่า 60% จะเพิ่มความสามารถในการทำลายเชื้อให้ chlorhexidine gluconate เพิ่มขึ้น จนสามารถทำลายเชื้อ อย่างเช่น *S. aureus* ได้ภายใน 15 วินาที (Sakuragi et al., 1995) อย่างไรก็ดี chlorhexidine gluconate มีข้อพึงระวังคือห้ามใช้ทำความสะอาดในบริเวณที่ใกล้กับเส้นประสาท, ดวงตา และหู เพราะอาจจะทำอันตรายได้ เมื่อมีการฉีดยาในบริเวณนั้น (Henschen and Olson, 1984)

Virusnip™ เป็นสารนิยมที่ใช้ในการทำลายเชื้อบนพื้นในฟาร์มและสิ่งแวดล้อม ในการทดลองนี้พบว่าการใช้ 0.005% Virusnip™ ที่ 15 วินาทีเพียงพอต่อฆ่าเชื้อในกลุ่ม CoPS ทั้งหมด ซึ่งผลจากการทดลองอาจจะใช้ความเข้มข้นที่มากกว่าการทดลองก่อนหน้า (Kramomtong et al., 2010) แต่เป็นค่าจริงที่ถูกนำมาใช้ในทางปฏิบัติ ดังนั้นความเข้มข้นนี้ถือว่าเหมาะอย่างยิ่งในการนำมาใช้ทดลอง

Manuka honey เป็นน้ำผึ้งที่รู้จักกันแพร่หลายในว่ามีคุณสมบัติฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับ (Schneider et al., 2012) เมื่อนำมาทดสอบพบว่าในน้ำผึ้งที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV มีเชื้อเจือปนมาทำให้ไม่เหมาะสมอย่างยิ่งกับการนำมาใช้จริง รวมถึงน้ำผึ้งท้องถิ่นอีกสองชนิดที่พบการปนเปื้อน จึงไม่ได้รับการทดสอบต่อในครั้งนี้

Silver nano เป็นสารทางเลือกที่นิยมนำมาใช้ในทางสัตวแพทย์ แม้ว่าจะมีรายงานถึงเกี่ยวฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารชนิดนี้ (Prabhu and Poulose, 2012) แต่ไม่มีรายงานยืนยันถึงการใช้สัตว์จริง ในการทดลองนี้พบว่า silver nano ต้องใช้เวลาในการฆ่าเชื้อทั้งหมดนานถึง 24 ชั่วโมง ดังนั้นสารทางเลือกชนิดจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นสารฆ่าเชื้อบนผิวหนังสัตว์

ในการทดลองครั้งนี้เราใช้การประยุกต์จากสองวิธีการเป็นเพราะเราต้องให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาการฆ่าเชื้อนั้นได้หยุดจริง ก่อนที่จะทำการเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวน ทั้งนี้จำนวนของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (10^6 cfu/ml) สูงกว่าจำนวนเชื้อจริงที่พบอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Sakuragi et al., 1995) เนื่องจากเรากังวลเกี่ยวกับการลดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของน้ำยาที่ใช้เมื่ออยู่บนผิวสัมผัสจริง ดังนั้นความเข้มข้นนี้จึงน่าจะเหมาะสมในการนำมาทดลองในครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ดีนี่อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อใช้ระยะเวลานานกว่าปกติในการถูกกำจัด (Berkelman et al., 1982; Haley et al., 1985)

5.2) สรุปงานโดยภาพรวม

5.2.1) เชื้อ CoPS ซึ่งประกอบด้วย *S. pseudintermedius* และ *S. schleiferi* subsp. *Coagulans* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปบนช่องจมูกและขาหนีบของสุนัข แต่พบน้อยบริเวณบาดแผล

5.2.2) การอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยาบนผิวหนังของสุนัขเป็นเรื่องที่อาจพบได้ทั่วไป แต่สมดุลนั้นอาจจะถูกรบกวนได้ด้วยการให้ยาปฏิชีวนะ

5.2.3) เชื้อ MRSP ที่มีภาวะ MDR สามารถเจอได้หลังจากให้ยาเพียงหนึ่งสัปดาห์และอาจคงอยู่มากกว่า 6 สัปดาห์หลังหยุดยา ทั้งนี้การเจอเชื้อหลังหยุดยานั้นอาจขึ้นกับระยะเวลาการให้ยาและการส่งผ่านเชื้อจากสิ่งแวดล้อมหรือจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่มีความใกล้ชิดกับสัตว์นั้นๆ

5.2.4) ระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดใช้สำหรับการฆ่าเชื้อกลุ่ม CoPS ได้แก่ 0.1% povidone iodine ที่เวลา 45 วินาที, 0.5% chlorhexidine ที่เวลา 15 วินาที และ 0.005% Vinusnip^{TM} ที่เวลา 15 วินาที

5.2.5) สารทางเลือกอย่างเช่นน้ำผึ้ง และ silver nano ยังไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นสารหลักในการฆ่าเชื้อในกลุ่ม CoPS เนื่องจากใช้ระยะเวลานานในการฆ่าเชื้อและมีการปนเปื้อนสูง

บทที่ 6

มาตรการป้องกันการติดต่อของเชื้อ MRCoPS จากสัตว์สู่คนในโรงพยาบาลสัตว์

สัตวแพทย์และผู้เกี่ยวข้องกับงานทางด้านสัตวแพทย์ในโรงพยาบาลสัตว์	
ข้อ	**วิธีปฏิบัติ**
1	ล้างมือด้วย chlorhedine gluconate แบบสบู่ หรือ เปลี่ยนถุงมือทุกครั้งก่อนจับสัตว์ป่วย
2	เลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสัตว์ป่วยเมื่อจำเป็น
3	ควรเลือกยาปฏิชีวนะให้เหมาะสมกับเชื้อ
4	ควรทำ drug sensitivity test สำหรับสุนัขทุกตัวที่จะเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้ยา ให้เหมาะกับตัวสัตว์

การทำความสะอาดบนผิวหนังสัตว์	
ข้อ	**วิธีปฏิบัติ**
1	การเตรียมผิวหนังก่อนผ่าตัด ในกรณีที่ผิวหนังบริเวณนั้นไม่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่ออ่อนหรือเส้นประสาท หลังจากที่ทำความสะอาดสิ่งสกปรกออกไปทั้งหมดแล้ว ให้ทำความสะอาดด้วย 0.5% chlorhedine gluconate ใน isopropyl alcohol โดยให้สารฆ่าเชื้อสัมผัสกับผิวหนังบริเวณนั้น อย่างน้อย 15 วินาที
2	การเตรียมผิวหนังก่อนผ่าตัด ในกรณีที่ผิวหนังบริเวณนั้นเกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่ออ่อนหรือเส้นประสาท หลังจากที่ทำความสะอาดสิ่งสกปรกออกไปทั้งหมดแล้ว ให้ทำความสะอาดด้วย 0.1-1% povidone iodine โดยให้สารฆ่าเชื้อสัมผัสกับผิวหนังบริเวณนั้นอย่างน้อย 45 วินาที

การทำความสะอาดบนพื้นผิวต่างๆในโรงพยาบาล	
ข้อ	**วิธีปฏิบัติ**
1	ใช้ 0.005% VirusnipTM ในการทำควาสะอาด พื้นโรงพยาบาล, โต๊ะตรวจ, และโต๊ะผ่าตัด โดยให้สารสัมผัสพื้นผิวอย่างน้อย 15 วินาที

บทที่ 7

เอกสารอ้างอิง

Abdeyazdan Z, Majidipour N and Zargham-Boroujeni A. 2014. Comparison of the effects of povidone-iodine and chlorhexidine solutions on skin bacterial flora among hospitalized infants. **J Educ Health Promot.** 3: 16.

Adams CJ, Manley-Harris M and Molan PC. 2009. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. **Carbohydrate Res**. 344: 1050–3.

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

Andersson, D. I., Björkman, J. and Hughes, D. 1998. [Antibiotic resistance here to stay? Compensatory mutations restore virulence of resistant bacteria]. ***Lakartidningen*** **95**(37), 3940, 3943-3944.

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

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

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

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

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

Banovic F, Bozic F and Lemo N. 2013. *In vitro* comparison of the effectiveness of polihexanide and chlorhexidine against canine isolates of *Staphylococcus*

pseudintermedius, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. **Vet Dermatol.** 24(4): 409-413, e488-409.

Beck, K. M., Waisglass, S. E., Dick, H. L. & Weese, J. S. 2012. Prevalence of meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their meticillin-resistant or meticillin-sensitive staphylococcal pyoderma. **Vet Dermatol** 23(4), 369-375, e366-367.

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

Bemis, D. A., Jones, R. D., Videla, R. and Kania, S. A. 2012. Evaluation of cefoxitin disk diffusion breakpoint for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. **J Vet Diagn Invest** 24(5), 964-967.

Berkelman RL, Holland BW and Anderson RL. 1982. Increased bactericidal activity of dilute preparations of povidone-iodine solutions. **J Clin Microbiol.** 15(4): 635-639.

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

Block C, Robenshtok E, Simhon A and Shapiro M. 2000. Evaluation of chlorhexidine and povidone iodine activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* using a surface test. **J Hosp Infect.** 46(2): 147-152.

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

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

Bryan, J., Frank, L. A., Rohrbach, B. W., Burgette, L. J., Cain, C. L. and Bemis, D. A. 2012. Treatment outcome of dogs with meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma. **Vet Dermatol** 23(4), 361-368, e365.

BSEN. chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 2/step 1)2000. Available from: http://www.cen.eu/cen/Sectors/TechnicalCommitteesWorkshops/CENTechnicalCommittees/Pages/Standards.aspx?param=6197&title=Chemical%20disinfectants%20and%20antiseptics.

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

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

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

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(2), 572-586.

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

CLSI. Vet01-S2 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Second Informational Supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

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

Descloux, S., Rossano, A. and Perreten, V. 2008. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone

and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **J Clin Microbiol.** 46: 1818-1823.

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

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

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

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

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

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

Gann, P.M., Milillo, M., Kwak, Y.I., Quintero, R., Waterman, P.E. and Lesho, E. 2013. Rapid and simultaneous detection of the chlorhexidine and mupirocin resistance gene *qacA/B* and *mupA* in clinincal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 77(3):270-2.

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

Gottardi W. 1985. The influence of the chemical behaviour of iodine on the germicidal action of disinfectant solutions containing iodine. **J Hosp Infect**. 6 Suppl A: 1-11.

Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S. and Rankin, S.C. 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and

Staphylococcus schleiferi in dogs with healthy and inflamed skin. **Vet Dermatol.** 19(3): 142-149.

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

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

Haley, C.E., Marling-Cason, M., Smith, J.W., Luby, J.P. and Mackowiak, P.A. 1985. Bactericidal activity of antiseptics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**. 21(6): 991-992.

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

Henschen, A. and Olson, L. 1984. Chlorhexidine-induced degeneration of adrenergic nerves. **Acta Neuropathol.** 63(1): 18-23.

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

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

Horváth, A., Dobay, O., Kardos, S., Ghidán, Á., Toth, A., Pászti, J., Ungvari, E., Horváth, P., Nagy, K., Zissman, S. & Füzi, M. 2012. Varying fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones governs clonal dynamic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. **31**(8), 2029-2036.

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

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

Jousson, O., Di Bello, D., Vanni, M., Cardini, G., Soldani, G., Pretti, C. and Intorre, L. 2007. Genotypic versus phenotypic identification of staphylococcal species of canine

origin with special reference to *Staphylococcus schleifer*i subsp. *coagulans*. **Vet Microbiol.** 123(1-3): 238-244.

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

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

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

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

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

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

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

Kramomtong, I., Niyomtham, W., Talummuk, S., Chaiyanate, P. and Sievert K. *In vitro* testing of the efficacy of organic releasing chlorine (Virusnip™) against *Escherichia coli*, Salmonella *spp*. *Candida albicans* and *Trichophyton mentagophytes*. **TJVM**. 2010;40(4):419-25.

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

Lehner, G., Linek, M., Bond, R., Lloyd, D. H., Prenger-Berninghoff, E., Thom, N., Straube, I., Verheyen, K. and Loeffler, A. 2014. Case-control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. **Vet Microbiol** 168(1), 154-160.

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

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

Maluping, R. P., Paul, N. C. and Moodley, A. 2014. Antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from veterinary clinical cases in the UK. **Br J Biomed Sci** 71(2), 55-57.

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

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

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

McDonnell G and Russell AD. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin Microbiol Rev.** 12(1): 147-179.

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

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

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

Mueller RS, Bergvall K, Bensignor E and Bond R. 2012. A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. **Vet Dermatol.** 23(4):330-41, e62.

Nielsen, K.L., Pedersen, T.M., Udekwu, K.I., Petersen, A., Skov, R.L., Hansen, L.H., Hughes, D. and Frimodt-Moller, N. 2012. Fitness cost: a bacteriological explanation for the demise of the first international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic. **J Antimicrob Chemother.** 67(6):1325-32.

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

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

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

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

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

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

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

Prabhu, S. and Poulose EK. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **INL**. 2(32):1-10.

Rackur H. 1985. New aspects of mechanism of action of povidone-iodine. **J Hosp Infect.** 6 Suppl A: 13-23.

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

Routh, J. C., Alt, A. L., Ashley, R. A., Kramer, S. A. and Boyce, T. G. 2009. Increasing prevalence and associated risk factors for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteriuria. **J Urol** 181(4), 1694-1698.

Sakuragi T, Yanagisawa K and Dan K. 1995. Bactericidal activity of skin disinfectants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Anesth Analg.** 81(3): 555-558.

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

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

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

Schneider M, Coyle S, Warnock M, Gow I and Fyfe L. 2012. Anti-Microbial Activity and Composition of Manuka and Portobello Honey. **Phytother Res**. 27(8):1162-8

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

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

Siak, M., Burrows, A. K., Coombs, G. W., Khazandi, M., Abraham, S., Norris, J. M., Weese, J. S. and Trott, D. J. 2014. Characterisation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from cases of canine pyoderma in Australia**. J Med Microbiol**. 63(Pt 9):1228-33

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

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

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

Swinney A, Fazakerley J, McEwan N and Nuttall T. 2008. Comparative in vitro antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. **Vet Dermatol**. 19(6): 373-379.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Windahl, U., Reimegard, E., Holst, B. S., Egenvall, A., Fernstrom, L., Fredriksson, M., Trowald-Wigh, G. and Andersson, U. G. 2012. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs--a longitudinal study. **BMC Vet Res.** 8, 34.

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

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

บทที่ 8

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการ

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

   Assoc. Prof. Dr. Nuvee Prapasarakul

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

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

   สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต

   จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

   ดุษฎีบัณฑิต

   Tokyo University of Agriculture and Technology

   Graduated Fellowship

   Murdoch University
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

   Veterinary Mycology: Isolation, Pathogeneisis, Immunology

   Antimicrobial resistance in bacteria: MIC, genetic mutation and mechnism

   Intestinal Spirochetes: Isolation, protein characteristics, genetic properties
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

   8.1 ประสบการณ์การทำวิจัย

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

8.2 งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในรอบ 5 ปี

8.2.1 **Nuvee Prapasarakul*,** Padet Tummaruk, Juthamas Klinwichit, Anchana Singchan, Assawanan Srithananchai and Tongchai Chalermchaikit (2010). Surveillance of antimicrobial-resistant rate of *Escherichia coli* isolated from pigs in 7 provinces in Thailand. *The*

Journal of Thai Veterinary Medical Science Association Under The Royal Patronage. 1-3(61), 1-10.

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

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

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

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

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

8.2.7 **Nuvee Prapasarakul***, *Chaiwat* Pulsrikarn, Taksa Vasaruchapong, Pisin Lekcharoen, Pattrarat Chanchaithong, Kittitat Lugsomya, Nitiwadee Keschumras, Natthakarn Thanomsuksinchai, Kanittha Tanchiangsai, and Padet Tummaruk. (2012) *Salmonella* serovar distribution in cobras (*Naja Kaouthia*), snake feeds and farm worker

at Queen Saovabha Snake Park, Thailand. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation.* Vol. 24, Number 2, 288-294. IF 1.56

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

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

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

8.2.11 Perreten V, Chanchaithong P, **Prapasarakul N,** Rossano A, Blum SE, Elad D, Schwendener S. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome mec element (ψSCCmec57395) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Nov;57(11):5509-15. IF 4.65

8.2.12 Chanchaithong, Pattrarat; Perreten, Vincent; Schwendener, Sybille; Tribuddharat, Chanwit; Chongthaleong, Anan; Niyomtham, Waree; **Prapasarakul, Nuvee***. (2014) Strain typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal species in dogs and people associated with dogs in Thailand. J Applied Microbiol. 117, 572-586.

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

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

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

8.3 รางวัล

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

8.3.2 Rachadapisek Sompod Fellowship, 2004-present

8.3.3 Fellowship of CNK Foundation, 2003- present

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

8.3.5 The Thailand research grants 2005

8.3.6 Crawford fellowship foundation, Australia 2006

8.3.7 The Thailand research grants 2008-2012

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

8.4 รางวัลงานวิจัย

8.4.1 Commendable Research Award 2006, Thai Veterinary Medication Association

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

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

8.4.4 Best Research Award, 2014, VPAT Regional Veterinary Congress

8.5 งานประชุมวิชาการ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8.5.13 The 2nd Asian Pig Veterinary Society congress. (2005) Title: *In vitro* sensitivity of pathogenic *Escherichia coli* and non-pathogenic

Escherichia coli against 16 antimicrobial agents. (Oral) Title: Prevalence of vilirent factors among hemolytic and non-hemolytic *E. coli* isolated from post weaning piglets in Thailand. (Oral) Title: The efficacy of colistin and bacitracin combination on number of enteric bacteria and some productive traits in post-weaning piglets. (Oral) Title: The prevalence and biochemical properties of *Brachspira hyodysenteriae* in Thailand. (Poster)

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

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

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

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

8.5.18 The 32th annual conference of Thai Veterinary Medical Association (2007) Title: Isolation and classification of *Malassezia* sp. isolated from atopic and healthy dog Title: Comparative study of DNA

extraction of *Malassezia* yeast Title: *In vitro* sensitivity of 6 antimicrobials against secondary bacteria in dog with viral infection Title: Comparative study of Salmonella prevalence in wild caught and farm snakes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ผู้วิจัยร่วม 1

1 ชื่อ – นามสกุล รศ. นพ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์

Assoc. Prof. Dr. Chanwit Tribuddharat

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

3 หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

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

4. ประวัติการศึกษา

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

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

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

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

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

แบคทีเรียวิทยา และอณุชีววิทยาขุ้นสูง

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

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

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

6.1.2 Srifuengfung S, Chokephaibulkit K, **Tribuddharat C**, Comerungsee S. A description of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus*

pneumoniae-Siriraj Hospital, Thailand: 2008. J Med Assoc Thai. 2010 Nov;93 Suppl 5:S27-34.

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

6.1.4 Jariyasethpong T, **Tribuddharat C**, Dejsirilert S, Kerdsin A, Tishyadhigama P, Rahule S, Sawanpanyalert P, Yosapol P, Aswapokee N. MRSA carriage in a tertiary governmental hospital in Thailand: emphasis on prevalence and molecular epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Aug;29(8):977-85.

6.1.5 Thapa B, **Tribuddharat C**, Srifuengfung S, Dhiraputra C. High prevalence of *bla*(OXA)-2 3 in oligoclonal carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010 May;41(3):625-35.

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

6.2 งานวิจัยที่กำลังทำ :

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

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

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

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

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

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

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

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

6.2.9 Typing and immunological study of *Leptospira interrogans*.

6.2.10 Molecular epidemiology of multi-drug resistant nosocomial pathogens.

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

ผู้วิจัยร่วม 2

1 ชื่อ-นามสกุล นาง สิริลักษณ์ สุรเชษฐพงษ์
Mrs. Sirilak Surachetpong

2 เลขหมายบัตรประชาชน 3 1999 00077 21 4

3 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4 หน่วยงาน และสถาที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
ถนนอังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

5 ประวัติการศึกษา
จบสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2545
จบปริญญาโท สาขา Clinical Science จาก Colorado State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2548
จบปริญญาเอก สาขา Clinical Science จาก Colorado State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2551
Post doctoral fellowship ณ Colorado State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2551-2552

6 สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ
Veterinary Medicine, Veterinary Cardiology

7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.1 การตายของเซลล์และการปรากฏของโปรตีนในตระกูลบีซีแอลสอง และทรานสฟอร์มมิ่ง โกรว์ท แฟคเตอร์ เบต้า 1 ในโรคลิ้นหัวใจไมทรัลเสื่อมในสุนัข

7.1.2 การศึกษาความชุกของโรค Bartonellosis ที่ก่อรอยโรคลิ้นหัวใจอักเสบ

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

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

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

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

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

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

7.3.2 การศึกษาความชุกของโรค Bartonellosis ที่ก่อรอยโรคลิ้นหัวใจอักเสบ
แหล่งทุน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
การทำวิจัยลุล่วงแล้วร้อยละ 70

ผู้วิจัยร่วม 3

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

7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*

8 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

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

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

8.1.3 Kesdangsakonwut, S., Banlunara,W., **Niyomtham, W.**, Chotiapisitkul,S., Thanawongnuwech, R. 2003. Disseminated Aspergillosis in a Mute Swan (Cygnusolor) in Thailand : A Case Report, The 11 th International Symposium of the World

Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, November 9-13; 102-103.

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

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

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

8.1.7 Kramomtong, I., **Niyomtham,W.**,Punachot, S., 2006. The effects of barakol extracted from *CASSIA SIAMEA* in reducing the colonization of *Salmonella* in young boiler chicks. Proceedings Ann. Con. Vet Sci. Chula. Meeting April 27-28: 73.

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

8.1.9 Kramomtong, I.,Tripipat, T., **Niyomtham W**. and Angkanaporn, K., 2007. Effects Of Mixed Organic Acids On Crop And Caecal *Salmonella* Enteritidis Colonization, *Lactobacilli* Count And Growth Performance In Broiler Chicks (PN0048). Conference proceedings The 8th Asian Pacific Poultry Conference 2007 Science to Solutions.

Swissotel Le Concorde Hotel, Bangkok, Thailand. March 5-6: 478-482.

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

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

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

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

ผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุม

1. "*Appearance of MRCoPS on dog skin following oral cefalexin monohydrate administration*." The 38th International Conference on Veterinary Science (The 38th ICVS) 16-18 January 2013 at Bangkok, Thailand
2. *"Dogs and dog-associated people in Thailand shared the same methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius and S. aureus strains"* The 38th International Conference on Veterinary Science, Bangkok, Thailand.
3. "Antibiograms of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintemedius* isolated from with and without ongoing antimicrobial treatment" The 38th International Conference on Veterinary Science, Bangkok, Thailand.
4. "*Prevalence of coagulase-positive staphylococci (CoPS) on veterinarians, surfaces and cotton ball at small animal hospital, faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University during 2010-2011*." The 38th International Conference on Veterinary Science (The 38th ICVS) 16-18 January 2013 at Bangkok, Thailand
5. "*Prolongation of methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) following cefalexin monohydrate administration.*" The 1st ASM Conference on Experimental Microbial Evolution 19-22 July 2014 at Washington DC, USA.
6. "*Inducible clindamycin resistance in Staphylococcus pseudintermedius isolated from dogs in Thailand*" at VPAT Regional Veterinary Conference 2014, Bangkok, Thailand.
7. "*Distribution and frequency of staphylococcal enterotoxins in Staphylococcus pseudintermedius isolated from dogs, humans, and environment*" 14th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC2015)
8. "*Enterotoxin gene profiles of Staphylococcus pseudintermedius from canine origin in Thailand*" at VPAT Regional Veterinary Congress 2015
9. "*Characteristics of predominant methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius sequence type 131 distributing in dogs and dog-associated people in Thailand*" at The 6th Swiss Molecular Microbiology Meeting 2014, Villars-sur-Ollon, Switzerland.

10. "*Approximately time and concentration of povidone iodine to kill Staphylococcus pseudintermedius"* The first grand progress presentation 12 December 2014 at Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
11. "*Risk Assessment of Coagulase Positive Staphylococci (CoPS) on Materials and Equipment Surfaces in a Veterinary Teaching Hospital, Thailand"* CUVC 2014 13th, Bangkok, Thailand.
12. "*Time to Kill Evaluation of Silver-Nano Agents to Canine Coagulase Positive Staphylococci* (CoPS)" CUVC 2014 13th, Bangkok, Thailand.
13. "*Distribution of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) in a small animal hospital"* 40th WSAVA 15-18 May 2015, Bangkok, Thailand.

ผลงานตีพิมพ์

- 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 staphalococcal species in dogs and people associated with dogs in Thailand. Journal of Applied Microbiology 117: 572-586.

- Perreten, V., Chanchaithong, P., Prapasarakul, N., Rossano, A., Blum, S., Elad, D. and Schwendener, S. 2013. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome mec element (ΨSCCmec57395) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57:5509-5515.

- Fungwithaya P., Chanchaithong P., Phumthanakorn N., Muaungkong P., Bumpenpol P., Kaewparuehaschi M., Chongthaleong A., Tribudharat C., and Prapasarakul N.* (2015) Association between cephalexin administration and the emergence of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (MRCoPS) in dogs. Thai Journal of Veterinary Medicine (In Press)

- Chanchaithong P* and Prapasarakul N. (2015) Occurrence and molecular characterization of inducible clindamycin in *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs in Thailand. The Veterinary Journal. (In Press)