



國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫系研究所

碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

雞隻及其飼養環境來源沙門氏菌抗藥特性調查

Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella* from
Chicken and Its Raising Environment

研究生：莊子昇 撰

Tzu-Sheng Chuang

指導教授：周崇熙 博士

Advisor: Chung-Hsi JiuJiu Chou, Ph.D.

中華民國 102 年 6 月

June, 2013

誌謝



時間過的很快，進入食品衛生安全研究室 303 軍團已經滿三年了，現在已經是實驗室的高年級生，回想剛進實驗室的情形，還歷歷在目。從當時還是一個對獸醫公共衛生及預防醫學懵懵懂懂的學生，經過老師的細心指導，到現在總算稍稍體會了這門學問。首先誠摯的感謝指導教授周崇熙老師，老師悉心的教導使我得以一窺獸醫研究領域的深奧，且不時在課堂上、捷運上、遊覽車上、小吃店裡...討論並指點我正確的方向，使我這些年中獲益匪淺。同時感謝老師不斷提供病例和實驗材料供我研究，才能有此篇論文的完成。

本論文的完成另外亦得感謝的蔡向榮老師、張紹光老師、沈瑞鴻老師、郭鴻志老師給予寶貴的建議和修正方向，使得本論文能夠更完整而嚴謹，在此向各位老師致上最高的謝意。

三年裡的日子，食品衛生安全研究室 303 和人共 107 軍團裡共同的生活點滴，不管在學術上的討論、一起做實驗的革命情感、休息時間的練肖話及晚上軍團們去活大麥當勞的進擊，因為有你們的陪伴及共同砥礪(墮落?)，讓三年的研究所的生活變得絢麗多彩。

感謝揚棋學長和嘉蘭學姊細心的帶我熟悉實驗室的環境，並且細心指導我細菌分離與培養的方法和分子生物的技術，使我獲益良多；感謝添富學長不厭其煩的指出我研究中的缺失，且總能在我迷惘時為我解惑。實驗室的金玉姊、宗承、唐維、庭維、正一、崇玟當然也不能忘記，對我日常生活的關心和在我研究遇到瓶頸時提供我寶貴的意見。在此我也要感謝化學系的林英智老師及師母豐盛的供應，讓我在週四的中午，回到靈裡和大家一同享受主的豐富。承蒙你們的幫助，

我的論文才能順利完成，在此由衷一併誌謝。

最後感謝我的家人對我的支持與愛護，並盡力提供我日常生活所需的一切，才能使我無後顧之憂完成我的學業。在此與你們分享論文完成的喜悅，並將我的報告獻給所有關心我的人。



摘要



沙門氏菌是重要的人畜共通傳染疾病，在飼養環境中很難被清除，其原因是由於許多無症狀的帶原動物藉由糞便間歇性排菌。又因廣泛使用抗菌劑，造成沙門氏菌的抗藥性增加，目前已出現有抗藥性細菌在人畜之間傳播。細菌抗藥性的產生可能是由於染色體的突變，抑或是抗藥性質體或者轉位子的存在加速抗藥性基因散佈。近幾年來又有新的抗藥性基因移動模式被提出，此模式為 *integron*。本研究於 2011-2012 年間，蒐集雞隻及其環境來源沙門氏菌共 22 株，探討菌株是否含有第一型 *integron* 及其相關抗藥特性。調查結果發現，一日齡雛雞沙門氏菌均無偵測出 *integron*，而大於一日齡雞隻及環境樣本則能檢出 *integron*，檢出率分別為 50 % (3/6) 與 75 % (6/8)。抗藥性基因方面，具有 *integron* 的菌株至少能檢測出三種抗藥性基因，而無 *integron* 菌株僅一株能檢測出三種抗藥性基因。一日齡雛雞及大於一日齡雞隻以 *TEM* (57 %, 8/14) 檢出率最高；環境樣本以 *dfrA1* (63 %, 5/8) 及 *PSE* (63 %, 5/8) 檢出率最高。在菌株抗藥性方面，具有 *Integron* 菌株至少對五種抗菌劑有抗藥性，一日齡雛雞及大於一日齡雞隻以 Ampicillin (86 %, 12/14) 抗藥性最高；環境樣本則以 Ampicillin、Oxytetracycline 及 Tetracycline 抗藥性最高，佔 88 % (7/8)。本研究以統計方式分析出一日齡雛雞的沙門氏菌其多重抗藥性，低於來自飼養環境的沙門氏菌 ($P < 0.05$)。可能原因是由於家禽飼養的過程中廣泛使用抗菌劑，使環境中的沙門氏菌抗藥性愈趨嚴重。另外，具 *integron* 菌株呈現多重抗藥性的比例遠高於不具 *integron* 菌株，顯示 *integron* 與多重抗藥性有密切關係。

ABSTRACT



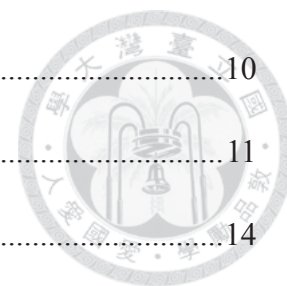
Salmonella is an important zoonotic pathogen that is difficult to control in food animal environment. However abuses of several drugs for the treatment of *Salmonella* infection had resulted in increment of antimicrobial resistance. Recently, there has been emergence of antimicrobial resistance in zoonotic diseases. In pathogenic bacteria, their drug resistance may be procurement by mutation or the transfer of plasmid or transposon. In recent year, many studies have demonstrated mobile DNA elements with a specific structure which obtains or exchanges the antibiotic resistance genes these elements that have been termed integrons. Samples for this study were collected from 2011 to 2012 from chicken and environment in Chicken farms and about 22 bacterial strains were isolated. Further studies on understanding the process of antimicrobial resistance and class 1 integron. The results have shown that no class 1 integron was detected in day old chicks. Chickens and environment samples can be detected integron, the detection rate was 50 % (3/6) and 75 % (6/8). The resistance genes: Integron-positive isolates was capable of detecting at least three types of resistance genes, integron-negative isolates only one was able to detect three types of resistance genes. Day-old chicks and chickens were the highest detection rate of *TEM* (57 %, 8/14). The highest detection rate of environment sample was *dfrA1* (63 %, 5/8) and *PSE* (63 %, 5/8). About antimicrobial resistance, Integron-positive isolates have at least five antimicrobial resistance. Day-old chicks and chickens were the highest detection rate of Ampicillin (86%, 12/14). Ampicillin 、oxytetracycline and tetracycline of environment sample get 88 % (7/8) of resistance. The result of statistical analysis is day-old chicks of resistance *Salmonella* lower than other raising environments ($P<0.05$). Due to the

poultry process, the widespread use of antibacterial agents, increasingly resistant *Salmonella*. Furthermore, The integron-positive strains showed multi-resistance is much higher than the proportion of integron-negative strains. Which shows integron and multi-resistance have close relationship.

目錄



口試委員會審定書	#
誌謝	i
摘要	iii
ABSTRACT	iv
目錄	vi
表次	ix
圖次	x
第一章 緒言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 沙門氏菌簡介	3
2.1.1 沙門氏菌命名與分類	3
2.1.2 沙門氏菌之型態與特性	4
第二節 沙門氏菌分離與鑑定	6
2.2.1 前增菌培養 (pre-enrichment)	6
2.2.2 選擇性增菌培養 (selective enrichment)	6
2.2.3 選擇性鑑別培養 (selective isolation)	7
2.2.4 沙門氏菌之生化學	8
2.2.5 沙門氏菌血清學鑑定	8
第三節 沙門氏菌之流行病學	10
2.3.1 沙門氏菌症	10



2.3.2 人類沙門氏菌之流性病學	10
2.3.3 家禽沙門氏菌症與公共衛生的關係	11
第四節 沙門氏菌之抗藥性問題	14
第五節 沙門氏菌抗藥性基因傳播	17
2.5.1 整合子與基因片匣基本特徵及種類	18
2.5.2 Integron 之流行病學調查	19
2.5.3 基因卡匣之流行病學調查	21
第三章 材料與方法	23
第一節 採樣流程與方法	23
3.1.1 檢體處理	23
第二節 沙門氏菌之分離與生化鑑定	25
3.2.1 沙門氏菌之分離培養	25
3.2.2 沙門氏菌之生化鑑定	25
3.2.3 沙門氏菌血清鑑定	26
第三節 沙門氏菌感受性試驗	29
第四節 以聚合酶鏈鎖反應檢測抗藥性基因	30
3.4.1 Genomic DNA 萃取流程	30
3.4.2 抗藥性基因隻之偵測	31
3.4.3 PCR 產物電泳	34
3.4.4 基因序列電泳分析	34
第五節 以巢式聚合酶鏈鎖反應檢測抗藥性基因是否存在於 integron	35
3.5.1 First round PCR	35

3.5.2 使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit	35
3.5.3 Second round PCR(nested PCR)	36
第六節 統計方法	37
第四章 結果	38
第一節 沙門氏菌分離株血清型的分布	39
第二節 沙門氏菌分離株之藥物感受性試驗結果	40
第三節 沙門氏菌分離株之抗藥性基因偵測	42
第五章 討論	46
第一節 雞場沙門氏菌之汙染率討論	46
第二節 沙門氏菌之血清型分佈	49
第三節 雞隻及環境分離株之抗藥性	52
第四節 雞隻及環境分離株之抗藥性基因	55
第六章 結論	59
第七章 參考文獻	61



表次



Table 1	Reference inhibition zone for antimicrobial resistance test of each tested drug.....	72
Table 2	Primer sequences and annealing temperatures used in the PCR reactions...	73
Table 3	Percentage of susceptibility over drugs for <i>Salmonella</i> at chicken farms	74
Table 4	Antimicrobial resistance of 14 <i>Salmonella</i> from day-old chicks and chickens	75
Table 5	Antimicrobial resistance of 16 <i>Salmonella</i> from day-old chicks and raising environment.....	76
Table 6	Antimicrobial resistance of 14 <i>Salmonella</i> from chickens and raising environment.....	77
Table 7	Multidrug-resistant <i>Salmonella</i> isolates from day-old chicks and chickens	78
Table 8	Multidrug-resistant <i>Salmonella</i> isolates from day-old chicks and raising environment.....	78
Table 9	Association between antibiotic susceptibility profile and integrons in 22 isolates	79

圖次



Fig 1.	PCR amplification of class 1 integrons among different serotypes of <i>Salmonella</i>	80
Fig 2.	Detection of <i>aadA</i> gene in 14 <i>Salmonella</i> isolate from chicken	80
Fig 3.	Detection of <i>dfrA1</i> gene in 14 <i>Salmonella</i> isolate from chicken	81
Fig 4.	Detection of <i>PSE</i> gene in 14 <i>Salmonella</i> isolate from chicken	81
Fig 5.	Detection of <i>Sul</i> gene in 14 <i>Salmonella</i> isolate from chicken.....	82
Fig 6.	Detection of <i>TEM</i> gene in 14 <i>Salmonella</i> isolate from chicken.....	82
Fig 7.	Detection of <i>tetA</i> gene in 14 <i>Salmonella</i> isolate from chicken.....	83
Fig 8.	Detection of <i>tetB</i> gene in 14 <i>Salmonella</i> isolate from environment.....	83
Fig 9.	Detection of <i>aadA</i> gene in 8 <i>Salmonella</i> isolate from environment.....	84
Fig 10.	Detection of <i>dfrA1</i> gene in 8 <i>Salmonella</i> isolate from environment.	84
Fig 11.	Detection of <i>PSE</i> gene in 8 <i>Salmonella</i> isolate from environment	85
Fig 12.	Detection of <i>Sul</i> gene in 8 <i>Salmonella</i> isolate from environment	85
Fig 13.	Detection of <i>TEM</i> gene in 8 <i>Salmonella</i> isolate from environment	86
Fig 14.	Detection of <i>tetA</i> gene in 8 <i>Salmonella</i> isolate from environment.....	86
Fig 15.	Detection of <i>tetB</i> gene in 8 <i>Salmonella</i> isolate from environment.....	87
Fig 16.	2.0 kb cassette array DNA sequence.....	88
Fig 17.	Detection resistance genes from 22 isolates	89

第一章 緒言



沙門氏菌為重要的人類食物媒介性病原菌 (food borne pathogen)，全球每年有 93,800,000 例非傷寒沙門氏菌感染個案，並且有 155,000 個以上的死亡病例，其中約有 80,000,000 是食媒性所引起的 (Majowicz et al., 2010)。沙門氏菌致病機制是由菌體數 (10^6 - 10^8) 及其釋放的內毒素協同作用所致，其潛伏期約 5-72 小時，通常為 12-36 小時，會出現腹部疼痛、下痢、寒顫、發燒、噁心、嘔吐等症狀，嚴重時甚至引起敗血症及造成死亡，這些結果都造成在醫療及經濟上嚴重的損失，在美國一年因沙門氏菌所造成的經濟損失就可高達三億五千萬至一兆五億美元左右 (Food and Drug Administration, 2000)。人類感染沙門氏菌，大部分是因食用到帶有病原菌的禽肉和禽蛋所致 (Cui et al., 2005; Cgen et al., 2002; Phan et al., 2004)；在英國人類受食媒性沙門氏菌之感染，有 67 % 是與雞隻有關 (Wilson, 2002)。

公共衛生上，家禽感染沙門氏菌最易引起人類食物中毒的危機，因此了解雞隻感染情形及各年齡層菌株的相關性，對控制沙門氏菌是相當重要的。雞隻感染沙門氏菌後的臨床症狀包括發熱、食慾不佳、腸胃道疾病、下痢等症狀；被感染的雞隻會有發育遲緩之情形及生產性能降低，進而造成家禽業者經濟損害。在治療細菌感染方面，抗菌劑的廣泛使用，往往伴隨細菌抗藥性的增加以及多重抗藥菌株的頻繁出現，使得用藥治療更加困難。另外，文獻指出家禽及人類的抗藥性沙門氏菌株其結果來源一致，因此推斷人類多重抗藥性的沙門氏菌來源可能為雞隻 (M'ikanatha et al., 2010)。細菌有多重抗藥性產生，已非單純的染色體突變所導致，而是細菌經由不同的機制獲得新的抗藥基因，並在不同的菌種間傳遞抗藥性



(Hall, 1997)。近幾年因抗藥基因序列的解讀，又有新的抗藥基因移動模式被提出，此模式為 integron，其具有主導單一或多個抗藥性基因卡匣嵌入或移出 integron，造成多重抗藥性的產生，integron 亦可位於轉位子、質體或染色體上，而將這些基因傳遞至其他不同種類的細菌上，因此在抗藥性上扮演非常重要的角色。目前 integron 有四型，其中在臨床感染菌株中以第一型 integron 最常見，舉例來說，美國對家禽分離之沙門氏菌進行第一型及第二型 integron 的流行病學調查，其第一型 integron 檢出率為 61.5 %，第二型 integron 為 4.6 % (Goldstein et al., 2001)。綜合上述，本研究探討各年齡層家禽和飼養環境來源的沙門氏菌，是否含有第一型 integron 及相關抗藥特性和抗菌劑感受性的差異，進一步提供預防醫學之參考資訊。

第二章 文獻探討

第一節 沙門氏菌簡介



2.1.1 沙門氏菌命名與分類

1885 年，首度由 Daniel Elmer Salmon 與 Theobald Smith 在豬的小腸分離到此細菌，並以其姓名命名為 *Salmonella*。其後，沙門氏菌不斷的在其他動物身上被發現，而新發現的沙門氏菌則是依據發病動物的種類、發病之情形以及沙門氏菌的生化特性作為其命名之方式，但隨著血清學診斷技術的進步以及不斷有新的沙門氏菌被發現，逐漸以發現地的地名做為血清型命名的依據 (Yan et al., 2003)。至今，已被發現 2555 多種沙門氏菌血清型，其主要根據體表抗原 (somatic, O-antigen)、鞭毛抗原 (flagellar, H- antigen) 和莢膜抗原 (capsular, Vi-antigen) 上的抗原表現不同，並參照 White-Kauffmann-Le Minor Scheme 體系的方法加以分類血清型。現行沙門氏菌屬 (genus) 分成兩個種 (species): *Salmonella enterica* 和 *Salmonella bongori*。

S. bongori 只有一個亞種，稱之為 subspecies V；*S. enterica* 又進一步區分為六個亞種 (Folkesson et al., 2002)：*S. enterica* subsp. *enteric* (或稱 subspecies I)、*S. enterica* subsp. *salmae* (或稱 subspecies II)、*S. enterica* subsp. *arizonae* (或稱 subspecies IIIa)、*S. enterica* subsp. *disrizonae* (或稱 subspecies IIIb)、*S. enterica* subsp. *houtenae* (或稱 subspecies IV) 和 *S. enterica* subsp. *indica* (或稱 subspecies VI)。

根據 WHO 與美國 CDC 建議，全名為 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Typhimurium 的菌種可簡寫為 *Salmonella* serotype Typhimurium 或 *Salmonella* Typhimurium。目前 *S. enterica* subsp. I 最常見於 O 抗原血清群中的 A,

B, C, D 及 E 群，並感染人類及溫血動物，而部分亞型 IIIa 和 IIIb 也可感染人類 (Uzzau et al., 2000)。 *S. enterica* subsp. *salmae*、*S. enterica* subsp. *arizonae*、*S. enterica* subsp. *disrizonae*、*S. enterica* subsp. *houtenae*、*S. enterica* subsp. *indica* 及 *S. bongori* 主要分離來自冷血動物和環境，但是很少分離自人類 (Brenner et al., 2000)。

2.1.2 沙門氏菌之型態與特性

沙門氏菌 (*Salmonella*) 屬於腸內細菌科 (*Enterobacteriaceae*)，為革蘭氏陰性短桿菌，菌體大小長 2.0-2.5 μm ，寬 0.7-1.5 μm ，兩端鈍圓，不形成莢膜和芽孢。多數沙門氏菌具有周鞭毛 (peritrichous flagella) 而有運動性，但家禽傷寒沙門氏菌 (*S. Gallinarum*) 與離白痢沙門氏菌 (*S. Pullorum*) 除外 (Holt et al., 1997)。於瓊脂平盤培養基上生長之沙門氏菌直徑約 2-4 mm。適合沙門氏菌生長之溫度為 35-37 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 值為 6.6-8.2，其具有兼性厭氧的特性，可以在無氧或有氧的環境中生存。在生化性狀方面，沙門氏菌大部份可以發酵葡萄糖、單奶糖、甘露醇、山梨醇、麥芽糖並產生酸和氣體，但沙門氏菌無法發酵乳糖和蔗糖，因此可與其他腸道菌相區別。在 triple sugar iron agar (TSIA) 中產生硫化氫並與鐵離子作用後，產生不溶性沉澱物為硫化鐵；於離胺酸脫羧酶試驗 (lysine decarboxylase test)、鳥胺酸脫羧酶試驗 (ornithine decarboxylase) 及觸酶試驗 (catalase test) 試驗中呈陽性反應；於氧化酶試驗 (oxidase test)、歐普氏試驗 (Voges-Proskauer test)、吲哚試驗 (indole test) 及尿素酶試驗 (urease test) 中呈陰性反應。此外，沙門氏菌廣泛存在於自然界中，能適應之溫度與 pH 值範圍廣泛，在有機物中可存活數週甚至數年不等，糞便內可存活 47 天，肉骨粉中可存活 5-8 個月，在冷凍及乾燥的環境下亦具有抵抗力，但沙門氏菌對高熱、直接陽光照射及常用消毒藥均敏感，60 $^{\circ}\text{C}$

時 15 分鐘可將其殺滅 (Davies et al., 1994、Baudart et al., 2000)。



第二節 沙門氏菌分離與鑑定



依據國際標準組織 (International Organization for Standardization; ISO) 所公佈的食品及動物食品中沙門氏菌分離標準流程 (ISO, 2002)，分成為前增菌培養、選擇性培養及純化等三個步驟，而本實驗亦依照此基準制定分離流程。

2.2.1 前增菌培養 (pre-enrichment)

Edel and Kamelmacher 指出檢體樣本中所含沙門氏菌可能因長期暴露於高熱、乾燥、高濃度的鹽類或者極端 pH 值之下，導致沙門氏菌的受損甚至死亡，再加上樣本遭受到外來的微生物污染所致，使沙門氏菌數量降低，因此需要進行前增菌培養來使受損的沙門氏菌回復正常之生理特性並增加其數量以利於後續的選擇性增菌培養。但對於非活性 (non-viable) 的沙門氏菌，前增菌培養液無法使其發育成長，因此降低了假陽性結果風險 (Myint et al., 2006)。另外，經過前增菌培養後的細菌，也就能夠抵抗選擇性增菌培養液 (selective enrichment) 的毒性 (Chen et al., 1993)。目前常用的前增菌培養液為 Buffered Peptone Water (BPW)，其 pH 值為 5.8-6.4 之間，接近沙門氏菌適宜生長之 pH 值。且研究指出 BPW 對於分離檢體之沙門氏菌的效果比其他的前增菌培養液效果佳 (Hoorfar and Baggesen, 1998)。

