

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการระบุสายพันธุ์ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium  
และ Enteritidis โดย High Resolution Melting Analysis



นางสาวพนัสนันท์ ศิลมัฐ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium  
AND Enteritidis STRAINS IDENTIFICATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS

Miss Panusanun Silamat



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology  
Department of Food Technology  
Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic year 2010  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการระบุสายพันธุ์  
*Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ  
Enteritidis โดย High Resolution Melting Analysis

โดย

นางสาวพนัสนันท์ ศิลมัฐ

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

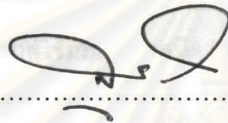
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิริติพิบูล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร.มงคล เวสารัชเวศย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
การศึกษิตตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



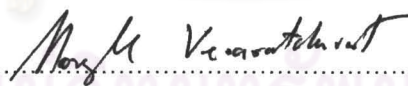
ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)



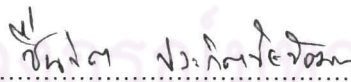
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิริติพิบูล)



อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.มงคล เวสารัชเวศย์)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประกิตชัยวัฒนา)



กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายสัตวแพทย์ รุจเวทย์ ทหารแก้ว)

พนัสนันท์ ศิลมัฐ : การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการระบุสายพันธุ์ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ Enteritidis โดย High Resolution Melting Analysis. (DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AND Enteritidis STRAINS IDENTIFICATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. สุวิมล กิรติพิบูล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.มงคล เวสารัชเวศย์, 96 หน้า.

High resolution melting analysis (HRM) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยอาศัยความแตกต่างของ melting profile บริเวณ variable number of tandem repeats (VNTR) ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค HRM มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค Multiple locus variable number tandem repeat (MLVA) แทนเทคนิค capillary electrophoresis (CE) เพื่อจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile โดยจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ใน *S. Typhimurium* ได้ทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมาย (STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3) โดยให้ melting profile ต่างกันในทุกอัลลีล แต่ในเชื้อ *S. Enteritidis* พบความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นเพียง 1 ตำแหน่งเป้าหมาย (SE2) จาก 4 ตำแหน่งเป้าหมาย (SE1, SE2, SE5 และ SE9) ในการพัฒนาเทคนิค HRM ในตำแหน่งเป้าหมาย SE1, SE5 และ SE9 ใน *S. Enteritidis* โดยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลงพบว่าเทคนิค HRM ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายได้ สำหรับการประเมินความแม่นยำพบว่าการวิเคราะห์ *S. Typhimurium* ด้วยเทคนิค HRM สามารถวิเคราะห์ซ้ำได้ในทุกๆ อัลลีลของ ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 และการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอและระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค HRM เมื่อเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และ เทคนิค HRM จำนวนเชื้อละ 50 ไอโซเลท พบว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ใน *S. Typhimurium* ให้ผลของ repeat units ตรงกับการจำแนกความแตกต่างด้วยเทคนิค CE ทั้ง 50 ไอโซเลท ดังนั้นการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM มาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในตำแหน่งเป้าหมายจึงมีความเป็นไปได้สูงโดยเฉพาะในเชื้อ *S. Typhimurium* แต่สำหรับ *S. Enteritidis* จำเป็นต้องมีการพัฒนาปรับปรุงเทคนิค HRM ต่อไป

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ..... 

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... 

ปีการศึกษา 2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... 

# # 5072652423 : MAJOR Food Technology

KEYWORDS: High resolution melting analysis / VNTR / *Salmonella* Typhimurium / *Salmonella* Enteritidis

PANUSANUN SILAMAT: DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AND Enteritidis STRAINS IDENTIFICATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, THESIS COADVISOR: MONGKOL VESARATCHAVEST, Ph.D., 96 pp.

High resolution melting analysis (HRM) is a molecular technique that has been applied to bacterial strain identification. This technique is based on differentiation of melting profile of number of nucleotide in variable number of tandem repeats (VNTR) which are specific for each strain. In the present, the analysis of the size of VNTR was based on capillary electrophoresis (CE) technique. However, this CE technique is relatively expensive and laborious. Therefore, the aim of this study was to develop HRM technique for differentiation of the size of VNTR by using a melting profile property of different VNTR size. The feasibility of HRM method was demonstrated in testing of different allele variants for 4 of 4 selected loci in *S. Typhimurium* and only single locus of 4 selected loci in *S. Enteritidis*. For *S. Typhimurium*, this method produced repeatable, reproducible and robust results for 4 loci and the distinguishable melting profile results were consistent with CE results obtained for the same alleles. Therefore, HRM, a rapid accurate and inexpensive technique can be used to discriminate VNTR variants in *S. Typhimurium* but required some development for *S. Enteritidis*.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department : Food Technology..... Student's signature..... 

Field of study : Food Technology.....Advisor's signature..... 

Academic year : 2010.....Co-advisor's signature..... 

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กীরติพิบูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และดร.มงคล เวสรัสซเวศย์ รองผู้อำนวยการบริษัทศูนย์วิทยาศาสตร์ เบทาโกร จำกัด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อชี้แนะในการปฏิบัติงาน ความรู้ต่างๆ ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขและตรวจทานวิทยานิพนธ์ จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์ รุจเวทย์ ทหารแก้ว ผู้อำนวยการบริษัทศูนย์ วิทยาศาสตร์เบทาโกรและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกที่กรุณาอนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือต่างๆและคุณท้าว อุประการปรีชา นักวิจัยอาวุโสศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกรที่อำนวยความสะดวกและให้คำปรึกษาต่างๆในระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณคุณคุณจิรพิพรรธ แพรวไพศาล คุณดารณี ศรีสิทธินาม คุณอัครเดช ปรัชญาภิตติ คุณศุภรัตน์ สีม่วง คุณชลธิชา ธรรมมะทันตา และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่บริษัทศูนย์ วิทยาศาสตร์เบทาโกร จำกัดที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก เป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณปู่ คุณย่า คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว คุณอาและทุกๆ คนในครอบครัวที่ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 สกุล (genus) <i>Salmonella</i> .....	3
2.1.1 จุลชีพวิทยาของ <i>Salmonella</i> .....	3
2.1.2 อนุกรมวิธานและระบบการเรียกชื่อของ <i>Salmonella</i> .....	4
2.1.3 แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของ <i>Salmonella</i> .....	7
2.1.4 การจำแนก <i>Salmonella</i> ในทางระบาดวิทยา.....	7
2.1.4.1 <i>Salmonella</i> ที่อาศัยคนเป็นเจ้าบ้าน.....	7
2.1.4.2 <i>Salmonella</i> ที่ปรับตัวตามเจ้าบ้าน.....	7
2.1.4.3 เชื้อ <i>Salmonella</i> ที่ไม่จำเพาะต่อเจ้าบ้าน.....	7
2.1.5 อาการของผู้ป่วยที่ได้รับ <i>Salmonella</i> .....	8
2.1.5.1 อาการของระบบทางเดินอาหาร.....	10
2.1.5.2 อาการไข้ไทฟอยด์.....	10
2.1.5.3 อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต.....	10
2.1.6 บทบาทของ <i>Salmonella</i> ในอุตสาหกรรมอาหาร.....	10
2.2 การจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์.....	12
2.2.1 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก.....	12
2.2.2 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะพันธุกรรม.....	12
2.3 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Salmonella</i> .....	13
2.3.1 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Salmonella</i> โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก.....	13
2.3.1.1 Serotyping.....	13

	หน้า
2.3.1.1.1 แอนติเจนบนผนังเซลล์.....	13
2.3.1.1.2 แอนติเจนบริเวณแล้.....	17
2.3.1.1.3 แอนติเจนบริเวณแคปซูล.....	18
2.3.1.1.4 วิธีการทั่วไปในการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> .....	18
2.3.1.2 Phage typing.....	22
2.3.2 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Salmonella</i> โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม.....	25
2.3.2.1 Restriction-based methods.....	25
2.3.2.1.1 Plasmid analysis.....	26
2.3.2.1.2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.....	27
2.3.2.1.3 Ribotyping.....	29
2.3.2.1.4 Insertional sequences –RFLP.....	29
2.3.2.1.5 Pulsed-field gel electrophoresis.....	30
2.3.2.2 Amplification-based methods.....	31
2.3.2.2.1 Amplified fragment length polymorphism (AFLP).....	31
2.3.2.2.2 Random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR).....	33
2.3.2.2.3 Repetitive element PCR (REP-PCR) .....	34
2.3.2.2.4 Variable number of tandem repeat (VNTR) analysis and multiple locus VNTR analysis (MLVA).....	35
2.3.2.3 Sequencing – based methods.....	37
2.3.2.3.1 Multilocus sequence typing (MLST).....	37
2.4 capillary gel electrophoresis (CE).....	38
2.5 High resolution melting (HRM) analysis.....	40
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>43</b>
3.1 เชื้อแบคทีเรีย.....	43
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	43



	หน้า
3.2.1 สารเคมีและสารละลาย.....	43
3.2.2 ชุดทดสอบ.....	43
3.2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	44
3.3 การเตรียมดีเอ็นเอจาก S. Typhimurium และ S. Enteritidis.....	44
3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบ.....	44
3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้ม.....	45
3.4 การเก็บรักษาดีเอ็นเอ.....	46
3.5 การคัดเลือกตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์.....	46
3.6 ข้อมูล repeat units ของ S. Typhimurium และ S. Enteritidis จากการ การวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของตำแหน่งเป้าหมายด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE.....	47
3.7 สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ S. Typhimurium และ S. Enteritidis ด้วยเทคนิค MLVA และ High resolution melting (HRM).....	47
3.7.1 S. Typhimurium.....	47
3.7.2 S. Enteritidis.....	49
3.8 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่ง เป้าหมาย.....	50
3.9 การพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ใน ตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ S. Enteritidis.....	51
3.10 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลง สภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	51
3.10.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ.....	51
3.10.2 การประเมินความแม่นยำ .....	51
3.10.2.1 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำใน การทดลองครั้งเดียวกัน.....	52
3.10.2.2 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำใน วันที่ต่างกัน.....	52
3.10.3 ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ.....	52

	หน้า
3.10.3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ.....	53
3.10.3.2 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ.....	53
3.11 การเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	54
<b>บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....</b>	<b>55</b>
4.1 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย.....	56
4.2 ผลการพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายของ S. Enteritidis.....	59
4.3 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	65
4.4 ผลการเปรียบเทียบผลของการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	73
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>79</b>
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Salmonella</i> ในแต่ละชนิดและชนิดย่อย.....	5
2-2	จำนวนซีโรวารที่พบในแต่ละชนิดและชนิดย่อยในปีต่างๆ	6
2-3	กลุ่มเจ้าบ้านของ <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ซีโรวารต่างๆ.....	8
2-4	ซีโกลุ่มแอนติเจน O แบบเก่าและแบบใหม่และแอนติเจน O factors ที่แสดง ในกลุ่ม.....	15
2-5	ตัวอย่างแอนติเจนของ <i>Salmonella</i> ซีโรวาร.....	22
2-6	ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณจุดจำที่ใช้ในเทคนิค RFLP.....	28
3-1	ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ ด้วยเทคนิค MLVA ของ <i>S. Typhimurium</i> .....	46
3-2	ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ ด้วยเทคนิค MLVA ของ <i>S. Enteritidis</i> .....	47
4-1	จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ <i>S. Typhimurium</i> ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE.....	55
4-2	จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ <i>S. Enteritidis</i> ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE.....	57
4-3	การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอซึ่งถูกเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007) ซึ่งคำนวณจากโปรแกรม Tm utility.....	58
4-4	คู่ไพรเมอร์ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ <i>S. Enteritidis</i> ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ที่ออกแบบใหม่.....	61
4-5	การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอ ไทด์ซึ่งได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ โดยคำนวณจากโปรแกรม Tm utility..	62
4-6	ไอโซเลทของ <i>S. Enteritidis</i> และ อัลลีลที่ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์ที่ ออกแบบใหม่.....	63
4-7	ไอโซเลทของเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และ repeat units ซึ่งถูกนำมาทดสอบการ ประเมินความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกัน.....	66

- 4-8 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ  
เทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ของ *S. Typhimurium*..... 75



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะเซลล์ของ <i>Salmonella</i> .....	4
2-2	แสดงเส้นทางของ <i>Salmonella</i> เมื่อเข้าไปในร่างกาย.....	9
2-3	แผนภาพแสดงโครงสร้างและตำแหน่งของแอนติเจน O, H, Vi ของ <i>Salmonella</i> ...	14
2-4	โครงสร้างทั่วไปของลิวโพรพอลิแซคคาไรด์ใน <i>Salmonella</i> .....	14
2-5	ลักษณะแฉะของ <i>Salmonella</i> .....	17
2-6	ลักษณะโคโลนีของ <i>Salmonella</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะชนิดประเภท ต่างๆ.....	19
2-7	การทดสอบด้วยเทคนิค slide agglutination.....	20
2-8	แผนภาพการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> ในตัวอย่างตามมาตรฐานข้อกำหนด ISO 6579.....	21
2-9	การติดตามการติดเชื้อไวรัสแบคทีเรียโดยดูจากการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย.....	23
2-10	แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค bacteriophage typing.....	24
2-11	แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค plasmid analysis.....	26
2-12	แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RFLP..	28
2-13	แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วย เทคนิค PFGE.....	30
2-14	แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วย เทคนิค AFLP.....	32
2-15	หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค RAPD-PCR.	33
2-16	หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค Rep-PCR...	34
2-17	แผนภาพแสดงแนวคิดและขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย ก่อโรคด้วยเทคนิค MLVA.....	36
2-18	หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค MLST.....	38
2-19	ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่องมือ capillary electrophoresis.....	39

2-20	หลักการเบื้องต้นในการพลอตค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และอุณหภูมิในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM.....	41
4-1	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ S. Typhimurium 9 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน.....	56
4-2	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ S. Enteritidis 10 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน.....	58
4-3	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 3 ตำแหน่งของ S. Enteritidis 4 ไอโซเลท ที่มี repeat units ต่างกันด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่...	64
4-4	Derivative melting plot ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของ S. Typhimurium ในการทดสอบ repeatability	67
4-5	Derivative melting plot ของการทดสอบ reproducibility ของเทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM ใน S. Typhimurium.....	69
4-6	Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STTR9 โดยการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอซึ่งมาจากวิธีการสกัดด้วยชุดทดสอบและการต้ม.....	71
4-7	Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STTR9 โดยแปรระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 10 -100 นาโนกรัม.....	72
4-8	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ S. Typhimurium และ 1 ตำแหน่งของ S. Enteritidis จำนวน 50 ไอโซเลท.....	74
ภ.1	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่ง เป้าหมาย STTR9 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	92
ภ.2	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่ง เป้าหมาย STTR5 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	93
ภ.3	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่ง เป้าหมาย STTR6 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	94
ภ.4	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่ง เป้าหมาย STTR3 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	95

## บทที่ 1

### บทนำ

ปัจจุบันประเทศต่างๆทั่วโลกได้ให้ความสำคัญในเรื่องความปลอดภัยของอาหารอย่างยิ่ง เนื่องจากพบว่าโรคเนื่องจากอาหารเป็นสื่อ (Foodborne disease) ได้กลายเป็นสาเหตุสำคัญของปัญหาที่เกิดขึ้นต่อสุขภาพของมนุษย์ สร้างความสูญเสียทั้งในด้านเศรษฐกิจและสังคมไปทั่วโลก หน่วยงานซึ่งมีหน้าที่รับผิดชอบ ได้แก่ องค์การอนามัยโลกและประเทศสมาชิกได้ตระหนักถึงปัญหาที่เกิดขึ้นจึงมีความพยายามกำหนดแผนยุทธศาสตร์เพื่อลดอันตรายซึ่งเกิดจากโรคเนื่องจากอาหารเป็นสื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอันตรายที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ ในหลายๆประเทศมีรายงานอุบัติการณ์การเกิดโรคซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เช่น *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. เป็นต้น (World Health Organization [WHO], 2002 : online)

*Salmonella* spp. เป็นหนึ่งในแบคทีเรียสำคัญที่ทำให้เกิดโรคเนื่องจากอาหารเป็นสื่อ โดยเรียกโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *Salmonella* spp. ว่า Salmonellosis จากรายงานการเฝ้าระวังโรคซึ่งเกิดจาก *Salmonella* พบว่าในปี 2008 *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเนื่องจากอาหารเป็นสื่อมากเป็นลำดับที่สองในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป โดยมีผู้ป่วยด้วยโรค Salmonellosis คิดเป็นอัตรา 26.4 รายต่อประชากร 100,000 ราย (European Food Safety Authority [EFSA], 2010) สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า มีผู้ติดเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นจำนวนถึง 7,444 ราย คิดเป็นอัตรา 16.20 รายต่อประชากร 100,000 ราย (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2009) นอกจากนี้มีการประมาณจำนวนผู้เสียชีวิตว่ามากกว่า 500 รายในแต่ละปี (Mead et al., 1999) ในประเทศญี่ปุ่น Infectious Disease Surveillance Center มีรายงานว่าในระหว่างปี 2005 - 2009 มีผู้ป่วยด้วยโรค Salmonellosis เป็นจำนวนถึง 5,286 ราย (Infectious Disease Surveillance Center [IDSC], 2009) ในประเทศไทยนั้นได้มีรายงานของสำนักงานระบาดวิทยาพบว่าในปี 2009 มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษซึ่งเกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นจำนวน 192 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.2 ของจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมด (อมรรัตน์ ชอบกตัญญู, 2552) สาเหตุหลักของการติดเชื้อ *Salmonella* spp. เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่ผลิตจากเนื้อหรือไข่ของสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์นมซึ่งเป็นแหล่งที่พบการปนเปื้อน *Salmonella* มาก (Yan et al., 2003)

ประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศผู้ผลิตอาหารลำดับต้นๆของโลกจึงควรติดตามอุบัติการณ์ที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *Salmonella* spp. โดยการเฝ้าระวังโรคและการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งถือเป็นพื้นฐานในการกำหนดแผนกลยุทธ์เพื่อลดความเสี่ยงเนื่องมาจากอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเฉพาะ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Enteritidis ที่พบว่าสร้างปัญหาอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์ปีก เช่น เนื้อไก่สด เนื้อไก่แช่แข็งและไก่แปรรูป ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของ *Salmonella* ในประเทศไทยนิยมใช้เทคนิค serotyping ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ *Salmonella* ในระดับซีโรวารซึ่งไม่เพียงพอต่อการหาต้นกำเนิดของการระบาดของโรค ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* ในระดับซับซีโรวาร (subserovar) เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของการจำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลทให้มากขึ้น โดยจำแนกความแตกต่างจากลักษณะที่แสดงออกเช่น เทคนิค phage typing หรือจำแนกความแตกต่างจากลักษณะทางพันธุกรรม เช่น เทคนิค Pulse-field gel electrophoresis เป็นต้น อย่างไรก็ตามเทคนิคเหล่านั้นยังมีข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ ขีดความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลทที่ยังไม่ดีนักและบางเทคนิคไม่สามารถปฏิบัติได้ภายในประเทศจึงต้องส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่หน่วยงานในต่างประเทศ (ปฐมพร เอมะวิศิษฎ์ และคณะ, 2546)

ดังนั้นเทคนิคการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* ในระดับซับซีโรวาร (subserovar) ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงจะช่วยให้การศึกษาระบาดวิทยาหรือการจัดการด้านความปลอดภัยของอาหารทำได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในปัจจุบันนิยมใช้การจำแนกเชื้อ *Salmonella* ในระดับซับซีโรวารด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ variable number of tandem repeat เพื่อดูความแตกต่างของจำนวน repeat units ในบริเวณโลคัส (locus) ซึ่งนิยมทำมากกว่า 1 โลคัส เรียกเทคนิคนี้ว่า multi-locus variable number of tandem repeats (MLVA) (Belkum, 2008) เทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือจะต้องวัดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค capillary electrophoresis (CE) ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานาน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค High Resolution Melting Analysis (HRM) สำหรับจำแนกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากความแตกต่างของ melting profile ที่จำเพาะต่อขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นๆเพื่อทดแทนการใช้เทคนิค CE ซึ่งถ้าสามารถพัฒนาได้จะทำให้ได้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกสายพันธุ์ของ *S. Typhimurium* และ *Enteritidis* ในระดับซับซีโรวารที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางระบาดวิทยาและการจัดการความปลอดภัยของอาหารได้ในอนาคต



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สกุล (genus) *Salmonella*

*Salmonella* เป็นแบคทีเรียก่อโรคซึ่งถูกค้นพบในปีคริสต์ศักราช 1885 โดย Theobald Smith นักแบคทีเรียชาวอเมริกันที่แยกเชื้อนี้ได้จากสุกรซึ่งป่วยเป็นอหิวาตกโรคและเชื้อสกุล *Salmonella* ถูกตั้งขึ้นเพื่อเป็นเกียรติแก่ Daniel E Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกันซึ่งดำรงตำแหน่งเป็นผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการในขณะนั้น หลังจากนั้นมีการค้นพบ *Salmonella* สายพันธุ์ใหม่ๆเพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์เหล่านี้ ซึ่งในปีคริสต์ศักราช 1926 Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมกันจัดทำหนังสือ Kauffmann – White Schema ขึ้นเพื่อเป็นหลักเกณฑ์การแยกลักษณะทางแอนติเจนของ *Salmonella* และใช้เป็นมาตรฐานในการตั้งชื่อ *Salmonella* สายพันธุ์ต่างๆจนถึงปัจจุบัน (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์, ม.ป.ป. : online)

##### 2.1.1 จุลชีววิทยาของ *Salmonella*

*Salmonella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) และเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ (Peritrichous flagella) (Yan et al., 2003) โดยลักษณะเซลล์ของ *Salmonella* แสดงในรูป 2-1 คุณสมบัติที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงประมาณ 35 – 37 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำอิสระ (water activity, Aw) ที่ *Salmonella* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.94 – 0.99 และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7 – 7.5 โคโลนีของ *Salmonella* มีลักษณะเรียบและผิวหน้าเป็นมันเงา มีขนาด 2 – 4 มิลลิเมตร (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545 ; New Zealand Food Safety Authority, 2001 : online)



รูป 2-1 ลักษณะเซลล์ของ *Salmonella*

ที่มา : Kunkel, 2004 : online

### 2.1.2 อนุกรมวิธานและระบบการเรียกชื่อ *Salmonella*

การจำแนกชนิด (species ) และชนิดย่อย (subspecies) ในสกุล *Salmonella* จะใช้ผลการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ดังแสดงในตาราง 2-1 และพิจารณาจากลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่ปรากฏบนผิวเซลล์ (O-antigen) และแฟลกเจลลา (H-antigen) ตามแบบแผนของ Kauffmann-White Scheme ทำให้การจำแนกชนิดของ *Salmonella* มีความแม่นยำมากขึ้น (อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.) นอกจากนี้ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา ทำให้ทราบว่าในสกุล *Salmonella* ประกอบด้วย *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* เพียง 2 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* ซึ่ง *Salmonella enterica* ประกอบด้วย 6 ชนิดย่อย ได้แก่ *S. enterica* subsp. *enterica* (Group I), *S. enterica* subsp. *salamae* (Group II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (Group IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (Group IIIb), *S. enterica* subsp. *housteane* (Group IV) และ *S. enterica* subsp. *indica* (Group VI) สำหรับ *Salmonella bongori* ไม่มีชนิดย่อย (Grimont and Weill, 2007)

ปัจจุบัน *Salmonella* มีประมาณ 2,579 ซีโรวาร (serovars) หรือซีโรไทป์ (serotype) แสดงในตารางที่ 2-2 ซึ่งหน่วยงานที่มีหน้าที่รวบรวมและรายงานจำนวนซีโรวาร (serovar) ที่ค้นพบได้แก่ WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* Institut Pasteur, Paris, France โดยตีพิมพ์ในหนังสือ "ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS"

ตาราง2-1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella* ในแต่ละชนิดและชนิดย่อย

species subspecies	<i>Salmonella enterica</i>						<i>Salmonella bongori</i>
	Enterica (I)	Salamae (II)	Arizonae (IIIa)	Diarizonae (IIIb)	Houtenae (IV)	Indica (VI)	
คุณสมบัติ							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate <sup>(a)</sup>	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
□ - glucuronidase	+ <sup>(*)</sup>	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-
Lysed by phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals			Cold-blooded animals			
<p>(a) = d-tartrate , (*) = Typhimurium , d, Dublin -, + = 90% หรือมากกว่าให้ผลบวก, - = 90% หรือมากกว่าให้ผลลบ</p> <p>d = ปฏิกริยาแตกต่างกันขึ้นกับซีโรไทป์ของเชื้อ</p>							

ที่มา : Grimont and Weill, 2007

ตาราง 2-2 จำนวนซีโรวารที่พบในแต่ละชนิดและชนิดย่อยในปีต่างๆ

Species	Subspecies	Year		
		1997	2001	2007
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	1,435	1,478	1,531
	<i>salamae</i>	485	498	505
	<i>arizonae</i>	94	94	99
	<i>diarizonae</i>	321	327	336
	<i>houtenae</i>	69	71	73
	<i>indica</i>	11	12	13
<i>Salmonella bongori</i>		20	21	22
Total		2,435	2,501	2,579

ที่มา : ดัดแปลงจาก อรุณ บำรุงตระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.; Grimont and Weill, 2007

จากรายงานพบว่าในปี 1997 มีจำนวน *Salmonella* 2,435 ซีโรวาร ต่อมาในปี 2001 มีเพิ่มขึ้นเป็น 2,501 ซีโรวารและในปี 2007 มีจำนวน 2,579 ซีโรวาร (อรุณ บำรุงตระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป. ; Grimont and Weill, 2007)

ในระบบการเขียนชื่อซีโรวารของ *Salmonella* สามารถแบ่งได้เป็น 2 กรณี ได้แก่

2.1.2.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ให้เขียนชื่อสกุล ชนิดและชื่อของชนิดย่อยด้วยตัวเอน ส่วนชื่อซีโรวารให้เขียนด้วยตัวตรงโดยตัวอักษรตัวแรกเขียนเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ เช่น *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium หรือ *S. enterica* serovar Typhimurium หรือ *Salmonella* ser. Typhimurium แต่ในทางปฏิบัตินิยมเขียนแบบสั้นๆ เพียงชื่อสกุลตามด้วยชื่อซีโรวาร เช่น *Salmonella* Typhimurium หรือ *S. Typhimurium*

2.1.2.2 *Salmonella enterica* subsp. II, IIIa, IIIb, IV, VI และ *Salmonella bongori* ชื่อซีโรวารจะเขียนอยู่ในรูปแบบโครงสร้างของแอนติเจนเท่านั้น เช่น *Salmonella* ซึ่งอยู่ในชนิดย่อยกลุ่ม II มี O-antigen 6 และ 7 มี H-antigen Phase I คือ a และ H-antigen Phase II คือ Z<sub>6</sub> ให้เขียนชื่อสกุล ชนิดและชนิดย่อยด้วยตัวเอน ส่วนชื่อซีโรวารให้เขียนโครงสร้างของแอนติเจนด้วยตัวตรงโดยเรียงตามลำดับ O-antigen : H-antigen Phase I : H-antigen Phase II

ตามลำดับ เช่น *Salmonella enterica* subspecies *salamae* serovar 6,7 : a : Z<sub>6</sub> ในทางปฏิบัติ นิยมเขียนแบบสั้นๆเพียงชื่อสกุลตามด้วยหมายเลขกลุ่มและโครงสร้างแอนติเจน เช่น *Salmonella* II 6,7 : a : Z<sub>6</sub> (อรุณ บำงตระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.; Ellermeier and Slauch, 2006; Grimont and Weill, 2007)

### 2.1.3 แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของ *Salmonella*

*Salmonella* อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารและลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น มนุษย์ สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง รวมถึงแมลง บางครั้งอาจพบเชื้อ *Salmonella* ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำหรืออาหาร เนื่องจากการแพร่กระจายของเชื้อผ่านทางอุจจาระของสัตว์ เมื่อมนุษย์หรือสัตว์บริโภคอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป อาจทำให้แสดงอาการของโรคออกมาหรือกลายเป็นพาหะ (carriers) ของเชื้อ (Todar, 2008 : online)

### 2.1.4 การจำแนก *Salmonella* ในทางระบาดวิทยา

นอกจากวิธีการจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วยังสามารถจำแนก *Salmonella* ตามหลักระบาดวิทยาและการเกิดโรคเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

2.1.4.1 *Salmonella* ที่อาศัยคนเป็นเจ้าบ้าน ได้แก่ *S. Typhi* ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ (Typhoid fever, *S. Paratyphi* A, B และ C ทำให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อย (Paratyphoid fever) ในมนุษย์

2.1.4.2 *Salmonella* ที่ปรับตัวตามเจ้าบ้าน เป็นกลุ่มของ *Salmonella* ที่โดยปกติจะพบจำเพาะในสัตว์แต่ละชนิด เช่น *S. Gallinarum* และ *S. Pullorum* ซึ่งอาศัยเปิดหรือไก่ เป็นโฮสต์ *S. Dublin* อาศัยวัวเป็นโฮสต์ *S. Choleraesuis* อาศัยสุกรเป็นโฮสต์

2.1.4.3 *Salmonella* ที่ไม่จำเพาะต่อเจ้าบ้าน เป็นกลุ่มของ *Salmonella* ที่สามารถแพร่กระจายจากคนและสัตว์ไปยังสิ่งแวดล้อม อาหาร น้ำ ดิน ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* การแพร่กระจายของโรคเรียกว่า non-typhoidal salmonellosis ทำให้เกิดโรค Salmonellosis ซึ่งส่วนใหญ่จะทำให้เกิดอาการทางลำไส้ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ หนาวสั่น

ตัวอย่างเจ้าบ้านของ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ซีโรวาร์ต่างๆ ดังแสดงในตาราง 2-3

ตาราง 2-3 กลุ่มเจ้าบ้านของ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ซีโรวาร์ต่างๆ

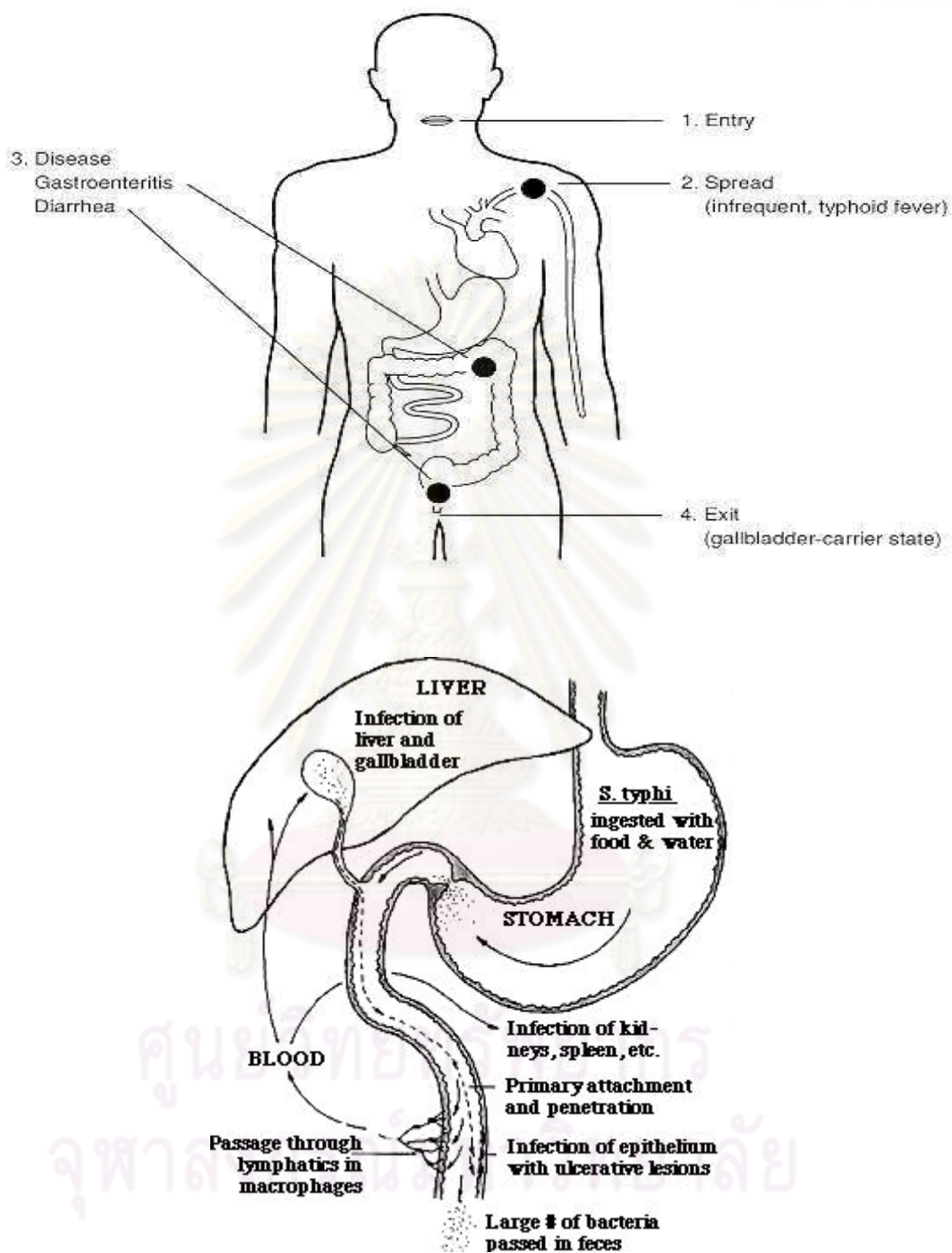
ประเภทของ <i>Salmonella</i>	ซีโรวาร์	เจ้าบ้าน
<i>Salmonella</i> ที่อาศัยคนเป็นเจ้าบ้าน	Typhi Paratyphi A and C	มนุษย์ มนุษย์
<i>Salmonella</i> ที่ปรับตัวตามชนิดของเจ้าบ้าน	Choleraesuis Dublin Gallinarum	สุกร วัว สัตว์ปีก
<i>Salmonella</i> ที่ไม่จำเพาะต่อชนิดของเจ้าบ้าน	Typhimurium Enteritidis	มนุษย์ สัตว์ปีก สุกร วัว และ สัตว์กัดแทะ มนุษย์ สัตว์ปีก และ สัตว์กัดแทะ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ellermeier and Schlauch, 2006

### 2.1.5 อาการของผู้ป่วยที่ได้รับ *Salmonella*

เมื่อมีการบริโภคอาหารที่มี *Salmonella* เข้าไปในร่างกาย จะมีเส้นทางการเคลื่อนที่ของเชื้อดังรูป 2-2

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูป 2-2 แสดงเส้นทางของ *Salmonella* เมื่อเข้าไปในร่างกาย

ที่มา : อรุณ บำรุงระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.

ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* มีอาการแบ่งออกเป็น 3 แบบ (International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF], 1996) ได้แก่

**2.1.5.1 อาการของระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis)** โดยทั่วไปเกิดจาก *Salmonella* ที่ไม่เลือกเจ้าบ้าน ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ช่วงระยะเวลาฟักตัวของโรคอยู่ระหว่าง 5 ชั่วโมงถึง 5 วัน แต่ปกติมักเกิดประมาณ 12-36 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อผู้ป่วยจะมีอาการท้องเดิน คลื่นไส้ ปวดท้อง ใช้สูงปานกลาง หนาวสั่น อาการท้องร่วงจะรุนแรงต่างกันตามลักษณะการถ่ายอุจจาระ เช่น อุจจาระอาจมีลักษณะเหลว จนถึงการถ่ายเป็นน้ำและเกิดอาการขาดน้ำ (dehydration) ในบางครั้งผู้ป่วยอาจอาเจียน อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ กระสับกระส่าย โดยทั่วไปอาการดังกล่าวจะปรากฏอยู่นาน 2-5 วัน

**2.1.5.2 อาการไข้ไทฟอยด์ (Enteric fever)** เกิดจาก *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* (*S. Schottmuelleri*) และ *S. Paratyphi C* (*S. Hirschfeldii*) ระยะเวลาฟักตัวของเชื้อไข้ไทฟอยด์อยู่ระหว่าง 7-28 วัน ผู้ป่วยจะมีอาการไม่สบาย ปวดศีรษะ ใช้ขึ้นสูงมากเป็นเวลาหลายวัน ปวดท้องและปวดเมื่อยตามร่างกาย อ่อนเพลีย ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ไอ มีเหงื่อออกตามตัว หนาวสั่น และเบื่ออาหาร มีจุดแดงตามลำตัว แผ่นหลังและหน้าอก หัวใจเต้นช้าและอ่อน ท้องบวม น้ำม้ามโต บางครั้งมีเลือดออกจากช่องท้องหรือจมูกและอาจหมดสติได้ ในบางครั้งหลังจากอาการทุเลาแล้ว ผู้ป่วยอาจเป็นพาหะของโรคต่อไปได้

**2.1.5.3 อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Bacteremia/Septicemia)** เกิดจาก *Salmonella* ที่ฟักตัวในลำไส้เล็ก แล้วเข้าสู่กระแสโลหิต ผู้ป่วยอาจจะมีไข้สูง ปวดหลัง ปวดท้อง และเจ็บหน้าอก หนาวสั่น เหงื่อออกตามลำตัว ไม่สบาย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อาการที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันหรือเป็นเรื้อรังได้

## 2.1.6 บทบาทของ *Salmonella* ในอุตสาหกรรมอาหาร

การปนเปื้อนของ *Salmonella* สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดห่วงโซ่อาหารตั้งแต่แหล่งผลิตเบื้องต้นไปจนถึงอาหารที่ใช้บริโภค โดยพบการปนเปื้อนในอาหารที่มี ไข่ เนื้อและผลิตภัณฑ์นมเป็นองค์ประกอบ โดยมีสัตว์ปีกเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญ (Yan et al., 2003) จากการสุ่มตรวจหาการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในฟาร์มไก่เนื้อในระหว่างปี 2548 – 2549 โดยหน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority's Zoonoses Task Force : EFSA) พบว่าไก่เนื้อร้อยละ 23.7 ในสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสวิตเซอร์แลนด์



เกิดการติดเชื้อ *Salmonella* ในระดับสูง (อนุชา มุมอ่อน, วสันต์ เคยเหล่า และสุदारัตน์ เคยเหล่า, 2550 : ออนไลน์) นอกจากนี้การศึกษาความชุกของ *Salmonella* ในฟาร์มไก่และสุกรในประเทศไทยระหว่างปี 2546 – 2548 พบว่าอัตราการพบเชื้อในฟาร์มไก่และสุกรมีค่าเท่ากับ 21.71% และ 19.47% ตามลำดับซึ่งแสดงว่าความชุกของ *Salmonella* ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่พบในฟาร์ม (พรเพ็ญ พัฒนโสภณ, วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ และศศิ เจริญพจน์, 2550)

ฟาร์มไก่ไข่เป็นอีกแหล่งหนึ่งซึ่งพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* โดยพบว่าการปนเปื้อนอาจเริ่มจากระดับฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ศูนย์รวบรวมไข่ ไปจนถึงสถานที่จำหน่าย ซึ่งส่วนใหญ่จะพบการปนเปื้อนที่เปลือกไข่มากกว่าในเนื้อไข่ ซึ่งการแพร่กระจายของ *Salmonella* เกิดจากมาตรการด้านสุขาภิบาลที่ไม่ดีพอที่จะควบคุมการแพร่กระจายของ *Salmonella* (ชุลีพร ศักดิ์สง่างวงษ์ และคณะ, 2550)

นอกจากจะพบการปนเปื้อน *Salmonella* ในแหล่งผลิตเบื้องต้นแล้วยังพบว่าเกิดการปนเปื้อน *Salmonella* ในโรงฆ่าสัตว์อีกด้วย โดยการปนเปื้อนเกิดจากสุขลักษณะในขบวนการฆ่าสัตว์ที่ไม่ดีพอทำให้ *Salmonella* ปนเปื้อนข้ามไปยังซากสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูปจากซากสัตว์นั้นไปสู่ผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกสัตว์ปีก เช่น เนื้อไก่ ซึ่งเป็นเนื้อสัตว์ที่มีปริมาณในการบริโภคสูงและมีแนวโน้มการบริโภคเพิ่มมากขึ้นทุกปี (เพ็ญญา มัชฌิมพงศ์, 2551 : ออนไลน์; อนุชา มุมอ่อน, และคณะ, 2552 : ออนไลน์)

ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ประเทศผู้นำเข้าอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำเข้าเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ เช่น สหภาพยุโรป ซึ่งเป็นตลาดส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยจึงได้กำหนดมาตรฐานให้เนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ปลอดจากการปนเปื้อน *Salmonella* ซึ่งถ้าสินค้ามีมาตรฐานไม่ถึงเกณฑ์ที่กำหนดจะทำให้พบกับบทลงโทษทางการค้า เช่น การระงับการนำเข้าสินค้าที่มีการปนเปื้อนได้ นอกจากการส่งออกแล้วการกำหนดมาตรฐานเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ให้ปลอดจากการปนเปื้อน *Salmonella* จะทำให้ผู้บริโภคภายในประเทศมีสุขภาพที่ดีอีกด้วย ดังนั้นจึงมีการกำหนดมาตรการในการจัดการและควบคุม *Salmonella* ทั้งหมดในระบบการผลิตไก่ตั้งแต่ฟาร์มเลี้ยงไก่จนถึงโรงอาหารปรุงสุกให้มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีการปนเปื้อน *Salmonella* เกิดขึ้นอยู่เสมอ ซึ่งการที่ไม่สามารถจัดการและควบคุมหรือลดระดับการปนเปื้อน *Salmonella* ได้นั้นอาจมีสาเหตุมาจากการไม่สามารถหาแหล่งต้นกำเนิดการปนเปื้อนหรือเส้นทางการปนเปื้อนที่แท้จริง ทำให้มาตรการจัดการและควบคุม *Salmonella* มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ จึงมีการพัฒนาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* วิธีต่างๆมาใช้ประโยชน์ในทางระบาดวิทยาเพื่อติดตามแหล่งต้นกำเนิดหรือ

เส้นทางการปนเปื้อนที่แท้จริงซึ่งจะทำให้การจัดการและควบคุมการปนเปื้อนของ *Salmonella* มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (เพ็ญญา มัชฌิมพงศ์, 2551 : ออนไลน์; อนุชา มุมอ่อน, และคณะ, 2552 : ออนไลน์)

## 2.2 การจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ (Microbial Typing)

Microbial typing ใช้ในการระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ในระดับที่ลึกกว่าสปีชีส์ สามารถแบ่งการจำแนกออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ epityping และ pathotyping การจำแนกแบบ epityping นั้นเป็นการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อวัตถุประสงค์ในทางระบาดวิทยาเพียงอย่างเดียวแต่การจำแนกแบบ pathotyping นั้นจะเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของการก่อโรคของสายพันธุ์แบคทีเรียจากความแตกต่างทางพันธุกรรม ดังนั้น microbial typing จึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่มีประโยชน์ในด้านระบาดวิทยาเนื่องจากสามารถบอกความเชื่อมโยงระหว่างผู้ป่วย อาหารที่ปนเปื้อนเชื้อที่ผู้ป่วยบริโภคไปจนถึงแหล่งของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (Foley, Lynne and Nayak, 2009; Belkum, 2008)

วิธีการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotyping) และการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (Genotyping)

**2.2.1 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotyping)** จะใช้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย เช่น คุณสมบัติทางชีวเคมี ชนิดของไวรัสแบคทีเรีย (bacteriophage) ชนิดของแอนติเจนบนผนังเซลล์ ความไวต่อสารต้านจุลชีพ ซึ่งการจำแนกประเภทนี้ค่อนข้างจะมีความผันแปรจากตัวแปรต่างๆ เช่น สภาวะในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ระยะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ตัวอย่างการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก ได้แก่ วิธี serotyping, phage typing

**2.2.2 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (Genotyping)** จะใช้การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์และการมีหรือไม่มีสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) (Tenover, Arbeit and Goering, 1997) โดยใช้การตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme digestion) การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก (nucleic acid amplification) หรือ การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) เป็นต้น

## 2.3 การจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* (*Salmonella* typing and subtyping)

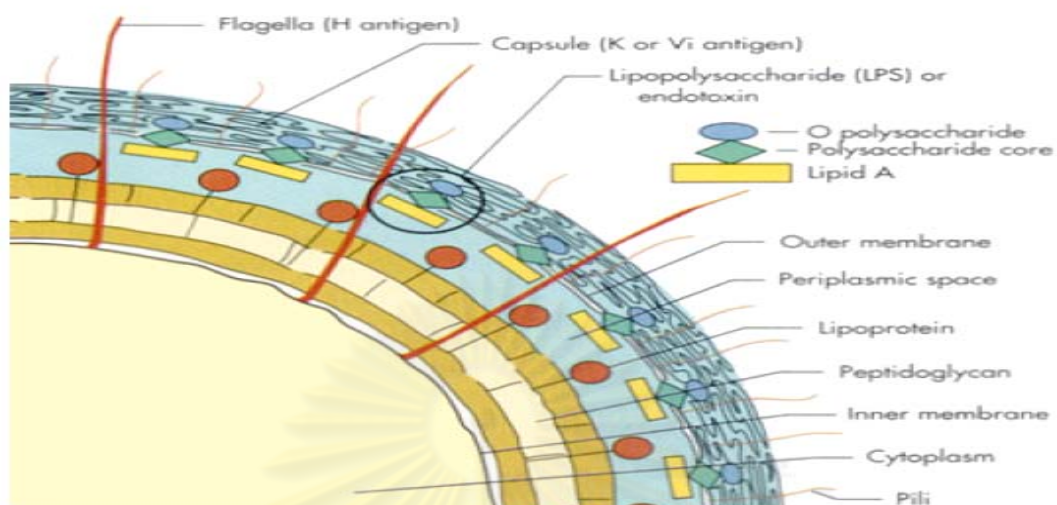
การจำแนกความแตกต่างของ *Salmonella* ในระดับสายพันธุ์ เริ่มมีความสำคัญมากขึ้นในด้านระบาดวิทยาและการเฝ้าระวังโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* เนื่องจากวิธีการจำแนกความแตกต่างที่มีประสิทธิภาพสูงอาจช่วยให้ติดตามต้นกำเนิดของการระบาดของโรคและสามารถติดตามแนวโน้มของการดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งสัมพันธ์กับรูปแบบที่จำเพาะได้ โดยการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* นั้น นอกจากจะใช้วิธีการจำแนกในระดับซีโรวาร์ด้วยเทคนิค serotyping แล้ว ยังมีการพัฒนาเทคนิคอื่น ๆ ขึ้นมาเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละไอโซเลทอีกด้วย (Yan et al, 2003; Wiedmann and Nightingale, 2009)

การจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ การจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* โดยใช้ลักษณะที่แสดงออกและการจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

### 2.3.1 การจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก (Phenotyping)

#### 2.3.1.1 Serotyping

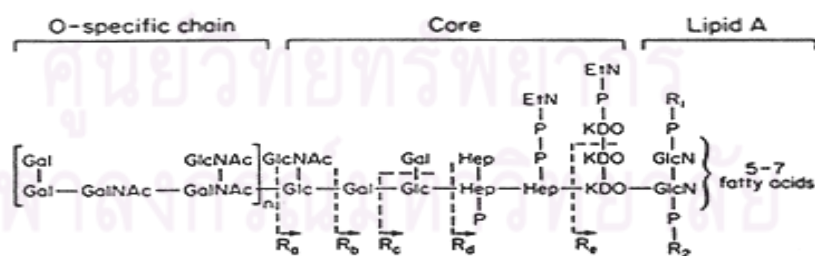
Serotyping เป็นเทคนิคมาตรฐานที่นิยมใช้มากที่สุดในการจำแนกเชื้อ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ หลักการของ serotyping คือ การใช้แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนขึ้น โดยพิจารณาจากโครงสร้างแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ แอนติเจนบนผนังเซลล์ (Somatic antigens, O-antigens), แอนติเจนบริเวณแฮล (Flagella antigens, H-antigens) และแอนติเจนบริเวณแคปซูล (Capsular antigens, Vi-antigens) (รูป 2-3)



รูป 2-3 แผนภาพแสดงโครงสร้างและตำแหน่งของแอนติเจน O, H, Vi ของ *Salmonella*  
ที่มา : Murray et al., 2002

### 2.3.1.1.1 แอนติเจนบนผนังเซลล์ (Somatic antigens, O-antigens)

ปรากฏบนผนังเซลล์ชั้นนอกซึ่งพบในแบคทีเรียแกรมลบ องค์ประกอบส่วนใหญ่คือลิพอพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ซึ่งเกิดจากการเชื่อมยึดกันของ lipid A, core oligosaccharide และพอลิเมอร์ของ O polysaccharide (รูป 2-4)



รูป 2-4 โครงสร้างทั่วไปของลิพอพอลิแซคคาไรด์ใน *Salmonella* เมื่อ Glc = glucose, GlcNac = N-acetylglucosamine, Gal = galactose, Hep = heptose, P = Phosphate, Etn = ethanolamine, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> = phosphoethanolamine or aminoarabinose, R<sub>a</sub> to R<sub>e</sub> indicate incomplete form of LPS, The R<sub>c</sub>, R<sub>d2</sub>, and R<sub>e1</sub> mutants lack the phosphate group attached to Hep.

ที่มา : Todar, 2008 : online

หน่วยย่อยของ O-polysaccharide นั้นจะประกอบด้วยน้ำตาล 4 – 6 โมเลกุลซึ่งความผันแปรที่เกิดจากการผ่าเหล่าของเชื้ออาจส่งผลต่อชนิดของน้ำตาลและพันธะในโครงสร้างของผิวเซลล์ทำให้เกิดแอนติเจน O หลายชนิด (Todar, 2003; Amonrattana Roobthaisong, 2006; Ellermeier and Slauch, 2006; Desroy, 2009)

ปัจจุบัน *Salmonella* มีจำนวนแอนติเจน O ประมาณ 67 แอนติเจน โดยหนังสือ “ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS” ฉบับปี 2007 ได้เปลี่ยนแปลงการเขียนชื่อกลุ่มของแอนติเจน O ซึ่งแต่เดิมนั้นแอนติเจน O กลุ่ม 1- 50 จะใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษ A – Z และกลุ่ม 51 – 67 จะแทนด้วยตัวเลขนั้น ให้เปลี่ยนจากกลุ่มตัวอักษรภาษาอังกฤษมาใช้ตัวเลขตามลักษณะค่าแอนติเจน O factors ดังตาราง 2-4 (Ellermeier and Slauch, 2006; Grimont and Weill, 2007)

**ตาราง 2-4** ชื่อกลุ่มแอนติเจน O แบบเก่าและแบบใหม่และแอนติเจน O factors ซึ่งแสดงในกลุ่ม

กลุ่มแอนติเจน O แบบเก่า	กลุ่มแอนติเจน O แบบใหม่	แอนติเจน O factors
A	2	1,2,12
B	4	4,12 ; 4,12,27 4,12,[27] ; 4,[5],12 ; 1,4,12 ;1,4,12,27 ; 1,4,[5],12 ; 1,4,12,[27] ; 1,4,[5],12,[27]
C1-C4	6,7	6,7 ; 6,7[VI] ; 6,7,14
C2-C3	8	6,8; 8 ; 8,20
D1	9	9,12 ; 1,9,12 ; 9,12[VI] ; 1,9,12[VI]
D2	9.46	9,46, 1,9,46
D3	9.46,27	1,9,12,46,27 ; 9,12,46,27
E1-E2-E3	3,10	3,10 ; 3,{10}{15} ; 3,{10}{15}{15,34} ; 3,{10}{15,34}
E4	1,3,19	1,3,19 ; 1,3,10,19 ; 1,3,15,19 ; 1,3,{10}{15},19
F	11	11
G1-G2	13	13,22 ; 13,23 ; 1,13,22 ; 1,13,23
H	6,14	6,14 ; 6,14,24 ; 1,6,14, ; 1,6,14,25 ; [1],6,14 ; [1],6,14,[25] ; (6), 14 ; 6,14,[24] ; 1,6,14,24
I	16	16
J	17	17
K	18	18, 6,14,18

กลุ่มแอนติเจน O แบบเก่า	กลุ่มแอนติเจน O แบบใหม่	แอนติเจน O factors
L	21	21
M	28	28
N	30	30
O	35	35
P	38	38
Q	39	39
R	40	40 ; <u>1</u> ,40
S	41	41
T	42	42 ; <u>1</u> ,42
U	43	43
V	44	44 ; <u>1</u> ,44
W	45	45
X	47	47; <u>1</u> ,47
Y	48	48
Z	50	50
51	51	51; <u>1</u> ,51
52	52	52
53	53	53, <u>1</u> ,53
54	54	54 ; 21,54 ; 3,54 ; 4,12,54 ; 8, <u>20</u> ,54 ; 6,7,54 ; {6,7, <u>14</u> }54 ; 3,15,54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59 : <u>1</u> , 59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
65	65	65
66	66	66
67	67	67

ที่มา : Grimont and Weill, 2007

ในบางกรณีอาจไม่มีการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน O และแอนติซีรัม ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก *Salmonella* ที่ทดสอบนั้นสร้าง Vi แคปซูล ซึ่งไปขัดขวางแอนติซีรัมไม่ให้เข้าไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนหรือเกิดจากการผ่าเหล่าของเชื้อซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างของ O-polysaccharide ทำให้ไม่มีแอนติเจน O ส่งผลต่อโคโลนีของ *Salmonella* ทำให้โคโลนีมีลักษณะขรุขระ เมื่อนำไปทดสอบพบว่าจะไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัมหรือในทางตรงกันข้ามอาจเกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัมทุกตัวที่ใช้ในการทดสอบแอนติเจน O ทำให้ไม่สามารถแปรผลได้ (Ellermeier and Slauch, 2006)

#### 2.3.1.1.2 แอนติเจนบริเวณแส้ (Flagella antigens, H-antigens)

แส้ (flagella) เป็นออร์แกเนลล์ที่ยื่นออกมาจากเซลล์หรือเกิดออกมาจากชั้นเนื้อเยื่อ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย สร้างจากโปรตีนหน่วยย่อยซึ่งเรียกว่าแฟลกเจลลิน (flagellin) (รูป2-5)



รูป2-5 ลักษณะแส้ของ *Salmonella*

ที่มา : Häusler, 2007 : online

*Salmonella* จะมีแอนติเจน H 2 แบบ ได้แก่แอนติเจน H phase 1 และ phase 2 โดยปกติจะพบแอนติเจน H ใน *Salmonella* ทั้ง 2 แบบ ยกเว้น *Salmonella* บางซีโรวาร์ซึ่งพบแอนติเจน H เพียง 1 แบบ เช่น *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Rissen* และซีโรวาร์ส่วนใหญ่ในกลุ่ม subsp. IIIa และ IV (Amonrattana Roobthaisong, 2006; Ellermeier and Slauch, 2006)

สำหรับการเขียนชื่อแอนติเจน H ใน phase 1 จะเขียนด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กตั้งแต่ “a” ถึง “z” และ  $z_1, z_2, z_3$  เรียงไปตามลำดับส่วน phase 2 จะเขียนด้วยตัวเลขอารบิก (Jay, 1992)

**2.3.1.1.3 แอนติเจนบริเวณแคปซูล (Capsular antigens, Vi-antigens, K-antigen)** แคปซูล (capsule) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์จำเพาะที่สะสมอยู่บนผิวรอบนอกของเซลล์ มีหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะหรือจับกับพื้นผิวหรือปกป้องเซลล์จากอันตรายแต่ไม่ทนต่อความร้อนและปรากฏในบางซีโรวาร์เท่านั้น ได้แก่ *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* และในบางครั้งอาจพบใน *S. Dublin* สามารถตรวจสอบแอนติเจนบริเวณแคปซูลได้โดยการทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะ ในบางกรณีแอนติเจนบริเวณแคปซูลอาจไปขัดขวางการทดสอบแอนติเจน O ทำให้ไม่เกิดการตกตะกอนซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการทำลายแอนติเจนบริเวณแคปซูลด้วยความร้อน เช่นการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปทดสอบแอนติเจน O (Todar, 2008 : online)

#### 2.3.1.1.4 วิธีการทั่วไปในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella*

วิธีการมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* จะประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลักได้แก่

1) การกระตุ้นให้เชื้อที่บาดเจ็บแข็งแรง (Pre-enrichment) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารยับยั้งแบคทีเรียผสมอยู่ เช่น buffered peptone water, nutrient of lactose broths เพื่อทำให้เซลล์ที่บาดเจ็บหรือใกล้ตายแข็งแรงขึ้น และเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella* ให้มากขึ้น

2) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด (Selective enrichment step) นำเชื้อ *Salmonella* จากขั้นตอนที่ 1) มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งเติมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิในช่วง 35 – 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเลือกเฉพาะชนิดที่นิยมได้แก่ Selenite – cystine broth, Tetrathionate broth, Selenite F broth, Brilliant Green MacConkey broth และ RV broth เป็นต้น

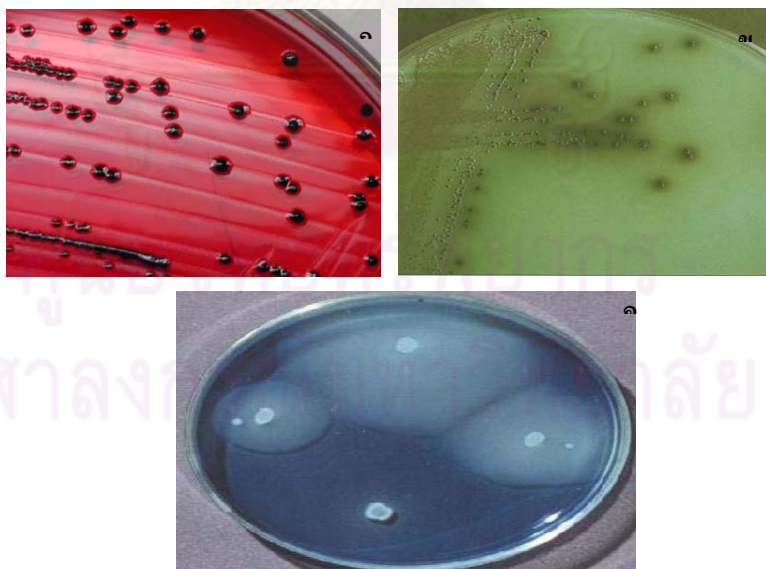


3) แยกเชื้อบนวุ้นอาหารเลือกเฉพาะชนิด (Selective – differential Plating Media) วุ้นอาหาร (Plating media) ที่นิยมใช้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระดับ ได้แก่

-ระดับที่หนึ่ง low selective plating media เช่น MacConkey, Endo Agar

-ระดับที่สองได้แก่ intermediate selective plating media เช่น Xylose Lysine Deoxycholate (XLD), Deoxycholate Citrate Agar (DCA)

-ระดับที่สามได้แก่ High selective plating media ได้แก่ Bismuth Sulfide (BS), Xylose Lysine Tergitol4 (XLT4) และMSRV (Modified Semi – solid Rappaport Vassiliadis agar) ในการจำแนก *Salmonella* จะอาศัยลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น โคโลนีของ *Salmonella* บนวุ้นอาหาร XLD จะมีลักษณะขอบเรียบ โคโลนีสีแดงมีจุดดำอยู่ตรงกลาง โคโลนีของ *Salmonella* บนวุ้นอาหาร BS จะมีลักษณะสีน้ำตาลหรือเทาดำ บริเวณรอบๆโคโลนีจะมีสีน้ำตาลหรือบางสายพันธุ์จะให้โคโลนีสีเขียวและรอบๆโคโลนีเป็นสีดำเล็กน้อย และโคโลนีของ *Salmonella* บนวุ้นอาหาร MSRV จะมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นรอบๆจุดที่หยดเชื้อ (รูป2-6)



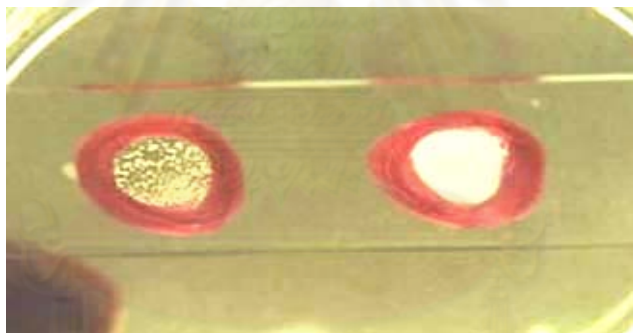
รูป2-6 ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะชนิดประเภทต่างๆ

ก: XLD Agar, ข: BS Agar, ค: MSRV Agar

ที่มา : อรุณ บำรุงระกุลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.

4) การทดสอบทางชีวเคมี การกลั่นกรองเบื้องต้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่จำกัดชนิดของเชื้อ เช่น Triple Sugar Iron Agar (TSI), Lysine Iron Agar (LIA), เป็นต้น จากนั้นจึงทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยการทดสอบขั้นแรกนิยมทดสอบ lysine, urease และ Indole ก่อน จากนั้นจึงทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีอีก 14 อย่าง เพื่อจำแนกสมาชิกในตระกูล Enterobacteriaceae ในระดับสกุล

5) การทดสอบทางซีโรวิทยา (serological test) เมื่อได้เชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Salmonella* ให้ทำการทดสอบทางซีโรวิทยาโดยวิธี slide agglutination โดยขั้นแรกให้ทดสอบเชื้อกับ Normal Saline Solution ความเข้มข้น 0.85% หากเกิดการตกตะกอนขึ้นแสดงว่าเชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบหาซีโรวารได้เนื่องจากเชื้อจะตกตะกอนกับแอนติซีรัมทุกชนิด หากไม่เกิดการตกตะกอนให้นำเชื่อนั้นไปทดสอบกับแอนติซีรัม *Salmonella* Polyvalent A-67 และ *Salmonella* Polyvalent A-I ถ้าตกตะกอนต่อแอนติซีรัมใดแสดงว่าเชื้อมีแอนติเจนต่อแอนติซีรัมนั้น (รูป2-7)



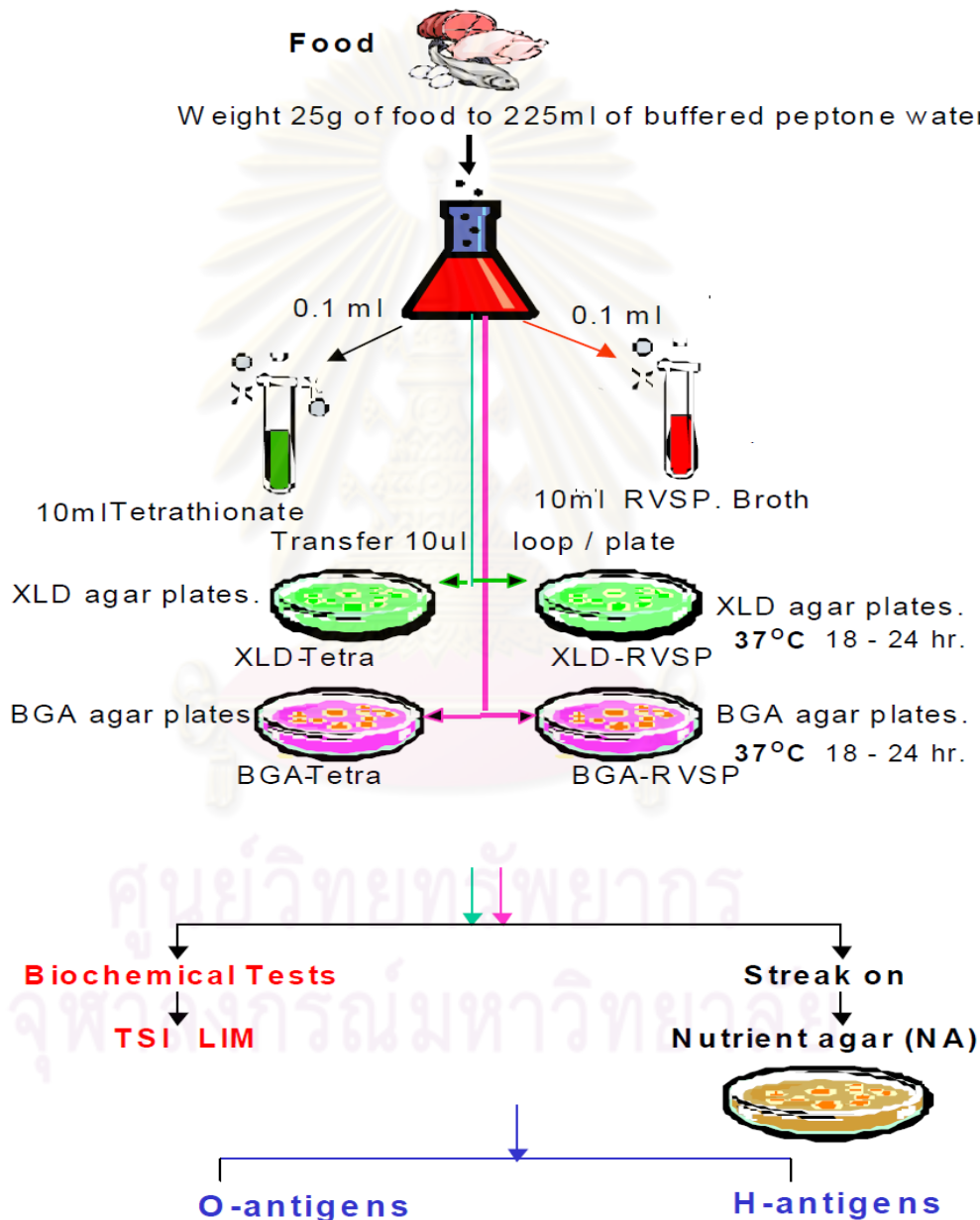
รูป2-7 การทดสอบด้วยเทคนิค slide agglutination โดยตัวอย่างด้านซ้ายมือเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัมเกิดการตกตะกอนขึ้น ตัวอย่างด้านขวามือไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัม

ที่มา : Lindquist, 2006 : online

การตรวจสอบขั้นตอนนี้ยังไม่สามารถบอกกลุ่มของ *Salmonella* ได้เนื่องจากใช้ antiserum รวมหลายชนิด จึงต้องทดสอบกับแอนติซีรัมเดี่ยวของแต่ละกลุ่มต่อไป ถ้าให้ ผลบวกกับกลุ่มใดแสดงว่าเป็น *Salmonella* กลุ่มนั้น ขั้นตอนสุดท้ายคือส่งทดสอบยืนยันเชื้อที่ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี เพื่อตรวจรายละเอียดว่าเป็นซีโรวารใดต่อไป ตัวอย่างแอนติเจนของ *Salmonella* ซีโรวารต่างๆดังแสดงในตาราง2-5

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ในตัวอย่างตาม  
 มาตรฐานข้อกำหนด ISO 6579 แสดงในรูป 2-8

**Detection of *Salmonella* in Food (ISO 6579)**



รูป 2-8 แผนภาพการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ในตัวอย่างตามมาตรฐานข้อกำหนด ISO 6579  
 ที่มา : อรุณ บำรุงตระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.

ตาราง 2-5 ตัวอย่างแอนติเจนของ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ

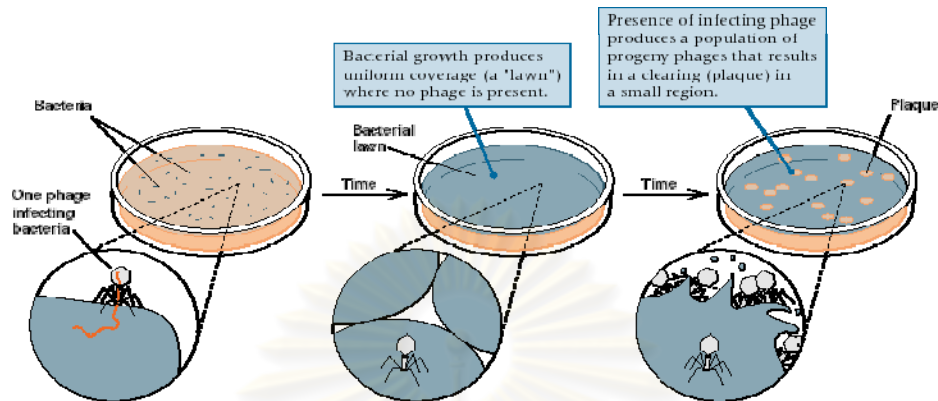
Serovar	Serogroup	Somatic antigen	Flagella (H) antigen		Capsular antigen
			Phase 1	Phase 2	
S. Typhimurium	O : 4 (B)	1, 4, [5], 12	l	1,2	[j], [z <sub>66</sub> ]
S. Enteritidis	O : 9 (D <sub>1</sub> )	1,9,12	g,m	-	
S. Gallinarum	O : 9 (D <sub>1</sub> )	1,9,12	-	-	
S. Typhi	O : 9 (D <sub>1</sub> )	9,12[Vi]	d	-	
S. Hadar	O : 8 (C <sub>2</sub> )	6,8	z <sub>10</sub>	e,n,x	
S. Virchow	O : 7 (C1)	6,7,14	r	1,2	

ที่มา : Grimont and Weill, 2007

serotyping จึงเป็นเทคนิคซึ่งเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในการจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* และเป็นเครื่องมือสำคัญในด้านสาธารณสุข อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถจำแนกความแตกต่างได้เพียงในระดับซีโรวาร์เท่านั้น ดังนั้นเทคนิคการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ที่มีประสิทธิภาพสูงอื่นๆจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเพิ่มขีดความสามารถให้การจำแนกมีความละเอียดมากขึ้น (Yan et al., 2003; อรุณ บำรุงตระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.)

### 2.3.1.2 Phage Typing

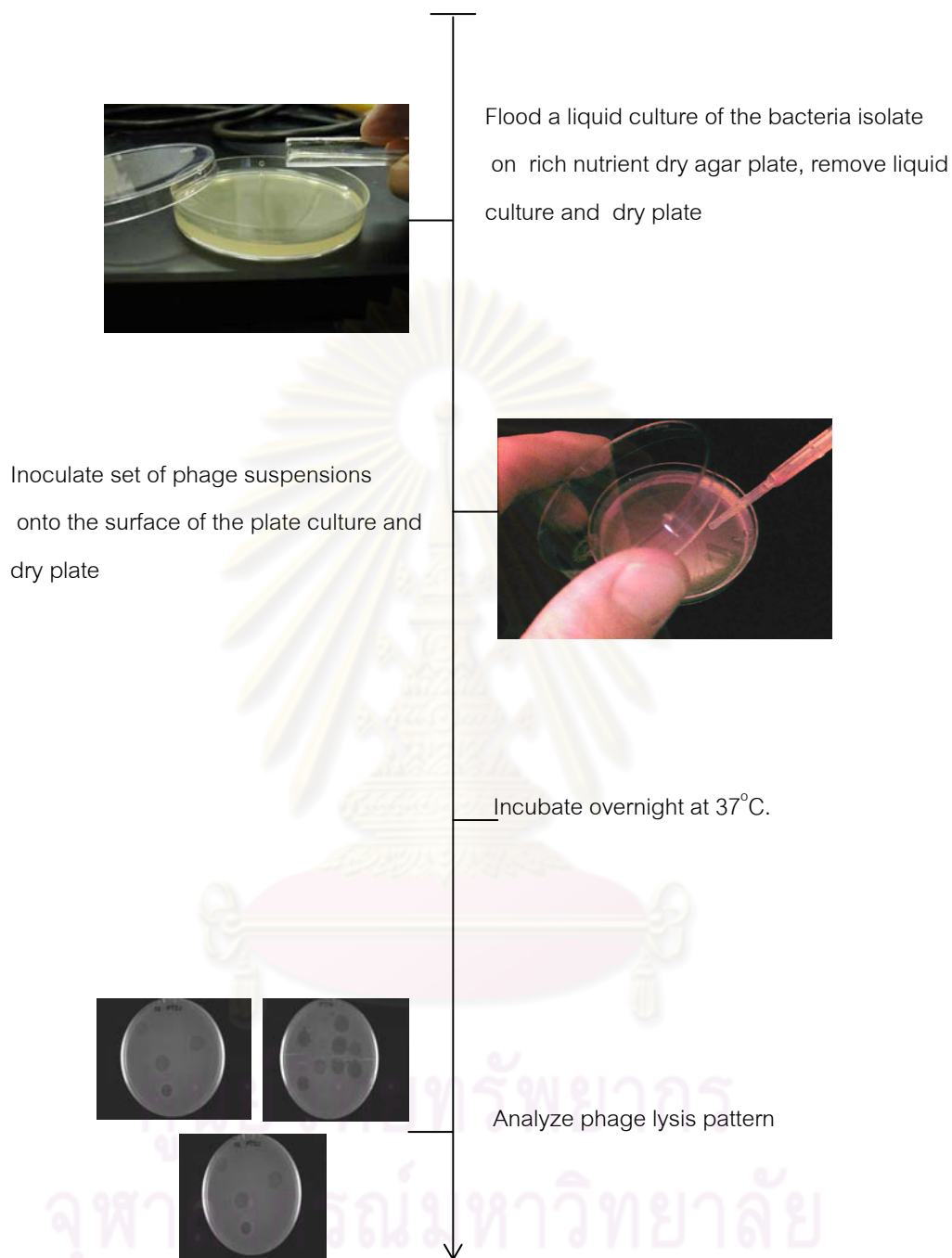
เป็นเทคนิคซึ่งใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ โดยใช้หลักการความจำเพาะของไวรัสแบคทีเรีย (bacteriophage) กับตัวรับ (phage receptors) ซึ่งตั้งอยู่บนผิวของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไอโซเลทได้ โดยไวรัสแบคทีเรียจะเข้าไปจับกับตัวรับที่เหมาะสมทำให้สามารถยึดติดกับผนังเซลล์แบคทีเรียและเกิดการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรียดังแสดงในรูป 2-9



รูป 2-9 การติดตามการติดเชื้อไวรัสแบคทีเรียโดยดูจากการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย  
 ที่มา : ธีระ ยิ้มอยู่, 2547 : ออนไลน์

ขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* ด้วยเทคนิค bacteriophage typing ประกอบด้วยการใช้สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเทบนผิวหน้าวุ้นอาหาร จากนั้นทำให้แห้งแล้วเติมสารแขวนลอยไวรัสแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วปล่อยให้แห้งจากนั้นนำวุ้นอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกและวิเคราะห์ผลการติดเชื้อไวรัสแบคทีเรียที่เกิดขึ้นดังแสดงในรูป 2-10

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูป 2-10** แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค bacteriophage typing

ที่มา : National *Salmonella* Reference Laboratory [NSRL], 2010 : online

ในปี 1938 Craigie และ Yen ได้จำแนกซีโรวาร์ของ *S. Typhi* โดยให้ Vi-phage 4 ชนิด ได้แก่ I, II, III และ IV และมีการปรับปรุง phage ที่ใช้จนสามารถจำแนกได้ 11 รูปแบบ ต่อมาในปี 1943 Felix และ Callow ได้ใช้ phage 11 ชนิดเพื่อจำแนก *S. Paratyphi B* และ *S. Typhimurium* โดยสามารถจำแนกซีโรวาร์ *Typhimurium* ได้ 12 รูปแบบและได้เพิ่ม phage เป็น 29 ชนิด ทำให้จำแนกเชื้อได้เป็น 34 รูปแบบ หลังจากนั้นในปี 1977 Anderson และคณะได้กำหนดรูปแบบจากการจำแนกเชื้อ *S. Typhimurium* เป็น definitive types (DT) โดยใช้ phage 34 ชนิด ทำให้ได้รูปแบบถึง 207 รูปแบบ (Anderson and Williams, 1956 ; Anderson et.al., 1977) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการเนื่องจากเทคนิค phage typing จำเป็นต้องใช้ standard phage typing sets ในการวิเคราะห์และการเก็บรักษา phage typing set ที่ได้มาตรฐาน ทำให้วิธีนี้สามารถปฏิบัติในห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น (Yan et. al, 2003) นอกจากนี้ยังประสบปัญหาไม่สามารถวิเคราะห์เชื้อบางสายพันธุ์ได้เนื่องจากไม่มี phage ที่มีความจำเพาะกับตัวรับบนผิวเซลล์ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์รูปแบบที่เกิดขึ้นได้

เนื่องจากการจำแนกความแตกต่างของ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ โดยใช้เทคนิค serotyping ร่วมกับ phage typing ที่พบว่ามีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ขีดความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของเทคนิค มาตรฐานและความสามารถในการทำซ้ำของเทคนิค เป็นต้น ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ร่วมกับเทคนิค serotyping เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ให้สูงขึ้น

### 2.3.2 การจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (genotyping)

จากข้อจำกัดของการจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ด้วยลักษณะที่แสดงออกทำให้มีการพัฒนาเทคนิคการจำแนกสายพันธุ์แบบที่เรียกว่าเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลซึ่งเป็นเทคนิคซึ่งมีความสามารถในการจำแนกสูงกว่าการจำแนกด้วยลักษณะที่แสดงออก โดยสามารถแบ่งการจำแนกด้วยลักษณะทางพันธุกรรมออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆตามเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่ restriction-based method, amplification-based method และ sequencing-based method

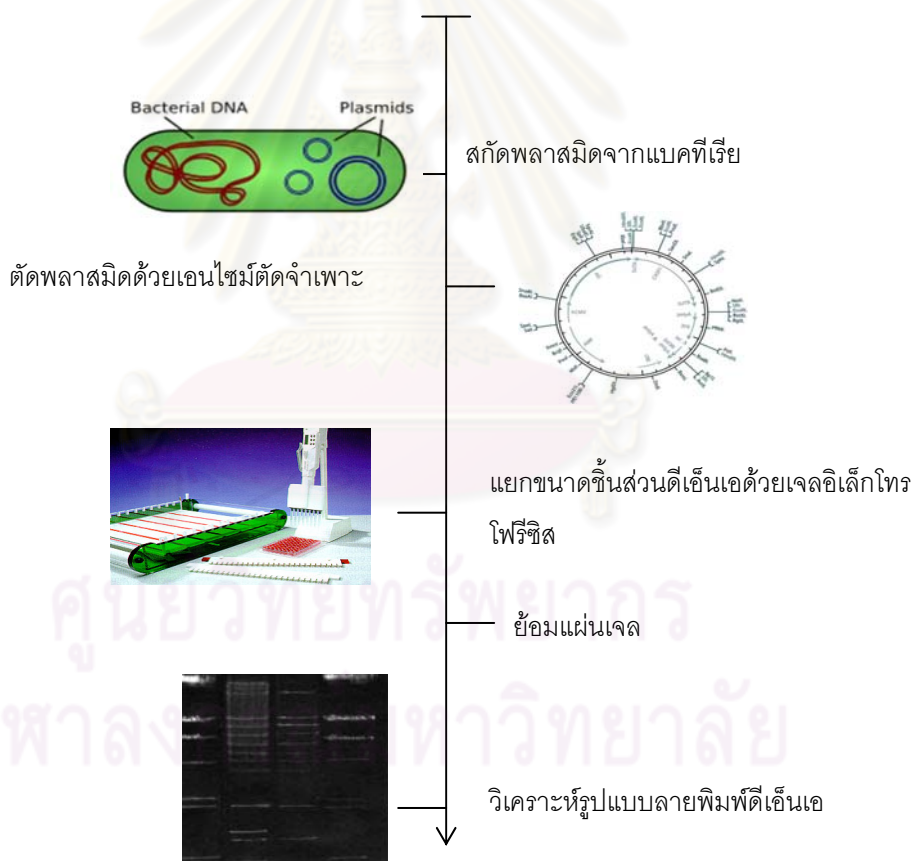
#### 2.3.2.1 Restriction-based methods

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้หลักการการแยกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยสามารถแบ่งเป็นวิธีต่างๆได้อีกหลายวิธี ได้แก่

plasmid analysis, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, ribotyping, insertional sequences (IS)-RFLP และ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

### 2.3.2.1.1 Plasmid analysis

พลาสมิดคือโมเลกุลดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) ที่มีลักษณะเป็นวงแหวน (circular DNA) อยู่ในไซโทพลาซึมของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์จะเกิดการสำเนาพลาสมิดมายังเซลล์ลูกด้วย ดังนั้นแบคทีเรียซึ่งมาจากต้นกำเนิดเดียวกันโดยปกติมักจะพบพลาสมิดชนิดเดียวกัน ทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรียได้ ขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค plasmid analysis แสดงในรูป 2-11



**รูป 2-11** แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค plasmid analysis

ที่มา : รวงผึ้ง สุทเธนทร์, 2545 : online



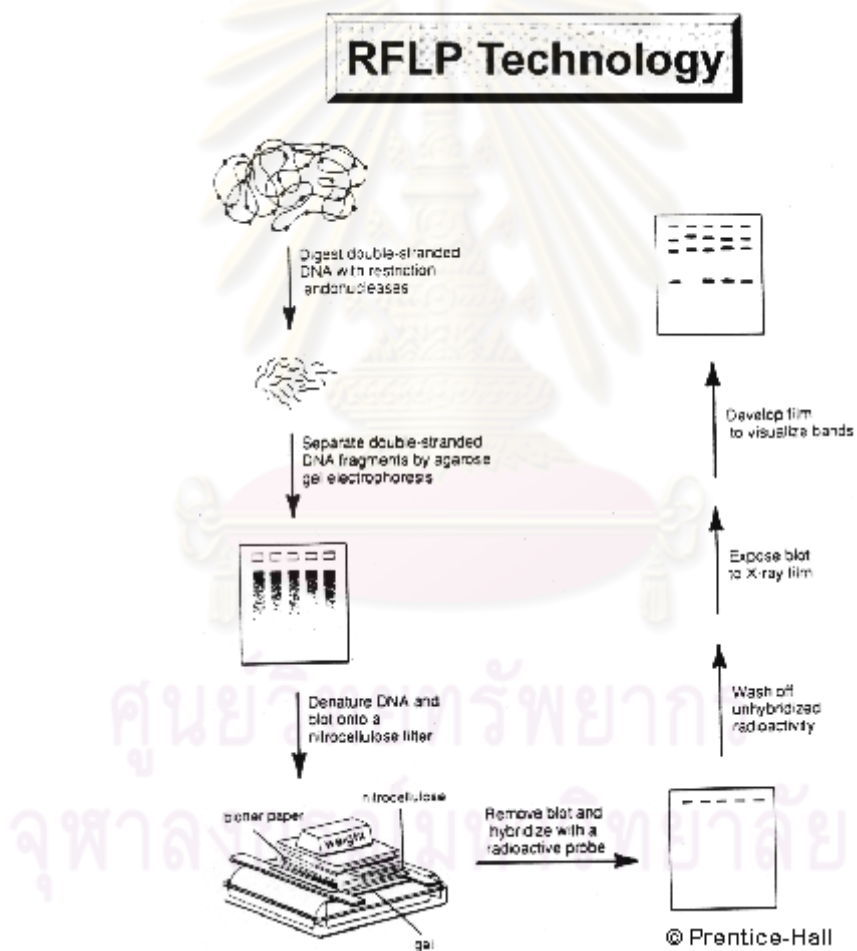
ชั้น แรก แยก ดีเอ็นเอ ของ พลาสมิด ซึ่ง เป็น ส่วน extrachromosomal DNA ออกจากแบคทีเรีย ตัดดีเอ็นเอด้วย restriction enzymes จากนั้นนำไป ทำ agarose gel electrophoresis ดูขนาดชิ้นส่วนและปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยในปี 1982 Taylor และคณะได้รายงานถึงชนิดของพลาสมิดซึ่งพบใน *Salmonella* spp. หลังจากนั้นได้มีความพยายามนำเทคนิคนี้มาใช้จำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* อย่างไรก็ตาม พบว่าในบางครั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพลาสมิดซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติ การเคลื่อนที่ระหว่างการวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Olsen et al., 1992; Foley et al., 2009) และอาจทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบบนแผ่นเจลทำให้การวิเคราะห์รูปแบบทำได้ยาก ในบางกรณีพบว่าแบคทีเรียมีพลาสมิดหลายชนิดซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันอาจเกิดการเคลื่อนที่ไปพร้อมกันและปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงหนึ่งแถบบนแผ่นเจล ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยใช้เอนไซม์ ตัดจำเพาะตัดพลาสมิดเพื่อสร้างรูปแบบการตัด (plasmid fingerprint) ขึ้น ในปี 1987 Platt และ คณะได้ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิค plasmid fingerprinting ในด้านระบาดวิทยาของ *S. Typhimurium* (Threlfall et al., 1990) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ที่แบคทีเรียบางไอโซเลทไม่มีพลาสมิด หรือการเจริญในบางสภาวะทำให้พลาสมิดสามารถหายไปได้ซึ่งการมีหรือไม่มีพลาสมิดจะส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องของพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย (Foley et al., 2009)

#### 2.3.2.1.2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis

เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัด chromosomal DNA ที่ ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะ ซึ่งเรียกว่าตำแหน่งจดจำ (recognition site) (ตาราง 2-6) และแยกชิ้นส่วนที่เกิดจากการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ถ้าดีเอ็นเอ เป้าหมายมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ ขนาดชิ้นส่วน ดีเอ็นเอและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกัน ขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RFLP แสดงในรูป 2-12

ตาราง 2-6 ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณจดจำที่ใช้ในเทคนิค RFLP

Restriction enzyme	Recognition site
<i>Mbo</i> I	^GATC
<i>Hha</i> I	GCG^C
<i>Hph</i> I	GGTGA(N) <sub>8</sub> ^



รูป 2-12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RFLP

ที่มา : Hancock, 1992

เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้วิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ เช่น Typhimurium, Dublin และ Enteritidis (Tompkins et al., 1986) ต่อมามีการพัฒนานำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction (PCR)) มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณที่ต้องการและตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกชิ้นส่วนที่เกิดจากการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เรียกเทคนิคนี้ว่า PCR-RFLP โดยยีนที่นิยมใช้ในการทดสอบเชื้อ *Salmonella* คือยีน *fliC* ซึ่งเทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการจำแนกความแตกต่างของซีโรวาร์ Gallinarum แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของซีโรวาร์อื่นๆได้ (Foley et al., 2009)

#### 2.3.2.1.3 Ribotyping

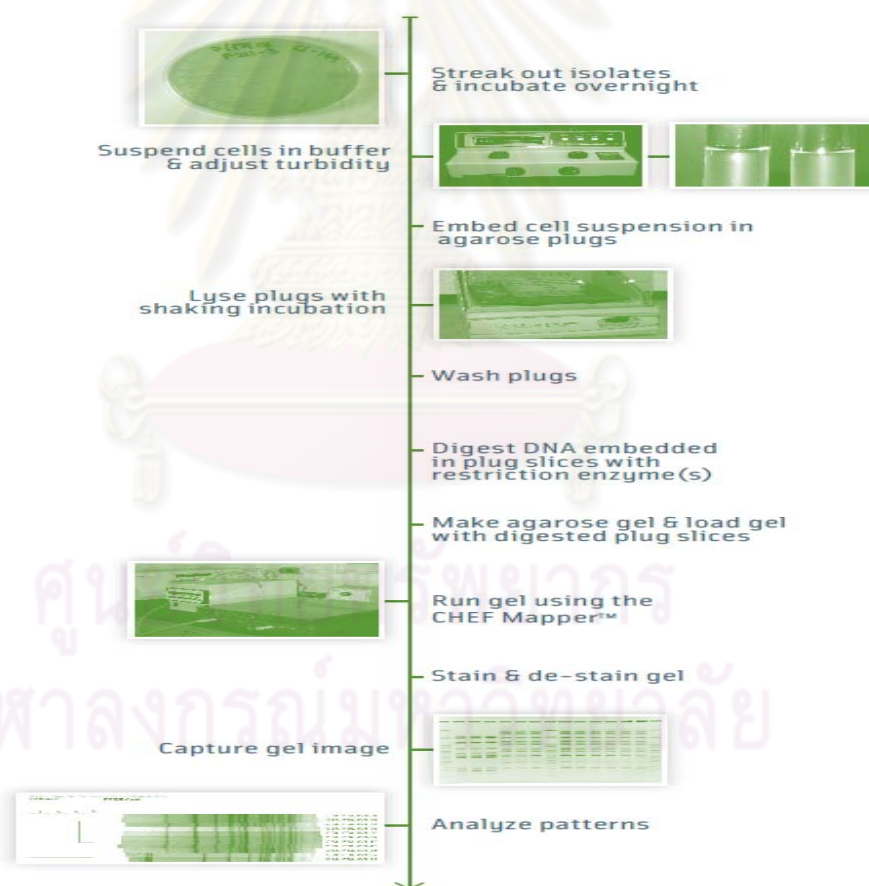
เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากเทคนิค PCR-RFLP โดยอาศัยความแตกต่างของตำแหน่งและจำนวนของยีนบริเวณ 16 S และ 23 S ribosomal RNA (rRNA) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอจากนั้นแยกชิ้นส่วนที่ถูกตัดเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนและนำแผ่นเมมเบรนมาไฮบริไดซ์พร้อมกับโพรบซึ่งจำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน rRNA รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียได้ โดยในปี 1989 Altwegg และคณะได้ใช้เทคนิค ribotyping ในการจำแนกความแตกต่างของ *S. Typhi* โดยสามารถจำแนกได้ 16 สายพันธุ์จาก 8 phage type (Altwegg, Hickman-Brenner and Farmer, 1989) ถึงแม้วิธีนี้จะให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แปรผลง่ายและทำซ้ำได้แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่จำนวนของยีน rRNA ซึ่งถ้าหากมีจำนวน ribosomal operons น้อยก็จะทำให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ (Nielsen et al., 2000, Foley et al., 2009)

#### 2.3.2.1.4 Insertional sequences (IS)-RFLP

ความแตกต่างระหว่างเทคนิค IS – RFLP และ ribotyping คือโพรบที่ใช้ใน IS-RFLP จะจำเพาะกับบริเวณ insertion sequences (IS) โดยเฉพาะ IS200 ซึ่งนิยมใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* ในซีโรวาร์ Typhimurium และ Enteritidis ข้อด้อยของเทคนิคนี้เกิดจากเชื้อ *Salmonella* บางไอโซเลทไม่มี IS200 ทำให้วิธีการนี้ไม่มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อเหล่านี้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังคงมีประโยชน์ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะและสายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ (Threlfall et al, 1994; Millemann et al., 2000; Foley et al., 2009)

### 2.3.2.1.5 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

เป็นเทคนิคซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในปี 1984 เพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีสต์ซึ่งมีขนาดใหญ่ (Schwartz and Cantor, 1984) และถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค RFLP เพื่อจำแนกความแตกต่างในระดับซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* ในปี 1995 โดย Murase และคณะ (Murase et al., 1995) เอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งนิยมใช้ในการตัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Salmonella* ได้แก่ XbaI, BlnI หลังจากการตัดเป็นขั้นตอนการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ในระหว่างขั้นตอนนี้จะมีการสลับขั้วกระแสไฟฟ้าเป็นจังหวะทำให้เกิดการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาดซึ่งมีตั้งแต่ 20 – 800 กิโลเบสเกิดเป็นรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังแสดงในรูป 2-13



รูป 2-13 แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค PFGE

ที่มา : Martin and Nightingale, 2009

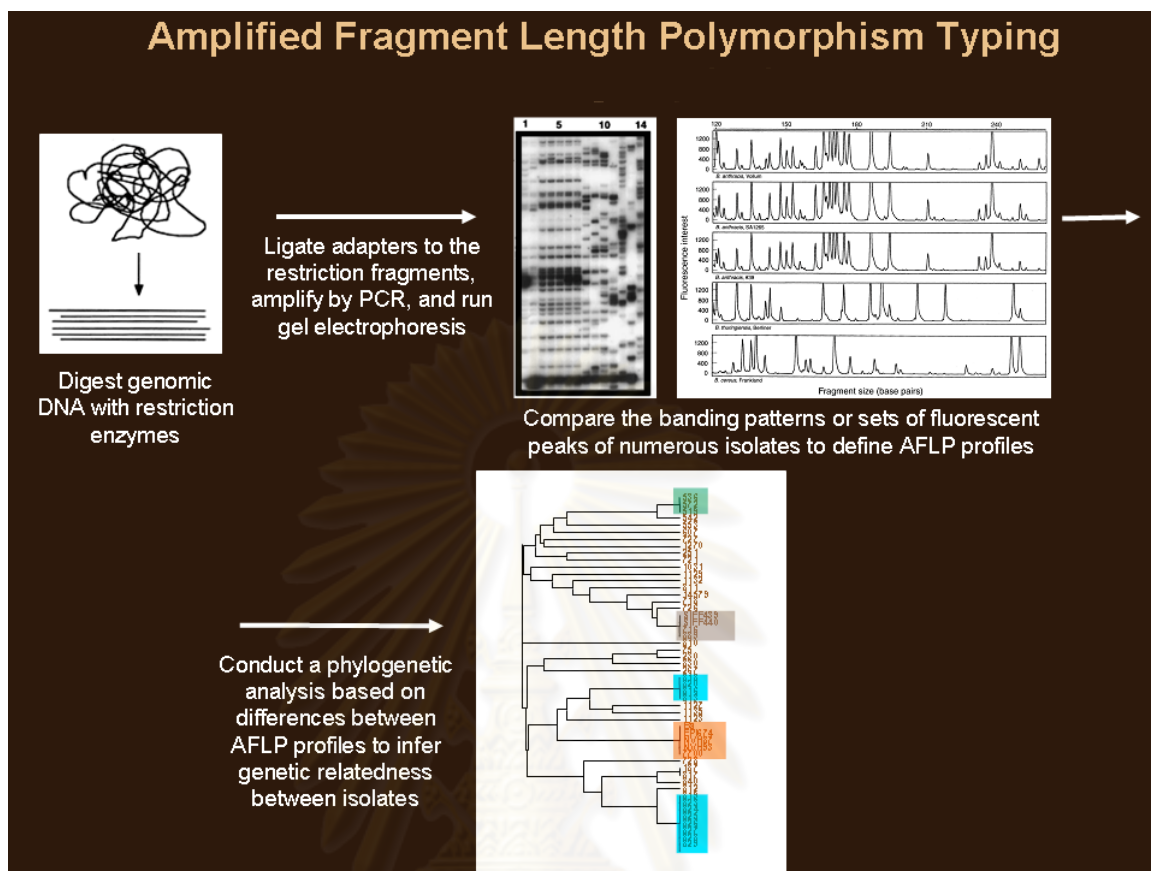
เทคนิค PFGE เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งถูกจัดให้เป็น “gold standard” ในการจำแนกเชื้อ *Salmonella* ในระดับซัพซี้โรวาร์เนื่องจากเป็นเทคนิคซึ่งมีประโยชน์และสามารถทำซ้ำได้จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังสามารถเปรียบเทียบผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการต่างๆผ่านฐานข้อมูลกลาง “PulseNet” (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>) ซึ่งเป็น National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance บริหารโดย Centers for Disease Control and Prevention (CDC) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้เป็นเทคนิคซึ่งใช้แรงงานมากและอาจต้องใช้เวลา 2 – 4 วันในการดำเนินการวิเคราะห์และแปลผลและอาจต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมากกว่าหนึ่งตัวเพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อนั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจริงๆ (Yan et al., 2003 ; Zheng et al., 2007 ; Foley et al., 2009)

### 2.3.2.2 Amplification-based methods

เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียโดยหลักการของเทคนิคคือการวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction [PCR]) เพื่อดูการมีหรือไม่มียีนในตำแหน่งเป้าหมาย โดยสามารถแบ่งเป็นวิธีต่างๆได้อีกหลายวิธี ได้แก่ amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR), repetitive element PCR (Rep – PCR) และ variable number of tandem repeat (VNTR) analysis และ multiple locus VNTR analysis (MLVA)

#### 2.3.2.2.1 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคซึ่งใช้การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการหาจีโนไทป์โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค AFLP แสดงในรูป 2-14



**รูป 2-14** แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค AFLP

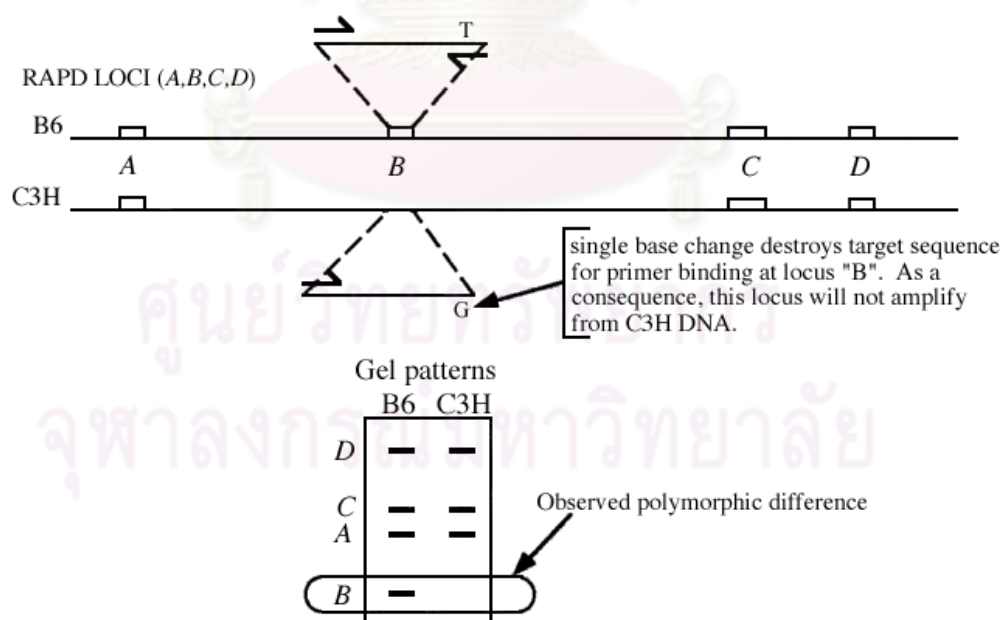
ที่มา : ดัดแปลงจาก University OF OSLO, n.d. : online

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP นั้น จีโนมของแบคทีเรียจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยทำการเชื่อมต่อกับ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์เพื่อเป็นตำแหน่งสำหรับให้ไพรเมอร์มาจับในการทำพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์จะถูกเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' ประมาณ 1 – 3 เบสต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสสอดคล้องกับไพรเมอร์ทำให้สามารถลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องวิเคราะห์ทั้งหมดได้ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียต่อไป เทคนิคนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกเชื้อ *Salmonella* ตั้งแต่นั้นปี 1998 เป็นต้นมา Aarts และคณะได้ใช้เทคนิคนี้ในการจำแนกความแตกต่างในระดับซัปสปีชีส์และ

ในปี 2000 Lindstedt และคณะได้จำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ในระดับซีโรวาร์ ซึ่งเทคนิคนี้มีความสามารถในการจำแนกเท่ากับเทคนิค PFGE อย่างไรก็ตามภายหลังได้มีการนำเครื่อง automate DNA sequencer มาใช้ในแยกและตรวจวัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้เทคนิคนี้มีความถูกต้องมากขึ้นแต่ก็ทำให้เกิดข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติหลายๆแห่งซึ่งไม่มีเครื่องมือตัวนี้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552; Aarts, Lith and Keijer, 1998; Lindstedt et al., 2000; Foley et al., 2009)

#### 2.3.2.2.2 Random amplified polymorphic DNA PCR(RAPD-PCR)

RAPD-PCR เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว ชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกแยกด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แบคทีเรีย หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RAPD-PCR แสดงในรูป 2-15



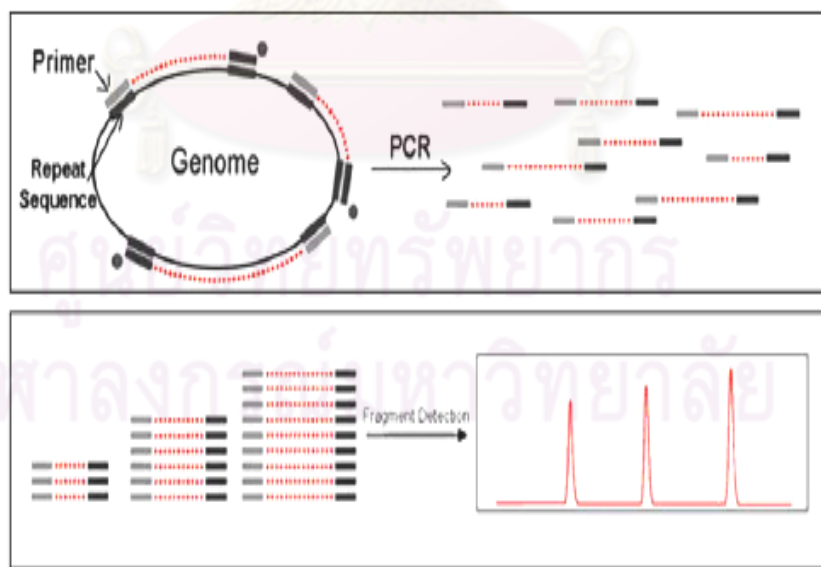
รูป 2-15 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค RAPD-PCR

ที่มา : Silver, 1995 : online

ในปี 2000 Chansiripornchai และคณะ ได้รายงานถึงการใช้นี้ เทคนิค RAPD-PCR ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* พบว่าเทคนิคนี้สามารถ จำแนกความแตกต่างระหว่างซีโรวาร์ได้แต่ยังมีข้อจำกัดในการแยกความแตกต่างของเชื้อในระดับ ซีโรวาร์ นอกจากนี้ยังพบปัญหาในเรื่องการทำซ้ำของเทคนิค เนื่องจากการเปลี่ยนแปลง ส่วนผสมของสารเคมี สภาวะในการทำพีซีอาร์ หรือปัจจัยอื่นๆเพียงเล็กน้อยอาจส่งผลทำให้ รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อ repeatability และ reproducibility ของเทคนิค (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552 ; Chansiripornchai et al., 2000 ; Foley et al., 2009)

### 2.3.2.2.3 Repetitive element PCR (Rep – PCR)

Rep-PCR เป็นเทคนิคในการจำแนกความแตกต่างของ แบคทีเรียโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆกัน (repetitive DNA) ซึ่งกระจาย อยู่ทั่วจีโนมของแบคทีเรีย หลังจากนั้นชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโทร โพรซีซและลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรม โดยมีหลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Rep-PCR ดังแสดงในรูป 2-16



รูป 2-16 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค Rep-PCR  
ที่มา : Sarita Raengpradub, 2009 : online

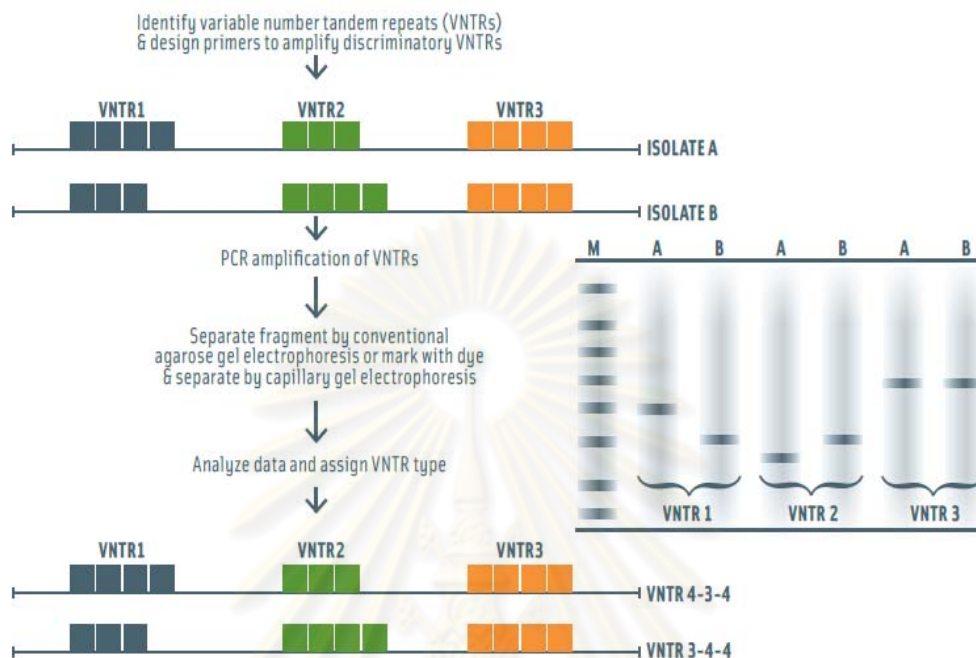


ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเกิดจากความแตกต่างของจำนวน repetitive DNA และตำแหน่งภายในจีโนมของแบคทีเรีย สำหรับ repetitive DNA ที่นิยมใช้ ได้แก่ enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC), repetitive extragenic palindromic (REP) และ BOX sequence เป็นต้น ERIC-PCR ถูกใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรครวมถึงเชื้อ *Salmonella* ด้วย อย่างไรก็ตามความสามารถในการจำแนกความแตกต่างยังด้อยกว่าเทคนิค PFGE นอกจากนี้ยังพบปัญหาในเรื่องการทำซ้ำซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงส่วนผสมของสารเคมี สภาวะในการทำพีซีอาร์หรือปัจจัยอื่นๆเพียงเล็กน้อยอาจส่งผลทำให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป (Versalovic et al., 1991; Foley et al., 2009)

#### 2.3.2.2.4 Variable number of tandem repeat (VNTR) analysis and multiple locus VNTR analysis (MLVA)

เป็นเทคนิคในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยพิจารณาจากความผันแปรของจำนวน variable number of tandem repeats (VNTR) ในจีโนมของแบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค MLVA ดังแสดงในรูป 2-17

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูป 2-17** แผนภาพแสดงแนวคิดและขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค MLVA โดยสมมติจำนวน VNTR ของเชื้อไอโซเลท A และ B และภาพเจลสมมติซึ่งเกิดจากการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณของไอโซเลท A และ B (เมื่อแถว M คือ DNA marker) แถบบนแทนชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดและแถบล่างแทนชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดแถว 2 – 7 แสดงขนาดชิ้นส่วน VNTR ทั้ง 3 ตำแหน่งของไอโซเลท A และ B  
ที่มา : Martin and Nightingale, 2009

ในขั้นแรกนั้นจำเป็นต้องหาตำแหน่ง VNTR ทั้งหมดในจีโนมของแบคทีเรียที่สนใจ หลังจากเลือกตำแหน่งได้แล้วจึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการ จากนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกนำไปหาขนาดเพื่อนำไปคำนวณจำนวน repeat ความแตกต่างของจำนวน repeat ที่ได้จะนำมาพิจารณาความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรีย ในบางครั้งการวิเคราะห์ VNTR เพียงตำแหน่งเดียวอาจทำให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยเพิ่มจำนวนบริเวณ VNTR ให้มีหลายตำแหน่งและพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบโดยการติดสีฟลูออเรสเซนต์เข้าไปที่ไพรเมอร์ซึ่งทำให้สามารถแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ด้วยเครื่อง automated sequencer หรือ capillary gel

electrophoresis (CE) ทำให้การหาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีความแม่นยำมากจนสามารถเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการได้ (Yan et al, 2003; Belkum, 2008; Foley et al., 2009; Martin and Nightingale, 2009)

ในปี 2003 Lindstedt และคณะศึกษาการจำแนกความแตกต่างใน ซีโรวาริ Typhimurium จากขนาดของ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA เปรียบเทียบกับวิธี PFGE โดยเลือก VNTR ที่ตำแหน่งต่างๆทั้งหมด 8 ตำแหน่ง พบว่าเทคนิค MLVA สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับซีโรวาริได้ดีกว่าเทคนิค PFGE โดยเฉพาะการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ S. Typhimurium DT 104 phage type ซึ่งมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมสูงเช่นเดียวกับ Torphdahl และคณะ (2006) ซึ่งใช้เทคนิค MLVA ในการศึกษาระบาดของเชื้อ S. Typhimurium DT12 (Lindstedt et al., 2003; Torphdahl et al., 2006) นอกจากนี้เทคนิค MLVA ยังสามารถจำแนกความแตกต่างในระดับซีโรวาริของเชื้อ S. Enteritidis ได้ดีกว่าเทคนิค PFGE และ phage typing อีกด้วย (Boxrud et al., 2007) ดังนั้นเทคนิค MLVA จึงเป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับซีโรวาริของเชื้อ S. Typhimurium สูงกว่าเทคนิคอื่นๆและสามารถทำซ้ำได้ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือในการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกต้องเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค capillary gel electrophoresis นั้นค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างและเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์มีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ไม่เหมาะสมในการใช้วิเคราะห์กับตัวอย่างจำนวนมาก

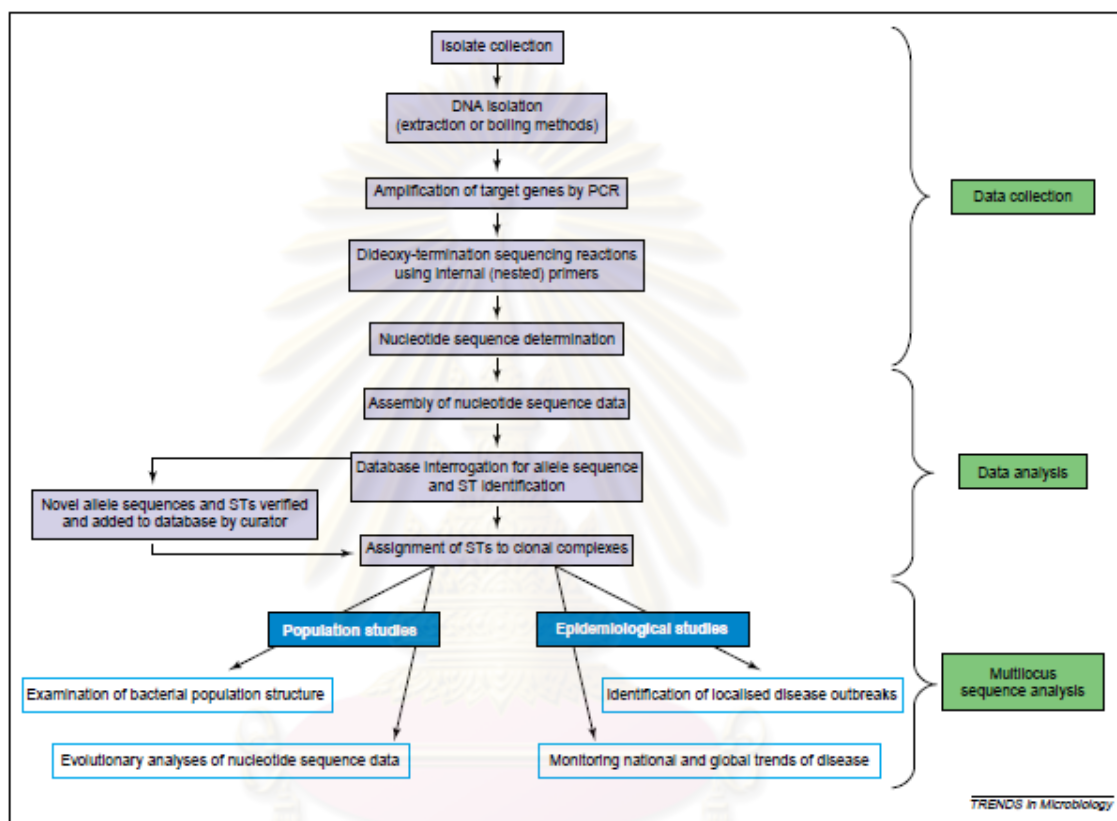
### 2.3.2.3 Sequencing-based methods

เมื่อข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของแบคทีเรียมีมากขึ้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียโดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจะทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลทและดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างไอโซเลทได้

#### 2.3.2.3.1 Multilocus sequence typing (MLST)

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ชิ้นส่วนของ house keeping gene ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับฟังก์ชันพื้นฐานที่มีความจำเป็นต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังเป็นยีนที่ปรากฏในทุกไอโซเลทและการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ประโยชน์ของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์คือสามารถแปรผลได้ง่าย และสามารถจัดเก็บข้อมูลในระบบฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ทำให้สามารถเปรียบเทียบข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทั่วโลก (Urwin and Maiden, 2003) ขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค MLST ดังแสดงในรูป 2-18



รูป 2-18 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค MLST

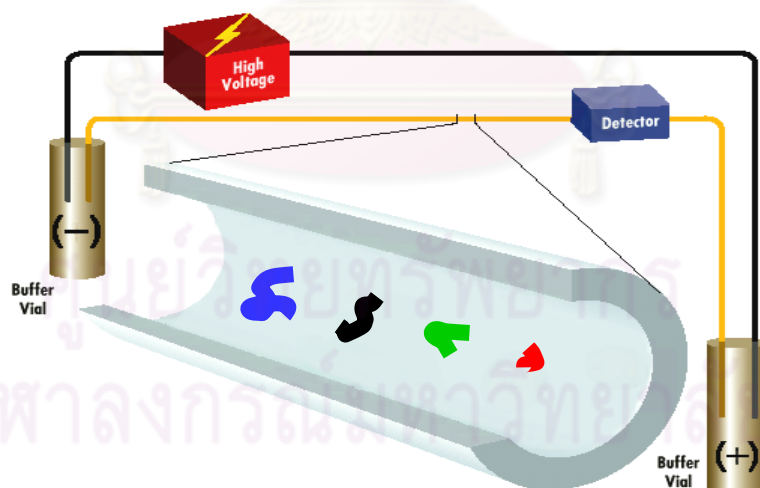
ที่มา : Urwin and Maiden, 2003

ในปี 2002 Kotetishvili และคณะ ใช้เทคนิค MLST จำแนกความแตกต่างในซีโรวาร์ Typhimurium เปรียบเทียบกับเทคนิค PFGE และ serotyping พบว่าเทคนิค MLST ซึ่งใช้ house keeping gene 4 ตำแหน่งให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างดีกว่าเทคนิค PFGE และ serotyping ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Foley และคณะ ในปี 2006 พบว่าเทคนิค MLST สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลทซึ่งมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค PFGE เดียวกันได้ อย่างไรก็ตามในปี 2005 Fakhr และคณะ ได้รายงานว่าการจำแนกความแตกต่างในซีโรวาร์ Typhimurium น้อยกว่าเทคนิค PFGE ซึ่ง

การรายงานที่ไม่สอดคล้องกันนี้อาจเกิดจากการเลือกยีนและจำนวนโลไซท์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อจำกัดของเทคนิค MLST คือต้องการผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพ ทำให้ต้องใช้เอนไซม์ที่มีคุณภาพดีและจำเป็นต้องทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทางทำให้เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง (Kotetishvili et al., 2002; Yan et al, 2003; Fakhr et al., 2005; Foley et al., 2009; Martin and Nightingale, 2009)

#### 2.4 Capillary gel electrophoresis (CE)

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งพัฒนามาจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ระบบแคปิลารีแทนแผ่นเจลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยแคปิลารีจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 – 100 ไมโครเมตรและมีความยาว 20 – 100 เซนติเมตร ภายในแคปิลารีประกอบด้วยซิลิกาซึ่งภายนอกถูกเคลือบด้วยสารโพลีเมอร์ จากการที่แคปิลารีมีขนาดเล็กทำให้สามารถใช้ปั๊มเฟออร์และตัวอย่างในการวิเคราะห์ในปริมาณน้อย ส่วนประกอบพื้นฐานของแคปิลารีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสดังแสดงในรูป 2-19



รูป 2-19 ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่องมือ capillary electrophoresis

ที่มา : วิถัน บัณฑิตย์, 2548 : ออนไลน์

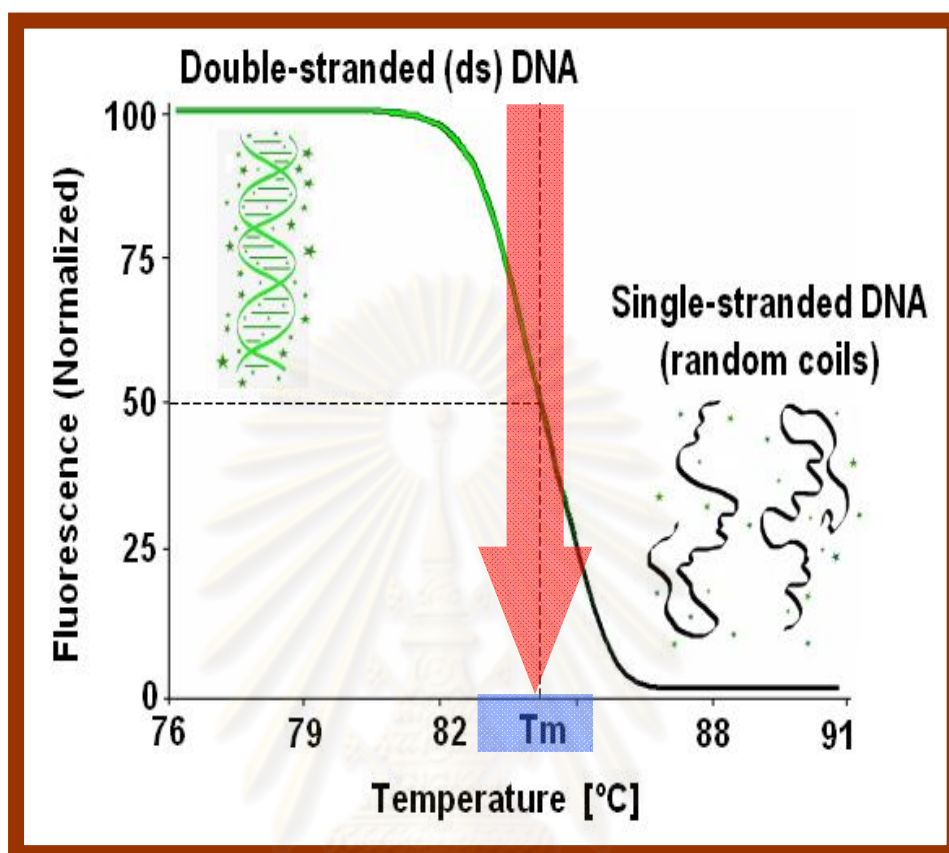
ส่วนประกอบพื้นฐานในระบบของแคปิลารีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสจะประกอบด้วย เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแรงสูง ภาชนะใส่บัฟเฟอร์ อิเล็กโทรดที่ต่อกับเครื่องจ่ายไฟและเครื่องตรวจจับสัญญาณ เมื่อเริ่มการวิเคราะห์ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในปลายด้านหนึ่งของแคปิลารีโดยใช้สนามไฟฟ้าหรือใช้ความดัน หลังจากที่ตัวอย่างปริมาณหนึ่งเข้าไปในแคปิลารีแล้วแคปิลารีจะถูกย้ายไปยังภาชนะใส่บัฟเฟอร์และจะเริ่มการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ปลายอีกด้านหนึ่งของแคปิลารีซึ่งข้อมูลจะถูกบันทึกและจัดเก็บโดยเครื่องประมวลผล (Zhu, 2005)

ข้อดีของเทคนิคแคปิลารีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสคือลดขั้นตอนในการเตรียมแผ่นเจลเนื่องจากเจลเป็นแบบพร้อมใช้และใช้เวลาในการแยกขนาดขึ้นส่วนดีเอ็นเอน้อยกว่าวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสแบบดั้งเดิมทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้รวดเร็วกว่า อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดโดยเครื่องมือวิเคราะห์นี้ยังคงมีราคาแพงทำให้มีอยู่ในเฉพาะห้องปฏิบัติการบางที่เท่านั้น นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างยังคงมีราคาสูง (วิถัน บัณฑิตย์, 2548)

## 2.5 High Resolution Melting (HRM) Analysis

เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจวัดอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ (melting temperature,  $T_m$ ) โดยตรวจวัดสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เข้มตัวสูงเริ่มตั้งแต่ถูกยัดเกาะในดีเอ็นเอสายคู่จนกระทั่งถูกปลดปล่อยออกมาจากตำแหน่งยัดเกาะในขณะที่มีการเพิ่มอุณหภูมิจนดีเอ็นเอสายคู่แยกตัวออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยสมบูรณ์อุณหภูมิ ณ จุดที่การแยกสายดีเอ็นเอเกิดขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์คือค่าที่เป็นตัวแทนค่าอุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอสายคู่นั้นโดย หลักการเบื้องต้นของการหาค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HRM ดังแสดงในรูป 2-20

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพ 2-20 หลักการเบื้องต้นในการพลอตค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และอุณหภูมิในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM

ที่มา : Corbett Research, 2006 : online

ปัจจัยที่ส่งผลต่ออุณหภูมิหลอมเหลวของดีเอ็นเอ ได้แก่ ปริมาณ GC ที่อยู่ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ความยาวของสายดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ นั้นซึ่งทำให้ค่าการหลอมเหลวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจง เทคนิค HRM ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย เช่น การวิเคราะห์ single strand conformation polymorphism (SSCP) หรือนำไปใช้ในการจำแนกชนิดสายพันธุ์ของ mycobacteria ในกลุ่ม *Mycobacterium chelonae-abscessus* นอกจากนี้เทคนิค HRM ยังถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์จีโนมไทป์ของ *Staphylococcus aureus*, และใช้จำแนกความแตกต่างในระดับซัพซีโรวาร์ของเชื้อ *Bacillus anthracis* และ *Yersinia petis* อีกด้วย (Erali, Voelkerding and Wittwer, 2008; Wittwer, Rasmussen and Ririe, 2009; Witter, 2009)

Erali และคณะ (2006) ศึกษาการใช้เทคนิค HRM ในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ โดยใช้ *Aspergillus* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. terreus*, *A. flavus*, *A. fumigatus* และ *A. niger* พบว่าเทคนิค HRM ให้รูปแบบ melting profile เป็น 4 รูปแบบที่แยกจากกันอย่างชัดเจนสอดคล้องกับการทดลองของ Jeffery และคณะ ในปี 2007 ซึ่งจัดกลุ่มสายพันธุ์ของ *Mycoplasma synoviae* จำนวน 33 ไอโซเลท โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน variable lipoprotein and haemagglutinin gene (vlhA) โดยใช้เทคนิค HRM เปรียบเทียบกับเทคนิค single-strand conformation polymorphisms (SSCP) พบว่าเทคนิค HRM ให้ผลที่สอดคล้องกับผลของ SSCP และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าในแต่ละรูปแบบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 1 เบสเท่านั้น (Erali et al., 2006; Jeffery et al., 2007)

Fortini และคณะ (2007) ศึกษาการใช้เทคนิค HRM ในการจำแนกความแตกต่างในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ของเชื้อ *Bacillus anthracis* จำนวน 19 สายพันธุ์ เปรียบเทียบผลการทดลองกับเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE ที่ตำแหน่งอัลลีลเดียวกันเป็นจำนวน 6 ตำแหน่ง พบว่า melting profile ที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับผลของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE (Fortini et al., 2007)

Ciammaruconi และคณะ (2009) ศึกษาการใช้เทคนิค HRM ในการจำแนกความแตกต่างของอัลลีลอย่างรวดเร็วใน *Y. pestis* จำนวน 10 ไอโซเลท โดยใช้ตำแหน่งเป้าหมายจำนวน 25 ตำแหน่งจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค capillary electrophoresis (CE) พบว่ามีตำแหน่งเป้าหมาย 14 ตำแหน่งที่มี melting profile แตกต่างกันและสามารถใช้ทดสอบความแตกต่างของอัลลีลได้อย่างถูกต้อง (Ciammaruconi, 2009)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ S. Typhimurium และ S. Enteritidis จำนวน 50 ไอโซเลทที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยมีไอโซเลทดังต่อไปนี้ STTR01, STTR02, STTR03, STTR04, STTR05, STTR06, STTR07, STTR08, STTR09, STTR10, STTR11, STTR14, STTR15, STTR16, STTR17, STTR18, STTR23, STTR24, STTR25, STTR26, STTR27, STTR29, STTR31, STTR32, STTR33, STTR35, STTR37, STTR38, STTR42, SAP21194/08, SAP00433/09, SAP00444/09, SAP00445/09, SAP00564/09, SAP01571/09, SAP03057/09, SAO4202, SAP4282, SAP4570, SAP4572, SAP5447, SAP6077, SAP9184/09, MLST12, MLST13, MLST23, MLST24, MLST33, ATCC13311 และ DMST17242

#### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

##### 3.2.1 สารเคมีและสารละลาย

Absolute ethanol (Merck, Germany)

dNTPs (Fermentus, USA)

LightCycle®480 Resolight Dye (Roche, Germany)

Magnesium chloride (Invitrogen, Brazil)

Oligonucleotide primer (1<sup>st</sup> base, Singapore)

PCR RXN buffer (Invitrogen, Brazil)

Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil)

Triptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)

##### 3.2.2 ชุดทดสอบ

Genomic DNA extraction kit (Qiagen, Germany)

### 3.2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

LightCycle®480 Real time PCR system (Roche, Germany)

PCR Thermocycle (Corbette, Australia)

Pipette, 2, 10,20,100,200,1,000 µl (Biohit, Germany)

UV-Vis Spectrophotometer Model U-1900 (Hitachi, Japan)

Mikro 200 zentrifugen (HeHich, Germany)

Incubator (Binder, Germany )

## 3.3 การเตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อ S. Typhimurium และ S. Enteritidis

### 3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบ

เชื้อ S. Typhimurium และ S. Enteritidis ถูกสกัดดีเอ็นเอด้วย Genomic DNA Extraction Kit โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) คุด suspension ของเชื้อ S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2) ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส

3) เติม GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

4) เติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นผสมนาน 5 วินาที

5) นำสารละลายในข้อ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนสารละลายใสกลับหลอดทุกๆ 3 นาที

6) นำหลอดน้ำปราศจากไอออนเข้าสู่ตู้ที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นตัวทำลายดีเอ็นเอ

7) เติม Absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นส่วนผสมนาน 10 วินาที ในขั้นตอนนี้อาจมีตะกอนเกิดขึ้นให้ปั่นส่วนผสมจนตะกอนแตก

8) สวม GD column ลงใน collection tube ใส่สารละลายในข้อ 7 ลงใน GD column ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง สวม GD column ลงใน collection tube

9) เติม W1 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง สวม GD column ลงใน collection tube

10) เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง สวม GD column ลงใน collection tube

11) นำ GD column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ย้าย GD column ใส่ใน microcentrifuge tube เติมน้ำปราศจากไอออนที่บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน column matrix

12) ทิ้งไว้ นาน 2 นาที ให้ column matrix ดูดซับน้ำปราศจากไอออนจนหมด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที จะได้สารละลาย DNA นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้ม

1) ดูดสารละลายเชื้อ S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทำพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส

2) ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใสเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วนำไปต้มด้วย PCR thermocycler ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3) นำสารละลายเชื้อที่ต้มแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใช้งานได้ทันที

### 3.4 การเก็บรักษาดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยชุดทดสอบและการสกัดด้วยการต้มจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5 การคัดเลือกตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์

การทดสอบ *S. Typhimurium* ใช้ตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์ตามงานวิจัยของ Linstedt และคณะ (2004) ดังตาราง 3-1 สำหรับการทดสอบ *S. Enteritidis* ใช้ตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์ตามงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007) ดังตาราง 3-2

**ตาราง 3-1** ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค MLVA ของ *S. Typhimurium*

Locus	Primer	Primer Sequence (5'- 3')	Repeat Length
STTR3	FORWARD	CCCCTAAGCCCGATAATGG	33
	REVERSE	TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA	
STTR5	FORWARD	ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT	6
	REVERSE	GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT	
STTR6	FORWARD	TCGGGCATGCGTTGAAA	6
	REVERSE	CTGGTGGGGAGAATGACTGG	
STTR9	FORWARD	AGAGGCGCTGCGATTGACGATA	9
	REVERSE	CATTTTCCACAGCGGCGAGTTTTTC	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง3-2 ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค MLVA ของ *S. Enteritidis*

Locus	Primer	Primer Sequence (5'- 3')	Repeat Length
SE1	FORWARD	AGACGTGGCAAGGAACAGTAG	7
	REVERSE	CCAGCCATCCATACCAAGAC	
SE2	FORWARD	CTTCGGATTATACCTGGATTG	7
	REVERSE	TGGACGGAGGCGATAG	
SE5	FORWARD	CGGGAAACCACCATCAC	6
	REVERSE	CAGGCCGAACAGCAGGAT	
SE9	FORWARD	CGTAGCCAATCAGATTCATCCC	9
	REVERSE	GCGTTTGAAACGGGGGTGTGGCGCTG	

### 3.6 ข้อมูล repeat units ของเชื้อ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของตำแหน่งเป้าหมายด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE

ข้อมูล repeat units ของเชื้อ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของตำแหน่งเป้าหมายด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE โดยส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Genescan (ABI, USA) ที่บริษัท Applied Biosystems

### 3.7 สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ด้วยเทคนิค MLVA และ High resolution melting (HRM)

#### 3.7.1 *S. Typhimurium*

สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดัดแปลงจากสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในงานวิจัยของ Linstedt และคณะ (2004)

1) ตัวอย่างดีเอ็นเอของ *S. Typhimurium* จากข้อ 3.3 ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ (ตาราง3-1) มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

10x PCRRXN buffer	2.00	ไมโครลิตร
10 mM dNTP Mix	0.40	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.48	ไมโครลิตร
10 μM Forward Primer	0.40	ไมโครลิตร
10 μM Reverse Primer	0.40	ไมโครลิตร
5U Taq DNA Polymerase	0.20	ไมโครลิตร
LightCycle®480 Resolight Dye	0.20	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	14.92	ไมโครลิตร
สารละลายดีเอ็นเอ	1.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

2) ตั้งโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ ภายใต้เงื่อนไขของ  
ปฏิกิริยาดังนี้

รอบ1	denaturation	95 องศาเซลเซียส	10	นาที
รอบ2	denaturation	95 องศาเซลเซียส	20	วินาที
	annealing	58 องศาเซลเซียส	30	วินาที
	extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที

3) สภาวะในการทำ HRM

ตั้งโปรแกรมสำหรับ HRM acquisition ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

Duplex formation

heating	95 องศาเซลเซียส	1	นาที
cooling down	40 องศาเซลเซียส	1	นาที

HRM

heating	70 – 99 องศาเซลเซียส	25 acquisitions / 1 °C
cooling	40 องศาเซลเซียส	30 วินาที

## 4) การวิเคราะห์ข้อมูล HRM

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

## 3.7.2 S. Enteritidis

สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดัดแปลงจากสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007)

1) ตัวอย่างดีเอ็นเอของ S. Enteritidis จากข้อ 3.1 ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ (ตาราง 3-2) มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

10x PCRRXN buffer	2.00	ไมโครลิตร
10 mM dNTP Mix	0.40	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.80	ไมโครลิตร
10 μM Forward Primer	0.30	ไมโครลิตร
10 μM Reverse Primer	0.30	ไมโครลิตร
5U Taq DNA Polymerase	0.20	ไมโครลิตร
LightCycle®480 Resolight Dye	0.20	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	14.80	ไมโครลิตร
สารละลายดีเอ็นเอ	1.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

2) ตั้งโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

รอบ1	denaturation	95 องศาเซลเซียส	10	นาที
รอบ2	denaturation	95 องศาเซลเซียส	20	วินาที
	annealing	60 องศาเซลเซียส	30	วินาที
	extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที

## 3) สภาวะในการทำ HRM

ตั้งโปรแกรมสำหรับ HRM acquisition ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

## Duplex formation

heating	95 องศาเซลเซียส	1	นาที
cooling down	40 องศาเซลเซียส	1	นาที

## HRM

heating	75 – 99 องศาเซลเซียส	25 acquisitions / 1 °C
cooling	40 องศาเซลเซียส	30 วินาที

## 4) การวิเคราะห์ข้อมูล HRM

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative melting plots เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

### 3.8 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย

เชื้อ S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis ถูกคัดเลือกจากข้อมูล repeat units ซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR 4 ตำแหน่งด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE (จากข้อ 3.6) โดยคัดเลือกไอโซเลทซึ่งมีข้อมูล repeat units ต่างกันมาวิเคราะห์ความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมาย ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

1) เชื้อ S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis ซึ่งมี repeat units ต่างกันถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบตามขั้นตอนในข้อ 3.3.1

2) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 1) ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ดังตารางที่ 3-1 สำหรับทดสอบ S. Typhimurium และตารางที่ 3-2 สำหรับทดสอบ S. Enteritidis โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทดสอบตามหัวข้อ 3.7

## 3) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น สำหรับตำแหน่งเป้าหมายที่สามารถแยกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ได้ ไอโซเลทซึ่งเป็นตัวแทนของอัลลีลนั้นจะถูกคัดเลือกเป็น internal control ต่อไป



### 3.9 การพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *S. Enteritidis*

ในกรณีที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ได้ ไพรเมอร์จะถูกออกแบบใหม่โดยออกแบบให้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ VNTR ตำแหน่งที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile ได้ ให้มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สั้นขึ้นเพื่อเพิ่มขีดความสามารถของเทคนิค HRM

1) หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งเป้าหมายที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ในฐานะข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST

2) ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ด้วยโปรแกรม primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 1) โดยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่นั้นต้องครอบคลุมบริเวณ VNTR เดิมแต่ให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสั้นขึ้นภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3) นำไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ไปตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงกับฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST

4) วิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยใช้สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทดสอบตามหัวข้อ 3.7 แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ และวิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

### 3.10 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

#### 3.10.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ *S. Typhimurium* จากข้อ 3.8 โดยคัดเลือกจากข้อมูล repeat units ซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่ง ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE (จากข้อ 3.6) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอนี้จะใช้ในการทดสอบตามหัวข้อ 3.10.2 และ 3.10.3

#### 3.10.2 การประเมินความแม่นยำ (precision)

การประเมินความแม่นยำของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จะพิจารณาจาก 2 กรณี ได้แก่ ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) และความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility)

3.10.2.1 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) ดัดแปลงจากวิธีของ Norambuena และคณะ ในปี 2009 (Norambuena et al., 2009) โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วยความแตกต่างของ melting profile ในการทดสอบครั้งเดียวกัน ภายในวันเดียวกันและผู้ทดลองคนเดียวกัน

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3.10.1 ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM คัดเลือกตัวแทนของอัลลีลอย่างน้อย 2 อัลลีลในแต่ละตำแหน่งเป้าหมายมาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7

2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

3.10.2.2 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) ดัดแปลงจากวิธีของ Norambuena และคณะ ในปี 2009 (Norambuena et al., 2009) โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วยความแตกต่างของ melting profile ซึ่งกระทำในวันที่ต่างกัน

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3.10.1 ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM คัดเลือกตัวแทนของอัลลีลอย่างน้อย 2 อัลลีลในแต่ละตำแหน่งเป้าหมายมาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7

2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative melting plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการทดลองวันที่หนึ่งและวันที่สอง

3.10.3 ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness)

คือความสามารถของเทคนิคทดสอบที่จะไม่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับอิทธิพลจาก

ปัจจัยต่างๆ โดยเลือกทดสอบ 2 ปัจจัยเพื่อดูเสถียรภาพของเทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM ได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอ และ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

### 3.10.3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอของ *S. Typhimurium* จากข้อ 3.10.1 และ ตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งถูกสกัดด้วยวิธีการตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.3.2 ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ เทคนิค HRM โดยเลือกวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยความแตกต่างของ melting profile ที่ตำแหน่ง STTR9 วิเคราะห์ 2 อัลลีล ซึ่งมี repeat units เท่ากับ 3 และ 4 repeat units โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7.1

#### 2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

### 3.10.3.2 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอของ *S. Typhimurium* จากข้อ 3.10.1 ด้วย เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยเลือกวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย ความแตกต่างของ melting profile ที่ตำแหน่ง STTR 9 วิเคราะห์ 2 อัลลีล ซึ่งมี repeat units เท่ากับ 3 และ 4 repeat units แปรระดับความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัม ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7.1

#### 2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของ แต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

### 3.11 การเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

1) เชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 ตัวอย่างถูกคัดเลือกจากข้อมูล repeat units ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ VNTR ทั้ง 4 ยีนเป้าหมาย ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE (จากข้อ 3.6) นำมาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.3.2

2) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 1) ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีและการวิเคราะห์ผล HRM ตามหัวข้อ 3.6 รวมถึงไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกเป็น internal control จากหัวข้อ 3.7

#### 3) การวิเคราะห์ผล

พิจารณา melting profile ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ถ้า melting peak ของตัวอย่างตกอยู่กลุ่มเดียวกับ internal control ของแต่ละอัลลีลใดให้ถือว่าตัวอย่งนั้นมี repeat units เท่ากับไอโซเลทซึ่งเป็น internal control นั้น ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การจำแนกความแตกต่างของขนาด VNTR ด้วยเทคนิค CE กับการจำแนกความแตกต่างของขนาด VNTR ด้วยเทคนิค HRM โดยดูความถูกต้องของการแปรผล repeat units จาก melting profile

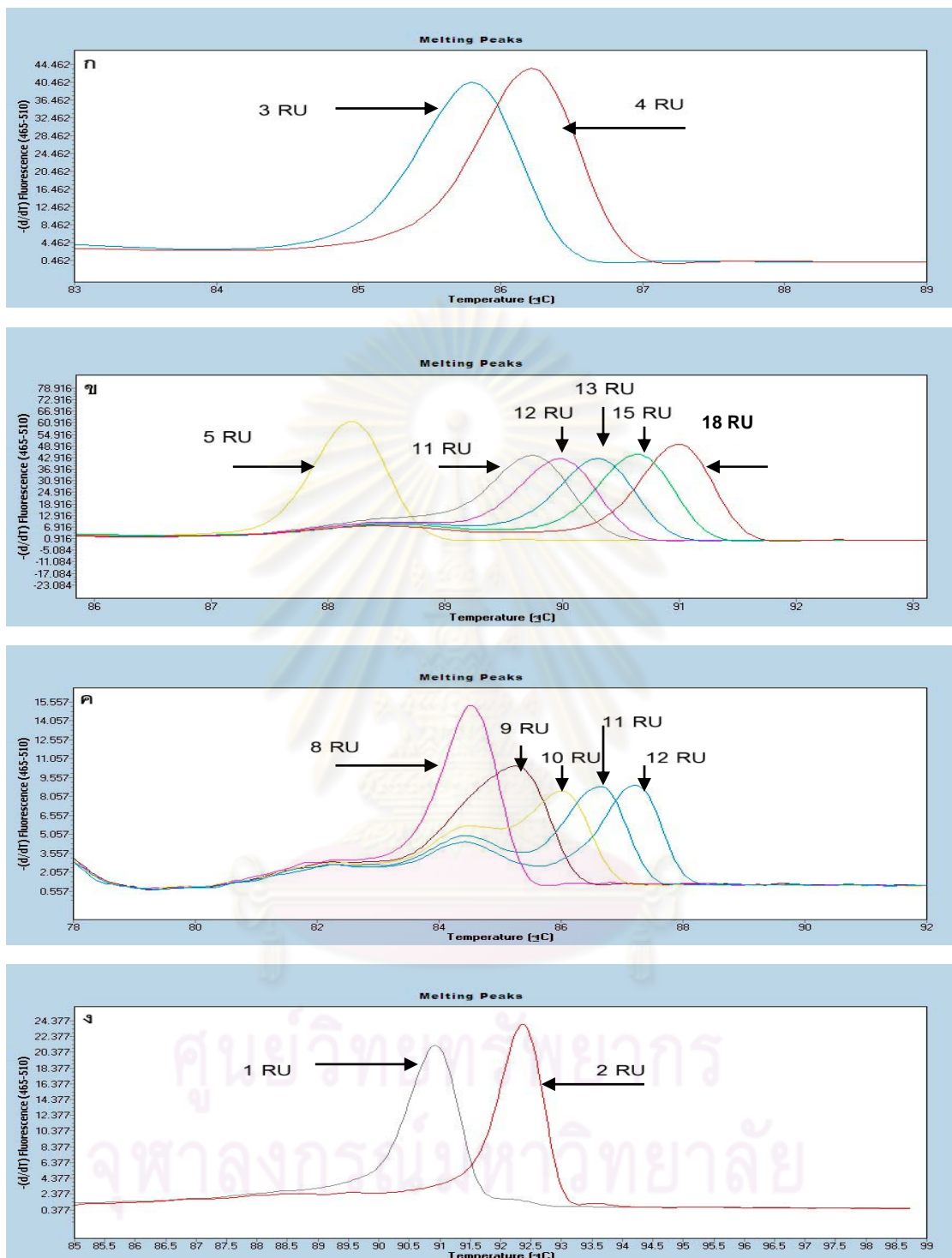
**บทที่ 4**  
**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**

**4.1 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย**

จากการทดสอบ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ซึ่งมีข้อมูล repeat units ที่ต่างกันดังตาราง 4-1 โดยวิเคราะห์ความแตกต่างในบริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM พบว่าในการทดสอบเชื้อ *S. Typhimurium* ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR 6 และ STTR3 มีความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นสอดคล้องกับความแตกต่างของ repeat units ในทุกๆ อัลลีลดังแสดงในรูป 4-1

**ตาราง 4-1** จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ *S. Typhimurium* ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE

Isolates	Repeat units			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
ST1				1
ST10		12	9	2
ST14		15	11	
ST17			8	
ST23	4	13	10	
ST27			12	
ST42	3	5		
SAP3057		11		
SAP5447		18		



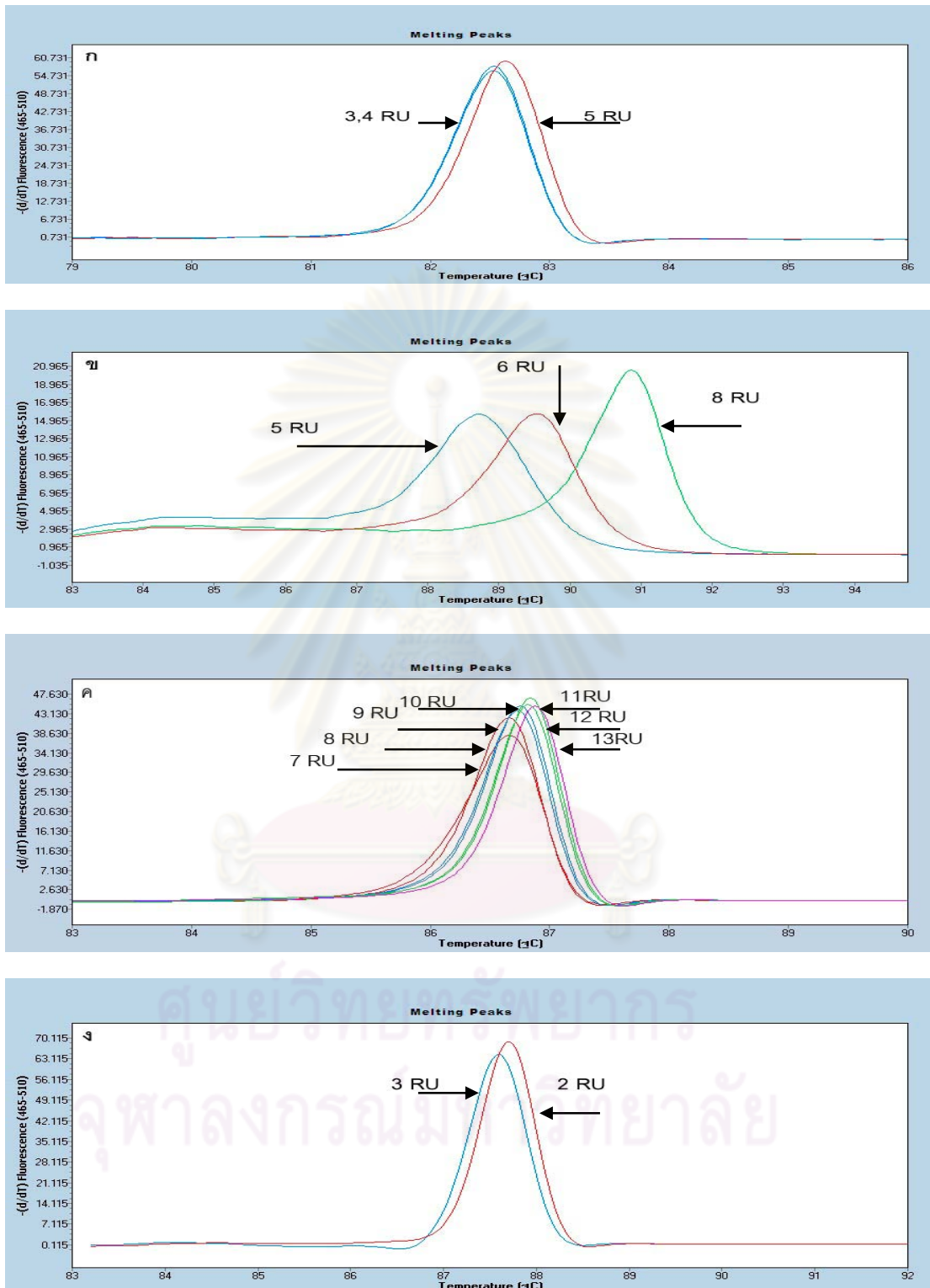
รูป 4-1 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ S. Typhimurium 9 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน กำหนดให้ ก = locus STTR9, ข = locus STTR5, ค = locus STTR6 และ ง = locus STTR3

โดยตำแหน่ง STTR9 มีความแตกต่างกัน 2 อัลลีล (3, 4 repeat units) เกิด 2 melting profile ตำแหน่ง STTR5 มีความแตกต่างกัน 6 อัลลีล (5, 11,12,13,15, 18 repeat units) เกิด 6 melting profile ตำแหน่ง STTR6 มีความแตกต่างกัน 5 อัลลีล (8, 9, 10, 11, 12 repeat units) เกิด 5 melting profile และตำแหน่ง STTR3 มีความแตกต่าง 2 อัลลีล (1, 2 repeat units) เกิด 2 melting profile

การทดสอบเชื้อ *S. Enteritidis* ซึ่งมีข้อมูล repeat units ที่ต่างกันดังตาราง 4-2 โดยวิเคราะห์ความแตกต่างในบริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ SE1, SE2, SE5 และ SE9 พบว่ามีเพียงบริเวณ VNTR ตำแหน่ง SE2 เท่านั้นที่มีความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นดังแสดงในรูป 4-2

**ตาราง 4-2** จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ *S. Enteritidis* ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE

Isolates	Repeat units			
	SE1	SE2	SE5	SE9
SAP5262	3		10	
080900035 - 2	4		11	3
080900798 - 3		5	8	
081200075 - 2	5			2
SAP2137			7	
080900796 - 1			9	
080900025 - 1			12	
SAP6090			13	
MLSE64		8		
MLSE118		6		



รูป 4-2 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ S. Enteritidis 10 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน กำหนดให้ ก = locus SE1, ข = locus SE2, ค = locus SE3 และ ง = locus SE9



ความแตกต่างของ melting profile ในตำแหน่ง SE2 ที่เกิดขึ้นนั้นสอดคล้องกับความแตกต่างของ repeat units ในทุกๆ อัลลีล โดยตำแหน่ง SE2 มีความแตกต่างกัน 3 อัลลีล (5, 6, 8 repeat units) เกิด 3 melting profile ในขณะที่ melting profile ที่ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 มีความแตกต่างของ melting profile น้อยมากไม่สอดคล้องกับความแตกต่างของ repeat units ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al. (2007) และ Ciammaruconi et al. (2009) ที่ศึกษาการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของอัลลีลอย่างรวดเร็วใน *B. anthracis* และ *Y. pestis* ตามลำดับและพบว่าไม่มีเพียงบางตำแหน่งเป้าหมายเท่านั้นที่ melting profile มีความแตกต่างกันในทุกอัลลีล

ดังนั้นการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile จึงมีความเป็นไปได้สูงในเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ให้ความแตกต่างของ melting profile ในทุกอัลลีลของทุกตำแหน่งเป้าหมาย ในขณะที่การจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในเชื้อ *S. Enteritidis* มีความเป็นไปได้เพียง 1 ตำแหน่งเป้าหมายเท่านั้นซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป ดังนั้นไอโซเลทของ *S. Typhimurium* ที่ถูกเลือกเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ทุก ไอโซเลท (ตาราง 4-1) จะถูกคัดเลือกเป็น internal control เพื่อการแปรผลค่า melting profile ไปเป็น repeat units ในการทดสอบเชื้อ *S. Typhimurium* 50 ไอโซเลทในการทดลองต่อไป สำหรับเชื้อ *S. Enteritidis* ในตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 จะถูกนำไปพัฒนาหาไพรเมอร์ใหม่เพื่อใช้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ต่อไป

#### 4.2 ผลการพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายของ *S. Enteritidis*

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1 ซึ่งพบว่าไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile ในตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ในเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วย melting profile ได้นั้น อาจเกิดจากปริมาณ GC ที่อยู่ในองค์ประกอบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เนื่องจากปริมาณ GC เป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีการตรวจสอบปริมาณ GC เบื้องต้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Tm utility (Bommarito et al., 2000) โดยปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวที่ได้จากการคำนวณดังแสดงในตาราง 4-3

ตาราง 4-3 การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งถูกเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007) ซึ่งคำนวณจากโปรแกรม Tm utility

Locus	Repeat units	Properties		
		%GC content	Length	Tm calculated
SE1	3	42.7	260	83.87
	4	42.7	267	83.91
	5	42.7	274	83.95
SE2	5	50.5	208	84.64
	6	51.2	215	87.26
	8	52.4	229	88.01
SE5	7	51.5	194	87.58
	8	51.5	200	87.64
	9	51.5	206	87.70
	10	51.4	212	87.76
	11	51.4	218	87.82
	12	51.3	224	87.87
SE9	2	54.4	329	90.17
	3	54.1	338	90.10

จากการตรวจสอบปริมาณ GC เบื้องต้นพบว่าที่ตำแหน่ง SE2 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวที่สามารถจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile ในอัลลีล 5, 6 และ 8 repeat units ด้วยเทคนิคHRM ได้นั้นมีปริมาณ GC เท่ากับ 50.5, 51.2 และ 52.4 ตามลำดับ ในขณะที่ตำแหน่ง SE1 ซึ่งมีอัลลีล 3, 4 และ 5 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 42.7 % เท่ากันทั้ง 3 อัลลีล ในตำแหน่ง SE5 ซึ่งมีอัลลีล 7 – 13 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 51.5 %, 51.4, 51.3 % ส่วนตำแหน่ง SE9 ซึ่งมีอัลลีล 2 และ 3 มีปริมาณ GC เท่ากับ

54.4 และ 54.1 % ตามลำดับ ถึงแม้ว่าค่าการหลอมเหลวที่ได้จากการคำนวณจะมีความแตกต่างจากค่าการหลอมเหลวที่ได้จากการทดลองจริงแต่สามารถทำให้ทราบถึงแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ GC ซึ่งเมื่อพิจารณาแนวโน้มของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณพบว่า ถ้ามีปริมาณ GC ต่างกันมากขึ้น แนวโน้มความแตกต่างของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอจะมีมากขึ้น ในขณะที่ถ้าปริมาณ GC เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากๆ ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของแต่ละอัลลีลจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับความแตกต่างของ melting peak ดังแสดงในภาพ 4-2 ซึ่งอุณหภูมิที่ต่างกันนั้นอาจเป็นผลมาจากจำนวนของ repeat units ที่เพิ่มเข้ามาทำให้นิวคลีโอไทด์ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีจำนวนเพิ่มขึ้นจึงทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอชิ้นนั้นมีค่าการหลอมเหลวสูงขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามพบว่าที่ตำแหน่ง SE 9 เมื่อจำนวนของ repeat units เพิ่มขึ้นค่าการหลอมเหลวกลับมีค่าลดลงซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณ GC พบว่าเมื่อ repeat units เพิ่มขึ้น ปริมาณ GC จะลดลงส่งผลให้ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอลดลงด้วย

ดังนั้นจึงได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยออกแบบให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณเพื่อการวิเคราะห์บริเวณ VNTR มีขนาดชิ้นส่วนเล็กลง เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการจำแนกของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยการออกแบบไพรเมอร์ใช้ตำแหน่ง VNTR เดิมแต่เปลี่ยนตำแหน่งของไพรเมอร์ใหม่ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่แสดงในตาราง 4-4

ตาราง 4-4 คู่ไพรเมอร์ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ *S. Enteritidis* ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ที่ออกแบบใหม่

Locus	Primer	Primer sequence (5'-3')	Product size
SE1	Forward	ccaggcaactattcgctatca	96
	Reverse	caatggcaacgagaccatc	
SE5	Forward	cgggaaaccacatcac	121
	Reverse	tgatacgcttttgacgttg	
SE9	Forward	tactgtccaccagcggtttt	96
	Reverse	tgcataccaacgatcaccac	

หลังจากได้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่แล้วนำไพรเมอร์ที่ได้ไปหาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากฐานข้อมูลของ Genbank แล้วนำมาทำนายปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Tm utility จากการตรวจสอบปริมาณ GC เบื้องต้นของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่พบว่าที่ตำแหน่ง SE1 ซึ่งมีอัลลีล 3, 4 และ 5 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 44.4 และ 44.3 % ตามลำดับ ในตำแหน่ง SE5 ซึ่งมีอัลลีล 7 – 13 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 50.5 และ 50.4 % ส่วนตำแหน่ง SE9 ซึ่งมีอัลลีล 2 และ 3 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 52.9 และ 52.1 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาแนวโน้มของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณพบว่า ถึงแม้ปริมาณ GC มีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน แต่ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของแต่ละอัลลีลมีแนวโน้มที่จะมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM melting profile ของแต่ละอัลลีลน่าจะมี ความแตกต่างกันด้วย

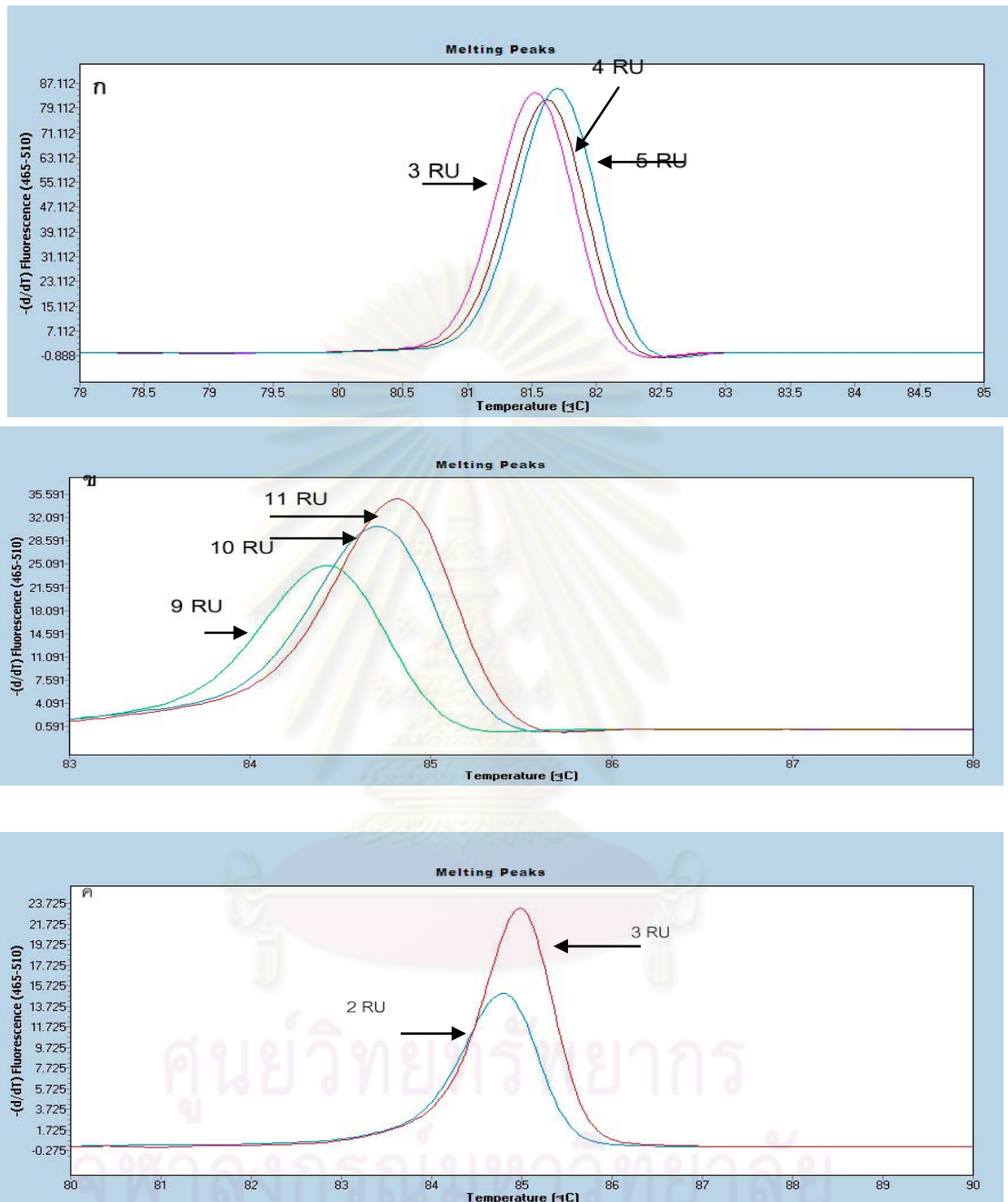
**ตาราง 4-5** การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ โดยคำนวณจากโปรแกรม Tm utility

Locus	Repeat units	Properties		
		%GC content	Length	Tm calculated
SE1	3	44.4	135	82.42
	4	44.4	142	82.56
	5	44.3	149	82.70
SE5	7	50.5	103	84.54
	8	50.5	109	84.83
	9	50.4	115	85.09
	10	50.4	121	85.32
	11	50.4	127	85.53
	12	50.4	133	85.72
SE9	2	52.9	87	85.40
	3	52.1	96	85.58

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ไปทดสอบวิเคราะห์ความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อเฉพาะ บางอัลลีลที่แตกต่างกันมาเป็นตัวแทนดังแสดงในตาราง 4-6 พบว่าไพรเมอร์คู่ใหม่ซึ่งใช้เพิ่ม ปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นลงยังคงไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ในเชื้อ S. Enteritidis ได้ดังแสดงในรูป 4-3

ตาราง 4-6 ไอโซเลทของ S. Enteritidis และ อัลลีลที่ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์ที่ ออกแบบใหม่

Isolates	Repeat units		
	SE1	SE5	SE9
SAP5262	3	10	
080900035 - 2	4	11	3
081200075 - 2	5		2
080900796 - 1		9	



รูป 4-3 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 3 ตำแหน่งของเชื้อ *S. Enteritidis* 4 ไอโซเลต ที่มี repeat units ต่างกันด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ กำหนดให้ ก = locus SE1, ข = locus SE5, ค = locus SE9

การที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ในเชื้อ *S. Enteritidis* ได้นั้นไม่สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Wittwer et al. (2003), Leiw et al. (2004) และ Seipp et al. (2009) ที่รายงานว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นได้ดีกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่และให้ melting peak ที่แยกความแตกต่างได้ชัดเจนขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ยังให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสมพอหรือชิ้นส่วนบริเวณ VNTR ที่ถูกเพิ่มปริมาณนั้นมีปริมาณ GC ในองค์ประกอบใกล้เคียงกันมากทำให้อุณหภูมิที่ต้องใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณ GC ไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวที่ส่งผลกระทบต่อค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอเนื่องจากเมื่ออุณหภูมิของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากการคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปพบว่าถึงแม้ปริมาณ GC จะมีค่าเท่ากันแต่ค่าการหลอมเหลวจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อจำนวนของ VNTR เพิ่มมากขึ้นซึ่งสนับสนุนข้อเท็จจริงที่ว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอ นอกจากจะมีปริมาณ GC แล้วยังขึ้นอยู่กับความยาวของสายดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นส่วนดีเอ็นเออีกด้วย นอกจากนี้ อาจเกิดจากประสิทธิภาพของเครื่องมือที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอต่างกันน้อยกว่า 0.4 องศาเซลเซียสได้ (Reed, Kent and Wittwer, 2007; Seipp et al., 2009)

#### 4.3 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

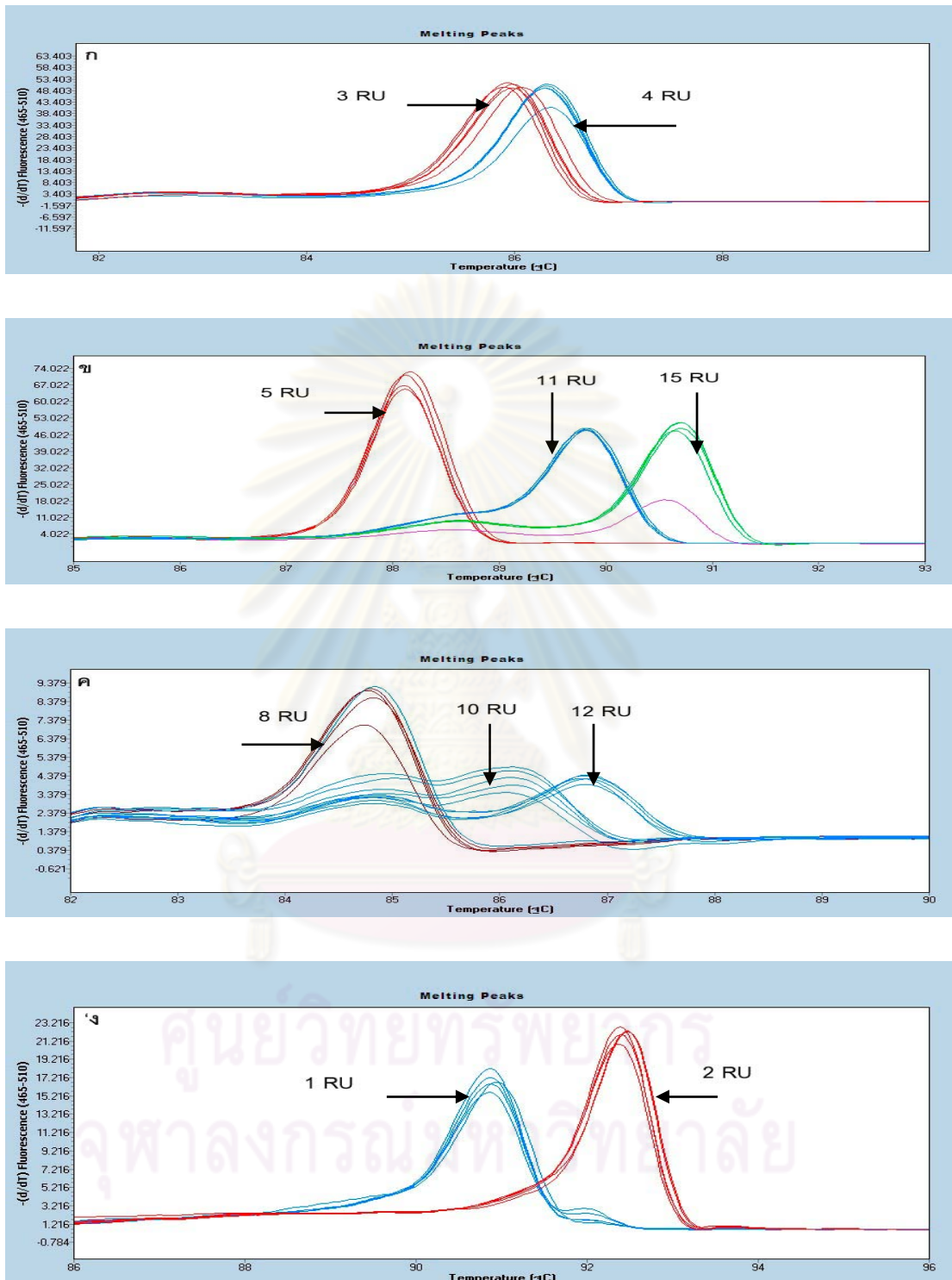
*S. Typhimurium* ถูกทดสอบบริเวณ VNTR ในทุกๆตำแหน่งเป้าหมาย (STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3) คัดเลือกไอโซเลทจากอัลลีลต่างๆในตำแหน่งเป้าหมายทั้ง 4 ตำแหน่งตำแหน่งละ 2 อัลลีล ดังแสดงในตาราง 4-7 เพื่อเป็นตัวแทนอัลลีลอื่นๆ ประเมินความแม่นยำของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ พบว่ามีความแตกต่างของ melting profile ของแต่ละ repeat units ที่ใช้ในการทดสอบเกิดขึ้นดังแสดงในรูป 4-4

ตาราง 4-7 ไอโซเลทของ *S. Typhimurium* และ repeat units ซึ่งถูกนำมาทดสอบการประเมินความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกัน (repeatability)

Isolates	Repeat units			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
ST1				1
ST10				2
ST14		15		
ST17			8	
ST23	4		10	
ST27			12	
ST42	3	5		
SAP3057		11		

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





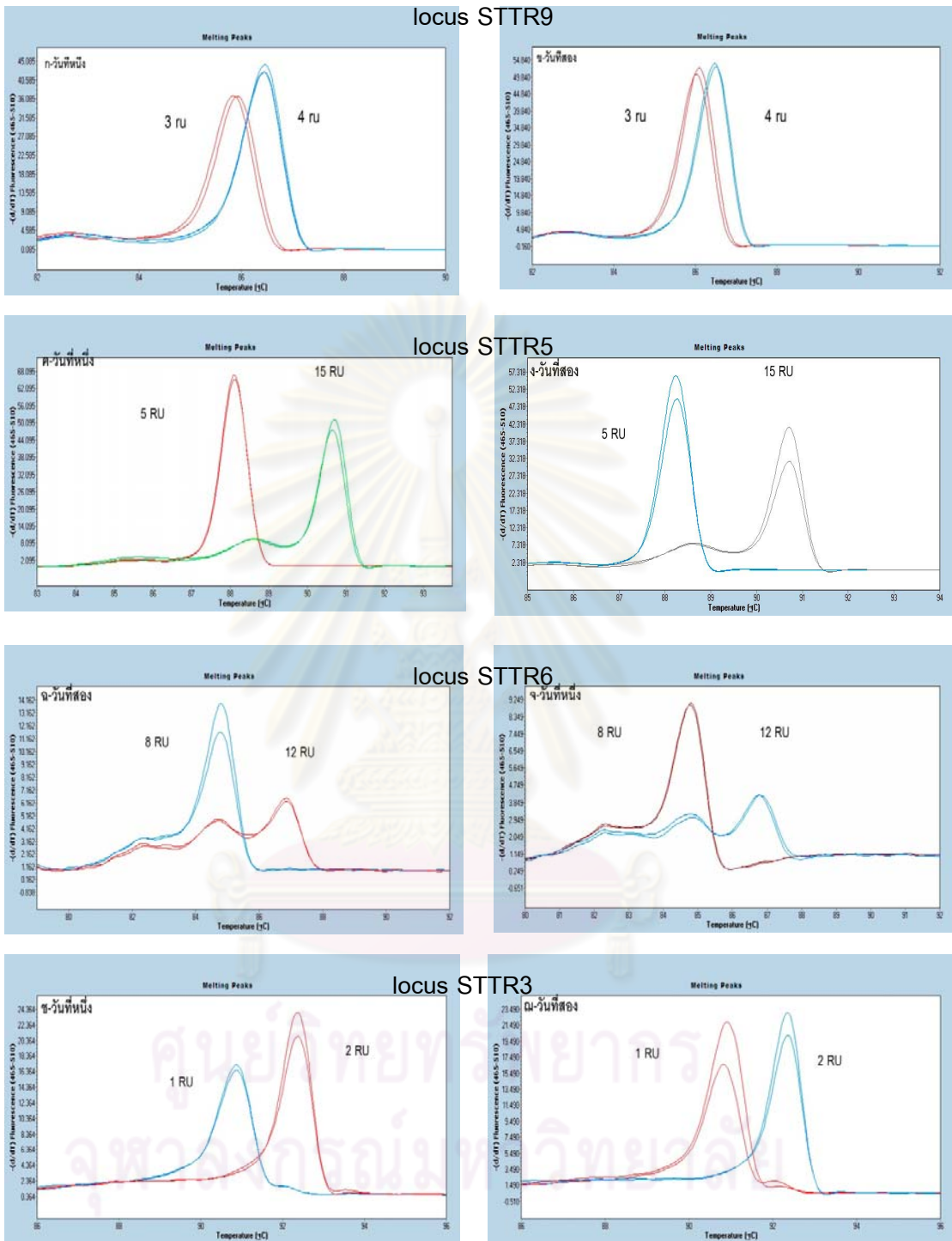
รูป 4-4 Derivative melting plot ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของ *S. Typhimurium* ในการทดสอบ repeatability

กำหนดให้ ก = locus STTR9, ข = locus STTR5, ค = locus STTR6 และ ง = locus STTR3

โดยในตำแหน่ง STTR9 ทดสอบ 2 อัลลีล (3, 4 repeat units) เกิด 2 melting profile ตำแหน่ง STTR5 ทดสอบ 3 อัลลีล (5, 11, 15 repeat units) เกิด 3 melting profile ตำแหน่ง STTR6 ทดสอบ 3 อัลลีล (8, 10, 12 repeat units) เกิด 3 melting profile และตำแหน่ง STTR3 ทดสอบ 2 อัลลีล (1, 2 repeat units) เกิด 2 melting profile โดยตัวอย่างทั้ง 5 ซ้ำของแต่ละอัลลีล ในตำแหน่งทั้ง 4 ตำแหน่ง มีรูปร่างของ melting peak ใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้อย่างถูกต้อง

ผลการทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) เมื่อพิจารณา melting profile ของวันที่ทำการทดลองวันที่หนึ่งเปรียบเทียบกับวันที่ทำการทดลองวันที่สอง พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของ melting profile ได้ถูกต้องสอดคล้องกับจำนวน repeat units ในทุกอัลลีลที่ถูกคัดเลือกมา โดยที่ตำแหน่ง STTR9 melting peak มีความแตกต่างกัน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มี repeat units เท่ากับ 3 และ 4 ตามลำดับทั้งในวันที่หนึ่งและวันที่สอง และเมื่อพิจารณา melting peak ของแต่ละกลุ่มตัวอย่างทั้งสามซ้ำในวันที่ทำการทดลองทั้งสองวัน พบว่ามีลักษณะรูปร่างของ melting peak ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูป 4-6 และผลการทดสอบในตำแหน่ง STTR5, STTR6 และ STTR3 เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทดสอบที่ตำแหน่ง STTR9

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูป 4-5 Derivative melting plot ของการทดสอบ reproducibility ของเทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM ในเชื้อ *S. Typhimurium* กำหนดให้ ก, ข = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR9 วันทดสอบวันที่หนึ่งและวันที่สองตามลำดับ ←, ง = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR5 วันทดสอบวันที่หนึ่งและวันที่สองตามลำดับ จ, ฉ = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR6 และช, ฉ = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR3 วันทดสอบวันที่หนึ่งและวันที่สองตามลำดับ

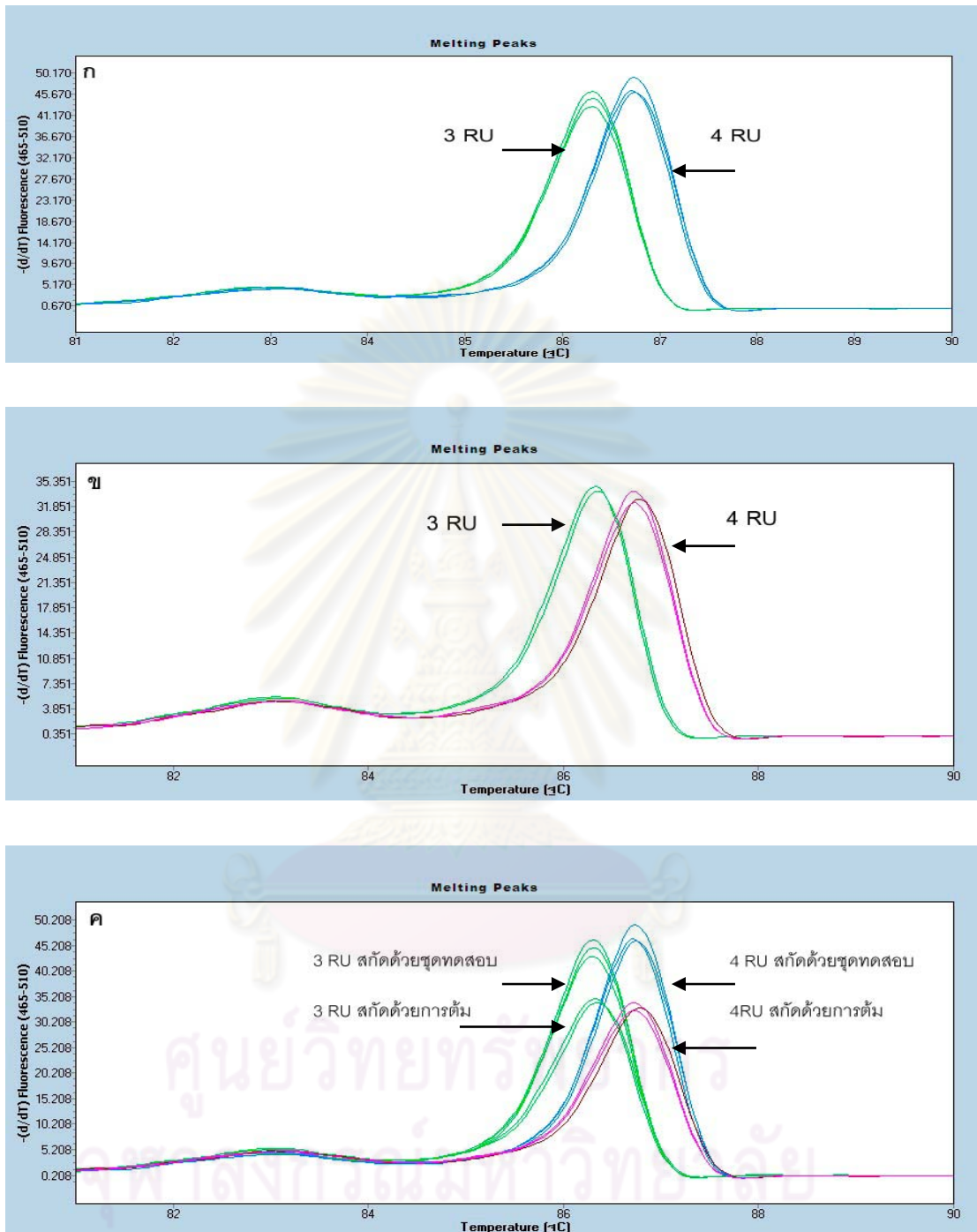


ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จึงมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ซ้ำทั้งในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) และการทดลองในวันที่ต่างกัน (reproducibility) สอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al. (2007) และ Ciammaruconi et al. (2009) ที่พบว่าเทคนิค HRM วิเคราะห์ความแตกต่างของอัลลีลในตำแหน่งเป้าหมายของ *B. anthracis* และ *Y. pestis* ซ้ำได้ทั้งในสภาวะการทดลองครั้งเดียวกันและการทดลองในวันที่ต่างกัน

ผลการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness) โดยเลือกทดสอบเชื้อ *S. Typhimurium* บริเวณ VNTR ตำแหน่ง STTR9 ซึ่งมี 2 อัลลีล ได้แก่ 3 และ 4 repeat units ตามลำดับ พบว่าการใช้ดีเอ็นเอซึ่งถูกสกัดด้วยชุดทดสอบและสกัดด้วยการต้มเป็นตัวอย่างที่ดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จะให้ผลของ melting peak ที่มีรูปร่างคล้ายคลึงกันและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันดังแสดงในรูป 4-6

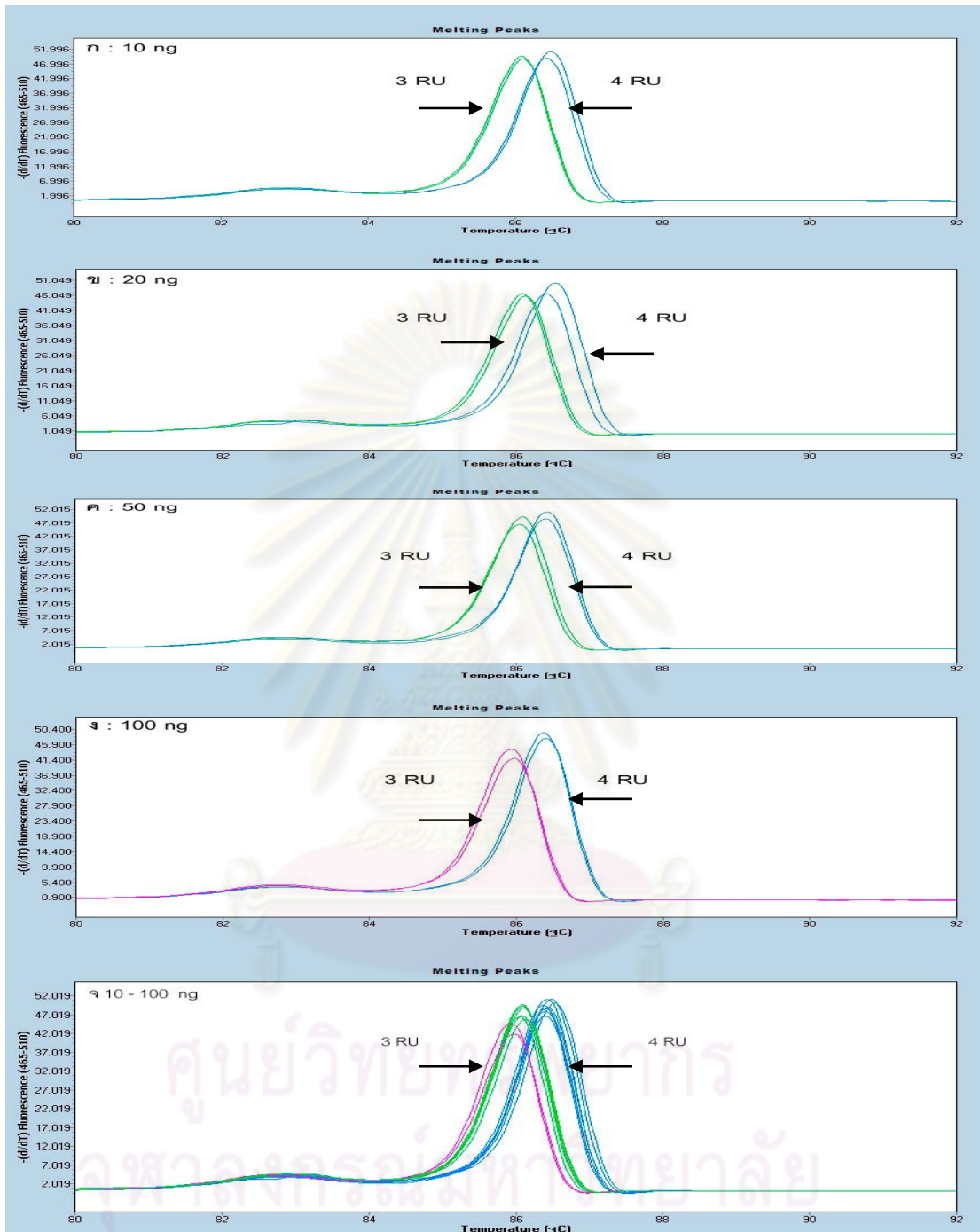
เมื่อพิจารณาการแปรระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมพบว่าในการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในแต่ละระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอนั้นพบว่าเกิด melting profile ที่แตกต่างกัน 2 กลุ่มสอดคล้องกับจำนวน repeat units 3 และ 4 repeat units อย่างถูกต้องในทุกระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอทุกระดับพร้อมกันพบว่า melting peak จะถูกจัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่มของอัลลีล 3 และ 4 repeat units แต่พบว่า melting peak ที่ระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมที่ 3 repeat units จะมีการเลื่อนออกจากกลุ่มไปเล็กน้อยแต่ไม่ส่งผลต่อการแปรผลแต่อย่างใดดังแสดงในรูป 4-7

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูป 4-6** Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STTR9 โดยการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอซึ่งมาจากวิธีการสกัดด้วยชุดทดสอบและการต้ม

กำหนดให้ ก : melting peak ซึ่งเกิดจากการวิเคราะห์ VNTR ด้วยดีเอ็นเอสกัดด้วยชุดทดสอบ, ข : melting peak ซึ่งเกิดจากการวิเคราะห์ VNTR ด้วยดีเอ็นเอสกัดด้วยการต้ม และ ค : melting peak ซึ่งเกิดจากการวิเคราะห์ VNTR ด้วยดีเอ็นเอสกัดด้วยชุดทดสอบและการต้มร่วมกัน



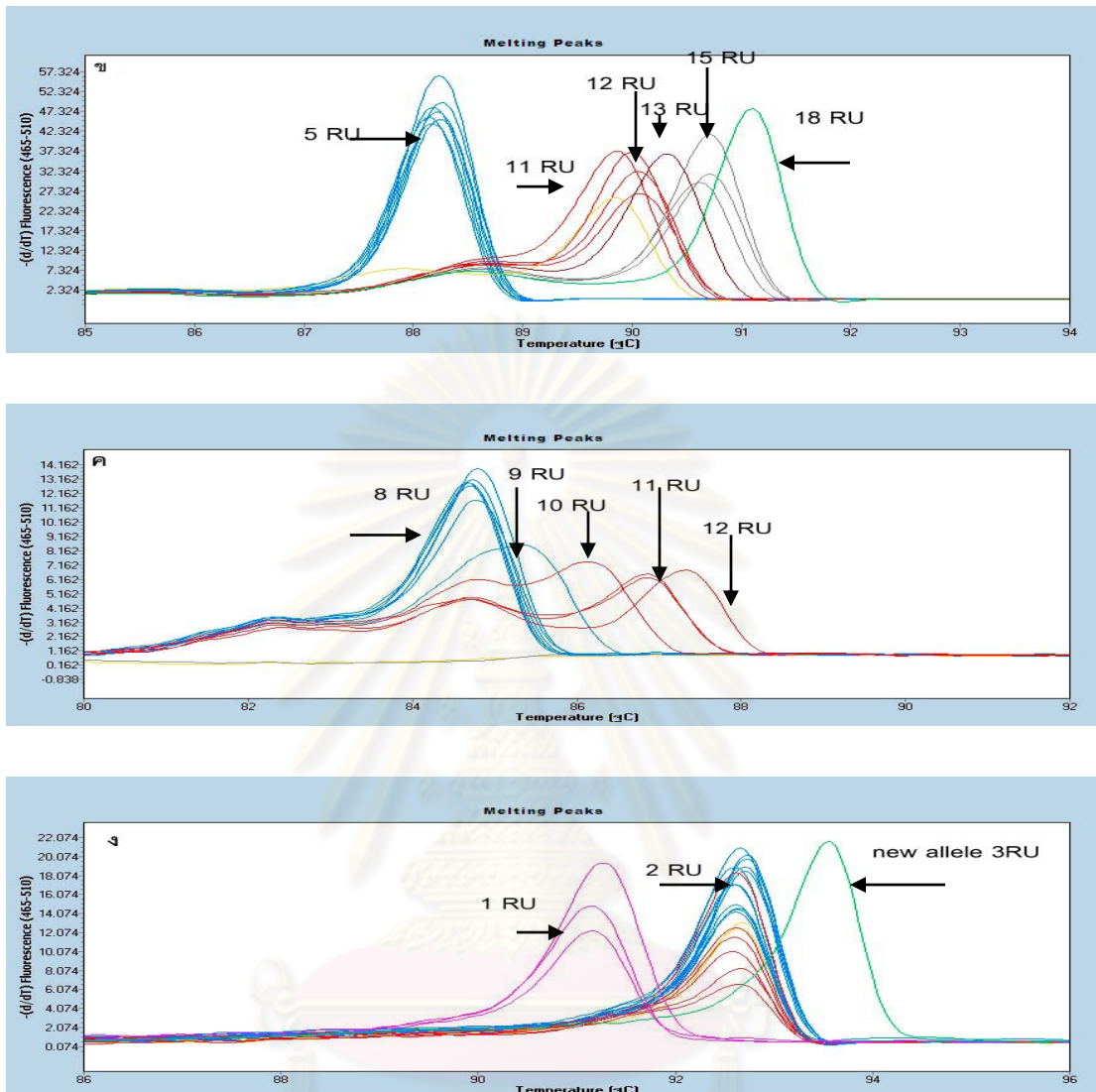
รูป4-7 Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STR9 โดยแปรระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 10 -100 นาโนกรัม

กำหนดให้ ก : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 10 นาโนกรัม, ข : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 20 นาโนกรัม, ค : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 50 นาโนกรัม, ง : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 100 นาโนกรัม และ จ : ความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งแต่ระดับ 10 – 100 นาโนกรัม

การทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบและการต้มส่งผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอในด้านของความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ทำให้สัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ในขณะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งได้จากการต้มมีสัญญาณสีที่ต่ำกว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งได้จากการสกัดด้วยชุดทดสอบ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดทั้งสองวิธีไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ซ้ำด้วยเทคนิค HRM สอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al. (2007) ซึ่งพบว่า melting peak ที่เกิดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM โดยใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากชุดทดสอบและการสกัดด้วยวิธีการต้มสามารถวิเคราะห์ซ้ำได้ ในขณะที่ผลการทดสอบการแปรระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอพบว่าระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ส่งผลต่อการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอในระดับ 10 – 50 นาโนกรัมเป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al (2007) และ Ciammaruconi et al.(2009) ที่รายงานว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอในระดับที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ในเชื้อ *B. anthracis* และ *Y. pestis* ด้วยเทคนิค HRM อยู่ในช่วง 20 – 40 และ 3- 50 นาโนกรัมตามลำดับ

#### 4.4 ผลการเปรียบเทียบผลของการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ในการจำแนกความแตกต่างของอัลลีลใน VNTR ด้วย melting profile โดยแปรผล repeat units จาก melting peak ของตัวอย่างที่ตรงกับ melting peak ของ internal control ดังแสดงในรูป 4-8 จากนั้นนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE พบว่าไม่มีความแตกต่างของการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ดังแสดงในตาราง 4-8



รูป 4-8 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 ไอโซเลต

กำหนดให้ ก = locus STTR9, ข = locus STTR5, ค = locus STTR6, ง = locus STTR3



ตาราง 4-8 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ของ S. Typhimurium

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE				Allelic variants analyzed by MLVA with HRM			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
STTR 01	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 02	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 03	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 04	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 05	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 06	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 07	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 08	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 09	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 10	3	12	9	2	3	12	9	2
STTR 11	3	13	8	2	3	13	8	2
STTR 14	4	15	11	2	4	15	11	2

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE				Allelic variants analyzed by MLVA with HRM			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
STTR 15	4	13	10	2	4	13	10	2
STTR 16	4	15	11	2	4	15	11	2
STTR 17	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 18	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 23	4	13	10	2	4	13	10	2
STTR 24	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 25	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 26	4	15	12	2	4	15	12	2
STTR 27	4	15	12	2	4	15	12	2
STTR 29	3	13	8	2	3	13	8	2
STTR 31	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 32	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 33	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 35	3	12	8	2	3	12	8	2

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE				Allelic variants analyzed by MLVA with HRM			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
STTR 37	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 38	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 42	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 21194/08	3	12	9	2	3	12	9	2
SAP 00433/09	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 00444/09	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 00445/09	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 00564/09	4	15	12	2	4	15	12	2
SAP 01571/09	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP 03057/09	3	11	8	2	3	11	8	2
SAP4202	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP4282	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP4570	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP4572	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP5447	3	18	8	1	3	18	8	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE				Allelic variants analyzed by MLVA with HRM			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
SAP6077	3	11	8	2	3	11	8	2
SAP9184/09	3	12	8	2	3	12	8	2
MLST12	4	13	10	2	4	13	10	2
MLST13	4	13	10	2	4	13	10	2
MLST23	3	13	8	2	3	13	8	2
MLST24	3	13	8	2	3	13	8	2
MLST33	4	13	10	2	4	13	10	2
ATCC13311	3	18	8	1	3	18	8	1
DMST17242	3	15	10	3	3	15	10	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การจำแนกความแตกต่างของ *S. Typhimurium* และ *Enteritidis* ในระดับซัปซีโรวาร์ ด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลภายหลังจากการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ยังคงได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยมีเป้าหมายเพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาและนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการด้านความปลอดภัยของอาหาร (Foley et al, 2009; Wiedmann and Nightingale, 2009) ดังนั้นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเออย่างเทคนิค HRM จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค MLVA เพื่อจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ด้วย melting profile

เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ใน *S. Typhimurium* โดยสามารถจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ได้ทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมาย ได้แก่ STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 โดยให้ melting profile ต่างกันในทุกอัลลีล แต่สำหรับเชื้อ *S. Enteritidis* พบความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นเพียง 1 ตำแหน่งเป้าหมายเท่านั้น ได้แก่ตำแหน่ง SE2 ส่วนอีก 3 ตำแหน่งเป้าหมายที่เหลือ ได้แก่ SE1, SE5 และ SE9 ไม่พบความแตกต่างของ melting profile หรือความแตกต่างของ melting profile ไม่เกิดขึ้นในทุกอัลลีล เมื่อพัฒนาเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ในการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ใน 3 ตำแหน่งเป้าหมาย ได้แก่ SE1, SE5 และ SE9 ใน *S. Enteritidis* โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นลงพบว่าเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ได้

การประเมินความแม่นยำ (precision) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยพิจารณาจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) และการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ย่างกัน (reproducibility) ดำเนินการทดสอบกับเชื้อ *S. Typhimurium* เท่านั้นเนื่องจากการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในเชื้อ *S. Enteritidis* ทำได้เพียง 1 ตำแหน่งซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปทดลองต่อ โดยพบว่าเทคนิค HRM สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ใน *S. Typhimurium* ซ้ำได้ทุกอัลลีลทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมายและการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA

ร่วมกับเทคนิค HRM พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบและการต้ม และความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ซ้ำของเทคนิค HRM

การเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยวิเคราะห์บริเวณ VNTR ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 ไอโซเลท พบว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างของ VNTR ด้วย melting profile ได้ทั้ง 50 ไอโซเลทที่ใช้ทดสอบ การแปรผล repeat units จาก melting peak ของตัวอย่างที่ตรงกับ melting peak ของ internal control ให้ผลของ repeat units ตรงกับผลของ repeat units ซึ่งได้จากกรวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE ทั้ง 50 ตัวอย่าง

ดังนั้นการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM มาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในตำแหน่งเป้าหมายจึงมีความเป็นไปได้สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อ *S. Typhimurium* ที่การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างได้ในทุกอัลลีลและทุกตำแหน่งเป้าหมาย แต่สำหรับ *S. Enteritidis* จำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิค HRM ในแนวทางอื่นนอกเหนือจากการปรับปรุงให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลง เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย SE1, SE5 และ SE9 ต่อไป โดยอาจปรับปรุงเทคนิคด้วยการใช้วิธี GC clamp ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ GC จำนวนมากเข้าไปที่บริเวณไพรเมอร์เพื่อให้ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันมากขึ้นหรือทำให้รูปแบบของ melting domain เปลี่ยนแปลงไป หรือหาบริเวณ VNTR ตำแหน่งเป้าหมายใหม่ที่สามารถใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR จาก melting profile ได้ เนื่องจากการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ได้เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาหรือการจัดการด้านความปลอดภัยของอาหาร

ถึงแม้ว่าการนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เช่น เทคนิค MLVA ไปจำแนกความแตกต่างของ *Salmonella* ในระดับซัพซี้โรวาริในทางปฏิบัติเพื่อแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของ *Salmonella* หรือการศึกษาทางระบาดวิทยาในโรงงานอุตสาหกรรมจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้นเนื่องจากเครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาสูงและต้องวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามการจำแนก *Salmonella* ลงไปในระดับซัพซี้โรวารินั้นจะทำให้สามารถจัดการแหล่งกำเนิดของการปนเปื้อน *Salmonella* ได้ถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การมีฐานข้อมูลใน

ระดับซีโรวาร์ของ *Salmonella* อาจเป็นแหล่งข้อมูลสำคัญในการตอบข้อโต้แย้งกับผู้ค้าเมื่อเกิดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในสินค้าได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ชวลีพร ศักดิ์สง่างาม, นิตยา ชะนะญาติ, ภาวิน ผดุงทศ และณัฐกานต์ อภัยวานนท์. การสำรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในไข่ เขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่. สัตวแพทยสาร 59 (เมษายน - สิงหาคม 2551): 38-46.
- ธีระ ยิ้มอยู่. The importance of bacteriophages. [ออนไลน์]. 2547. แหล่งที่มา: <http://micro.sci.ku.ac.th/fscicvk/virologyreport2547/> [2010, June 22]
- ปฐมาพร เอมะวิศิษฐ์, วิชัย ศุภสินธุ์, อรุณ บ่างตระกูลนนท์และวิษณุ บุญญาวิวัฒน์. การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อและการศึกษาระบาดวิทยาของ *S. Typhimurium* multidrug-resistant DT104 ในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการผลิตผลจากสัตว์. (2546): 1-20.
- พรเพ็ญ พัฒนโสภณ, วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ และศศิ เจริญพจน์. ความชุก ซีโรวาร และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากฟาร์มไก่และสุกรในเขตภาคกลาง. สัตวแพทยสาร 58 (สิงหาคม 2550): 49-63.
- เพ็ญนภา มัชฌิมพงศ์. การลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาในโรงฆ่าสัตว์ปีก. [ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: <http://www.dld.go.th/certify/certify/page/article/article/html> [2553, มิถุนายน 20]
- รวงผึ้ง สุทเธนทร์. การวินิจฉัยโรคติดเชื้อด้วยอณูชีววิทยา. [ออนไลน์]. 2545. แหล่งที่มา: <http://www.nhrbc.org/paper15.4.html> [2553, มิถุนายน 21]
- วีถัน บัณฑิตย์. Capillary zone electrophoresis. [ออนไลน์]. 2548. แหล่งที่มา: [http://e-service.agri.cmu.ac.th/course/course\\_lecture\\_download.asp?CourseNO=35970&CID=800](http://e-service.agri.cmu.ac.th/course/course_lecture_download.asp?CourseNO=35970&CID=800) capillary gel electrophoresis [2553, มิถุนายน 25]
- สุมนททา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 2545.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552.
- อนุชา มุมอ่อน, วสันต์ เคยเหล่า และสุदारัตน์ เคยเหล่า. แนวทางการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาในขั้นตอนการผลิตเนื้อไก่ในโรงฆ่าและชำแหละไก่เพื่อการส่งออก. [ออนไลน์]. 2550.



แหล่งที่มา: <http://www.dld.go.th/certify/certify/page/article/article.html> [2553, มิถุนายน 20]  
 อมรรัตน์ ชอบกัตต์ญญ. โรคอาหารเป็นพิษ. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2552. (2552): 117-124.  
 อรุณ ป่างตระกุลนนท์, สุเมณฑา วัฒนสินธุ์ และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์. โรคซัลโมเนลโลซิส.  
 [Online]. ม.ป.ป. แหล่งที่มา : [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nith/.../](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nith/.../Salmonella1.pdf)  
 Salmonella1.pdf.

### ภาษาอังกฤษ

Aarts, H.J.M., Lith, L.A.J.T.V. and Keijer, J. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. Letters in Applied Microbiology 26(February 1998): 131-135.

Altwegg M., Hickman-Brenner, FW., and Farmer, JJ. 3<sup>rd</sup> Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella* typhi strains. Journal of Infectious Diseases 160(July 1989) : 145-149.

Amonrattana Roobthaisong. Comparison of salmo-dot bacterial culture and PCR for detection of *Salmonella* spp. in food samples. Master's Thesis, Department of Tropical medicine, Graduate School, Mahidol University, 2006.

Anderson, E.S. and Williams, R.E.O. Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. Journal of Clinical Pathology 9 (May 1956): 94-127.

Anderson, E.S., Ward, L.R., De Saxe, M.J. and De Sa, J.D.H. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* typhimurium. Journal of Hygiene 78(April 1977): 297-300.

Belkum, A.V. Newer methods for bacterial strain typing. Clinical Microbiology Newsletter 30 (May 2008): 63-68.

Boxrud, D., et al. Comparison of multiple-locus variable number of tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. Journal of Clinical Microbiology 45(February 2006): 536-543.

- Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary foodnet data on the incident of infection with pathogens transmitted commonly through food ---10 States. Morbidity and Mortality Weekly Report. 58 (April 2009): 333-337.
- Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, Sasipreeyajan, J., and Svenson, S.B. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 29 (November 2000): 221-225..
- Ciammaruconi, A., et al. A rapid allele variant discrimination method for *Yersinia pestis* strains based on high-resolution melting curve analysis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 65(September 2009): 7-13.
- Corbett Research. HRM assay design and analysis. [Online]. 2006. Available from: <http://hrm.gene-quantification.info/> [2010, June 25]
- Desroy, N. et al. Towards gram-negative antivirulence drugs: new inhibitors of HldE kinase. Bioorganic and Medical Chemistry 17(2009): 1276-1289.
- Ellermeier, C.D and Slauch, J.M. The Genus *Salmonella*. The Prokaryotes, 123-158. Singapore: Springerlink science and business, 2006.
- Erali, M., Voelkerding, K.V and Witter, C.T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine . Experimental and Molecular Pathology 85(August 2008): 50-58.
- Erali, M., Pounder, J.I., Woods, G.L., Petti, C.A and Witter, C.TI. Multiplex single-color PCR with amplicon melting analysis for identification of *Aspergillus* species. Clinical Chemistry 52(June 2006): 1143-1145.
- European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zooness and Zoonotic Agent in The European Union in 2008. The EFSA Journal 8(July 2010): 1 – 261.
- Fakhr, M.K., Nolan, L.K and Logue, C.M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Journal of Clinical Microbiology 43(May 2005): 2215-2219.

- Foley, S.L., Lynne, A. M. and Nayak, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infection, Genetics and Evolution 9 (July 2009): 430-440.
- Fortini, D., et al. Optimization of High-Resolution Melting Analysis for Low-cost and Rapid Screening of Allelic Variants of *Bacillus anthracis* by Multiple-Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis. Clinical Chemistry 53 (July 2007): 1377-1380.
- Grimont, P.A.D. and Weill, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9 editions. France: Institute Pasteur, 2007.
- Hancock, J.F. Plant evolution and the origin of crop species. USA, New Jersey: Prentice Hall, Inc, 1992.
- Häusler, T. *Salmonella* Typhimurium bacterium with multiple flagella. [Online]. 2007. Available from: <http://www.bacteriophagetherapy.info/ECF40946-8E2F-4890-9CA6-D390A26E39C1/455EEAE8-3AD1-4235-8055-D76B15DC24A6.html> [2010, July 15]
- Infectious Disease of Surveillance Center. Salmonellosis in Japan as of June 2009. Infectious Agents Surveillance Report. 30(August 2009): 203-204.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Salmonella* Microorganisms in Foods 5. New York: Blackie Academic & Professional, 1996.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., and Golden, D.A. Modern food microbiology. 7<sup>ed</sup>. Food science text series. USA, NY: Springer Science + Business Media, Inc, 2005.
- Jeffery, N., Gasser, R.B., Steer, P., and Noormohammadi, A.H. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. Microbiology 153 (August 2007): 2679-2688.
- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Kreger, A., Morris, J.G and Jr&Sulakvelidze, A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. Journal of Clinical Microbiology 40(May 2002): 1626-1635.

- Kunkel, D. *Salmonella* Typhimurium. [Online]. 2004. Available from [http://www.dennis-kunkel.com/product\\_info.php?products\\_id=502](http://www.dennis-kunkel.com/product_info.php?products_id=502) [2010, July 15]
- Lindquist, J. *Salmonella*-general aspects and nomenclature. [Online]. 2006. Available from: <http://www.splammo.net/bact102/102xsal.html> [2010, July 15]
- Lindstedt, B.A., Heir, E., Vardund, T., and Kapperud, G. Fluorescent amplified – fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of Clinical Microbiology* 38(April 2000): 1623-1627.
- Lindstedt, B.A., Heir, E., Gjernes, E. and Kapperud, G. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *Journal of Clinical Microbiology* 41(April 2003): 1469-1479.
- McClelland et al., Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 25(October 2001): 852-856.
- Mead, P.S., et al. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5 (September - - October 1999): 607 – 625.
- Millemann, Y., Gaubert, S., Remy, D. and Colmin, C. Evaluation of IS200 – PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (June 2000): 2204-2209.
- Murase, T., et al. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infection. *Microbiology and Immunology* 39 (1995): 673-676.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. and Tenover, M.A. *Medical microbiology*. 4th ed. United States of America: Harcourt health sciences, 2002.
- National *Salmonella* Reference Laboratory. Phage typing. [Online]. (n.d.). Available from : [http://www.nuigalway.ie/research/salmonella\\_lab/phage\\_typing.html](http://www.nuigalway.ie/research/salmonella_lab/phage_typing.html) [2010, June 21]

- New Zealand Food Safety Authority. Microbial Pathogen Data Sheets: NON-TYPHOID SALMONELLAE [online]. 2001. Available from: [http:// www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-typhoid-salmonellae.pdf](http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-typhoid-salmonellae.pdf) [2010, June 15]
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C. and On, S.L.W. Evaluation of phenotypic and genotypic method for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from human, poultry and cattle. Journal of Clinical Microbiology 38(October 2000): 3800-3810.
- Norambuena, P.A., et al. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. Clinical biochemistry 42(August 2009): 1308-1316.
- Olsen, J.E., Brown, D.J., Baggesen, D.L. and Bisgaard, M. Biochemical and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype berta and comparison of methods for typing. Epidemiology and Infection 108(April 1992): 243-260.
- Reed, G.H., Kent, J.O.K and Wittwer, C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics 8 (June 2007): 597-608.
- Sarita Raengpradub. Microbial identification: tracking the great unknown with innovative and advanced technologies. [Online]. 2009. Available from: <http://www.jala.com/publicat.php> [2010, June 25]
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. Separation of yeast chromosome – sized DNAs by Pulsed Field Gel Electrophoresis. Cell 37 (May 1984): 67-75.
- Silver, L.M. Mouse genetics: concepts and application. [Online]. (1995). Available from: <http://www.informatics.jax.org/silver/figures/figure8-9.shtml> [2010, July 2]
- Seipp, M.T., Durtschi, J.D., Voelkerding, K.V., and Wittwer, C.T. Multiplex amplicon genotyping by high-resolution melting. Journal of Biomolecular Techniques 20 (2009): 160-164.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D. and Goering, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A

- review for healthcare epidemiologists. Infection control and Hospital epidemiology 18(June 1997): 426-439.
- Threlfall, E.J., Torre, E., Ward, L.R., Davalos-Perez, A., Rowe, B. and Gibert, I. Insertion sequence IS200 fingerprinting of *Salmonella* typhi: an assessment of epidemiological applicability. Epidemiology and Infection 112(April 1994): 253-261.
- Todar, K. Salmonella and Salmonellosis. [online]. 2008. Available from: <http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html> [2010, June 15]
- Tompkins, L.S., Troup, N., Labigne-Roussel, A. and Cohen, M.L. Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. Journal of Infection Disease 154(July 1986): 156-162.
- Torpdahl, M., Skov, M.N., Sandvang, D. and Baggesen, D.L. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed – field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. Journal of Microbiological Methods 63 (November 2005): 173-184.
- University of Oslo. AFLP of the *Bacillus cereus* group. [Online]. (n.d.). Available from: [http://mlstoslo.uio.no/cgi-bin/mlstodb/mlstodbnet3.pl?dbase=general&page=aflp-general&file=bcereusgrp\\_isolates.xml](http://mlstoslo.uio.no/cgi-bin/mlstodb/mlstodbnet3.pl?dbase=general&page=aflp-general&file=bcereusgrp_isolates.xml) [2010, June 25]
- Urwin, R. and Maiden, M.C. Multi – locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiology 11 (October 2003): 479-487.
- Versalovic, J., Koeuth, T and Lupski, JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 19 (December 1991): 6823-6831.
- Wiedmann, M. and Nightingale, K. DNA-based subtyping methods facilitate identification of foodborne pathogens. Food Technology 4 (2009): 44-49.
- Wittwer, C.T. High-resolution melting analysis: advancement and limitations. Human mutation 6(June 2009) : 857-859.

- Wittwer, C.T., Rasmussen, R.P and Ririe, K.M. Rapid PCR and melting analysis. BustinSA, editor, The PCR revolution, 48-69. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
- World Health Organization. WHO global strategy for food safety: safer food for better health. Food safety issues. [Online]. 2002. Available from: [http://www.who.int/foodsafety/publication/general/global\\_strategy/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publication/general/global_strategy/en/index.html) [2010, July 15]
- Yan, S.S., Pendrak, M.L., Abela-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P. and Foley, S.L. An Overview of *Salmonella* typing Public Health perspectives. Clinical and Applied Immunology Reviews 4 (2003): 189-204.
- Zheng, J., Keys, C.E., Zhao, S., Meng, J. and Brown, E.W. Enhanced subtyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. Emerging Infectious Diseases 13(2007): 1932-1935.
- Zhu, L. Capillary and microchip gel electrophoresis using multiplexed fluorescence detection with both time-resolved and spectral-discrimination capabilities: applications in DNA sequencing using near-infrared fluorescence. Dissertation, Department of Chemistry, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College Nankai University. 2005.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 1.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

1.1.1 ชั่ง Tryptic Soy Broth 4.5 กรัม

1.1.2 เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 150 มิลลิลิตร

1.1.3 นำสารละลายไปสเตอริไลซ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

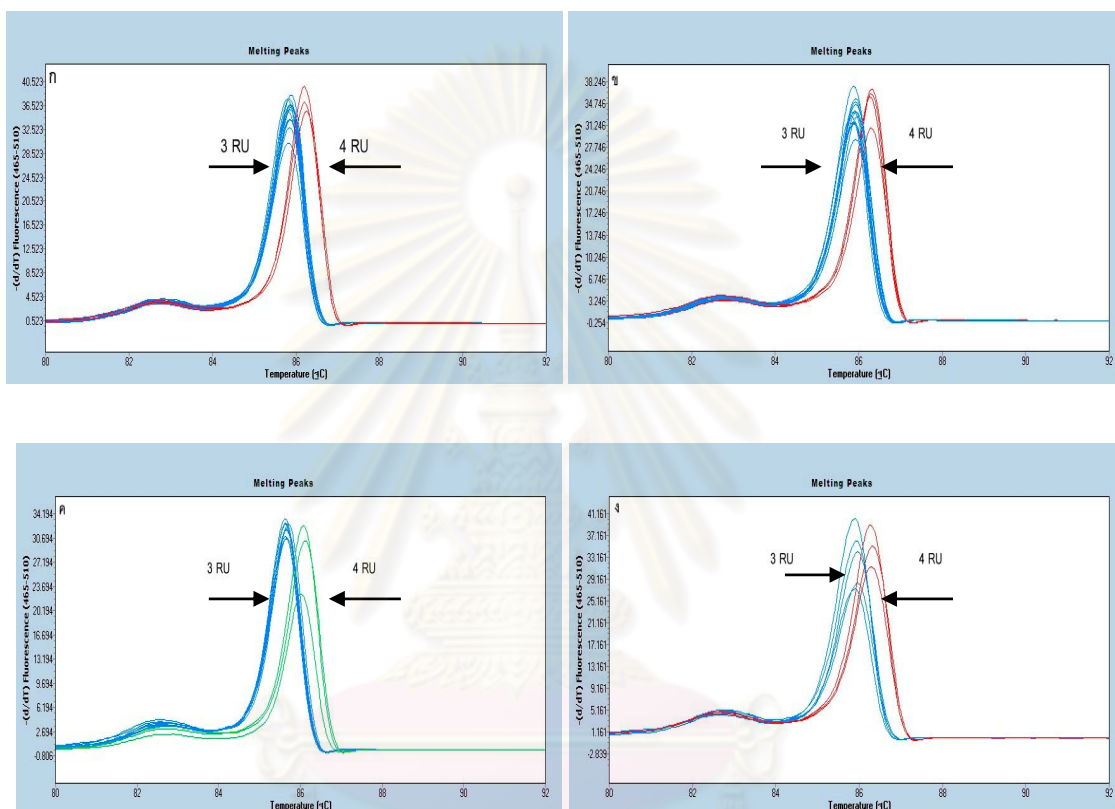
1.1.4 ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2. Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ S. Typhimurium

ภาพ ภ.1 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR9 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate



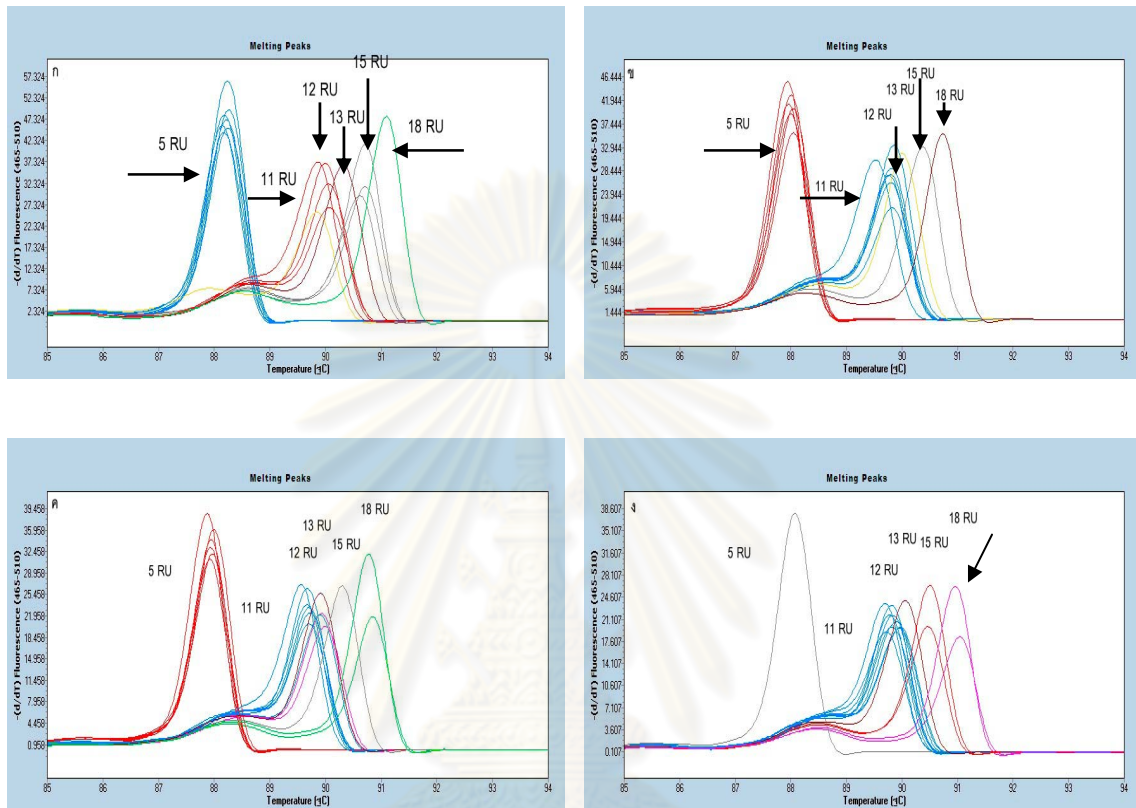
โดยภาพ ภ.1 ก มี S. Typhimurium ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR03, STTR04, STTR05, STTR06, STTR07, STTR08, STTR09, STTR10, STTR24, STTR31, STTR37, SAP00445/09, SAP4570, STTR14, STTR15, STTR23 และ STTR42

ภาพ ภ.1 ข มี S. Typhimurium ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR01, STTR02, STTR11, STTR16, STTR17, STTR18, STTR25, STTR26, STTR29, STTR35, SAP21194/08, SAP00433/09, SAP00564, SAP4282, SAP5447, SAP6077, MLST33, STTR23, STTR42

ภาพ ภ.1 ค มี S. Typhimurium ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR32, STTR33, STTR38, SAP00444/09, SAP01571/09, SAP03057/09, SAP4572, SAP9184/09, MLST23, STTR27, STTR23, STTR42

ภาพ ภ.1 ง มี S. Typhimurium ไอโซเลตดังต่อไปนี้: SAP4202, MLST13, MLST24, ATCC 13311, DMST17242, MLST12, ST23, ST42

ภาพ ภ.2 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR5 ของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 isolate



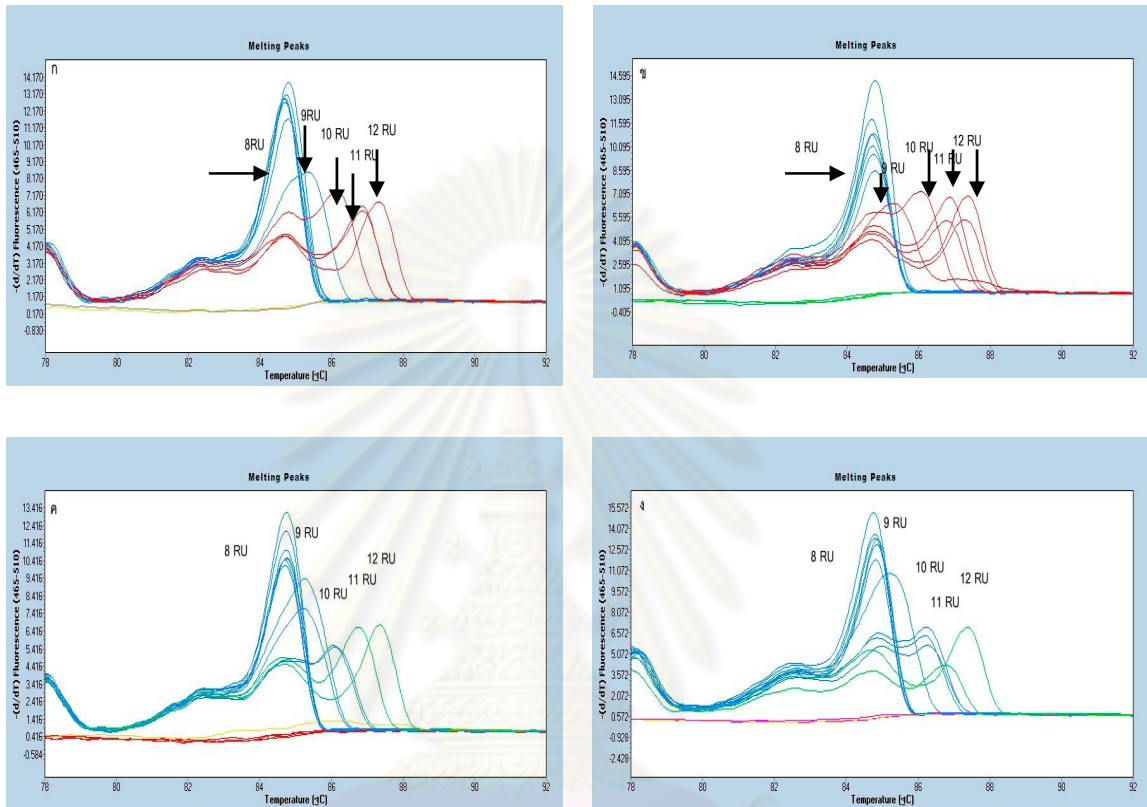
โดยภาพ ภ.2 ก มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR01, STTR02, STTR03, STTR04, STTR05, STTR08, STTR09, STTR16, STTR24, STTR27, STTR32, SAP4202, SAP00564, STTR10, STTR14, STTR23, STTR42, SAP3057, SAP4570, SAP5447

ภาพ ภ.2 ข มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR06, STTR07, STTR17, STTR25, STTR33, STTR35, STTR37, SAP21194/08, SAP00433/09, SAP00444/09, SAP00445/09, STTR10, STTR14, STTR23, STTR42, SAP3057, SAP4570, SAP5447

ภาพ ภ.2 ค มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR11, STTR15, STTR18, STTR26, STTR29, STTR31, STTR38, SAP01571/09, SAP6077, SAP4282, SAP4572, STTR10, STTR14, STTR23, STTR42, SAP3057, SAP4570, SAP5447

ภาพ ภ.2 ง มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: SAP9184/09, MLST13, MLST23, MLST24, MLST33, ATCC 13311, DMST17242, MLST12, STTR10, STTR14, STTR23, STTR42, SAP3057, SAP4570, SAP5447

ภาพ ภ.3 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR6 ของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 isolate



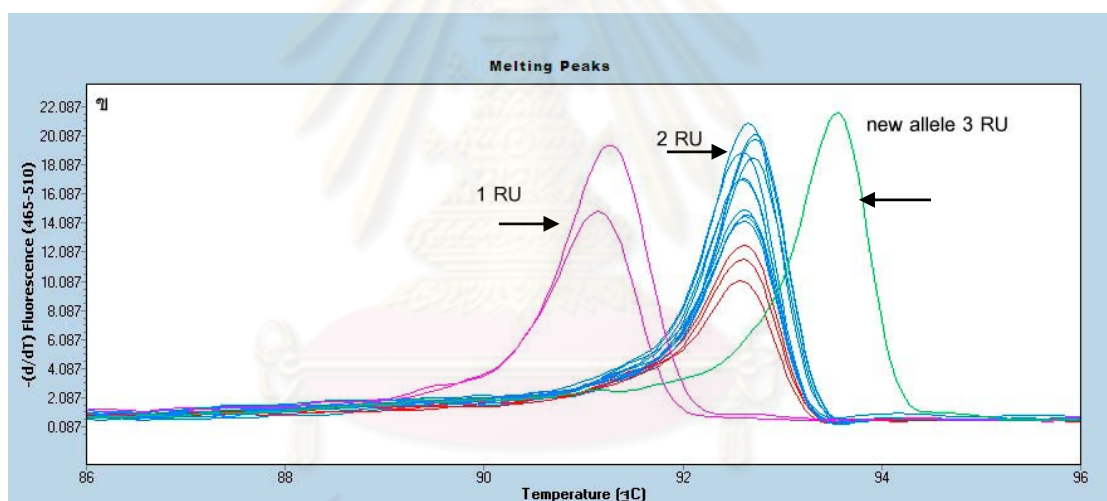
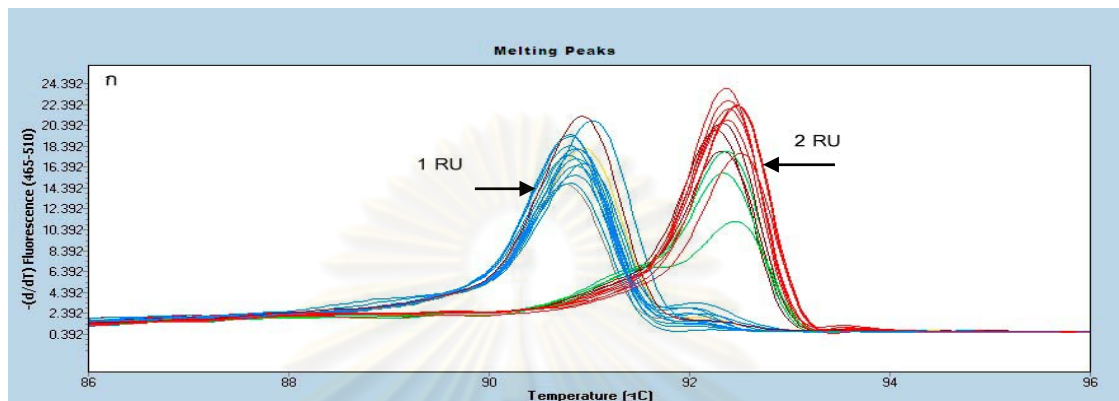
โดยภาพ ภ.3 ก มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR01, STTR02, STTR03, STTR04, STTR05, STTR11, STTR16, STTR18, STTR24, STTR29, SAP00444/09, SAP00564/09, SAP01571/09, SAP4282, STTR10, STTR14, STTR17, STTR23, STTR27

ภาพ ภ.3 ข มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR06, STTR07, STTR08, STTR09, STTR25, STTR26, STTR32, STTR33, STTR35, SAP3057/09, SAP4282, STTR10, STTR14, STTR17, STTR23, STTR27

ภาพ ภ.3 ค มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR15, STTR37, STTR38, STTR42, SAP21194, SAP4570, SAP4572, SAP5447, STTR10, STTR14, STTR17, STTR23, STTR27

ภาพ ภ.3 ง มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: SAP00433/09, SAP00445/09, SAP4202, SAP60ZZ, SAP9184/09, MLST12, MLST13, MLST23, MLST24, MLST33, ATCC13311, DMST17243, STTR10, STTR14, STTR17, STTR23, STTR27

ภาพ ก.4 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR3 ของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 isolate



โดยภาพ ก.4 ก มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR01, STTR02, STTR03, STTR04, STTR05, STTR06, STTR07, STTR08, STTR09, STTR11, STTR24, STTR25, STTR26, STTR27, STTR28, STTR29, STTR31, STTR32, STTR33, STTR42, SAP21194/09, STTR01, STTR10

ภาพ ก.4 ข มี *S. Typhimurium* ไอโซเลตดังต่อไปนี้: STTR14, STTR15, STTR16, STTR17, STTR18, STTR23, STTR35, SAP6077, SAP9184/09, MLST12, MLST13, MLST23, MLST24, MLST33, ATCC13311, DMST17242, STTR01, STTR10

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพนัสนันท์ ศิลมัฐ เกิดเมื่อวันที่ 22 เมษายน 2523 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2546 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ผลงานที่ผ่านมาได้แก่การนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในหัวข้อเรื่อง “การพัฒนาเทคนิค High Resolution Melting Analysis (HRM) เพื่อจำแนกความแตกต่างของ Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) ใน *Salmonella* Typhimurium” ในการประชุม ทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 18 วันที่ 16 – 17 กันยายน 2553 ณ สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย