จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การตรวจหาและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาในเชื้อซาลโมเนลล่าที่แยกได้จากไก่และสุกรในประเทศไทย

โดย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
พรเพ็ญ พัฒนโสภณ

เมษายน 2551

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การตรวจหาและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาในเชื้อซาลโมเนลล่าที่แยกได้จากไก่และสุกรในประเทศไทย

โดย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
พรเพ็ญ พัฒนโสภณ

เมษายน 2551

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติเงินทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2548 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านอณูชีววิทยา ผศ.น.สพ.ดร. ภาวิน ผดุงทศ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการแยกเชื้อและการวิเคราะห์ทางสถิติ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การตรวจหาและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาในเชื้อซาลโมเนลล่าที่แยกได้จากไก่และสุกรในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ เมษายน 2549

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาการดื้อยาในเชื้อซาลโมเนลลา เอนเทอริกา ที่แยกได้จากไก่และสุกรในประเทศไทย โดยศึกษาการดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ class 1 integrons ในเชื้อจำนวน 211 เชื้อ และที่ไม่เกี่ยวข้องกับ class 1 integrons ในเชื้อจำนวน 184 เชื้อ ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและจัดรูปแบบการดื้อยาในเชื้อทุกตัว สำหรับการดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ class 1 integrons ตรวจหาการปรากฏของ class 1 integrons ศึกษาลักษณะและจำแนกชนิดของยีนดื้อยาที่พบใน class 1 integrons รวมทั้งทดสอบหาตำแหน่งและความสามารถในการถ่ายทอดของเชื้อที่มี class 1 integrons ส่วนการดื้อยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับ class 1 integrons ทำการตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาตามลักษณะการดื้อยาของเชื้อแต่ละตัว ผลการวิจัยพบว่า class 1 integrons และยีนดื้อยามีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายการดื้อยาในซาลโมเนลลาที่แยกได้จากไก่และสุกรในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title	Detection and molecular characterization of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* isolated from broilers and swine in Thailand
Name of Investigators	Rungtip Chuanchuen Pornpen Pathanasophon
Year	April 2006

Abstract

The study was conducted to characterize genetics of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine in Thailand. The class 1 integrons-associated antibiotic resistance was investigated in 211 isolates and non-class 1 integrons antibiotic resistance was examined in 184 isolates. Antimicrobial susceptility test and analysis of antibiotic-resistance pattern were performed in all of the isolates. For class 1 integrons-associated resistance, occurrence, characteristics of gene cassttes and localization of class 1 integrons and their transferability were assessed. For non-class 1 integrons resistance, the presence of resistance genes was determined according to the resistance phenotype of *Salmonella* isolates. The results showed that class 1 integrons and resistance gens play an important role in dessimination of antibiotic resistance among *Salmonella* isolates from swine and poultry in Thailand.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
รายการสัญลักษณ์	vii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการวิจัย	6
ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยก *S. enterica*	6
ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. enterica*	7
ระยะที่ 3 ศึกษาพันธุกรรมของการดื้อยา	9
ผลการวิจัย	14
ความชุกของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยา	14
การปรากฏของ class 1 integrons	17
การศึกษา Class 1 integrons gene cassettes	17
Class 1 integrons with unusual 3' conserved region	21
การถ่ายทอด class 1 integrons	23
การปรากฏของยีนดื้อยาอื่นๆ	23
การอภิปรายผล	25
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	33
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้าที่

ตารางที่ 1 *Samonella enterica* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (*n* = 211) 8

ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย 9

ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการศึกษา class 1 integrons 11

ตารางที่ 4 การตรวจยีนดื้อยาแยกตามการดื้อยาของเชื้อ 12

ตารางที่ 5 Primers ที่ใช้ในการศึกษา none-class 1 integrons resistance genes 13

ตารางที่ 6 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* (*n*= 211) 15

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *intI1*, Inserted gene cassettes และ 3'CS 17

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง integron profiles, รูปแบบการดื้อยา, SGI1 และความสามารถในการถ่ายทอด 19

ตารางที่ 9 genotype และ phenotype ของ *Salmonella* ที่ใช้ในการศึกษา Class 1 integrons with unusual 3' conserved region 21

ตารางที่ 10 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ transconjugants 21

ตารางที่ 11 การปรากฏของยีนดื้อยาแยกตามการดื้อต่อยาของเชื้อ 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้าที่
รูปที่ 1	โครงสร้างของ Class I Integrons	3
รูปที่ 2	อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* ที่แยกได้จากไก่และสุกร	12
รูปที่ 3	PCR amplicons ของ class 1 integrons	18
รูปที่ 4	PCR products resulting from PCR amplifications	22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

A_{540nm}	absorbance at 540 nm
A_{600nm}	absorbance at 600 nm
AMP	ampicillin
bla	β-lactamase encoding gene
bp	base pair(s)
Cb	carbenicillin
°C	degree(s) Celcius
CIP	ciprofloxacin
CHP	chloramphenicol
cm	centimeter(s)
Da	Dalton(s)
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate(s)
E.	*Escherichia*
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EPI	efflux pump inhibitors
ERY	Erythromycin
FRT	Flp recombinase target
GEN	gentamycin
h	hour(s)
kb	kilobase(s) or 1000 bp
kDa	kilodalton(s)
KEM	kanamycin
l	liter(s)
LB	Luria-Bertani medium
LBAp100	Luria-Bertani medium containing 100 μg/ml ampicillin
Mb	megabasepairs
M	molar
mM	millimolar
MDR	multidrug resistance

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
ml	milliliter(s)
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s);
P.	*Pseudomonas*
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
^{r}	resistance/resistant
RT	room temperature
^{s}	sensitive/susceptible
sec	seconds
STR	streptomycin
TET	tetracycline
u	unit(s)
μl	microliter
μM	micromolar
μg	microgram(s)
v/v	volume by volume
WT	wild-type

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เชื้อดื้อยาเป็นโรคอุบัติใหม่ที่สร้างปัญหาทั้งด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจ และได้กลายเป็นประเด็นสำคัญทางการค้าระหว่างประเทศ สาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้มุ่งมาที่การใช้สารต้านจุลชีพในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ทำให้แบคทีเรียพัฒนาการดื้อยาหรือคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียดื้อยาที่ปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อมและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร เชื้อเหล่านี้มักดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน สามารถพัฒนาการดื้อข้ามไปยังยาชนิดอื่นๆ รวมถึงยาที่ใช้รักษาโรค เมื่อมนุษย์ได้รับแบคทีเรียเหล่านี้จากการบริโภคอาหารที่มาจากสัตว์และติดเชื้อ จะส่งผลให้ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

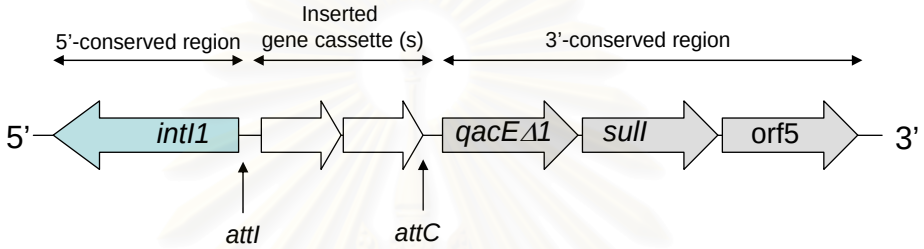
องค์กรการค้าระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้องได้ออกมาตรการเพื่อลดปัญหาเชื้อดื้อยาที่ปนเปื้อนในอาหารที่สำคัญและมีผลโดยตรงต่อประเทศไทย คือ สหภาพยุโรปเพิกถอนการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งหมดเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ โดยที่ Codex และ OIE ได้จัดทำแนวปฏิบัติในการประเมินความเสี่ยงด้านเชื้อดื้อยาสำหรับยาใหม่ที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์ สำหรับประเทศไทย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ประกาศยกเลิกการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคและยาใหม่ที่จะนำมาใช้ในสัตว์เหล่านี้จะต้องผ่านการประเมินความเสี่ยงด้านเชื้อดื้อยาจะมีผลบังคับใช้ภายใน 2 ปี ในการประเมินความเสี่ยงเกี่ยวด้านเชื้อดื้อยาควรมีข้อมูลทางพันธุกรรมของการดื้อยาประกอบการประเมินและวางแนวทางในการจัดการความเสี่ยง นอกจากนี้ Codex ได้ออกข้อกำหนดเพื่อลดการดื้อยาต้านจุลชีพ (Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance)(Codex, 2005) ซึ่ง Code ฉบับนี้ให้ความสำคัญต่อการพัฒนาแนวทางปฏิบัติที่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน โดยเน้นการศึกษากลไกและระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของการดื้อยา การถ่ายทอดยีนดื้อยาและการประเมินความเสี่ยงด้านเชื้อดื้อยา ซึ่งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในแต่ละประเทศมีหน้าที่ที่จะสนับสนุนให้มีการศึกษาเหล่านี้เกิดขึ้น ในประเทศที่พัฒนาแล้วย่อมได้เปรียบเพราะมีการศึกษาวิจัยการดื้อยาในระดับโมเลกุลอยู่แล้ว ส่วนในประเทศกำลังพัฒนาได้มีการศึกษามากขึ้น เห็นได้จากการตีพิมพ์ข้อมูลพันธุกรรมการดื้อยาที่มีมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น ประเทศเวียดนาม (Vo et al., 2007) ไต้หวัน (Hsu et al., 2006a) เกาหลี (Kwon et al., 2002) เป็นต้น แต่ในประเทศไทยมีการศึกษาการดื้อยาของเชื้อในระดับโมเลกุลน้อยมาก ในขณะที่ประเทศไทยได้มีการใช้สารต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์มานาน เพื่อการรักษาและป้องกันโรค รวมถึงเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต โดยทั่วไปที่มีการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาอยู่แล้ว แต่ที่ผ่านมาการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศเป็นการเก็บข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะ (ดื้อหรือไว) ซึ่งข้อมูลความไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นข้อมูลพื้นฐานไม่เพียงพอที่จะสนับสนุนการวางข้อกำหนดเพื่อลดการดื้อยาต้านจุลชีพหรือการประเมินความเสี่ยงด้านเชื้อดื้อยา การนำข้อมูลของประเทศอื่นๆ มาใช้อย่างเต็มรูปแบบเป็นไปได้ยากและอาจเป็นไปไม่ได้ในบางกรณี เพราะแต่ละประเทศมีการใช้ยาและพันธุกรรมของเชื้อดื้อยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาด้านพันธุกรรมของการดื้อยาของเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยอย่างจริงจัง เพราะจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศทั้งด้านเศรษฐกิจ สาธารณสุขและสังคม

Salmonella enterica เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ Salmonellosis ที่พบได้บ่อยมากในประเทศไทย แหล่งสะสมของเชื้อชนิดนี้คือ ไก่และสุกร ซึ่งเนื้อไก่เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ ทั้งเนื้อไก่และเนื้อสุกรได้รับความนิยมในการบริโภคทั่วไปของประชากรในประเทศ ในปัจจุบันพบว่าอัตราการพบ *Salmonella* ดื้อยามีมากขึ้น โดยมักดื้อยาหลายชนิดและยังสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ โดยกลไกดื้อยาที่สำคัญและเป็นที่สนใจอย่างกว้างขวางในขณะนี้ คือ class 1 integrons (รูปที่ 1) เพราะสามารถมียีนดื้อยาได้มากกว่า 1 ยีนพร้อมกันในรูปของ gene cassettes ซึ่งมียีนดื้อยามากกว่า 100 ยีนที่พบได้บน Integrons(Fluit and Schmitz, 2004) ส่งผลให้ *Salmonella* ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน นอกจากนี้ยังเป็น mobile genetic elements ที่สามารถถ่ายทอด resistance gene cassettes ไปยังแบคทีเรียชนิดเดียวกันและแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ได้ ซึ่งการใช้สารต้านจุลชีพในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายยีนดื้อยาเหล่านี้และการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวสามารถคัดเลือก *Salmonella* ที่มี class I integrons ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดได้ (Fluit and Schmitz, 2004)

ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นการเริ่มต้นการศึกษาการดื้อยาในระดับโมเลกุล โดยเลือกที่จะศึกษาใน *S. enterica* ที่แยกจากไก่ สุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม โดยคณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า ไก่ สุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์มเป็นแหล่งสะสมของ *Salmoenlla* ดื้อยา เป็นผลมาจากการใช้สารต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์ ยีนดื้อยาใน *Salmonella* เหล่านี้มีหลายแบบและสามารถถ่ายทอดได้จึงเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยาและกำหนดวัตถุประสงค์ดังนี้

1. ศึกษารูปแบบการดื้อยา
2. เก็บข้อมูลความชุกของ class I integrons
3. ศึกษายีนดื้อยาใน gene cassettes ของ class I integrons
4. ศึกษายีนดื้อยาอื่นๆ ที่อยู่นอก class I integrons
5. ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons

เมื่อพิจารณาในห่วงโซ่อาหาร ไก่ สุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์มเป็นแหล่งที่มาของเชื้อดื้อยา ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ร่วมกับผลการวิจัยใน *S. enterica* ตลอดห่วงโซ่อาหาร คือ ในเนื้อไก่-สุกรและมนุษย์ การพิสูจน์ว่าเชื้อจากแหล่งทั้ง 3 มีพันธุกรรมการดื้อยาคล้ายคลึงกันจะสนับสนุนว่า ยาต้านจุลชีพเป็น selective pressure ที่สำคัญในการทำให้เชื้อดื้อยาคงอยู่ในห่วงโซ่อาหาร และเป็นเหตุผลสำคัญที่จะต้องควบคุมการใช้ยาในสัตว์อย่างเคร่งครัดและสมเหตุสมผล และเป็นการยกระดับการเก็บข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อดื้อยาในประเทศ นอกจากนี้เทคนิคที่ใช้การวิจัยครั้งนี้จะสามารถใช้ในการศึกษา class I integrons ในแบคทีเรียดื้อยาอื่นๆ ที่มีความสำคัญด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจ เช่น *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Campylobactor* spp. เป็นต้น รวมทั้งสามารถใช้ในการวิจัยอื่นๆ เช่น การพัฒนาการใช้สมุนไพรในการเลี้ยงสัตว์ การพัฒนาเทคนิคการตรวจหายีนดื้อยา รวมถึงการพิสูจน์ยืนยันว่า การเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์เกษตรช่วยลดเชื้อดื้อยาได้จริงหรือไม่ เป็นต้น



รูปที่ 1 โครงสร้างของ Class I Integrons ประกอบด้วยยีน *intI1* ที่ผลิตโปรตีน integrase ทำหน้าที่ในการถ่ายทอดยีนดื้อยาใน gene cassette ตามด้วย variable regions ประกอบด้วย gene cassette ที่มีขนาดต่างกันขึ้นกับชนิดและจำนวนของยีนดื้อยาที่บรรจุอยู่ โดยส่วนท้ายเป็น 3' conserved region ประกอบด้วย *qacE*Δ1 ซึ่งเป็นยีน multidrug efflux ที่ทำให้ดื้อต่อ quaternary ammonium compound และยาปฏิชีวนะได้ ตามด้วยยีน *sul*I ที่ทำให้ดื้อต่อยา sulphonamides และสุดท้ายเป็น orf5 ซึ่งแบคทีเรียต่างชนิดกันมีโครงสร้างของ class I integrons ที่เหมือนกัน คำย่อ : *intI1*, integrase 1; *attI*, recombination site ด้าน 5' conserved region; *attc*, recombination site บน gene cassettes; *qac*Δ*E1*, ยีนควบคุมการดื้อ quaternary ammonium compounds; *sul1*, ยีนควบคุมการดื้อยากลุ่ม sulphonamide; orf 5, open reading frame 5 (Fluit and Schmitz, 2004; Recchia and Hall, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันพบว่ามี integrons จำนวนมากถึง 9 รูปแบบ ตามลักษณะทางพันธุกรรมของยีน integrase โดยที่พบมากที่สุดคือ Class I integrons ซึ่งเป็น mobile genetic elements ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการดื้อยาในแบคทีเรียแกรมลบ ที่รวมถึง *Salmonella* ในปัจจุบัน Class I integrons ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากที่สุด

จากการศึกษา class I integrons ใน *Salmonella* ที่ผ่านมา พบการกระจายตัวของ class I integrons ในอัตราต่างๆ กัน ที่ประเทศอังกฤษและเวลล์ มีรายงานว่าพบ class I integrons ใน *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ ที่แยกได้จากสัตว์ 34% ต่อมา Linstedt และคณะ (2003) พบ class 1 inetgrons ใน *S.* Typhimurium ที่แยกได้จากผู้ป่วยมากถึง 94% และ *S.* Enteritidis ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยเช่นกันในอัตรา 22% เชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ ที่แยกได้ทั้งจากผู้ป่วย สัตว์และสิ่งแวดล้อมในประเทศอังกฤษมี class 1 inetgrons ในอัตรา 26.7% ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เชื้อที่แยกได้จากคนที่มีสุขภาพดี มี class 1 inetgrons ในอัตรา 17.4% เมื่อเร็วๆ นี้ Nogrady และคณะ (2005) รายงานว่า เชื้อที่แยกได้ในประเทศฮังการีมี class 1 inetgrons มากถึง 33%

