การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากผู้ป่วยและเนื้อไก่ในประเทศไทยโดยวิธี Pulsed-Field Gel Electrophoresis

นายธนรัตน์ แก้วสว่าง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4701-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARATIVE STUDY OF DNA PATTERNS OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS ISOLATED FROM HUMAN PATIENTS AND CHICKEN MEAT IN THAILAND BY PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS

Mr. Thanarat Kaewsawang

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 2003

ISBN 974-17-4701-2

Thesis Title	Comparative Study of DNA Patterns of *Salmonella* Enteritidis Isolated from Human Patients and Chicken Meat in Thailand by Pulsed-Field Gel Electrophoresis
By	Mr. Thanarat Kaewsawang
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Thongchai Chalermchaikit, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Dr. Anan Chongthaleong, M.D.
	Instructor Aroon Bangtrakulnonth

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

Suchada Kiranadana ..... Dean of Graduate School

(Professor Dr. Suchada Kiranadana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Somatat Wongsawang ..... Chairman

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

T. Chalermchaikit ..... Thesis Advisor

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

..... Thesis Co-advisor

(Dr. Anan Chongthaleong, M.D.)

Aroon Bangtrakulnonth ..... Thesis Co-advisor

(Instructor Aroon Bangtrakulnonth)

Sumalee Boonmar ..... Member

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

ธนรัตน์ แก้วสว่าง: การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากผู้ป่วยและเนื้อไก่ในประเทศไทยโดยวิธี Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Comparative Study of DNA Patterns of *Salmonella* Enteritidis Isolated from Human Patients and Chicken Meat in Thailand by Pulsed-Field Gel Electrophoresis) อ. ที่ปรึกษา : รศ. น.สพ. ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. นพ. อนันต์ จงเถลิง, อ. อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 1XX หน้า. ISBN 974-17-4701-2

เชื้อ *Salmonella* เป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งในการก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งในช่วงปี พ.ศ.2545 ที่ผ่านมา เชื้อ *Salmonella* Enteritidis เป็นซีโรวาร์ที่ถูกแยกได้จากผู้ป่วย salmonellosis มากที่สุดจากทั่วประเทศ และในเนื้อไก่มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อซีโรวาร์นี้สูงอีกด้วย การศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากเนื้อไก่มาทำการทดสอบ

ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดได้ถูกทำการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีและทดสอบยืนยันซีโรวาร์ด้วย serotyping ซึ่งได้จำนวนตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วย 480 ตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างเชื้อจากเนื้อไก่ 78 ตัวอย่าง ตัวอย่างดังกล่าวทั้งหมดถูกนำมาศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมโดยการตัดโครโมโซมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ซึ่งพบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อนี้ที่แตกต่างกัน 42 patterns และถูกให้เรียกเป็น PFGE รูปแบบ 1 ถึง 42 โดย PFGE รูปแบบ 1 พบจำนวนตัวอย่างมากที่สุดซึ่งพบทั้งในผู้ป่วยและในเนื้อไก่ จาก dendrogram พบว่าสายพันธุ์ทั้งหมดถูกแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และกลุ่ม B ซึ่งมี similarity relation 42.80 % และแต่ละกลุ่มยังถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยอีก

จากการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างเชื้อในสายพันธุ์ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากผู้ป่วยและเนื้อไก่ในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2545 มีความหลากหลายของสายพันธุ์ และจำนวนตัวอย่างทั้งจากผู้ป่วยและเนื้อไก่ส่วนใหญ่พบว่าอยู่ในสายพันธุ์ PFGE รูปแบบที่ 1 โดยถูกจัดอยู่ในกลุ่มเอ (A) แสดงให้เห็นว่าเป็นสายพันธุ์หลักที่เกี่ยวข้องกับการระบาดในประเทศไทย

ภาควิชาสหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4489073020 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: DNA PATTERNS / *SALMONELLA* ENTERITIDIS / PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

THANARAT KAEWSAWANG : COMPARATIVE STUDY OF DNA PATTERNS OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS ISOLATED FROM HUMAN PATIENTS AND CHICKEN MEAT IN THAILAND BY PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. THONGCHAI CHALERMCHAIKIT, PH.D., THESIS CO-ADVISORS : ANAN CHONGTHALEONG, M.D., INSTRUCTOR AROON BANGTRAKULNONTH, 1XX pp. ISBN : 974-17-4701-2.

Salmonella is one of the most important causative agents of foodborne diseases in Thailand. In the year 2000, *Salmonella* serovar Enteritidis was the most common isolated serovar from human salmonellosis as well as from chicken meat samples. Four-hundred and eighty strains isolated from human cases and 78 strains isolated from chicken meat in this study were collection of the WHO *Salmonella* and *Shigella* Center, Department of Medical Science, Ministry of Public Health. All strain samples were reconfirmation by biochemical and serological assays. The comparative studied of DNA patterns were performed by digestion with *Xba* I restriction endonuclease enzyme and separated by pulsed-field gel electrophorsis (PFGE). Fourty-two different patterns, arbitrarity designated PFGE profiles 1 to 42 were obtained. The PFGE profile 1 had the most number of isolate samples in both human patients and chicken meat. Dendrogram showed two major clusters, assigned A and B, which had similarity relation was 42.80 % and also divided into subgroups later.

Salmonella Enteritidis isolated from human cases and chicken meat samples in Thailand in the year 2000 had shown genetic diversities. Strain of PFGE profile 1 was the predominant strain in cluster A and could be related to epidemic in Thailand.

Inter-Department of Medical Microbiology
Field of study Medical Microbiology
Academic year 2003

Student's signature Thanarat Kaewsawang
Advisor's signature T. Chalermchaikit
Co-advisor's signature anan chongthaleong
Co-advisor's signature Aroon Bangtrakulnonth

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep gratitude to 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, my advisor. Dr. Anan Chongthaleong, 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, my co-advisors, for their valuable advices, indispensable help, encouraging guidance, initiating ideas and construction criticisms throughout my study.

Greateful acknowledgement is also extended to Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness suggestion on the technique and the use of pulsed-field gel electrophoresis and also to all staffs of Division of Bacteriology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, all staffs of the WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center and all staffs of Center for Antimicrobial Resistance Monitoring in Foodborne Pathogens for their kindness and help.

Most sincerely, I wish to extend to Dr. Carl J. Mason, and all staffs of Department of Enteric Diseases, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) for their kindess suggestion on the use of BioNumerics program to result interprete.

Finally, I would like to show her deep appreciation to advisor committee, Associate Professor Dr. Somatat Wongsawang, of Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and Associate Professor Dr. Sumalee Boonmar of Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University for their kindness and helpful suggestion for the completeness of this thesis and to my family and my friends for their understanding and support during my study period.

CONTENTS

PAGE

THAI ABSTRACT....iv
ENGLISH ABSTRACT....v
ACKNOWLEDGEMENT....vi
CONTENTS....vii
LIST OF TABLES....viii
LIST OF FIGURES....ix
ABBREVIATIONS....xi
CHAPTER
I. INTRODUCTION....1
II. OBJECTIVE....6
III. LITERATURE REVIEWS....7
IV. MATERIALS AND METHODS....86
V. RESULTS....92
VI. DISCUSSION....100
VII. CONCLUSION....104
REFERENCES....105
APPENDICES
APPENDIX I....122
APPENDIX II....133
APPENDIX III....137
BIOGRAPHY....139

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	Differential biochemical reaction of *Salmonella*, *Citrobacter*, *E. tarda* and *Proteus*	12
2	Differential characters of *Salmonella species* and subspecies	13
3	Arrangement of *Salmonella* grouping must depend on O antigen	14
4	Antigenic schema for *Salmonella* formulas (which contain O antigen and H antigen)	17
5	Presentation of the symbols's scheme and actual number of serovars in each species and subspecies	18
6	Host defenses against *Salmonella*	27
7	Factors increasing susceptibility to salmonellosis	28
8	Characteristic of typing systems	34
9	Effects of genetic events on PFGE fragment patterns	74
10	Criteria for interpreting PFGE patterns	75
11	Biochemical reaction tests and result of *Salmonella* Enteritidis	92
12	Serological test and result of *Salmonella* Enteritidis	93

LIST OF FIGURES

FIGURES		PAGE
1	Schematic drawing of *Salmonella* antigens	9
2	Pathogenesis of salmonellosis	21
3	Scheme of the Pathogenesis of *Salmonella* enterocolitis and diarrhea	23
4	Invasion of intestinal mucosa by *Salmonella*	24
5	Electron photomicrograph demonstrating invasion of guinea pig ileal epithelial cells by *Salmonella* Typhimurium. Arrows point to invading *Salmonella* organisms	25
6	Schematic drawing of the plasmid fingerprinting technique using agarose gel electrophoresis	41
7	Schematic drawing of restriction endonuclease digestion of two unique plasmid, followed by agarose gel electrophoresis	43
8	Schematic drawing of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA using conventional electrophoresis	45
9	Schematic drawing of pulsed-field gel electrophoresis	47
10	Schematic drawing of restriction fragment-length polymorphism analysis using a DNA or RNA probe	52
11	Electrode configuration of commonly used pulsed field gel electrophpresis units	57
12	Increased separation of the 20-50 kb range with field inversion gel electrophoresis (FIGE)	59
13	Rotating gel electrophoresis (RGE) separation *Saccharomyces cercevisiae* chromosomes	61

LIST OF FIGURES (cont.)

FIGURES PAGE

14 Rotating gel electrophoresis (RGE) separation of 3000 to 6000 kb DNA *Schizosaccharomyces pombe* chromosomes.....63

15 Schematic diagram showing the changes in the PFGE pattern of an isolate as a result of various genetic events.....72

16 PFGE patterns of chromosomal DNA restriction fragments of *S. aureus* NCTC 8325 DNA digested with *Sma*I , *E. faecalis* OG1RF DNA digested with *Not*I or *Sma*I , and *E. faecalis* OG1RF DNA digested with *Sma*I.....77

17 PFGE patterns of chromosomal DNA restriction fragments of *E. faecium* GE1 DNA digested with *Apa*I or *Sma*I and *E. coli* MG1655 DNA digested with *Xba*I or *Not*I.....80

18 Representative of chromosomal DNA fingerprints of *Salmonella* Enteritidis generated with *Xba* I, the most common patterns from human patients and chicken meat.....96

19 Representative of polymorphism of chromosomal DNA fingerprints of *Salmonella* Enteritidis from human patients and chicken meat generated with *Xba* I.....97

20 Dendrogram showing the cluster analysis of *Salmonella* Enteritidis.....98

ABBREVIATIONS

bp	base pair
cfu	colony forming units
CHEF-DR®III	Contour-clamped homogenous electric field apparatus
cm	centimeter
°C	degree celsius
DNA	deoxyribonucleic acid
DW	distilled water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	et alli
g	gram
h	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 chroride
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
µg	microgram (s)
µl	microlitre (s)
µm	micrometre (s)
%	percent
$	The United States dollars