



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาและปัจจัยในการก่อ
ความรุนแรงของโรคของเชื้อซาลโมเนลล่า เอ็นเทอริกา ที่แยก
ได้จากห่วงโซ่อาหาร

โดย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น และ อลงกร อมรศิลป์

พฤษภาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG5180154

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาและปัจจัยในการก่อ
ความรุนแรงของโรคของเชื้อซาลโมเนลล่า เอ็นเทอริกา ที่แยก
ได้จาก
ห่วงโซ่อาหาร

โดย

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. อลงกร อมรศิลป์ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุน
การวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติเงินทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2552 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้วงปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2553

Abstract

Salmonella enterica isolates from dairy cows ($n=160$), pork and patients ($n=131$) were molecular characterized for their antimicrobial resistance. The results demonstrated the widespread of resistance *Salmonella* among dairy farms, pork and patients. Class 1 integrons play an important role in dissemination and transfer of resistance among these isolates. It indicates that the control of antimicrobial uses in food-producing animals is necessary. It is important to encourage the studies of antimicrobial resistance at molecular level to discover the basis of such resistance and to solve the problem using the scientific- based strategies.

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาและการปรากฏของ virulence factors ในเชื้อ *Salmonella enterica* ที่แยกได้จากโคนม ($n=160$) เนื้อสุกรและผู้ป่วย ($n=131$) ผลการวิจัยพบการแพร่กระจายของเชื้อ *Samonella* ดื้อยาในฟาร์มโคนม เนื้อสุกรและผู้ป่วย โดย class 1 integrons มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายและการถ่ายทอดพันธุกรรมการดื้อยาในเชื้อเหล่านี้ รวมทั้งเชื้อเหล่านี้ยังมีปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคอย่าง รวมถึงการส่งเสริมให้การศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ทราบปัญหาที่แท้จริงของการดื้อยาในเชื้อและสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้อย่างถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์

Executive Summary

Salmonella enterica เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญที่ถ่ายทอดจากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคในฟาร์มผ่านกระบวนการผลิตและห่วงโซ่อาหารสู่ผู้บริโภค โดยความรุนแรงของโรคขึ้นกับการมีปัจจัยก่อความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factors) และถ้าเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจะทำให้การรักษาด้วยยาดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้อาการติดเชื้อรุนแรงมากขึ้น ใช้ระยะเวลาในการรักษานานขึ้นและเปิดโอกาสให้มีการปล่อยเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น การใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตเป็นสาเหตุสำคัญของการกระจายเชื้อดื้อยาในคน ในการเลี้ยงโคนมมีการใช้ยาปฏิชีวนะเช่นกัน โคนมอาจติดเชื้อ *Salmonella* ได้โดยไม่แสดงอาการเจ็บป่วย เชื้อเหล่านี้จะอยู่ในระบบทางเดินอาหารและถูกปล่อยเชื้อเหล่านี้ออกมาพร้อมกับอุจจาระและนมเมื่อโคเกิดความเครียดและสามารถเป็นพาหะได้นานตลอดชีวิต ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาของ *Salmonella* ที่แยกได้จากโคนม โดยแยกเชื้อจำนวน 160 isolates จากอุจจาระของโคนมที่สุขภาพแข็งแรงและไม่แสดงอาการป่วยใดๆที่สามารถสังเกตเห็นได้ รวมทั้งเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วยจำนวน 131 isolates โดยศึกษาการปรากฏและลักษณะทางพันธุกรรมของ class 1 integrons รวมทั้งการปรากฏของปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค (virulence factors) ผลการวิจัยพบการแพร่กระจายของเชื้อ *Samonella* ดื้อยาในฟาร์มโคนม เนื้อสุกรและผู้ป่วย โดย class 1 integrons มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายและการถ่ายทอดพันธุกรรมการดื้อยาในเชื้อเหล่านี้ รวมทั้งเชื้อเหล่านี้ยังมีปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคหลายชนิด ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคอย่าง รวมถึงการส่งเสริมให้การศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ทราบปัญหาที่แท้จริงของการดื้อยาในเชื้อและสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้อย่างถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
Executive summary	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
รายการสัญลักษณ์	viii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
วิธีดำเนินการวิจัย	3
เก็บตัวอย่างและแยก <i>S. enterica</i>	3
ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ	5
ศึกษาพันธุกรรมของการดื้อยา	6
ผลการวิจัย	11
ความชุกของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยา	11
Integrans และ SGI1	16
การปรากฏของยีนดื้อยาอื่นๆ	19
การถ่ายทอด class 1 integrons และยีนดื้อยา	24
การปรากฏของ virulence genes	24
การอภิปรายผลการวิจัย	26
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	32
Outputs ที่ได้จากโครงการ	34

รายการตารางประกอบ

หน้าที่

ตารางที่ 1	<i>Samonella enterica</i> ที่แยกได้จากโคนม ($n=160$)	4
ตารางที่ 2	<i>Samonella enterica</i> ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย ($n=131$)	5
ตารางที่ 3	ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย	6
ตารางที่ 4	Primers ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	8
ตารางที่ 5	การตรวจยีนดื้อยาแยกตามการดื้อยาของเชื้อ	10
ตารางที่ 6	รูปแบบการดื้อยา การปรากฏของยีนดื้อยาและ serovars ของ <i>Salmonella</i> ที่แยกได้จากโคนม ($n=160$)	12
ตารางที่ 7	รูปแบบการดื้อของ <i>Salmonella</i> ที่แยกได้จากเนื้อสุกร ($n=79$)	14
ตารางที่ 8	รูปแบบการดื้อยา ของ <i>Salmonella</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วย ($n=52$)	15
ตารางที่ 9	integrans profiles ของเชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย	18
ตารางที่ 10	การปรากฏของยีนดื้อยาและ serovars ของ <i>Salmonella</i> ที่แยกได้จากเนื้อสุกร และผู้ป่วย ($n=131$)	20
ตารางที่ 11	อัตราการปรากฏของ virulence genes ใน <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย ($n= 131$)	25

รายการภาพประกอบ

		หน้าที่
รูปที่ 1	อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ <i>Salmonella</i> ที่แยกได้โคนม ($n = 160$)	11
รูปที่ 2	อัตราการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของ <i>Salmonella enterica</i> ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย ($n=131$)	13
รูปที่ 3	PCR products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน <i>ins</i> และ variable regions ใน <i>Salmonella</i> ที่แยกได้จากโคนม	17
รูปที่ 4	PCR products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน variable regions ของ class 1 integrons ใน <i>Salmonella</i> ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย	18
รูปที่ 5	PCR products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน virulence genes ทั้ง 16 ยีน	24

รายการสัญลักษณ์

$A_{540\text{nm}}$	absorbance at 540 nm
Amp	ampicillin
β -Gal	β -galactosidase
<i>bla</i>	β -lactamase encoding gene
bp	base pair(s)
Cb	carbenicillin
$^{\circ}\text{C}$	degree(s) Celcius
cm	centimeter(s)
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate(s)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EPI	efflux pump inhibitors
Ery	Erythromycin
<i>FRT</i>	Flp recombinase target
Gm	gentamycin
h	hour(s)
IMP	inner membrane protein
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	kilobase(s) or 1000 bp
l	liter(s)
<i>lacI</i>	<i>E. coli lac</i> repressor structural gene
<i>lacZ</i>	β -galactosidase encoding gene
LB	Luria-Bertani medium
LBAp100	Luria-Bertani medium containing 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin
M	molar
mM	millimolar
MCS	multiple cloning site(s)
MDR	multidrug resistance
MEX	multidrug efflux system
MFP	membrane fusion protein
mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
ml	milliliter(s)
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s);

OMP	outer membrane protein
<i>ori</i>	origin of replication
<i>oriT</i>	origin of transfer
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
P_{lac}	<i>E. coli lac</i> operon promoter
P_{trc}	<i>E. coli trp-lac</i> hybrid promoter
PCR	polymerase chain reaction
PMF	proton motive force
<i>r</i>	resistance/resistant
RND	resistance – nodulation-division family
RT	room temperature
<i>s</i>	sensitive/susceptible
<i>s</i>	seconds
Str	streptomycin
Suc	sucrose
Tet	tetracycline
<i>tet</i>	tetracycline-resistance encoding gene
<i>u</i>	unit(s)
μ l	microliter
μ M	micromolar
μ g	microgram(s)
v/v	volume by volume
WT	wild-type

บทนำ

Salmonella enterica เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากเป็นลำดับ 2 ของประเทศไทย [19] คนติดเชื้อมีได้จากการบริโภคอาหารและน้ำที่ปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มาจากสัตว์ ซึ่งเชื่อว่า มีการถ่ายทอดเชื้อ *Salmonella* จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคในฟาร์มผ่านกระบวนการผลิตและห่วงโซาอาหารสู่ผู้บริโภค โดยความรุนแรงของโรคขึ้นกับการที่เชื้อมีปัจจัยก่อความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factors) [9] และถ้าเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจะทำให้การรักษาด้วยยาตั้งกล่าวไม่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้อาการติดเชื้อมีความรุนแรงมากขึ้น ใช้ระยะเวลาในการรักษานานขึ้นและเปิดโอกาสให้มีการปล่อยเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น

ในปัจจุบันเชื่อว่า การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคเป็นสาเหตุสำคัญของการกระจายเชื้อดื้อยาในคน ส่งผลให้สหภาพยุโรปได้ยกเลิกการใช้ยาเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวทั้งหมด ซึ่งมีผลกระทบต่อประเทศไทยในฐานะผู้ส่งออก ขณะนี้ได้มีการศึกษาทางระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของ *Salmonella* ที่ได้จากปศุสัตว์และผู้ป่วยกันอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาใดที่สามารถให้ข้อสรุปที่ชัดเจนและยังไม่รายงานการศึกษาเหล่านี้ในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุล (genetic relatedness) พันธุกรรมการดื้อยาและปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อที่ได้จากห่วงโซาอาหารและทางการแพทย์รวมกันจะสามารถอธิบายความเกี่ยวข้องของเชื้อในอาหารที่มาจากสัตว์และคนรวมถึงกลไกการเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อหรือยีนดื้อยาจากสัตว์มาสู่มนุษย์หรือไม่

Salmonella มี virulence factors หลายชนิด บางชนิดมีความจำเพาะต่อ serovars บางชนิดพบได้ในหลาย serovars [24] การปรากฏของ virulence genes เหล่านี้มีผลเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคของ *Salmonella* ช่วยให้เชื้อสามารถปรับตัวและก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ สามารถเจริญเติบโตและบุกรุกเซลล์ได้รวดเร็ว ส่งผลให้สามารถก่อโรคได้อย่างรุนแรง [26] โดย virulence factors ใน *Salmonella* รวมกลุ่มกันบนโครโมโซมเรียกว่า *Salmonella* Pathogenicity island (SPI) หรืออาจอยู่บน plasmid ที่สามารถถ่ายทอดได้ (conjugative plasmid) [9, 17] ที่ศึกษากันอย่างกว้างขวางคือ the *spv* (*Salmonella* plasmid virulence) ซึ่งพบบน conjugative plasmid [4] การแพร่กระจายของ the *spv* operon ทำให้เชื้อพัฒนาความรุนแรงในการก่อโรคและมีผลต่อวิวัฒนาการของเชื้อ (evolution) อีกด้วย [3]