Class I integrons พบได้ใน *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ ที่แยกได้ทั้งจากคนและสัตว์ โดย Guerra และคณะ (2000) รายงานว่า *Salmonella* ที่แยกได้จากคนดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันและมี class I integrons ที่มี gene cassettes แตกต่างกันถึง 7 แบบ โดยมียีนดื้อยา 1-2 ยีนบน gene cassettes(Guerra et al., 2000) ต่อมา Randall และคณะ (2004) พบว่า *Salmonella enterica* ที่แยกได้จากคน สุกร สัตว์ปีกและโคมี class I integrons โดยเชื้อเหล่านี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้มากถึง 7 ชนิด (Randall et al., 2004) ซึ่ง Nogrady และคณะ (2005) รายงานว่า non-typhoidal *Salmonella* ที่แยกได้จากคนมี class I integrons ที่มี gene cassettes แตกต่างกันถึง 9 แบบ โดยมียีนดื้อยา 1-2 ยีนบน gene cassettes (Nogrady et al., 2005) ซึ่ง Raino และคณะ (2006) รายงานการพบ ESBL genes บน class I integrons ใน *Salmonella* ที่แยกได้จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่มีสุขภาพดี (Riano et al., 2006) และเร็วๆ นี้ Cabrera และคณะ (2006) พบว่า *Salmonella* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษที่ติดจากการเดินทาง (traveler's diarrhea) มี class I integrons พร้อม gene cassettes ด้วย (Cabrera et al., 2006) การศึกษาในเชื้อชนิดอื่น Sunde และ Norstrom (2006) ได้ทำการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาของ *Escherichia coli* พบว่า เชื้อเหล่านี้มียีนดื้อยาหลายแบบและสามารถถ่ายทอดได้ (Sunde and Norstrom, 2006) ซึ่งก่อนหน้านี้ Sunde (2005) ทำการศึกษาความชุกของ class I และ II integrons ใน *E. coli* ชุดเดียวกันพบ 12 และ 6 % ตามลำดับ โดยใน gene cassettes ที่หลากหลายและมียีนดื้อยาที่อยู่นอก integrons อีกหลายชนิด ซึ่งรับผิดชอบต่อการดื้อยาในเชื้อเหล่านี้ (Sunde, 2005)

ที่ผ่านมา ยีนดื้อยาที่มีรายงานว่าพบใน class 1 integrons มีหลายชนิด ที่มีรายงานว่าพบได้บ่อยได้แก่ ยีน *dfr* ควบคุมการดื้อยา trimethoprim ยีน *bla* ควบคุมการดื้อยา ß-lactams และยีน *aad* ควบคุมการดื้อยา aminoglycoside ซึ่งจากรายงานในหลายประเทศรวมทั้งประเทศในกลุ่มยุโรป อาทิเช่น เนเธอร์แลนด์ (Vo et al., 2006), สเปน (Guerra et al., 2000), โปรตุเกส (Antunes et al., 2004) และนอร์เวย์ (Lindstedt et al., 2003) พบยีน *aadA1*, *aadA2*, *dfrA1*, bla_{OXA}และ bla_{PSE-1} ได้บ่อยมาก ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกา พบยีน *aadA1*

และ bla_{PSE-1} ได้บ่อยที่สุด (Chen et al., 2004) ในประเทศแถบเอเชีย มีรายงานการพบยีน *dfr17* ในเชื้อที่แยกได้จากประเทศเนปาล (Tamang et al., 2007) *ยีน dfrA12* และ *aadA1* ในเชื้อที่แยกได้จากประเทศเวียดนาม Vietnam (Ploy et al., 2003) ยีน bla_{OXA}(Lee et al., 2003), bla_{TEM} (Lee et al., 2004) และ *dfrA12-aadA2* (Kim et al., 2007) ในเชื้อที่แยกได้จากประเทศเกาหลีและยีน *dfrA12-aadA2* ในเชื้อที่แยกได้จากประเทศไต้หวัน (Hsu et al., 2006b)

นอกจากนี้ gene cassettes บน Class I integrons สามารถถ่ายทอดได้ในแบคทีเรียชนิดเดียวกันและต่างชนิดซึ่งจากการศึกษาของ Hsu และคณะ (2006) พบว่า *Salmonella* ดื้อยาที่แยกได้จากคนและสุกรมีชุดของยีนดื้อยาเหมือนกัน แต่เป็นเชื้อสายพันธุ์ต่างกัน แสดงว่ามีการถ่ายทอดยีนดื้อยาตามขวาง (Horizontal transfer) ระหว่างเชื้อ (Hsu et al., 2006a) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ McCuddin และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อ *Salmonella* สามารถรับยีนดื้อยาจากเชื้ออื่นเมื่อเจริญร่วมกันในร่างกายได้ (McCuddin et al., 2006) แต่ในปีเดียวกัน Butaye และคณะ (2006) รายงานว่าการแพร่กระจายของ *Salmonella* ที่ดื้อยาเป็นผลของการกระจายของตัวเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาเองมากกว่าการถ่ายทอดยีนดื้อยาระหว่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างและแยก *S. enterica*

ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษาใน *Salmonella enterica* จำนวน 211 isolates ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างจากไก่และสิ่งแวดล้อมในฟาร์มจำนวน 103 isolates จากสุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์มจำนวน 108 isolates โดยเชื้อจำนวน 171 isolates เป็นเชื้อในช่วงปี พ.ศ. 2546 – 2548 และอยู่ใน stock collection ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพมหานคร เชื้อในส่วนนี้แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บในจังหวัดอ่างทอง ชัยนาท สิงห์บุรี ชลบุรี ลพบุรี ปทุมธานีและสุพรรณบุรี ส่วนเชื้ออีกจำนวน 40 isolates เป็นเชื้อที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการโดยความร่วมมือกับภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างไก่ สุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์มในจังหวัดเชียงใหม่ในช่วงปี พ.ศ. 2548 – 2549 เชื้อทั้งหมดได้จากสัตว์ที่มีสุขภาพดีและเก็บเชื้อ 1 โคโลนีต่อ serovars ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยวิธีที่ใช้ในการแยกเชื้อมีดังนี้

แยก *S. enterica* จากตัวอย่างที่ส่งไปยังการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ได้แก่ swab อุจจาระ น้ำ อาหาร โดยเป็นตัวอย่างจากไก่และสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม สุกรและสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม สำหรับการแยก *S. enterica* ทำตามวิธีมาตรฐาน ISO6579 โดยทำการ 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, Hamshire, 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-18 24 ชม. แยกเชื้อที่มีการเคลื่อนที่บน BGA และคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย Urease test จากนั้นทำการทดสอบในอาหารทดสอบ TSI และ MIL ทำ serotyping และจำแนก serovars ด้วยวิธี Slide – Agglutination test ตามวิธีของ Kauffmann-White Scheme, Pasture Institute โดยใช้ specific antiserum จากบริษัท S&A REAGENTS LAB. LTD., PART. (กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย) ในการเก็บรักษา *Salmonella* นำโคโลนีบริสุทธิ์มาผสมกับ 10% skim milk แบ่งใส่หลอดแก้วหลอดละ 100 μl แช่ในไนโตรเจนเหลวจนส่วนผสมกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นนำไปทำเยือกแข็งด้วยเครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) (VIRIS™, SPIndustries Company, USA) โดยลดอุณหภูมิลงจนถึง -80°C ความดัน 0 มิลลิทอร์ (mtor.) ซึ่งเป็นสภาพสูญญากาศ ปิดหลอดด้วยเครื่องมือปิดหลอดแก้วด้วยเปลวไฟ

ที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 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 serovar และที่มาของเชื้อที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้แสดงในตารางที่ 1

ระยะที่ 2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. enterica*

ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเชื้อเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) หรือ Microdilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Muller Hinton Broth (MHB) ตามวิธีมาตรฐานของ Clnical Laboratory Standard Intitute (CLSI) ยาปฏิชีวนะที่ทดสอบคือ ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, spectinomycin, streptomycin, sulphonamides, tetracycline และ trimethoprim โดยเจือจางแบบ two-fold เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29212

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 *Samonella enterica* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (*n* = 211)

Salmonella	No. of isolates	
	Poultry	Swine
S.Albany	3	1
S.Altona	0	3
S.Agona	3	0
S.Amsterdam	10	0
S.Anatum	0	9
S.Bovismorbifican	1	1
S.Bsilla	0	13
S.Bareilly	1	0
S.Blockley	1	0
S.Corvallis	4	5
S.Enteritidis	30	1
S.Emek	5	0
S.Eppendorf	1	0
S.Give	2	1
S.Kedougou	1	8
S.Kingston	0	1
S.Kentucky	2	0
S.Lexington	1	0
S.Muenster	1	0
S.Orion	1	2
S.Panama	0	1
S.Paratyphi B2	1	0
S.Poona	2	0
S.Rissen	1	13
S.Stanley	5	20
S.Subspecies I	3	8
S.Schwarzengrund	1	0
S.Senftenberg	2	0
S.Singpore	1	0
S.Thyphimurium	7	13
S.Thomson	1	0
S.Virginia	0	1
S.Virchow	3	1
S.Worthington	1	2
S.Weltevreden	7	4
Total	103	108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

ยาปฏิชีวนะและ ยาฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (μg/ml)	breakpoint* (μg/ml)
1. ampicillin (AMP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32
2. chloramphennicol (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

* ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา

ระยะที่ 3 ศึกษาพันธุกรรมของการดื้อยา

เนื่องจากยีนดื้อยามีหลายชนิดมาก เพื่อให้การวิจัยดำเนินไปอย่างเป็นระบบจึงทำการวิจัยโดยแบ่งยีนดื้อยาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ยีนดื้อยาที่อยู่บน gene cassettes ของ class I integrons และยีนดื้อยาที่ไม่อยู่บน class 1 integrons ดังนี้

3.1 ยีนดื้อยาที่อยู่บน gene cassettes ของ class I integrons

3.1.1 ตรวจการปรากฏของยีน *intI1* ยีน *ins* ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers int1F และ int1R และ conditions ตามที่แสดงในตารางที่ 2 ปฏิกิริยามีปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย 5 μl of total DNA, 10 pmoles of each primer และ 12.5 μl 2.5 X PCR master mix eppendrof® MasterMix (Eppendrof, Hamburg, Germany) ตรวจสอบความจำเพาะของ primers ที่ใช้ด้วยการสกัด PCR products ด้วยชุดทดสอบ QIAQuick gel extraction kit (Qiagen) และส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ Macrogen (Seoul, South Korea)

3.1.2 เฉพาะเชื้อที่มียีน *intI1* ยืนยันด้วยการตรวจหา 3'-conserved regions ด้วย PCR โดยใช้ primers 2 คู่ คือ qacEF กับ sul1R และ qacEΔ1R กับ sul1R

3.1.3 ศึกษาลักษณะของ Unusual 3'-conserved regions ของ class 1 integron เลือกเชื้อจำนวน 7 isolates ได้แก่ SA043, SA045, SA076, SA077, SA161, SA075 และ SA201 (ตารางที่) ที่ไม่มี typical 3'-conserved regions มาทำการศึกษาลักษณะการจัดเรียงตัวของยีนใน 3'-conserved regions โดยเริ่มจากตรวจหาการปรากฏของยีน *sul3, qacH* และ the fused structure *qacH*-IS440- *sul3* จากนั้นตรวจการเรียงตัว

ของยีนใน cluster ตาม gene cassettes ใน class 1 integrons ของแต่ละเชื้อและตามที่อธิบายก่อนหน้านี้โดย Bischoff และคณะ (2005) และ Antunes และคณะ (2007) จากนั้นทดสอบความสามารถในการถ่ายทอด class 1 integrons โดยใช้ *E. coli* MG1655rif^{R} ด้วยวิธี biparental mating ตามที่อธิบายใน 3.1.5 ทดสอบยืนยันการสกัด plasmid ตรวจการปรากฏของ class 1 integrons, *sul3* และ *qacH* ใน transconjugants จากนั้นหาค่า MICs ต่อ streptomycin, chloramphenicol, sulphonamides และ trimethoprim ของ transconjugants ด้วย

3.1.4 ศึกษา resistance gene cassettes ใน variable regions

เฉพาะเชื้อที่มียีน *intI1* นำมาตรวจหาการปรากฏของ resistance genes ใน variable regions ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ 5'CS และ 3'CS ศึกษายีนใน variable regions ด้วยการหาลำดับเบส (DNA sequencing) สกัด PCR products และส่งไปตรวจหาลำดับเบส ตรวจความถูกต้องของลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) สำหรับ PCR products ที่มีขนาดเดียวกันจะศึกษาด้วย Restriction fragments-length polymorphism (RFLP) analysis โดยใช้เอนไซม์ *EcoR*I, *BamH*I, *Xba*I, *Bgl*II, *Nco*I และ *Dpn*I ตรวจสอบ restriction pattern โดยการแยกบน 1.5-2% agarose gel PCR products ที่มีรูปแบบ RFLP patterns เหมือนกันจัดเป็น Resistance genes ชนิดเดียวกัน จากนั้นจัดกลุ่ม class 1 integrons ตามขนาดและจำนวนของ amplicons และชนิดของยีนที่พบ

3.1.5 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยการทดสอบว่า ยีนดื้อยาอยู่บน plasmid หรือไม่ โดยใช้เทคนิค biparental mating ตามวิธีของ Sunde (2006) และ Sorum (2001) โดยตัวรับคือ MG1655rif^{r}2 (MIC ต่อ rifampicin 256 μg/ml) และตัวให้ (donor) คือ MDR *Salmonella* ที่มี class 1 intgerons (มีทั้งยีน *intI1* และ resistance genes ใน variable regions) ดังนี้ เพาะเลี้ยง MG1655rif^{r}2 และ MDR *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 4 มล. ใน shaking incubator ที่ 37 ^{o}C นาน 18-24 ชม. จากนั้นเจือจางด้วย LB ในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงเชื้อต่อใน shaking incubator ที่ 37 ^{o}C จนถึง Mid-log phase (3-4 ชม.) ผสมตัวรับและตัวให้อย่างละ 700 μl ใน eppendrof tube ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนใน LB อุ่นที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C 30-50 μl และไปเปตลงบนแผ่น nitrocellulose filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm และ pore size 0.45 μm ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง นำไปอบเลี้ยงเชื้อที่ 37 ^{o}C นาน 18-24 ชม.จากนั้นนำแผ่น filter พร้อมส่วนผสมเชื้อใส่ลงใน LB 1 มล. ใน eppendrof tube ใหม่ vortex ประมาณ 1 นาที นำแผ่น filter ออก และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 1 นาที Plate เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี rifampicin 32 μg/ml และยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ trimethoprim 10 μg/ml streptomycin 50 μg/ml

ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการศึกษา class 1 integrons

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	References
intI1	Int1F	CCT GCA CGG TTC GAA TG	497	Chuanchuen et al. (2007)
	Int1R	TCG TTT GTT CGC CCA GC	497	Chuanchuen et al. (2007)
variable region	5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	variable	Levesque et al. (1995)
	3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA	variable	Levesque et al. (1995)
qacEΔ1	qacEF	TAA GCC GTA CAC AAA TTG GGA GAT AT	363	Chuanchuen et al. (2007)
	qacEΔ1R	GCC TCC GCA GCG ACT TCC ACG	363	Chuanchuen et al. (2007)
sul1	sul1F	CGG ACG CGA GGC CTG TAT C	591	Chuanchuen et al. (2007)
	sul1R	GGG TGC GGA CGT AGT CAG G	591	Chuanchuen et al. (2007)
qacEΔ1-sul1	qacEF	TAA GCC GTA CAC AAA TTG GGA GAT AT	1,198	Chuanchuen et al. (2007)
	sul1R	GGG TGC GGA CGT AGT CAG G	1,198	Chuanchuen et al. (2007)

หรือ ampicillin 100 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 MG1655rif^r ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin เพียงอย่างเดียวและ rifampin ร่วมกับยาฏิชีวนะที่เหมาะสม

3.2 **ยีนดื้อยาที่ไม่อยู่บน** class 1 integrons

ตรวจการปรากฏของยีนในเชื้อจำนวน 184 isolates ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิด ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น โดยใช้ primers ตามที่แสดงในตารางที่ 3 ในการตรวจจะเลือกชนิดของยีนที่ตรวจตามความดื้อยาของยาในแต่ละเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4 สกัด PCR products ด้วยและส่งไปตรวจหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความจำเพาะของ primers ที่ใช้

ตารางที่ 4 การตรวจยีนดื้อยาแยกตามการดื้อยาของเชื้อ

Antibiotic	No. of isolates	Gene
Ampicillin	103	bla_{PSE}, bla_{TEM}
Chloramphenicol	59	*catA*, *catB*, *cmlA*
Gentamicin	26	*aadB*
Tetracycline	86	*tetA*, *tetB*
Trimethoprim	69	*dfrA1*, *dfrA10*, *dfrA12*
Spectinomycin	103	*aadA1, aadA2*
Streptomycin	127	*aadA1, aadA2, strA, strB*
Sulphonamides	139	*sul1*, *sul2, sul3*

3.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติในการวิจัยครั้งนี้ใช้ STATA Software Version 8 (STATA Corp., College Station, TX, USA) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยากับการดื้อยาด้วย Fisher's exact test เปรียบเทียบค่า MIC กับจำนวนยีนดื้อยาด้วย Kruskal-Wallis test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 Primers ที่ใช้ในการศึกษา none-class 1 integrons resistance genes ในการศึกษาครั้งนี้

