

การเปรียบเทียบรูปแบบการดื้อยาและแบบแผนดีเอ็นเอของเชื้อ
Salmonella Schwarzengrund ที่คัดแยกได้จากคนและเนื้อไก่ในประเทศไทย

นางสาวจรรุวรรณ พรรณสังข์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

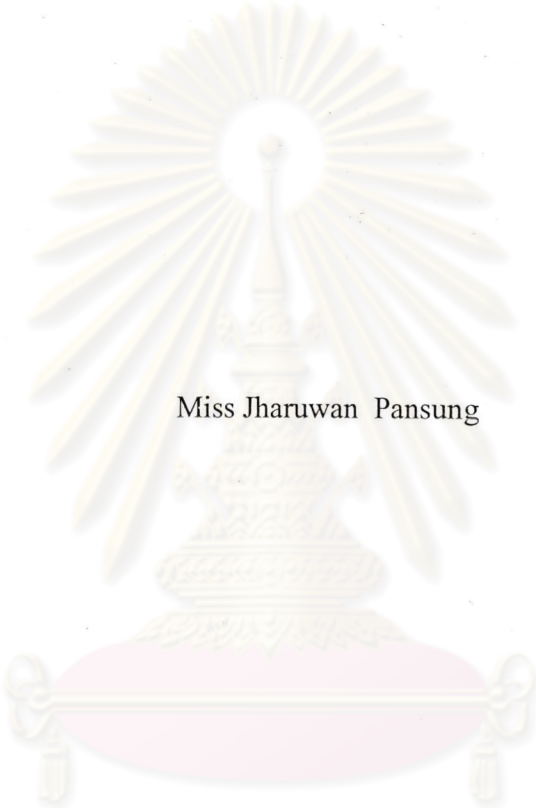
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-59711

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND DNA PATTERNS OF
Salmonella Schwarzengrund ISOLATED FROM HUMAN AND CHICKEN MEAT IN
THAILAND



Miss Jharuwan Pansung

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Microbiology(Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-59711

Thesis Title COMPARISON OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND
DNA PATTERNS OF Salmonella Schwarzengrund ISOLATED
FROM HUMAN AND CHICKEN MEAT IN THAILAND

By Miss Jharuwan Pansung

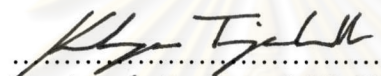
Field of Study Medical Microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Dr. Thongchai Chalermchaikit, Ph.D.

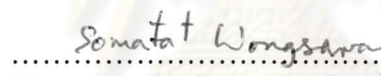
Thesis Co-advisor Tanittha Chatsuwan, Ph.D.

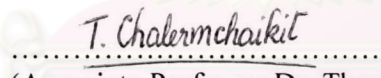
Thesis Co-advisor Mrs. Aroon Bangtrakulnonths

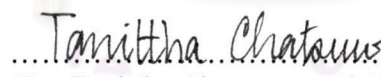
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Master's Degree.



.....Dean of The Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

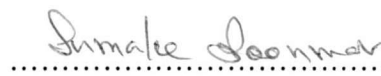
THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Dr. Somatat Wongsawang, Dr. med. vet.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Dr. Thongchai Chalermchaikit, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Dr. Tanittha Chatsuwan, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Instructor Aroon Bangtrakulnonth)


.....Member
(Associate Professor Dr. Sumalee Boonmar, Ph.D.)

จารุวรรณ พรรณสังข์: การเปรียบเทียบรูปแบบการดื้อยาและแบบแผนดีเอ็นเอของเชื้อ *Salmonella* Schwarzengrund ที่คัดแยกได้จากคนและเนื้อไก่ในประเทศไทย (COMPARISON OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND DNA PATTERNS OF *Salmonella* Schwarzengrund ISOLATED FROM HUMAN AND CHICKEN MEAT IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.ธนัญญา ฉัตรสุวรรณ, อ. อรุณ บำงตระกูลนนท์, 102 หน้า. ISBN 974-17-5971-1

เชื้อซัลโมเนลล่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ซึ่งเป็นปัญหาทั้งสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประเทศไทย จากรายงานการเฝ้าระวังเชื้อซัลโมเนลล่าของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขพบว่าในช่วงปี พ.ศ. 2543-2546 เชื้อ *Salmonella* Schwarzengrund ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความชุกเพิ่มขึ้นจาก 0.2% เป็น 2.6% และพบการปนเปื้อนในเนื้อไก่เพิ่มขึ้นจาก 0.3% เป็น 26% เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางระบาดวิทยาของ *S. Schwarzengrund* ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่และแยกได้จากผู้ป่วย การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบความไวรับของเชื้อ *S. Schwarzengrund* จำนวนทั้งหมด 300 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยและเนื้อไก่ในประเทศไทยระหว่าง พ.ศ. 2543-2546 ต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิดคือ: Ampicillin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Gentamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Streptomycin, Sulfamethoxazole, Sulfamethoxazole+Trimethoprim, Tetracycline, cefotaxime, and cefotaxime+clavulanic acid รวมทั้งทำการเปรียบเทียบแบบแผนดีเอ็นเอด้วยวิธี Pulse field gel electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *S. Schwarzengrund* มีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงขึ้นในแต่ละปีรวมทั้งมีรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดคล้ายคลึงกัน สำหรับแบบแผนดีเอ็นเอของเชื้อพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและเนื้อไก่มีความใกล้เคียงกันมากกว่า 70% ดังนั้นเชื้อ *Salmonella* Schwarzengrund ที่แยกได้จากผู้ป่วยน่าจะมีแหล่งแพร่เชื้อมาจากเนื้อไก่ในประเทศไทยความรู้ที่ได้จากงานวิจัยอาจนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* Schwarzengrund.

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต..... จารุวรรณ พรรณสังข์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ธงชัย เฉลิมชัยกิจ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ธนัญญา ฉัตรสุวรรณ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อรุณ บำงตระกูลนนท์

4589072520: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
 KEY WORD: *SALMONELLA* SCHWARZENGRUND/ ANTIMICROBIAL
 DRUG RESISTANCE/ PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)
 JHARUWAN PANSUNG: COMPARISON OF ANTIMICROBIAL
 RESISTANCE AND DNA PATTERNS OF *SALMONELLA*
 SCHWARZENGRUND ISOLATED FROM HUMAN AND CHICKEN MEAT
 IN THAILAND THESIS ADVISOR :ASSOC. PROF. THONGCHAI
 CHALERMCHAIKIT, PH.D., THESIS CO-ADVISORS :TANITTHA
 CHATSUWAN, Ph.D., INSTRUCTOR AROON BANGTRAKULNONT, 102
 pp. ISBN : 974-17-59711

Salmonella is a bacterial agents that can cause disease in human and animals so it is a public health and economic problem in Thailand. The epidemiological report of *Salmonella* Schwarzengrund from WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center, the National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health in the year 1999-2003 shown that the prevalent of *Salmonella* Schwarzengrund isolated from human was changed from 0.2% to 2.6% and the prevalent of *Salmonella* Schwarzengrund isolated from chicken meat was changed from 0.3% to 26%. So 300 isolates of *Salmonella* Schwarzengrund from infection in human and chicken meat were studied epidemiological typing by tested 12 antimicrobial drugs: Ampicillin, Chloramphenical, Ciprofloxacin, Gentamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Streptomycin, Sulfamethoxazole, Sulfamethoxazole+Trimethoprim, Tetracycline, cefotaxime, and cefotaxime+clavulanic acid were utilized in the susceptibility test of *Salmonella* Schwarzengrund and all of these samples were compare DNA profile between *Salmonella* Schwarzengrund from infection in human and chicken meat in Thailand by using Pulse field gel electrophoresis(PFGE). This study concluded that *Salmonella* Schwarzengrund is a multidrug resistance and the range is increased every year. About PFGE patterns suggest that *Salmonella* Schwarzengrund isolated from human and chicken meat have had a high similarity more than 70% so it should be mentioned that the nature source of human *Salmonella* Schwarzengrund is a same clone with *Salmonella* Schwarzengrund isolated from chicken meat. The acknowledge from this research will lead to better understanding about epidemiology and transmission of *Salmonella schwarzengrund* isolated in Thailand.

Inter-Department of Medical Microbiology
 Field of study Medical Microbiology
 Academic year 2004

Student's signature... Jharuwan Pansung.
 Advisor's signature... T. Chalermchakit
 Co-advisor's signature... Tanittha Chatsuwon
 Co-advisor's signature... Aroon Bangtrakulnonth

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincerest gratitude and deepest appreciation to my advisor Associate Professor Dr. Thongchai Chalermchaikit, Center for Antimicrobial Resistance Monitoring in Foodborne Pathogens (in cooperation with WHO), Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for his meaningful supervision, continuous guidance, invaluable advice and encouragement given to me throughout this thesis study. He has never lacked his kindness and support. He is the person who always devotes himself on research, academic work as well as teaching students. I'm very grateful to my advisor. Dr. Tanittha Chatsuwana, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and instructor Aroon Bangtrakulnonth, the WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health for their helpful guidance, constructive criticism and suggestions providing throughout this thesis.

My appreciation is to Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, all staffs of the WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center, and also to all staffs of Center for Antimicrobial Resistance Monitoring in Foodborne Pathogens for providing grants for this research and research facilities and to all people, whom my thesis is concerned with, for their assistance in the supported equipments and the help during my work. I would like to say that I feel very thankful to my friends who give me kind assistance and close friendship throughout the study and also to any persons who have not been mentioned here for their encouragement.

Ultimately, I would like to convey my tremendous gratitude to my parents for their continuous support and care; without them I would not have been able to complete this work.

CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
ABBREVIATIONS.....	x
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. OBJECTIVE.....	4
III. LITERATURE REVIEWS.....	5
IV. MATERIALS AND METHODS.....	36
V. RESULTS.....	47
VI. DISCUSSION.....	72
VII. CONCLUSION.....	76
REFERENCES.....	78
APPENDICES	
APPENDIX I.....	87
APPENDIX II.....	96
APPENDIX III.....	100
BIOGRAPHY.....	102

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	Annual number of reported <i>Salmonella</i> isolates from infections in humans of the 25 most common serovars between 1993 to 2001.....	1
2	Differential characters of <i>Salmonella species</i> and subspecies.....	7
3	Antigenic schema for <i>Salmonella</i> formulas (which contain O antigen and H antigen).....	9
4	Biochemical reaction tests and characteristics of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund.....	37
5	Serological test and result of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund.....	38
6	The concentration of antimicrobial for use in agar dilution.....	40
7	MIC of reference control for MIC determinations ($\mu\text{g/ml}$).....	43
8	MIC standard range and their interpretation for the antimicrobial agent.....	44
9	Restriction enzyme mixture.....	45
10	MIC50, MIC90 and MIC range of susceptibility test of <i>S.Schwarzengrund</i> ...	51
11	MIC50, MIC90 and MIC range of susceptibility test of <i>S.Schwarzengrund</i> ...	52
12	The result of confirmation <i>Salmonella</i> Schwarzengrund Biochemical and Serological test.....	62
13	The result of susceptibility test of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund.....	65

ศูนย์วิทยุโทรพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURES	PAGE
1 Epidemiological changing of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund in varies resorvoir between 1993 to 2001.....	2
2 Rout infection of <i>Salmonella</i>	11
3 Inoculum plate of agar dilution method.....	43
4 Pattern of Antimicrobial resistant of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund	51
5 Patterns of antimicrobial drug resistance of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund.....	52
6 Patterns of multiple-drug resistance of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund.....	53
7 Patterns of antimicrobial resistance of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund.....	54
8 Comparison of pulsed-field gel electrophoresis of whole-cell DNA from <i>Salmonella</i> Schwarzengrund isolated from human and <i>Salmonella</i> Schwarzengrund isolated from chicken meat.....	55
9 Comparison of pulsed-field gel electrophoresis of whole-cell DNA from <i>Salmonella</i> Schwarzengrund isolated from human and <i>Salmonella</i> Schwarzengrund isolated from chicken meat.....	56
10 Representative of polymorphism of chromosomal DNA fingerprints of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund from human and chicken meat.....	57
11 Representative of polymorphism of chromosomal DNA fingerprints of <i>Salmonella</i> enteritidis from human patients and chicken meat generated with <i>Xba</i> I.....	58
12 Dendrogram showing the cluster analysis of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund.....	59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

CFU	Colony forming units
cm	centimeter
°C	Degree celsius
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Distilled water
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>et al.</i>	et alli
g	gram
hr(s)	hour (s)
HCl	hydrochloric acid
L	liter
M	Molar
mM	millimolar
mg	milligram (s)
mL	milliliter (s)
mm	millimeter (s)
min	minute (s)
NA	nutrient agar
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hidroxide
No	number
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
sec	second (s)
TSA	Trypticase soy broth
TSI	Triple sugar iron
LDA	Lysine deaminase
LDC	Lysine decarboxylase
UV	Ultraviolet
V	Volt
WHO	World Health Organization
µg	microgram (s)