ปัญหาสำคัญของการติดเชื้อมี *Salmonella* คือ การติดเชื้อมีความดื้อยาที่พบได้บ่อยและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยมักเป็นการดื้อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มพร้อมกัน (Multidrug resistance, MDR) ซึ่งนอกจากจะเป็นตัวการในการสร้างปัญหาโดยตรงแล้วยังเป็นแหล่งสะสมของยีนดื้อยาสำหรับเชื้ออื่นๆ ที่พบในคนอีกด้วย โดยการใช้ยาปฏิชีวนะในกระบวนการผลิตสัตว์เพื่อใช้เป็นอาหารมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ *Salmonella* ที่ดื้อยา [25] ความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* อาจเกิดจากการคัดเลือกเชื้อที่ดื้อยาด้วยการกลายพันธุ์หรือมีการถ่ายทอดยีนดื้อยา [18] ในปัจจุบัน กลไกที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย *Salmonella* ดื้อยาที่มีความสำคัญและได้รับความสนใจมากที่สุดคือ integrons ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) และเป็นแหล่งสะสมของยีนดื้อยาหลายชนิด [11] เพราะยีนดื้อยาคือยีนดื้อยาต่างๆ สามารถบรรจุอยู่ในรูปของ gene cassettes ใน integrons โดยยีนดื้อยาเหล่านี้สามารถแลกเปลี่ยน เพิ่มจำนวนและจัดเรียงตัวใหม่ได้ รวมทั้ง gene cassettes ยังสามารถเคลื่อนย้ายไปยัง integrons อื่นๆ ระหว่างเชื้อชนิดเดียวกันและต่างชนิดได้ [27] สามารถพบ integrons บน conjugative plasmid ที่ถ่ายทอดไปยัง *Salmonella* ต่าง Serovars และเชื้ออื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [12] ในขณะเดียวกัน integrons ยังสามารถเคลื่อนที่ (integrate) เข้าไปยัง chromosome โดยไปอยู่ใน *Salmonella* Genomic Islands 1 (SGI1) [6, 7] ซึ่งเป็น hot spot สำหรับการรวมตัว (integration)

และสูญเสีย (loss) ยีนดื้อยา โดยที่ SGI1 อาจอยู่ในรูป conjugative plasmid ได้เช่นกัน [6] กลไกการดื้อยาเหล่านี้ทำให้ได้เชื้อสามารถดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันแบบถาวรซึ่งไม่สูญเสียการดื้อยานี้แม้จะอยู่ในที่ๆไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ (chromosomal encode) ในขณะที่จะมีการแพร่กระจายและถ่ายทอดยีนดื้อยาแบบ horizontal ได้เมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะ (plasmid encode)

ปัญหาการติดเชื้อ *Salmonella* รุนแรงมากขึ้น เมื่อเกิดการรวมกัน (cointegrate) ระหว่าง plasmid ที่มี virulence factors กับ plasmid ที่มียีนดื้อยาส่งผลให้ได้ plasmid รูปแบบใหม่ (hybrid virulence-resistance plasmid) ที่มีทั้งยีนควบคุมความรุนแรงในการก่อโรคและการดื้อยา [4] ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในทางการแพทย์และสัตวแพทย์จะคัดเลือกเชื้อที่ทั้งก่อโรครุนแรงมากขึ้นและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในเวลาเดียวกัน (coselection) ถ้าหากยีนมีการจัดเรียงตัวใหม่และ integrate เข้าสู่โครโมโซมก็จะได้เชื้อที่ก่อโรคอย่างรุนแรงและดื้อยาแบบถาวรโดยไม่จำเป็นต้องมี plasmid เหล่านี้อีกต่อไป อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจาย วิวัฒนาการและบทบาทของ plasmid ที่มีทั้ง virulence factors และยีนดื้อยาใน *Salmonella* ที่เป็น clinical isolates ยังมีไม่มากและยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทย ซึ่งโดยปกติ virulence factors และพันธุกรรมการดื้อยาของเชื้อที่แยกได้จากแต่ละประเทศจะแตกต่างกันขึ้นกับลักษณะการใช้ยาในแต่ละภูมิภาค

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยวางแผนที่จะทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ virulence factors และการดื้อยาใน *S. enterica* ที่แยกได้จากห่วงโซ่อาหารที่รวมถึงสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคอาหารจากสัตว์ และผู้ป่วย โดยทำการศึกษาใน *S. enterica* จากโคนม ไก่และสุกรในฟาร์มซึ่งเป็นแหล่งที่มาของ *S. enterica* นม เนื้อไก่และเนื้อสุกรเป็นสื่อนำเชื้อเหล่านี้ไปยังคนและจุดสุดท้ายคือ ผู้บริโภคซึ่งเป็นผู้ป่วยด้วยโรคท้องเสียที่เข้ารับรักษาตัวที่โรงพยาบาลและได้รับผลเสียจากการปรากฏของ virulence factors และการดื้อยาใน *S. enterica* ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในอธิบายกลไกการเกิดและการแพร่กระจายของ *Salmonella* ที่ก่อโรคและดื้อยาจากสัตว์มาสู่คน สามารถใช้ในการเตือนภัยล่วงหน้าของการติดเชื้อที่ไม่อาจรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งอาจนำไปสู่การเสียชีวิตจากการติดเชื้อแบคทีเรียจากอาหารได้อีกด้วย การวิจัยครั้งนี้จะเป็นการยกระดับการเก็บข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อดื้อยาในประเทศและเป็นรากฐานที่สำคัญของการศึกษาวิจัยในแนวลึกต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจและสังคมของประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

จากสมมติฐานว่า *Samonella* จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคสามารถถ่ายทอดไปยังคนได้โดยผ่านห่วงโซ่อาหาร โดยสามารถถ่ายทอดทั้ง virulence factors และยีนดื้อยาส่งผลให้ปัญหาการติดเชื้อรุนแรงมากขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าวคณะผู้วิจัยจึงตั้งวัตถุประสงค์ดังนี้

- 1) เพื่อศึกษาพันธุกรรม การถ่ายทอดและการแพร่กระจายของ virulence factors ใน *S. enterica*
- 2) เพื่อศึกษากลไกการดื้อยาในระดับโมเลกุล การถ่ายทอดและการแพร่กระจายของยีนดื้อยา ใน *S. enterica*
- 3) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมการดื้อยาและ virulence factors ใน *S. enterica*

วิธีดำเนินการวิจัย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยก *S. enterica*

ในการวิจัยครั้งนี้แยกเก็บเชื้อและทำการวิจัยเป็น 2 ส่วนคือ เชื้อที่แยกได้จากโคนมในฟาร์มและเชื้อที่แยกจากเนื้อสุกรและผู้ป่วย

1.1 เชื้อที่แยกได้จากโคนมในฟาร์ม

ทำการศึกษาใน *Salmonella enterica* จำนวน 160 isolates ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างอุจจาระโคนม โดยเป็นเชื้อที่อยู่ใน strain collection ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในช่วงปี พ.ศ. 2005 – 2007 เก็บอุจจาระโดยตรงจากลำไส้ใหญ่ (per rectum) ของโคนมที่มีสุขภาพดีและไม่แสดงอาการป่วยใดๆ ให้สังเกตเห็นได้ เก็บเชื้อ 1 โคโลนีต่อ serovars ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยวิธีที่ใช้ในการแยกเชื้อตามวิธีมาตรฐาน ISO6579 [14] ดังนี้

ทำการ pre-enrichment เชื้อในตัวอย่าง 25 กรัมใน Buffer Peptone Water (BPW) 225 ml หรือจาก swab ใน BPW 10 ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-18 ชม. ทำการเพิ่มจำนวน (enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Rappaport Vassiliadis Broth (RV) (Oxoid, Hampshire, UK) 41.5°C และ Tetra Thionate Broth (TTB) (Oxoid) ที่ 41.5°C นาน 24-18 ชม. จากนั้นแยก *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-Lysine Desoxycholate Agar (XLD) (Oxoid) และ Brilliant Green Agar (BGA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-18 ชม. ทำการทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางชีวเคมีในอาหารทดสอบ Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Oxoid) และ Motility Indole Lysine Medium (MIL) (Difco, Detroit, USA) ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. รวมทั้ง นำเชื้อใน BPW 10 µl มาทดสอบการเคลื่อนที่โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis Medium (MSRV) (Oxoid) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24-18 ชม. แยกเชื้อที่มีการเคลื่อนที่บน BGA และคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย Urease test จากนั้นทำการทดสอบในอาหารทดสอบ TSI และ MIL จากนั้นส่งเชื้อไปทำการจแนก serotype (serotyping) ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขด้วยวิธี Slide – Agglutination test ตามวิธีของ Kauffmann-White Scheme, Pasture Institute โดยใช้ specific antiserum จากบริษัท S&A REAGENTS LAB. LTD., PART. (กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย) เก็บรักษา *Salmonella* ใน 80% glycerol ที่ 80°C โดย serovars ของเชื้อที่แยกได้จากโคนมแสดงในตารางที่ 1

1.2 เชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย

ทำการศึกษาใน *Salmonella enterica* จำนวน 131 isolates ซึ่งแยกได้จากเนื้อสุกร ($n=79$) และผู้ป่วย ($n=52$) เป็นเชื้อในช่วงปี พ.ศ. 2548 – 2550 และอยู่ใน stock collection ภาควิชาสัตวแพทยศาสตรณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ และเก็บเชื้อ 1 โคโลนีต่อ serovars ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยวิธีที่ใช้ในการแยกเชื้อมีดังนี้

ทำการแยก *S. enterica* ทำตามวิธีมาตรฐาน ISO6579 โดยมีข้อแตกต่างจากวิธีที่กล่าวข้างต้น ดังนี้ เริ่มจาก pre-enrichment เชื้อในตัวอย่าง 25 กรัมใน Buffer Peptone Water (BPW) 225 ml หรือจาก swab ใน BPW 10 ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม ทำการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis Medium (MSRV) ที่อุณหภูมิ 42°C และ Tetra Thionate Broth (TTB) (Oxoid) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชม จากนั้นแยก *Salmonella* ปริมาณ 1 loopful บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-Lysine

Tergitol 4 agar (XLT4) (Oxoid) และ Brilliant Green Agar (BGA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-18 ชม. ทำการทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางชีวเคมีในอาหารทดสอบ TSI และ MIL จากนั้นจำแนก serovars ด้วยวิธี Slide - Agglutination test ดังกล่าวข้างต้น โดย serovars ของเชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วยแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 *Samonella enterica* ที่แยกได้จากโคนม (n=160)

Serotype	Number (%)
ser. 11:-:-	1 (0.6)
ser. 4,5,12:b:-	2 (1.3)
ser. 9,12:-:,1,5	4 (2.5)
Aberdeen	3 (1.9)
Amsterdam	7 (4.4)
Anatum	1 (0.6)
Augustenborg	12 (7.5)
Bareilly	4 (2.5)
Bovismorbificans	1 (0.6)
Brunei	7 (4.4)
Corvallis	2 (1.3)
Derby	1 (0.6)
Eastborne	4 (2.5)
Enteritidis	2 (1.3)
Hvittingfoss	5 (3.1)
Javiana	8 (5.0)
Lexington	5 (3.1)
Mbandaka	3 (1.9)
Newport	9 (5.6)
Rissen	3 (1.9)
Singapore	5 (3.1)
Stanley	17 (10.6)
Thompson	3 (1.9)
Typhimurium	9 (5.6)
Virchow	7 (4.4)
Weltevreden	34 (21.2)
Subsp. Houtenae	1 (0.6)
Total	160

ตารางที่ 2 *Salmonella enterica* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย (n=131)