Target gene	Primer	Sequence (5′-3′)	Size of amplicons
aadA1	aadA1-F	CTCCGCAGTGGATGGCGG	631
	aadA1-R	GATCTGCGCGCGAGGCCA	
aadA2	aadA2-F	CATTGAGCGCCATCTGGAAT	500
	aadA2-R	ACATTTCGCTCATCGCCGGC	
aadB	aadB-F	CTAGCTGCGGCAGATGAGC	300
	aadB-R	CTCAGCCGCCTCTGGGCA	
bla_{PSE-1}	bla_{PSE1}-F	GCAAGTAGGGCAGGCAATCA	422
	bla_{PSE1}-R	GAGCTAGATAGATGCTCACAA	
bla_{TEM}	bla_{TEM}-F	ATCAGTTGGGTGCACGAGTG	608
	bla_{TEM}-R	ACGCTCACCGGCTCCAGA	
catA	catA-F	CCAGACCGTTCAGCTGGATA	462
	catA-R	CATCAGCACCTTGTCGCCT	
catB	catB-F	CGGATTCAGCCTGACCACC	454
	catB-R	ATACGCGGTCACCTTCCTG	
cmlA	cmlA-F	TGGACCGCTATCGGACCG	642
	cmlA-B	CGCAAGACACTTGGGCTGC	
dfrA1	dfrA1-F	CAATGGCTGTTGGTTGGAC	254
	dfrA1-R	CCGGCTCGATGTCTATTGT	
dfrA10	dfrA10-F	TCAAGGCAAATTACCTTGGC	432
	dfrA10-R	ATCTATTGGATCACCTACCC	
dfrA12	dfrA12-F	TTCGCAGACTCACTGAGGG	330
	dfrA12-R	CGGTTGAGACAAGCTCGAAT	
strA	strA-F	TGGCAGGAGGAACAGGAGG	405
	strA-R	AGGTCGATCAGACCCGTGC	
strB	strB-F	GCGGACACCTTTTCCAGCCT	621
	strB-R	TCCGCCATCTGTGCAATGCG	
sul1	sul1-F	CGGACGCGAGGCCTGTATC	600
	sul1-R	GGGTGCGGACGTAGTCAGC	
sul2	sul2-F	GCGCAGGCGCGTAAGCTGAT	514
	sul2-R	CGAAGCGCAGCCGCAATTC	
sul3	sul3-F	GGGAGCCGCTTCCAGTAAT	500
	sul3-R	TCCGTGACACTGCAATCATTA	
tetA	tetA-F	GCTGTCGGATCGTTTCGG	658
	tetA-R	CATTCCGAGCATGAGTGCC	
tetB	tetB-F	CTGTCGCGGCATCGGTCAT	615

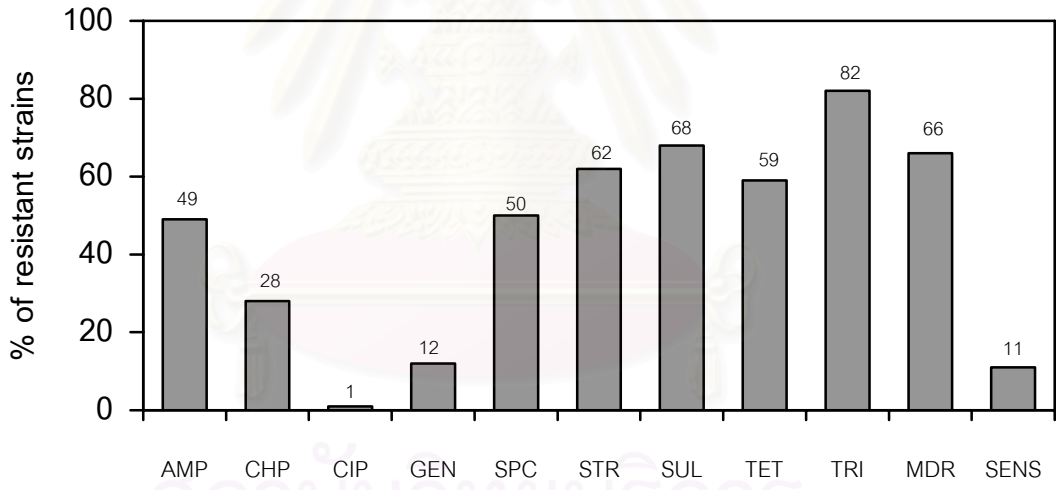
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	tetB-R	CAGGTAAAGCGATCCCACC	
qacH	qacHF	CTCGCACTCAAGTCCATCC	143
	qacHR	CTAACGATAAGTCCCATGCC	

ผลการวิจัย

ความชุกของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยา

จาก *Salmonella* ทั้งหมด 211 isolates พบว่ามีเชื้อดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิดจำนวน 188 isolates (88%) โดยเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันจำนวน 140 isolates (66%) การดื้อยาไม่มีความจำเพาะต่อ serovars โดยอัตราการดื้อยาชนิดต่างๆ แสดงในรูปที่ 2 ในการวิจัยครั้งนี้ *Salmonellla* มีรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 64 รูปแบบ โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI (12, 5.7%) และ AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET phenotype (12, 5.7%) รูปแบบการดื้อยาแสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 2 อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* ที่แยกได้จากไก่และสุกร (*n* = 211)

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

ตารางที่ 6 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* (*n*= 211)

Antibiotic resistance	No. of isolates (%)
AMP	1 (0.5)
SPC	3 (1.4)
STR	4 (1.9)
SUL	9 (4.2)
TET	6 (2.8)
TRI	1 (0.5)
AMP, TET	1 (0.5)
AMP, STR	2 (1.0)
AMP, SUL	3 (1.4)
SPC, SUL	2 (1.0)
SPC, TET	2 (1.0)
SPC, TRI	1 (0.5)
STR, SUL	4 (1.9)
STR, TET	5 (2.4)
SUL, TET	1 (0.5)
TET, TRI	1 (0.5)
AMP, CIP, STR	2 (1.0)
AMP, CHP, TET	1 (0.5)
AMP, TET, SUL	1 (0.5)
AMP, SPC, SUL	5 (2.4)
CHP, SUL, TRI	1 (0.5)
SPC, STR, SUL	8 (3.8)
SPC, STR, TET	5 (2.4)
SPC, SUL, TET	1 (0.5)
STR, SUL, TET	5 (2.4)
SUL, TET, TRI	5 (2.4)
AMP, TET, STR	2 (1.0)
AMP, STR, SUL	3 (1.4)
AMP, SUL, TRI	1 (0.5)
AMP, CIP, SPC, STR	1 (0.5)
AMP, STR, SUL, TET	5 (2.4)
AMP, STR, SUL, TRI	1 (0.5)
AMP, SPC, SUL, TET	2 (1.0)
AMP, SPC, STR, SUL	2 (1.0)
AMP, SUL, TET, TRI	1 (0.5)
CHP, SUL, TET, TRI	2 (1.0)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHP, SPC, STR, SUL	2 (1.0)
CHP, STR, SUL, TRI	1 (0.5)
SPC, STR, SUL, TRI	4 (1.9)
SPC, STR, TET, TRI	1 (0.5)
SPC, STR, SUL, TET	3 (1.4)
STR, SUL, TET, TRI	1 (0.5)
AMP, SPC, STR, SUL, TET	4 (1.9)
CHP, GEN, SPC, SUL, TET	1 (0.5)
AMP, CHP, SUL, TET, TRI	1 (0.5)
AMP, SPC, STR, SUL, TRI	1 (0.5)
AMP, CHP, SPC, STR, TET	1 (0.5)
AMP, STR, SUL TET, TRI	1 (0.5)
AMP, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.5)
SPC, STR, SUL, TET, TRI	3 (1.4)
CHP, SPC, STR, SUL, TRI	1 (0.5)
AMP, CHP, SPC, STR, SUL, TET	12 (5.7)
AMP, CHP, STR, SUL, TET, TRI	4 (1.9)
AMP, SPC, STR, SUL, TET, TRI	6 (2.8)
AMP, CHP, GEN, SPC, SUL, TET	1 (0.5)
AMP, CHP, GEN, SUL, TET, TRI	1 (0.5)
AMP, CHP, SPC, STR, TET, TRI	2 (1.0)
AMP, GEN, STR, SUL, TET, TRI	3 (1.4)
AMP, GEN, SPC, SUL, TET, TRI	3 (1.4)
CHP, SPC, STR, SUL, TET, TRI	1 (0.5)
AMP, CHP, GEN, STR, SUL, TET	1 (0.5)
AMP, CHP, GEN, SPC, STR, SUL, TET	6 (2.8)
AMP, CHP, SPC, STR, SUL, TET, TRI	11 (5.2)
AMP, GEN, SPC, STR, SUL, TET, TRI	2 (1.0)
AMP, CHP, GEN, SPC, STR, TET, TRI	1 (0.5)
AMP, CHP, GEN, STR, SUL, TET, TRI	1 (0.5)
AMP, CHP, GEN, SPC, STR, SUL, TET, TRI	6 (2.8)

คำย่อ : AMP, ampicillin; CHP, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamycin; SPC, spectinomyicn ; STR, streptromycin; SUL, sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TRI, trimethoprim

การปรากฏของ class 1 integrons

พบยีน *intI1* ในเชื้อจำนวน 54 isolates(26%) โดยความสัมพันธ์ระหว่างยีน *intI1*, Inserted gene cassettes และ 3'CS แสดงในตารางที่ 4 ซึ่งจากเชื้อที่ยีน *intI1* พบว่าเชื้อจำนวน 33 isolates (16%) มี variable regions ขนาด 0.7-2.3 kb เชื้อจำนวน 10 isolates (5%) มี class 1 integrons แต่ไม่มี variable regions เชื้อจำนวน 11 isolates (5%) มียีน *intI1* แต่ไม่มีทั้ง gene cassettes และ 3'CS ซึ่งมีเชื้อจำนวน 6 isolates (3%) ที่มี 2 class 1 integrons เชื้อทั้งหมดที่มี class 1 integrons ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน

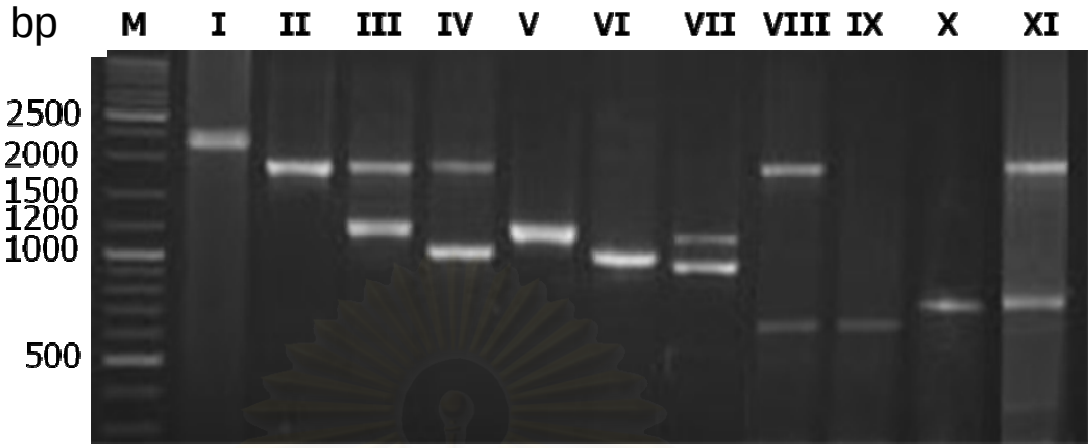
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *intI1*, Inserted gene cassettes และ 3'CS

Group	No. of isolates (%)	*intI1*	Inserted gene cassettes	3'-CS
A	33 (16.0)	+	+	+
B	5 (2.4)	+	+	-
C	10 (4.7)	+	-	+
D	11 (5.2)	+	-	-
Total	54 (25.7)			

การศึกษา Class 1 integrons gene cassettes

ในการวิจัยครั้งนี้ แบ่งกลุ่มเชื้อที่มี class 1 integrons ตามจำนวนและขนาดของ variable regions ที่ได้จากการทำ PCR ได้ทั้งหมด 11 integron profiles (IP-I ถึง IP-XI) ดังแสดงในรูปที่ 3 ขนาดและจำนวนของ amplicons รวมทั้ง genes ที่พบใน variable regions ของแต่ละ integron profiles แสดงในตารางที่ 5 โดยความสัมพันธ์ระหว่าง serovars และ integron profiles แสดงในตารางที่ 6

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาที่พบได้แก่ bla_{PSE-1} ควบคุมการดื้อยากลุ่ม β-lactams, *aadA2* และ *aadA4* ควบคุมการดื้อยา streptomycin และ spectomycin, *dfrA1* และ *dfrA12* ควบคุมการดื้อยา trimethoprim, *sat* ควบคุมการดื้อยา streptothricin, นอกจากนี้ยังพบ *silB* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน SilB เป็น membrane fusion protein ของระบบ *silABC*, *codB* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ cytosine permease และ open reading frames ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ยีนที่พบมากที่สุดเป็นยีนที่ควบคุมการดื้อยา trimethoprim และ aminoglycosides ซึ่ง the gene cassette array ที่พบมากที่สุดคือ *dfrA12-aadA2* (17/33, 51.5%).



รูปที่ 3 PCR amplicons ของ class 1 integrons ที่พบใน *Salmonella* โดย amplicons มีขนาด 0.7 to 2.3 Kb แบ่งได้เป็น 11 integron profiles (IPs) IP-I, II, V, VI, VIII IX และ X มี 1 integron ส่วน IP-III, IV, VII และ XI มี 2 integrons M; molecular weight marker

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง integron profiles, รูปแบบการดื้อยา, SGI1 และความสามารถในการถ่ายทอด

IP[a]	*Size(s) of amplicons (kb)*	*Inserted gene cassettes*	*Antibiotic resistance patterns*	*Serotype (number)*[b]	*SGI1 types*	*Excision*	*Transfer of integrons*
I	2.3	*silB*	AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Give	-	nt[c]	nt
II	1.9	*dfrA12-aadA2*	AMP-CHL-GEN-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Weltevreden	-	nt	+
			AMP-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley (2)	-	nt	+
			AMP-GEN-SPC-SUL-TET-TRI	Schwarzengrund	-	nt	+
			CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	-	nt	-
			CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	-	nt	+
			AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	-	nt	-
			SPC-STR-SUL-TET-TRI	Typhimurium	-	nt	+
			AMP-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Rissen (2)	-	nt	+
			AMP-SPC-STR-TET-TRI	Rissen	-	nt	-
III	1.2, 1.9	*blaPSE1, dfrA12-aadA2*	AMP-GEN-SPC-SUL-TET-TRI	Kentucky	-	nt	+[d]
IV	1.0, 1.9	*aadA2, dfrA12-aadA2*	AMP-GEN-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Anatum	-	nt	+[d]
V	1.2	*dfrA1-orfC*	AMP-CHL-STR-SUL-TET-TRI	Albany (3)	SGI1-F	-	-
			AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Albany (2)	SGI1-F	-	-
			AMP-CHL-SUL-TRI	Albany	SGI1-F	-	-
			AMP-CHL-GEN-SPC-STR-SUL-TET	Kedougou	SGI1-F	-	-
			SPC-STR-SUL-TRI	Emek	SGI1-F	+	+
VI	1.0	*aadA4a*	AMP-SPC-STR-SUL-TET	Orion	-	nt	-
VII	1.0, 1.2	*aadA2, blaPSE1*	AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Kingston	SGI1-A	-	-
VIII	0.7, 1.9	Incomplete *sat* gene, *dfrA12-aadA2*	CHL- SPC-STR-SUL-TRI	Stanley	-	nt	+[e]
			AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	-	nt	+[e]
IX	0.7	Incomplete *sat* gene	AMP-CHL-GEN-SPC-STR-SUL-TET	Kedougou	-	nt	nt
			AMP-CHL- SPC-STR-SUL-TET	Stanley	-	nt	nt
			CHL -SPC-STR-SUL	Atona	-	nt	nt
			AMP-CHL-SPC-SUL-TET	Kedougou	-	nt	nt
X	0.8	Incomplete *codB* gene	AMP-STR-SUL-TET	Weltevreden	-	nt	nt
XI	0.8, 1.9	Incomplete *codB* gene, *dfrA12-aadA2*	AMP-GEN-SPC-SUL-TET-TRI	Eppendorf	-	nt	+[e]
			AMP-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Weltevreden	-	nt	-

[a] nt หมายถึง not tested

[b] เฉพาะ class 1 integrons ที่มี *dfrA12-aadA2* gene arrays เท่านั้นที่ถ่ายทอด

[c] ทดสอบเฉพาะการถ่ายทอดการดื้อต่อยา trimethoprim และ streptomycin

[d] + หมายถึง ถ่ายทอดได้ และ - หมายถึง ถ่ายทอดไม่ได้

คำย่อ : AMP, ampicillin; CHP, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamycin; SPC, spectinomyicn ; STR, streptromycin; SUL, sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TRI, trimethoprim

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Class 1 integrons with unusual 3' conserved region

