

ความแตกต่างทางพันธุกรรมและความไวต่อยาต้านจุลชีพของ เชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่แยกได้จากเนื้อไก่ จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร

พัชรี ทองคำคูณ* วัชรชัย ฌรณศักดิ์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กทม. 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทร. 0 2579 8908- 14 ต่อ 405, email: patchareet@dld.go.th

บทคัดย่อ

นำเชื้อ *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ที่เพาะแยกได้จากการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างเนื้อเป็ดและเนื้อไก่จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร ในปี 2549-2550 จำนวน 20 isolates มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค pulsed field gel electrophoresis (PFGE) โดยใช้เอนไซม์ *ApaI* *SmaI* และ *AscI* จำแนกแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อได้เป็น 12 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุด จำนวน 8 isolates อาจแสดงว่าที่มาของแต่ละ isolate ที่พบในพื้นที่กรุงเทพมหานครมีความใกล้เคียงกันสูง ส่วนค่า minimum inhibitory concentration (MIC) range ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ทั้ง 20 isolates มีดังนี้ ampicillin 0.5-1 µg/mL, penicillin 0.5-2 µg/mL, ciprofloxacin 1-16 µg/mL, gentamicin 0.25-0.5 µg/mL, erythromycin 0.25-0.5 µg/mL, tetracycline 0.5-64 µg/mL และ trimethoprim/sulfamethoxazole <0.125/2.375 µg/mL แสดงว่าเชื้อ *L. monocytogenes* ที่พบในกรุงเทพมหานครในช่วงปี 2549-2550 ยังคงมีความไวสูงต่อยาต้านจุลชีพที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามมีเชื้อที่ดื้อต่อยา penicillin และ tetracycline อย่างละ 1 isolate และที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin 7 isolates ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและติดตามเชื้อดื้อยาต่อไป

คำสำคัญ: แบบแผนทางพันธุกรรม, ความไวต่อยาต้านจุลชีพ, *Listeria monocytogenes*, pulsed field gel electrophoresis

บทนำ

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก พบแพร่กระจายได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม มูลสัตว์ น้ำเสีย ดิน แหล่งน้ำ ผัก หนุ่ยหมัก หรือแม้แต่ในอุจจาระคน เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม psychrophilic bacteria คือ สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 5°C โดยที่ *L. monocytogenes* เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 1 - 42 °C ช่วงที่เหมาะสมคือ 30 - 37 °C ส่วนความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ pH 5.0 - 9.0 นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเค็มร้อยละ 10 (Ryser and Marth, 1991) *L. monocytogenes* เป็นสาเหตุของโรค listeriosis ในสัตว์หลายชนิด รวมทั้งในคน ซึ่งจะทำให้มีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ เช่น มีไข้ ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสีย บางครั้งจะมีอาการสมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ คิดเชื่อในกระแสเลือด การคิดเชื่อในมดลูกและช่องคลอด ทำให้หญิงมีครรภ์แท้งหรือทารกแรกคลอดเสียชีวิตได้ (Seeliger and Finger, 1983) ผู้ป่วยแสดงอาการได้ตั้งแต่หลายวันจนถึงหลายสัปดาห์ โดยติดต่อจากการสัมผัสแหล่งรังโรคในธรรมชาติ หรืออาจเกิดจากคนหรือสัตว์ที่คิดเชื่อ แต่ส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหาร เช่น อาหารที่มีส่วนผสมของนํ้านมดิบ เนยแข็ง เนือบด ผักดิบ (Schlech et al., 1983; Fleming et al., 1985; James et al., 1985; Piffaretti et al., 1989) ได้มีการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในเนื้อไก่ในหลายประเทศ พบอัตราการปนเปื้อนของเชื้อที่แตกต่างกันไป เช่น ในสหราชอาณาจักรพบการปนเปื้อนในเนื้อไก่ดิบสูงถึง 60% (Pini and Gilbert, 1988) ในประเทศฟินแลนด์พบ 62% (Miettinen et al., 2001) ในประเทศนอร์เวย์พบการปนเปื้อนในเนื้อไก่ดิบ 50% (Rorvik et al., 2003) และประเทศโปรตุเกสพบ 41% (Antunes et al., 2002) ส่วนที่ประเทศญี่ปุ่นพบ 15% (Okutani et al., 2004) Rocourt and Lossart (1997) ตั้งข้อสังเกตไว้ว่า มักจะมีรายงานการพบเชื้อ *L. monocytogenes* ในประเทศอุตสาหกรรม (industrialized country) แถบยุโรปและอเมริกาเหนือ แต่ไม่มีรายงานในแถบเอเชียและแอฟริกา อาจมีสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับชนิดของอาหาร วัฒนธรรมการบริโภค ตลอดจนเทคโนโลยีการเก็บและถนอมอาหารที่แตกต่างกัน หรืออาจเป็นเพราะขาดการตรวจสอบรวมทั้งข้อจำกัดด้านความสามารถของห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการสำรวจเชื้อนี้ในประเทศเขตร้อนมากขึ้น โดยพบอัตราการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างเนื้อไก่สดหรือแช่แข็ง เพียง 1% ในประเทศอิรัก (Molla et al., 2004), 2.5-7.5% ในประเทศปากีสถาน (Mahmood et al., 2003), 8.5% ในประเทศอินเดีย (Kalorey et al., 2005)

คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจหาอัตราการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในเนื้อเป็ดและเนื้อไก่ดิบที่วางขายตามแผงในตลาดสดต่าง ๆ ในเขตกรุงเทพมหานคร โดยทำการเก็บตัวอย่างเมื่อปี 2549-2550 สามารถแยกเชื้อ *L. monocytogenes* จากเนื้อไก่ได้ 5.85% (10/171) ในปี 2549 และ 3.65% (11/301) ในปี 2550 แต่ไม่พบว่ามี การปนเปื้อนในเนื้อเป็ด (พัชร และคณะ, 2552) จึงได้นำเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เพาะแยกได้จำนวน 20 isolates จากการศึกษาดังกล่าวมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิค pulsed field gel electrophoresis และศึกษาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยา เชื้อดื้อยาและชนิดของยาที่เหมาะสมในการรักษา ซึ่งเป็นการเฝ้าระวังโรคและเป็นประโยชน์ทางด้านสัตวแพทยสาธารณสุขในการดูแลสุขภาพและอนามัยของผู้บริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อ *L. monocytogenes*

นำเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เพาะแยกได้จากเนื้อไก่ที่ทำการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อจากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร เมื่อปี 2549-2550 จำนวน 20 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C มาเพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar บ่มที่ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

การทำ pulsed field gel electrophoresis

ดัดแปลงจากวิธีการของ Louie และคณะ (1996) มีวิธีการดังนี้ เชื้อเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เพาะบน 5% sheep blood agar ใส่ลงในหลอดปั่น 1.5 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับ suspension buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1M NaCl) ปริมาณ 750 µl โดยให้ได้ค่า OD ที่ 610 นาโนเมตร เท่ากับ 1.3 จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที 2 ครั้ง เพื่อล้างตะกอน เติม suspension buffer 750 µl ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย เติม 1.6% low melting agarose ปริมาณเท่ากัน ผสมให้เข้ากัน หยดใส่แม่พิมพ์ (plug mould) ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว หลังจากนั้นนำชิ้น agarose plug ไปผ่านขบวนการเตรียม genomic DNA โดยแช่ไว้ในสารละลายที่ประกอบด้วย 6 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM EDTA pH 9, 0.5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% lauroyl sarcosine และ 1 mg/mL lysozyme บ่มที่ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายเดิมออก เปลี่ยนเป็นสารละลาย 0.5 M EDTA pH 9, 0.5% lauroyl sarcosine, และ 100 µg/mL proteinase K บ่มที่ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง plug ด้วยสารละลาย TE 5 ครั้ง ที่ 50 °C ทุก 15 นาที ใช้ restriction enzyme *ApaI* (20U) บ่มที่ 25 °C ช้ามคืน หรือ *SmaI* (20U) หรือ *AscI* (20U) บ่มที่ 37 °C ช้ามคืน ดัดย่อย genomic DNA ออกชิ้นส่วนต่าง ๆ หลังจากนั้นล้างเอนไซม์ออกด้วยสารละลาย 0.5% TBE แล้ว นำ plug ไปใส่ในหลุมบนแผ่นเจล 1% PFGE agarose เข้าเครื่อง CHEF-DR® III (Biorad, USA.) ใช้ pulse time 4s-40s สำหรับ *ApaI* หรือ 0.2s-25s สำหรับ *SmaI* หรือ 1s-35s สำหรับ *AscI* กระแสไฟฟ้า 200 V ที่ 14 °C ใน 0.5% TBE นาน 22 ชั่วโมง, 20 ชั่วโมง หรือ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ เสร็จแล้วนำแผ่นเจลไปย้อมสีในสารละลาย EtBr 0.5 µg/mL นาน 15 นาที อ่านผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง GelDoc. It (UVP, USA.) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Bio-Profil - Bio-1D++ (Vilber Lourmat, Germany)

การทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

เชื้อเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เพาะไว้ isolate ละ 1 โคโลนี และเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (ควบคุมวิธีการทดสอบ) มาเพาะลงบน tryptic soy agar และ 5% sheep blood agar ตามลำดับ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 – 20 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth microdilution ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standard Institute หรือ CLSI (CLSI, 2006; CLSI, 2009) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ cation-adjusted Mueller-Hinton broth ที่เติม 2.5% lysed horse blood ผสมกับยาต้านจุลชีพ โดยให้มีระดับความเข้มข้นของยาใน

อาหารเลี้ยงเชื้อ เริ่มจาก 64, 32, 16.... จนถึง 0.125 µg/mL ส่วน trimethoprim/sulfamethoxazole ระดับความเข้มข้นของยาเริ่มจาก 64/ 1,216, 32/ 608, 16/304.... จนถึง 0.125/ 2,375 µg/mL จากนั้นปรับปริมาณเชื้อแต่ละ isolate ให้มีความเข้มข้นในแต่ละหลุมของ microtiter plate เท่ากับ 5×10^5 CFU/ mL โดยทำการทดสอบดังนี้ คอลัมน์ที่ 1 ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น (sterility check) คอลัมน์ที่ 2 – 11 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับยาด้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้น 0.125 – 64 µg/mL ตามลำดับ คอลัมน์ที่ 12 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมกับยาด้านจุลชีพเพื่อตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ (growth control) แถวที่ 1 – 7 เติมเชื้อแต่ละ isolate ให้มีความเข้มข้น 5×10^5 CFU/ mL ทุกหลุม แถวที่ 8 เติมเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/ mL ทุกหลุม จากนั้นปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 – 24 ชั่วโมง

ยาด้านจุลชีพ

ละลายยาด้านจุลชีพ 7 ชนิด คือ ampicillin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, penicillin, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole ในตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วปรับระดับความเข้มข้นของยาให้ได้ 5,120 µg/mL จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C จนกว่าจะใช้งาน

การอ่านผล

นำ microtiter plate มาตรวจดูการมีชีวิตของเชื้อและการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นก่อน ถ้าไม่พบการเจริญของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นต้องทำการทดสอบใหม่ ถ้าพบการเจริญเติบโตของเชื้อทุก isolate และไม่มีการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น ก็จะอ่านผลโดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตขึ้นบน microtiter plate เป็นค่า MIC

ผล

แบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ *L. monocytogenes*

จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApaI* ในการตัดย่อย genomic DNA ของเชื้อ *L. monocytogenes* และตรวจสอบแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน 20 isolates โดยการผ่านกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง pulsed field gel electrophoresis พบแบบแผนทางพันธุกรรม 9 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุด มี 11 isolates รูปแบบที่ 3 มี 2 isolates ส่วน 7 รูปแบบที่เหลือเป็น single isolate (Fig. 1) เอนไซม์ *SmaI* สามารถตัด genomic DNA ของเชื้อได้ 19 isolates จำแนกได้เป็น 10 รูปแบบ พบรูปแบบที่ 1 มากที่สุด มี 9 isolates รูปแบบที่ 5 มี 2 isolates ส่วน 8 รูปแบบที่เหลือเป็น single isolate (Fig. 2) เอนไซม์ *AscI* สามารถตัด genomic DNA ของเชื้อได้ทั้ง 20 isolates จำแนกได้เป็น 7 รูปแบบ พบรูปแบบที่ 1 มากที่สุด มี 12 isolates รูปแบบที่ 2 มี 3 isolates ส่วน 5 รูปแบบที่เหลือเป็น single isolate (Fig. 3)

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *L. monocytogenes* ทั้ง 20 isolates จากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จะจำแนกแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อได้เป็น 12 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 1 มากที่สุด มี 8 isolates (Table 1)

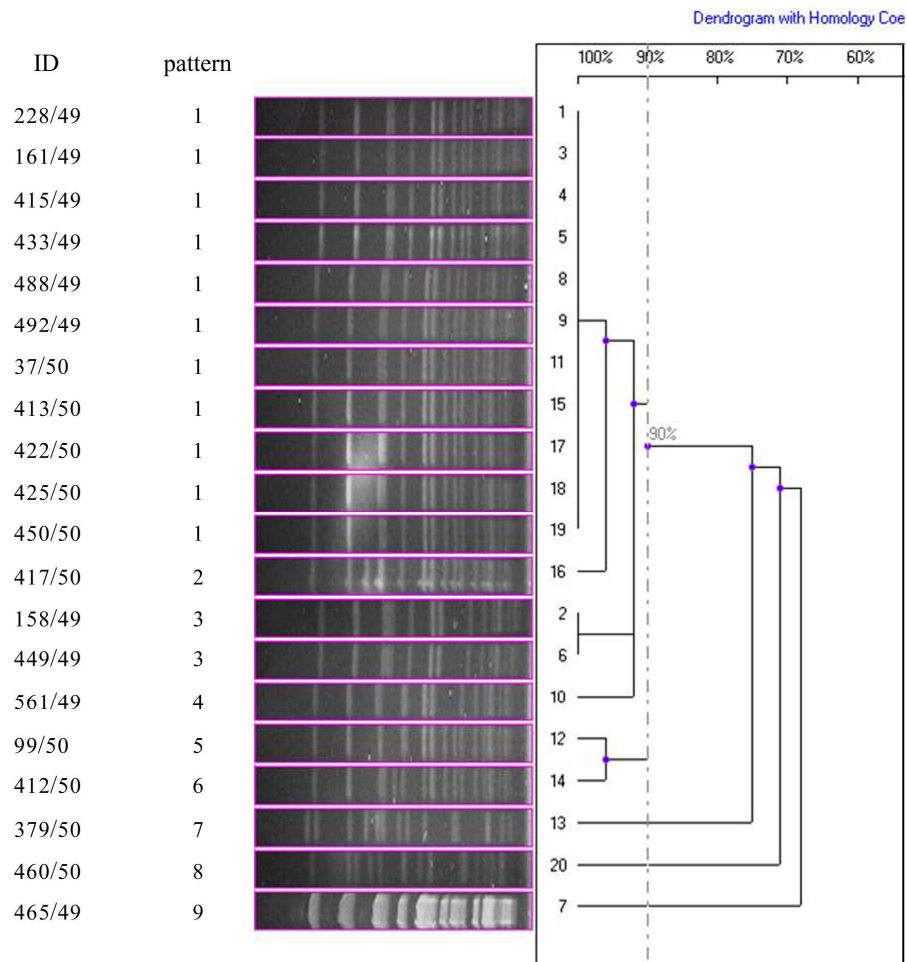


Fig. 1 Dendrogram showing 9 different patterns derived from PFGE of *ApaI*- restricted genomic DNA from *L. monocytogenes* 20 isolates obtained from chicken meat in fresh market in Bangkok during 2006-2007 (with Homology coefficient 2.5% UPGMA)

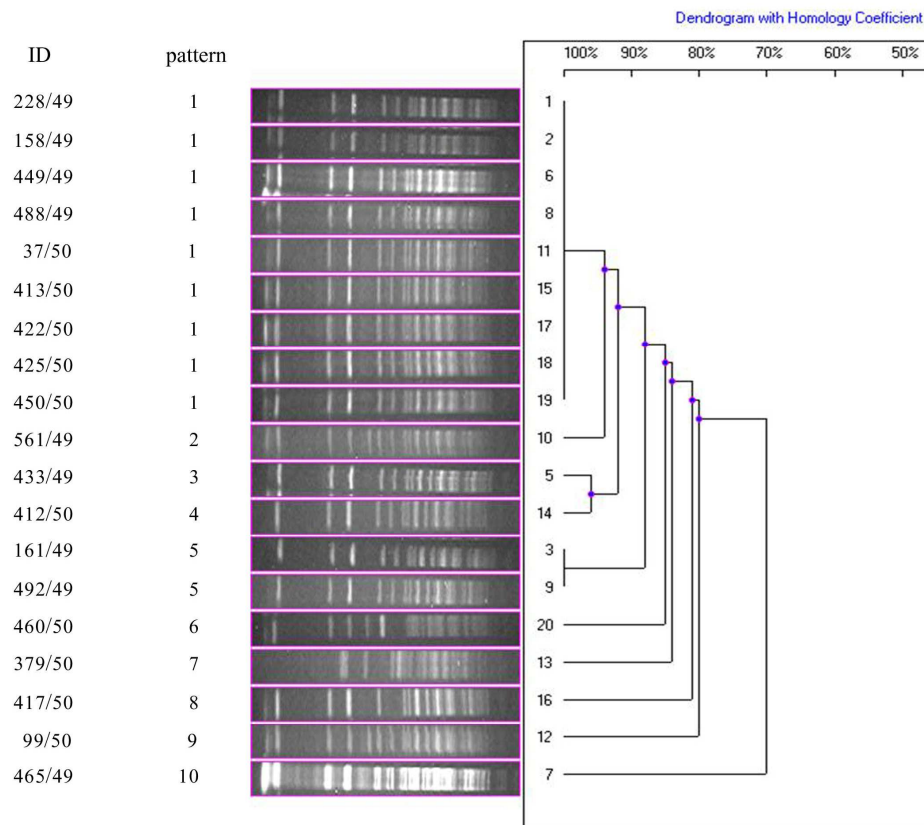


Fig. 2 Dendrogram showing 10 patterns PFGE of *SmaI*- restricted genomic DNA from *L. monocytogenes* 19 isolates obtained from chicken meat in fresh market in Bangkok during 2006-2007 (with Homology coefficient 2.5% UPGMA)

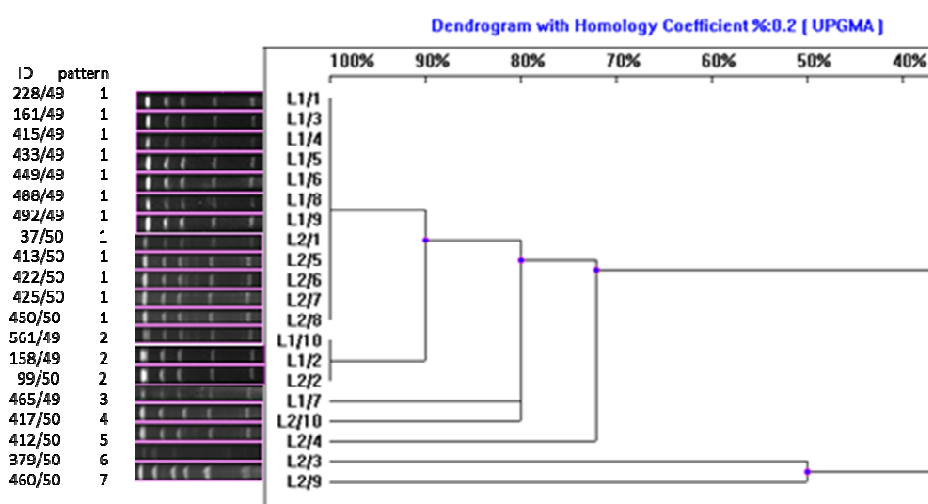


Fig. 3 Dendrogram showing 7 patterns PFGE of *AscI*- restricted genomic DNA from *L. monocytogenes* 20 isolates obtained from chicken meat in fresh market in Bangkok during 2006-2007

ความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC)

ค่า MIC range ของยาด้านจุลชีพต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ทั้ง 20 isolates มีดังต่อไปนี้ ampicillin 0.5-1 µg/mL, penicillin 0.5-2 µg/mL, ciprofloxacin 1-16 µg/mL, gentamicin 0.25-0.5 µg/mL, erythromycin 0.25-0.5 µg/mL, tetracycline 0.5-64 µg/mL และ trimethoprim/sulfamethoxazole <0.125/2.375 µg/mL รวมทั้งค่า MIC 50 และ MIC 90 แสดงไว้ใน Table 1

Table 1 Combined PFGE patterns and MIC of Antimicrobial agents against *L. monocytogenes*

20 isolates obtained from chicken meat samples collected from various fresh markets in Bangkok during 2006-2007

ID No.	market	PFGE pattern	MIC (µg/mL)						
			ampicillin	penicillin	ciprofloxacin	gentamicin	erythromycin	tetracycline	Trimet/sulfamet
158/49	รุ่งเจริญ	2	1	0.5	1	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
161/49	รุ่งเจริญ	3	1	1	1	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
228/49	ลาดพร้าวสะพาน2	1	1	0.5	1	0.25	0.25	1	<0.125/2.375
449/49	ลาดพร้าวสะพาน2	5	1	1	1	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
415/49	ลานบุญ	1	1	1	1	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
433/49	รวมใจ	4	1	1	8	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
465/49	วัดศรีเขมา	6	1	1	1	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
488/49	เงินวิจิตร	1	1	1	8	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
492/49	เงินวิจิตร	3	1	1	8	0.5	0.5	1	<0.125/2.375
561/49	แฮปปี้แลนด์	7	1	1	1	0.25	0.25	1	<0.125/2.375
37/50	อุดมสุขพัฒนา	1	1	1	16	0.5	0.25	0.5	<0.125/2.375
99/50	มณีพิมาณ	8	1	1	4	0.25	0.25	1	<0.125/2.375
379/50	คลองเตย	9	1	0.5	1	0.25	0.5	64	<0.125/2.375
412/50	การเคหะธนฯ	10	1	1	8	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
413/50	การเคหะธนฯ	1	1	1	8	0.5	0.5	1	<0.125/2.375
417/50	ดาวคะนอง	11	1	1	1	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
422/50	บางปะกอก	1	1	1	4	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
425/50	บางปะกอก	1	1	1	8	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
450/50	บางกะปิ	1	1	2	2	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
460/50	พรานนก	12	0.5	0.5	1	0.25	0.5	0.5	<0.125/2.375
No. of PFGE pattern		12							
MIC range			0.5-1	0.5-2	1-16	0.25-0.5	0.25-0.5	0.5-64	<0.125/2.375
MIC 50			1	1	1	0.25	0.5	1	<0.125/2.375
MIC 90			1	1	8	0.5	0.5	1	<0.125/2.375

วิจารณ์

การศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยการจำแนกซีโรไทป์มักจะใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากเป็นวิธีการจำแนกในระดับเป็นกลุ่มมากกว่าในระดับสายพันธุ์ ประกอบกับซีโรไทป์ของเชื้อที่พบบ่อยในคน อาหาร และสิ่งแวดล้อมมักจะจำกัดเฉพาะบางซีโรไทป์ (Norrung and Gerner-Smidt, 1993) Louie และคณะ (1996) กล่าวว่า การศึกษาแบบแผน DNA ของเชื้อด้วยเทคนิค AP-PCR หรือ PFGE เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาด้านระบาดวิทยาได้ดี กล่าวคือสามารถแยก isolate ที่ก่อให้เกิดการระบาดออกจากเชื้อที่เป็นการพบทั่วไปเป็นครั้งคราวได้ Nakama และคณะ (1998) ใช้เทคนิค PFGE โดยการตัด genomic DNA ของเชื้อด้วยเอนไซม์ถึง 4 ชนิด สรุปว่า การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ จะไม่เพียงพอในการแยกเชื้อในระดับสายพันธุ์ จากการศึกษาเชื้อ *L. monocytogenes* 40 isolates ด้วยเอนไซม์ *Apal*, *AscI*, *SmaI* หรือ *Sse8387I* เพียงตัวเดียว จำแนกเชื้อได้เป็น 24, 26, 26 และ 21 รูปแบบตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์แบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเอนไซม์ทุกตัวร่วมกัน จะแยกเชื้อออกได้เป็น 28 รูปแบบ โดยแยกเชื้อที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันได้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น การสอบสวนระบาดวิทยาของการระบาดของโรค listeriosis โดยการศึกษาแบบแผนของเชื้อย้อนหลัง สนับสนุนการใช้เอนไซม์อย่างน้อยสองชนิดในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ เนื่องจากการพบแบบแผนที่แตกต่างกันแม้เพียงเล็กน้อยจะยืนยันว่าไม่ใช่เป็นเชื้อจากการระบาดครั้งเดียว แต่น่าจะเป็นการระบาดในรอบสองมากกว่า (Graves et al., 2005) ส่วนการติดตามการติดเชื้อ *L. monocytogenes* เข้าซากในโรงงานผลิตนม หรือโรงงานแปรรูปอาหาร โดยนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษา PFGE หากพบว่าแม้จะแยกเชื้อได้ในเวลาที่ต่างกัน นับเป็นเดือนหรือเกือบปี ก็ยังพบแบบแผนทางพันธุกรรมที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน บ่งชี้ได้ถึงการหลงเหลือของเชื้อเดิมตามเครื่องมือหรือสิ่งแวดล้อมในโรงงานกลับมาปนเปื้อน (recurrent) ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ใหม่ (Harvey and Gilmore, 2001)

การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากเนื้อไก่ที่เก็บจากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร ครั้งนี้ ใช้เทคนิค PFGE โดยวิเคราะห์เอนไซม์ 3 ชนิดร่วมกัน สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อได้มากกว่าการใช้เอนไซม์เพียงหนึ่งหรือสองชนิด โดยพบว่าเชื้อจำนวน 20 isolates สามารถจำแนกได้ 12 รูปแบบ ซึ่งอย่างน้อย 5-7 รูปแบบมีแบบแผนที่ใกล้เคียงกันมากอาจแสดงว่า isolate ที่พบแต่ละแห่งในพื้นที่กรุงเทพมหานครมีความใกล้เคียงกันสูง สอดคล้องกับการศึกษาของ Fugett และคณะ (2007) แยกแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้ในสหรัฐอเมริกาพบว่า เชื้อบาง isolate มีความจำเพาะต่อพื้นที่ เช่น เชื้อที่พบทั้งในคน อาหาร ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ และในสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ตอนกลางและตะวันตก และ ใจกลางเมืองของรัฐนิวยอร์กจะมีแบบแผนที่เหมือนและใกล้เคียงกัน ในขณะที่เชื้อที่พบในเขตตะวันออกของรัฐจะมีอีกรูปแบบหนึ่ง ซึ่งน่าจะแสดงถึงความเกี่ยวเนื่องของแหล่งที่มาของเชื่อนั่นเอง การศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในหลาย ๆ งานวิจัย พบว่าเชื้อมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก แตกต่างจากการสำรวจในครั้งนี้ แต่การศึกษาในประเทศสเปนของ Garrido et al. (2009) สำรวจและจำแนกเชื้อ *L. monocytogenes* จากอาหารปรุงสำเร็จพร้อม

รับประทาน ในปี 2003-2005 แยกเชื้อได้จากตัวอย่างที่มาจากตลาดสด 45 isolates และศึกษาร่วมกับเชื้อที่เคยแยกได้ในปี 1995-2002 อีก 42 isolates จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้เป็น 20 รูปแบบ รูปแบบที่พบมากที่สุดมี 10 isolates เป็นเชื้อที่แยกได้จากปี 2002-2005 และรูปแบบที่พบรองลงมา มี 9 isolates เป็นเชื้อที่แยกได้จากปี 1995-1998 เช่นเดียวกับการศึกษาในเมือง Abruzzo ประเทศอิตาลีของ Acciari และคณะ (2011) ทำการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากเนยแข็งชนิดอ่อนและชนิดกึ่งอ่อน 5 ชนิด ในระหว่างเดือนมีนาคม 2005 ถึงเดือนตุลาคม 2006 โดยเก็บตัวอย่างจากร้านค้า 39 ร้าน จำนวน 42 isolates จำแนกได้เป็น 11 รูปแบบ รูปแบบที่พบมากที่สุดมี 27 isolates พบทั้งจากเนยแข็งหลากหลายชนิดและเก็บต่างช่วงเวลาและสถานที่ รูปแบบที่พบรองลงามี 10 isolates พบจากตัวอย่างที่หลากหลายเช่นกัน การพบรูปแบบหนึ่งใดเป็นจำนวนมาก ๆ ในพื้นที่ใด อาจแสดงถึงความจำเพาะของ isolate นั้นในแต่ละพื้นที่นั้นเช่นกัน

ส่วนความไวของเชื้อ *L. monocytogenes* ต่อยาต้านจุลชีพ มีผู้ทำการศึกษาค่อนข้างมากทั้งในเชื้อที่พบจากผู้ป่วย สัตว์ป่วย และจากอาหาร Hansen และคณะ (2005) นำเชื้อที่แยกได้จากเลือดและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยในประเทศเดนมาร์ก ตั้งแต่ปี 1958-2001 พบว่าระดับความไวต่อเชื้อของยา erythromycin, penicillin, ampicillin, gentamicin และ ciprofloxacin อยู่ในระดับสูงและมี MIC range ของเชื้อในช่วงปีแรกไม่ต่างจากเชื้อที่แยกได้ในช่วงหลัง เช่นเดียวกับเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากอาหาร ในประเทศเดนมาร์ก จำนวน 114 isolates พบว่าเชื้อยังคงไวต่อยา erythromycin, penicillin, ciprofloxacin และ tetracycline (Aarestrup et al., 2007) ส่วน Vela และคณะ (2001) หาค่าความไวของเชื้อที่แยกได้จากแกะที่เป็นโรค listeriosis และจากอาหารสัตว์ พบว่าเชื้อทั้งหมดยังไวต่อยา penicillin, erythromycin, gentamicin และ ciprofloxacin แต่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา tetracycline จำนวน 3 isolates คิดเป็น 7.3% ของเชื้อทั้งหมด การศึกษาความไวของเชื้อที่แยกได้สิ่งแวดล้อมภายในฟาร์มโคนมในรัฐเทนเนสซี สหรัฐอเมริกา พบว่าเชื้อยังคงไวต่อยา gentamicin และ erythromycin แต่พบว่าเชื้อบางตัวเริ่มมีการดื้อต่อยา ampicillin, penicillin และ tetracycline (Srinivasan et al., 2005) การศึกษาในประเทศสเปน จากเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และจากอาหารตั้งแต่ปี 1995-2005 เชื้อยังคงไวต่อยา penicillin ampicillin gentamicin แต่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา tetracycline คิดเป็น 1.2% ของเชื้อทั้งหมด (Vitas et al., 2007) เช่นเดียวกับการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น มีทั้งเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย สัตว์ และสิ่งแวดล้อม จำนวน 201 isolates พบเชื้อ 1 isolate ดื้อต่อยา tetracycline (Okada et al., 2011) ส่วน Falavina dos Reis และคณะ (2011) ทดสอบความไวเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศบราซิล ตั้งแต่ปี 1970-2008 จำนวน 68 isolates เชื้อทั้งหมดไวต่อยา ampicillin และ tetracycline สำหรับความไวของเชื้อ *L. monocytogenes* ต่อยาต้านจุลชีพในการศึกษารุ่นนี้ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีความไวต่อยาต้านจุลชีพ ampicillin, erythromycin, gentamicin และ trimethoprim/sulfamethoxazole แต่มีเชื้อที่ดื้อต่อยา penicillin และ tetracycline อย่างละ 1 isolate และมีถึง 7 isolates ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin โดยการเปรียบเทียบ breakpoint ของยาต่อเชื้อ gram positive ตามที่ระบุใน CLSI (NCCLS, 2001; NCCLS, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานข้างต้น ทั้งนี้ ciprofloxacin เป็นยาที่ไม่แนะนำให้ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ

เชื้อ *L. monocytogenes* (Hansen et al., 2005) ส่วนการติดเชื้อยา tetracycline พบได้ทั้งในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย สัตว์ อาหาร และสิ่งแวดล้อม แต่กลไกการติดเชื้อยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากกลไกใด (Vela et al., 2001)

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า เชื้อ *L. monocytogenes* ที่พบในกรุงเทพมหานครในช่วงปี 2549-2550 ยังคงมีความไวสูงต่อยาต้านจุลชีพส่วนใหญ่ แต่ควรมีการเฝ้าระวังและติดตามเชื้อดื้อยาที่อาจมีโอกาสมากขึ้นในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณชยภัค สีบุญ คุณอุบลรัตน์ แทนกลาง ที่ทำหน้าที่ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบความไวเชื้อต้านจุลชีพ คุณฉวีวรรณ ปันคำ และคุณกัทร พรหมโด ที่ช่วยงานด้านเทคนิค PFGE ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- พัชรี ทองคำคุณ พรทิพย์ ศิริวรรณ ชิต ศิริวรรณ. 2552. การสำรวจเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อเป็ด และไก่จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร ระหว่างปี 2549-2550. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 3(3): 268 – 280.
- Aarestrup, F.M., Knochel, S. and Hasman, H. 2007. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* from food products. Foodborne Pathogens and Disease. 4(2): 216-221.
- Acciari, A., Torresi, M., Migliorati, G., Di Giannatale, E., Semprini, P. and Prencipe, V. 2011. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from soft and semi-soft cheeses sampled in a region of Italy. Veterinaria Italiana. 47(1): 15-23.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Pestana, N. and Peixe, L. 2002. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. J. Food Protect. 65(12): 1888-1893.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. 2006. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolates or fastidious bacteria: Approved guideline. CLSI Document M45-A, Vol. 26, No.19, CLSI, Wayne, PA, U.S.A. p. 61.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard. 8th ed. CLSI Document M07-A8, Vol. 29, No. 2, CLSI, Wayne, PA, U.S.A. p. 63.

- Falavina dos Reis, C.M., Barbosa, A.V., Rusak, L.A., Vallim, D.C. and Hofer, E. 2011. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44(2): 173-176.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 312: 404-407.
- Fugett, E.B., Schoonmaker-Bopp, D., Dumas, N.B., Corby, J. and Wiedmann, M. 2007. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, food, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated well as widely distributed PFGE types. J. Clin. Microbiol. 45(3): 865-873.
- Garrido, V., Vitas, A.I. and García-Jalón, I. 2009. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. Food Control. 20: 986-991.
- Graves, L.M., Hunter, S.B., Ong, A.R. Schoonmaker-Bopp, D. Hise, K., Kornstein, L., DeWitt, W., Hayes, P.S., Dunne, E., Mead, P. and Swaminathan, B. 2005. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the Pulsenet network. J. Clin. Microbiol. 43(5): 2350-2355.
- Hansen, J.M., Gerner-Smidt, P. and Brunn, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. APMIS. 113: 31-36.
- Harvey, J. and Gilmore, A. 2001. Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy food s by pulsed field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and Cadmium and antibiotic resistance determination. Appl. Environ. Microbiol. 67(2): 840-847.
- James, S.M., Fannin, S.L., Agee, B.A., Hall, B., Parker, E., Vogt, J., Run, G., Williams, J., Lieb, L., Saminen, C., Prendergast, T., Werner, S.B. and Chin, J. 1985. Listeriosis outbreaks associated with mexican-style cheese California. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 34: 357-359.
- Kalorey, D.R., Barbuddhe, S.B., Kurkure, N.V. and Gunjal, P.S. 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat in Vidharba region of India. Proceedings of the 17th European Symposium on the Quality of Poultry Meat. 2005 May 23 – 26. Doorwerth, The Netherlands. p. 172-173.

- Louie, M., Jayaratne, P., Luchsinger, I. Devenish, J., Yao, J., Schlech, W. and Simor, A. 1996. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed field gel electrophoresis of molecular typing of *Listeria monocytogenes*. J. Clin. Microbiol. 34(1): 15-19.
- Mahmood, M.S., Ahmed, A.N. and Hassain, I. 2003. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat, poultry meat products and other related inanimates at Faisalabad. Pakistan J. Nutr. 2(6): 346-349.
- Miettinen, M.K., Palmu, L., Bjorkroth, K.J. and Korkeala, H., 2001. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant and retail level. J. Food Protect. 64(7): 994-999.
- Molla, B., Yilma, R. and Alemayehu, D. 2004. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail meat and milk products in Addis Ababa, Ethiopia. Ethiop. J. Health Dev. 18(3): 208-212.
- Nakama, A., Matsuda, M., Itoh, T. and Kaneuchi, C. 1998. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan by pulsed field gel electrophoresis. J. Vet. Med. Sci. 60(6): 749-752.
- NCCLS. 2001. Document M100 – S11 performance standards for antimicrobial susceptibility testing-Tenth information supplement. NCCLS, Wayne, PA, U.S.A.
- NCCLS. 2004. Document M2-A8 and M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing-Fourteenth information supplement. NCCLS, Wayne, PA, U.S.A.
- Norrung, B. and Gerner-Smidt, P. 1993. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis (MEE), ribotyping, restriction enzyme analysis (REA) and phage typing of *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. 111: 71-79.
- Okada, Y., Okutani, A., Suzuki, H., Asakura, H., Monden, S., Maruyama, T. and Igimi, S. 2011. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan. J. Vet. Med. Sci. 73(12): 1681 – 1684.
- Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S. 2004. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. Inter. Food Microbiol. 93: 131-140.
- Piffaretti, J.C., Kressebuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J.M., Selander, R.K. and Rocourt, J. 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 86(10): 3818-22.
- Pini, P.N. and Gilbert, R.J. 1988. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Inter. J. Food Microbiol. 6: 317-326.

- Rocourt, J. and Lossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. In: Food Microbiology : Fundamental and Frontiers. Edited by M. P. Doyle, L. R. Beuchat and J. J. Monville. ASM Press, Washington D.C., U.S.A. p. 337 – 352.
- Rorvik, L.M., Aase, B., Alvestad, T. and Caugant, D.A. 2003. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. J. Appl. Microbiol. 94: 633-640.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. 1991. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Marcel Decker Inc, New York, U.S.A. 632 p.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308(4): 203-208.
- Seeliger, H.R.P. and Finger, H. 1983. Listeriosis. In: Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. Edited by J.S. Remington and J. Klein. Saunders. p. 333-365.
- Srinivasan, V., Nam, H.M., Ngugen, L.T., Tamilselvem, B., Murinda, S.E. and Oliver, S.P. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. Foodborne Pathogens and Disease. 2(3): 201-211.
- Vela, A.I., Fernandez-Garayzabal, J.F., Latre, M.V., Rodriguez, A.A., Dominguez, L. and Moreno, M.A. 2001. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. Int. J. Antimicrob. Agents. 17: 215-220.
- Vitas, A.I., Sanchez, R.M., Agudo, V. and Garcia-Jalon, I. 2007. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clicinal cases in Navarra, Spain. J. Food Protect. 70(10): 2402-2406.

Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat from fresh markets in Bangkok

Pacharee Thongkamkoon* Watcharachai Narongsak

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding person: Tel. 02579 8908- 14 ext. 405, email: patchareet@dld.go.th

Abstract

Twenty isolates of *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) obtained from a survey of *L. monocytogenes* contamination in duck and chicken meat collected from fresh market in Bangkok during 2006-2007 were evaluated for genetic diversity by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Combined results from PFGE patterns of *ApaI*, *SmaI* and *AscI* revealed 12 genetic patterns of which pattern 1 predominated and contained 8 isolates, suggesting the existence of high similarity clones around Bangkok areas. Antimicrobial susceptibility testing of these 20 isolates resulted as minimum inhibitory concentration (MIC) ranges as follows: ampicillin 0.5-1 µg/mL, penicillin 0.5-2 µg/mL, ciprofloxacin 1-16 µg/mL, gentamicin 0.25-0.5 µg/mL, erythromycin 0.25-0.5 µg/mL, tetracycline 0.5-64 µg/mL and trimethoprim/sulfamethoxazole <0.125/2.375 µg/mL. In general, most of the isolates were susceptible to the antimicrobials tested. However, resistances to penicillin and tetracycline were found in one isolate each and resistance to ciprofloxacin was found in 7 isolates. Thus, surveillance and monitoring antimicrobial resistant *L. monocytogenes* should be carried out at regular intervals.

Keywords: genetic diversity, antimicrobial susceptibility, *Listeria monocytogenes*,
pulsed field gel electrophoresis