<i>Salmonella</i> serovars	No. of isolates (%)	
	Pork	Human
Agona	1 (0.76)	0
Albany	2 (1.53)	0
Anatum	22 (16.79)	2 (1.53)
Baiboukum	1 (0.76)	0
Bovismorbificans	2 (1.53)	0
Bradford	1 (0.76)	0
Coeln	1 (0.76)	0
Corvallis	0	5 (3.82)
Enteritidis	0	7 (5.34)
Give	3 (2.29)	0
Kedougou	10 (7.63)	13 (9.92)
Langensalza	1 (0.76)	0
Newport	0	4 (3.05)
Panama	1 (0.76)	2 (1.53)
Paratyphi B	1 (0.76)	0
Rissen	15 (11.45)	0
Singapore	2 (1.53)	0
Stanley	9 (6.87)	11 (8.39)
Typhimurium	2 (1.53)	5 (3.82)
Virchow	1 (0.76)	0
Weltevreden	4 (3.05)	3 (2.29)
Total	79 (59.54)	52 (39.69)

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเชื้อเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) [22] ยาปฏิชีวนะที่ทดสอบคือ ampicillin, ceftriazone, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, spectinomycin, streptomycin, sulphonamides, tetracycline และ trimethoprim ทำการหาค่า MIC ต่อ ceftriazone เฉพาะเชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย โดยเจือจางแบบ two-fold เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29212

ตารางที่ 3 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย

ยาปฏิชีวนะและ ยามาเชื้อ	ความเข้มข้นที่ทดสอบ ($\mu\text{g/ml}$)	breakpoint* ($\mu\text{g/ml}$)
1. ampicillin (AMP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
2. chloramphenicol (CHP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
3. ciprofloxacin (CIP)	0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	4
4. gentamycin (GEN)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	8
5. spectinomycin (SPC)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	128
6. streptomycin (STR)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	32
7. sulfamethoxazole (SUL)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	512
8. tetracycline (TET)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	16
9. trimethoprim (TRI)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16
10. ceftriazone (CEF)	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64	64

* ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา

ระยะที่ 3 ศึกษาพันธุกรรมของการดื้อยา

3.1 การเตรียม DNA ด้วยวิธี whole cell boiled lysate

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ whole cell DNA ที่เตรียมด้วย whole cell boiling preparation [16] ถ้าต่างจากนี้จะระบุไว้ในขั้นตอนนั้นๆ

เลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) agar ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกโคโลนีจำนวน 1 โคโลนี ลงใน eppendorf tube ที่มีน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g นาน 5 นาที ดูดเก็บของเหลวใส เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR ต่อไป

3.2 การศึกษา class I integrons

3.2.1 ตรวจการปรากฏของยีน *int1* ยีน *ins* ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers int1F และ int1R ปฏิกริยา PCR มีปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย 5 μl of total DNA, 10 pmoles of each primer และ 12.5 μl 2.5 X PCR master mix eppendorf® MasterMix (Eppendorf, Hamburg, Germany) ตรวจสอบความจำเพาะของ primers ที่ใช้ด้วยการสกัด PCR products ด้วยชุดทดสอบ QIAQuick gel extraction kit (Qiagen) และส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ Macrogen (Seoul, South Korea)

3.2.2 ศึกษา resistance gene cassettes ใน variable regions

เฉพาะเชื้อที่มียีน *int1* นำมาตรวจหาการปรากฏของ resistance genes ใน variable regions ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ 5'CS และ 3'CS ศึกษาใน variable regions ด้วยการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

สกัด PCR products และส่งไปตรวจหาลำดับเบส ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบส เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.2.3. ศึกษา *Salmonella Genomic Island I* (SGI)

นำเชื้อที่มีการปรากฏของ class 1 integrons มาทดสอบว่า class 1 integrons อยู่ใน SGI1 หรือไม่ ถ้าอยู่เป็น SGI1 แบบไหน ด้วยเทคนิค PCR และ DNA sequencing ตามวิธีของ Doublet *et al.*, 2003

3.3 การปรากฏของยีนดื้อยาที่ไม่อยู่บน class 1 integrons

ตรวจการปรากฏของยีนในเชื้อจำนวน 109 isolates ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิด ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers ตามที่แสดงในตารางที่ 2 ในการตรวจจะเลือกชนิดของยีนที่ตรวจตามความดื้อยาของยาในแต่ละเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4 สกัด PCR products ด้วยและส่งไปตรวจหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความจำเพาะของ primers ที่ใช้

ตารางที่ 4 Primers ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Target gene or region	Primer	Sequence of primers (5'-3')	Reference
Class 1 integrons			
<i>int1</i>	Int1F	CCTGCACGGTTCCAATG	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2007
	Int1R	TCGTTTGTTCCGCCAGC	
variable regions	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Levesque <i>et al.</i> , 1995
	3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA	
SGI1			
<i>thdF</i>	thdF1	ACACCTTGAGCAGGGCAAG	Doublet <i>et al.</i> , 2003
	thdF2	AGTTCTAAAGGTTTCGTAGTCG	
<i>SA044- yidY</i>	SO44	TGACGAGCTGAAGCGAATTG	Doublet <i>et al.</i> , 2003
	yidY	ACCAGGGCAAACTACACAG	
<i>SA044- int2</i>	SO44	TGACGAGCTGAAGCGAAT TG	Doublet <i>et al.</i> , 2003
	int2	AGCAAGTGTGCGTAATTTGG	
<i>sul1- floR</i>	sulTER	AAGGATTTCCTGACCCCTG	Doublet <i>et al.</i> , 2003
	F3	AAAGGAGCCATCAGCAGCAG	
<i>floR-tetR</i>	F4	TTCCTCACCTTCATCCTACC	Doublet <i>et al.</i> , 2003
	F6	TTGGAACAGACGGCATGG	
<i>tetR- tetG</i>	tetR	GCCGTCCCGATAAGAGAGCA	Doublet <i>et al.</i> , 2003
	tetG	GAAGTTGCGATTGGTCTGCG	
<i>groEL- pse1</i>	groEL	TTCTGGTCTTCGTTGATGCC	Doublet <i>et al.</i> , 2003
	pse1	CATCATTTCCGCTCTGCCATT	
Antibiotic resistance genes			
<i>aadA1</i>	aadA1-F	CTCCGCAGTGATGGCGG	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	aadA1-R	GATCTGCGCGCGAGGCCA	
<i>aadA2</i>	aadA2-F	CATTGAGCGCCATCTGGAAT	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	aadA2-R	ACATTTGCTCATCGCCGGC	
<i>aadB</i>	aadB-F	CTAGCTGCGGCAGATGAGC	Chuanchuen and Padungtod 2009
	aadB-R	CTCAGCCGCCTCTGGGCA	
<i>bla_{PSE-1}</i>	bla _{PSE-1} -F	GCAAGTAGGGCAGGCAATCA	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	bla _{PSE-1} -R	GAGCTAGATAGATGCTCACAA	
<i>bla_{TEM}</i>	bla _{TEM} -F	ATCAGTTGGGTGCACGAGTG	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	bla _{TEM} -R	ACGCTCACCGGCTCCAGA	
<i>catA</i>	catA-F	CCAGACCGTTCAGCTGGATA	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	catA-R	CATCAGCACCTTGTCGCCT	
<i>catB</i>	catB-F	CGGATTGAGCCTGACCACC	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	catB-R	ATACGCGGTACCTTCCTG	
<i>cmlA</i>	cmlA-F	TGGACCGCTATCGGACCG	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^a
	cmlA-B	CGCAAGACACTTGGGCTGC	
<i>dfrA1</i>	dfrA1-F	CAATGGCTGTTGGTTGGAC	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	dfrA1-R	CCGGCTCGATGTCTATTGT	
<i>dfrA10</i>	dfrA10-F	TCAAGGCAAATTACCTTGGC	Chuanchuen and Padungtod 2009
	dfrA10-R	ATCTATTGGATCACCTACCC	
<i>dfrA12</i>	dfrA12-F	TTCCGAGACTCACTGAGGG	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	dfrA12-R	CGGTTGAGACAAGCTCGAAT	
<i>strA</i>	strA-F	TGGCAGGAGGAACAGGAGG	Chuanchuen and Padungtod 2009
	strA-R	AGGTCGATCAGACCCGTGC	
<i>strB</i>	strB-F	GCGGACACCTTTTCCAGCCT	Chuanchuen and Padungtod 2009
	strB-R	TCCGCCATCTGTGCAATGCG	
<i>sul1</i>	sul1-F	CGGACGCGAGGCCTGTATC	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2006
	sul1-R	GGGTGCGGACGTAGTCAGC	
<i>sul2</i>	sul2-F	GCGCAGGCGCGTAAGCTGAT	Chuanchuen and Padungtod 2009
	sul2-R	CGAAGCGCAGCCGAATTC	
<i>sul3</i>	sul3-F	GGGAGCCGCTTCCAGTAAT	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^a
	sul3-R	TCCGTGACACTGCAATCATTA	
<i>tetA</i>	tetA-F	GCTGTGCGGATCGTTTCGG	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	tetA-R	CATTCCGAGCATGAGTGCC	
<i>tetB</i>	tetB-F	CTGTGCGGCGCATCGGTCAT	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2008 ^b
	tetB-R	CAGGTAAAGCGATCCCACC	
Virulence genes			
<i>invA</i>	InvA-1	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	Chiu and Ou, 1996
	InvA-2	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	
<i>spvC</i>	SpvC-1	ACTCCTTGACACAACCAAATGCGGA	Chiu and Ou, 1996
	SpvC-2	TGTCTTCTGCATTTGCCACCATCA	
<i>pefA</i>	PefA-F	GCGCCGCTCAGCCGAACCAG	Skyberg <i>et al.</i> , 2006
	PefA-R	GCAGCAGAACAGGAAACAGTG	

ตารางที่ 4 Primers ที่ใช้ในการศึกษานี้ (ต่อ)

Target gene or region	Primer	Sequence of primers (5'-3')	Reference
Class 2 integrons			
<i>int2</i>	Int2F	GGCAGACAGTTGCAAGACAA	Chuanchuen et al., 2008
	Int2R	AAGCGATTTTCTGCGTGTTT	Chuanchuen et al., 2008
Class 3 integrons			
<i>int3</i>	Int3F	CCGGTTCAGTCTTTCCTCAA	Chuanchuen et al., 2008
	Int3R	GAGGCGTGTACTTGCCTCAT	Chuanchuen et al., 2008
Virulence gene			
<i>invA</i>	invAF	CTGGCGGTGGGTTTTGTGTCTTCTCTATT	Skyberg et al., 2005
	invAR	AGTTTCTCCCCCTCTTCATGCGTTACCC	Skyberg et al., 2005
<i>spvC</i>	spvCF	ACTCCTTGCAACAACAAATGCGGA	Chiu and Ou., 1996
	spvCR	TGTCTTCTGCATTTTCGCCACCATCA	Chiu and Ou., 1996
<i>pefA</i>	pefAF	GCGCCGCTCAGCCGAACCAG	Skyberg et al., 2005
	pefAR	GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG	Skyberg et al., 2005
<i>spiA</i>	spiAF	CCAGGGGTCTGTAGTGTATTGCGTGAGATG	Skyberg et al., 2005
	spiAR	CGCGTAACAAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	Skyberg et al., 2005
<i>pagF</i>	pagCF	CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC	Skyberg et al., 2005
	pagCR	GAAGCCGTTTATTTTGTAGAGGAGATGTT	Skyberg et al., 2005
<i>msgA</i>	msgAF	GCCAGGCGCACGCCAAATCATCC	Skyberg et al., 2005
	msgAR	GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTTCAAAC	Skyberg et al., 2005
<i>sipB</i>	sipBF	GGACGCCGCCCGGAAAACTCTC	Skyberg et al., 2005
	sipBR	ACACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	Skyberg et al., 2005
<i>prgH</i>	prgHF	GCCCGAGCAGCCTGAGGAGTTAGAAA	Skyberg et al., 2005
	prgHR	TGAAATGAGCGCCCTTGAGCCAGTC	Skyberg et al., 2005
<i>spaN</i>	spaNF	AAAAGCCGTGGAATCCGTTAGTGAAGT	Skyberg et al., 2005
	spaNR	CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG	Skyberg et al., 2005
<i>orgA</i>	orgAF	TTTTTGGAATGCATCAGGGAACA	Skyberg et al., 2005
	orgAR	GGCGAAAGCGGGGACGGTATT	Skyberg et al., 2005
<i>tolC</i>	tolCF	TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC	Skyberg et al., 2005
	tolCR	CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	Skyberg et al., 2005
<i>iroN</i>	iroNF	ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT	Skyberg et al., 2005
	iroNR	CGCTTTACCGCCGTTCTGCCACTGC	Skyberg et al., 2005
<i>sitC</i>	sitCF	CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC	Skyberg et al., 2005
	sitCR	CGGGGCGAAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	Skyberg et al., 2005
<i>sifA</i>	sifAF	TTTGCCGAACGCGCCCCACACG	Skyberg et al., 2005
	sifAR	GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCCACCCATCT	Skyberg et al., 2005
<i>sopB</i>	sopBF	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG	Skyberg et al., 2005
	sopBR	TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	Skyberg et al., 2005
<i>lpf</i>	lpfCF	GCCCCGCCTGAAGCCTGTGTTGC	Skyberg et al., 2005
	lpfCR	AGGTCGCCGTGTTTGTAGGTTGGATA	Skyberg et al., 2005

ตารางที่ 5 การตรวจยีนดื้อยาแยกตามการดื้อยาของเชื้อ

Antibiotic	No. of isolates	Gene
Ampicillin	7	<i>bla_{PSE}</i> , <i>bla_{TEM}</i>
Chloramphenicol	3	<i>catA</i> , <i>catB</i> , <i>cmlA</i>
Gentamicin	1	<i>aadB</i>
Tetracycline	14	<i>tetA</i> , <i>tetB</i>
Trimethoprim	3	<i>dfrA1</i> , <i>dfrA10</i> , <i>dfrA12</i>
Spectinomycin	29	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>
Streptomycin	102	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>
Sulphonamides	18	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>

3.4 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons และยีนดื้อยา

ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยการทดสอบว่า ยีนดื้อยาอยู่บน plasmid หรือไม่ โดยใช้เทคนิค biparental mating ตามวิธีของ Sunde (2006) และ Sorum (2001) โดยตัวรับคือ MG1655rif² (MIC ต่อ rifampicin 256 µg/ml) และตัวให้ (donor) คือ MDR *Salmonella* ที่มี class 1 integrons (มีทั้งยีน *intI1* และ resistance genes ใน variable regions) ดังนี้ เพาะเลี้ยง MG1655rif² และ MDR *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 4 มล. ใน shaking incubator ที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. จากนั้นเจือจางด้วย LB ในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงเชื้อต่อใน shaking incubator ที่ 37 °C จนถึง Mid-log phase (3-4 ชม.) ผสมตัวรับและตัวให้อย่างละ 700 µl ใน eppendorf tube ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนใน LB อุณหภูมิ 37 °C 30-50 µl และไปเปดลงบนแผ่น nitrocellulose filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm และ pore size 0.45 µm ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง นำไปอบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. จากนั้นนำแผ่น filter พร้อมส่วนผสมเชื้อใส่ลงใน LB 1 มล. ใน eppendorf tube ใหม่ vortex ประมาณ 1 นาที นำแผ่น filter ออกและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 1 นาที Plate เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี rifampicin 32 µg/ml และยาปฏิชีวนะ streptomycin 50 µg/ml คัดเลือกโคโลนีที่ดื้อต่อ rifampicin และยาปฏิชีวนะที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ eosin methylene blue (EMB) agar, brilliant green agar (BGA) และ/หรือ MacConkey Agar เพื่อยืนยันว่าเป็น *E. coli* จากนั้นนำมา สกัด plasmid จาก transconjugants ด้วยชุดทดสอบ QIAprep[®] Mini-spin kit (Qiagen) และตรวจสอบว่ายังมี plasmid หรือไม่บน gel electrophoresis รวมทั้งตรวจหาการปรากฏของยีน *intI1* และ resistance genes ด้วยเทคนิค PCR ตามที่กล่าวแล้วข้างต้น ชุดควบคุมคือ MG1655rif² ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin เพียงอย่างเดียวและ rifampin ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม

3.5 การศึกษา virulence genes

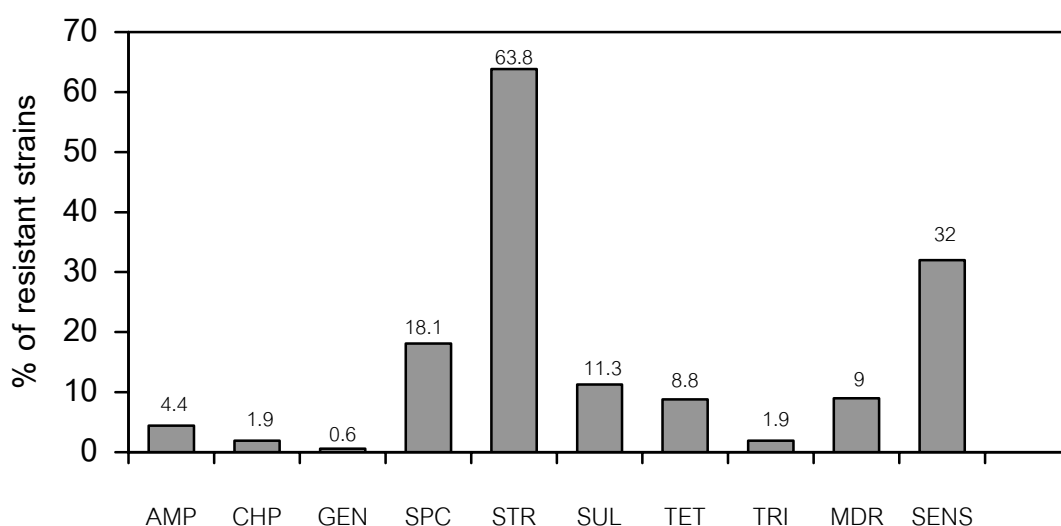
ตรวจการปรากฏของยีน *invA*, *spvC* และ *pcfA* ในเชื้อที่แยกได้จากสุกรทุกตัว (n=160) ด้วยเทคนิค PCR และใช้ primers จำเพาะ ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสุกรและผู้ป่วยตรวจการปรากฏของ virulence genes ทั้งหมด 16 ยีน

ผลการวิจัย

ความชุกของการดื้อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยา

1. เชื้อที่แยกได้จากโคนม

จาก *Salmonella* ที่แยกได้โคนมทั้งหมด 160 isolates พบว่ามีเชื้อดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิดจำนวน 109 isolates (88%) โดยเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันจำนวน 14 isolates (9%) การดื้อยาไม่มีความจำเพาะต่อ serovars โดยอัตราการดื้อยาชนิดต่างๆ แสดงในรูปที่ 1 ในการวิจัยครั้งนี้ *Salmonella* มีรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 13 รูปแบบ โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ STR (64, 40%) (ตารางที่ 6)



รูปที่ 1 อัตราการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* ที่แยกได้โคนม ($n = 160$)

AMP, ampicillin; CHP, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamycin; SPC, spectinomycin; STR, streptomycin; SUL, sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TRI, trimethoprim; MDR, multidrug resistance; SENS, susceptible to all antibiotics

ตารางที่ 6 รูปแบบการดื้อยา การปรากฏของยีนดื้อยาและ serovars ของ *Salmonella* ที่แยกได้จากโคนม
(n=160)

Resistance pattern (n=160) ^a	Number (%)	Antimicrobial resistance gene (n=109)		
		Resistance gene	Serovar	Number (%)
Spc only	1(0.6)	-	-	-
Str only	64(40.0)	<i>aadA2</i>	Augustenborg	1(0.9)
		<i>aadA2</i>	Singapore ^b	1(0.9)
Sul only	3(1.9)	-	-	-
Tet only	2(1.3)	<i>tetA</i>	Enteritidis	1(0.9)
Amp-Spc	1(0.6)	-	-	-
Spc-Str	21(13.1)	<i>strA, strB</i>	Newport	1(0.9)
		<i>strA, strB</i>	Weltevreden	1(0.9)
Str-Sul	3(1.9)	-	-	-
Amp-Spc-Str	2(1.3)	-	-	-
Str-Sul-Tet	8(5.0)	<i>strA, strB, sul2</i>	Bovismorbificans	1(0.9)
		<i>strA, strB, sul2, tetA</i>	Typhimurium	6 (5.5)
Amp-Chp-Spc-Str-Sul-Tet	1(0.6)	<i>aadA1, bla_{TEM}, catB, tetA, sul1</i>	Rissen	1(0.9)
Amp-Spc-Str-Sul-Tet-Tri	1(0.6)	<i>aadA1, dfrA12, tetA</i>	Anatum	1(0.9)
Amp-Chp-Spc-Str-Sul-Tet-Tri	1(0.6)	<i>aadA2, bla_{PSE-1}, dfrA10</i>	Derby ^c	1(0.9)
Amp-Chp-Gen-Spc-Str-Sul-Tet-Tri	1(0.6)	<i>aadA1, bla_{TEM}, catB, dfrA12,</i>	Typhimurium	1(0.9)
		<i>strA, strB, sul1, sul2, tetA</i>		
Susceptible to all antimicrobials tested	51(32%)	-	-	-

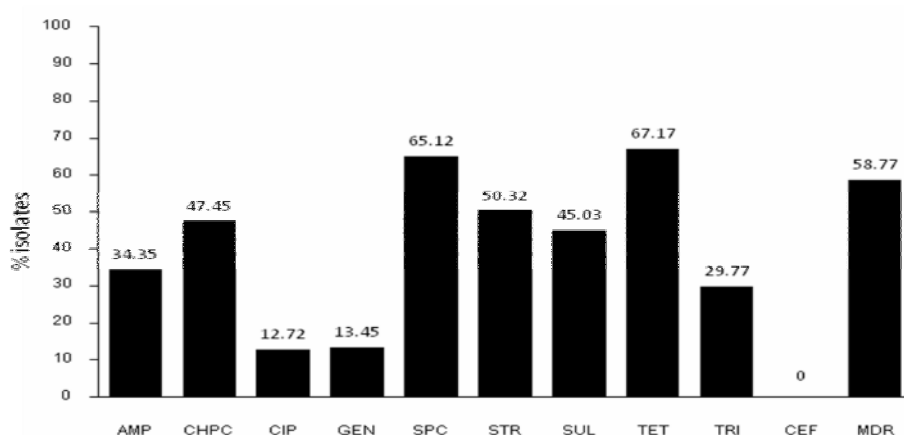
^a Amp, ampicillin; Chp, chloramphenicol; Gen, gentamycin; Spc, spectinomycin; Str, streptomycin; Sul, sulfamethoxazole; Tet, tetracycline; Tri, trimethoprim

^b presence of class 1 integrons

^c presence of SGI1-A

2. เชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย

เชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วยมีเชื้อดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิดจำนวน 115 isolates (87.8%) โดยเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันจำนวน 77 isolates (58.8%) การดื้อยาไม่มีความจำเพาะต่อ serovars ไม่พบว่ามีเชื้อตัวใดที่ดื้อต่อ ceftriaxone โดยอัตราการดื้อยาสายพันธุ์ต่างๆ แสดงในรูปที่ 2 จัดรูปแบบการดื้อยาได้ 33 รูปแบบและ 19 รูปแบบสำหรับเชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วยตามลำดับ โดยรูปแบบที่พบบ่อยที่สุดสำหรับเชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกร คือ SUL (11.4%) รูปแบบที่พบบ่อยที่สุดสำหรับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยคือ AMP-CHP- SPC-STR-SUL-TET (15.4%)



รูปที่ 2 อัตราการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของ *Salmonella enterica* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย (n=131)

AMP, ampicillin; CHPC, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; SPC, spectinomycin; STR, streptomycin; SUL, sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TRI, trimethoprim; CEF, ceftriaxone; MDR, multidrug resistance

ตารางที่ 7 รูปแบบการดื้อของ *Salmonella* ที่แยกได้จากเนื้อสุกร ($n=79$)

Resistance pattern	No. of isolates (%)
SPC only	2(2.5)
STR only	1(1.3)
SUL only	9(11.4)
TET only	4(5.1)
TMP only	1(0.9)
AMP-SUL	1(1.3)
AMP-TET	1(1.3)
CHP-TMP	1(1.3)
STR-TET	2(2.5)
SUL-TRI	1(1.3)
AMP- SPC- TET	2(2.5)
AMP -STR-TET	3(3.7)
AMP - SUL-TET	1(1.3)
GEN- SUL-TET	1(1.3)
SPC - SUL-TET	1(1.3)
AMP-CHP-SUL-TET	1(1.3)
AMP-CHP-SUL-TMP	1(1.3)
AMP-SPC-SUL-TET	1(1.3)
AMP-SPC-SUL-TMP	1(1.3)
AMP-STR-SUL-TET	1(1.3)
CHP-SPC-SUL-TET	2(2.5)
CHP-SPC-SUL-TMP	1(1.3)
CHP-STR-SUL-TET	2(2.5)
AMP-CHP-SPC-SUL-TET	2(2.5)
AMP-CHP-STR-SUL-TET	1(1.3)
AMP-SPC-SUL-TET-TMP	5(6.3)
CHP-SPC-SUL-TET-TMP	2(2.5)
AMP-CHP-GEN-SPC-SUL-TET	2(2.5)
AMP-CHP- SPC-SUL-TET-TMP	1(1.3)
AMP- SPC-STR-SUL-TET-TMP	1(1.3)
AMP-CHP-GEN-SPC-SUL-TET-TMP	1(1.3)
AMP-CHP-SPC-STR-SUL-TET-TMP	3(3.8)
AMP-CHP-GEN-SPC-STR-SUL-TET-TMP	1(1.3)

ตารางที่ 8 รูปแบบการดื้อยา ของ *Salmonella* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (n=52)

Resistance pattern	No. of isolates (%)
AMP-CHP-SPC	1(1.9)
AMP-CHP-CIP-SPC	1(1.9)
AMP-CHP-SPC-SUL	1(1.9)
AMP-CHP-CIP-SPC-TMP	1(1.9)
AMP-CHP-SPC-STR-SUL	1(1.9)
AMP-CHP-SPC-STR-TET	7(13.5)
AMP-CHP-GEN-SPC-TET-TMP	1(1.9)
AMP-CHP- SPC-STR-SUL-TET	8(15.4)
AMP-CHP- SPC-STR-TET-TMP	7(13.5)
AMP-CHP- SPC- SUL-TET-TMP	1(1.9)
AMP-CHP- CIP-SPC-STR- TET-TMP	4(7.6)
AMP-CHP- CIP-SPC- SUL-TET-TMP	1(1.9)
AMP-CHP-GEN- SPC-STR- TET-TMP	4(7.6)
AMP-CHP- SPC-STR- SUL-TET-TMP	4(7.6)
AMP-CHP- CIP- GEN-SPC-STR-TET-TMP	2(3.8)
AMP-CHP- CIP- GEN- SPC- SUL-TET-TMP	1(1.9)
AMP-CHP- CIP- SPC-STR- SUL-TET-TMP	4(7.6)
AMP-CHP- GEN-SPC -STR- SUL-TET-TMP	1(1.9)
AMP-CHP- CIP- GEN-SPC -STR- SUL-TET-TMP	2(3.8)

Integrans และ SGI1

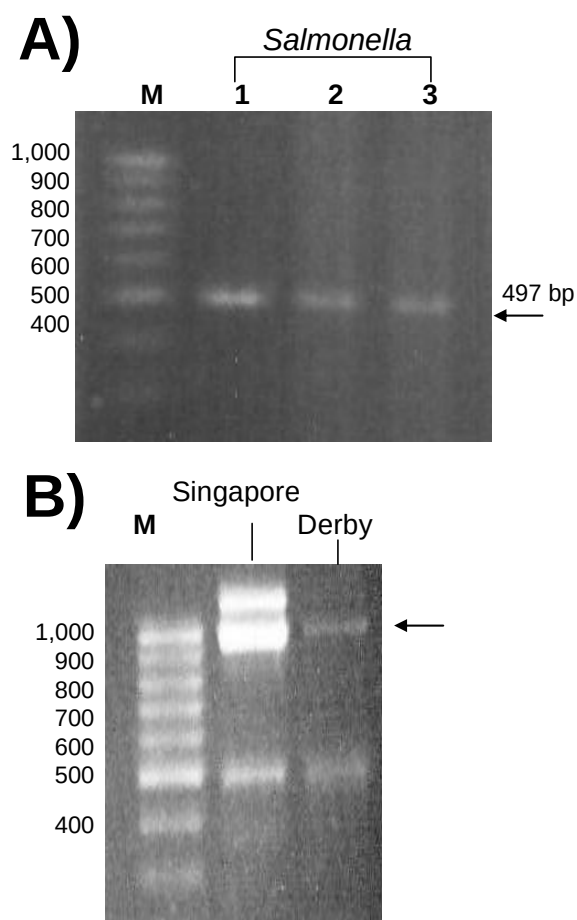
1. เชื้อที่แยกได้จากโคนม

เชื้อจากโคนมจำนวน 2 (1.25%) isolates เท่านั้นที่มียีน *ins* คือ serovars Singapore และ Derby โดยทั้ง 2 isolates ให้ PCR amplicons ของ variable region ขนาด 1,000 bp ผลการตรวจหาลำดับเบสพบว่าเป็นยีน *aadA2* ที่ควบคุมการดื้อยา streptomycin เมื่อทำการศึกษา SGI1 พบว่า class 1 integrans ของ serovar Derby อยู่บน SGI-A (รูปที่ 3)

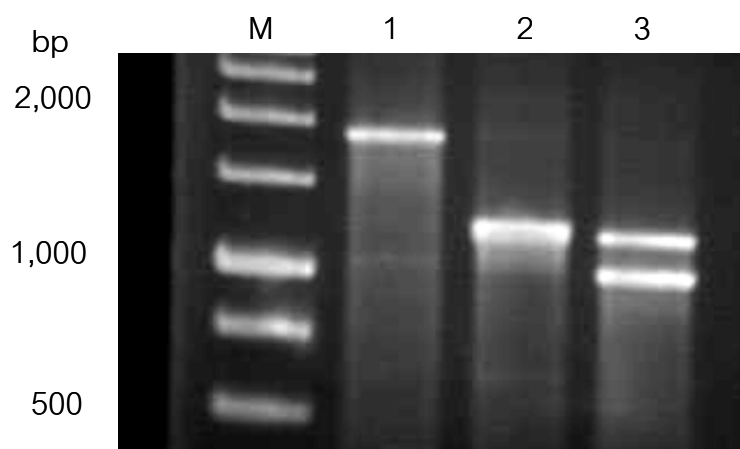
2. เชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย

เชื้อจากเนื้อสุกรและผู้ป่วยจำนวน 39 (29.8%) isolates มียีน *int1* โดยเชื้อจำนวน 11 (28.2%) isolates มี inserted gene cassettes ที่มีขนาด 1,000-1,900 bp เชื้อทั้ง 11 isolates มี variable region ขนาด 1,900 bp มีเชื้อเพียง 1 isolates ที่มี variable region ขนาด 1,200 bp จำนวน 2 isolates มี 2 class 1 integrans ซึ่งให้ variable region ขนาด 1,000 และ 1,200 bp (รูปที่ 4) สามารถจัด integron profiles (IPs) ได้ทั้งหมด 3 IPs โดยใช้ขนาดและจำนวนของ variable regions ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR (ตารางที่ 7) จากการถอดรหัสพันธุกรรมพบว่า variable regions ขนาด 1,000, 1,200 และ 1,900 เป็นยีน *dfra1-aadA2*, *blaPS-1* และ *aadA2* ตามลำดับ

ผลการวิจัยยังพบว่าไม่มีเชื้อตัวใดที่มี class 2, 3 integrans และ SGI1



รูปที่ 3 PCR products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *ins* และ variable regions ใน *Salmonella* ที่แยกได้จากโคนม **A)** ยีน *ins* ซึ่งมีขนาด 497 bp และ **B)** variable regions ของ class 1 integrons ใน *Salmonella* Derby และ *Salmonella* Singapore มีขนาดประมาณ 1,000 bp **M**, Molecular weight marker



รูปที่ 4 PCR products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน variable regions ของ class 1 integrons ใน *Salmonella* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย จากผลการถอดรหัสพันธุกรรม Lane 1, IP1: *dfra1-aadA2*; lane 2, IP2: *blaPS-1* และ Lane 3, IP3: *blaPS-1-aadA2* M, Molecular weight marker

ตารางที่ 9 integrons profiles ของเชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย

IP	Approximate size of amplicons(kb)	Insert gene cassettes	Antibiotic resistance patterns	Number of isolates	Serotype
I	1.9	<i>dfra12-aadA2</i>	AMP, TET, SUL, TMP, SPC	2	Rissen
			AMP, TET, SUL, TMP, SPC	2	Anatum
			TET, CHPC, SUL, TMP, SPC	1	Anatum
			AMP, STR, TET, CHPC, SUL, TMP, SPC	1	Anatum
			AMP, STR, TET, CHPC, SUL, TMP, SPC	1	Baiboukou
			AMP, STR, TET, CHPC, SUL, TMP, SPC	1	Rissen
			AMP, CHPC, SUL, TMP	1	Albany
II	1.2	<i>blaPSE-1</i>	AMP, CHPC, SUL, TMP	1	Albany
III	1.2, 1.0	<i>blaPSE-1, aadA2</i>	STR, TET, CHPC, SUL	1	Anatum
			AMP, STR, TET, CHPC, SUL, TMP, SPC	1	Anatum

การปรากฏของยีนดื้อยาอื่น ๆ

1. เชื้อที่แยกได้จากโคนม

ในเชื้อที่แยกได้จากโคนม เชื้อที่ดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิดจำนวน 109 isolates ตรวจพบยีนดื้อยาที่ทดสอบในเชื้อ 16 (14.7%) isolates โดยการกระจายตัวของยีนดื้อยาแสดงในตารางที่ 6 ยีนดื้อยาที่พบมากที่สุดคือ *strA-strB* ซึ่งพบในเชื้อที่ดื้อยา streptomycin ยีนดื้อยาที่พบสอดคล้องกับลักษณะการดื้อยาของเชื้อ เช่น เชื้อที่ดื้อต่อ streptomycin มียีน *strA-strB* เชื้อที่ดื้อต่อ tetracycline มียีน *tetA* เป็นต้น ยีนดื้อยาที่พบส่วนใหญ่อยู่นอก class 1 integrons ยกเว้นยีน *aadA2* (ของ serovar Singapore และ Derby อย่างละ 1 isolate) ส่วนยีน *bla_{PS-1}* และ *dfrA10* ของ serovar Derby 1 isolate อยู่บน SG11-A

2. เชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย การกระจายตัวของยีนดื้อยาแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การปรากฏของยีนดื้อยาและ serovars ของ *Salmonella* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย (n=131)

Resistance pattern	No. (%)	Antimicrobial resistance gene		
		Resistance gene	Serovar	No. (%)
SPC only	2 (1.5)	<i>aadA1, aadA2</i>	Kedougou	1(0.8)
		-	Weltevreden	1(0.8)
STR only	1 (0.8)	-	Anatum	1(0.8)
SUL only	9 (6.9)	<i>sul1, sul2</i>	Anatum	2(1.8)
		-	Bradford	1(0.8)
		<i>sul2</i>	Stanley	3(2.7)
		<i>sul1, sul2</i>	Rissen	1(0.8)
		<i>sul2</i>	Singapore	1(0.8)
		<i>sul2</i>	Weltevreden	1(0.8)
		-	Anatum	1(0.8)
TET only	4 (3.1)	-	ParatyphiB	1(0.8)
		<i>tetB</i>	Rissen	2(1.8)
		-	Weltevreden	1(0.8)
TMP only	1 (0.8)	-	Stanley	1(0.8)
AMP-SUL	1 (0.8)	<i>sul3</i>	Anatum	1(0.8)
AMP-TET	1 (0.8)	<i>bla_{PSE-1}</i>	Anatum	1(0.8)
CHP-TMP	1 (0.8)	-	Anatum	1(0.8)
STR-TET	2 (1.5)	<i>aadA1, aadA2, tetB</i>	Give	2(1.8)
SUL-TRI	1 (0.8)	-	Anatum	1(0.8)
AMP-CHP-SPC	1 (0.8)	<i>aadA1, aadA2, bla_{PSE-1}, cmlA</i>	Kedougou	1(0.8)
AMP- SPC- TET	2 (1.5)	<i>bla_{PSE-1}</i>	Rissen	1(0.8)
		<i>bla_{PSE-1}, tetB</i>	Stanley	1(0.8)
AMP -STR-TET	3 (2.3)	<i>bla_{TEM'}, tetB</i>	Stanley	3(2.7)
AMP - SUL-TET	1 (0.8)	<i>bla_{TEM'}, tetB</i>	Anatum	1(0.8)
GEN- SUL-TET	1 (0.8)	<i>aadA1, tetB</i>	Coeln	1(0.8)
SPC - SUL-TET	1 (0.8)	<i>sul3</i>	Rissen	1(0.8)
AMP-CHP-CIP-SPC	1 (0.8)	<i>aadA1, aadA2, bla_{PSE-1}, cmlA</i>	Covallis	1(0.8)
AMP-CHP-SPC-SUL	1 (0.8)	<i>bla_{PSE-1}, cmlA</i>	Kedougou	1(0.8)
AMP-CHP-SUL-TET	1 (0.8)	<i>bla_{TEM'}, cmlA, sul3, tetA</i>	Kedougou	1(0.8)
AMP-CHP-SUL-TMP	1 (0.8)	<i>bla_{PSE-1}, bla_{TEM'}, sul2</i>	Albany	1(0.8)

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Resistance pattern	No (%)	Antimicrobial resistance gene		
		Resistance gene	Serovar	No. (%)
AMP-SPC-SUL-TET	1 (0.8)	<i>aadA1</i>	Anatum	1(0.8)
AMP-SPC-SUL-TMP	1 (0.8)	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>	Typhimurium	1(0.8)
AMP-STR-SUL-TET	1 (0.8)	<i>aadA1</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>sul1</i> , <i>tetB</i>	Typhimurium	1(0.8)
CHP-SPC-SUL-TET	2 (1.5)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>tetB</i>	Kedougou	2(1.8)
CHP-SPC-SUL-TMP	1 (0.8)	<i>sul3</i>	Panama	1(0.8)
CHP-STR-SUL-TET	2 (1.5)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>catB</i> , <i>sul1</i>	Anatum	1(0.8)
		<i>cmlA</i> , <i>catA</i> , <i>sul3</i> , <i>tetB</i>	Weltevreden	1(0.8)
AMP-CHP-CIP-SPC-TMP	1 (0.8)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>cmlA</i>	Covallis	1(0.8)
AMP-CHP-SPC-SUL-TET	2 (1.5)	<i>catB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	Kedougou	1(0.8)
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>cmlA</i> , <i>bla_{TEM}</i>	Rissen	1(0.8)
		<i>sul3</i> , <i>tetB</i>		
AMP-CHP-SPC-STR-SUL	1 (0.8)	<i>bla_{TEM}</i> , <i>cmlA</i>	Kedougou	1(0.8)
AMP-CHP-SPC-STR-TET	7 (5.3)	<i>bla_{TEM}</i> , <i>catA</i> , <i>catB</i>	Anatum	1(0.8)
		<i>aadA2</i> , <i>cmlA</i> , <i>bla_{PSE-1}</i>	Kedougou	1(0.8)
		<i>bla_{PSE-1}</i> , <i>catA</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA2</i> , <i>tetB</i>	Stanley	4(3.6)
		<i>bla_{PSE-1}</i> , <i>aadA2</i> , <i>cmlA</i> ,	Typhimurium	1(0.8)
AMP-CHP-STR-SUL-TET	1 (0.8)	<i>aadA1</i> , <i>catB</i>	Kedougou	1(0.8)
AMP-SPC-SUL-TET-TMP	5 (3.8)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>dfrA12</i> ,	Anatum	2(1.8)
		<i>sul3</i> , <i>tetB</i>		
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>dfrA10</i> ,	Rissen	3(2.7)
		<i>dfrA12</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetB</i>		
CHP-SPC-SUL-TET-TMP	2 (1.5)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>cmlA</i> , <i>dfrA12</i> ,	Anatum	1(0.8)
		<i>sul1</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>		
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	Kedougou	1(0.8)
AMP-CHP-GEN-SPC-SUL-TET	2 (1.5)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	Anatum	2(1.8)
AMP-CHP-GEN-SPC-TET-TMP	1 (0.8)	<i>catA</i>	Enteritidis	1(0.8)

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Resistance pattern	No. (%)	Antimicrobial resistance gene		
		Resistance gene	Serovar	No. (%)
AMP-CHP- SPC-STR- SUL-TET	8 (6.1)	<i>bla_{PSE-1}</i> , <i>catA</i> , <i>catB</i>	Anatum	1(0.8)
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>cmlA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetB</i>	Covallis	1(0.8)
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>catB</i>	Kedougou	2(1.8)
		<i>cmlA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>		
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>cmlA</i>	Stanley	3(2.7)
		<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>	Weltevreden	1(0.8)
AMP-CHP- SPC-STR- TET-TMP	7 (5.3)	<i>bla_{TEM}</i> , <i>dfrA1</i>	Enteritidis	1(0.8)
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>cmlA</i>	Kedougou	1(0.8)
		<i>tetB</i>		
		<i>bla_{PSE-1}</i> , <i>catA</i> , <i>dfrA10</i> , <i>tetB</i>	Newport	3(2.7)
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>catB</i>	Typhimurium	2(1.8)
		<i>dfrA12</i> , <i>tetB</i>		
AMP-CHP- SPC-SUL- TET-TMP	2 (1.5)	<i>bla_{TEM}</i> , <i>cmlA</i>	Weltevreden	2(1.8)
AMP- SPC-STR-SUL- TET-TMP	1 (0.8)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>dfrA10</i>	Rissen	1(0.8)
		<i>sul2</i> , <i>sul3</i>		
AMP-CHP- CIP-SPC- STR- TET-TMP	4 (3.1)	<i>bla_{PSE-1}</i> , <i>cmlA</i> , <i>dfrA10</i>	Covallis	1(0.8)
		<i>bla_{TEM}</i> , <i>dfrA1</i>	Enteritidis	1(0.8)
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>cmlA</i>	Kedougou	1(0.8)
		<i>tetB</i>		
		<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>cmlA</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tetB</i>	Typhimurium	1(0.8)
AMP-CHP- CIP-SPC- SUL-TET-TMP	1 (0.8)	<i>catA</i> , , <i>cmlA</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA10</i> , <i>dfrA12</i>	Enteritidis	1(0.8)
AMP-CHP-GEN- SPC- STR- TET-TMP	4 (3.1)	<i>aadA1</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>catA</i> , <i>cmlA</i>	Stanley	2(1.8)
		<i>aadA1</i> , <i>bla_{PSE-1}</i> , <i>cmlA</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tetB</i>	Covallis	1(0.8)
		<i>aadA1</i> , <i>dfrA12</i>	Newport	1(0.8)

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Resistance pattern	No. (%)	Antimicrobial resistance gene (n=112)		
		Resistance gene	Serovar	No. (%)
AMP-CHP-GEN-SPC- SUL-TET-TMP	1 (0.8)	<i>aadA1, dfrA12, bla_{TEM}, cmlA, sul2, sul3, tetA</i>	Stanley	1(0.8)
AMP-CHP-SPC-STR- SUL-TET-TMP	7 (5.3)	<i>bla_{TEM}, sul1</i>	Anatum	1(0.8)
		<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, dfrA12, sul1, tetB</i>	Baiboukoum	1(0.8)
		<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, catB</i>	Panama	1(0.8)
		<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, catA, catB, cmlA, dfrA1, dfrA12, tetB</i>	Rissen	1(0.8)
		<i>bla_{TEM}, sul1, tetB</i>	Stanley	3(2.7)
AMP-CHP- CIP- GEN- SPC-STR-TET-TMP	2 (1.5)	<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, dfrA1, tetB</i>	Kedougou	1(0.8)
		<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, cmlA</i>	Panama	1(0.8)
AMP-CHP- CIP- GEN- SPC- SUL-TET-TMP	1 (0.8)	<i>aadA2, catA, dfrA10</i>	Enteritidis	1(0.8)
AMP-CHP- CIP- SPC- STR- SUL-TET-TMP	4 (3.1)	<i>bla_{TEM}</i>	Enteritidis	1(0.8)
		<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, cmlA, dfrA12, sul3, tetB</i>	Kedougou	3(2.7)
AMP-CHP- GEN-SPC – STR- SUL-TET-TMP	1 (0.8)	<i>aadA1, bla_{TEM}, catB, sul1, sul2, sul3</i>	Stanley	1(0.8)
AMP-CHP-GEN-SPC- STR-SUL-TET-TMP	1 (0.8)	<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, catA, cmlA, dfrA1, dfrA10, sul3</i>	Rissen	1(0.8)
AMP-CHP- CIP- GEN- SPC -STR- SUL-TET-TMP	2 (1.5)	<i>aadA1, bla_{TEM}, dfrA1, dfrA12</i>	Enteritidis	1(0.8)
		<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM}, tetB</i>	Kedougou	3(2.7)
Susceptable to all antimicrobials tested	19 (14.5)	-		

การถ่ายทอด class 1 integrons และยีนดื้อยา

1. เชื้อที่แยกได้จากโคนม

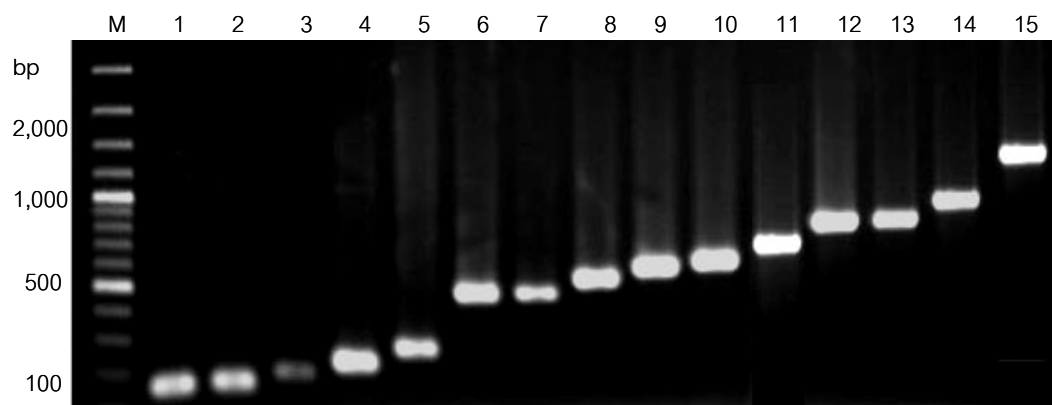
class 1 integrons ในเชื้อทั้ง 2 isolates ไม่สามารถถ่ายทอดไปยัง *E. coli* ได้ โดยมีเชื้อเพียง 7 isolates ที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาแบบขวางได้ โดย *Salmonella* Typhimurium จำนวน 1 isolate ถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ streptomycin, ampicillin และ tetracycline *Salmonella* Javiana จำนวน 1 isolate ถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ ampicillin *Salmonella* Anatum จำนวน 1 isolate ถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ tetracycline *Salmonella* Enteritidis จำนวน 2 isolate ถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ tetracycline และ *Salmonella* Eastborne และ Newport อย่างละ 1 isolate ถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ streptomycin ได้

2. เชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย เฉพาะ *S. Rissen* จำนวน 2 isolate และ *S. Baiboukoum* จำนวน 1 isolate สามารถถ่ายทอด *dfrA12-aadA2* ได้

การปรากฏของ virulence genes

1. เชื้อที่แยกได้จากโคนม พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ (98%) มียีน *invA* ในขณะที่เชื้อเพียง 2 และ 1 isolates ที่มียีน *spvC* และ *pefA*

2. เชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย พบว่าเชื้อทุกตัวให้ผลบวกต่อยีน *invA* โดยที่เชื้อเพียง 1 (0.76%) isolate ที่มียีน *spvC* และ *pefA* โดยพบยีน *pagC*, *spaN* และ *sopB* ในเชื้อมากกว่า 99% ขนาดของ PCR products ของแต่ละยีนที่ตรวจพบแสดงในรูปที่ 5 และอัตราการพบ virulence genes ทั้ง 16 ชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 11



รูปที่ 5 PCR products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน virulence genes ทั้ง 16 ยีน lane 1-15, ยีน *pefA*, *tolC*, *msgA*, *sopB*, *orgA*, *sifA*, *pagC*, *spaN*, *spiA*, *spvC*, *lpfC*, *prgH*, *sitC*, *sipB*, *invA* และ *iro* ตามลำดับ lane M, 100 bp marker

ตารางที่ 11 อัตราการปรากฏของ virulence genes ใน *Salmonella enterica* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วย (n= 131)

Gene	Prevalence (%)
<i>spvC</i>	8 (6.10)
<i>invA</i>	131 (100.00)
<i>pefA</i>	4 (3.05)
<i>spiA</i>	131 (100.00)
<i>pagC</i>	130 (99.24)
<i>msgA</i>	131 (100.00)
<i>sipB</i>	112 (85.50)
<i>prgH</i>	126 (96.18)
<i>spaN</i>	130 (99.24)
<i>orgA</i>	75 (57.25)
<i>tolC</i>	131 (100.00)
<i>iroN</i>	119 (90.84)
<i>sitC</i>	118 (90.08)
<i>sifA</i>	92 (70.22)
<i>sopB</i>	131 (99.24)
<i>lpfC</i>	67 (51.14)

การอภิปรายผลการวิจัย

จากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเกินความจำเป็นและไม่สุ่มรอบคอบในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคเป็นต้นเหตุสำคัญของการเกิดเชื้อดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยา โดยเชื้อดื้อยาดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังมนุษย์ได้โดยผ่านห่วงโซ่อาหารและอาจถ่ายทอดวัฏจักรการดื้อยาไปยังแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ โดยเชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญและมีอัตราการดื้อยาสูงขึ้น สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ในส่วนของเชื้อที่แยกได้จากฟาร์ม ไม่ได้ทำการศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากไก่และสุกรเพราะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในเชื้อเหล่านี้ก่อนหน้านี้และได้รับการตีพิมพ์ไปแล้ว [15] ดังนั้นจึงเลือกศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากโคนม เนื่องจากเป็นปศุสัตว์ที่สำคัญเช่นกัน

การศึกษาที่ผ่านมามักทำการศึกษาในเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากโคนมที่ป่วย ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากโคนมที่สุขภาพแข็งแรงและไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใดๆ ที่สามารถสังเกตได้ โดยสัตวแพทย์ทำการตรวจสอบสุขภาพโคนมก่อนเก็บตัวอย่าง ซึ่งโคนมเหล่านี้จะถูกนำมารีดนมและมีความใกล้ชิดกับห่วงโซ่อาหารมากกว่าโคป่วยซึ่งจะถูกพักการรีดนม ผลการวิจัยพบว่า มีการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* ที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันและแยกได้จากอุจจาระโคนม แสดงให้เห็นถึงโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม น้านม ชากโคและมนุษย์ การที่อัตราการดื้อยาปฏิชีวนะ streptomycin, spectinomycin and sulfamethoxazole สอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา [2, 8, 23] ซึ่งเหตุผลน่าจะมาจากการที่ยาเหล่านี้เป็นยาที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเลี้ยงโคนม แสดงให้เห็นว่า การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* ดื้อยา เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากโคป่วยจากการศึกษาก่อนหน้านี้ [2, 23] พบว่า อัตราการดื้อยาของเชื้อในการการวิจัยครั้งนี้ต่ำกว่ามาก ซึ่งสนับสนุนว่า อัตราการดื้อยาในเชื้อที่แยกได้จากโคป่วยมีแนวโน้มสูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากโคปกติ ซึ่งสาเหตุสำคัญน่าจะมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการติดเชื้อในโคป่วยและความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยากับปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค ถึงแม้ว่าอัตราการดื้อต่อ ampicillin, chloramphenicol, gentamycin และ trimethoprim จะค่อนข้างต่ำ แต่ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ได้ถูกใช้ในการรักษาในวงการสัตวแพทย์ ดังนั้นการติดเชื้อ *Salmonella* ที่ดื้อยาเหล่านี้ก็จะส่งผลให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพได้เช่นกัน

ในการวิจัยครั้งนี้พบ class 1 integrons เชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากโคนมเพียง 2 isolates เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า non-Typhimurium serovars ที่แยกได้จากโคนมที่แข็งแรงมีอัตราการพบ class 1 integrons ที่ต่ำมากเช่นกัน [8] โดย class 1 integrons ที่พบใน *S. Derby* ได้เคลื่อน (integrate) เข้าไปอยู่ในโครโมโซม ในรูปของ SGI1-A ซึ่งจะส่งผลให้ไม่สูญเสียการดื้อยาแม้ว่าจะอยู่ในที่ไม่มียาปฏิชีวนะ (selection pressure) ก็ตาม ซึ่งยีน *aadA2* เป็นยีนเพียงชนิดเดียวที่พบบน class 1 integrons ทั้ง 2 โดยเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 2 isolates ที่มี class 1 integrons ดื้อยา streptomycin ด้วย นอกจากนี้ยีน *strA-strB* เป็นยีนที่พบมากที่สุด ซึ่งสาเหตุน่าจะมาจากการใช้ penicillin G ร่วมกับ dihydrostreptomycin อย่างแพร่หลายในการรักษาโคนม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคเต้านมอักเสบ ข้อมูลเหล่านี้ยืนยันถึงบทบาทของ streptomycin ต่อการคัดเลือกยีนควบคุมการดื้อยา aminoglycoside ในเชื้อ *Salmonella*

จากรายงานก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยพบยีน *aad2* นี้แพร่กระจายในอัตราที่สูงใน class 1 integrons ที่พบใน *Salmonella* ที่แยกได้จากไก่และสุกร [15] ซึ่งให้เห็นถึงการแพร่กระจายและการถ่ายทอดยีนดื้อยาระหว่าง *Salmonella* ที่แยกได้จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคต่างชนิดกัน

เชื้อ *Salmonella* คือยาส่วนหนึ่งไม่มียีนดื้อยาที่เลือกทดสอบในการวิจัยครั้งนี้แสดงว่ายังมีกลไกหรือยีนดื้อยาอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการศึกษา ซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ที่ทำลายยาปฏิชีวนะ การเปลี่ยนเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาและการแสดงออกของกลไก multidrug efflux systems ก็ได้ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า ส่วนมากของเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากโคนมมียีน *invA* โดยไม่ขึ้นกับ serovars ของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ [1, 5] ยีน *invA* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ invasins ที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าไปในผนังลำไส้ของเชื้อ ในทางตรงกันข้ามพบอัตราการปรากฏของยีน *spvC* และ *pefA* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ plasmid ต่ำมาก ซึ่งรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากนกป่วย [13] และ สุนัขป่วย [21] มียีนทั้ง 2 ในอัตราที่สูง ซึ่งพบยีน *spvC* ใน *S. Singapore* และเป็นรายงานการพบยีน *spv* เป็นครั้งแรกใน *Salmonella* serovars นี้ด้วย ซึ่งรายงานก่อนหน้านี้พบว่า มีการเคลื่อนตัวของ virulence plasmid เข้าไปสู่โครโมโซม ได้ โดยในการวิจัยครั้งนี้เชื้อทุกตัวที่มี ยีน *spvC* และ *pefA* มี plasmid ขนาดใหญ่ด้วย อย่างไรก็ตามการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาตำแหน่งของยีน *spvC* และ *pefA* ด้วย

สำหรับเชื้อที่แยกได้สุกรและผู้ป่วยพบว่ามีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะในระดับที่ค่อนข้างสูง ซึ่งพบอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะพร้อมกันสูงถึง 59% แสดงให้เห็นว่า มีการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* เข้าสู่ห่วงโซ่อาหารและมายังผู้บริโภค ในปัจจุบันพบเชื้อ *Salmonella* ที่ดื้อต่อยา ceftriaxone ในอัตราสูงขึ้น ซึ่งสร้างความวิตกกังวลต่อวงการแพทย์เพราะยาปฏิชีวนะชนิดนี้เป็นตัวเลือกสำคัญสำหรับการรักษาอาการติดเชื้อ *Salmonella* อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีเชื้อที่ดื้อต่อยา ceftriaxone ในการวิจัยครั้งนี้

ในการวิจัยครั้งนี้พบว่า class 1 integrons สามารถแพร่กระจายได้โดยไม่จำกัดเฉพาะ serovars การที่พบว่า *dfra12-aadA2* เป็น resistance array ที่พบมากที่สุดนั้นสอดคล้องกับผลงานวิจัยในเชื้อที่แยกได้จากไก่และสุกรในฟาร์ม [15] ซึ่งอาจเนื่องมาจากการใช้ยาในกลุ่ม aminoglycosides และ trimethoprim ในอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่และสุกรในประเทศไทยอย่างแพร่หลาย จากการที่สามารถพบ resistance array แบบเดียวกันในเชื้อต่างชนิด แยกได้จากทั้งเนื้อสัตว์และผู้ป่วยแสดงว่า มีการแลกเปลี่ยนและแพร่กระจายของ class 1 integrons ทั้งแบบภายในและระหว่าง species รวมทั้งการศึกษาที่ผ่านมาพบรายงานการพบ class 1 integrons บน plasmid ที่ถ่ายทอดได้ [18, 27] แสดงว่ามีการถ่ายทอดตามขวาง (horizontal transfer) เกิดขึ้นด้วย ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า class 1 integrons อยู่บน plasmid และสามารถถ่ายทอดไปยัง *E. coli* ได้ สนับสนุนว่ามี horizontal transfer เกิดขึ้นได้จริง

นอกจากนี้ยีนดื้อยาที่พบใน class 1 integrons ไม่สามารถครอบคลุม resistance phenotype ของ *Salmonella* ได้ทั้งหมด แม้แต่เชื้อที่มี class 1 integrons แต่ไม่มี variable regions ซึ่งเรียกว่า empty class 1 integrons ยังดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันแสดงว่า ยังมียีนดื้อยาอื่นๆ ที่ไม่ได้อยู่บน class 1 integrons การดื้อยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับ class 1 integrons เหล่านี้อาจมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์บนโครโมโซมก็ได้

เชื้อที่แยกได้ทุกตัวมียีน *invA* ผลการวิจัยนี้ยืนยันความสำคัญของยีนตัวนี้ต่อความสามารถในการก่อโรคของ *Salmonella* ในขณะที่มียีน *spvC* และ *pefA* ในอัตราที่ต่ำมากซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในเชื้อที่แยกได้จากโคนมและรายงานก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ยังพบ virulence genes อื่นๆในอัตราที่สูง เช่น เชื้อทุกตัวมียีน *spiA*, *msgA*, *tolC*, *sopA* เป็นต้น แสดงว่าเชื้อที่แยกได้จากเนื้อสุกรและผู้ป่วยในครั้งนี้มีแนวโน้มที่จะก่อความรุนแรงของโรคในระดับที่สูงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *TolC* ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ AcrAB-TolC เป็นกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน [10, 20]

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

โดยสรุป โครงการวิจัยครั้งนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ โดยดำเนินการไปตามแผนที่วางไว้และคาดว่าจะเสร็จสิ้นได้ตามกำหนดการ จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า

1. มีการแพร่กระจายของ *Salmonella* ดื้อยาในโคนม เนื้อสุกรและผู้ป่วย
2. มีการแพร่กระจายของ class 1 integrons ใน *Salmonella* ที่แยกได้โคนม เนื้อสุกรและผู้ป่วย
3. Class 1 integrons สามารถถ่ายทอดได้ทั้งในเชื้อชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน
4. มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางของ virulence factors ในเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากโคนม เนื้อสุกรและผู้ป่วยในประเทศไทย
5. เชื้อ *Salmonella* ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันและมี virulence factors การติดเชื้อเหล่านี้จะส่งผลให้อาการรุนแรงมากขึ้นและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ

ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคอย่างจริงจัง รวมถึงการส่งเสริมให้การศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ทราบปัญหาที่แท้จริงของการดื้อยาในเชื้อและสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้อย่างถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปศึกษาวิจัยต่อเนื่องเกี่ยวกับพันธุกรรมการดื้อยาในเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆ ดังนั้นเพื่อให้ได้จึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตและที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. ศึกษาการดื้อยาในระดับโมเลกุลของ *Salmonella* ให้ครบตลอดห่วงโซ่อาหาร สามารถใช้ประกอบการอธิบายเพื่อหาข้อสรุปของการแพร่กระจาย *S. enterica* จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคมาสู่คนในประเทศไทยว่าเกิดขึ้นหรือไม่
2. ศึกษาความสัมพันธ์ด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของ *Salmonella* ที่แยกได้จากสัตว์ อาหาร ที่มาจากสัตว์และคน สามารถใช้ประกอบการอธิบายเพื่อหาข้อสรุปของการแพร่กระจาย *S. enterica* จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคมาสู่คน
3. ศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆ ในแนวลึกต่อไป เพื่อเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีและความรู้ของประเทศ รวมทั้งได้ข้อมูลที่มีคุณค่าและสามารถใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Abouzeed, Y. M., Hariharan, H., Poppe, C., and Kibenge, F. S. 2000. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23:253-266.
2. Blau, D. M., McCluskey, B. J., Ladely, S. R., Dargatz, D. A., Fedorka-Cray, P. J., Ferris, K. E., and Headrick, M. L. 2005. *Salmonella* in dairy operations in the United States: prevalence and antimicrobial drug susceptibility. *J. Food Prot.* 68:696-702.
3. Chu, C., and Chiu, C. H. 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. *Microbes Infect.* 8:1931-1936.
4. Chu, C., Chiu, C. H., Wu, W. Y., Chu, C. H., Liu, T. P., and Ou, J. T. 2001. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2299-2303.
5. Diarrassouba, F., Diarra, M. S., Bach, S., Delaquis, P., Pritchard, J., Topp, E., and Skura, B. J. 2007. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *J. Food Prot.* 70:1316-1327.
6. Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M. R., and Cloeckaert, A. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol. Microbiol.* 55:1911-1924.
7. Doublet, B., Lailier, R., Meunier, D., Brisabois, A., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckaert, A. 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerg. Infect. Dis.* 9:585-591.
8. Edrington, T. S., Schultz, C. L., Bischoff, K. M., Callaway, T. R., Looper, M. L., Genovese, K. J., Jung, Y. S., McReynolds, J. L., Anderson, R. C., and Nisbet, D. J. 2004. Antimicrobial resistance and serotype prevalence of *Salmonella* isolated from dairy cattle in the southwestern United States. *Microb. Drug Resist.* 10:51-56.
9. Fluit, A. C. 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43:1-11.
10. Fralick, J. A. 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:5803-5805.
11. Hall, R. M., and Stokes, H. W. 1993. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90:115-132.
12. Hsu, S. C., Chiu, T. H., Pang, J. C., Hsuan-Yuan, C. H., Chang, G. N., and Tsen, H. Y. 2006. Characterisation of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons among *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis

- strains isolated from humans and swine in Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:383-391.
13. Hudson, C. R., Quist, C., Lee, M. D., Keyes, K., Dodson, S. V., Morales, C., Sanchez, S., White, D. G., and Maurer, J. J. 2000. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* 38:1860-1865.
 14. ISO. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp: ISO6579, 4th ed, vol. Reference number ISO 6579:2002(E).
 15. Khemtong, S., and Chuanchuen, R. 2008. Class 1 Integrins and *Salmonella* Genomic Island 1 among *Salmonella enterica* Isolated from Poultry and Swine. *Microbe. Drug Resist.* 14:65-70.
 16. Levesque, C., Piche, L., Larose, C., and Roy, P. H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185-191.
 17. Lostroh, C. P., and Lee, C. A. 2001. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect.* 3:1281-1291.
 18. Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., and Helmuth, R. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:1025-1033.
 19. MOPH. 2003. Annual epidemiological surveillance report. Ministry of public health Bangkok, Thailand.
 20. Morona, R., and Reeves, P. 1982. The tolC locus of *Escherichia coli* affects the expression of three major outer membrane proteins. *J Bacteriol* 150:1016-1023.
 21. Namimatsu, T., Asai, T., Osumi, T., Imai, Y., and Sato, S. 2005. Prevalence of the virulence plasmid in *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 68:187-188.
 22. NCCLS. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M31-A2. NCCLS, PA, USA.
 23. Ray, K. A., Warnick, L. D., Mitchell, R. M., Kaneene, J. B., Ruegg, P. L., Wells, S. J., Fossler, C. P., Halbert, L. W., and May, K. 2007. Prevalence of antimicrobial resistance among *Salmonella* on midwest and northeast USA dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 79:204-223.
 24. Rychlik, I., Gregorova, D., and Hradecka, H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* 112:1-10.
 25. Tietjen, M., and Fung, D. Y. 1995. Salmonellae and food safety. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:53-83.
 26. van Asten, A. J., and van Dijk, J. E. 2005. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44:251-259.

27. Vo, A. T., van Duijkeren, E., Fluit, A. C., Wannet, W. J., Verbruggen, A. J., Maas, H. M., and Gastra, W. 2006. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28:172-179.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Muller Hinton Agar (MHA) (Difco™, MD, USA)

- Beef Extract Powder	2.0	g
- Acid Digest of Casien	17.5	g
- Starch	1.5	g
- Agar	17.0	g

2. Luria-Bertani Agar (LB) (Difco™, MD, USA)

- Trptone	10.0	g
- Yeast Extract	5.0	g
- Sodium chloride	5.0	g
- Agar	15.0	g

3. COLINSTANT CHROMOGENIC AGAR (Scharlau, Barcelona, Spain)

- Tryptone	10.00	g
- Yeast Extract	3.00	g
- Meat Extract	5.00	g
- Bile Salts	1.50	g
- Di-sodium phosphate	2.70	g
- Sodium phosphate	2.20	g
- Chromogenic mixture	0.40	g
- Agar	13.00	g

ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอื่น ๆ

1. 50X TAE (Tris-Acetate buffer) ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Tris	242.0	g
- Acetic acid	57.1	g
- 0.5M EDTA pH 8.0	100.0	ml

2. 0.5 M EDTA, pH 8.0 ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Disodium ethylene diamine tetraacetate. 2H ₂ O	186.1	g
- Distilled deionized water	800.0	ml
- Adjust pH to 8.0		

3. 1 M Tris HCl, pH 8.0 ใน 1,000 ml ประกอบด้วย

- Tris (ultrapure)	121.1	g
- Distilled deionized water	800.0	ml
- Adjust pH to 8.0 by adding conc. HCL	42.0	ml

4. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

Antibiotic	Solvents	Stock concentration
Ampicillin	Water	100 µg/ml
Chloramphenicol	95% Ethanol	25 µg/ml
Ciprofloxacin	0.1 M NaOH และ dH ₂ O	10 µg/ml
Gentamicin	Water	50 µg/ml
Rifampicin	Methanol	25 µg/ml
Spectinomycin	Water	100 µg/ml
Streptomycin	Water	100 µg/ml
Sulfamethoxazole	0.1 M NaOH และ dH ₂ O	25 µg/ml
Tetracycline	70% Ethanol	100 µg/ml
Trimethoprim	dimethylacetamide	10 µg/m

Outputs ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1.1 **Chuanchuen R**, Ajariyakhajorn K, Koowatananukul C, Wannaprasat W, Khemtong S, Samngamnim S. 2010 Antimicrobial resistance and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from dairy cows. *Foodborne Pathogen and Disease*. 7(1):63-9.

1.2 Wannaprasat, W., Padungtod, P. and **Chuanchuen, R**. Molecular characterization of multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* from pork meat and humans. (Manuscript in preparation)

2. การนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Wannaprasat, W., Padungtod, P and **Chuanchuen, R**. Molecular characterization of class 1, 2 and 3 integrons in *Salmonella* isolates from pork and human in Thailand. The 7th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance. March 18-20, 2009. Bangkok Convention Centre at Centralworld, Bangkok, Thailand.