2.2.2 選擇性增菌培養 (selective enrichment)

選擇性增菌培養的目的，在於抑制其他細菌但不影響沙門氏菌培養生長之基礎上進行。根據 ISO 公布的標準流程，在使用選擇性增菌培養時需要兩種以上的培養基，常用的選擇性培養基為 Muller-Kauffmann tetrathionate (MKTT) broth 與



Rappaport-Vassiliadis (RV) broth。MKTT broth 中加入 Sodium thiosulfate 和 Tetrathionate 來淘汰不具四硫代硫酸鹽降解酶 (Tetrathionate reductase) 之細菌，而碳酸鈣 (Sodium thiosulfate) 做為緩衝液，此培養液含有膽鹽 (Bile salt)、煌綠 (Brilliant green)、諾伯黴素 (Novobiocin) 等成分，可以抑制大部分的革蘭氏及其他非沙門氏菌的腸道細菌。RV broth 中含有孔雀綠 (Malachite green) 和諾伯黴素分別可抑制真菌及革蘭氏陽性菌的生長；此外，此培養液利用酸性 ($\text{pH} 5.1 \pm 0.2$)、高溫培養 ($41.5 \pm 1^\circ\text{C}$) 及大量氯化鎂形成之酸性、高溫和高滲透壓的環境，來達到有效篩選出沙門氏菌。

2.2.3 選擇性鑑別培養 (selective isolation)

本步驟需使用兩種以上之固態培養基進行培養。在上一步驟中，所使用的選擇性液態培養基，已將當中的雜菌數量大幅降低，並大量增殖沙門氏菌。因此，本步驟將菌液接種至具有特殊成分的選擇性固態培養基上培養，取得疑似沙門氏菌菌落，以利接下來生化性狀鑑定與血清學等工作的進行。目前使用的選擇性培養基包含 Xylosed lysine desoxycholate agar (XLD agar) 與 Bismuth Sulphite agar (BSA agar)；XLD agar 是添加去氧膽酸鈉 (sodium desoxycholate) 來抑制革蘭氏陽性菌，其中離胺酸是用來區別沙門氏菌和其他腸內菌所用，而木糖 (xylose)、乳糖 (lactose) 和蔗糖 (sucrose) 則是做為微生物的碳水化合物來源，當糖類被微生物利用時會產酸，使培養基的外觀變成黃色，但因多數沙門氏菌並不會利用乳糖和蔗糖，因此其產酸程度不及其他腸內菌。另外，沙門氏菌對離胺酸去羧基酶 (decarboxylate lysine) 的作用，使得原本利用木糖產生酸的狀態，回復至鹼性狀態，並在培養基維持紅色型態。沙門氏菌在 XLD 上可產生硫化氫而形成黑色的菌

落，除了造成家禽傷寒沙門氏菌與離白痢沙門氏菌以外，XLD agar 便是以上述的特性來篩選沙門氏菌。在 BSA 方面，BSA 培養基能抑制革蘭氏陽性菌以及大腸桿菌群（coliform），診斷系統主要是依據可發酵葡萄糖的存在，使亞硫酸鹽還原為硫化物，進而形成黑色菌落來篩選沙門氏菌。

2.2.4 沙門氏菌之生化學

經過上述步驟可得到疑似菌落，將疑似菌落釣至非選擇性培養基 Tryptic Soy Agar (TSA) 進行繼代培養，並做進一步生化學與血清學鑑定是否為沙門氏菌。生化檢測的項目包含有醣類發酵、離胺酸脫酸酶、吲哚試驗、運動性及硫化氫產生與否等試驗。常用培養基為 Triple sugar iron (TSI) agar、Sulfide-indole-motility (SIM) medium 和 Lysine decarboxylase broth 等。在 TSI agar 中因沙門氏菌可發酵葡萄糖，但不發酵乳糖及蔗糖特性，形成斜面部份呈紅色，中央和底部則為黃色。另外，此培養基含硫化鐵及硫代硫酸鈉以供給硫離子，讓細菌產生硫化氫。於 SIM agar 為半固態培養基，可同時測硫化氫、吲哚及運動性；吲哚試驗為不產生桃紅色而呈陰性。Lysine decarboxylase broth 為檢測腸內菌是否有去羧基酶，若胺基酸被去羧基化形成鹼性胺，則培養基會回復回來的紫色。確認符合沙門氏菌的生化性狀後，即可進行血清學之鑑定並依照 White-Kauffmann-Le Minor Scheme。

2.2.5 沙門氏菌血清學鑑定

沙門氏菌菌體上之體表抗原 (Somatic antigen; O antigen) 及鞭毛抗原 (Flagella antigen; H antigen) 作為分類之依據。

(1) 體表抗原 (Somatic antigen)

即為 O 抗原，位在菌體外膜表面，主要成分為多醣類 (polysaccharide) 是細菌 lipopolysaccharide 的一部分，會和血清中的特定抗體產生凝集，具有專一性，依據 O 抗原的不同，可將沙門氏菌區分為不同的血清群 (serogroup)：A、B、C1、C2、D1 和 E 等

(2) 鞭毛抗原 (Flagella antigen)

即為 H 抗原，具有專一性，會和特定抗血清 (antisera) 產生凝集，通常具有雙相 (diphase) (Yan et al., 2003)，分別為第一相 (phase I) 及第二相 (phase II)，但有些血清型為單相 (monophase)。沙門氏菌的鞭毛抗原通常並不會兩相一起表現，而是兩相交替出現 (Bonifield and Hughes, 2003)。H 抗原第一相特異性通常較高，書寫則以小寫的英文字母來代表；H 抗原第二相特異性相對較低，書寫則以阿拉伯數字加上小寫的英文字母來表示。另外沙門氏菌中有兩個血清型 *S. Pullorum* 與 *S. Gallinarum*，因不具有鞭毛故無法測出 H 抗原。

(3) 莢膜抗原 (Capsular Virulence antigen)

即為 K 抗原，又可稱毒力抗原，由多醣體組成，能保護細菌免受宿主吞噬細胞破壞，只有少數沙門氏菌具有此抗原，如 *S. Typhi*。進行莢膜抗原測定時，需使用新鮮活菌。

第三節 沙門氏菌之流行病學



2.3.1 沙門氏菌症

沙門氏菌為重要的人畜共通病原菌，且廣泛存在環境中，一直都是重要的公共議題 (Mead et al., 1999)。多數已開發國家，儘管已有良好的食品衛生規範，但人類食用到受沙門氏菌汙染之肉、肉製品、蛋和蛋製品而感染的病例仍時有所聞。人類感染沙門氏菌的臨床症狀，會隨不同的血清型而有不同的表現，一般主要分為四型：(1)腸熱症或傷寒型 (enteric fever or typhoid fever)，主要是由感染 *S. Typhi* 而引起，另外 *S. Paratyphi A*、*S. Paratyphi B*、*S. Paratyphi C* 等沙門氏菌則會引起症狀較輕微之副傷寒；(2)腸胃炎型 (gastroenteritis)，大多是因感染 *S. Typhimurium*、*S. Enteritidis* 及 *S. Derby* 等血清型之沙門氏菌所引起；(3)菌血症型 (bacteremia)，由 *S. Choleraesuis* 所引起；(4)無症狀感染型 (subclinical infections)，受到緊迫，如併發症感染或口服抗生素治療進而發病 (Arun, 2008)。其致病機轉，主要於小腸、結腸和盲腸處增殖，並附著於腸黏膜上皮細胞，隨後侵入黏膜下組織，使腸黏膜發生炎症反應，並在胃腸道造成胃腸炎，當沙門氏菌在經淋巴組織並藉由淋巴組織散播，進入血液循環時則引起菌血症而造成全身性的感染。

2.3.2 人類沙門氏菌之流行病學

美國疾病管制局指出於 2009 年，沙門氏菌所造成之食因性疾病爆發案例都較其他食媒菌多 (CDC, 2010)。在歐盟 2004 年，人畜共通傳染病有 40 萬多件，其中又以沙門氏菌 192,000 件最為嚴重。2010 年文獻指出，全球每年感染非傷寒沙門氏菌引起的腸胃炎約有 9380 萬件病例，其中有 8000 萬件是與食媒性疾病相關，



且約有 155,000 因感染非傷寒沙門氏菌症而死亡 (Majowicz et al., 2010)。目前已知有 200 種血清型別會感染人類而導致沙門氏菌症，常見的血清型別有 *S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*、*S. Virchow*、*S. Newport*、*S. Agona*、*S. Hadar*、*S. Heidelberg*、*S. Choleraesuis* 等，而在這血清型又以 *S. Enteritidis* 及 *S. Typhimurium* 感染率最多 (Schoeni et al., 1995)。在泰國方面，1993 到 2002 年間人類最常見之血清型分別為 *S. Weltevreden*、*S. Enteritidis*、*S. Anatum* 和 *S. Derby* (Bangtrakulnonth et al., 2004)。在日本方面，1995 到 2005 年間人類病患檢出沙門氏菌之最常見的血清型為 *S. Enteritidis*、*S. Weltevreden* 和 *S. Bareilly* (Kudaka et al., 2006)。在巴西方面，1996 到 2003 年間人類所分離之血清型以 *S. Enteritidis* 為最主要的血清型 (Fernandes et al., 2006)。在韓國方面，2010 年人類最常見的血清型為 *S. Enteritidis*、*S. Typhimurium* 和 *S. Typhi* (Oh et al., 2010)。台灣方面，於過去 10 年間，人類常見感染之沙門氏菌血清型為 *S. Typhimurium*、*S. Choleraesuis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Derby*、*S. Newport* (Chiu et al., 1999)，到 2004 年則以 *S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*S. Stanley* 為前 3 名，到最近一次 2009 年，沙門氏菌感染最常見之血清型別，前四名為 *S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*S. Stanley* 及 *S. Newport*，佔全部沙門氏菌感染的 64 % (Chiu et al., 2009)。

2.3.3 家禽沙門氏菌症與公共衛生的關係

人類發生食媒性沙門氏菌，主要來源經常是家禽的肉品及蛋品 (Cox et al., 2000; Nayak and Kenney, 2002)。在英國人類受食媒性沙門氏菌之感染，有 67 % 是與雞隻有關 (Wilson, 2002)。2010 年美國疾病管制局指出，有超過 2752 個沙門氏菌感染報告，當中約 1600 多宗與食用受污染的雞蛋有關。在市售雞肉與病患身

上分離之沙門氏菌，以 *Xba*I 及 *Bln*I 酵素切割後，進行脈衝式電泳分析，條帶圖譜完全相同 (M'ikanatha et al., 2010)。綜合這些結果都顯示家禽製品為傳播沙門氏菌的重要媒介。

家禽是沙門氏菌的重要宿主之一，引起家禽沙門氏菌的病原可區分三類：第一類是對家禽具有宿主專一性和高病原性的血清型，包括 *S. Pullorum* 以及 *S. Gallinarum*，其中 SP 以侵犯雛雞為主，罹病雛雞排出灰白色下痢便，並形成急性敗血症而引發高死亡率；而 SG 以成雞所造成之感染率和死亡率較高。第二類為具侵犯性的血清型，如 *S. Enteritidis* 和 *S. Typhimurium* 之感染症狀較輕微，症狀包括胃腸道疾病、虛弱無力、下痢與生長不良 (Yu et al., 2008)。第三類是非侵犯性的血清型，且通常不會對禽類造成疾病。家禽沙門氏菌的傳播途徑方面，分為水平傳播及垂直傳播兩種，水平傳播的途徑眾多在過去的研究顯示，主要以水平的接觸感染及藉由污染的飼料及飲水食入造成感染；在垂直傳播方面，沙門氏菌經由母雞的輸卵管處感染雞蛋，造成孵化的雛雞在孵化過程遭受感染。家禽文獻指出，採集肉雞場及種雞場之腸炎沙門氏菌進行抗藥性圖譜及 PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) 的比對，發現具有相同的抗菌劑圖譜及 PFGE 圖譜，文獻並表示腸炎沙門氏菌可透過垂直傳播途徑感染雞隻，進而造成雞隻有化膿性關節 (Oh et al., 2010)。Kim 等人於 2007 年在韓國調查肉雞一貫場的沙門氏菌污染模式，從種雞場到屠宰場，分成 A 及 B 兩場進行調查，並各分離 11 株腸炎沙門氏菌進行 PFGE 分析，共分出 5 種不同的圖譜，並發現 1 和 3 的條帶只在 A 場的一貫場出現，而 4 和 5 的條帶只在 B 場的一貫場，這些結果都顯示，不同條帶的差異是與源頭有關 (Kim et al., 2007)。Namata 等人發現，一日齡雛雞被沙門氏菌感染會增加白肉雞族群感染沙門氏菌風險 (Namata et al., 2009)。且幼雞對沙門氏菌之感受性遠大於

成禽，在感染發病時，由於下痢等症狀而消耗成發育遲緩，結果降低生產性，造成家禽業者很大的經濟損害，綜合以上結果，雞隻感染沙門氏菌可能造成下游產業鏈的汙染，因此阻斷病原傳播途徑是控制疫病的重要策略，故了解源頭之汙染來源是很重要的關鍵。

第四節 沙門氏菌之抗藥性問題



另一個重要的議題為抗藥性沙門氏菌的盛行，在過去二十年，各國沙門氏菌均有明顯的抗藥性增長趨勢 (Su et al., 2004)。文獻指出 1980 年至 1987 年沙門氏菌分離株之抗藥性比例由原本 16 % 增加至 29 % (MacDonald et al., 1987)。另沙門氏菌之多重抗藥性，如對 Ampicillin、Chloramphenicol、Kanamycin、Streptomycin、Sulfonamid 及 Tetracycline 等藥物之抗藥性亦有相關文獻報告，其中最常見的為多重抗藥性的鼠傷寒桿菌第 104 確定型 (*Salmonella typhimurium* definitive type 104, DT104)，在 1990 年代首次報告發現對 Ampicillin、Chloramphenicol、Streptomycin、Sulfonamide 及 Tetracycline (R-type, ACSSuT 菌株) 等藥物同時具有抗藥性 (Glynn et al., 1998)。英國在 2002 年，感染沙門氏菌的病人以多重抗藥性 *S. Typhimurium* DT 104 的比例高居第二位，另外在家禽、牛、豬及綿羊也分離出 DT104，因此認為人類感染 DT104 與家畜等肉製品有相關 (Threlfall, 2002)。在美國，1979-1980 年的 *S. Typhimurium* 對五種 ACSSuT 產生抗藥性只有 0.6 %，而到 1996 年上升至 34 %。另外在英格蘭和威爾斯從 1996 年至 2000 年間，在病人身上所分離的 *S. Typhimurium*、*S. Virchow*、*S. Hadar* 對四種以上抗菌劑皆有很高的抗藥性頻率，尤其是 *S. Typhimurium* DT 104；但 *S. Enteritidis* 以及其它血清型別則抗藥性較低 (Threlfall, 2002)。這些動物的抗藥性細菌可透過食物鏈的方式感染人類，而這樣的結果不僅治療上造成困難，且危及動物及人類生命，亦造成醫療支出的增加。

在台灣下痢患者所分離的沙門氏菌，對 ACSSuT 抗菌劑的比例為 41 % (321/798)，其中 *S. Typhimurium* 對 ACSSuT 抗菌劑比例最高為 72.7 % (176/242)、*S. Schwarzengrund* 的比例為 70 % (42/60)、*S. Albany* 的比例為 50 % (18/36)、*S. Choleraesuis* 的比例為 82.4 % (14/17)、*S. Derby* 的比例為 72.7 % (16/22)；另外在



798 株沙門氏菌中，有 2 % 對新合成的 Ciprofloxacin 之抗菌劑有抗藥性，血清型皆為 Schwarzengrund (Lauderdale et al., 2006)。而 Li 等人調查北部醫學中心所分離的 3027 株非傷寒沙門氏菌，有 31 株菌 (1 %) 對 Ceftriaxone 產生抗藥性，其中 16 株菌是屬於沙門氏菌 B 群血清群，9 株菌是屬於沙門氏菌 C 群血清群，4 株菌是屬於沙門氏桿菌 D 群血清群，2 株菌是屬於沙門氏菌 E 群血清群 (Li et al., 2005)。另 Chiu 等人調查 2001-2002 年人類感染沙門氏菌血清群 D 群的分離株，發現對 Ciprofloxacin 和 Ceftriaxone 已具有抗藥性 (Chiu et al., 2004)。目前台灣常見的血清型為 Typhimurium 及 Enteritidis，將其血清型與美國和歐洲的菌株進行抗藥性比較，發現台灣地區的沙門氏菌，多重抗藥性比例較美國及歐洲國家高 (Lauderdale et al., 2006)。

家禽方面，台灣嘉義地區不同雞場採集家禽糞腔拭子進行沙門氏菌之調查，結果陽性分離株對 ACSSuT 抗菌劑具有 27.7 % (46/166) 的抗藥性 (邱, 2005)。另一篇在仿土雞的沙門氏菌，其 ACSSuT 抗菌劑則是佔 17.3 % (44/254) (謝, 2006)。調查中部地區傳統市場及屠宰場仿土雞的沙門氏菌，其菌株對各種抗菌劑均有較高的抗藥性比例，分別為 Ampicillin (79 %)、Colistin (99 %)、Florfenicol (57 %)、Nalidixic acid (91 %)、Sulphamethoxazole/Trimethoprim (74 %) 及 Tetracycline (97 %) (郭, 2007)。在美國調查零售雞隻屠體沙門氏菌之抗藥性結果，發現對 Tetracycline (25 %)、Ampicillin (22.5 %)、Streptomycin (21.25 %)、Cephalothin (18.75 %)、Ceftiofur (16.25 %) 和 Cefoxitin (15 %) 均有抗藥性，有 43.75 % 對 1 種或 1 種以上抗菌劑產生抗藥性，22.5 % 對 1-3 種抗菌劑產生抗藥性，16.25 % 對 4-6 種抗菌劑產生抗藥性，5 % 對 7 種抗菌劑有產生抗藥性；在血清型方面，發現 9 株中有 3 株 S.Berta 對 9 種以上的抗菌劑產生抗藥性，其次是 Typhimurium 和

Kentucky 至少都對 4 種抗菌劑有抗藥性 (Berrang et al., 2006)。另一個研究也同樣調查美國零售雞隻屠體之沙門氏菌抗藥性，結果 31 % 的沙門氏菌對 3 種以上的抗菌劑有抗藥性；另外，家禽菌株與人類分離株，進行 PFGE 的比對，發現其來源一致，因此推斷人類多重抗藥性的沙門氏菌來源可能為雞隻 (M'ikanatha et al., 2010)。

第五節 沙門氏菌抗藥性基因傳播



細菌抗藥性的產生與抗藥基因的取得有密切關係，細菌可經由彼此交換或移動 DNA 來取得抗藥性基因 (Smith and Lewin, 1993)。抗藥性菌株主要分為以下三種：Transformation 攝入外來的 DNA 分子至質體或染色體來進行基因重組，Transduction 主要是透過病毒顆粒將 DNA 送進宿主細胞內的作用，Conjugation 則是透過性線毛來進行質體轉移，將抗藥性傳給另一同屬或不同屬的細菌 (Giedraitienė et al., 2011)。近幾年因抗藥基因序列的解讀，又有新的抗藥基因移動模式提出，並由 Stokes 和 Hall 將此模式命名為 integron (Stokes and Hall 1989)。Integron 是與基因卡匣 (gene cassette) 所組成，且被認為是一種天然的選殖 (cloning) 和表達載體 (vector) (Hall and Collis, 1995)。當時利用限制酶圖譜 (restriction mapping) 及異股 DNA 泳動分析 (heteroduplex analysis) 的實驗結果發現，不同的抗藥基因存在於構造相近的質體 (如 R388 或 pSa)，或是同一個轉位子 (如 Tn21、Tn2603 和 Tn2424)，這樣的結果顯示出，這些基因都被整合在相同基因結構中 (Recchia and Hall, 1995)。而位在 integron 5'端的保守區 (conserved segment) 與 3'端保守區 (conserved segment) 間的抗藥基因，則以基因卡匣 (gene cassette) 稱之。目前已有 80 種以上不同的基因卡匣被確認，包含有 Aminoglycoside、Penicillins、Cephalosporins、Carbapenems、Trimethoprim、Chloramphenicol、Rifampin、Erythromycin 及 Quaternary ammonium compounds，並且數目還可能持續增加中 (Mazel, 2006)。此外單一的 integron 可主導單一或多個抗藥性基因卡匣嵌入或移出 integron，形成多重抗藥性的產生，並且 integron 又可位於轉位子、質體或染色體上，將這些基因傳遞至其他不同種類的細菌上 (Lapierre et al., 2010)。因此，integron 和基因卡匣在臨床菌株抗藥性的快速改變過程中，扮演著非常重要

的角色。



2.5.1 整合子與基因片匣基本特徵及種類

Integron 包括兩端的高度保守片段(conserved segment)和中心變異區(variable region)。中心變異區含有一個或多個基因卡匣，但基因卡匣並非 integron 的必須組成部分。目前已知的 integron 中，都具有三個與此特定部位重組作用與基因表現有關的基本特徵，第一個具有一段 *int* 基因，可轉譯出 integrase 酵素，屬於酪氨酸整合酶家族 (tyrosine-recombinase family)，此為一種特定部位重組作用 (site-specific recombinase)。而第二個為 *att* site，此段基因在 *int* 附近，並受整合酶 (integrase) 所辨識使 DNA 進行重組，形成可容納基因卡匣插入之部位，且整合酶通常藉由調控 *att I* site 及 *attC* site 之間的嵌入和移出，其皆均具有 GTTRRRY 之七個鹼基的保守序列，稱為核心部位，特別在保留度 100 % 的 GTT 在重組作用中扮演著相當重要的角色，因實驗曾以定點突變 (site-directed mutagenesis) 將 GTT 以別的鹼基取代，結果大幅降低重組作用發生的頻率 (Hansson et al., 1997)。第三個具有一個啟動子 (promoter) 負責外來基因卡匣的表現。位在上游-35 和-10 區域的啟動子會因鹼基突變而導致基因卡匣轉錄的改變，轉錄表現大小可相差 20 倍。部分啟動子下游還存在第二起動子 (P2)，以 active 和 inactive 兩種型式存在，並在-35 區及-10 區間插入三個鹼基即形成有轉錄活性的 P2，加強基因卡匣的表現 (Collis and Hall, 1995)。基因卡匣的表現程度與啟動子距離遠近有關，基因卡匣在第一個位置通常比其他下游的基因卡匣表現要強。另外在抗菌劑的選擇壓力下，位在 3'端相對應的抗藥性基因卡匣能通過整合酶的作用接近啟動子 (White et al., 2001)。

Integron 根據整合酶的不同而進行分型，其中與細菌抗藥基因有密切相關的主



要有三型 (Nemergut et al., 2004)。第一型 integron 其 integrase *Int I1* 含有 337 個氨基酸，在 5'端含有 *Int I1*、重組位置 *att I1* 和啟動子，另外有的 integron 還有啟動子 P2 (Hall and Collis, 1995)。第二型 integron 存在於 Tn7 或其他相關轉位子上，其 *int I2* 基因其 open reading frame 內有一個終止密碼存在，可能導致 integrase 基因無法完整的轉譯出 integrase 酵素 (Hansson et al., 2002)。*int I2* 約有 318 個氨基酸與 *Int I1* 有 40 % 的同源性 (Recchia et al., 1995)。第三型 integron 最初由 Arakawa 在耐碳青黴烯類 (imipenem) 抗藥性的粘質沙雷菌 (*Serratia marcescens*) 的質體上發現，其 *int I3* 有 346 個氨基酸與 *Int I1* 有 60 % 的同源性 (Collis et al., 2002)。

在基因卡匣方面，是一種可移動性基因片段，常以環狀的形式獨立存在，並受 integrase 催化嵌入 integron 中，而插入主要發生在 *attC* 和 *att I* 之間，另外基因卡匣並不具有自己的 promoter，而是受到 integron 上的 promoter 所調控。大部分基因卡匣所帶的基因都是抗藥性基因，且種類繁多，例如有多種不同的抗 aminoglycosides、trimethoprim、chloramphenicol 及 β -lactams 藥物之抗藥基因，此外，也有少數基因卡匣攜帶的基因是對消毒劑具抗性，或者其他功能未知 (fluit and Schmitz, 1999)。基因卡匣在長度上並不一致，由兩百多個 base pairs 到一千多個 base pairs 都有，因多數基因卡匣之 gene non-coding 僅佔一小部分，因此 integron 的長度主要是依據所攜帶的抗藥基因多寡所致 (Recchia and Hall, 1995)。

2.5.2 Integron 之流行病學調查

巴西的調查自 1999 年至 2003 年，收集不同來源包含從人類、動物的飼料、家畜動物及食品等來源，分離出 135 株沙門氏菌，並從這 135 株沙門氏菌進行 integron 的檢測，在第一型 integron 沙門氏菌佔 41 %，而第二型 integron 只佔 0.7 %；



另外研究也指出上述的來源，以人類及動物這兩個來源為最常檢測出 *integron* (Peirano et al., 2006)。荷蘭方面的研究，主要來源是從人類及動物分離大腸桿菌、沙門氏菌和彎曲桿菌，並進行第一型、第二型及第三型的 *integron* 流行病學調查，在第一型 *integron* 大腸桿菌佔 76 %，沙門氏菌佔 43 %，彎曲桿菌則沒有偵測出；而第二型 *integron* 之檢測，大腸桿菌下降至 11 %、沙門氏菌也降至 1 %，彎曲桿菌也是一樣沒有檢測出；至於第三型 *integron* 則三種不同的細菌都沒檢測出 (Van Essen-Zandbergen et al., 2007)。智利方面的研究，豬隻分離之沙門氏菌，進行第一型和第二型 *integron* 的比較，結果可見沙門氏菌之 *integron* 以第一型最常被檢測出佔 29 %，但第二型 *integron* 的比例比其他國家所檢測到的第二型 *integron* 較高，佔 17 %；其可能為藥物的使用方式跟其他的國家不一樣，最主要在智利是使用 Streptomycin、Spectinomycin 及 Trimethoprim 這三種抗菌劑，來治療豬隻消化道及呼吸道的疾病，在這些治療的藥物之抗藥基因也出現在 *integron* 的基因卡匣內 (San Martín et al., 2008)。伊朗方面的研究，從病人身上分離出的沙門氏菌，進行第一型、第二型和第三型的 *integron* 比較；其結果 *integron* 以第一型最常被檢測出佔 32 %，但第二型 *integron* 的比例則明顯較低為 13 %，第三型則一樣沒有檢測出 (Tajbakhsh et al., 2012)。在 1997-2000 年間，美國的卡羅納州的 24 間豬場，分離出 30 種非傷寒沙門氏菌之血清型，並進行第一型 *integron* 檢測，其第一型 *integron* 檢測出 Typhimurium、Derby、Muenchen、Worthington、Bere 和 Muenster 等血清型 (Gebreyes et al., 2004)。美國的家禽所分離之沙門氏菌，其第一型 *integron* 檢出率為 61.5 %，而第二型 *integron* 為 4.6 % (Goldstein et al., 2001)。

在臺灣方面 2004 至 2006 年間調查台灣屏東地區某教學醫院，收集病患所分離之沙門氏菌共 215 株，其中 32 株具有第一型 *integron* 的構造，分離菌株之血清



型以 *S. Typhimurium* 所佔比例最高 (75 %, 24/32) (陳, 2008)。於 1997-2006 年間，收集自南台灣地區醫學中心的革蘭氏陰性菌包含有 *Serratia marcescens*、*Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*、*Aeromonas* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Acinetobacter* spp、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Chryseobacterium* spp.、*Burkholderia cepacia*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Sphingobacterium spiritivorum* 等為研究的材料，並利用 PCR 技術檢測試驗菌株帶有第一、二和三型 *integron* 的基因體盛行率，結果第二、三型 *integron* 的檢出率都為 0 %，只在第一型 *integron* 檢測出 (李, 2009)。南台灣豬隻所分離出的 71 株 *Salmonella Choleraesuis*，以第一型 *integron* 檢出率最高為 81.7 %，第二、三型 *integron* 的檢出率為 0 % (Lee et al., 2008)。另外，分別調查 2002 及 2006 年，孵化場絨毛分離之沙門氏菌並進行第一型 *integron* 檢測，於 2002 年檢測出 70 %到 2006 年檢測出 64 %。

2.5.3 基因卡匣之流行病學調查

在臺灣，帶有 *integron* 之菌株所夾帶的抗藥基因，已嚴重威脅臨床上的治療 (Chang et al., 2007)，故本研究進行基因卡匣的流行病學調查。在智利調查豬隻之沙門氏菌，於不同沙門氏菌血清型的第一型 *integron* 都夾帶相同的 *aadA1* (100 %, 10/10) 抗藥基因，通常細菌帶有 *aadA* 抗藥基因都會對 Streptomycin 和 Spectinomycin 這兩類抗菌劑具有抗藥性；而第二型 *integron* 也都夾帶相同的基因排列為 *dfrA1-sat1-aadA1* (100 %, 6/6)，通常細菌帶有 *dfrA1* 抗藥基因對 Trimethoprim 抗菌劑具有抗藥性，另外，細菌帶有 *sat1* 抗藥基因對 Streptothricin 抗菌劑具有抗藥性 (San Martín et al., 2008)。Lapierre 等人指出本文的上篇文獻，在同個地區同一



個物種，但不同年份下，所分離出的沙門氏菌，經檢測及定序第一型 *integron* 之抗藥基因，比過去 2005 年所定序的抗藥基因，多檢測出 *oxa* 及 *dfrA1* 抗藥基因；而第二型則是維持一樣的基因排列方式為 *dfrA1-sat1-aadA1* (Lapierre et al., 2010)。

在荷蘭研究針對不同來源，其基因卡匣有 22 種不同的組合方式，其中第一型 *integron* 的大腸桿菌及沙門氏菌分別有 75 %和 22 %攜帶 *dfrA1-aadA1a* 抗藥基因；而第二型 *integron* 則是 *dfrA-2sat2-aadA1* 抗藥基因出現在大腸桿菌及沙門氏菌裏，分別為 77 %和 50 % (Van Essen-Zandbergen et al., 2007)。在美國北方卡羅納州，發現具有 *integron* 的沙門氏菌有三種血清型分別為 Derby、Muenchen 和 Worthington，皆發現在這些血清型的 *integron* 內出現 *aadA1* 抗藥基因，另外 *oxa30* 為 β -lactamase 抗藥基因，則只出現在 Muenchen 的血清型 (Gebreyes et al., 2004)。

在台灣，針對革蘭氏陰性菌的 *integron* 基因卡匣分析，發現對 Aminoglycosides、Trimethoprim、Sulfamethoxazole、 β -lactam antibiotics、Chloramphenicol、Rifampin、Quaternary compounds 及 Erythromycin 等抗菌劑的抗藥基因存在 *integron* 的基因卡匣內，並依其基因排列有 30 種不同的組合變化，其中 *dfrA12-orfF -aadA2* 之基因片匣排列最常見 (李, 2009)。南臺灣自豬隻所分離的 *S. Choleraesuis*，其 *integron* 所含的基因卡匣以 *dfrA12-orfF -aadA2-Sul1* 最常見，佔 24 % (Hsu et al., 2006)。

綜合上述結果沙門氏菌，第一型 *integron* 基因卡匣內以 *aadA1* 抗藥基因最常見，而第二型 *integron* 基因卡匣內以 *dfrA1-sat1-aadA1* 最常見。

第三章 材料與方法

第一節 採樣流程與方法



本調查於 2011 年 4 月至 2012 年 1 月間（共 9 個月），自中臺灣和北臺灣之種雞場與肉雞場，及國外輸入禽鳥進行一日齡雛雞採樣，樣本共收集 424 隻，其中種雞場一日齡雛雞佔 150 隻，肉雞場一日齡雛雞佔 179 隻，國外輸入之原種一日齡雛雞佔 95 隻進行採樣，其來源國家包括有：美國、加拿大、荷蘭、法國、澳洲等。雛雞採樣每批次分別取 5 至 30 隻不等，每 5 隻視為 1 個樣本，少數 4 隻為 1 個樣本。另外也從本實驗所分離出的 17 株沙門氏菌進行調查，其分離期間也是在 2011 年 4 月至 2012 年 1 月間。

3.1.1 檢體處理

(1) 家禽

一日齡雛雞：收到檢體後，以 75 %酒精噴拭雛雞表面和塑膠盆，並在塑膠盆內操作將雛雞腹腔打開，再以滅菌的剪刀將卵黃囊剪破，取 5 隻於同一無菌採樣袋(whirl-pak bag)中。滅菌量筒分裝 100 ml buffered peptone water (BPW, Acumedia, USA) 倒入無菌採樣袋，以組織均質機或用手拍打 10 秒以上將樣本與 BPW 充分混合，靜置於是室溫下 30 分鐘後，再以吸管輔助器均勻吸取 10 ml 至於 13 ml 養菌管中，放在 37 ± 1 °C 培養箱以轉速 100~140 rpm 鬆蓋培養 18 ± 2 小時。

成禽：以 75 %酒精噴拭雞隻表面，以剪刀剖開雞隻，再以拭子穿刺內臟採樣。每隻雞至少採 3 隻拭子，合併於已盛裝 9 ml BPW 之同一養菌管內，以 vortex

震至棉花鬆開，至於 37 ± 1 °C 培養箱以轉速 100~140 rpm 鬆蓋培養 18 ± 2 小時。



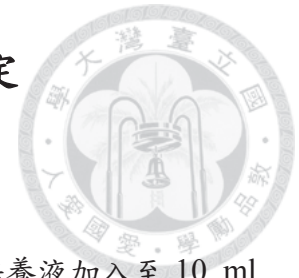
(2) 環境採樣

飼料: 以無菌量筒分裝 225 ml BPW 至滅菌廣口瓶內標示樣本編號。秤取 25 g 飼料倒入廣口瓶內。放置於震盪機上以轉速 100~140 rpm 混均 30 分鐘後，置於 37 ± 1 °C 培養箱以轉速 100~140 rpm 鬆蓋(約 1/4 圈)培養 18 ± 2 小時。

墊料: 以無菌量筒分裝 225 ml BPW 至滅菌廣口瓶內標示樣本編號。秤取 25 g 飼料倒入廣口瓶內。放置於震盪機上以轉速 100~140 rpm 混均 30 分鐘後，置於 37 ± 1 °C 培養箱以轉速 100~140 rpm 鬆蓋(約 1/4 圈)培養 18 ± 2 小時。

鞋套: 採樣後的鞋套一雙放置於鐵胃袋中，取 190 ml BPW 與鞋套使用組織均勻機混和均勻。靜置於室溫下 30 分鐘，以吸管輔助器吸取 10 ml 樣本至 13 ml 養菌管中，置於 37 ± 1 °C 培養箱以轉速 100~140 rpm 鬆蓋培養 18 ± 2 小時。

第二節 沙門氏菌之分離與生化鑑定



3.2.1 沙門氏菌之分離培養

BPW 在經過 18 小時的前增菌培養後，取 0.1 ml 的前增培養液加入至 10 ml Rappaport-Vassiliadis (RV) broth (Difco,USA)，並放置於 41.5 ± 1 °C 的培養箱，以轉速 100~140 rpm 鬆蓋培養 24 ± 3 小時，以及加入 1 ml 的前增培養液至 10 ml Muller-Kauffman tetrathionate (MKTT) broth (Oxoid, UK)，於 37 ± 1 °C 的培養箱，以轉速 100~140 rpm 鬆蓋培養 24 ± 3 小時。接下來將培養後的 RV 與 MKTT broth 的培養液沾取上層菌液，以四區畫法於 xylose lysine deoxycholate (XLD) agar (Difco,USA) 及 bismuth sulfite agar (BSA, Difco,USA)，並放置於 37 °C 培養箱，培養 24 小時觀察菌落型態。XLD 培養基的典型沙門氏菌菌落呈桃紅色菌落，而中央會產生硫化氫 (H_2S)，形成有大而具光澤黑色中心或呈黑色菌落。但離白痢沙門氏菌呈桃紅色菌落，無黑色中心。而部分非典型菌落會形成黃色菌落，有黑色中心。BSA 培養基典型沙門氏菌菌落呈褐色、灰色或黑色，有時會產生金屬光澤；菌落周圍之培養基顏色，起初為褐色，隨著培養時間加長而轉為黑色並產生光環效應。離白痢沙門氏菌呈綠色偏白菌落周圍培養基色澤不變色；部分非典型菌落會形成綠色菌落，周圍培養基色澤稍微變深或不變色。

3.2.2 沙門氏菌之生化鑑定

針對疑似菌落接種在 TSA 上，進行 triple sugar-iron (TSI) agar (Difco,USA)、sulfide-indole-motility (SIM) medium (Remel,USA) 與 lysine decarboxylase broth (Difco,USA) 之生化鑑定：

TSIA: 以接種針挑取單一菌落，穿刺 TSI 培養基至表面下 2/3，抽出後於培養基斜面畫 Z 字型，並培養於 37 °C 培養箱中 24 小時。

SIM: 以接種針挑取單一菌落，並穿刺接種於表面下 2/3。培養 24 小時後，在滴上一滴 Kovacs' indole reagent。

Lysine decarboxylase: 以接種針挑菌落進行接種後，在管內滴礦物油無氧培養。

3.2.3 沙門氏菌血清鑑定

體表抗原（O 抗原）檢測

多價本體（O）抗血清試驗（Polyvalent somatic O test）

- (1) 準備冰桶，抗血清需放置冰上以確保活性。
- (2) 載玻片以酒精擦拭。
- (3) 接種於 TSA 培養基 24±3 小時之菌落，在生物操作櫃中以無菌操作方式進行鑑定。
- (4) 以微量分注器取 5~10 µl *Salmonella* O Antiserum PolyA-I & Vi (Difco, USA) 滴在玻片上，用無菌牙籤或接種環（1 µl），取待測之單一菌落與抗血清混合均勻。
- (5) 玻片前後搖動約 1 分鐘後在光源上觀察結果：
正反應-菌液與本體抗血清產收凝集，並呈沙狀顆粒。
負反應-菌液與本體抗血清均無凝集，並呈霧狀。
- (6) 應於 3 分鐘內完成觀察

單價本體（O）抗血清試驗（Monovalent somatic O test）

陽性樣本將再依序以 *Salmonella* O Antiserum PolyA 到 PolyG、*Salmonella* O

Antiserum Group (A、B、C1、C2、D1、D2、E1、E2 等) 及 *Salmonella* O Antiserum Factor 重複以上檢測步驟，用以檢定菌株之血清群別 (Group) 及單價抗體原 (Factor)，直至確認沙門氏菌菌體抗原。



鞭毛抗原 (H 抗原)

多價鞭毛 (H) 第 I 相抗原血清試驗 (Serological polyvalent flagellar (H) phase I test)

(1) 首先以相誘導法檢驗沙門氏菌鞭毛抗原之第一相原，將待測之沙門氏菌接種在 3 ml tryptic soy broth (TSB, Difco, USA) 的無菌試管內中，於 37 °C 培養 18 個小時。

(2) 加入等量 0.6 % 福馬林生理食鹽水溶液 (1000 ml 的 0.85 % NaCl 溶液加 6 ml 的 35 % 甲醛溶液)，並置於 50 °C 恆溫水槽中水浴 1 小時，其目的為固定鞭毛相原。

(3) 分別取 0.5 ml 之 *Salmonella* H Antiserum Poly A ~E (Difco, USA) 至無菌試管中與 0.6 % Formaline saline 固定後的菌液取 0.5 ml 加入裝有抗血清之試管中。

(4) 再至於 50 °C 恆溫水槽中進行試管凝集試驗，分別於第 15 分鐘、30 分鐘及 1 小時觀察。觀察時小心拿取避免晃動。

(5) 在光源上觀察

陽性反應-有雲絮狀凝集發生

陰性反應-則清澈透明

(6) 若為陽性反應依序使用 *Salmonella* H Antiserum (a,b,c,r 等) (Difco, USA)

及 *Salmonella* H Antiserum single factor (2,5,6,7) (Difco, USA) 重複上述檢測方法，直至檢測出第 I 相鞭毛抗原。

多價鞭毛(H) 第 II 相抗原血清試驗 (Serological polyvalent flagellar (H) phase test)

- (1) 準備滅菌燒杯、剪刀與鑷子。
- (2) 並將無菌滴管前端剪下置於燒杯內做為 Craigie tube。
- (3) 配置內含第 I 相 H 抗原之抗血清 0.5 ml 與半固態 (Semi-solid) 3 ml TSB (含 0.3 agar) 於無菌試管中，並混合均勻。
- (4) 以鑷子夾取 Craigie tube，置第三步驟之尚未凝固的 TSB 內。
- (5) 待其冷卻凝固後，以接種針挑取單一新鮮菌落至無菌滴管中培養基之表面，置於 37 °C 恆溫培養箱中鬆蓋培養，每兩小時觀察一次，直至菌株爬出滴管外離表面培養基約 2~3 mm 處。
- (6) 以接種針取菌至 3 ml 之 TSB 中，置於 37 °C 恆溫培養箱中培養 6 到 8 個小時。
- (7) 後續步驟則重複第 I 相鞭毛抗原之檢測法，至檢測出第 II 相鞭毛抗原。

第三節 沙門氏菌感受性試驗



本試驗以瓊脂紙錠擴散方法 (the disc diffusion susceptibility test)，又稱 Kirby-Bauer 試驗 (Baur et al., 1996)，來了解菌株對各種抗菌劑的感受性 (susceptibility)。其步驟如下：

於 TSA 上以無菌環挑取單一菌落，接種至無菌 TSB 培養液中，放置培養箱以 37 ± 1 °C 培養 18 - 24 小時。培養後，TSB 菌液以無菌生理食鹽水調成比濁管濃度 0.5 MacFarland unit。利用無菌棉花棒從 TSB 中沾適量菌液，依三個方向很均勻的塗抹到厚度為 5 mm Mueller - Hinton agar (Difco, USA) 上，貼上抗菌劑藥片，距離培養皿邊緣至少 1.4 公分，兩種藥片之間至少 2.2 公分，於 37 °C 培養 24 小時，然後測藥片旁的抑制圈直徑，依美國臨床及實驗室標準機構 (Clinical and Laboratory standards Institute, CLSL) 之瓊脂藥片擴散法步驟 (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests)，分析細菌對抗菌劑耐受性及感受性。

本實驗所使用之抗菌劑來自商品化藥片 (Oxoid, USA)，和其濃度如下所示 ($\mu\text{g}/\text{disc}$)：Ampicillin (10 μg , AMP10)、Ceftriaxone (30 μg , CRO30)、Ciprofloxacin (5 μg , CIP5)、Kanamycin (30 μg , K30)、Oxytetracycline (30 μg , OT30)、Spectinomycin (100 μg , SH100)、Streptomycin (10 μg , S10)、Tetracycline (30 μg , TE30)、Sulfamethoxazole/trimethoprim (1.25/23.75 μg , SXT25)、Trimethoprim (5 μg , W5)。

第四節 以聚合酶酵素鏈鎖反應檢測抗藥性基因



3.4.1 Genomic DNA 萃取流程

使用 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany) 萃取沙門氏菌之 Genomic DNA，步驟如下：

- (1) 將菌株培養在 10 ml TSB 中，置於 37°C 恆溫培養箱培養 24 小時。
- (2) 培養後菌液，取 1 ml 置於微量離心管中，以 7500 rpm 離心 10 分鐘，棄上清液。
- (3) 加入 180 μ l ALT 溶液，置微量離心管中並與 pellet 混合均勻。
- (4) 加入 20 μ l proteinase K，置微量離心管與溶液輕微混合後，靜置室溫作用 3 分鐘。
- (5) 作用完後，再加入 200 μ l AL 及 200 μ l 100 % 酒精置微量離心管。
- (6) 以 Pipet 將管內溶液混合均勻後，置於 column 中，以 8000 rpm 離心 1 分鐘，棄 collection tube 中溶液。
- (7) 換新的 collection tube，加 500 μ l AW1 溶液，以 8000 rpm 離心 1 分鐘。
- (8) 棄 collection tube 中溶液，再換新的 collection tube，加 500 μ l AW2 溶液，以 14000 rpm 離心 3 分鐘。
- (9) 棄 collection tube 中溶液，再換新的微量離心管，加 50 μ l TE 溶液，以 8000 rpm 離心 1 分鐘，微量離心管內為 DNA。
- (10) 並以超微量分光光度計 ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technology, USA) 測 DNA 濃度抽出後之 Genomic DNA 以確認其濃度與純度。
- (11) 所抽取的 Genomic DNA 樣本置於 -20 °C 中保存。



3.4.2 抗藥性基因隻之偵測

本研究主要利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction ; PCR) 來偵測菌株是否具有 *aadA1*、*dfrA1*、*PSE*、*Sul1*、*tetA*、*tetB*、*TEM* 及 Class 1 integron 等抗藥性基因，並依據前人文獻使用引子如下。

胺基糖苷類 (Aminoglycosides) 抗菌劑基因

aadA1 (Madsen et al., 2000)

aadA1-F GTG GAT GGC GGC CTG AAG CC

aadA1-R AAT GCC CAG TCG GCA GCG

aadA1 這組引子分別是依照細菌對 Spectinomycin 和 Streptomycin 的抗藥性基因片段做設計，其增幅出來的片段為 528 bp。

磺胺劑類 (Sulfonamides) 抗藥性基因

dfrA1 (Toro et al., 2005)

dfrA1- F GGAGTG CCA AAG GTG AAC AGC

dfrA1- R GAG GCG AAG TCT TGG GTA AAA AC

Sul1 (Sandvang et al., 1998)

Sul 1- F CTT CGA TGA GAG CCG GCG GC

Sul 1- R GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC

dfrA1 這組引子是依照細菌對 Trimethoprim 的抗藥性基因片段做設計，增幅出來的片段為 367 bp。*Sul 1* 這組引子是依照細菌對 Sulphonamides 的抗藥性基因片段做設計，增幅出來的片段為 436 bp。

四環素類抗菌劑基因

tetA (Ng et al., 2001)



tetA-F GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC

tetA-R CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG

tetB (Ng et al., 2001)

tetB-F TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG

tetB-R GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG

tetA 只會將四環素抗生素排出細菌外，藉以減少細菌內藥物的濃度，來保護細菌核糖體免受藥物的攻擊；*tetB* 會將四環素與 Minocycline 主動排出，故此兩幫浦的差異在於 Minocycline 抗藥性 (Vila et al., 1993)。其所增幅出來的片段分別為 210 bp (*tetA*) 及 659 bp (*tetB*)。

乙內醯胺類 (β -lactam) 抗菌劑基因

TEM (Carlson et al., 1999)

TEM-F GCA CGA GTG GGT TAC ATC GA

TEM-R GGT CCT CCG ATC GTT GTC AG

PSE (Faldynova et al., 2003)

PSE-F TAG CCA TAT TAT GGA GCC TC

PSE-R TTA ACT TTT CCT TGC TCA GC

TEM-1 是對 Ampicillin 及第一類頭孢子素的抗藥性基因片段做設計，其所增幅出來的片段為 311 bp。*PSE* 其所增幅出來的片段為 321 bp。

聚合酶連鎖反應總體積為 30 μ l，反應溶液中各成分的含量：2X Green Master MIX (GoTaq[®]) 取 15 μ l，引子組各 0.75 μ l (各引子濃度均為 0.25 μ M)，模板為 Genomic DNA 5 μ l (50 ng/ μ l)，以無菌二次蒸餾水補至 8.5 μ l 後，將反應物均勻混合置於溫度循環器中 (GeneAmp PCR System9700)。設定程式

如下，95 °C 加熱 5 分鐘以解開雙股 DNA，然後於 95°C 下 30 秒使 DNA 變性 (Denaturaion)，於 30 秒使引子黏合 (Annealing) (資料詳見 Table 2)，72°C，30 秒使 DNA 延長 (Extension)，共循環 28 次，最後於 72°C，5 分鐘，將未延長完全的反應做完。

第一型整合子 (Class 1 integron) 分析

5'CS -GGC ATC CAA GCA GCA AG-

3'CS -AAG CAG ACT TGA CCT GA-

本研究是依據前人文獻所使用的引子確認 class 1 integron 之存在 (Lévesque et al., 1995)。此引子乃根據 integron 的特殊構造設計，引子組中的一端位在 5' 端的 conserved segment，另一端位在 3' 端的 conserved segment，此外由於這兩組 primer 的位置都靠近 5' 端 conserved segment 和 3' 端 conserved segment 的重組部位，所以經 PCR 增幅得到的片段就包含了 integron 和兩個 conserved segment 間的變異區部份，因此 PCR 不僅可以偵測到 integron，同時也可藉 PCR 產物的片段大小來預估 integron 可能含有的基因片匣的數目或大小。

聚合酶連鎖反應總體積為 30 µl，反應溶液中各成分的含量為：2X Green Master MIX (GoTaq®) 為 15 µl，引子組各 0.6 µl (各引子濃度均為 0.25 µM)，模板為 Genomic DNA 5 µl (50 ng/µl)，以無菌二次蒸餾水補至 8.8 µl 後，將反應物均勻混合置於溫度循環器中 (GeneAmp PCR System 9700)。設定程式如下，95 °C 加熱 5 分鐘以解開雙股 DNA，然後於 95 °C 下 30 秒使 DNA 變性 (Denaturaion)，60 °C 加熱，30 秒使引子黏合 (Annealing)，72 °C，30 秒使 DNA 延長 (Extension)，共循環 28 次，最後於 72 °C，5 分鐘，將未延長完全的反應做完。

3.4.3 PCR 產物電泳

- (1) 配置 1.5 % 電泳膠，秤取 agarose 溶於 1X TBE 緩衝液中，並用微波爐加熱沸騰後，置於 55 °C 水浴中降溫後，加入 Syber Green (比例 1:10000) 混合均勻，倒入鑄膠器，以鋁箔紙覆蓋避光帶凝固。
- (2) 將膠片置入電泳槽內，倒入 1X TBE 緩衝液中
- (3) 注入 5 µl 分子量標示物，於電泳膠第一孔，並再依序注入 5 µl PCR 產物於電泳膠的不同孔中。
- (4) 蓋上電泳槽蓋子，設 100 V 電壓以鋁箔紙覆蓋避光跑 40 分鐘。

3.4.4 基因序列電泳分析

為了確知核酸定序所得到的 DNA 序列是何種基因，需進行基因相似性搜尋，可利用一相似搜尋程式 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 直接在網路上進行比對。

第五節 以巢式聚合酶鏈鎖反應檢測抗藥性基因是否存在於 *integron*



第一次增幅使用 Class 1 *integron* 引子以產生增幅產物，此產物存在下進行膠萃取，接著使用抗藥性基因當內引子，進行第二次增幅。由於 nested PCR 有兩次特異性 PCR 之增幅，因此降低了非特異性反應的可能性，其操作步驟如下。

3.5.1 First round PCR

聚合酶連鎖反應總體積為 30 μ l，反應溶液中各成分的含量: 2X Green Master MIX(GoTaq[®])為 15 μ l，引子組各 0.6 μ l(各引子濃度均為 0.25 μ M)，模板為 Genomic DNA 5 μ l (50 ng/ μ l)，以無菌二次蒸餾水補至 8.8 μ l 後，將反應物均勻混合置於溫度循環器中。設定程式如下，95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘以解開雙股 DNA，然後於 95 $^{\circ}$ C 下 30 秒使 DNA 變性，60 $^{\circ}$ C 加熱，30 秒使引子黏合，72 $^{\circ}$ C，30 秒使 DNA 延長，共循環 28 次，最後於 72 $^{\circ}$ C，5 分鐘，將未延長完全的反應做完。

3.5.2 使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit

- (1) 自電泳膠片取 300 mg 膠體至 1.5 ml 離心管中，加入 500 μ l DF Bufferc 後，放入乾浴槽 60 $^{\circ}$ C 感作 10 分鐘（每 2 分鐘均勻搖晃膠體）。
- (2) 作用完後，取 800 μ l 溶解的膠體，至 DF Column，以 14000 rpm 離心 1 分鐘。
- (3) 棄 collection tube 中溶液，加 400 μ l W1 Bufferc，以 14000 rpm 離心 1 分鐘。
- (4) 棄 collection tube 中溶液，加 600 μ l Wash Bufferc，等待 1 分鐘，再以 14000 rpm 離心 1 分鐘。

(5) 棄 collection tube 中溶液，以 14000 rpm 離心 3 分鐘。

(6) 拿起 DF Column，並放到新的 1.5ml 離心管上，取 40 μ l Elution Buffer，等待 3 分鐘後，以 14000 rpm 離心 2 分鐘



3.5.3 Second round PCR(nested PCR)

聚合酶連鎖反應總體積為 30 μ l，反應溶液中各成分的含量: 2X Green Master MIX (GoTaq[®]) 取 15 μ l，引子組各 0.75 μ l (各引子濃度均為 0.25 μ M)，模板為 Genomic DNA 5 μ l (50 ng/ μ l)，以無菌二次蒸餾水補至 8.5 μ l 後，將反應物均勻混合置於溫度循環器中。設定程式如下，95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘以解開雙股 DNA，然後於 95 $^{\circ}$ C 下 30 秒使 DNA 變性，於 30 秒使引子黏合 (各抗藥基因的引子黏合資料詳見 Table 2)，72 $^{\circ}$ C，30 秒使 DNA 延長，共循環 28 次，最後於 72 $^{\circ}$ C，5 分鐘，將未延長完全的反應做完。

第六節 統計方法

本研究使用 SAS 9.1.3 service pack 4 進行費雪精確檢定(Fisher Exact Test)，以分析沙門氏菌於一日齡雛雞與大於一日齡雛雞隻之抗藥性及抗藥基因間的關係是否達統計上之顯著差異 ($P<0.05$)。



第四章 結果



本研究於 2011-2012 年間，收集台灣地區家禽場一日齡雛雞、大於一日齡雛雞及環境樣本進行沙門氏菌分離，所有菌株皆經 O 抗及 H 抗反應鑑定為沙門氏菌。

樣本組成方面：種雞場共有 11 株，其中 4 株沙門氏菌分離自一日齡雛雞、3 株沙門氏菌來分離自大於一日齡雛雞、環境樣本的檢體，有 3 株沙門氏菌分離自鞋套、1 株沙門氏菌分離自飼料槽；在肉雞場共有 11 株，4 株沙門氏菌分離自一日齡雛雞、3 株沙門氏菌分離自大於一日齡雛雞、環境樣本的檢體，有 1 株沙門氏菌分離自飼料、3 株沙門氏菌分離自墊料。

一日齡雛雞分離率方面，種雞場的一日齡雛雞有 150 隻，每 5 隻視為 1 個樣本，共 30 件樣本分離出 2 株沙門氏菌，總分離率為 6.7 % (2/30)；肉雞場一日齡雛雞有 179 隻，每 5 隻視為 1 個樣本，少數為 4 隻為 1 個樣本，共 36 件樣本分離出 3 株沙門氏菌，總分離率為 8.3 % (3/36)；國外輸入之原種一日齡雛雞有 95 隻，每 5 隻視為 1 個樣本，全部樣本共 19 件，皆未分離出沙門氏菌。

另外也從本實驗所分離出的 17 株沙門氏菌進行調查，其中在一日齡種雞、一日齡肉雞及大於一日齡種雞為病例所分離之沙門氏菌，分別為 2 株、1 株及 3 株。而大於一日齡肉雞，自 17 個檢體分離出 3 株沙門氏菌，分離率為 17.6 %。環境檢體方面，在種雞場的部分，有 3 株為別的實驗室所分讓，其中 2 株分離自鞋套，1 株分離自飼料；而本實驗室自 16 雙鞋套分離出 1 株沙門氏菌，分離率為 6.3 %。在肉雞場的部分，本實驗分離出 4 株沙門氏菌，其來源方面有 3 株分離自墊料，1 株分離自鞋套，分離率分別為 10 %及 2.3 %。

第一節 沙門氏菌分離株血清型的分布

雞場樣本中分離出 22 株沙門氏菌，經 White-Kauffmann-Le Minor Scheme 成功鑑定出確切血清型的有 21 株，分屬 5 種血清型別的 7 個血清型。分別是 B 群的 Typhimurium (5/22, 22.7 %)，C1 群的 Livingstone (2/22, 9.1 %)，C2 群的 Newport (1/22, 4.5 %)、Albany (7/22, 31.8 %)，D1 群的 Enteritidis (2/22, 9.1 %)、Pullorum (3/22, 13.6 %)、E4 群的 Dessau (1/22, 4.5 %)。其中以 Albany、Typhimurium、Pullorum 等 3 型較為常見，另外 1 株沒有確切的型別屬於 E4 血清群(1/22, 4.5 %)。

依不同的型態的雞場觀察，來自種雞場的 11 株沙門氏菌所檢出之血清型共 5 種，包括 Albany、Typhimurium、Pullorum、Enteritidis、Livingstone。肉雞場的 11 株沙門氏菌所檢出之血清型共 7 種，包括 Typhimurium、Albany、Pullorum、Enteritidis、Livingstone、Dessau、Newport。另外，依不同的年齡層的雞隻觀察，一日齡雛雞以 Pullorum(37.5 %, 3/8)最常見；大於一日齡雞隻以 Typhimurium(33.3 %, 2/6) 和 Albany (33.3 %, 2/6) 最常見。雞場環境方面以 Albany (62.5 %, 5/8) 最常見。

第二節 沙門氏菌分離株之藥物感受性試驗結果

以 Ampicillin、Ceftriaxone、Ciprofloxacin、Kanamycin、Spectinomycin、Streptomycin、Sulfamethoxazole/trimethoprim、Trimetroprim、Oxytetracycline、Tetracycline 等 10 種抗菌劑紙錠分別對 22 株沙門氏菌進行抗菌劑感受性試驗。根據 CLSI (Clinical and Laboratory standards Institute) 規範進行判定，以直徑大小將菌株對藥物之反應區分為具敏感性 (susceptible)、抵抗性 (resistant) 及中間值 (intermediate) 三種結果，而本實驗將具抵抗性的結果歸類於該沙門氏菌對此抗菌劑具有抗藥性。21 株對至少一種抗菌劑具有抗藥性，佔 95 % (21/22)。

依不同的型態的雞場觀察，來自種雞場的 11 株沙門氏菌有 6 株至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 54.5 % (6/11)；肉雞場的 11 株沙門氏菌有 7 株至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 63.6 % (7/11)。依不同的年齡層的雞隻觀察，種雞一日齡雞隻至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 25 % (1/4)，肉雞一日齡雞隻至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 25 % (1/4)；大於一日齡種雞至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 25 % (1/4)，大於一日齡肉雞至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 100 % (3/3)。另外利用 Fisher's exact test 比較一日齡雞及飼養環境來源沙門氏菌，其抗藥性程度有顯著上的差異 ($P < 0.05$)。

一日齡雞對 Ampicillin (75 %, 6/8) 抗藥性最高，其次是 Streptomycin (62.5 %, 5/8)；大於一日齡雞對 Ampicillin (100 %, 6/6) 抗藥性最高，其次是 Oxytetracycline (66.7 %, 4/6)、Tetracycline (66.7 %, 4/6)、Trimetroprim (50 %, 3/6)、Sulfamethoxazole/trimethoprim (50 %, 3/6) 和 Streptomycin (50 %, 3/6)。環境方面，以 Ampicillin (87.5 %, 7/8)、Oxytetracycline (87.5 %, 7/8)、Tetracycline (87.5 %, 7/8) 抗藥性最高，其次是 Trimetroprim (75 %, 6/8)、Sulfamethoxazole/trimethoprim (75

%, 6/8)。依沙門氏菌血清型分類的結果，一日齡的雞隻或者是大於一日齡的雞隻其所分離出來的 5 株 Typhimurium，至少對四種以上的抗菌劑具有抗藥性，其中有 2 株對 8 種抗菌劑具有抗藥性，分別為 Ampicillin、Kanamycin、Spectinomycin、Streptomycin、Sulfamethoxazole/trimethoprim、Trimetroprim、Oxytetracycline、Tetracycline。其次為 Albany，則至少對兩種以上的抗菌劑具有抗藥性。另外，自一日齡雞隻所分離的 Pullorum 對 Streptomycin 具 100 % (3/3) 的抗藥性。

第三節 沙門氏菌分離株之抗藥性基因偵測

分離的 22 株沙門氏菌，以聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction, PCR）檢測 Class 1 integron、*aadA1*、*aphA-I ab*、*dfrA1*、*PSE-1*、*Sul1*、*TEM*、*tetA*、*tetB* 等 9 種抗藥基因。

4.3.1 抗藥性基因檢測

首先在胺基糖苷類的抗菌劑基因方面，針對 Spectinomycin 和 Streptomycin 的抗菌劑，使用 *aadA1F* 和 *aadA1R* 做為引子，若具有 *aadA1* 抗藥基因則所增幅出來的片段大小應為 528 bp，本實驗中共有 5 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 22.7 % (5/22)。在來源方面，種雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體皆無檢測出 *aadA1* 抗藥基因；肉雞場則在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體檢測出 *aadA1* 抗藥基因，檢出率分別為 50 % (2/4)、67 % (2/3)、25 % (1/4)。

磺胺劑類的抗菌劑基因方面，針對 Sulphonamides 的抗菌劑，使用 *Sul1F* 和 *Sul1R* 做為引子，若具有 *Sul1* 抗藥基因則所增幅出來的片段大小應為 436 bp，本實驗中共有 5 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 22.7 % (5/22)。來源方面，種雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *Sul1* 抗藥基因檢出率，分別為 0 % (0/4)、33 % (1/3)、50 % (2/4)；肉雞場之一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *Sul1* 抗藥基因檢出率，分別為 0 % (0/4)、0 % (0/3)、50 % (2/4)。進一步分析血清型方面，7 株 Albany 菌株中有 5 株檢測出 *Sul1* 抗藥基因，其餘的血清型則無檢測出 *Sul1* 抗藥基因。針對 Trimethoprim 的抗菌劑，使用 *dfrA1F* 和 *dfrA1R* 做為引子，若具有 *dfrA1* 抗藥基因則所增幅出來的片段大小應為 367 bp，本實驗共有 7 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 32 % (7/22)。來源方面，種雞場之雞

隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *dfrA1* 抗藥基因檢出率，分別為 0 % (0/4)、33 % (1/3)、75 % (3/4)；肉雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *dfrA1* 抗藥基因檢出率，分別為 25 % (1/4)、0 % (0/3)、50 % (2/4)。

四環素類的抗菌劑基因方面，使用 *tetAF* 和 *tetAR* 做為引子，若具有 *tetA* 基因則所增幅出來的片段大小應為 210 bp，本實驗中總共有 2 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 9 % (2/22)。來源方面，種雞場之一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體則皆無檢測出 *tetA* 抗藥性基因。肉雞場之一日齡雛雞及環境檢體無檢測出 *tetA* 抗藥基因，但在大於一日齡之雞隻則能檢測出，檢出率為 67 % (2/3)。使用 *tetBF* 和 *tetBR* 做為引子，若具有 *tetB* 抗藥基因則所增幅出來的片段大小應為 659 bp 之產物，本實驗中總共有 7 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 32 % (7/22)。來源方面，種雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *tetB* 抗藥基因檢出率，分別為 25 % (1/4)、0 % (0/3)、25 % (1/4)；肉雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *tetB* 抗藥基因檢出率，分別為 50 % (2/4)、67 % (2/3)、25 % (1/4)。

乙內醯胺類的抗藥性基因方面，針對 Ampicillin 及第一類頭孢子素的抗菌劑，使用 *TEMF* 和 *TEMR* 做為引子，若具有 *TEM* 抗藥基因則所增幅出來的片段大小應為 311 bp，本實驗中總共有 11 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 50 % (11/22)。來源方面，種雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *TEM* 抗藥基因檢出率，分別為 50 % (2/4)、67 % (2/3)、25 % (1/4)；肉雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *TEM* 抗藥基因檢出率，分別為 25 % (1/4)、100 % (3/3)、50 % (2/4)。使用 *PSEF* 和 *PSER* 做為引子，若具有 *PSE1* 抗藥基因則所增幅出來的片段大小應為 321 bp，本實驗中共有 6 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔

27 % (6/22)。來源方面，種雞場之雞隻在一日齡雛雞、大於一日齡雞隻及環境檢體的 *PSE1* 抗藥基因，檢出率分別為 0 % (0/4)、33 % (1/3)、75 % (3/4)；肉雞場之一日齡雛雞、大於一日齡雞隻則皆無檢測出 *PSE1* 抗藥基因，但在環境檢體檢測出 *PSE1* 抗藥基因，檢出率為 50 % (2/4)。

4.3.2 Class 1 Integron 檢測

以 PCR 檢測 Class 1 integron 於沙門氏菌之存在情形，所使用的引子組分別位在 5'端及 3'端 conserved segments 上近 central variable region 的位置，因此增幅片段的大小與嵌入於 class 1 integron 的結構在基因片匣及數量並不一定，通常會在 600 到 2000 bp 間出現增幅產物。本次調查 22 株自雞隻及其飼養環境來源分離之沙門氏菌，以 PCR 偵測 integron 的存在情形，結果有 9 株 (佔 41 %) 可增幅得到 PCR 產物。依不同型態的雞場觀察，來自種雞場具有 integron 的沙門氏菌有 4 株，佔 36 % (4/11)；肉雞場具有 integron 的沙門氏菌有 5 株，佔 45 % (5/11)。依不同年齡層觀察，一日齡種雞及肉雞均無檢測出 class 1 integron (0/8)，但大於一日齡種雞及肉雞則能檢出 class 1 integron，檢出率分別為 33 % (1/3) 與 67 % (2/3)。雞場環境方面，class 1 integron 檢出率為 75 % (6/8)。

另外利用 nested PCR 技術，檢測抗藥性基因是否在 integron 裏面；其作用原理簡略說明。在第一次增幅，外引子使用 Class 1 integron 引子以產生增幅產物，此產物存在下進行膠萃取，然後使用抗藥性基因當內引子，進行第二次增幅。由於 nested PCR 有兩次特異性 PCR 之增幅，因此降低了非特異性反應的可能性。結果方面，*aadA1* 抗藥基因共有 5 株沙門氏菌呈現陽性反應，其中有 3 株在 integron 裏面，佔 60 %；*dfrA1* 抗藥基因共有 7 株沙門氏菌呈現陽性反應，其中有 6 株在 integron

裏面，佔 86 %；*PSE* 抗藥基因共有 6 株沙門氏菌呈現陽性反應，其中有 6 株在 integron 裏面，佔 100 %；*Sul1* 抗藥基因共有 5 株沙門氏菌呈現陽性反應，其中有 5 株在 integron 裏面，佔 100 %；*TEM* 抗藥基因共有 11 株沙門氏菌呈現陽性反應，其中有 5 株在 integron 裏面，佔 45 %；*tetA* 及 *tetB* 抗藥基因皆無在 integron 裏面。

第五章 討論



本次調查自 2011 年 4 月至 2012 年 1 月份，由台灣中部種雞場（ $n=150$ ）和北部肉雞場（ $n=179$ ）所蒐集到之一日齡雛雞，以及國外輸入原原種之一日齡雛雞（ $n=95$ ）作為分離沙門氏菌的樣材。依照前述結果，國內部分有 329 隻一日齡雛雞，分成 66 個樣本，當中檢測出 5 株沙門氏菌；而國外原原種之一日齡雛雞，將 95 隻一日齡雛雞，分成 19 個樣本，當中並未分離出沙門氏菌。

除了上述的 5 株沙門氏菌，本實驗另外自種雞場及肉雞場分離的 17 株沙門氏菌進行比較，來源組成方面：種雞場之一日齡雛雞分離出 2 株沙門氏菌，大於一日齡雛雞隻分離出 3 株沙門氏菌，環境檢體分離出 4 株沙門氏菌；肉雞場之一日齡雛雞分離出 1 株沙門氏菌，大於一日齡肉雞分離出 3 株沙門氏菌，環境檢體分離出 4 株沙門氏菌。以下討論將依此結果進行此 22 株沙門氏菌在公共衛生上的重要性、抗藥性的產生、抗藥基因傳播之可能原因，參考國內外專家學者的文獻報告，一併進行流行病學方面的探討。

第一節 雞場沙門氏菌之汙染率討論

沙門氏菌為重要之人類食物媒介性病原菌，而雞肉與雞蛋為人類感染沙門氏菌之重要來源。在臺灣多為白肉雞系統所生產，因此本研究比較白肉雞之原原種雞群、原種雞群、肉雞群的沙門氏菌調查。其分離結果在種雞場一日齡雛（ $n=150$ ），共分成 30 個樣本分離出 2 株沙門氏菌，總分離率為 6.7 %（ $2/30$ ）；肉雞場一日齡雛雞（ $n=179$ ），分成 36 件樣本分離出 3 株沙門氏菌，總分離率為 8.3 %（ $3/36$ ）；國外輸入之原原種一日齡雛雞（ $n=95$ ），分成 19 件樣本，則未分離出沙門氏菌。

在 osman 等人的研究，針對進口之一日齡原原種雛雞（ $n=150$ ）、一日齡雛雞



(n=150)、一日齡種雞(n=150)、一日齡小鴨(n=150)以及一日齡小火雞(n=150)進行沙門氏菌分離，結果顯示在一日齡原原種雞無分離出沙門氏菌，其他一日齡雞、一日齡種雞、一日齡小鴨以及一日齡小火雞的沙門氏菌分離率，則分別為 18.6 %、23.3 %、19.3 %、12.6 % (Osman et al., 2010)。此篇結果與本實驗在進口之輸入原原種雞雞方面一致，但在一日齡種雞及肉雞部份，本實驗沙門氏菌分離率則明顯較低，這可能是由於沙門氏菌之分離方式不一樣所造成的結果。本實驗的分離方式，主要是將雞雞腹腔打開，再以滅菌的剪刀將卵黃囊剪破，取 5 隻於同一無菌採樣袋 (whirl-pak bag) 中，最後進行沙門氏菌分離；而 osman 等人，主要是針對一日齡雞雞之不同臟器和紙盒進行沙門氏菌分離，其中臟器的沙門氏菌分離率方面，肝臟有 2.6 %、卵黃囊有 2.6 %、盲腸有 3.3 %及肺臟有 6.0 %，另外盛裝 1 日齡雞雞的紙盒，其沙門氏菌分離率有 18.6 %。若以臟器方面討論，本實驗針對一日齡雞雞之沙門氏菌，其分離率比 osman 等人結果高。台灣方面，於 2007 年洪等在臺灣孵化場調查沙門氏菌，分離率為 0.2 % (9/3967) (洪, 2009)，其結果與本實驗自一日齡雞雞分離的沙門氏菌相比，則略顯較低，可能原因是由於從不同臟器進行細菌分離，而造成不一樣的分離率結果。

另外本實驗發現國外原原種一日齡雞雞皆未分離出沙門氏菌，但在台灣種雞場及肉雞場之一日齡雞雞皆有分離出沙門氏菌，其結果顯示台灣在雞雞之孵育、疾病控制及環境衛生管理機制尚無良好的機制。此外，Namata 等人發現，一日齡雞雞被沙門氏菌感染後，大幅增加白肉雞族群感染沙門氏菌風險 (Namata et al., 2009)；另外尚有研究指出一貫場的沙門氏菌污染模式都與源頭有關 (Kim et al., 2007；Oh et al., 2010)。在前人研究基礎之上，本實驗進一步分析肉雞與種雞之分離率比較，在一日齡肉雞比一日齡種雞之沙門氏菌分離率略顯較高，這是否與飼

料、飼養方式、飼養型態或是透過垂直傳播的方式汙染下游場，上述諸多問題皆有待進一步探討。



第二節 沙門氏菌之血清型分佈



雞隻及飼養環境來源分離出 22 株沙門氏菌，鑑定出確切血清型的有 21 株，分屬 5 種血清群別的 7 個血清型。分別是 B 群的 Typhimurium (5/22, 22.7 %)，C1 群的 Livingstone (2/22, 9.1 %)，C2 群的 Newport (1/22, 4.5 %)、Albany (7/22, 31.8 %)，D1 群的 Enteritidis (2/22, 9.1%)、Pullorum (3/22, 13.6 %)、E4 群的 Dessau (1/22, 4.5 %)。

參考其他學者的研究報告，美國疾病管制局於 2005 年，有臨床症狀的雞隻中，最常被分離到的沙門氏菌血清型為 *S. Enteritidis*、*S. Kentucky* 與 *S. Typhimurium* 排名為前三名，且分離率都在 10 % 以上；無臨床症狀的雞隻中前三名則是 *S. Heidelberg*、*S. Kentucky*、*S. Typhimurium*，且分離率也都在 10 % 以上。自一日齡雞隻分離到的沙門氏菌血清型有 *S. Newport*、*S. Kentucky*、*S. Enteritidis*、*S. Shubra*、*S. Saintpaul* 及 *S. Agona*；另外進口的一日齡種雞血清型有 *S. Shubra* 和 *S. Shipley* (Osman et al., 2010)。臺灣 2008 年林於上市仿土雞與白肉雞進行沙門氏菌調查，仿土雞共分離 345 株沙門氏菌，其中 *S. Albany* 有 163 株 (47.2 %) 為最多，其次是 *S. Schwarzengrund* 有 90 株 (26.1 %) 與 *S. Enteritidis* 有 26 株；白肉雞共分離 225 株，其中 *S. Schwarzengrund* 有 50 株 (22.2 %)、*S. Albany* 有 45 株 (20.0 %) 與 *S. Enteritidis* 有 43 株 (19.1 %) (林, 2008)。養雞場方面，2010 年陳於養雞場分離之沙門氏菌，主要群別以 C2 (53.4 %) 為主，其次分別為血清型 E (15.5 %) 及血清型別 B (12.1 %)，進一步分型得到 *S. Albany* (53.4 %) 最多，其次分別為 *S. Muenster* (10.3 %) 及 *S. Enteritidis* (8.6 %) (陳, 2010)。

在美國的零售雞隻屠體調查，沙門氏菌最常見之血清型為 *S. Heidelberg* (25 %)、*S. Typhimurium* (18.75 %)、*S. Kentucky* (17.5 %)、*S. Betra* (11.25 %) 及 *S. Hadar*



(8.75 %)(Berrang et al., 2006)。Angkititrakul 等人調查泰國在 2003 年雞隻屠體，好發的血清型為 *S. Anatum* (33.3 %) 及 *S. Rissen* (16.7 %) (Angkititrakul et al., 2005)。於 2000 年王等人調查中臺灣白肉雞屠體沙氏菌分離率，共分離 23 株菌，其中 *S. Schwarzengrund* 有 14 株 (60.9 %)，其次為 *S. Albany* 有 3 株 (13 %)(Wang et al., 2006)。2002 年郭於北臺灣調查白肉雞與有色雞之屠體，發現沙門氏菌血清型以 *S. Schwarzengrund* 最多，佔 70 % (35/50)，而 *S. Typhimurium* 則為 1 株，並無 *S. Albany* (郭, 2002)。

上述研究可得知國內外家禽及家禽屠體血清型有明顯的差異，造成此差異的原因，可能與各雞隻品種特性、飼養管理、週齡或飼料等因素影響 (林, 2008)。另外血清型對雞臟器親合性，從不同臟器進行細菌分離，證實會有不一樣的分離率，且所得到的分離株血清型也有所不同 (謝, 2006)。綜合學者的研究報告，國外禽類之沙門氏菌血清型以 *S. Enteritidis*、*S. Kentucky*、*S. Typhimurium* 最常見；臺灣則以 *S. Schwarzengrund*、*S. Enteritidis* 及 *S. Albany* 最常見。而本實驗分離出 22 株沙門氏菌，以 *S. Albany* 佔的比例最高，為 31.8 % (7 株)，其次是 *S. Typhimurium* 有 5 株，佔 22.7 %。而台灣常見的 *S. Enteritidis*，本實驗只分離出 2 株，佔 9.1 %；*S. Schwarzengrund* 則沒有分離到。

沙門氏菌血清型具有高度宿主專一性，其中對人類具有病原性之沙門氏菌亞種血清型超過 200 多種。在台灣人類常見血清型調查，於 1998~2002 年期間，人類下痢病患檢體所分離之沙門氏菌血清型，分別依序是 *S. Typhimurium* (30.3 %)、*S. Enteritidis* (11.4 %)、*S. Stanley* (8.3 %)、*S. Schwarzengrund* (7.5 %)，而 *S. Albany* (4.5 %) 則是零星病例發生 (Lauderdale et al., 2006)。於 2004 至 2008 年間之調查，由人體分離 13063 株沙門氏菌，前 5 大血清型分別為 *S. Enteritidis* (25.8 %)、*S.*



Typhimurium (21.7 %)、S. Stanley (9.6 %)、S. Newport (6.9 %)、S. Albany (4.1 %) (邱, 2009)。綜合以上結果，在臺灣 S. Typhimurium 為人類常見血清型，然而本次研究調查雞場之沙門氏菌，22 株沙門氏菌分離 5 株佔 22 %，比國內養雞場所分離比例都略高。這是否說明 S. Typhimurium 在養雞場污染情形日益嚴重，又或者近年來 Typhimurium 在臨床上呈現多重性抗藥性，而在藥物選擇性壓力下增加 Typhimurium 的血清型族群。另 Gast 等人指出 S. Typhimurium 常發生在畜群管理不良的牧場，並從其他不同的動物或環境中感染 (Gast et al., 2004)。但亦有可能本次研究因樣本數較少而無法宏觀的進行分析，不過此現象值得公共衛生的學界繼續追蹤調查。

第三節 雞隻及環境分離株之抗藥性

在台灣，家禽分離之沙門氏菌的抗藥性調查，發現不同雞種的分離株對 ACSSuT 抗菌劑具有多重抗藥性，佔 27.7 % (46/166)。另收集仿土雞的盲腸及生殖道分離之沙門氏菌，結果對 ACSSuT 抗菌劑具有多重抗藥性，佔 17.3 % (44/254) (邱, 2004)。周及蔡等則是自 1998 至 1999 年，收集 626 隻不同年齡的肉雞，所分離之沙門氏菌對 Tetracycline、Doxycycline、SXT、JOT(josamicin-trimethoprim) 等抗菌劑具有高度的抗藥性 (周, 2001)。針對仿土雞及白肉雞分離的沙門氏菌，有一半以上對 Colistin、Tetracyclin、Nalidixic acid、Ampicillin 及 SXT 等 5 種抗菌劑具有抗藥性，而仿土雞分離之沙門氏菌則多增加 florfenicol 抗菌劑 (林, 2008)。養雞場所分離的沙門氏菌，其抗藥性達 93.1 % (54/58)，其中同時對五種抗菌劑具有抗藥性，達 43.1 % (25/58) (陳, 2010)。以上研究都顯示台灣家禽之沙門氏菌對於抗菌劑皆呈現極高的抗藥性比例，且對各種不同類型的抗菌劑如四環素類 (tetracyclines)、乙內醯胺類 (β -lactam)、多黏菌素類 (polymyxins)、葉酸還原及合成抑制劑 (inhibitor of folate synthesis and reduction)、胺基糖苷類 (Aminoglycosides) 及氟奎諾酮類 (quinolone) 等抗菌劑皆產生抗藥性。

本實驗自雞隻及環境檢體分離 22 株沙門氏菌，對四環素類、乙內醯胺類、葉酸還原及合成抑制劑、胺基糖苷類等藥物皆有產生抗藥性。其藥理機制方面，Sulfonamides 主要會抑制葉酸的合成，影響細菌 DNA 的複製與代謝；胺基糖苷類及四環素類則會抑制細菌蛋白質的合成；乙內醯胺類之抗菌劑為臨床上治療細菌感染最常使用的抗菌劑，作用機制主要是藉由和 penicillin-binding proteins 結合，來抑制細胞壁的合成，破壞細菌結構，以達殺菌效果。本實驗有 21 株對至少一種抗菌劑具有抗藥性，佔 95 % (21/22)；13 株至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 59

% (13/22)；其結果與陳在養雞場之沙門氏菌的藥物敏感性試驗相近。進一步探討對一種以上的抗菌劑有抗藥性，大部分為 Ampicillin 佔 86 % (19/22)；對四種以上分別為 Ampicillin 佔 86 % (19/22)、Tetracyclin 佔 63 % (14/22)、Oxytetracycline 佔 63 % (14/22)、Streptomycin 佔 45 % (10/22)、SXT 佔 45 % (10/22)。

不同的型態的雞場觀察，來自種雞場分離的 11 株沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 54.5 % (6/11)；肉雞場分離的 7 株沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 63.6 % (7/11)。依不同年齡層的雞隻觀察，一日齡種雞分離之沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 25 % (1/4)，一日齡肉雞分離之沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 25 % (1/4)；大於一日齡種雞之沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 33 % (1/3)，大於一日齡肉雞分離之沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 100 % (3/3)；在種雞場的飼養環境之沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 100 % (4/4)，肉雞場的飼養環境之沙門氏菌至少對四種抗菌劑具有抗藥性，佔 75 % (3/4)。綜合上述的抗藥性結果分析種雞場與肉雞場的一日齡雛雞之沙門氏菌多重抗藥性調查，兩者沒有太大差異，但在大於一日齡肉雞之沙門氏菌多重抗菌性的比例則高於種雞，顯示在台灣肉雞場的飼養環境及用藥使用方式的不同所造成的結果。統計分析方面，本實驗利用費雪精確檢定 (Fisher Exact Test) 分析，一日齡雛雞所分離的沙門氏菌，其多重抗藥性顯著低於飼養環境來源之沙門氏菌 ($P < 0.05$)。可能原因是家禽飼養過程中，廣泛使用抗菌劑，使飼養環境來源及雞隻之沙門氏菌抗藥性愈趨嚴重。且本實驗發現多重抗藥性沙門氏菌普遍存在於雞場的飼養環境中，而多重抗藥性沙門氏菌是否會透過水平傳播方式傳播給雞隻，在公共衛生上是需密切注意的。

血清型方面比較，Chiu 等人在 2001-2002 年調查，發現人類感染沙門氏菌血



清群 D 群的分離株，已對 Ciprofloxacin 和 Ceftriaxone 具有抗藥性 (Chiu et al., 2004)。另外在 798 株沙門氏菌中，有 2 % 對新合成的 Ciprofloxacin 之抗菌劑有抗藥性，血清型皆為 Schwarzengrund (Lauderdale et al., 2006)。而 Li 等人調查北部醫學中心所分離的 3027 株非傷寒沙門氏菌，有 31 株菌 (1 %) 對 Ceftriaxone 產生抗藥性，其中 16 株菌是屬於沙門氏菌 B 群血清群，9 株菌是屬於沙門氏菌 C 群血清群，4 株菌是屬於沙門氏菌 D 群血清群，2 株菌是屬於沙門氏菌 E 群血清群 (Li et al., 2005)。本研究 5 種血清群別的 7 個血清型，分別是 B 群的 Typhimurium，C1 群的 Livingstone，C2 群的 Newport、Albany，D1 群的 Enteritidis、Pullorum、E4 群的 Dessau。結果僅 1 株自飼養環境檢體所分離出 B 群的 Typhimurium 對 Ceftriaxone 具有抗藥性，其他血清型均對 Ciprofloxacin 和 Ceftriaxone 不具有抗藥性。根據動物用藥品使用手冊 Ciprofloxacin 和 Ceftriaxone 並沒有列在動物用藥的使用範圍，故此二類藥物是不能專供預防、治療動物之疾病，而本實驗調查雞隻均無對 Ciprofloxacin 和 Ceftriaxone 產生抗藥性，僅只有一株自飼養環境來源的沙門氏菌，對 Ceftriaxone 產生抗藥性，此結果需要進一步分析調查。

目前在台灣的人類感染沙門氏菌常見之血清型為 Typhimurium 及 Enteritidis，將其血清型與美國和歐洲的菌株進行抗藥性比較，發現台灣的沙門氏菌，其多重抗藥性比例較美國及歐洲國家高 (Lauderdale et al., 2006)。而本實驗自雞隻及其飼養環境來源分離的 Typhimurium 共有 5 株，且這 5 株至少對四種以上的抗菌劑產生抗藥性，甚至有 2 株可對八種抗菌劑產生抗藥性；而 Enteritidis 共有 2 株，其中 1 株只對 Ampicillin 具有抗藥性，另外 1 株對本實驗所檢測的抗菌劑皆具有敏感性。另本次結果發現所分離出的 Typhimurium 皆具有多重抗藥性，但在 Enteritidis 並沒有此現象。

第四節 雞隻及環境分離株之抗藥性基因



抗藥性基因之存在情形

以 PCR 檢測 *aadA1*、*dfrA1*、*PSE-1*、*Sul1*、*TEM*、*tetA*、*tetB* 等 7 種抗藥性基因。*tetA* 及 *tetB* 依照細菌對四環素類(tetracycline)的抗藥性基因片段做設計；*PSE-1* 及 *TEM* 依照細菌對乙內醯胺類抗藥性基因片段做設計 (β -lactam)；*Sul1* 及 *dfrA1* 依照細菌對葉酸還原及合成抑制劑 (inhibitor of folate synthesis and reduction) 的抗藥性基因片段做設計；*aadA1* 依照細菌對胺基糖苷類 (Aminoglycosides) 的抗藥性基因片段做設計。

抗乙內醯胺類的基因方面，*TEM-1* 主要可以水解 Ampicillin、Carboxypenicillin 與 Ureidopenicillin 類藥物；而 *PSE1* 對抗菌劑所產生抗藥性之範圍與標準的 *TEM-1* 相似，但值得注意的是也會對 β -lactamase 抑制劑及 β -lactam 加入抑制劑的複合劑有較高之抗藥性。在法國的研究更發現人與動物所分離到的 *S. Typhimurium* 中，菌株表現的 β -lactamase 共有 *blaTEM*、*blaPSE-1*、*blaSHV* 及 *blaOXA-2* 四類，其分離株所佔的比例分別為 24 %、78 %、< 3 %及< 3 %，其中佔有最大比例的 *blaPSE-1* 抗藥基因位於染色體上的 Integron，其它的 β -lactamase 基因都在染色體上 (Casin et al.,1999)。本研究發現雞隻及環境分離菌株有 11 株中佔 50 % (11/22) 帶有 *TEM-1* 抗藥基因，而有 27 %分離株帶有 *PSE1* 抗藥基因。

抗四環素類的抗藥性基因，其抗藥機制主要有三種：第一種是以主動運輸的方式將四環素排出細胞外 (Levy, 1992)，第二種是 ribosomal protection protein 會驅除與 30S ribosomal subunit 鍵結的四環素 (Burdett, 1991)。第三種則是利用酵素不活化 (Speer and Salyers, 1989)。而本實驗主要針對 *tetA* 及 *tetB* 抗藥基因，主要原因是這兩個四環素的抗藥基因常見於沙門氏菌，帶有 *tetA* 抗藥基因只會將四環素抗



菌劑排出，而 *tetB* 抗藥基因會將四環素與 Minocycline 主動排出 (Vila et al., 1993)。本實驗 *tetA* 共有 2 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 9 % (2/22)，*tetB* 總共有 7 株沙門氏菌呈現陽性反應，佔 32 % (7/22)。與 Martin 等人在 2008 年檢測豬隻 *tetA* (36 %) 與 *tetB* (64 %) 抗藥基因相比，本實驗的結果比例明顯較低 (San Martín et al., 2008)。臺灣洪等人於不同期間調查孵化場之沙門氏菌的 *tetA* 及 *tetB* 抗藥基因，在 2002 年有 23 株沙門氏菌帶有 *tetA* 抗藥基因，而 *tetB* 抗藥基因則沒有被檢測出，到 2006 年只有在 6 株沙門氏菌檢測出 *tetA* 抗藥基因，而 *tetB* 抗藥基因則同樣在 6 株沙門氏菌檢測出 (洪, 2009)。上述的結果，可見到 *tetB* 抗藥基因的檢出率有上升的情形；而本實驗 *tetB* 抗藥基因比例明顯高於 *tetA* 抗藥基因，顯示出臺灣這幾年使用不同種類的四環素類抗菌劑，帶有 *tetB* 抗藥基因主要對四環素與 Minocycline 具有抗藥性，根據動物用藥規定 Minocycline 並不能使用在動物，故本實驗也沒對此類藥物進行探討，但可以確定台灣這幾年 *tetA* 及 *tetB* 抗藥基因比例明顯改變。

抗葉酸還原及合成抑制劑的抗藥性基因，本實驗中主要針對 *Sul1* 及 *dfrA1* 抗藥基因，帶有此基因可以對 Sulfamethoxazole 及 Trimethoprim 產生抗藥性。在臺灣郭等人發現傳統市場和屠宰場的仿土雞之沙門氏菌對 Sulphamethoxazole 及 Trimethoprim (74 %) 具有相當高的抗藥性 (郭, 2007)。而在鵝隻的腸道細菌，對 Sulphamethoxazole 及 Trimethoprim 的抗藥性為 100 % (謝, 2003)。另外多篇文獻指出第一型 integron 及第二型 integron 的基因卡匣內，常攜帶 *dfrA1* 抗藥基因 (Peirano et al., 2006；San Martín et al., 2008；Van Essen-Zandbergen et al., 2007)。故本研究對 *dfrA1* 抗藥基因進行探討，其結果有 7 株沙門氏菌檢測出 *dfrA1* 抗藥基因佔 31 %，而 *Sul1* 抗藥基因，則有 5 株檢測出佔 22 %。

抗胺基糖苷類的抗藥性基因，屬廣效性抗生素，對於治療革蘭氏陽性菌及革蘭氏陰性菌感染具治療效果，但在臨床上被限制使用，因會引起腎臟及聽覺障礙。值得注意的是 Martin 等人在 2008 年檢測豬隻沙門氏菌之第一型 integron 及第二型 integron，其基因卡匣內全部攜帶 *aadA1* 抗藥基因。結果顯示本實驗分離菌株對 *aadA1* 抗藥基因有 5 株檢測出佔 22 %，另外用 nested PCR 技術分析 *aadA1* 抗藥基因，有 3 株在 integron 裏面佔 60 %。

接下來探討，沙門氏菌所攜帶的抗藥基因和沙門氏對抗菌劑產生抗藥性表現的關聯性，本實驗利用費雪精確檢定，檢測抗藥性基因和沙門氏菌抗藥性的表現，發現沙門氏菌帶有 *sul1*、*dfrA1* 及 *tetB* 抗藥基因與沙門氏菌產生抗藥性具有顯著的相關性，但 *aadA1*、*tetA* 及 PSE 抗藥基因則無相關性。

另外具有 integron 的沙門氏菌及不具有 integron 的沙門氏菌之抗藥性基因的比較，結果可見具有 integron 的沙門氏菌所佔的抗藥性基因比不具有 integron 的沙門氏菌高，其中比較有趣的事，具有 integron 的沙門氏菌幾乎都檢測出 *sul1*、PSE 及 *tetA* 抗藥基因。而外國文獻指出，具有 integron 的沙門氏菌，有高的比例檢測出 *tet* 抗藥基因，但進一步分析，發現 *tet* 抗藥基因幾乎都位在染色體及質體上(Lapierre et al., 2010)。接著利用費雪精確檢定，比較具有 integron 的沙門氏菌及不具有 integron 的沙門氏菌產生抗藥性的關係，可發現具有 integron 的沙門氏菌，其多重抗藥性明顯較高。

Class 1 integron 基因分析

PCR 增幅片段經純化後進行 DNA 定序分析，所得之基因序列利用 BLAST 搜尋程式做基因的相似性比對，以確定增幅片段之基因為何。在 5'-CS 所讀出的序

列中，可發現有 5'-conserved segments 的部份序列，其後是核心部位(core site) 的 7 個 base 為 GTTRRRY，接著便是基因片匣的部份。

本次結果 22 株自雞隻及其飼養環境來源分離出之沙門氏菌，有 9 株檢出 integron 的增幅片段，並經純化後送至基龍米克斯及明欣生技公司進行基因序列分析。其結果只能定序出 3 株，其餘 6 株定序結果皆為訊號雜亂。而定序成功的 3 株利用搜尋程式 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 分別進行基因相似性搜尋，目的確認 DNA 序列，其 DNA 序列結果與 Genebank 編號為 FJ460237.1 的 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain sores04-45 class I integron DfrA12 (*dfr12*), hypothetical protein, and AadA2 (*aadA2*) genes, complete cds, 相似度為 100 % (1816/1816) (Fig16)。

其餘 6 株定序結果皆為訊號雜亂，可能由於這組 primer 的特性分別位在 5'端及 3'端 conserved segments 上近 central variable region 的位置，因此 PCR 增幅的產物片段大小及長度並不一致，乃是看於 integron variable region 內的基因卡匣的數目和基因卡匣的本身大小；另外此組 primer 另一個特性，就是菌株體內可能具有 2~3 個夾帶不同基因片匣的 integron，在國外也有文獻指出 (Gebreyes et al., 2004)。

因此本實驗推測，分離自雞隻及其飼養環境來源的菌體可能帶有至少有 2 種以上的 integron 在同一個相近的位置上，由於 agarose gel 的鑑別度較低，在 agarose gel 上只能大概利用 PCR 產物的大小來判別 DNA 中所帶的 integron 是否相同，而相同大小的 PCR 產物並無法確定其基因片匣中抗藥基因的組合是否相同。所以這也是其餘的六株無法定序出來的原因。故解決的辦法可能只有使用 clone 的技術，才能將序列單一化並增幅。

第六章 結論



公共衛生上，家禽及家禽製品是人類感染沙門氏菌的主要來源。而文獻指出雞隻若是遭到沙門氏菌的感染，即可能導致下游場的雞隻持續感染此菌，並且會排菌至環境，因此在選購沙門氏菌清淨的雞隻，對控制沙門氏菌是重要的關鍵。

另外，家禽之抗藥性沙門氏菌的盛行，已造成臨床上治療的困難。近年來被各界學者廣為研究的 integron，其被認為繼抗藥性質體與轉位子外，另一個細菌獲得抗藥基因及抗藥基因散佈有關的機制。因此本實驗針對不同年齡層的雞隻及環境分析沙門氏菌，並探討菌株是否含有第一型 integron 及其相關抗藥特性。

首先在抗藥性分析方面，種雞場與肉雞場的一日齡小雞之沙門氏菌多重抗藥性調查，兩者沒有太大差異，但在大於一日齡肉雞之沙門氏菌多重抗藥性的比例則高於種雞，顯示在台灣肉雞場的飼養環境及用藥使用方式的不同所造成之結果。而在一日齡雞隻之沙門氏菌多重抗藥性比例低於其他年齡層雞隻，並利用統計分析一日齡雞隻之沙門氏菌，其多重抗藥性顯著低於飼養環境來源之沙門氏菌 ($P<0.05$)。可能原因是家禽飼養過程中，廣泛使用抗菌劑，使飼養環境來源及雞隻之沙門氏菌抗藥性愈趨嚴重。且本實驗發現多重抗藥性沙門氏菌普遍存在雞場的飼養環境中，是否會透過水平傳播方式傳播抗藥性沙門氏菌給雞隻，在公共衛生上是需密切注意的。因此建議雞場環境要確實清潔與消毒，以避免雞隻遭受到沙門氏菌的感染。

Integron 的檢測方面，一日齡雞隻分離的沙門氏菌均無偵測出 integron，但大於一日齡雞隻及環境樣本之沙門氏菌則能檢出 integron，檢出率分別為 50 % (3/6) 與 75 % (6/8)。抗藥性基因方面，具有 integron 的菌株至少能檢測出三種抗藥性

基因，而不具 integron 的菌株僅一株能檢測出三種抗藥性基因；在菌株抗藥性方面，具 Integron 菌株至少對五種抗菌劑有抗藥性。這些結果都顯示，具有 integron 的菌株抗藥性比例都明顯高於 integron 陰性菌株，並且 integron 陽性菌株呈現更顯著的多重抗藥性。Integron 顯然在抗藥基因的傳播上扮演著重要的角色，值得各方重視。

第七章 參考文獻



陳青聖。台灣地區養雞場沙門氏菌之分離與鑑定。碩士論文。國立屏東科技大學獸醫學系。2010。

李美鳳。革蘭氏陰性桿菌第一類型 integron 之研究。博士論文。高雄醫學大學醫學研究所。2009。

翁嘉伶。台灣傳統市場有色肉雞沙門氏菌血清型及抗藥性之研究。碩士論文。國立中興大學獸醫公共衛生學研究所。2009。

陳怡君。沙門氏桿菌抗藥性基因型之分析。碩士論文。國立屏東科技大學獸醫學系。2008。

謝志宏。種禽及孵化蛋之沙門氏桿菌的疫情與抗藥性分析。碩士論文。國立嘉義大學獸醫學系研究所。2006。

邱蘭皓。台灣南部地區雞場沙門氏菌流行病學研究:血清型、抗藥性及基因型分析。碩士論文。國立嘉義大學獸醫學系研究所。2004。

郭乃維。家禽屠宰場與市售屠體沙氏桿菌與彎曲桿菌汙染情形調查。碩士論文。國立台灣大學獸醫學研究所。2002。

洪惠雯、邱怡昌、王金和。孵化場絨毛分離之沙門氏菌抗生素抗藥性變化。臺灣獸醫學雜誌。2009。35(1): 9-14。

周崇熙，蔡向榮。台灣肉雞沙氏桿菌、彎曲桿菌之盛行率及抗菌劑感受性調查。中華獸醫誌。2001。27: 27-38。

林正忠，劉哲宏，張照勤，李維誠，劉正義，陳德勛。不同來源之豬隻沙氏桿菌
流行病學調查：探討台灣居民感染人畜共通沙氏桿菌症風險。台灣公共衛生
雜誌 2008。27: 243-49。



林正忠，郭俊緯，張照勤，王裕智，沈瑞鴻，葉光勝，陳德勛。上市白肉雞與仿
土雞之沙氏桿菌分離率與抗藥性比較。臺灣獸醫學雜誌。2008。34(4):217-25。

Angkititrakul S, Chomvarin C, Chaita T, Kanistanon K, Waethewutajarn S.
Epidemiology of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from pork,
chicken meat and humans in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health.
2005; 36 (6): 1510-5.

Arun KB. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogens. Springer. New
York. 2008. 201-16.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs. Nucleic Acids Res. 1997; 25 (17): 3389-402.

Bangtrakulnonth A, Pornreongwong S, Pulsrikarn C, Sawanpanyalert P, Hendriksen RS,
Lo Fo Wong DM and Aarestrup FM. *Salmonella* serovars from humans and other
sources in Thail, 1993-2002. Emerg Infect Dis. 2004; 10 (1): 131-36.

Baudart J, Lemarchand K, Brisabois A, Lebaron P. Diversity of *Salmonella* strains
isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and
amplification of the ribosomal DNA spacer regions. Appl Environ Microbiol.
2000; 66 (4): 1544-52.

Bauer JAW, Kirdy WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a
standard single disc method. Am j Clin Pathol. 1996; (45): 493-96.

Berrang ME, Ladely SR, Simmons M, Fletcher DL, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial resistance patterns of *salmonella* from retail chicken. Int J Poult Sci. 2006; 5 (4): 351-54.

Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. J Bacteriol. 2003; 185 (12): 3567-74.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol. 2000; 38 (7): 2465-7.

Burdett V. Purification and characterization of tet (M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. J Biol Chem. 1991; 266 (5): 2872-7.

Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet Res. 2001; 32 (3-4): 243-59.

Carlson SA, Bolton LF, Briggs CE, Hurd HS, Sharma VK, Fedorka-Cray PJ, Jones BD. Detection of multiresistant *Salmonella* typhimurium DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. Mol Cell Probes. 1999; 13 (3): 213-22.

Casin I, Breuil J, Brisabois A, Moury F, Grimont F, Collatz E. Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1. J Infect Dis. 1999; 179 (5): 1173-82.

Chang LL, Chang TM, Chang CY. Variable gene cassette patterns of class 1 integron associated drug-resistant *Escherichia coli* in Taiwan. Kaohsiung J Med Sci. 2007; 23 (6): 273-80.

Chen H, Fraser AD, Yamazaki H. Evaluation of the toxicity of *Salmonella* selective media for shortening the enrichment period. Int J Food Microbiol. 1993; 18 (2): 151-59.

Chiou CS, Lin JM, Chiu CH, Chu CH, Chen SW, Chang YF, Weng BC, Tsay JG, Chen CL, Liu CH, Chu C. Clonal dissemination of the multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Braenderup, but not the serovar Bareilly, of prevalent serogroup C1 *Salmonella* from Taiwan. BMC Microbiol. 2009; 9: 264.

Chiu CH, Lin TY and Ou JT. Prevalence of the virulence plasmids of nontyphoid *Salmonella* in the serovars isolated from humans and their association with bacteremia. Microbiol Immunol 1999; 43 (9): 899-903.

Chiu CH, Su LH, Hung CC, Chen KL, Chu C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of serogroup D nontyphoidal *Salmonella* in a university hospital in Taiwan. J Clin Microbiol. 2004; 42 (1): 415-7.

Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39 (1): 155-62.

Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. J Bacteriol. 2002; 184 (11): 3017-26.

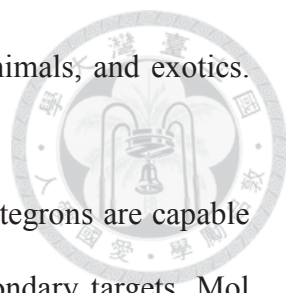
Cox NA, Berrang ME, Cason JA. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs-a review. Poult Sci. 2000 ; 79 (11): 1571-74.

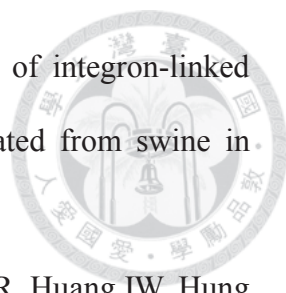
Davies RH, Wray C. An approach to reduction of *Salmonella* infection in broiler chicken flocks through intensive sampling and identification of cross contamination hazards in commercial hatcheries. Int J Food Microbiol. 1994; 24(1-2): 147-60.

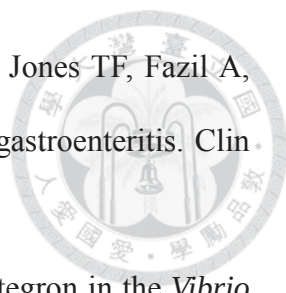
Dera-Tomaszewska B. *Salmonella* serovars isolated for the first time in Poland, 1995-2007. Int J Occup Med Environ Health. 2012 ; 25(3): 294-303.

Faldynova M, Pravcova M, Sisak F, Havlickova H, Kolackova I, Cizek A, Karpiskova R, Rychlik I. Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar

- 
- typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47 (6): 2002-5.
- Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi AC, Dias AM, Almeida IA and Melo LC. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006; 48 (4): 179-84.
- Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18 (11): 761-70.
- Folkesson A, Löfdahl S, Normark S. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. Res Microbiol. 2002; 153(8): 537-45.
- Frana TS, Carlson SA, Griffith RW. Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104. Appl Environ Microbiol. 2001; 67 (1): 445-8.
- Gebreyes WA, Thakur S, Davies PR, Funk JA, Altier C. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. J Antimicrob Chemother. 2004; 53 (6): 997-1003.
- Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas). 2011; 47 (3): 137-46.
- Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. N Engl J Med. 1998; 338 (19): 1333-8.
- Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. Incidence of class 1 and 2 integrases in

- 
- clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45 (3): 723-6.
- Hansson K, Sköld O, Sundström L. Non-palindromic *attI* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. Mol Microbiol. 1997; 26 (3): 441-53.
- Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH. *IntI2* integron integrase in Tn7. J Bacteriol. 2002; 184 (6): 1712-21.
- Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol. 1995; 15 (4):593-600.
- Hall RM. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. Ciba Found Symp. 1997; 207: 192-202.
- Hoorfar J and Baggesen DL. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. FEMS Microbiol Lett. 1998 ; 169 (1): 125-30.
- Holt PS, Chaubal LH. Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella* pullorum cultures. J Clin Microbiol. 1997; 35 (4): 1016-20.
- Hsu SC, Chiu TH, Pang JC, Hsuan-Yuan CH, Chang GN, Tsen HY. 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. 2006; 27 (5): 383-91.
- Kim A, Lee YJ, Kang MS, Kwag SI, Cho JK. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. J Vet Sci. 2007; 8 (2): 155-61.
- Kudaka J, Itokazu K, Taira K, Iwai A, Kondo M, Susa T, Iwanaga M. Characterization of *Salmonella* isolated in Okinawa, Japan. Jpn J Infect Dis. 2006; 59(1): 15-9.

- 
- Lapierre L, San Martín B, Araya-Jordán C, Borie C. Comparison of integron-linked antibiotic resistance genes in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine in Chile in 2005 and 2008. *Can J Microbiol*. 2010; 56 (6): 515-21.
- Lauderdale TL, Aarestrup FM, Chen PC, Lai JF, Wang HY, Shiau YR, Huang IW, Hung CL; TSAR hospitals. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 55 (2): 149-55.
- Lee CY, Chiu CH, Chuang YY, Su LH, Wu TL, Chang LY, Huang YC, Lin TY. Multidrug resistant non typhoid *Salmonella* infections in a medical center. *J Microbiol Immunol Infect*. 2002; 35 (2): 78-84.
- Lee MF, Chen YH, Peng CF. Molecular characterisation of class 1 integrons in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33 (3): 216-22.
- Lee LA, Puhr ND, Maloney EK, Bean NH, Tauxe RV. Increase in antimicrobial resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990. *J Infect Dis*. 1994; 170 (1): 128-34.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 ; 39 (1): 185-91.
- Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992; 36 (4): 695-703.
- Madsen L, Aarestrup FM, Olsen JE. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Vet Microbiol*. 2000; 75 (1): 73-82.

- 
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010; 50 (6): 882-9.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. Science. 1998; 280 (5363): 605-8.
- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol. 2006; 4 (8): 608-20.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999; 5 (5): 607-25.
- M'ikanatha NM, Sandt CH, Localio AR, Tewari D, Rankin SC, Whichard JM, Altekruse SF, Lautenbach E, Folster JP, Russo A, Chiller TM, Reynolds SM, McDermott PF. Multidrug-resistant *Salmonella* isolates from retail chicken meat compared with human clinical isolates. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7 (8): 929-34.
- Myint MS, Johnson YJ, Tablante NL and Heckert RA. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. Food Microbiol. 2006; 23 (6): 599-604.
- Nayak R, Kenney PB. Screening of *Salmonella* isolates from a turkey production facility for antibiotic resistance. Poult Sci. 2002; 81 (10): 1496-1500.
- Namata H, Welby S, Aerts M, Faes C, Abrahantes JC, Imberechts H, Vermeersch K, Hooyberghs J, Méroc E, Mintiens K. Identification of risk factors for the prevalence and persistence of *Salmonella* in Belgian broiler chicken flocks. Prev Vet Med. 2009; 90 (3-4): 211-22.

Nemergut DR, Martin AP, Schmidt SK. Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70 (2): 1160-8.

Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes.* 2001; 15 (4): 209-15.

Oh JY, MS Kang, BK An, Song EA, Kwon JH, YK Kwon. Occurrence of purulent arthritis broilers vertically infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Korea. *Poult Sci.* 2010; 89 (10): 2116-22.

Osman KM, Yousef AM, Aly MM, Radwan MI. *Salmonella* spp. infection in imported 1-day-old chicks, ducklings, and turkey poults: a public health risk. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7 (4): 383-90.

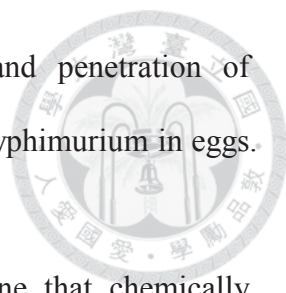
Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, dos Reis EM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58 (2): 305-9.

Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* 1995; 141 (Pt 12): 3015-27.

Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 245 (2): 195-203.

San Martín B, Lapierre L, Cornejo J, Bucarey S. Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine. *Can J Microbiol.* 2008; 54 (7): 569-76.

Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 160 (1): 37-41.

- 
- Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wong AC. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. Int J Food Microbiol. 1995; 24 (3): 385-96.
- Speer BS, Salyers AA. Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. J Bacteriol. 1989; 171 (1): 148-53.
- Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol. 1989; 3 (12): 1669-83.
- Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. Clin Infect Dis. 2004; 39 (4): 546-51.
- Tajbakhsh M, Hendriksen RS, Nochi Z, Zali MR, Aarestrup FM, Garcia-Migura L. Antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. recovered from patients admitted to six different hospitals in Tehran, Iran from 2007 to 2008. Folia Microbiol (Praha). 2012; 57 (2): 91-7.
- Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev. 2002; 26 (2): 141-8.
- Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, Prado V. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. Epidemiol Infect. 2005; 133 (1): 81-6.
- Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesús J, Platt DJ, Olsen JE. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiol Infect. 2000; 125 (2): 229-55.
- Van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, Mevius D. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and

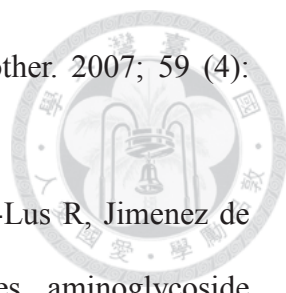
- 
- Campylobacter* spp. in the Netherlands. J Antimicrob Chemother. 2007; 59 (4): 746-50.
- Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R, Gomez-Lus R, Jimenez de Anta T. In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37 (1): 138-41.
- Wang YC, Yeh KS, Chang CC, Hsuan SL, Chen TH. Fluoroquinolone-resistant *Salmonella* sp. in carcasses. Emerg Infect Dis. 2006; 12 (2): 351-2.
- White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrins and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45 (9): 2658-61.
- Wilson IG. *Salmonella* and *campylobacter* contamination of raw retail chickens from different producers: a six year survey. Epidemiol Infect. 2002; 129 (3): 635-45.
- Yan SS, Pendark ML, Abela-Ridder B, Punderson JW, Fedoeko DP and Foley SL. An overview of *salmonella* typing public health perspectives. Applied Immunol Rev. 2004; (3): 189-204.
- Yu CY, Chu C, Chou SJ, Chao MR, Yeh CM, Lo DY, Su YC, Horng YM, Weng BC, Tsay JG, Huang KC. Comparison of the association of age with the infection of *Salmonella* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Pekin ducks and Roman geese. Poult Sci. 2008; 87 (8): 1544-9.



Table 1. Reference inhibition zone for antimicrobial resistance test of each tested drug.

Antimicrobials	Inhibition zone (mm)		
	Resistant	Intermediate	Sensitive
Ampicillin (10μg)	≤ 13	14-16	≥ 17
Ceftrizxone (30μg)	≤ 13	14-20	≥ 21
Ciprofloxacin (5μg)	≤ 15	16-20	≥ 21
Kanamycin (30μg)	≤ 13	14-17	≥ 18
Oxytetracycline (30μg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Spectinomycin (100μg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Streptomycin (10μg)	≤ 11	12-14	≥ 15
SXT (1.25 /23.75 μg)	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetracycline (30μg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimethoprim (5μg)	≤ 10	11-15	≥ 16

SXT: Sulfamethoxazole-Trimethoprim



Table 2. Primer sequences and annealing temperatures used in the PCR reactions.

Primer	Sequence	Length (bp)	Annealing Temperature (°C)	Reference
5'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variable	60	Lévesque et al., 1995
3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA			
<i>aadA1F</i>	GTGGATGGCGGCTGAAGCC	528	65	Madsen et al., 2000
<i>aadA1R</i>	AATGCCCAGTCGGCAGCG			
<i>aphA1F</i>	AAACGTCCTTGCTCGAGGC	500	65	Frana et al., 2001
<i>aphA1R</i>	CAAACCGTTATTCAATTCGTGA			
<i>dfrA1F</i>	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC	367	55	Toro et al., 2005
<i>dfrA1R</i>	GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC			
<i>PSE-F</i>	TAGCCATAATTATGGAGCCTC	321	55	Faldynova et al., 2003
<i>PSE-R</i>	TTAACTTTTCCTTGCTCAGC			
<i>Sul 1 F</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC	436	65	Sandvang et al., 1998
<i>Sul 1 R</i>	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC			
<i>TEM F</i>	GCACGAGTGGGTTACATCGA	311	55	Carlson et al., 1999
<i>TEM R</i>	GGTCCTCCGATCGTTGTCAG			
<i>tetA F</i>	GCTACATCCTGCTTGCCCTC	210	55	Ng et al., 2001
<i>tetA R</i>	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>tetB F</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTG			
<i>tetB R</i>	GTAATGGCCAAATAACACCG	659	55	Ng et al., 2001



Table 3. Percentage of susceptibility over drugs for *Salmonella* at chicken farms

Sources	Day-old chicken				Chicken				Environment			
	n=8				n=6				n=8			
	R	I	S		R	I	S		R	I	S	
Antimicrobials												
Ampicillin (10 µg)	75% (6/8)	13% (1/8)	13% (1/8)		100% (6/6)	0% (0/6)	0% (0/6)		88% (7/8)	0% (0/8)	13% (1/8)	
Ceftrizxone (30 µg)	0% (0/8)	13% (1/8)	88% (7/8)		0% (0/6)	0% (0/6)	100% (6/6)		13% (1/8)	0% (0/8)	88% (7/8)	
Ciprofloxacin (5 µg)	0% (0/8)	0% (0/8)	100% (8/8)		0% (0/6)	0% (0/6)	100% (6/6)		0% (0/8)	0% (0/8)	100% (8/8)	
Kanamycin (30µg)	0% (0/8)	38% (3/8)	63% (5/8)		33% (2/6)	50% (3/6)	17% (1/6)		13% (1/8)	13% (1/8)	75% (6/8)	
Oxytetracycline(30µg)	38% (3/8)	0% (0/8)	63% (5/8)		67% (4/6)	0% (0/6)	33% (2/6)		75% (7/8)	0% (0/8)	13% (1/8)	
Spectinomycin(100µg)	13% (1/8)	50% (4/8)	38% (3/8)		33% (2/6)	67% (4/6)	0% (0/6)		13% (1/8)	63% (5/8)	25% (2/8)	
Streptomycin (10 µg)	63% (5/8)	38% (3/8)	0% (0/8)		50% (3/6)	50% (3/6)	0% (0/6)		25% (2/8)	75% (6/8)	0% (0/8)	
SXT (1.25/23.75 µg)	13% (1/8)	25% (2/8)	63% (5/8)		50% (3/6)	17% (1/6)	33% (2/6)		75% (6/8)	0% (0/8)	25% (2/8)	
Tetracycline (30µg)	38% (3/8)	0% (0/8)	63% (5/8)		67% (4/6)	0% (0/6)	33% (2/6)		88% (7/8)	0% (0/8)	13% (1/8)	
Trimethoprim (5µg)	13% (1/8)	13% (1/8)	75% (6/8)		50% (3/6)	17% (1/6)	33% (2/6)		75% (6/8)	0% (0/8)	25% (2/8)	

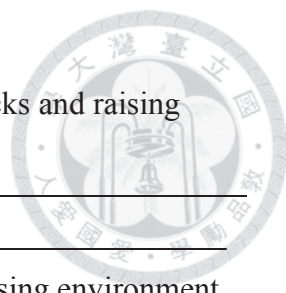
Table 4. Antimicrobial resistance of 14 *Salmonella* from day-old chicks and chickens

Antimicrobials	Source ^a	
	Day-old chicks (n=8)	Chickens (n=6)
Ampicillin	6	6
Ceftrizxone	0	0
Ciprofloxacin	0	0
Kanamycin	0	2
Oxytetracycline	3	4
Spectinomycin	1	3
Streptomycin	5	2
SXT	1	3
Tetracycline	3	4
Trimethoprim	1	3

^a Fisher's exact two-tailed *P*-value.

No statistical significant difference was found between any category ($P>0.05$)

Table 5. Antimicrobial resistance of 16 *Salmonella* from day-old chicks and raising environment



Antimicrobials	Source ^a	
	Day-old chicks (n=8)	Raising environment (n=8)
Ampicillin	6	7
Ceftrixone	0	1
Ciprofloxacin	0	0
Kanamycin	0	1
Oxytetracycline	3	7
Spectinomycin	1	1
Streptomycin	5	2
SXT	1	6*
Tetracycline	3	7
Trimethoprim	1	6*

^aFisher's exact two-tailed *P*-value.

*Significant ($P < 0.05$)

Table 6. Antimicrobial resistance of 14 *Salmonella* from Chickens and raising environment

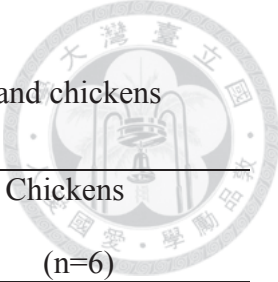


Antimicrobials	Source ^a	
	Chickens (n=6)	Raising environment (n=8)
Ampicillin	6	7
Ceftrizxone	0	1
Ciprofloxacin	0	0
Kanamycin	2	1
Oxytetracycline	4	7
Spectinomycin	2	1
Streptomycin	5	2
SXT	3	6
Tetracycline	4	7
Trimethoprim	3	6

^a Fisher's exact two-tailed *P*-value.

No statistical significant difference was found between any category ($P>0.05$)

Table 7. Multidrug-resistant *Salmonella* isolates from day-old chicks and chickens



No. of antibiotics	Day-old chicks (n=8)	Chickens (n=6)
3	4(50%)	4(67%)
4	2(25%)	4(67%)
5	0(0%)	3(50%)

a Fisher's exact two-tailed P-value.

No statistical significant difference was found between any category ($P>0.05$)

Table 8. Multidrug-resistant *Salmonella* isolates from day-old chicks and raising environment

No. of antibiotics	Day-old chicks (n=8)	Raising environment (n=8)
3	4(50%)	7(88%)
4	2(25%)	7*(88%)
5	0(0%)	7*(88%)

*Significant ($P<0.05$)



Table 9. Association between antibiotic susceptibility profile and integrons in 22 isolates

No. of antimicrobial	Integron-positive salmonella (n=9)	Integron –negative salmonella (n=13)
3	9*	6
4	9*	4
5	9*	1
6	3*	0

*Significant ($P<0.05$)

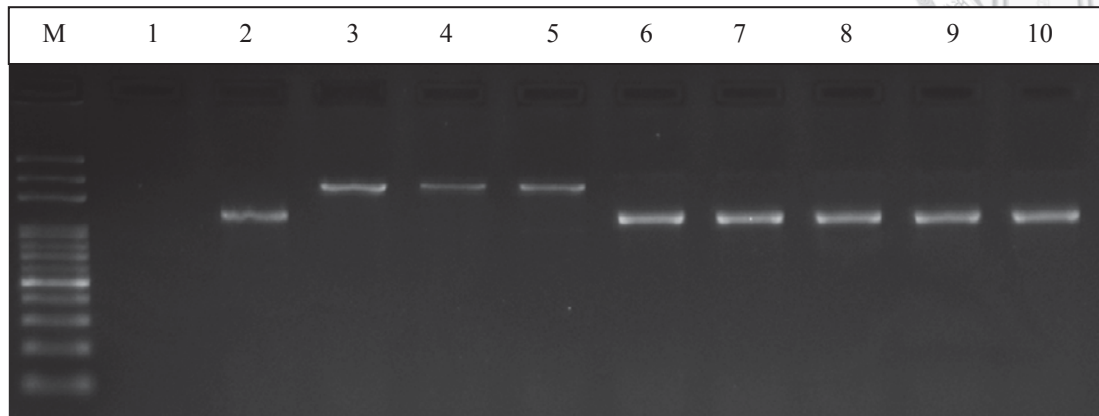


Fig 1. PCR amplification of class 1 integrons among different serotypes of *Salmonella*.
 Lane M: 100bp DNA ladder markers. Lane 1: negative control (Distilled water).
 Lane 2: Albany. Lane 3: Livingstone. Lane 4 ~ 5: Typhimurium. Lane 6 ~ 10:
 Albany

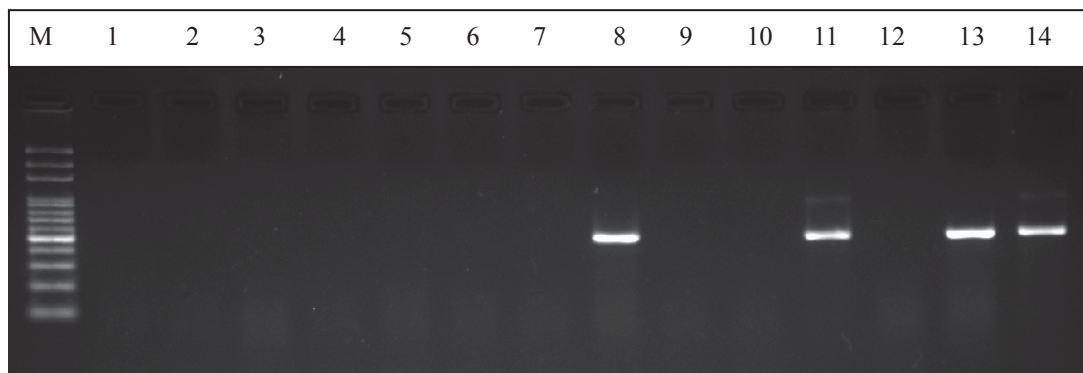


Fig 2. Detection of *aadA* gene in 14 *Salmonella* isolate from chicken

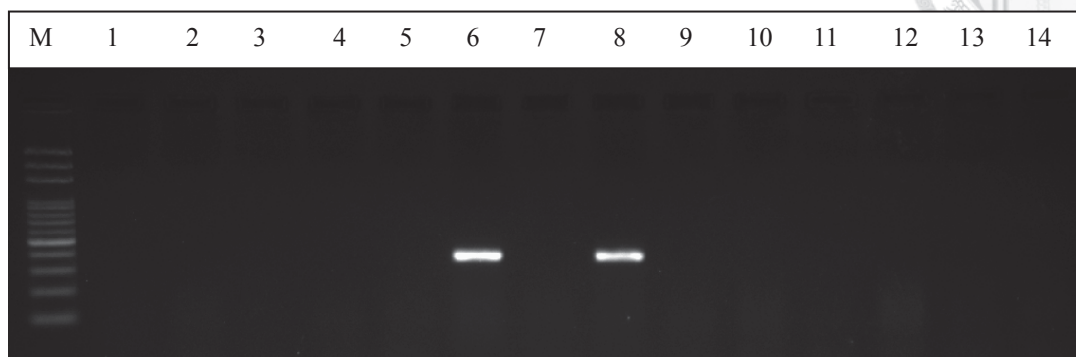


Fig 3. Detection of *dfrA1* gene in 14 *Salmonella* isolate from chicken

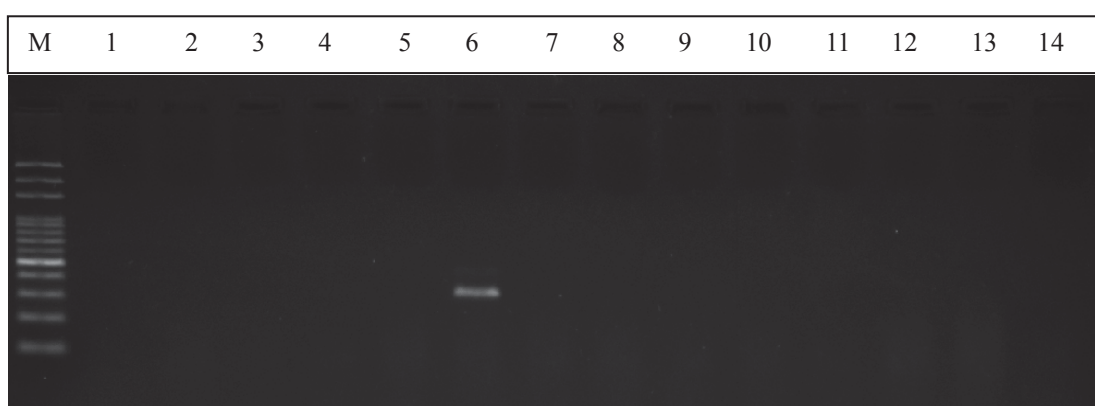


Fig 4. Detection of *PSE* gene in 14 *Salmonella* isolate from chicken

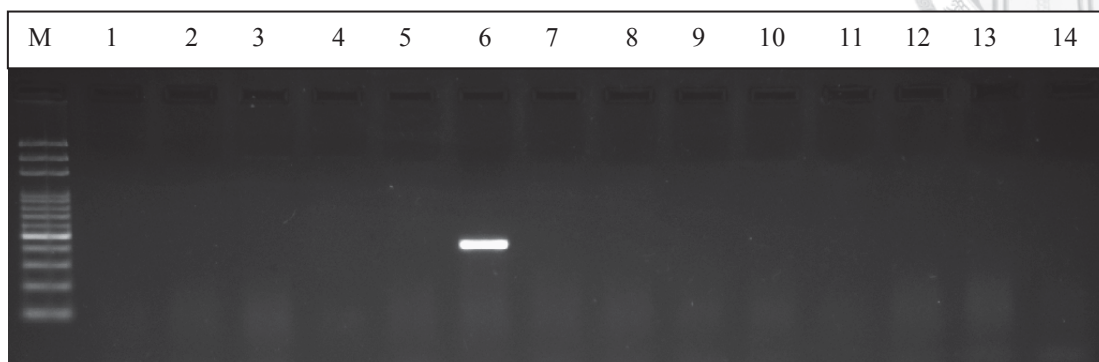


Fig 5. Detection of *Sul* gene in 14 *Salmonella* isolate from chicken

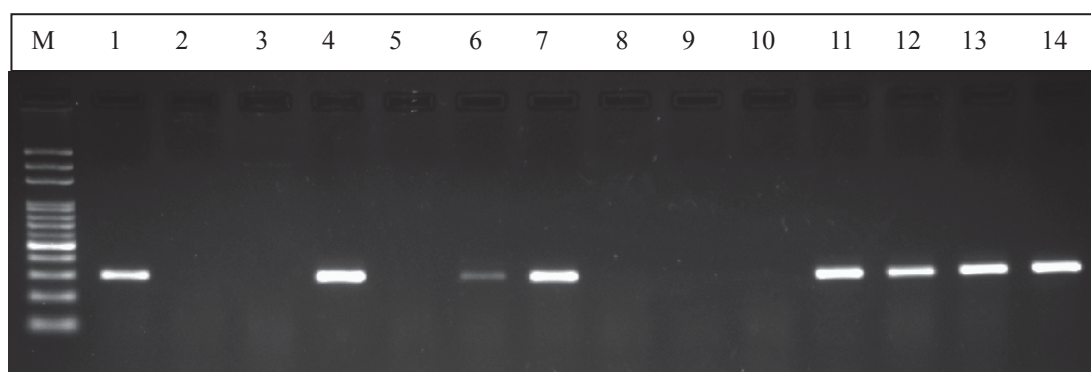


Fig 6. Detection of *TEM* gene in 14 *Salmonella* isolate from chicken

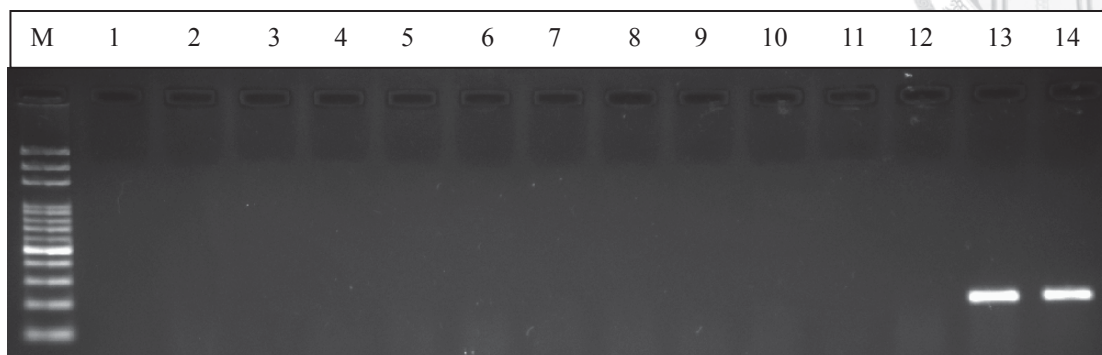


Fig 7. Detection of *tetA* gene in 14 *Salmonella* isolate from chicken

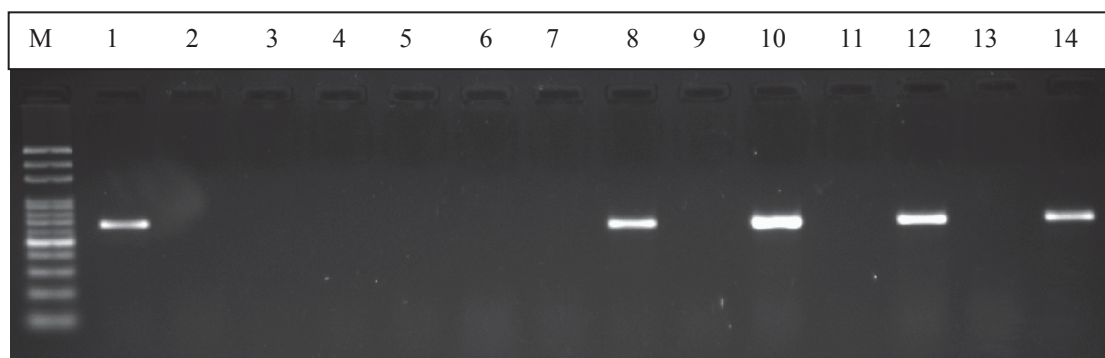


Fig 8. Detection of *tetB* gene in 14 *Salmonella* isolate from chicken

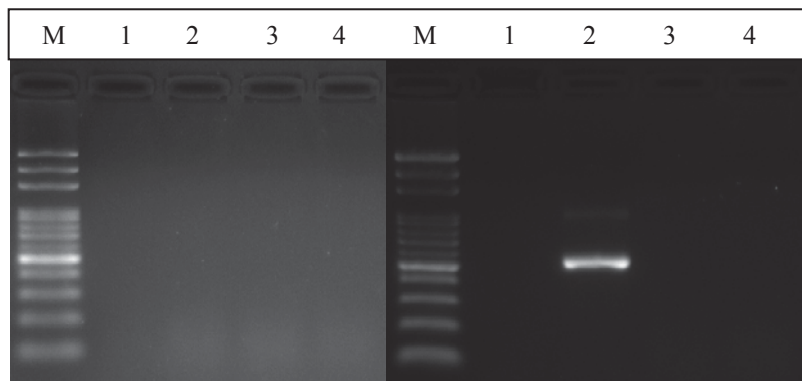


Fig 9. Detection of *aadA* gene in 8 *Salmonella* isolate from environment

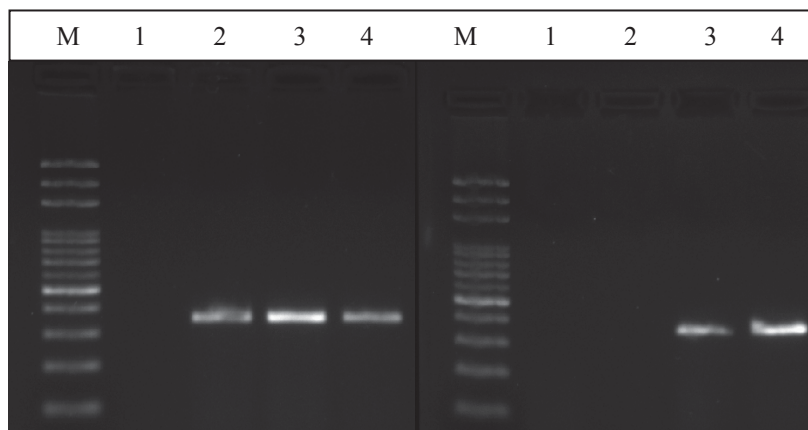


Fig 10. Detection of *dfrA1* gene in 8 *Salmonella* isolate from environment

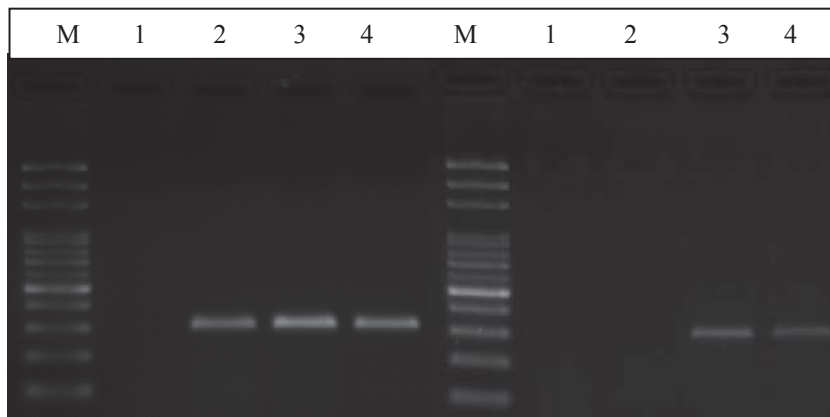


Fig 11. Detection of *PSE* gene in 8 *Salmonella* isolate from environment

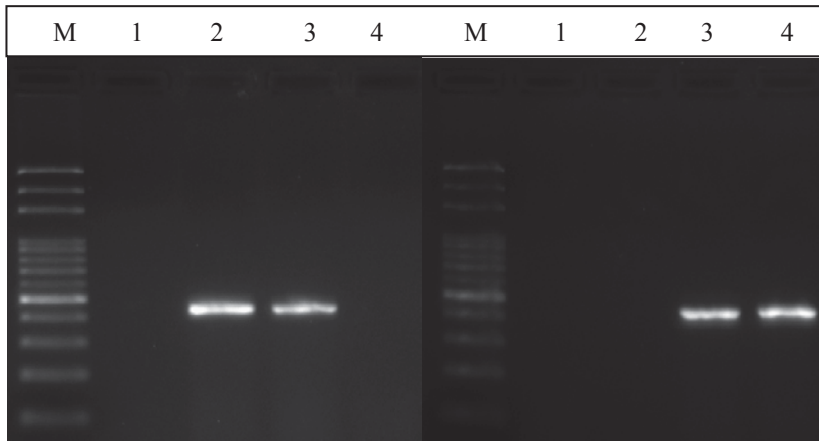


Fig 12. Detection of *Sul1* gene in 8 *Salmonella* isolate from environment

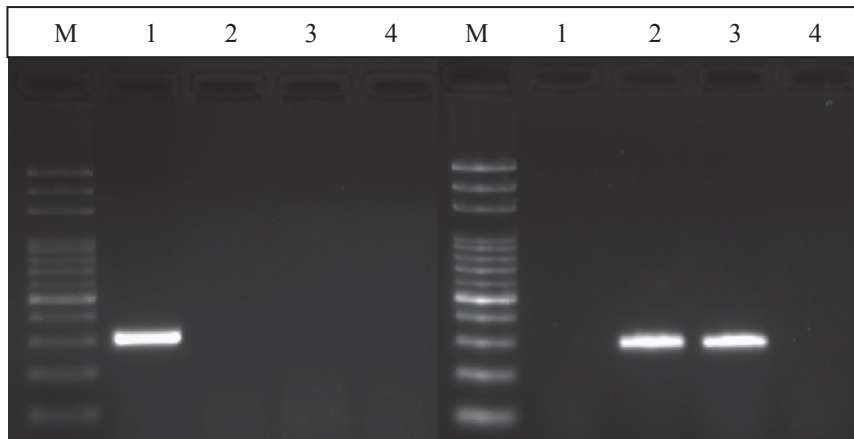


Fig 13. Detection of *TEM* gene in 8 *Salmonella* isolate from environment

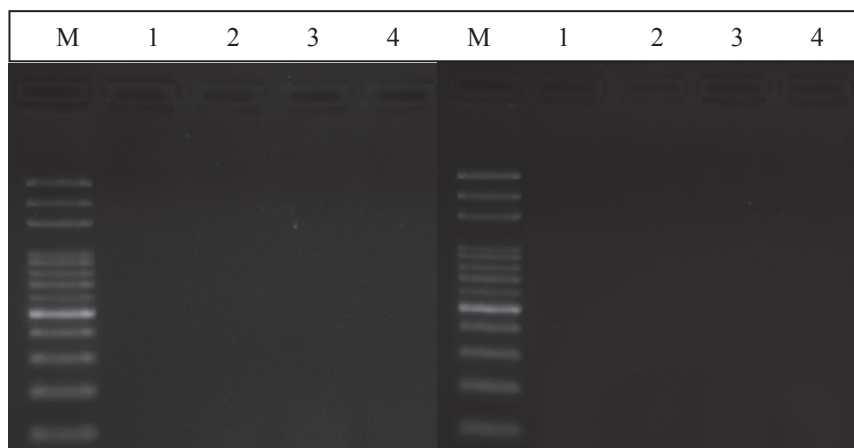


Fig 14. Detection of *tetA* gene in 8 *Salmonella* isolate from environment

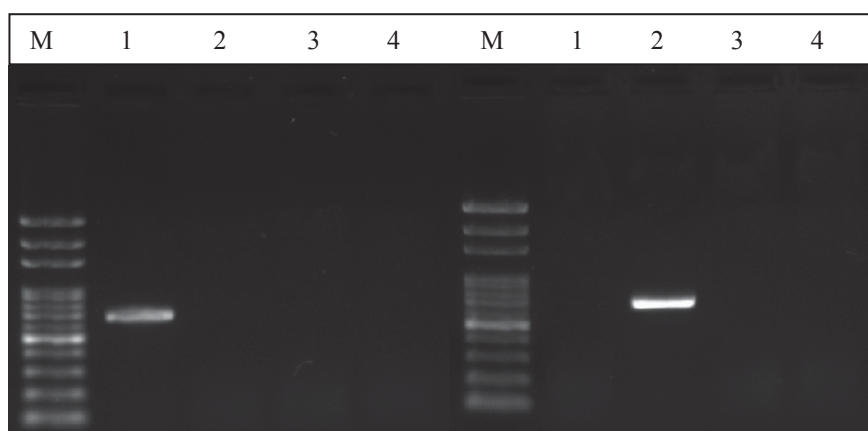


Fig 15. Detection of *tetB* gene in 8 *Salmonella* isolate from environment



1 tggagcagca acgatgttac gcagcagggc agtcgcccta aaacaaagtt agccatatga
61 actcggaatc agtacgcatt tatctcgttg ctgcgatggg agccaatcgg gttattggca
121 atggctctaa tatccctcgg aaaattccgg gtgagcagaa gatttttcgc agactcactg
181 agggaaaagt cgttgatcatg gggcgaaaga cttttgagtc tatcggcaag cctctaccga
241 accgtcacac attggaatc tcacgccaag ctaactaccg cgccactggc tgcgtagtgc
301 tttcaacgct gtcgcacgct atcgctttgg catccgaact cggcaatgaa ctctacgtcg
361 cgggcgggagc tgagatatata actctggcac tacctcagcg ccacggcgtg tttctatctg
421 aggtacatca aaccttcgag ggtgacgcct tcttccaat gctcaacgaa acagaattcg
481 agcttgcttc aaccgaaacc attcaagctg taattccgta caccactcc gtttatgcgc
541 gtcgaaacgg ctaaccattc cgtcaacggg acgcaaaaat gctgcgcatt ttggttccct
601 ccgctgcgct cgggtctcgt ttacgtccaa cgtagcacc actgaaaccc agctttattt
661 agctcatgtt tattcaaacg gcatttagct tttcaggcgt tattcagtgc ctgttttgcc
721 tttttccgg gcttcgctg catgggctgc gcaggtttc agtcttttg gccttagcc
781 cttgcgtagc aagcgcaagc agctatcgtt ttgcagtgc tgtgccgct cggtggcgca
841 gcgtttttc acggttagcg cccgtcgcca aattcaagtt atccgtttg gcttctggtt
901 ctaacatttc ggtcaagccg accgcattc tgcggtcggc ttacctgcc cgtagacat
961 catgagggaa gcggtgacca tcgaaatttc gaaccaacta tcagaggtgc taagcgtcat
1021 tgagcgccat ctggaatcaa cgttgctggc cgtgcattg tacggctccg cagtggatgg
1081 cggcctgaag ccatacagcg atattgattt gttggttact gtggccgtaa agcttgatga
1141 aacgacgcgg cgagcattgc tcaatgatct tatggaggct tcggctttcc ctggcgagag
1201 cgagacgctc cgcgctatag aagtcaccct tgcgtgcat gacgacatca tcccgtagcg
1261 ttatccggct aagcgcgagc tgcaatttgg agaattggcag cgcaatgaca ttcttgcggg
1321 tatcttcgag ccagccatga tcgacattga tctagctatc ctgcttaca aagcaagaga
1381 acatagcgtt gccttggtag gtccggcagc ggaggaattc ttgaccggg ttcctgaaca
1441 ggatctattc gaggcgctga gggaaacctt gaagctatgg aactcgagc ccgactgggc
1501 cggcgatgag cgaaatgtag tgcttacgtt gtcccgcat tggtagacgc caataaccgg
1561 caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaata aaacgcctac ctgcccagta
1621 tcagcccgtc ttacttgaag ctaagcaagc ttatctggga caaaaagaag atcacttggc
1681 ctacgcgca gatcacttgg aagaatttat tcgctttgtg aaaggcgaga tcatcaagtc
1741 agttggtaaa tgatgtctaa caattcgttc aagccgaccg cgctacgcgc ggcggcttaa
1801 ctccggcggt agatgc

Fig 16. 2.0 kb cassette array DNA sequence. 1~56 :5' conserved region of class 1 integron , 17~54: *att1* , 57~554: *dfrA12* , 666~956:orfF , 962~1753:*addA2* 1809~1806: 3'cs conserved region of class 1 integron.

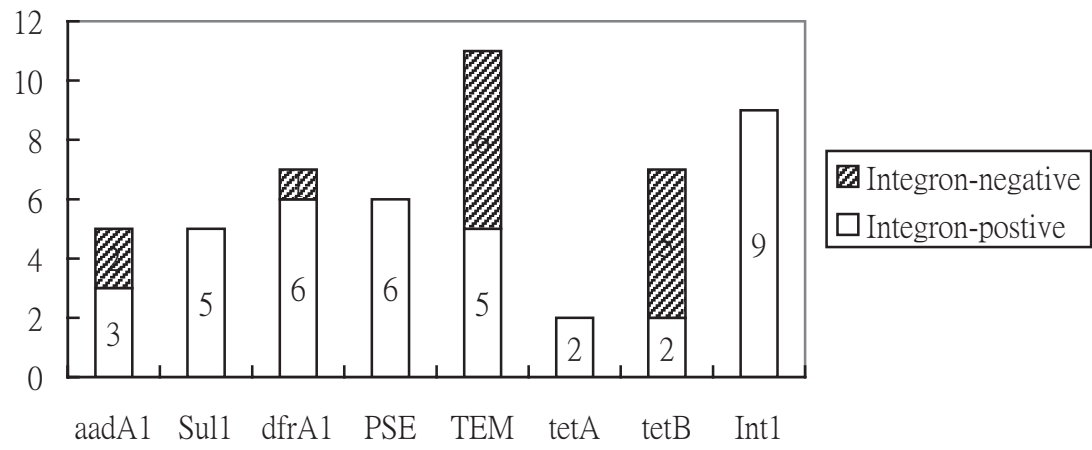


Fig 17. Detection resistance genes from 22 isolates