ผลการวิจัยพบว่า เชื้อทั้ง 7 isolates มียีน *sul3*, *qacH* และ *qacH*-IS*440-sul3* โดยมี genetic organization ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งการปรากฏของยีนใน cluster สอดคล้องกับ resistance phenotypes ของเชื้อทั้งหมด (ตารางที่ 9) *S.* Kedougou จำนวน 3 isolates มีการจัดเรียงตัวของ gene cassette แบบ 5'CS-*sat-psp-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH*-IS*440-sul3* ส่วน Class 1 integrons ที่มี gene cassette แบบ 5'CS-*drfA12-orf-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH*-IS*440-sul3* พบใน *S. enterica* serotype Stanley 1 isolate และพบ Class 1 integrons ที่มี gene cassette แบบ 5'CS-*aadA2-cmlA1-aadA1-qacH*-IS*440-sul3* ในเชื้อ *S.* Kedougou อีก 3 isolates ที่เหลือ โดยยีนที่พบร่วมกันใน gene cassettes ทั้ง 3 แบบ คือ *aadA1, aadA2, cmlA1*และ *qacH* ควบคุมการดื้อยา streptomycin, chloramphenicol และ quaternary ammonium compounds ตามลำดับ ส่วนยีน *dfrA12* ควบคุมการดื้อยา ยีน *sat* และ *psp* ควบคุมการดื้อยา streptothricin และ putative phosphoserine phosphatase ตามลำดับ โดยเชื้อจำนวน 3 isolates คือ SA076 SA077 SA075 และ SA201 สามารถถ่ายทอด Class 1 integrons และความดื้อยาได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 Genotype และ phenotype ของ *Salmonella* ที่ใช้ในการศึกษา Class 1 integrons with unusual 3' conserved region

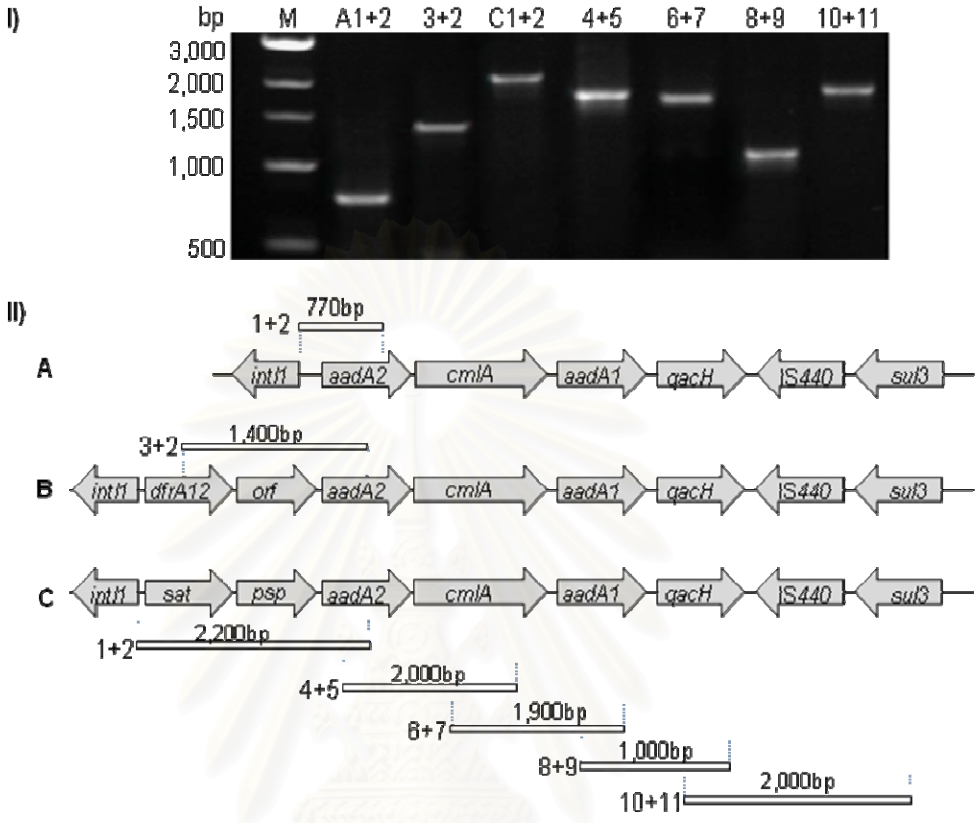
Strain	Serovars	Source	Gene cassette	Resistance phenotype
SA043	Kedougou	Swine	*aadA2-cmlA1-aadA1*	AMP-CHP-GEN-SPC-STR-SUL-TET
SA045	Kedougou	Poultry	*aadA2-cmlA1-aadA1*	AMP-CHP-GEN-SPC-STR-SUL-TET
SA076	Kedougou	Swine	*sat-psp-aadA2-cmlA1-aadA1*	AMP-CHP- GEN-STR-SUL-TET
SA077	Stanley	Swine	*drfA12-orf-aadA2-cmlA1-aadA1*	AMP-CHP-SPC-STR-SUL-TET-TRI
SA161	Kedougou	Swine	*aadA2-cmlA1-aadA1*	CHP-SPC-SUL-STR-TRI
SA075	Kedougou	Poultry	*sat-psp-aadA2-cmlA1-aadA1*	AMP-CHP-GEN-SPC-STR-SUL-TET
SA201	Kedougou	Swine	*sat-psp-aadA2-cmlA1-aadA1*	AMP-CHP-GEN-SPC-STR-SUL-TET

ตารางที่ 10 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ transconjugants

Donor x recipient	MICs[a] (μg/ml)			
	STR	CHP	SUL	TRI
MG1655Rif^R	8	16	1024	0.5
SA076 x MG1655Rif^R	256	64	1024	ND
SA077 x MG1655Rif^R	512	128	1024	>1024
SA075 x MG1655Rif^R	1024	64	1024	ND
SA201 x MG1655Rif^R	>1024	256	1024	ND

[a] Minimum inhibitory concentration value of transconjugant from the corresponding donor (*Salmonella*) and recipient (*E. coli* MG1655Rif^R)

ND Not detected



รูปที่ 4 I) PCR products ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยการผสมผสานระหว่าง primers จำเพาะต่างๆ (ระบุด้วยตัวเลข) II) การจัดเรียงตัวของ class 1 integrons ใน *Salmonella* ที่ได้จากผลการทดสอบด้วย PCR (not to scale) ทิศทางของยีนแสดงด้วยลูกศร เส้นตรงสีขาวและเส้นประแนวตั้งแสดงบริเวณที่ทำ PCR และตัวเลขเหนือแต่ละเส้นแสดงขนาดของ PCR amplicons primers จำเพาะแสดงด้วยตัวเลข 1-7 ได้แก่ 1, 5'CS; 2, aadA2R; 3, dfrA12; 4, aadA2F; 5, cmlAR; 6, cmlAF; 7, aadA1R; 8, aadA1F; 9, qacHR; 10, qacHF; 11, sul3. M, molecular weight marker.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การถ่ายทอด class 1 integrons

Class 1 integrons สามารถถ่ายทอดไปยัง *E. coli* ได้มากถึง 42% (14/33) ซึ่ง Transconjugants ทั้งหมดมี class 1 integrons ที่เหมือนกับ *Salmonella* ตัวให้ เชื้อที่สามารถถ่ายทอด class 1 integrons ไปยัง *E. coli* ได้ (ตารางที่ 10)

การปรากฏของยีนดื้อยาอื่น ๆ

ตรวจพบยีนดื้อยาที่ทดสอบในเชื้อ 78% จากเชื้อทั้งหมด 184 isolates โดยการกระจายตัวของยีนดื้อยาแสดงในตารางที่ 11 เชื้อที่ดื้อยา ampicillin จำนวน 98% bla_{PSE-1}, และ bla_{TEM} โดยพบยีน bla_{PSE-1} มากที่สุด (87%) เชื้อส่วนใหญ่ที่ดื้อยา chloramphenicol (63%) มียีน *cmlA* ในขณะที่เชื้อส่วนใหญ่ที่ดื้อยา gentamycin (88%) มียีน *aadB* ยีน *tetA* เป็นยีนดื้อยาที่พบมากที่สุดในเชื้อที่ดื้อยา tetracycline (86%) เชื้อที่ดื้อยา ยีน *dfrA12* เป็นยีนดื้อยาที่พบมากที่สุดในเชื้อที่ดื้อยา trimethoprim (42%) เชื้อส่วนใหญ่ที่ดื้อยา sulphonamides (76%) มียีน *sul* อย่างน้อย 1 ยีน เชื้อส่วนใหญ่ที่ดื้อยา spectinomycin (68%) และ streptomycin (56%) มียีน *aadA1* เชื้อจำนวน 53% มียีนต่างชนิดกันมากกว่า 1 ยีนแต่ควบคุมการดื้อยาชนิดเดียวกัน โดยเชื้อทั้งหมดที่มียีนดื้อยามากกว่า 1 ยีนเป็นเชื้อดื้อยาแบบ MDR

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏของยีนดื้อยาส่วนใหญ่กับการดื้อยาของเชื้อ (p=0.000) ยกเว้นยีน *catB* และ *dfrA10* ที่การปรากฏของยีนทั้ง 2 ไม่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา chloramphenicol และ trimethoprim ตามลำดับ (p=0.051) นอกจากนี้ การมียีนต่างชนิดกันที่ควบคุมการดื้อยาชนิดเดียวกันมากกว่า 1 ยีนมีความสัมพันธ์กับค่า MIC ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.000) และการมียีนดื้อยาหลายชนิดมีความสัมพันธ์กับการมี MDR phenotype อย่างมีนัยสำคัญด้วย (p=0.000)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การปรากฏของยีนดื้อยาแยกตามการดื้อต่อยาของเชื้อ

Resistance phenotype (n)	Resistance genes	Number (%)
Ampicillin (103)	*bla*$_{PSE1}$	6 (6)
	bla$_{TEM}$	61 (59)
	both	29 (28)
	at least one	96 (93)
Chloramphenicol (59)	*catB*	1 (2)
	cmlA	37 (63)
Gentamicin (26)	*aadB*	23 (88)
Spectinomycin (103)	*aadA1*	47 (46)
	aadA2	2 (2)
	both	23 (22)
	at least one	49 (48)
Streptomycin (127)	*aadA1*	17 (13)
	strA, strB	22 (17)
	strA, strB, aadA1	2 (2)
	aadA1, aadA2	10 (8)
	strA, strB, aadA1	37 (29)
	strA, strB, aadA2	2 (2)
	strA, strB, aadA1, aadA2	5 (4)
	at least one	95 (75)
Sulfamethoxazole (139)	*sul1*	18 (13)
	sul2	17 (12)
	sul3	37 (27)
	all three	9 (6)
	sul1, sul2	2 (1)
	sul1,sul3	14 (10)
	sul2,sul3	8 (6)
	at least one	105 (76)
Tetracycline (86)	*tetA*	60 (70)
	tetB	5 (6)
	both	14 (16)
	at least one	65 (76)
Trimethoprim (69)	*dfrA1*	7 (10)
	dfrA10	2 (3)
	dfrA12	28 (41)
	dfrA10, dfrA12	1 (1)
	at least one	38 (55)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

ในการวิจัยครั้งนี้พบ class 1 integrons ใน *Salmonella* หลาย serovars ที่แยกได้จากไก่และสุกร แสดงให้เห็นว่า class 1 integrons สามารถแพร่กระจายได้โดยไม่จำกัดเฉพาะ serovars การที่พบว่า *dfrA12-aadA2* เป็น resistance array ที่พบมากที่สุดนั้น อาจเนื่องมาจากมีการใช้ยากลุ่ม aminoglycosides และ trimethoprim ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่และสุกรในประเทศไทยอย่างแพร่หลาย ในการวิจัยครั้งนี้พบ *dfrA12-aadA2* array ใน serovars Kentucky, Anatum, Stanley, Eppendorf, Typhimurium, Rissen, Schwarzenrund และ Weltevreden ซึ่งก่อนหน้านี้ มีรายงานการพบ *dfrA12-aadA2* array ใน *S.* Typhimurium, *S.* Schwarzenrund, *S.* Derby และ *S.* Anatum ที่แยกได้ในประเทศเวียดนาม (Vo et al., 2007), *S.* Choleraesuis ที่แยกได้ในประเทศไต้หวัน(Hsu et al., 2006a) และ *S.* Gallinarum ที่แยกได้ในประเทศเกาหลี (Kwon et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบใน *E. coli* ที่แยกได้จากคนในประเทศเกาหลี (Yu et al., 2003) และวัวได้ ในประเทศนอร์เวย์ (Sunde, 2005) และสุกรในประเทศเยอรมันนี (Gebreyes et al., 2004) จากการที่สามารถพบ resistance array แบบเดียวกันในเชื้อต่างชนิด แยกได้จากทั้งสัตว์ต่างชนิดและคนในประเทศต่างๆ แสดงว่า มีการแลกเปลี่ยนและแพร่กระจายของ class 1 integrons ทั้งแบบภายในและระหว่าง species รวมทั้งการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานการพบ class 1 integrons บน plasmid ที่ถ่ายทอดได้ (Miko et al., 2005; Vo et al., 2006) แสดงว่ามีการถ่ายทอดตามขวาง (horizontal transfer) เกิดขึ้นด้วย และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *dfrA12-aadA2* array ทั้งหมดอยู่บน plasmid และสามารถถ่ายทอดไปยัง *E. coli* ได้ สนับสนุนว่ามี horizontal transfer เกิดขึ้นได้จริง ซึ่งจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการถ่ายทอดตามขวางของ class 1 integrons และยีนดื้อยาของ *Salmonella* ที่แยกได้ในประเทศไทย

นอกจาก *dfrA12-aadA2* array แล้วยังสามารถพบ *dfrA1-orfC1* ได้มากเช่นกัน ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศอื่นๆพบว่า *dfrA1* มักร่วมกับ *aadA1* (Miko et al., 2005; Vo et al., 2006) ความแตกต่างนี้อาจมีสาเหตุมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศ อย่างไรก็ตามสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัดและน่าจะมีการศึกษาต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้พบ gene cassettes แบบใหม่ 2 แบบคือ ยีน *codB* และ *silB* ยีน *codB* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ cytosine permease ที่เกี่ยวข้องต่อการเผาผลาญอาหาร เนื่องจากยีนที่พบไม่สมบูรณ์จึงไม่มีประโยชน์ต่อ *Salmonella* ก่อนหน้านี้มีรายงานการพบยีนที่ควบคุมการสร้าง metabolic enzymes และลำดับเบสไม่สมบูรณ์เช่นกัน (Yu et al., 2003) ซึ่งอาจเกิดจาก aberration recombination ในช่วงที่มีการถ่ายทอด class 1 integrons ก็ได้ ส่วนยีน *silB* ควบคุมการสร้างโปรตีน SilB เป็น membrane fusion protein ของระบบ *silABC* ซึ่งเป็นระบบ efflux ใน Resistance Nodulation and Cell division (RND) family ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อ silver compounds เนื่องจาก SilB เป็นเพียงส่วนหนึ่งของระบบ จึงยังไม่ทราบแน่ชัดว่าจะมีประโยชน์ใดๆ ต่อ *Salmonella* หรือไม่

จากการพบ atypical class 1 integrons ซึ่งไม่มี 3'CS แสดงว่า class 1 integrons เหล่านี้ไม่ใช่แบบ *sul1*-type integrons ซึ่งมีรายงานการพบ atypical class 1 integrons มาก่อนเช่นกัน (Antunes et al., 2005) นอกจาก *sul1*-type integrons ยังเคยมีการพบ atypical class 1 integrons ที่ 3'CS มียีน *sul3* และ

ประกอบด้วย *qacH* และ IS*440*-*sul3*-orf1-IS26 ซึ่งพบได้ใน *Salmonella* หลาย serovars(Antunes et al., 2007)[3] สำหรับการวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อที่มี atypical class 1 integrons มียีน *sul3* ด้วย ซึ่งพบว่า ยีน *sul3* เกี่ยวข้องกับ *qacH* และเป็นส่วนหนึ่งของ 3'CS เช่นกัน การพบยีนหลายชนิดบน cluster เดียวกันอาจส่งผลให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันทั้งที่ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดแล้วก็ตาม โดยเชื้อที่แยกได้ยังคงดื้อต่อยา chloramphenicol ทั้งที่ยาชนิดนี้ได้ถูกห้ามใช้ในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคมาเป็นเวลานานแล้ว อาจมีสาเหตุมาจากการที่ยีน *cmlA* ที่ควบคุมการดื้อยา chloramphenicol มักปรากฏอยู่บน class 1 integrons กับยีน *aad* ที่ควบคุมการดื้อยา streptomycin ดังนั้นการใช้ ยา streptomycinจะคัดเลือก class 1 integrons ที่มียีน *aad* พร้อมกับและยีน *cmlA* ทำให้เชื้อยังคงดื้อยา chloramphenicol ทั้งที่ไม่มีการใช้ยาชนิดนี้แล้วก็ตาม[3] ส่วน SA043, SA044 และ SA0161 ที่ไม่สามารถถ่ายทอดการดื้อยา streptomycin และ chloramphenicol แสดงว่า class 1 integrons ในเชื้อเหล่านี้อยู่บนโครโมโซม

ยีนดื้อยาที่พบใน 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 ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของยีนดื้อยาอื่นๆ ที่เคยมีรายงานว่าพบในแบคทีเรีย Enterobactericeae โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Salmonella* โดยมีอัตราการพบยีนเหล่านี้ค่อนข้างสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ สิ่งที่น่าสนใจคือ เชื้อดื้อยาจำนวนสูงถึง 53% มียีนต่างชนิดกันแต่ควบคุมการดื้อยาชนิดเดียวกันมากกว่า 1 ยีน ซึ่งเชื้อเหล่านี้รวมเชื้อที่มี class 1 integrons ด้วย (25/98 isolates) สำหรับเชื้อที่มี class 1 integrons เป็นไปได้ว่ายีนตัวหนึ่งอยู่บน class 1 integrons ในขณะที่ยีนอีกตัวหนึ่งอาจอยู่ plasmid อื่น ส่วนในเชื้อที่ไม่มี class 1 integrons ที่มียีนต่างชนิดกันแต่ควบคุมการดื้อยาชนิดเดียวกันมากกว่า 1 ยีนนั้น จำเป็นที่จะต้องทำการศึกษากลไกอื่นๆที่เป็นไปได้ต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษา plasmid ที่เชื้อเหล่านี้มีอยู่

เป็นที่ทราบดีว่า ยีนดื้อยาหลายชนิดมักรวมกันอยู่หรือต่อกันเป็น cluster บนโครโมโซมหรือ plasmid ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งที่สามารถคัดเลือกยีนที่ควบคุมการดื้อต่อยานั้นก็อาจจะเลือกยีนที่ควบคุมการดื้อต่อยาชนิดอื่นๆไปด้วย (co-selection) ถึงแม้จะไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ นี้ก็ตาม จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบว่า *E. coli* (Bischoff et al., 2005; Chuanhuen et al., 2008) และ *Salmonella* ที่แยกได้จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคดื้อต่อยา chloramphenicol ทั้งที่ได้มีการเพิกถอนการใช้ยานี้ในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคมาเป็นเวลานานเนื่องจากยาปฏิชีวนะชนิดนี้กดการทำงานของไขกระดูก ส่งผลเสียหายต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงและทำให้เกิด aplastic anemia ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้เช่นกัน ซึ่งพบว่า เชื้อที่ดื้อยา chloramphenicol มียีน *cmlA* และยีนนี้ปรากฏอยู่เป็นส่วนหนึ่งของ gene cassettes ใน class 1 integrons ที่มี unusual 3'CS แบบ *qacH-sul3* ซึ่งยีน *cmlA* นี้อยู่บน cluster เดียวกับยีน *aadA1* และ *aadA2* ที่ควบคุมการดื้อยา spectinomycin และ streptomycin ดังนั้นการใช้ยา spectinomycin และ streptomycin สามารถคัดเลือกยีน *aadA1* และ *aadA2* พร้อมกับยีน *cmlA* ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา chloramphenicol ทั้งที่ไม่มีการใช้ยาชนิดนี้อีกแล้ว (Bischoff et al., 2005; Chuanhuen et al., 2008)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การปรากฏของยีนดื้อยาส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาของเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการปรากฏยีนดื้อยาเหล่านี้มักมีการแสดงออก (expression) ด้วย อย่างไรก็ตาม นอกจากการปรากฏของยีนดื้อยาที่ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้แล้ว ยังมียีนและกลไกการดื้อยาอื่นๆที่อาจมีส่วนร่วมในการทำให้เชื้อเหล่านี้ดื้อยา เช่น การกลายพันธุ์ ระบบ multidrug efflux systems ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

โดยสรุป โครงการวิจัยครั้งนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ โดยดำเนินการไปตามแผนการที่วางไว้และคาดว่าจะเสร็จสิ้นได้ตามกำหนดการ จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า

1. มีการแพร่กระจายของ *Salmonella* ดื้อยาทั่วไปในสุกรและไก่ที่เลี้ยงในฟาร์ม
2. มีการแพร่กระจายของ class 1 integrons ใน *Salmonella* ที่แยกได้จากในสุกรและไก่ที่เลี้ยงในฟาร์ม
3. Class 1 integrons สามารถถ่ายทอดได้ทั้งในเชื้อชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน

ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคอย่างจริงจัง รวมถึงการส่งเสริมให้การศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ทราบปัญหาที่แท้จริงของการดื้อยาในเชื้อและสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้อย่างถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปศึกษาวิจัยต่อเนื่องเกี่ยวกับพันธุกรรมการดื้อยาในเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆ ดังนั้นเพื่อให้ได้จึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตและที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. ศึกษาการดื้อยาในระดับโมเลกุลของ *Salmoenlla* ให้ครบตลอดห่วงโซ่อาหาร สามารถใช้ประกอบการอธิบายเพื่อหาข้อสรุปของการแพร่กระจาย *S. enterica* จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคมาสู่คนในประเทศไทยว่าเกิดขึ้นหรือไม่
2. ศึกษาความสัมพันธ์ด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล (fringerprinting) ของ *Salmonella* ที่แยกได้จากสัตว์ อาหารที่มาจากสัตว์และคน สามารถใช้ประกอบการอธิบายเพื่อหาข้อสรุปของการแพร่กระจาย *S. enterica* จากสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคมาสู่คน
3. ศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆ ในแนวลึกต่อไป เพื่อเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีและความรู้ของประเทศร่วมทั้งได้ข้อมูลที่มีคุณค่าและสามารถใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ในการนำไปใช้

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงชนิดและพันธุกรรมการดื้อยาของ *Salmonella* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญ และมีรายงานการศึกษาในประเทศไทยน้อยมาก โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. นำข้อมูลการดื้อยาในระดับโมเลกุลมาใช้วางแผนและประกอบการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยาและเป็นแนวทางในการจัดการความเสี่ยง รวมทั้งประกอบการแยกบัญชียาคนและยาสัตว์ที่อาจมีขึ้นในอนาคต รวมถึงกำหนดนโยบายในการใช้ยาต้านจุลชีพในคนและสัตว์ของประเทศ

2. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยอื่นๆและการพัฒนาทางเลือกอื่นๆในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ ได้แก่

2.1 การพัฒนาการใช้สมุนไพรในการเลี้ยงสัตว์ ซึ่งสมุนไพรที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์จะต้องไม่เป็นสาเหตุของการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการดื้อยาขึ้นอีก การพิสูจน์ยืนยันว่า การเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์เกษตรช่วยลดการดื้อยา การแพร่กระจายและการถ่ายทอดยีนดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพจริงหรือไม่

2.2 การพัฒนาเทคนิคในการทำนายการเกิดเชื้อดื้อยาในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนพิจารณาว่า ยาใหม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในสัตว์หรือไม่

3. เป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลระบาดวิทยาและการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศไทย

4. สามารถใช้ในการเผยแพร่ความรู้ให้กับผู้ที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งนักวิชาการ แพทย์ สัตวแพทย์ เภสัชกร เพื่อให้เห็นความสำคัญของการใช้ยาอย่างถูกต้องและรอบคอบ เป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและเอื้อประโยชน์ต่อการส่งออกและเศรษฐกิจ

5. สามารถแสดงให้ประเทศคู่ค้าเห็นว่า ประเทศไทยมีการศึกษาวิจัยและการเฝ้าระวังปัญหาเชื้อดื้อยาอย่างจริงจัง มีความพร้อมทางด้านวิทยาศาสตร์และงานวิจัยที่สนับสนุนความปลอดภัยจากเชื้อดื้อยาที่ไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว

6. ประกอบการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยาและเป็นแนวทางในการจัดการความเสี่ยง

7. ใช้ประกอบการแยกบัญชียาคนและยาสัตว์ที่อาจมีขึ้นในอนาคต รวมถึงกำหนดนโยบายในการใช้ยาต้านจุลชีพในคนและสัตว์ของประเทศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Antunes, P., Machado, J., Peixe, L., 2007. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 51. 1545-1548.

Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L., 2004. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 54. 429-434.

Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L., 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. Antimicrob. Agents Chemother. 49. 836-839.

Bischoff, K.M., White, D.G., Hume, M.E., Poole, T.L., Nisbet, D.J., 2005. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 243. 285-291.

Cabrera, R., Marco, F., Vila, J., Ruiz, J., Gascon, J., 2006. Class 1 Integrons in *Salmonella* Strains causing traveler's diarrhea. Antimicrob. Agents Chemother. 50. 1612-1613.

Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C.M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P.F., Ayers, S., Meng, J., 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from retail meats. Appl. Environ. Microbiol. 70. 1-7.

Chuanchuen, R., Khemtong, S., Padungtod, P., 2007. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian J Trop Med Public Health 38. 855-562.

Chuanhuen, R., Koowatananukul, C., Khemtong, S., 2008. Characterizartion of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health 39. 419-424.

Codex, 2005. Proposed Draft Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance. ALINORM 05/28/31, Appendix VIII.

Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 10. 272-288.

Gebreyes, W.A., Thakur, S., Davies, P.R., Funk, J.A., Altier, C., 2004. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. J. Antimicrob. Chemother. 53. 997-1003.

Guerra, B., Soto, S., Cal, S., Mendoza, M.C., 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. Antimicrob. Agents Chemother. 44. 2166-2169.

Hsu, S.C., Chiu, T.H., Pang, J.C., Hsuan-Yuan, C.H., Chang, G.N., Tsen, H.Y., 2006a. 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.

Hsu, S.C., Chiu, T.H., Pang, J.C., Hsuan-Yuan, C.H., Chang, G.N., Tsen, H.Y., 2006b. 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.

Kim, T.E., Kwon, H.J., Cho, S.H., Kim, S., Lee, B.K., Yoo, H.S., Park, Y.H., Kim, S.J., 2007. Molecular differentiation of common promoters in Salmonella class 1 integrons. J Microbiol Methods 68. 453-457.

Kwon, H.J., Kim, T.E., Cho, S.H., Seol, J.G., Kim, B.J., Hyun, J.W., Park, K.Y., Kim, S.J., Yoo, H.S., 2002. Distribution and characterization of class 1 integrons in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum biotype Gallinarum. Vet. Microbiol. 89. 303-309.

Lee, K., Yong, D., Yum, J.H., Kim, H.H., Chong, Y., 2003. Diversity of TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. J. Antimicrob. Chemother. 52. 493-496.

Lee, K., Yong, D., Yum, J.H., Lim, Y.S., Kim, H.S., Lee, B.K., Chong, Y., 2004. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhi in Korea. Antimicrob Agents Chemother 48. 4130-4135.

Levesque, C., Piche, L., Larose, C. Roy, P.H., 1995. PCR mapping of integrons reveal several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 39. 185-191.

Lindstedt, B.A., Heir, E., Nygard, I., Kapperud, G., 2003. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. J. Med. Microbiol. 52. 141-149.

McCuddin, Z.P., Carlson, S.A., Rasmussen, M.A., Franklin, S.K., 2006. *Klebsiella* to *Salmonella* gene transfer within rumen protozoa: implications for antibiotic resistance and rumen defaunation. Vet Microbiol 114. 275-284.

Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., 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.

Nogrady, N., Gado, I., Toth, A., Paszti, J., 2005. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. Int. J. Antimicrob. Agents 26. 126-132.

Ploy, M.C., Chainier, D., Tran Thi, N.H., Poilane, I., Cruaud, P., Denis, F., Collignon, A., Lambert, T., 2003. Integron-associated antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar typhi from Asia. Antimicrob. Agents. Chemother. 47. 1427-1429.

Randall, L.P., Cooles, S.W., Osborn, M.K., Piddock, L.J., Woodward, M.J., 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. J. Antimicrob. Chemother. 53. 208-216.

Rechia, G.D., Hall, R.M., 1995. Gene cassette : a new class of mobile elements. Microbiology. 141. 3015-3027.

Riano, I., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Dominguez, L., Torres, C., 2006. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. J. Antimicrob. Chemother. 58. 844-847.

Sorum, H., L'Abee-Lund, T.M., Solberg, A., Wold, A., 2003. Integron-containing IncU R-plasmid pRAS1 and pAr-32 from fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. Antimicrob Agents Chemother 47. 1285-1290.

Sunde, M., 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. J. Antimicrob. Chemother. 56. 1019-1024.

Sunde, M., Norstrom, M., 2006. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. J. Antimicrob. Chemother. 58. 741-747.

Tamang, M.D., Oh, J.Y., Seol, S.Y., Kang, H.Y., Lee, J.C., Lee, Y.C., Cho, D.T., Kim, J., 2007. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi associated with a class 1 integron carrying the *dfrA7* gene cassette in Nepal. Int. J. Antimicrob. Agents. 30. 330-335.

Vo, A.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Gaastra, W., 2007. Antimicrobial resistance, class 1 integrons and a novel variant of Genomic Island 1 in *Salmonella* isolates from Vietnam. Antimicrob. Agents Chemother. In press.

Vo, A.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Wannet, W.J., Verbruggen, A.J., Maas, H.M., Gaastra, 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.

Yu, H.S., Lee, J.C., Kang, H.Y., Ro, D.W., Chung, J.Y., Jeong, Y.S., Tae, S.H., Choi, C.H., Lee, E.Y., Seol, S.Y., Lee, Y.C., Cho, D.T., 2003. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. J. Clin. Microbiol. 41. 5429-5433.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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. $2H_2O$	186.1	g
- Distilled deionized water	800.0	ml
- Adjust pH to 8.0		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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_2O	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_2O	25 µg/ml
Tetracycline	70% Ethanol	100 µg/ml
Trimethoprim	dimethylacetamide	10 µg/m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ผลงานจากการวิจัยครั้งนี้ได้รับการเผยแพร่ ดังนี้

Poster presentations/Proceedings

1. Khemtong, S, P. Pathanasophon and **R. Chuanchuen**. Identification and Characterization of Antimicrobial Resistance Patterns and Class 1 Integron Resistance Gene Cassettes among *Salmonella* Strains Isolated from Poultry and Swine in Thailand. The 107rd ASM General meeting, Toronto, Ontario, Canada. May 21-25, 2007
2. **Chuanchuen, R**, P. Padungtod and P. Pathasophon. Antimicrobial Resistance Genes among *Salmonella enterica* isolates from Poultry and Swine in Thailand. The 13th International Congress on Infectious Diseases. June 19-22, 2008. Kuala Lumpur, Malaysia.

Paper publications

1. Khemtong, S. and **R. Chuanchuen**. 2007. Class 1 Integrons and *Salmonella* Genomic Island 1 among *Salmonella enterica* Isolated from Poultry and Swine. Microb. Drug Resist. 14 (1): 65-70.
2. **Chuanchuen, R.**, Chailai Koowatananukul and Sirintip Khemtong.2008. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 39 (3):419-424.
3. **Chuanchuen, R**. and P. Padungtod. Antibiotic Resistance Genes in *Salmonella enterica* Isolates from Poultry and Swine. Microb. Drug Resist. **(manuscript in preparation)**.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

American Society for Microbiology
Toronto General 107th Meeting
May 21-25, 2007 • Toronto, ON, Canada

Z-086. Identification and Characterization of Antimicrobial Resistance Patterns and Class 1 Integron Resistance Gene Cassettes among *Salmonella* Strains Isolated from Poultry and Swine in Thailand

S. Khemtong[1], P. Pathanasophon[2], **R. Chuanchuen**[1];
[1]Chulalongkorn University, Pathumwan, THAILAND,
[2]National Institute of Health, Pathumwan, THAILAND.

Background: As several mechanisms involving mobile genetic elements contribute to the spread of the antibiotic resistant organisms, class 1 integrons are most frequently found among multiresistant *Salmonella* serovars. Up to date, little is known about the possible transmission of antimicrobial resistance and class 1 integrons in the *Salmonella* strains isolated from poultry and swine, the major food-producing animals in Thailand. **Methods:** Two hundred and twelve *Salmonella* strains representing 35 serotypes isolated from poultry (n=104) and swine (n=108) were examined for their susceptibility to seven common antibiotics. All isolates were screened for the presence of the *int1* gene by polymerase chain reaction (PCR). The *int1*-positive isolates were further analyzed for the presence of *qacEΔ1-sulI* genes, the marker of the 3'-conserved regions. The gene cassette arrays were identified by DNA sequencing and/or restriction fragment length polymorphism. **Results:** As a hundred and eighty isolates (84.9%) were resistant to at least one antimicrobial, 134 isolates (63.21%) were multiple resistant. Multiresistance to ampicillin, chloramphenicol, tetracycline, trimethoprim, and sulfamethoxazole was the most frequent resistance pattern (7.5%). The *intI* genes were present in 54 isolates (25.5%), of which 35 (64.8%) carry gene cassettes with sizes ranging from 0.7 kb to 2.3 kb. Four of the swine isolates contained the peculiar class 1 integrons that lacked the 3'-conserved regions. Sequence analysis revealed that the integrons had 11 distinct profiles in which *blaPSE1*, *dfrA1*, *dfrA12*, *aadA2*, *aadA4* and *sat* genes were present. The gene cassette array *dfrA12-aadA2* was the most prevalent among the isolates. Experiments are in the progress to ascertain the location of the integrons and the transfer of antimicrobial resistance genes by examination for the presence of the conjugative plasmids. **Conclusion:** The results revealed that multidrug resistance was widely present in *Salmonella* isolates obtained in Thailand and that class 1 integrons might play an important role in contributing to the transfer of antimicrobial resistance.

Session 17

Ballroom (Exhibition Area ~ Level 3)
Kuala Lumpur Convention Centre (KLCC)

Friday, June 20, 2008
12:30–13:30

Poster Presentations

17.019 Prevalance of Extended-Spectrum β-Lactamases produced by *Klebsiella spp.* from Various Clinical Samples in an Urban Hospital in South India
P. Kesani, L. Jonnalagadda, R. Sadayappan
Chidambaram (India)

17.020 A Novel Extended-Spectrum SHV-Type Beta-lactamase, SHV-104, From *Klebsiella pneumoniae*
N. Ben Achour, P. Mercuri, C. Belhadj, M. Ben Moussa, J.M. Frere, M. Galleni, O. Belhadj
Liège (Belgium), Tunis (Tunisia)

17.021 Highly Susceptible Strains of Typhoid Bacilli Encountered in Jamaica
N.C. Bodonaik, O. Heslop
Kingston (Jamaica)

17.022 Carbapenem Resistance Mechanisms in *Acinetobacter spp.* Isolated from University of Malaya Medical Centre (Ummc)
E.H. Wong, G.S. Subramaniam, P. Navaratnam, S.D. Sekaran
Kuala Lumpur (Malaysia)

17.023 Antimicrobial Susceptibility and Serotype Distribution of Nontyphoid Salmonella Clinical Isolates in Seven Asian Countries, 2003–2005
H.Y. Lee, C.H. Chiu, J.H. Song
Seoul (Republic of Korea), Taoyuan (Taiwan)

17.024 Nationwide Surveillance of in vitro Activities of Tigecycline against Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan
J.W. Liu, L.S. Wang, Y.J. Cheng, G.J. Shu, P.L. Lu, Y.C. Liu, C.M. Chen, C.M. Lee, W. Sun, T.N. Jang
Changhua, Chiayi, Hualien, Kaohsiung, Pingtung, Taichung, Taipei (Taiwan)

17.025 Genotypic Characterization of Extended-Spectrum β-lactamases Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated in Malaysia
K.L. Thong, K.T. Lim, C.C. Yeo, S.D. Puthucheary, R. Yasin
Kuala Lumpur (Malaysia)

17.026 Antimicrobial Resistance Genes among *Salmonella enterica* isolates from Poultry and Swine in Thailand
R. Chuanchuen, P. Padungtod, P. Pathanasophon
Bangkok, Chiangmai (Thailand)

17.027 Prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* Genes in Community-Acquired *Enterobacteriaceae* Isolated in Healthy Volunteers in Hochiminh City
V. Le, T. Le, T. Cao, L. Le, N. Tran, T.P. Le, H. Nguyen, J. Campbell, S. Baker, J. Farrar, C. Schultsz
Ho Chi Minh (Vietnam)

Antimicrobial Resistance Genes among *Salmonella enterica* isolates from Poultry and Swine in Thailand

R. Chuanchuen[1]*, P. Padungtod[2] and P. Pathanasophon[3]

[1] Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand
[2] Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand
[3] National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok 10900 Thailand

A total of 184 *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine were classified as resistant to at least one antibiotic and the presence of class 1 integrons and inserted resistance gene cassettes were investigated in our previous study. In this study, we further examined the distribution of various antibiotic resistance genes among the isolates. All the isolates were screened for the presence of class 2 and 3 integrase genes and 18 resistance genes corresponding to their resistance phenotypes using PCR. Ampicillin-resistant isolates (n = 103) were screened for the presence of bla_{PSE} and bla_{TEM}. Chloramphenicol-resistant isolates (n = 59) were investigated for *catA*, *catB* and *cmlA*. Gentamicin-resistant strains (n = 26) were screened for *aadB*. All strains resistant to tetracycline (n = 86) were examined for the presence of *tetA* and *tetB*. Trimethoprim-resistant isolates (n = 69) were investigated for *dfrA1*, *dfrA10* and *dfrA12*. Spectinomycin-resistant isolates (n = 103) were screened for *aadA1* and *aadA2* and streptomycin-resistant strains (n = 127) were additionally tested for the presence of *strA* and *strB*. All the strains resistant to sulphonamides (n = 139) were screened for *sul1*, *sul2* and *sul3*. The results revealed that none carried class 2 and 3 integrons. The investigated resistance genes were responsible for resistance in 78% of the isolates. All the strains harboring more than one resistance gene were resistant to three or more antibiotics. The bla_{TEM}, *cmlA*, *tetA*, *dfrA12*, *sul3*, *aadA1* genes were detected in the majority of strains resistant to ampicillin (59%), chloramphenicol (63%), tetracycline (60%), trimethoprim (41%), sulphonamides (27%) and streptomycin/spectinomycin (28%), respectively. The presence of different genes within the same strains, encoding resistance to the same antibiotics, was detected in 98 isolates. In conclusion, the results indicated that the resistance genes play a major role in conferring resistance among the *Salmonella* isolates investigated.

Keywords: *Salmonella enterica,* antibiotic resistance, resistance genes

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*Corresponding author
Tel 66-2218-9578 fax 66-2218-9577
E-mail: rchuanchuen@yahoo.com

MICROBIAL DRUG RESISTANCE
Volume 14, Number 1, 2008
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/mdr.2008.0807

Class 1 Integrons and *Salmonella* Genomic Island 1 Among *Salmonella enterica* Isolated from Poultry and Swine

Sirintip Khemtong and Rungtip Chuanchuen

Two hundred eleven *Salmonella enterica* strains representing 35 serotypes isolated from healthy poultry ($n = 103$) and swine ($n = 108$) were used in this study. The occurrence and characteristics of class 1 integrons were investigated. *Salmonella* genomic islands (SGIs) and the horizontal transfer of integrons were assessed. One hundred eighty-six isolates (88%) were resistant to at least one antimicrobial and 140 isolates (66%) were multidrug resistant. The *intI1* gene was present in 54 isolates (25.6%), of which 33 (15.6%) carried gene cassettes with sizes ranging from 0.7 to 2.3 kb. Sequence analysis revealed 11 distinct integron profiles in which resistance genes bla_{PSE-1}, *dfrA1*, *dfrA12*, *aadA2*, *aadA4a*, and *silB* were present. The gene cassette array *dfrA12-aadA2* was the most prevalent among the isolates whereas most integrons were located on conjugative plasmids. SGI1 variants (SGI1-A and -F) were present in nine isolates belonging to serovars Albany, Emek, Kedougou, and Kingston.

Introduction

LARGE AMOUNTS of antimicrobial agents have been used in the production of food animals for treatment of bacterial infections as well as for prophylaxis and growth promotion. Such extensive use of antimicrobials has increased the selection pressure for antimicrobial resistance in bacterial pathogens that have an important animal reservoir and can be transmitted to humans through the food chain.[3] Resistance to combinations of several classes of antimicrobials has led to the emergence of multidrug-resistant (MDR) strains.[21] One important foodborne pathogen known to harbor multiple resistance factors is *Salmonella* spp.[10] and MDR *Salmonella enterica* has emerged as one of the leading causes of food poisoning worldwide.[4,25]

An efficient route of dissemination of antimicrobial resistance is through mobile elements including integrons.[13] Four classes of integrons have been reported to be associated with resistant gene cassettes.[24] Class 1 integrons are the most common integron type in multiresistance gram-negative bacteria and predominate in MDR *Salmonella*.[4,14] As class 1 integrons associated with conjugative plasmids or transposons play an important role in distribution of antimicrobial resistance genes,[19] these integrons can be found on *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), an integrative-mobilizable chromosomal element.[18,27] Recently, the circular extrachromosomal form of SGI1 has also been demonstrated in *Salmonella* Typhimurium DT104.[8] The association of class 1 integrons with transferable elements may promote the rapid spread of antibiotic resistance among *Enterobacteriaceae*.[19]

Poultry and swine are the major food-producing animals playing a role as the common reservoirs of *Salmonella* in several countries including Thailand. To date, very little is known about the basic mechanism of resistance and genetic determinants in antimicrobial-resistant *Salmonella* in most developing countries. The objectives of this study were to investigate 1) prevalence and molecular characteristics of class 1 integrons in *S. enterica* isolated from healthy swine and poultry, 2) association of class 1 integrons with conjugative plasmid and SGI1, and 3) transferability of class 1 integrons carrying resistance genes.

Materials and Methods

Isolates

A total of 211 *S. enterica* isolates representing 35 serotypes were included in this study. One hundred seventy-one strains were obtained from the strain collection at National Institute of Animal Health (NIAH), Department of Livestock, Bangkok, during 2003–2005. The other strains were isolated from samples (feces, rectal swabs, drinking water, and feed) collected from poultry and swine during 2005–2006. Only one colony of each serotype was collected from each positive sample. All of the isolates tested were from healthy animals. The *Salmonella* strains were recovered by using methods described in ISO6579:2002 (E) and confirmed by standard biochemical test.[15] Serotypes of *Salmonella* isolates were determined by slide agglutination using the Kauffmann–White serotyping schemes.[23] All bacterial strains were stored as 20% glycerol stock at −80°C.

Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibilities to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, spectinomycin, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, and trimethoprim were assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using a two-fold agar dilution technique according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI) formerly NCCLS.[20] Breakpoints for clarifying *Salmonella* as resistant were as follows: ampicillin (32 μg/ml), chloramphenicol (32 μg/ml), ciprofloxacin (4 μg/ml), gentamicin (8 μg/ml), spectinomycin (128 μg/ml), streptomycin (32 μg/ml), sulfamethoxazole (512 μg/ml), tetracycline (16 μg/ml), and trimethoprim (16 μg/ml). Multidrug resistance was defined as isolates being resistant to three or more different classes of antibiotics.[22] *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Staphylococcus aureus* ATCC 29212 were used as control organisms. Gentamicin was obtained from EM SCIENCE (Gibbstown, NJ). All other antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The *Salmonella* isolates from NIAH were investigated for susceptibility to antibiotics in our previous study[6] and their resistance rates to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, tetracycline, and trimethoprim were 47%, 29%, 14%, 56%, and 32%, respectively.

Integron analysis

Integrons were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequencing. Template DNA of all isolates was prepared by the whole cell boiled lysate procedure described elsewhere.[17] PCR amplifications were performed using PCR master mix of Eppendorf®MasterMix (Eppendorf, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. All isolates were screened for the presence of *intI1* class 1 integrase gene using specific primers and all of the *intI1*-positive strains were examined for the presence of the 3′-conserved segments (3′-CS).[5] Since the *sul3*-associated class 1 integrons have been recently found in *Salmonella*, the presence of *sul3* was detected in whole cell DNA from the isolates classified as integron profile (IP)-VIII to IP-XI (Table 1) and from 10 *intI1*-positive strains that carried neither gene cassettes nor the typical 3′-CS using primer pair sul3F (5′-GGG AGG CGC TTC CAG TAA T-3′) and sul3R (5′-TCC GTG ACA CTG CAA TCA TTA-3′).

Inserted gene cassette region of class 1 integrons were detected by CS-PCR using the 5′-CS and 3′-CS primer pair as previously described.[17] Amplification products were gel purified using QIAQuick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and submitted for sequencing at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The resulting DNA sequence data were compared to the GenBank Database using the Blast algorithm available at the National Center for Biotechnology for Biotechnology Information website (www.ncbi.nlm.nih.gov).

CS-PCR amplicons of the same size were analyzed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analyses. The PCR products were digested with at least two different restriction endonuclease enzymes including *Eco*RI, *Bam*HI, *Xba*I, *Bgl*II, *Nco*I, and *Dpn*I and separated on a 1.5–2% agarose gel. The amplicons with the same RFLP patterns were considered identical.

Conjugation experiments

Conjugation experiments were performed in order to determine if integrons were located on conjugative plasmids as previously described.[4] The integron-positive *Salmonella* isolates containing the resistance gene cassettes (31 strains) were used as donors and the rifampicin-resistant derivatives of *E. coli* K12 strain MG1655 (MIC = 256 μg/ml) were recipients. This recipient is susceptible to antibiotics tested and does not contain class 1 integrons and plasmid. Transconjugants were selected on Luria-Bertani (LB) agar (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) supplemented with 32 μg/ml of rifampicin and one of the following antibiotics: ampicillin (100 μg/ml), trimethoprim (10 μg/ml), or streptomycin (50 μg/ml). Transconjugants were confirmed to be *E. coli* by growth on MacConkey agar (Difco) or eosin methylene blue agar (Difco) and further tested for additional antibiotic resistance. Plasmid DNA were extracted from each transconjugant clone using QIAprep® Mini-spin kit (Qiagen) and examined for the presence of class 1 integrons and the corresponding resistance gene cassettes by PCR as described above.

Determination of Salmonella genomic island 1 and its variants

Association of class 1 integrons with SGI1 and its variants was determined by PCR using the primer sets and thermal cycles as previously described.[7] First, chromosomal DNA from all of the integron-positive isolates were tested for the presence of the left and right junction of SGI1. Then, the order of the antibiotic resistance gene cluster was determined on the basis of their integron profiles and antibiotic resistance patterns.

The presence of the circular extrachromosomal form of SGI1 was also detected in all *Salmonella* isolates containing SGI-1 and its variants. PCR was performed using plasmid DNA as DNA templates and primer pair SGI1circ1 and SGI1circ2.[8]

Results

Resistance phenotype and occurrence of class 1 integrons

Among a total of 211 *Salmonella* isolates, the following numbers of strains were resistant to ampicillin (104, 49%), chloramphenicol (59, 28%), ciprofloxacin (3, 1%), gentamicin (26, 12%), spectinomycin (106, 50%), streptomycin (130, 62%), sulfamethoxazole (144, 68%), tetracycline (124, 59%), and trimethoprim (72, 34%). One hundred eighty-six isolates (88%) were resistant to at least one antibiotic, and 140 isolates (66%) were multidrug resistant. Two common MDR phenotypes found were the AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI phenotype (12, 5.7%) and the AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET phenotype (12, 5.7%). The results showed that antimicrobial resistance was not solely associated with a particular *Salmonella* serovar. The *intI1* gene was detected in 54 of all 211 *Salmonella* isolates (26%). Among these *intI1*-positive strains, 33 isolates (16%) had class 1 integrons comprising variable regions with size ranging from 0.7 to 2.3 kb and 10 isolates (5%) harbored class 1 integron elements without gene cassettes inserted. The rest of *intI1*-positive isolates (11, 5%) carried neither gene cassette nor the typical 3′-CS.

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF CLASS 1 INTEGRON-POSITIVE *SALMONELLA ENTERICA* ISOLATES

IP[a]	Size(s) of amplicons (kb)	Inserted gene cassettes	Antibiotic resistance patterns[f]	Serotype (n)[b]	Salmonella genomic islands 1 types	Excision	Transfer of integrons
I	2.3	*silB*	AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Give	–	nt[c]	nt
II	1.9	*dfrA12-aadA2*	AMP-CHL-GEN-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Weltevreden	–	nt	+
			AMP-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley (2)	–	nt	+
			AMP-GEN-SPC-SUL-TET-TRI	Schwarzengrund	–	nt	+
			CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	–	nt	–
			CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	–	nt	+
			AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	–	nt	–
			SPC-STR-SUL-TET-TRI	Typhimurium	–	nt	+
			AMP-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Rissen (2)	–	nt	+
			AMP-SPC-STR-TET-TRI	Rissen	–	nt	–
III	1.2, 1.9	bla_{PSE-1}, *dfrA12-aadA2*	AMP-GEN-SPC-SUL-TET-TRI	Kentucky	–	nt	+[d]
IV	1.0, 1.9	*aadA2*, *dfrA12-aadA2*	AMP-GEN-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Anatum	–	nt	+[d]
V	1.2	*dfrA1-orfC*	AMP-CHL-STR-SUL-TET-TRI	Albany (3)	SGI1-F	–	–
			AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Albany (2)	SGI1-F	–	–
			AMP-CHL-SUL-TRI	Albany	SGI1-F	–	–
			AMP-CHL-GEN-SPC-STR-SUL-TET	Kedougou	SGI1-F	–	–
			SPC-STR-SUL-TRI	Emek	SGI1-F	+	+
VI	1.0	*aadA4a*	AMP-SPC-STR-SUL-TET	Orion	–	nt	–
VII	1.0, 1.2	*aadA2*, bla_{PSE-1}	AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Kingston	SGI1-A	–	–
VIII	0.7, 1.9	Incomplete *sat* gene, *dfrA12-aadA2*	CHL-SPC-STR-SUL-TRI	Stanley	–	nt	+[e]
			AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Stanley	–	nt	+[e]
IX	0.7	Incomplete *sat* gene	AMP-CHL-GEN-SPC-STR-SUL-TET	Kedougou	–	nt	nt
			AMP-CHL-SPC-STR-SUL-TET	Stanley	–	nt	nt
			CHL-SPC-STR-SUL	Atona	–	nt	nt
			AMP-CHL-SPC-SUL-TET	Kedougou	–	nt	nt
X	0.8	Incomplete *codB* gene	AMP-STR-SUL-TET	Weltevreden	–	nt	nt
XI	0.8, 1.9	Incomplete *codB* gene, *dfrA12-aadA2*	AMP-GEN-SPC-SUL-TET-TRI	Eppendorf	–	nt	+[e]
			AMP-SPC-STR-SUL-TET-TRI	Weltevreden	–	nt	–

[a] The integron profiles (IPs) were defined by the number and the size of the PCR amplicons obtained.
[b] Number of strains is indicated if more than one.
[c] nt: not tested.
[d] Only integrons with the *dfrA12-aadA2* gene arrays were able to transfer.
[e] Only transfer of resistance to trimethoprim and streptomycin were tested.
[f] AMP, Ampicillin; CHL, Chloramphenicol; GEN, Gentamicin; SPC, Spectinomycin; STR, Streptomycin; TET, Tetracycline; TRI, Trimethoprim.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Co-existence of two distinct integrons carrying different gene cassettes was identified in six isolates (3%). All of the integron-positive strains were MDR (Table 1).

Class 1 integron gene cassettes

Eleven integron profiles (IP-I to IP-XI) were defined (Table 1). The gene cassettes identified in variable regions include bla_{PSE-1} gene encoding resistance to β-lactams, *aadA2* and *aadA4* genes encoding resistance to streptomycin and spectomycin, *dfrA1* and *dfrA12* genes encoding resistance to trimethoprim, *silB* encoding a SilB membrane fusion protein, *sat* gene conferring resistance to streptothricin, *codB* gene mediating cytosine permease, and open reading frames encoding protein of unknown function. The resistance genes most commonly found among class 1 integrons were those encoding resistance to aminoglycoside and trimethoprim and the gene cassette array *dfrA12-aadA2* was the most prevalent (17/33, 51.5%).

Sequence of all *sat* and *codB* genes found were incomplete. The integrons lacking the conserved 3′-CS were found in five isolates (2.4%) (*i.e.*, IP-IX and IP-X) and all of these unusual integrons carried the incomplete *sat* or *codB* genes. Four *Salmonella* strains classified as IP-VIII and IP-XI carried two different integrons, one of which was with the partial *sat* or *codB* genes and the others were class 1 integrons with the inserted *dfrA12-aadA2* gene arrays. The integrons with the *dfrA12-aadA2* gene arrays contained the conserved 3′-CS determined by PCR using plasmid DNA from *E. coli* transconjugants as template (data not shown). However, it was uncertain if class 1 integrons with the defective *sat* or *codB* gene cassettes in these four strains carried the typical 3′-CS or not. All *Salmonella* strains in IP-VIII to IP-XI carried *sul3* gene. In addition, 6 of 11 *intI*-positive strains that carried neither gene cassette nor the conserved 3′-CS were also positive for *sul3* gene.

Conjugal transfer of class 1 integron resistance genes

Transfer of class 1 integrons to *E. coli* was possible in 14 of 33 integron-positive isolates (42%). These were confirmed by the observations that the *E. coli* transconjugants were *intI1* positive, harbored the integrons with variable regions of the same size as those in the corresponding donors, and carried plasmid having identical restriction fragment patterns as those in the donors (data not shown). These transconjugants also obtained resistance phenotypes of the parental strains (data not shown).

Salmonella genomic island 1 and its variants

Complete gene clusters of SGI1 variants, SGI1-A and SGI1-F were found in nine (4.3%) isolates of the class 1-integron positive strains. SGI1-A was identified in a single *Salmonella* Kingston isolate while SGI1-F was found in *Salmonella* Albany, *Salmonella* Emek, and *Salmonella* Kedougou. The circular form of SGI1 was proved to be present in one *Salmonella* Emek strain. No circular form of SGI1 was detected with plasmid DNA from other serovars.

Discussion

The main finding in this study was the widespread occurrence and diversity of class 1 integrons and SGI1 variants in different *Salmonella* serovars isolated from food animals. This suggests that the acquisition of integrons is not limited to specific *Salmonella* serovars but may occur in any serovars. Among the 11 integron profiles, genes encoding for resistance to trimethoprim (*dfrA1* and *dfrA12*) and aminoglycosides (*aadA2*) were most commonly found. It could be related to the extensive use of these antibiotics in veterinary treatment and agriculture that increases the selection pressure of the genes.

The presence of integrons with variable regions of 1.9 kb (*dfrA12-aadA2*) was most common and detected in serovars Kentucky, Anatum, Stanley, Eppendorf, Typhimurium, Rissen, Schwarzenrund, and Weltevreden. This type of integron has been found in serovars; Choleraesuis in Taiwan[14]; and Gallinarum in Korea.[16] The same gene cassette combination was detected in class 1 integrons in *E. coli* isolates from humans in Korea,[28] cattle in Norway,[26] and swine in Germany.[9] Since the identical gene cassette arrays could be found in the same and different bacterial species, in different hosts, and in different geographical area, it suggests that the gene cassettes or integrons have been exchanged between intra- and inter-species and play an important role in the horizontal dissemination of antimicrobial resistance among bacteria.[14] All class 1 integrons carrying the *dfrA12-aadA2* gene array found in this study were located on plasmids and could be successfully transferred to other bacterial strains. This could be the explanation for a wide dissemination of this gene cassette; it also suggested the important role of this gene cassette in widespread resistance to trimethroprim and aminoglycosides in *Salmonella* isolates from food animals in this study.

In addition to *dfrA12-aadA2*, the *dfrA1-orfC1* gene array was also commonly found. However, the *dfrA1* gene was previously found in combination with *aadA1* in *Salmonella* isolates from several countries.[19,27] The reason underlying widespread occurrence of some integrons with a specific combination in a certain geographic area is currently unknown. One explanation may be the different antibiotic use within geographically distinct regions, and this requires further examination.

Two new gene cassettes, an incomplete *codB* gene and a *silB* gene, were found in the present study. The *codB* gene encoding cytosine permease was found in *Salmonella* Weltevreden and *Salmonella* Eppendorf and could not provide any advantage for the *Salmonella* hosts. The association of class 1 integrons with a partial gene encoding a metabolic enzyme has been previously observed and it has been suggested that this incomplete gene may have been captured through an aberrant recombination event during integron transfer.[28]

The *silB* gene encoding for SilB a membrane fusion protein of the SilABC system[11] was found in a *Salmonella* Give isolate. This efflux system belongs to the resistance nodulation and cell division (RND) family and confers resistance to silver compounds. The *silABC* operon was found in plasmids along with antimicrobial-resistance genes and the bacterial chromosome.[11] Selection of resistance to silver may also select for multidrug-resistant plasmids.[12] However, the benefit of the *silB*-containing integron to the *Salmonella* strain in this study is unclear and was not pursued.

Atypical class 1 integrons that lacked 3′-CS were observed suggesting that they were not the *sul1*-associated integrons. This type of integrons was previously observed in several

bacterial strains.[1] Unusual 3′-CS regions *qacH* linked to a *sul3* domain consisting of IS*440*-*sul3*-orf1-IS26 was identified in plasmid-borne class 1 integrons in different *Salmonella* serovars.[2] In this study, it was observed that *Salmonella* isolates lacking the 3′-CS contained *sul3*. However, based on these results alone, linkage of *sul3* to integron structures was uncertain. The genetic background of the *sul3* gene in these strains, including its association with integron structure and contribution to maintenance of class 1 integron elements, are currently being investigated.

Many of MDR *Salmonella* in this study carried class 1 integrons related to SGI1 variants SGI1-F and SGI1-A. SGI1 was found as circular extrachromosomal DNA in a *Salmonella* Emek isolate, as most of the extrachromosomal circular intermediates of SGI1 were previously found in *Salmonella* Typhimurium.[8] These findings suggest that class 1 integrons and SGI1 play a role as multidrug resistance determinants in *Salmonella* serovars. Integration of class 1 integrons into the chromosome of *Salmonella* has provided the stable multidrug resistance even in the absence of antibiotic selection pressure and led to widespread of MDR strains in food animals.[18] The location of the non-SGI1 class 1 integrons on transferable plasmid also enhanced their horizontal-transfer efficiency.[19]

Class 1 integrons examined in this study did not support the total resistance phenotype observed and all strains carrying the empty integrons were also MDR, indicating the presence of non–class 1 integron-borne resistance genes. Such results may be due to chromosomal mutations or the presence of other integrons or other resistance genes that were not detected.

In conclusion, the data presented in this study confirmed the diversity and widespread occurrence of class 1 integrons in different serovars of *Salmonella* isolated from food-producing animals. Since these domestic livestock play an important role as the major reservoirs of MDR *S. enterica* carrying mobile genetic elements associated with resistance determinants, projects to discontinue the abuse of antimicrobials are essential. The continued monitoring of antimicrobial resistance is decisively required. Detailed studies are warranted, currently in progress, in order to track the evolution of this type of resistance among *S. enterica* in humans and foodstuffs of animal origin.

Acknowledgments

We thank P. Pathanasophon, NIAH, for providing of *Salmonella* isolates and A. Kumar, University of Ontario Institute of Technology, Canada, for assistance in manuscript preparation. *E. coli* K12 MG1655 was provided by Genetic Strains Research Center, National Institute of Genetics, Japan. This study was supported by Rachadapisaksompoch grant in the fiscal year 2007, Chulalongkorn University.

References

1. Antunes, P., J. Machado, J.C. Sousa, and L. Peixe. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:836–839.
2. Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe. 2007. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3′ conserved sequence region among *Salmonella* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:1545–1548.
3. Barza, M. 2002. Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. Clin. Infect. Dis. **34(Suppl 3)**:S123–125.
4. Chen, S., S. Zhao, D.G. White, C.M. Schroeder, R. Lu, H. Yang, P.F. McDermott, S. Ayers, and J. Meng. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from retail meats. Appl. Environ. Microbiol. **70**:1–7.
5. Chuanchuen, R., S. Khemtong, and P. Padungtod. 2007. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health **38**:855–862.
6. Chuanchuen, R., P. Pathanasophon, S. Khemtong, W. Wannaprasat, and P. Padungtod. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand. J. Vet. Med. Sci. (In press).
7. Doublet, B., R. Lailler, D. Meunier, A. Brisabois, D. Boyd, M.R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. Emerg. Infect. Dis. **9**:585–591.
8. Doublet, B., D. Boyd, M.R. Mulvey, and A. Cloeckaert. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. Mol. Microbiol. **55**:1911–1924.
9. Gebreyes, W.A., S. Thakur, P.R. Davies, J.A. Funk, and C. Altier. 2004. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997–2000. J. Antimicrob. Chemother. **53**:997–1003.
10. Gebreyes, W.A., and S. Thakur. 2005. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:503–511.
11. Gupta, A., K. Matsui, J.F. Lo, and S. Silver. 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. Nat. Med. **5**:183–188.
12. Gupta, A., L.T. Phung, D.E. Taylor, and S. Silver. 2001. Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. Microbiology **147**:3393–3402.
13. Hall, R.M., and H.W. Stokes. 1993. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. Genetics **90**:115–132.
14. Hsu, S.C., T.H. Chiu, J.C. Pang, C.H. Hsuan-Yuan, G.N. Chang, and H.Y. Tsen. 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.
15. ISO. 2002. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp: ISO6579, 4th (ed). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
16. Kwon, H.J., T.E. Kim, S.H. Cho, J.G. Seol, B.J. Kim, J.W. Hyun, K.Y. Park, S.J. Kim, and H.S. Yoo. 2002. Distribution and characterization of class 1 integrons in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum biotype Gallinarum. Vet. Microbiol. **89**:303–309.
17. Levesque, C., L. Piche, C. Larose, and P.H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of

resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:185–191.
18. Levings, R.S., D. Lightfoot, S.R. Partridge, R.M. Hall, and S.P. Djordjevic. 2005. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. J. Bacteriol. **187**:4401–4409.
19. Miko, A., K. Pries, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J. Antimicrob. Chemother. **56**:1025–1033.
20. 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, Wayne, PA.
21. O'Brien, T.F. 2002. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. Clin. Infect. Dis. **34(Suppl 3)**:S78–84.
22. O'Mahony, R., M. Saugy, N. Leonard, D. Drudy, B. Bradshaw, J. Egan, P. Whyte, M. O'Mahony, P. Wall, and S. Fanning. 2005. Antimicrobial resistance in isolates of *Salmonella* spp. from pigs and the characterization of an *S.* Infantis gene cassette. Foodborne Pathog. Dis. **2**:274–281.
23. Popoff, M. and L. LeMinor. 1992. Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars, 7th ed. Institut Pasteur, Paris.
24. Recchia, G.D., and R.M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology **141**:3015–3027.
25. Schroeter, A., B. Hoog, and R. Helmuth. 2004. Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health **51**:389–392.
26. Sunde, M. 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. J. Antimicrob. Chemother. **56**:1019–1024.
27. Vo, A.T., E. van Duijkeren, A.C. Fluit, W.J. Wannet, A.J. Verbruggen, H.M. Maas, and W. Gaastra. 2006. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in the Netherlands. Int. J. Antimicrob. Agents **28**:172–179.
28. Yu, H.S., J.C. Lee, H.Y. Kang, D.W. Ro, J.Y. Chung, Y.S. Jeong, S.H. Tae, C.H. Choi, E.Y. Lee, S.Y. Seol, Y.C. Lee, and D.T. Cho. 2003. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. J. Clin. Microbiol. **41**:5429–5433.

Address reprint requests to:
Dr. Rungtip Chuanchuen
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Bangkok 10330
Thailand

E-mail: rchuanchuen@yahoo.com

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Short communication

Antibiotic Resistance Genes in *Salmonella enterica* Isolates from Poultry and Swine

RUNGTIP CHUANCHUEN [1] AND PAWIN PADUNGTOD [2]

[1]Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[2]Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand

Address reprint requests to:

Dr. Rungtip Chuanchuen

Department of Veterinary Public Health

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Bangkok 10330 Thailand

E-mail: rchuanchuen@yahoo.com

Running title: RESISTANCE GENES IN *SALMONELLA*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

A total of 184 resistant *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine were investigated for the distribution of and associations between various antibiotic resistance genes. All the isolates were screened for the presence of class 2 and 3 integrase genes and 18 resistance genes corresponding to their resistance phenotypes. None of the isolates carried class 2 and 3 integrons. The investigated resistance genes were responsible for resistance in 78% of the isolates. All the strains harboring more than one resistance gene were resistant to three or more antibiotics. The bla_{TEM}, *cmlA*, *tetA*, *dfrA12*, *sul3*, *aadA1* genes were detected in the majority of strains resistant to ampicillin (87%), chloramphenicol (63%), tetracycline (86%), trimethoprim (42%), sulphonamides (42%) and streptomycin/spectinomycin (61%), respectively. Two ciprofloxacin-resistant isolates had a single point mutation leading to Ser-83-Phe in GyrA or Thr-57-Ser in ParC. Statistical analysis revealed good correlation between the presence of antibiotic resistance genes and corresponding resistance phenotype (p=0.000). The results indicated that the resistance genes play a major role in conferring resistance among the *Salmonella* isolates investigated.

Keywords: *Salmonella enterica,* antibiotic resistance, resistance genes

ลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INTRODUCTION

Food-borne diseases caused by nontyphoid *Salmonella enteric* serovars represent an important public health problem worldwide.[19, 24] In the last two decades, multidrug resistant (MDR) *Salmonella* isolates has been increasing and become a major health hazard.[1, 3, 12] These MDR *Salmonella* strains can be a direct threat to human health when their multidrug resistance phenotype interferes with the efficacy of antibiotic treatment or an indirect threat when resistance is transferred to other human pathogens. The routine use of antimicrobials in food-producing animals for any purposes, including infection treatment, disease prevention and growth promotion has been a major factor in development and widespread dissemination of antimicrobial resistance in bacteria that are subsequently transferred to humans through the food chain. Therefore, surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animal reservoirs and study of mechanisms underlying the emergence and dissemination of antimicrobial resistance are important for control of food borne pathogens and antimicrobial resistance.

In our previous study, the prevalence, molecular characteristics and transferability of class 1 integrons in *S. enterica* from healthy swine and poultry were investigated.[13] In this study, we further characterized the molecular mechanisms of multidrug resistance among the *Salmonella* isolates. The objectives were to investigate distribution and associations of various resistance genes in MDR *Salmonella* isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and antimicrobial susceptibility test

A total of 184 *Salmonella* isolates previously isolated were studied.[8, 13] A hundred and forty four strains were obtained from the strain collection at National Institute of Animal Health (NIAH), Department of Livestock, Bangkok during 2003-2005. The other strains were isolated from samples (feces, rectal swabs, drinking water and feed) collected from healthy poultry and swine during 2005-2006. All the *Salmonella* isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing and the minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using a two-fold agar dilution technique according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI) formerly NCCLS.[17] The antimicrobial agents tested and the breakpoints for clarifying *Salmonella* as resistant were as follows: ampicillin (32 μg/ml), chloramphenicol (32 μg/ml), gentamicin (8 μg/ml), spectinomycin (128 μg/ml), streptomycin (32 μg/ml), sulfamethoxazole (512 μg/ml), tetracycline (16 μg/ml) and trimethoprim (16 μg/ml). Multidrug resistance was defined as isolates being resistant to 3 or more different classes of antibiotics.[18]

All of the isolates used were previously classified as resistant to at least one antibiotic.[13] Resistance rates to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, spectinomycin, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline and trimethoprim were 56%, 32%, 2%, 14%, 56%, 69%, 76%, 47% and 38%, respectively. Fifteen percent of the isolates carried class 1 integrons with resistance gene cassettes and 5% of the isolates harbored SGI1-A or -F.[13]

Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequencing

The 184 resistant isolates were screened for class 3 integrase, *intI3* and 18 resistance genes corresponding to their resistance phenotypes using PCR. Ampicillin-resistant isolates (n =103) were screened for the presence of the bla_{PSE-1} and bla_{TEM} genes. Chloramphenicol-resistant isolates (n =59) were investigated for the *catA*, *catB* and *cmlA* genes. Gentamicin-resistant strains (n =26) were screened for the *aadB* gene. All strains resistant to tetracycline (n =86) were examined for the presence of the *tetA* and *tetB* genes. Trimethoprim-resistant isolates (n =69) were investigated for the *dfrA1*, *dfrA10* and *dfrA12* genes. Spectinomycin-resistant isolates (n =103) were screened for the presence of the *aadA1* and *aadA2* genes. Strains resistant to streptomycin (n =127) were investigated for the *aadA1, aadA2, strA* and *strB* genes. All the strains resistant to sulphonamides (n =139) were screened for the presence of the *sul1*, *sul2* and *sul3* genes.

For all ciprofloxacin-resistance isolates (n =3), mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of the *gyrA, gyrB, parC* and *parE* genes were determined. The sequences were analyzed using the BLAST search available at the website of the National Center for Biotechnology Information. Two *Salmonella* isolates susceptible to ciprofloxacin were used as control.

Template DNA of all isolates was prepared by the whole cell boiled lysate procedure.[14] PCR was performed in a final volume of 25 µl using PCR master mix of Eppendorf®MasterMix (Eppendorf, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's protocol. All primers used are listed in Table 1. The following thermal cycles were used to amplify all resistance genes and the QRDRs: one cycle at 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 45 s, 57°C for 45 s, and extension at 72°C for 1 s; and a final extension at 72°C

for 5 min. The *intI3* gene was amplified using the same denaturation and annealing conditions, except that the extension time was changed to 45 sec. The representatives of PCR products were purified using the QIAQuick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and submitted for sequencing at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). pAV3.5 was used as positive control for *intI3*.[23]

Realtime PCR

All the isolates were screened for the presence of class 2 integrase gene, *intI2*, using realtime PCR. PCR reactions were carried out in a final volume of 25 μl using Biotools QuantiMix EASY SYG Kit (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, Spain) as described by the manufacturer in a Rotor-Gene™ 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research, Sydney, Australia). Amplification conditions were 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s followed by holding at 4°C. *Salmonella* Paratyphi B var Java was used as positive control for *intI2*.[22]

Statistical analysis

All statistical analysis was carried out using STATA software Version 8.0 (STATA Corp., College Station, TX, USA). The significance level of association between having resistance genes and resistance phenotype was determined using Fisher's exact test. Comparison among median MIC level of isolates with different number of resistance gene (s) was performed using Kruskal-Wallis test.

RESULTS

No class 2 or 3 integrons were detected in the *Salmonella* isolates in this study. The investigated resistance genes were responsible for resistance in 78% of the isolates and the distribution of the various resistance genes is shown in Table 2. Most of amicillin-resistant strains (93%) contained either bla_{PSE-1} and/or bla_{TEM}, of which the bla_{TEM} gene was the most commonly-identified genes (87%). The majority of chloramphenicol- (63%) and gentamicin- (88%) resistant isolates carried *cmlA* and *aadB* genes respectively. The *tetA* gene was detected in the majority of tetracycline-resistant strains (86%) and the *dfrA12* gene was most prevalent among trimethoprim-resistant strains (42%). Most of sulphonamide-resistant strains (76%) contained at least one *sul* gene tested, of which the *sul3* gene was the most frequently-detected genes (42%). Resistance to spectinomycin and streptomycin was mediated by *aadA1* in the majority of the spectinomycin- (68%) and streptomycin- (56%) resistant isolates. The presence of different genes within the same strains, encoding resistance to the same antibiotics, was detected in 53%.

Sequence analysis of the QRDRs of the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes revealed that only two isolates harbored a point mutation. Replacement of C248 with G leading to a Ser-83-Phe substitution in GyrA was identified in a serovar Senftenberg isolate and a point mutation C-170-G leading to a Thr-57-Ser substitution in ParC was found in the other serovar Senftenberg isolate. No mutations were observed in the QRDRs of the ciprofloxacin sensitive control.

All the strains harboring more than one resistance gene were resistant to three or more antibiotics. Statistical analysis showed that there were significant associations between being resistance to an antibiotic and having resistance gene for all genes (p=0.000) except *catB* and *dfrA10*, which were not significantly associated with being resistance to chloramphenicol and trimethoprim respectively (p=0.051). Having more than one gene conferring resistance to a single agent was significantly associated with increasing MIC level and proportion of resistance isolates (p=0.000). In addition, having genes conferring resistance to multiple drugs was significantly associated with being multiresistance (p=0.000).

DISCUSSION

Most of the tested resistance genes were detected at high rates, indicating that these genes play an important role in conferring resistance among the *Salmonella* isolates in this study. This data also confirmed the wide diversity of mechanisms mediating antimicrobial resistance in different *Salmonella* serovars of animal origins. These investigated resistance genes were previously observed at high rate in *Salmonella* from humans, food animals and food products.[1, 4, 16] As class 1 integrons were previously found to be prevalent in the resistant *Salmonella* isolates of our collection[13], integrons of either class 2 and 3 were not identified in this study. Several reports showed that class 1 integrons were more frequently observed than class 2 integrons[16, 22] and the rarely described class 3 integrons are to date not identified in this pathogen.[22] These results once

again highlight the important role of class 1 integrons in dissemination of antibiotic resistance.

Resistance to quinolones in *Salmonella* is usually a result of a single point mutation in the QRDR of the *gyrA* gene (nucleotides 67 to 122)[11], which is consistent with the results in this study. The mutation Ser-83-Phe and Thr-57-Ser had been previously described.[9, 10, 15] However, a ciprofloxacin-resistant strain did not have mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE*. The possible resistance mechanisms for the isolates could be decreased permeability of the outer membrane, an active efflux[5, 11] or the existence of as yet unknown additional resistance mechanisms. These results warrant further investigation.

Up to 53% of the isolates harbored 2 or 3 different resistant genes for the same antibiotics, such as *sul1, sul2* and *sul3* for sulphonamide resistance or *dfrA10* and *dfrA12* for trimethoprim resistance. These include all of the strains that contained class 1 integrons. For these class 1 integrons-positive strains, it is possible that one resistance gene was associated with the integrons and gene clusters on SGI1 variants, but the other gene(s) were located in a plasmid.[20] However, some of the class 1 integrons-negative strains also carried more than one resistance gene for the same antibiotic resistance. These results warranted further studies to characterize plasmids and elucidate the alternative possibilities.

The prevalence of chloramphenicol resistance and the existence of the chloramphenicol resistance gene (s) among *E. coli* isolates has been demonstrated [2, 21] even through the antibiotic has been prohibited for using in domestic animals. This is in agreement of the results in our study, which the *cmlA* gene was found in the majority of

chloramphenicol-resistant isolates. In our previous study, the *cmlA* gene in 7 chloramphenicol-resistant *Salmonella* strains was shown to be part of gene cassettes in class 1 integrons with unusual 3′ conserved segment linked to the *qacH-sul3* domain and the common resistance genes in the gene cassettes included *aadA1* and *aadA2,* and *qacH.*[7] This close-genetic linkage to other resistance genes could be a mechanism for maintenance and co-selection of chloramphenicol resistance in *Salmonella* in the absence of chloramphenicol selection pressure.[2, 21]

The present study demonstrated good correlations between the presence of antibiotic resistance genes and corresponding resistance phenotype suggesting that these resistance genes were usually expressed when present. For each antibiotic, the MIC level of the *Salmonella* isolates carrying more than one corresponding-resistance gene was higher than that of the strains with only a single gene, indicating the synergy among the genes in mediating resistance. However, these results did not rule out that other resistance genes not tested in this study are also present.

In conclusion, the data in this study may provide useful information regarding the dissemination of resistance genes among a wide range of the resistant *Salmonella* serovars confirming an important role of food animals in the spread of antibiotic resistance. However, data regarding the epidemiological situation of antimicrobial resistance and mechanism basis of resistance is still limited especially in most developing countries. Continued monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* along the food chain is required.

217 **ACKNOWLEDGEMENTS**

218

219 We thank S. Khemtong for technical assistance. P. Pathanasophon, NIAH was
220 acknowledged for strain providing. This study was supported by Chulalongkorn
221 university Rachadapisaksompoch Endowment Fund in the fiscal year 2007 to R.
222 Chuachuen. It is supported in part by the Thailand Research Fund to P. Padungtod

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REFFERENCES

1. **Aarestrup, F.M., M. Lertworapreecha, M.C. Evans, A. Bangtrakulnonth, T. Chalermchaikit, R.S. Hendriksen and H.C. Wegener.** 2003. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. J. Antimicrob. Chemother. **52:** 715-718.
2. **Bischoff, K.M., D.G. White, M.E. Hume, T.L. Poole and D.J. Nisbet.** 2005. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **243:** 285-291.
3. **Butaye, P., G.B. Michael, S. Schwarz, T.J. Barrett, A. Brisabois and D.G. White.** 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. Microbes. Infect. **8:** 1891-1897.
4. **Chen, S., S. Zhao, D.G. White, C.M. Schroeder, R. Lu, H. Yang, P.F. McDermott, S. Ayers and J. Meng.** 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from retail meats. Appl. Environ. Microbiol. **70:** 1-7.
5. **Choi, S.H., J.H. Woo, J.E. Lee, S.J. Park, E.J. Choo, Y.G. Kwak, M.N. Kim, M.S. Choi, N.Y. Lee, B.K. Lee, N.J. Kim, J.Y. Jeong, J. Ryu and Y.S. Kim.** 2005. Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. J. Antimicrob. Chemother. **56:** 1111-1114.
6. **Chuanchuen, R., S. Khemtong and P. Padungtod.** 2007. Occurrence of *qacE*/*qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health **38:** 855-862.
7. **Chuanchuen, R., C. Koowatananukul and S. Khemtong.** 2008. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health **In press.**
8. **Chuanchuen, R., P. Pathanasophon, S. Khemtong, W. Wannaprasat and P. Padungtod.** 2008. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and swine in Thailand. J. Ved. Med. Sci. **In press.**
9. **Eaves, D.J., E. Liebana, M.J. Woodward and L.J. Piddock.** 2002. Detection of *gyrA* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* by denaturing high-performance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. **40:** 4121-4125.
10. **Escribano, I., J.C. Rodriguez and G. Royo.** 2004. Mutations in the *gyrA* gene in *Salmonella enterica* clinical isolates with decreased ciprofloxacin susceptibility. Int. J. Antimicrob. Agents **24:** 300-303.
11. **Guerra, B., B. Malorny, A. Schroeter and R. Helmuth.** 2003. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. Antimicrob. Agents Chemother. **47:** 2059.
12. **Hanson, R., J.B. Kaneene, P. Padungtod, K. Hirokawa and C. Zeno.** 2002. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli*, and their resistance to antimicrobial agents, in farming communities in northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health **33 Suppl 3:** 120-126.
13. **Khemtong, S. and R. Chuanchuen.** 2008. Class 1 Integrons and *Salmonella* Genomic Island 1 among *Salmonella enterica* Isolated from Poultry and Swine. Microbe. Drug Resist. **14:** 65-70.
14. **Levesque, C., L. Piche, C. Larose and P.H. Roy.** 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. **39:** 185-191.
15. **Ling, J.M., E.W. Chan, A.W. Lam and A.F. Cheng.** 2003. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant salmonellae in Hong Kong. Antimicrob. Agents Chemother. **47:** 3567-3573.
16. **Miko, A., K. Pries, A. Schroeter and R. Helmuth.** 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J. Antimicrob. Chemother. **56:** 1025-1033.
17. **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.
18. **O'Mahony, R., M. Saugy, N. Leonard, D. Drudy, B. Bradshaw, J. Egan, P. Whyte, M. O'Mahony, P. Wall and S. Fanning.** 2005. Antimicrobial resistance in isolates of *Salmonella* spp.

277 from pigs and the characterization of an *S.* Infantis gene cassette. Foodborne Pathog. Dis. **2:** 274-
278 281.
279 19. **Padungtod, P., J.B. Kaneene, R. Hanson, Y. Morita and S. Boonmar.** 2006. Antimicrobial
280 resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand. FEMS
281 Immunol. Med. Microbiol. **47:** 217-225.
282 20. **Randall, L.P., S.W. Cooles, M.K. Osborn, L.J. Piddock and M.J. Woodward.** 2004. Antibiotic
283 resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella*
284 *enterica* isolated from humans and animals in the UK. J. Antimicrob. Chemother. **53:** 208-216.
285 21. **Sunde, M. and M. Norstrom.** 2006. The prevalence of, associations between and conjugal transfer
286 of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products.
287 J. Antimicrob. Chemother. **58:** 741-747.
288 22. **van Essen-Zandbergen, A., H. Smith, K. Veldman and D. Mevius.** 2007. Occurrence and
289 characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp.
290 in the Netherlands. J. Antimicrob. Chemother. **59:** 746-750.
291 23. **Xu, H., J. Davies and V. Miao.** 2007. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia*
292 spp. J. Bacteriol. **189:** 6276-6283.
293 24. **Yang, S.J., K.Y. Park, S.H. Kim, K.M. No, T.E. Besser, H.S. Yoo, S.H. Kim, B.K. Lee and**
294 **Y.H. Park.** 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and
295 Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance
296 characterization. Vet. Microbiol. **86:** 295-301.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

297 TABLE 1. PRIMERS USED IN THIS STUDY
298

Target gene or region	*Primer*	*Sequence of primers (5'-3')*	*Reference*
aadA1	aadA1-F	CTCCGCAGTGGATGGCGG	8
	aadA1-R	GATCTGCGCGCGAGGCCA	
aadA2	aadA2-F	CATTGAGCGCCATCTGGAAT	8
	aadA2-R	ACATTTCGCTCATCGCCGGC	
aadB	aadB-F	CTAGCTGCGGCAGATGAGC	This study
	aadB-R	CTCAGCCGCCTCTGGGCA	
bla_{PSE-1}	bla_{PSE1}-F	GCAAGTAGGGCAGGCAATCA	8
	bla_{PSE1}-R	GAGCTAGATAGATGCTCACAA	
bla_{TEM}	bla_{TEM}-F	ATCAGTTGGGTGCACGAGTG	8
	bla_{TEM}-R	ACGCTCACCGGCTCCAGA	
catA	catA-F	CCAGACCGTTCAGCTGGATA	8
	catA-R	CATCAGCACCTTGTCGCCT	
catB	catB-F	CGGATTCAGCCTGACCACC	8
	catB-R	ATACGCGGTCACCTTCCTG	
cmlA	cmlA-F	TGGACCGCTATCGGACCG	7
	cmlA-B	CGCAAGACACTTGGGCTGC	
dfrA1	dfrA1-F	CAATGGCTGTTGGTTGGAC	8
	dfrA1-R	CCGGCTCGATGTCTATTGT	
dfrA10	dfrA10-F	TCAAGGCAAATTACCTTGGC	This study
	dfrA10-R	ATCTATTGGATCACCTACCC	
dfrA12	dfrA12-F	TTCGCAGACTCACTGAGGG	8
	dfrA12-R	CGGTTGAGACAAGCTCGAAT	
strA	strA-F	TGGCAGGAGGAACAGGAGG	This study
	strA-R	AGGTCGATCAGACCCGTGC	
strB	strB-F	GCGGACACCTTTTCCAGCCT	This study
	strB-R	TCCGCCATCTGTGCAATGCG	
sul1	sul1-F	CGGACGCGAGGCCTGTATC	6
	sul1-R	GGGTGCGGACGTAGTCAGC	
sul2	sul2-F	GCGCAGGCGCGTAAGCTGAT	This study
	sul2-R	CGAAGCGCAGCCGCAATTC	
sul3	sul3-F	GGGAGCCGCTTCCAGTAAT	7
	sul3-R	TCCGTGACACTGCAATCATTA	
tetA	tetA-F	GCTGTCGGATCGTTTCGG	8
	tetA-R	CATTCCGAGCATGAGTGCC	
tetB	tetB-F	CTGTCGCGGCATCGGTCAT	8
	tetB-R	CAGGTAAAGCGATCCCACC	
intI2	intI2	GGCAGACAGTTGCAAGACAA	This study
	intI2	AAGCGATTTTCTGCGTGTTT	
intI3	intI3-F	CCGGTTCAGTCTTTCCTCAA	This study
	intI3-R	GAGGCGTGTACTTGCCTCAT	
gyrA	gyrA-F	GCTGAAGAGCTCCTATCTGG	This study
	gyrA-R	GGTCGGCATGACGTCCGG	
gyrB	gyrB-F	GCGCGCTCGATTTAGCCG	This study
	gyrB-R	TGATAGCGCAGCTTGTCCG	
parC	parC-F	GTACGTGATCATGGATCGTG	This study
	parC-R	TTCCTGCATGGTGCCGTCG	
pare	parE-F	GCGATCGCGAATATCAGGCG	This study
	parE-R	CAGTTGTTCCAGTACGCCC	

299
300

TABLE 2. DISTRIBUTION OF RESISTANE GENES IN RELATION TO RESISTANCE PHENOTYPES

Resistance phenotype (n)	*Resistance genes*	*Number (%)*
Ampicillin (103)	bla_{PSE1}	6 (6)
	bla_{TEM}	61 (59)
	both	29 (28)
	at least one	96 (93)
Chloramphenicol (59)	*catB*	1 (2)
	cmlA	37 (63)
Gentamicin (26)	*aadB*	23 (88)
Spectinomycin (103)	*aadA1*	47 (46)
	aadA2	2 (2)
	both	23 (22)
	at least one	49 (48)
Streptomycin (127)	*aadA1*	17 (13)
	strA, strB	22 (17)
	strA, strB, aadA1	2 (2)
	aadA1, aadA2	10 (8)
	strA, strB, aadA1	37 (29)
	strA, strB, aadA2	2 (2)
	strA, strB, aadA1, aadA2	5 (4)
	at least one	95 (75)
Sulfamethoxazole (139)	*sul1*	18 (13)
	sul2	17 (12)
	sul3	37 (27)
	all three	9 (6)
	sul1, sul2	2 (1)
	sul1,sul3	14 (10)
	sul2,sul3	8 (6)
	at least one	105 (76)
Tetracycline (86)	*tetA*	60 (70)
	tetB	5 (6)
	both	14 (16)
	at least one	65 (76)
Trimethoprim (69)	*dfrA1*	7 (10)
	dfrA10	2 (3)
	dfrA12	28 (41)
	dfrA10, dfrA12	1 (1)
	at least one	38 (55)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย