**เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2557; 12(2): 95-105**

**บทความต้นฉบับ**

# ความชุกของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ที่ตำแหน่งโพรงจมูกและฝีเย็บในสุนัขและแมวสุขภาพดีจากโรงพยาบาลสัตว์เพื่อการสอนด้านสัตว์เล็ก

**วลัยพร ตนพิทักษ์*, จุฬาภา สอนกลิ่น**

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพฯ 10530*

**บทคัดย่อ** การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุกของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) ที่ตำแหน่งโพรงจมูกและฝีเย็บในสุนัขและแมวสุขภาพดีจากโรงพยาบาลสัตว์เพื่อการสอนด้านสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร รวมทั้งจำแนกชนิดของ staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) ของสายพันธุ์ที่พบโดยเก็บตัวอย่างจากสุนัขและแมวสุขภาพดีจำนวนอย่างละ 23 ตัว ทำการเพาะแยกเชื้อและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อวินิจฉัยชนิดเชื้อแบคทีเรีย *S. pseudintermedius* และยืนยันด้วยวิธี RFLP การดื้อต่อยา methicillin ทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี disk diffusion ด้วยยา oxacillin และยืนยันการมียีน *mec*A ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส หลังจากนั้นจำแนกชนิด SCC*mec* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่มัลติเพล็กซ์โพลิเมอร์เรส ผลการศึกษาพบว่าความชุกของ MRSP ในสุนัขและแมวสุขภาพดีมีค่าเท่ากันคือ ร้อยละ 4.3 โดยพบเชื้อที่ตำแหน่งฝีเย็บ ซึ่งเชื้อดังกล่าวดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดในกลุ่มร่วมด้วย MRSP ทั้งสองสายพันธุ์ที่พบในสุนัขและแมวนั้นให้ผลเช่นเดียวกันคือ ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เนื่องจากไม่พบผลผลิตกลุ่มยีน *ccr* **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2557; 12(2): 95-105**

**คำสำคัญ:** *Staphylococcus pseudintermedius*, ดื้อยา methicillin, SCC*mec* type, สุนัข, แมว

**ติดต่อสำเนาบทความได้ที่ :** วลัยพร ตนพิทักษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพฯ 10530, E-mail address: walaipor@mut.ac.th ; ได้รับบทความวันที่ 21 พฤศจิกายน 2556

## บทนำ

*S. pseudintermedius* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม และสร้างเอนไซม์ coagulase มักพบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ผิวหนัง โพรงจมูก คอหอย และช่องทวารหนักของสุนัข แมว (Abraham et al., 2007; Griffeth et al., 2008; Rubin & Chirino-Trejo, 2011) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ใน นกแก้ว และคนด้วย (Devriese et al., 2005; van Hoovels et al., 2006) ยาเมธิซิลลิน (Methicillin) เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มเพนนิซิลลิน (Penicillin) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะเข้าไปจับกับ Penicillin binding protein (PBP) การดื้อต่อยาเมธิซิลลินใน *Staphylococcus* spp. เกิดขึ้นโดยยีน *mec*A ที่สร้างโปรตีน Penicillin binding protein 2a (PBP2a) ซึ่ง

ไม่ถูกจับด้วยยาเบต้า-แลคแตมเหมือน PBP ทั่วไป แบคทีเรียจึงสามารถสร้างผนังเซลล์ได้ตามปกติ (van Duijkeren et al., 2011a) ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Disk diffusion method โดยทดสอบกับยา Oxacillin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม Isoxazolepenicillin ที่มีความเสถียรมากกว่า Methicillin ขนาดความเข้มข้นของยา Oxacillin ที่แนะนำให้ใช้คือ 1 ไมโครกรัม (Schissler et al., 2009) นอกจากนี้ยังสามารถทำได้ด้วยการตรวจหายีน *mec*A (Tonpitak, Sornklien & Suwannakhen, 2010)

ยีน *mec*A จะอยู่ในส่วนพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) ในโครโมโซมของ *Staphylococcus* ที่เรียกว่า staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) โดยลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ซ้ำกัน (direct repeat) เป็นส่วนที่แสดงถึงการแทรกของ SCC*mec* เข้ามาในโครโมโซมซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญ 4 ส่วน คือ 1) มีกลุ่มยีน *mec* ที่มียีน *mec*A และยีนที่ควบคุมการสร้างยีนชนิดนี้ 2) มีกลุ่มยีน *ccr* ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้าย SCC*mec* 3) มีนิวคลิโอไทด์ที่มีลำดับซ้ำกันอยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของ SCC*mec* ทำให้โครงสร้างของ SCC*mec* เคลื่อนที่ได้ 4) SCC*mec* นี้จะอยู่ที่ปลาย 3’ ของ *orf*X การจำแนกชนิดของ SCC*mec* ของ *S. aureus* ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 11 ชนิด คือ SCC*mec* Type I ถึง Type XI โดยอาศัยความแตกต่างกันของ กลุ่มยีน *mec* และ กลุ่มยีน *ccr* โดยกลุ่มยีน *mec* แบ่งเป็น 6 class คือ class A B C1 C2 D และ E กลุ่มยีน *ccr* แบ่งเป็น 8 ชนิด คือ Type 1 ถึง Type 8 ซึ่งพบยีน *ccr* ชนิด A1B1 A2B2 A3B3 A4B4 C1 A5B3 A1B6 และ A1B3 ตามลำดับ (Turlej, Hryniewicz&Empel, 2011)

รายงานการดื้อยาเมธิซิลลิน ของ *S. pseud-intermedius* (MRSP) ในสัตว์พบมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุนัขและแมว ซึ่งมักพบว่าก่อให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบ ช่องหูอักเสบและทางเดินปัสสาวะอักเสบในสุนัข ในแมวมักพบก่อโรคผิวหนังอักเสบ และการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ และยังมีรายงานพบการติดต่อไปยังเจ้าของสัตว์อีกด้วย (van Duijkeren et al., 2011 a; Soedamanto et al., 2011; Wettstein et al., 2008) โดย MRSP ที่พบมักมีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่มร่วมด้วย (Perreten et al., 2010; Schwarz et al., 2008; Weese & van Duijkeren, 2010) ซึ่งรายงานการตรวจพบ MRSP ในสุนัขและแมวปกติในประเทศไทยยังมีรายงานน้อยมากดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความชุกของเชื้อ MRSP ในสุนัขและแมวสุขภาพดี และวินิจฉัยแยกชนิด SCC*mec* ของ MRSP ที่แยกได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการศึกษาครั้งนี้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร (Reference No. VET-MUT 029/2556)

### แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่มี SCC*mec* Type I ถึง Type X ดังแสดงในตารางที่ 1 และ MRSP สายพันธุ์ 1059 (Schwarz, Kadlec & Strommenger, 2008)

**ตารางที่ 1** แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

| *SCC*mec Type | สายพันธุ์ | *ccr* gene complexes | *mec* gene complexes | แหล่งที่มาและเอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| I | NCTC10422 | A1B1 | B | Lulitanond A. (Faculty of Associated Medical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen, Thailand) (Lulitanond et al., 2010) |
| II | N315 | A2B2 | A | |
| III | 85/2082 | A3B3 | A | |
| IV | 81/108 | A2B2 | B | |
| V | WIS | C1 | C2 | Hiramatsu K. (Department of Bacteriology Medical School, Jutendo University, Tokyo, Japan) (Ito et al., 2004) |
| VI | HDE288 | A4B4 | B | de Lancastre H. (The Rockefeller University, New York, USA) (Oliveira et al. 2006) |
| VII | JCSC6082 | C1 | C1 | Ito T. (Department of Bacteriology Medical School, Jutendo University, Tokyo, Japan) (Berglund et al., 2008) |
| VIII | JCSC8875 | A4B4 | A | Zhang K. (Centre for Antimicrobial Resistance, University of Calgary, Canada) (Zhang et al., 2009) |
| IX | JCSC6943 | A1B1 | C2 | Ito T. (Department of Bacteriology Medical School, Jutendo University, Tokyo, Japan) (Shanshuang et al., 2011) |
| X | JCSC6945 | A1B6 | C1 | |

**การเพาะแยกเชื้อและการวินิจฉัยแบคทีเรียจากตัวอย่าง**

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้เก็บจากสุนัขและแมวสุขภาพดีซึ่งไม่จำแนกเพศ พันธุ์และอายุจากโรงพยาบาลเพื่อการเรียนการสอนด้านสัตว์เล็ก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ที่ได้รับการตรวจสุขภาพเบื้องต้นว่าไม่มีอาการทางคลินิกและผลการตรวจเลือด ได้แก่ ค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด เอนไซม์แสดงการทำงานของตับและไตอยู่ในเกณฑ์ปกติ และไม่พบพยาธิเม็ดเลือด สัตว์แต่ละตัวจะถูกเก็บตัวอย่างจากโพรงจมูก และบริเวณฝีเย็บโดยใช้สำลีพันปลายไม้ปราศจากเชื้อชุบน้ำเกลือพอหมาดป้ายเก็บตัวอย่างและทำการเพาะเชื้อทันที แต่ละตัวอย่างนำมาเพาะเชื้อลงบน blood agar base No.2 (Oxoid, England) ที่ผสมเลือดโค 5% และ MacConkey agar (Merck, Germany) บ่มที่ 37ºC นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วนำแบคทีเรียที่สงสัยมาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Chanchaithong & Prapasarakul, 2011) เพื่อวินิจฉัย *S. pseudintermedius* หลังจากนั้นยืนยันด้วยวิธี PCR-RFLP (PCR restriction fragment length polymorphism) โดยการตรวจหายีน *pta* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสและตัดด้วยเอนไซม์ MboI (Bannoehr et al., 2009)

**การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ**

แบคทีเรีย *S. pseudintermedius* ที่แยกได้นำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ โดยวิธี disk diffusion method ตามมาตรฐาน CLSI 2013 และใช้ค่า break point ตามมาตรฐาน CLSI 2008 ในการทดลองนี้ใช้ยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ดังนี้ Ampicillin /sulbactam 20 µg, Amoxycillin/Clavulanic acid 30 µg, Cephalexin 30 µg, Ceftriaxone 30 µg, Cefoperazone 75 µg, Ceftazidime 30µg, Cefpirome 30 µg, Oxacillin 1 µg, Imipenem 10 µg, Meropenem 10 µg, Vancomycin 30 µg, Clindamycin 2 µg, Lincomycin 2 µg, Enrofloxacin 5 µg, Levoloxacin

5 µg, Ciprofloxacin5µg, Gentamicin 10 µg, Amikacin 30 µg, Doxycycline 30 µg, Oxytetracycline 30 µg, Azitromycin 15µg, Sullfa-trimethroprim 25µg

**การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย**

การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ในการตรวจยีโนไทป์ชนิดต่างๆ ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany) ซึ่งมีการเพิ่มเติมขั้นตอนการสลายผนังเซลล์แบคทีเรียโดยนำเซลล์แบคทีเรียกระจายตัวใน lysis buffer (20 mMTris, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100) ที่เติม lysostaphin 100 µg/ml จำนวน 200 µl และบ่มที่ 37°C นาน 5-20 นาที จนกระทั่งสารละลายใสจึงทำตามขั้นตอนต่างๆ ต่อไปตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

**การหายีน *mec*A และชนิดของ SCC*mec***

การตรวจหายีน *mec*A เพื่อยืนยันการดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (Tonpitak et al., 2010) แบคทีเรีย *S. pseudintermedius* ที่แยกได้และตรวจพบยีน *mec*A จะนำมาวินิจฉัยแยกชนิดของ SCC*mec* Type โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสทั้งหมด 3 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสมัลติเพล็กส์ (multiplex PCR) 2 ปฏิกิริยาและปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างง่าย 1 ปฏิกิริยาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสมัลติเพล็กส์ปฏิกิริยาที่ 1 (M-PCR1) ใช้ตรวจหากลุ่มยีน *ccr* A1B1 A2B2 A3B3 A4B4 C1 และ A1B6 ปฏิกิริยาที่ 2 ใช้ตรวจหากลุ่มยีน *mec*Class A BC2 และ E ปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างง่าย 1 ปฏิกิริยาใช้ตรวจหากลุ่มยีน *mec*ClassC1 ซึ่งรายละเอียดได้มีในรายงานก่อนหน้านี้ (Kondo et al., 2007; Tonpitak, 2013)

**ผลการทดลอง**

พบ *S. pseudintermedius* ในสุนัขจากโพรงจมูก 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 39.1% (9/23) และจากบริเวณฝีเย็บ 13 ตัวอย่าง คิดเป็น 56.5% (13/23) ในแมวพบจากโพรงจมูกและจากบริเวณฝีเย็บอย่างละ 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.7% (2/23) ดังแสดงในตารางที่ 2 การทดสอบความไวต่อยาเมธิซิลลินโดยทดสอบกับแผ่นยา oxacillin 1 µg และยืนยันการดื้อต่อยาเมธิซิลลินโดยการตรวจพบยีน *mec*A ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสที่ให้ผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 280 bp นั้นให้ผลสอดคล้องกัน คือ พบเชื้อ MRSP ในสุนัขและแมวจำนวนเท่ากันคือ 1 ตัวอย่าง จากบริเวณฝีเย็บ คิดเป็น 4.3% (1/23) และไม่พบ MRSP จากตัวอย่างโพรงจมูกทั้งในสุนัขและแมว เมื่อนำ MRSP ที่แยกได้ไปทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 2** แสดงสัดส่วนของเชื้อ *S. pseudintermedius* และ methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) ที่พบจากสุนัขและแมว

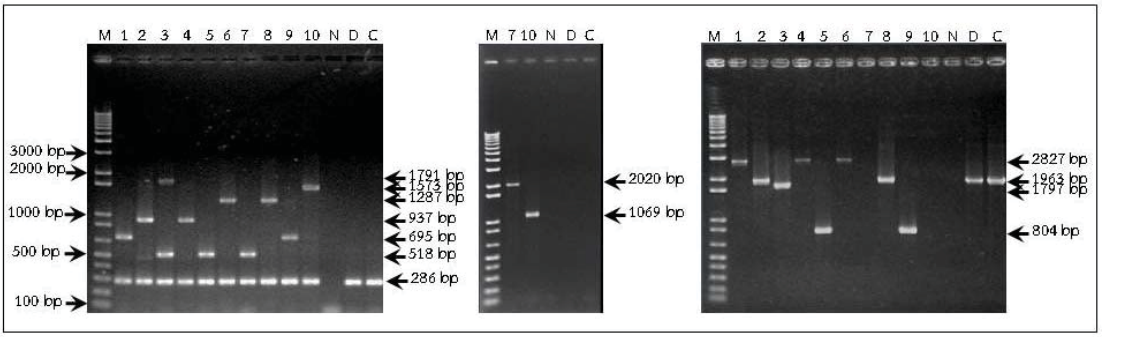
| ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง | สุนัข | | แมว | |
|---|---|---|---|---|
| | *S. pseudintermedius* | MRSP | *S. pseudintermedius* | MRSP |
| โพรงจมูก | 39.1% (9/23) | 0% (0/23) | 8.7% (2/23) | 0%(0/23) |
| บริเวณฝีเย็บ | 56.5% (13/23) | 4.3% (1/23) | 8.7% (2/23) | 4.3% (1/23) |

**ตารางที่ 3** แสดงการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆของ MRSP ที่แยกได้จากสุนัขและแมว

| กลุ่มยา | กลุ่มโครงสร้างβ-lactam | | | | | | | | | | Glycopeptide | Lincosamide | | Quinolones | | | Aminoglycosides | | Tetracycline | | Macrolides | Sulfa-Trimethoprim |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ชื่อยา | Ampicillin/sulbactam | Amoxycillin | Amoxycillin/Clavulanic acid | Cephalexin | Ceftriaxone | Cefoperazone | Ceftazidime | Cefpirome | Imipenem | Meropenem | Vancomycin | Clindamycin | Lincomycin | Enrofloxacin | Levofloxacin | Ciprofloxacin | Gentamicin | Amikacin | Doxycycline | Oxytetracycline | Azithromycin | Sulfa-Trimethoprim |
| สุนัข | R | R | R | R | R | R | R | R | S | I | S | S | S | R | R | R | R | S | I | R | R | R |
| แมว | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R | S | I | R | R | R |

R=resistant, S = susceptible, I = Intermediate โดยใช้ค่าตัดสินความไวรับต่อยาต้านจุลชีพจาก CLSI (2008)

ผลการวินิจฉัยแยกชนิด SCC*mec* Type ของ MRSP ทั้งสองสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุนัขและแมวบริเวณฝีเย็บ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสมัลติเพล็กส์ (M-PCR1) เพื่อการตรวจหากลุ่มยีน *ccr* นั้น ไม่พบกลุ่มยีน *ccr* สำหรับผลการตรวจหากลุ่มยีน *mec* ในทั้งสองสายพันธุ์พบ *mec* ClassA ที่ให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสมัลติเพล็กส์ (M-PCR2) 1963 bp ใกล้เคียงกับ SCC*mec* Type II และ VIII (รูปภาพที่ 1)




**รูปภาพที่ 1** ผลการจำแนกชนิดของ SCC*mec* Type ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสเพื่อตรวจหากลุ่มยีน *ccr* (M-PCR1 ซ้าย) *mec* Class C1 (กลาง) และ *mec*Class A B C2 และ E (M-PCR2 ขวา) M: 1 kb plus molecular standard (Invitrogen), 1-10: *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน Type I ถึง X ตามลำดับ, N: negative control, D: MRSPที่แยกได้จากสุนัข, C: MRSPที่แยกได้จากแมว

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบ *S. pseudintermedius* ในสุนัขสุขภาพดีที่บริเวณฝีเย็บ (56.5%) ในสัดส่วนที่มากกว่าที่พบในโพรงจมูก (39.1%) ซึ่งสอดคล้องกันกับรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศสหราชอาณาจักรที่รายงานการพบ *S. pseudintermedius* ที่บริเวณฝีเย็บและในโพรงจมูกของสุนัขสุขภาพดีมีสัดส่วน 93.8% และ 37.5% ตามลำดับ (Fazakerley et al., 2009) ประเทศเดนมาร์กรายงานพบ *S. pseudintermedius* ที่บริเวณฝีเย็บและในโพรงจมูกของสุนัขสุขภาพดีมีสัดส่วน 66% และ 27% ตามลำดับ (Paul et al., 2012) แม้ว่าในรายงานของ Chanchaithong & Prapassarakul (2011) จากประเทศไทยจะพบว่า *S. pseudintermedius* จากโพรงจมูกสุนัขมีสัดส่วน 60.6% ซึ่งมากกว่าที่พบบริเวณฝีเย็บที่มีสัดส่วน 57.1% อย่างไรก็ตามการตรวจพบแบคทีเรียทั้งสองตำแหน่งยังคงอยู่ในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปเพาะแยกเชื้อหา *S. pseudintermedius* ในสุนัขควรเก็บตัวอย่างจากบริเวณฝีเย็บ และโพรงจมูก สำหรับในแมวสุขภาพดีจากการศึกษาครั้งนี้พบ *S. pseudintermedius* ทั้งในบริเวณฝีเย็บและโพรงจมูกในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกัน คือ 8.7% ซึ่งมากกว่าในรายงานในประเทศแคนาดาของ Haselman และ คณะ (2009) ซึ่งพบ *S. pseudintermedius* ในโพรงจมูกของแมวที่สัดส่วน 1.2%

ความชุก MRSP ในสุนัขและแมวนั้นพบว่ามีค่าเท่ากันที่ 4.3% (1/23) โดยพบที่บริเวณฝีเย็บ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาความชุกของ MRSP ที่มีการยืนยันด้วยการตรวจหายีน *mec*A ในประเทศต่างๆ ก่อนหน้านี้ในสุนัขพบว่ามีค่าความชุกใกล้เคียงกันกับรายงานของ Gómez-Sanz และคณะ (2011) ในประเทศสเปนที่มีความชุกในสุนัขเท่ากับ 4.6% (9/196) แต่พบมีความชุกมากกว่าการศึกษาของ Griffeth และคณะ (2008) ในประเทศสหรัฐอเมริกาและของ Onuma, Tanabe & Sato (2012) ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งพบมีความชุก 2% (1/50) และ 0% (0/56) ตามลำดับ ในแมวพบว่ามีค่าความชุกใกล้เคียงกับรายงานของ Abraham และคณะ (2007) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบความชุกในแมวเท่ากับ 4% (2/50) อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลให้ค่าความชุกของ MRSP จากการศึกษาต่างๆ มีค่าแตกต่างกัน ได้แก่ วิธีการทดสอบความไวรับของยาต้านจุลชีพโดยดูจากฟีโนไทป์ ค่าอ้างอิงที่ใช้ตัดสินความไวรับของยาต้านจุลชีพ เป็นต้น แม้ว่าการศึกษานี้จะเปรียบเทียบค่าความชุกกับการศึกษาอื่นที่มีการตรวจยืนยันการดื้อยาเมธิซิลลินด้วยการตรวจหายีน *mec*A แต่การตรวจหา MRSP โดยตรวจดูจากฟีโนไทป์เพื่อคัดเลือก MRSP เบื้องต้นนั้นแตกต่างกัน ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ค่าอ้างอิงจาก CLSI ปี 2008 ซึ่งตัดสินการดื้อยาเมธิซิลลินที่ inhibition zone ≤ 10 mm.ทำให้ค่าความชุกของ MRSP จึงค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้จำนวนตัวอย่างในการศึกษายังค่อนข้างน้อยจึงอาจทำให้ความชุกที่พบค่าคลาดเคลื่อนได้ MRSP ที่แยกได้ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่ม (multidrug-resistant) ที่นิยมใช้ในทางสัตวแพทย์สำหรับการรักษาสัตว์เลี้ยงทั้งในรูปแบบการกินและการฉีด เช่นเดียวกันกับที่พบในรายงานต่างๆ ก่อนหน้านี้ (Feng et al. 2012; Onuma et al. 2012; van Duijkeren et al. 2011b) แต่มีความไวต่อยา Amikacin และ Vancomycin ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่ใช้ไม่แพร่หลายในสัตว์เลี้ยง เนื่องจาก Amikacin มีความเป็นพิษต่อไตสูง สำหรับ Vancomycin นั้นเป็นยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียรุนแรงในคน ในทางสัตวแพทย์จึงมักสงวนไว้ใช้ในกรณีที่ยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ใช้ไม่ได้ผล เพื่อป้องกันการดื้อยาและอาจเกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาชนิดนี้ไปยังคนได้

ชนิดของ SCC*mec* ของ MRSP ที่พบในสุนัขและแมวนั้นมีความหลากหลาย ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือมักพบ Type V ในประเทศแถบทวีปยุโรปมักพบ Type II-III (van Duijkeren et al., 2011a) ประเทศในทวีปเอเชียมักพบ Type V อย่างไรก็ตามยังพบ Type II-III และ VII ด้วย (Feng et al., 2012;

Onuma K. et al., 2012; Youn J.H. et al., 2011) สำหรับชนิดของ SCC*mec* ที่พบจากบริเวณฝีเย็บของสุนัขและแมวในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบกลุ่มยีน *mec* class A แต่ไม่พบว่ามีกลุ่มยีน *ccr* จึงไม่สามารถจำแนกชนิดของ SCC*mec* ได้ เช่นเดียวกันกับที่พบในรายงานของ Perreten และ คณะ (2013) ที่รายงาน MRSP จากสุนัขในประเทศไทยและอิสราเอลซึ่งมีกลุ่มยีน *mec* class C1 แต่ไม่พบกลุ่มยีน *ccr* ซึ่ง MRSP ชนิดนี้ถูกจำแนกเป็น pseudo ($\Psi$) SCC*mec* element

แม้ว่ารายงานการติดเชื้อ MRSP ในคนนั้นยังมีรายงานน้อยแต่มีรายงานหลายฉบับพบว่า MRSP ที่พบในสัตว์เลี้ยงและเจ้าของนั้นเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจมีการติดต่อจากสัตว์เลี้ยงไปยังเจ้าของสัตว์ (Haselman et al., 2009;Soedarmanto et al., 2011) และยังมีการตรวจพบ MRSP ในสัตวแพทย์ผู้ปฏิบัติงานในสถานพยาบาลสัตว์ และในสิ่งแวดล้อมที่มีสัตว์เลี้ยงอีกด้วย (van Duijkeren et al., 2011a) ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อและการปนเปื้อนเชื้อด้วยการรักษาความสะอาด เช่น การสวมเสื้อกาวน์และถุงมือในการตรวจรักษาสัตว์ การล้างมือหลังจากสัมผัสกับสัตว์ การทำความสะอาดพื้นที่ที่สัตว์อาศัยเป็นประจำ เป็นต้น รวมทั้งให้ความรู้แก่เจ้าของสัตว์ และการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างถูกต้องเหมาะสม จะช่วยลดการติดเชื้อและแพร่กระจายของ MRSP ได้

## สรุป

ความชุกของ MRSP ที่พบในสุนัขและแมวสุขภาพดีจากการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากันคือ 4.3% และไม่สามารถจำแนกชนิดของ SCC*mec* Type ได้

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย Prof. Stefan Schwarz สถาบันวิจัยเพื่อสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ประเทศเยอรมันนีที่สนับสนุน MRSP สายพันธุ์ 1059 ศาสตราจารย์ Teruyo Ito มหาวิทยาลัยจูเทนโด ประเทศญี่ปุ่น ผู้ช่วยศาสตราจารย์ Kunyan Zhang ศูนย์การดื้อยา มหาวิทยาลัยคาลการี ประเทศแคนาดา และศาสตราจารย์ Herminia de Lencastre มหาวิทยาลัยลิสบาวประเทศโปรตุเกส ที่สนับสนุนแบคทีเรีย *Staphylococcus* สายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งมี SCC*mec* type ชนิดต่างๆ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานครที่สนับสนุนทุนในงานวิจัยครั้งนี้

## References

Abraham, J.L., Morris, D.O., Griffeth, G.C., Shofer, F.S. and Rankin, S.C. (2007). Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferissp.schleiferi*. Veterinary Dermatolology, 18(4), 252-259.

Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A. & Fitzgerald, J.R. (2009). Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. Journal of Clinical Microbiology, 47(2), 469-471.

Berglund, C., Ito, T., Ikeda, M., Ma, X.X., Söderquist, B. et al. (2008). Novel type of staphylococcal chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(10), 3512-3516.

Chanchaithong, P. &Prapasarakul, N. (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.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2008). Performance standard for

antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. M31-A3. CLSI Standards and Guidelines. Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S23. CLSI Standards and Guidelines. Wayne, PA.

Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert et al. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(4), 1569-1573.

Fazakerley, J., Nuttall, T., Sales, D., Schmidt, V., Carter, S.D. et al. (2009). Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. Veterinary Dermatology, 20(3), 179-184.

Feng, Y., Tian, W., Lin, D., Luo, Q., Zhou, et al. (2012). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South-China. Veterinary Microbiology, 160(3-4), 517-524.

Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Sáenz, Y. &Zarazaga, M. (2011). Detection and characterization of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Riojo, Spain. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease, 34(5), 447-453.

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. Veterinary Dermatology, 19(3), 142-149.

Hanselman, B.A., Kruth, S.A., Rousseau, J. &Weese, J.S. (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. The Canadian Veterinary Journal, 50(9), 954-958.

Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, K., Okuma, H., Yuzawa, H. et al., (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*C. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 48(7), 2637-2651.

Kondo, Y., Tyo, T., Ma, X.X., Watanabe, S.,Kreiswirth, B.N. et al. (2007). Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr* and major differences in junkyard regions. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 51(1), 264-274.

Lulitanond, A., Chanawong, A., Sribenjalux, P., Walailuckana, C., Kaewkes, W. et al. (2010). Preliminary report of SCC*mec*-types and antimicrobial susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a university hospital in Thailand. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 41(4), 920-927.

Oliveira, D.C., Milheirico, C. & de Lencastre H. (2006). Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(10), 3457-3459.

Onuma, K., Tanabe, T. &Sato, H. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. Veterinary Dermatology,23(1), 17-22.

Paul, N.C., Bärgman, S.C., Moodley, A., Nielsen, SS. &Guardabassi L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: a cross-sectional and longitudinal study. Veterinary Microbiology, 160(3-4), 420-427.

Perreten, V., Chanchaithong, P., Prapasaraku,l N., Rossano, A., Blum, S.E. et al. (2013). Novel pseudo Staphylococcal cassette chromosome *mec* element (Ψ SCC*mec* 57395) in methicillin-resistant *Staphylooccus pseudintermedius* CC45. Antimicrobial Agents and Chemo therapy, 57(11), 5509-5515.

Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Andersson, U.G., Finn, M., Greko, C., et al. (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(6), 1145-1154.

Rubin, J.E. &Chirino-Trejo, M. (2011). Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23(2), 351-354.

Schissler, J.R., Hillier A., Daniels, J.B., Cole, L.K. &Gebreyes, W.A. (2009). Evaluation of clinical laboratory standards institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 21(5), 684-688.

Schwarz, S., Kadlec, K. &Strommenger, B. (2008). Methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-Germ Vet monitoring programme 2004-2006 in Germany. Journal of Antimicrobial Che motherapy, 61(2), 282-285.

Shanshuang, L, Skov, R.L., Han, X., Larsen, A.R., Larsen, J. et al. (2011). Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55(6), 3046-3050.

Soedamanto, I., Kanbar, T., Ülbegi-Mohyla, H., Hijazin, M., Alber, J., Lämmler, C. et al. (2011). Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog the dog owner. Research of Veterinary Science, 91(3), e25-27.

Tonpitak, W. (2013). Development of Staphy lococcal cassette chromosome *mec* assay of Type I to X based on the*mec*- and the *ccr*-gene complexes by two multiplex PCRs and one simple PCR.Proceedings of the 7th MUT Veterinary Annual Conference, Bangkok, 22th November 2013. pp. 67-70.

Tonpitak, W., Sornklien, C. &Suwannakhen, S. (2010). Detection of methicillin resistant *Staphylococcus* sp. by simple polymerase chain reaction. Proceedings of the 4th MUT Veterinary Annual Conference. Bangkok, 26th November 2010.pp.148-149.

Turlej, A., Hryniewicz, W. &Empel, J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. Polish Journal of Microbiology, 60(2), 95-103.

Van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyörälä, S. et al.(2011a). Review on methicillin-resistant

*Staphylococcus pseudintermedius*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66(2), 2705-2714.

Van Duijkeren, E., Kamphuos, M., Van der Mije, I.C., Laarhoven, L.M., Duim, B., Wagenaar, J.A. et al. (2011b). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. Veterinary of Microbiology, 150(3-4), 338-343.

Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K. & de Beenhouwer, H. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. Journal of Clinical Microbiology, 44(12), 4609-4612.

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

Wettstein, K., Descloux, S. Rossano, A. &Perreten V. (2008). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Switzerland. Three cases of urinary tract infections in cats. Schweizer Archievfür Tierheilkunde, 150(7), 339-343.

Youn, J.H., Koo, H.C., Ahn, K.J., Lim, S.K. & Park. Y.H. (2011).Determination of staphylococcal exotoxins, SCC*mec* types, and genetic relatedness of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals and hospital environments in Korea. Journal of Veterinary Science, 12(3), 221-226.

Zhang, K., McClure J.A., Elsayed, S. & Conly, J.M. (2009). Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A*mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(2), 531-540.

# Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Healthy Dogs and Healthy Cats in a Small Animal Teaching Hospital

**Walaiporn Tonpitak* and Chulabha Sornklien**

*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Nong Chok, Bangkok, 10530, THAILAND*

**Abstract** The objective of this study was to investigate the prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) at nasal cavity and perineum in healthy dogs and cats entering the veterinary small animal teaching hospital of Mahanakorn University of Technology including characterize staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type of MRSP isolates. Samples were obtained from 23 healthy dogs and 23 healthy cats. The bacteria were cultured and identified by their unique biochemical profile and RFLP. Methicillin resistant trait was initially detected by oxacillin disk screening and confirmed the existence of *mec*A by PCR. The staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types of MRSP were characterized by two multiplex PCRs detection the *mec* gene complex and the *ccr* gene complex. The results showed that the prevalence of MRSP in dogs and cats are equal to 4.3% and also are multidrug-resistant to other antibiotic classes. The two MRSP isolates possessed *mec*A gene with non-typeable SCC due to lack of the *ccr* region.

**Key words:** *Staphylococcus pseudintermedius,* methicillin resistance, SCC*mec* type, dog, cat