

## บทที่ 2

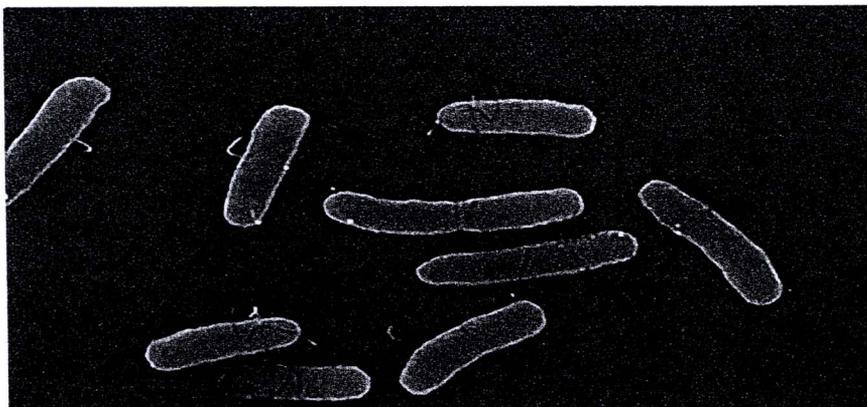
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สกุล (genus) *Salmonella*

*Salmonella* เป็นแบคทีเรียก่อโรคซึ่งถูกค้นพบในปีคริสต์ศักราช 1885 โดย Theobald Smith นักแบคทีเรียชาวอเมริกันที่แยกเชื้อนี้ได้จากสุกรซึ่งป่วยเป็นอหิวาตกโรคและชื่อสกุล *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, สุมนทนา วัฒนสินธุ์ และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์, ม.ป.ป. : online)

##### 2.1.1 จุลชีววิทยาของ *Salmonella*

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



รูป2-1 ลักษณะเซลล์ของ *Salmonella*

ที่มา : Kunkel, 2004 : online

### 2.1.2 อนุกรมวิธานและระบบการเรียกชื่อ *Salmonella*

การจำแนกชนิด (species ) และชนิดย่อย (subspecies) ในสกุล *Salmonella* จะใช้ผลการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ดังแสดงในตาราง2-1 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"

ตาราง 2-1 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  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 บ่างตระกูลนนท์และคณะ, 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 บ่างตระกูลนนท์และคณะ, 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 บำรุงตระกูลนนท์และคณะ, ม.ป.ป.; Ellermeier and Slauch, 2006; Grimont and Weill, 2007)

### 2.1.3 แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของ *Salmonella*

*Salmonella* อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารและลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น มนุษย์ สัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงคลาน 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* ซีโรวารต่างๆดังแสดงในตาราง2-3

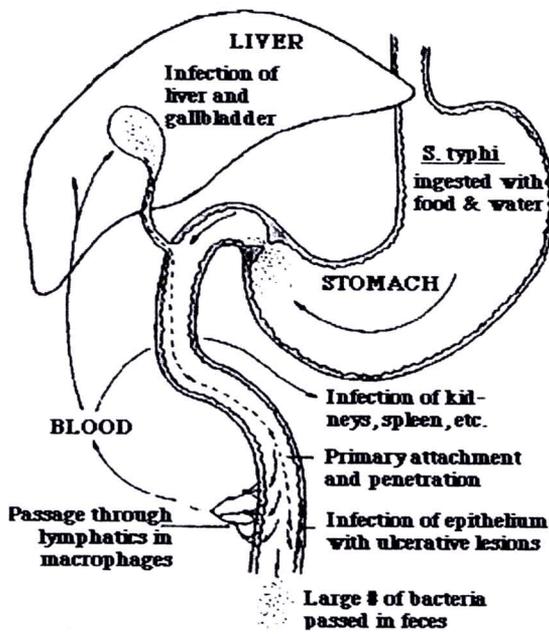
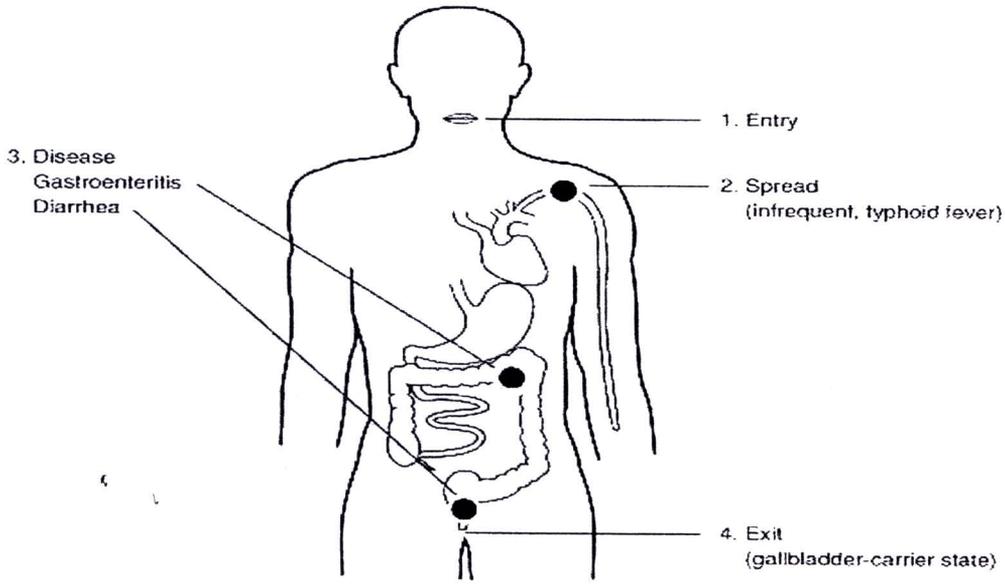
ตาราง 2-3 กลุ่มเจ้าบ้านของ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ซีโรวารี่ต่างๆ

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

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ellermeier and Slauch, 2006

### 2.1.5 อาการของผู้ป่วยที่ได้รับ *Salmonella*

เมื่อมีการบริโภคอาหารที่มี *Salmonella* เข้าไปในร่างกาย จะมีเส้นทางการเคลื่อนที่ของเชื้อดังรูป 2-2



รูป 2-2 แสดงเส้นทางของ *Salmonella* เมื่อเข้าไปในร่างกาย

ที่มา : อรุณ บำรุงตระกูลนนท์และคณะ, 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 ไข้ขึ้นสูงมากเป็นเวลาหลายวัน ปวดท้องและปวดเมื่อยตามร่างกาย อ่อนเพลีย ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ไอ มีเหงื่อออกตามตัว หนาวสั่น และเบื่ออาหาร มีจุดแดงตามลำตัว แผ่นหลังและหน้าอก หัวใจเต้นช้าและอ่อน ท้องบวม น้ำมูกโต บางครั้งมีเลือดออกจากช่องท้องหรือจุกและอาจหมดสติได้ 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 เนื้อ และผลิตภัณฑ์นมเป็นองค์ประกอบ 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 และสวีเดน



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)

ฟาร์มไก่ยังเป็นอีกแหล่งหนึ่งซึ่งพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* โดยพบว่าการปนเปื้อนอาจเริ่มจากระดับฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ศูนย์รวบรวมไข่ ไปจนถึงสถานที่จำหน่าย ซึ่งส่วนใหญ่จะพบการปนเปื้อนที่เปลือกไข่มากกว่าในเนื้อไข่ ซึ่งการแพร่กระจายของ *Salmonella* เกิดจากมาตรการด้านสุขาภิบาลที่ไม่ดีพอที่จะควบคุมการแพร่กระจายของ *Salmonella* (ชูลีพร 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 (เพ็ญนภา มัชฌมพงศ์, 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 นอกจากจะใช้วิธีการจำแนกในระดับซีโรวารด้วยเทคนิค serotyping แล้ว ยังมีการพัฒนาเทคนิคอื่น ๆ ขึ้นมาเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละไอโซเลตอีกด้วย (Yan et al, 2003; Wiedmann and Nightingale, 2009)

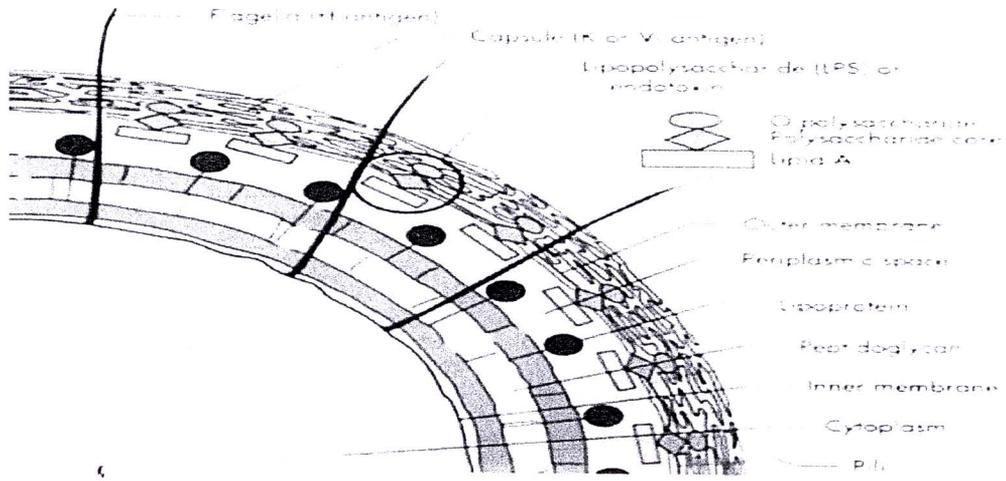
การจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ การจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* โดยใช้ลักษณะที่แสดงออกและการจำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

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

##### 2.3.1.1 Serotyping

Serotyping เป็นเทคนิคมาตรฐานที่นิยมใช้มากที่สุดใน การจำแนกเชื้อ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร หลักการของ serotyping คือ การใช้แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนขึ้น โดยพิจารณาจากโครงสร้างแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ แอนติเจนบนผนังเซลล์ (Somatic antigens, O-antigens), แอนติเจนบริเวณแส้ (Flagella antigens, H-antigens) และแอนติเจนบริเวณแคปซูล (Capsular antigens, Vi-antigens) (รูป 2-3)

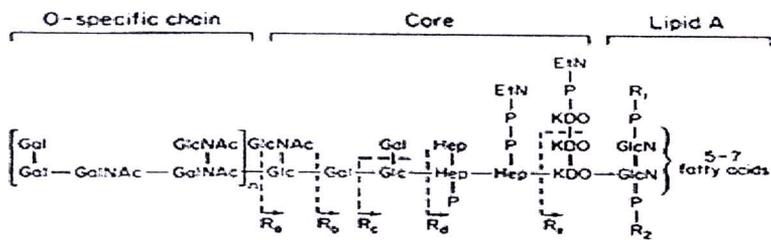




รูป 2-3 แผนภาพแสดงโครงสร้างและตำแหน่งของแอนติเจน O, H, Vi ของ *Salmonella*  
ที่มา : Murray et al., 2002

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, R1 and R2 = 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>d1</sub> mutants lack the phosphate group attached to Hep.

ที่มา : Todar, 2008 : online

หน่วยย่อยของ O-polysaccharide นั้นจะประกอบด้วยน้ำตาล 4 – 6 โมเลกุลซึ่งความผันแปรที่เกิดจากการผ่าเหล่าของเชื้ออาจส่งผลกระทบต่อชนิดของน้ำตาลและพันธะในโครงสร้างของผิวเซลล์ทำให้เกิดแอนติเจน 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 ; 1,40
S	41	41
T	42	42 ; 1,42
U	43	43
V	44	44 ; 1,44
W	45	45
X	47	47 ; 1,47
Y	48	48
Z	50	50
51	51	51 ; 1,51
52	52	52
53	53	53, 1,53
54	54	54 ; 21,54 ; 3,54 ; 4,12,54 ; 8,20,54 ; 6,7,54 ; {6,7,14}{54} ; 3,15,54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59 ; 1, 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* บางซีโรวาร์ ซึ่งพบแอนติเจน 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  $z_1, z_2, z_3$  เรียงไปตามลำดับ ส่วน 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

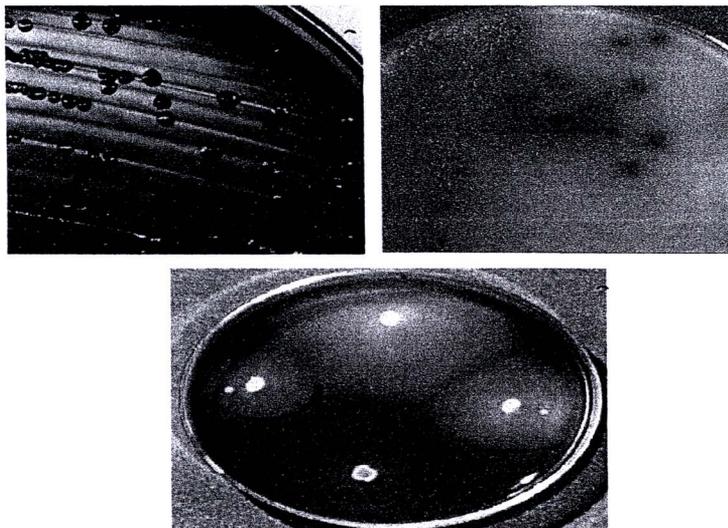
- 1) การกระตุ้นให้เชื้อที่บาดเจ็บแข็งแรง (Pre-enrichment) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารยับยั้งแบคทีเรียผสมอยู่ เช่น buffered peptone water, nutrient of lactose broths เพื่อทำให้เซลล์ที่บาดเจ็บหรือใกล้ตายแข็งแรงขึ้น และเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella* ให้มากขึ้น
- 2) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด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



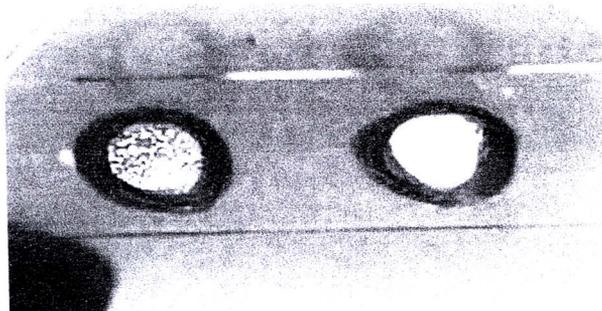
รูป2-6 ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะชนิดประเภทต่างๆ

ก: XLD Agar, ข: BS Agar, ค: MSRV Agar

ที่มา : อรุณ บำรุงตระกูลนนท์และคณะ, 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) เมื่อได้เชื้อที่คาดว่าจะเป็ *Salmonella* ให้ทำการทดสอบทางซีโรวิทยาโดยวิธี slide agglutination โดยขั้นแรกให้ทดสอบเชื้อกับ Normal Saline Solution ความเข้มข้น 0.85% หากเกิดการตกตะกอนขึ้น แสดงว่าเชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบหาซีโรวารได้เนื่องจากเชื้อจะตกตะกอนกับแอนติซีรัมทุกชนิด หากไม่เกิดการตกตะกอนให้นำเชื่อนั้นไปทดสอบกับแอนติซีรัม *Salmonella* Polyvalent A-67 และ *Salmonella* Polyvalent A-I ถ้าตกตะกอนต่อแอนติซีรัมใดแสดงว่าเชื้อมีแอนติเจนต่อแอนติซีรัมนั้น (รูป2-7)



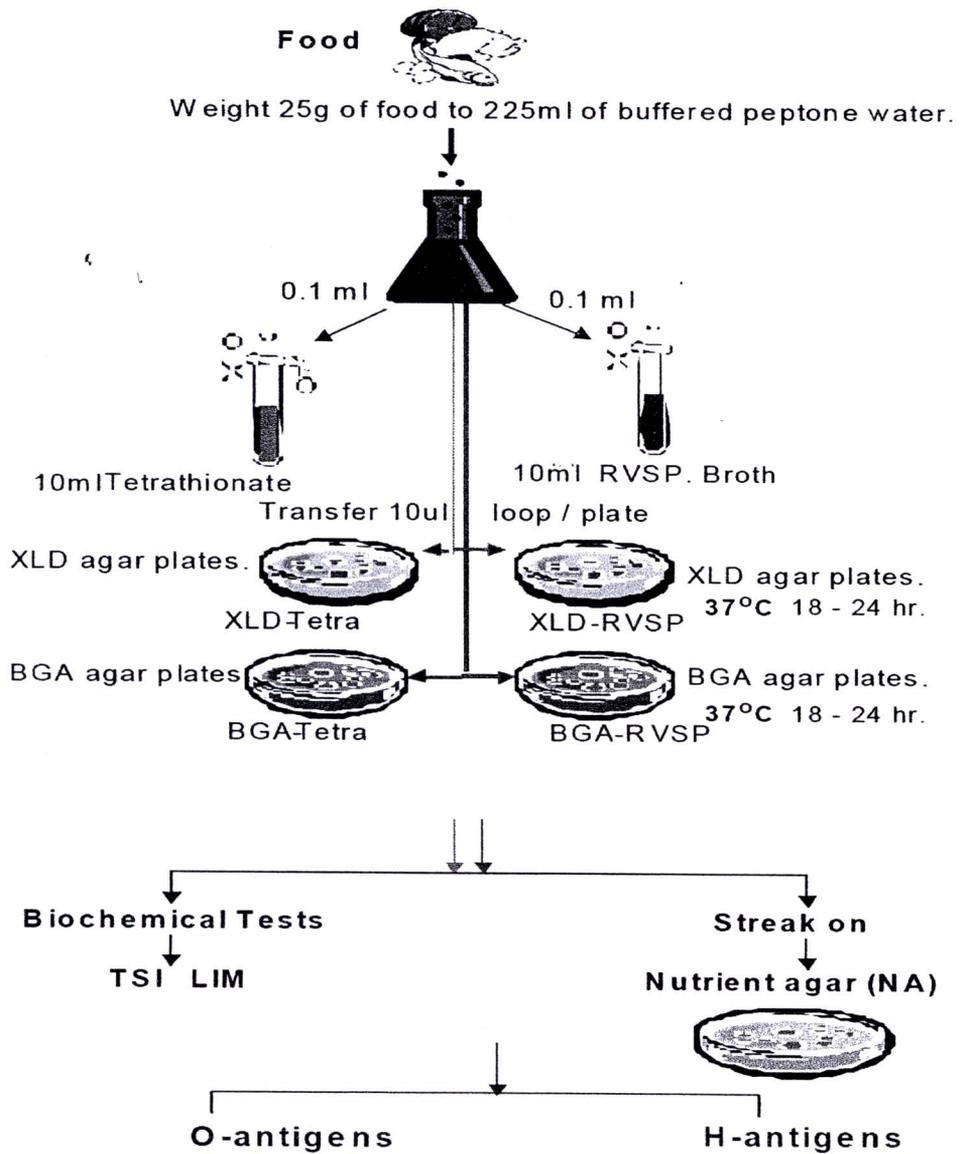
รูป2-7 การทดสอบด้วยเทคนิค slide agglutination โดยตัวอย่างด้านซ้ายมือเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัมเกิดการตกตะกอนขึ้น ตัวอย่างด้านขวามือไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัม

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* ซีโรวารต่างๆ

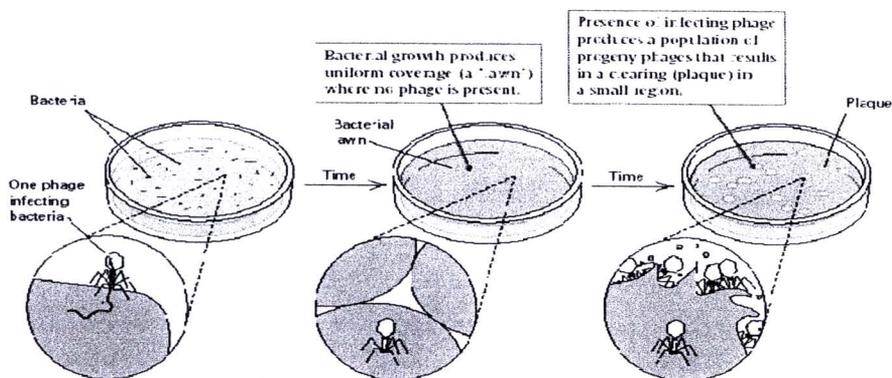
Serovar	Serogroup	Somatic antigen	Flagella (H) antigen		Capsular antigen
			Phase 1	Phase 2	
<i>S. Typhimurium</i>	O : 4 (B)	<u>1</u> , 4 ,[5], 12	l	1,2	[j],[z <sub>66</sub> ]
<i>S. Enteritidis</i>	O : 9 (D <sub>1</sub> )	<u>1</u> ,9,12	g,m	-	
<i>S. Gallinarum</i>	O : 9 (D <sub>1</sub> )	<u>1</u> ,9,12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

ที่มา : Grimont and Weill, 2007

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

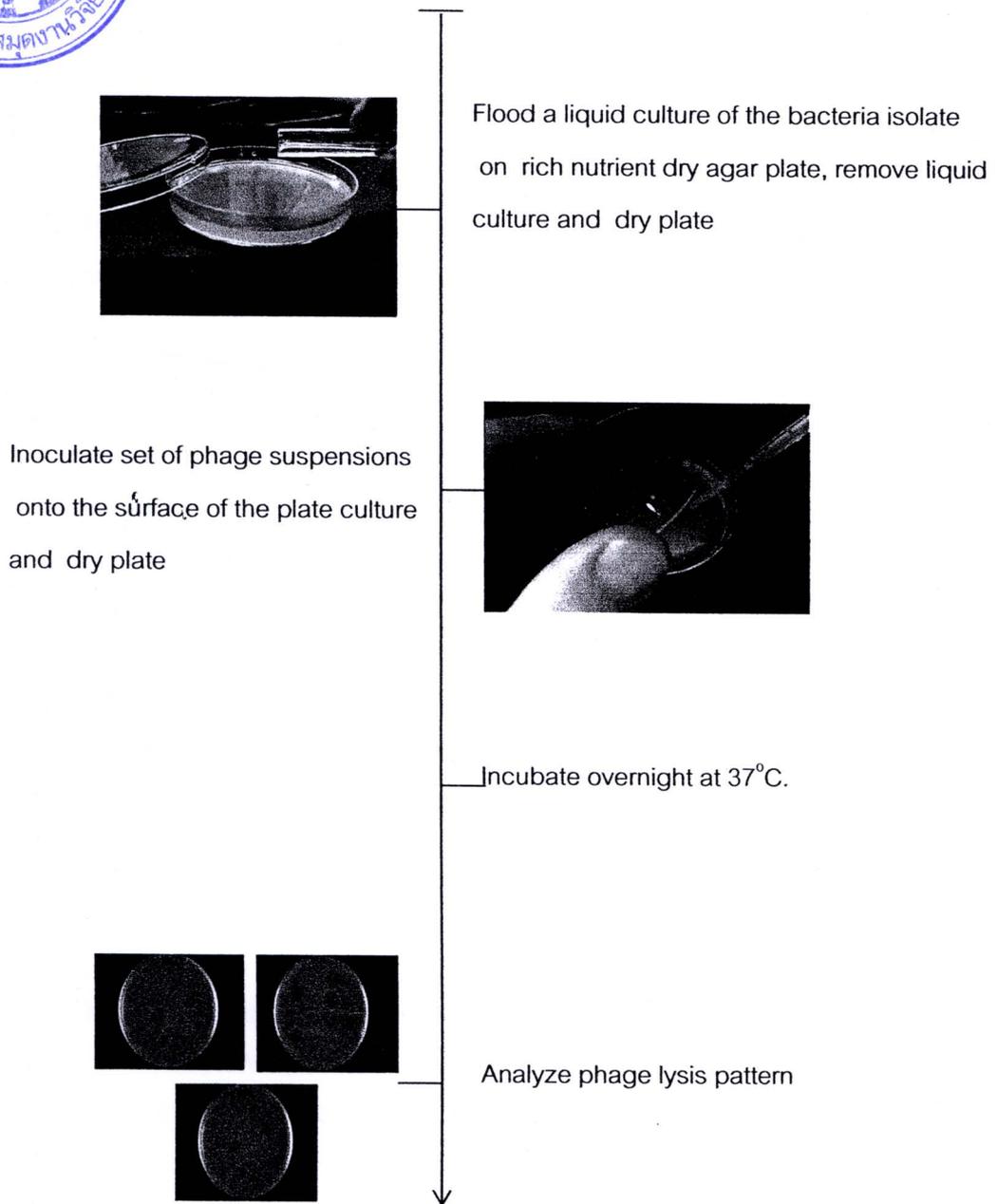
### 2.3.1.2 Phage Typing

เป็นเทคนิคซึ่งใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ *Salmonella* ในระดับซับซีโรวาร โดยให้หลักการความจำเพาะของไวรัสแบคทีเรีย (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



รูป 2-10 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค bacteriophage typing

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

ในปี 1938 Craigie และ Yen ได้จำแนกซีโรวาร์ของ *S. Typhi* โดยใช้ 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 ที่พบว่ายังมีข้อจำกัดหลายประการ 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

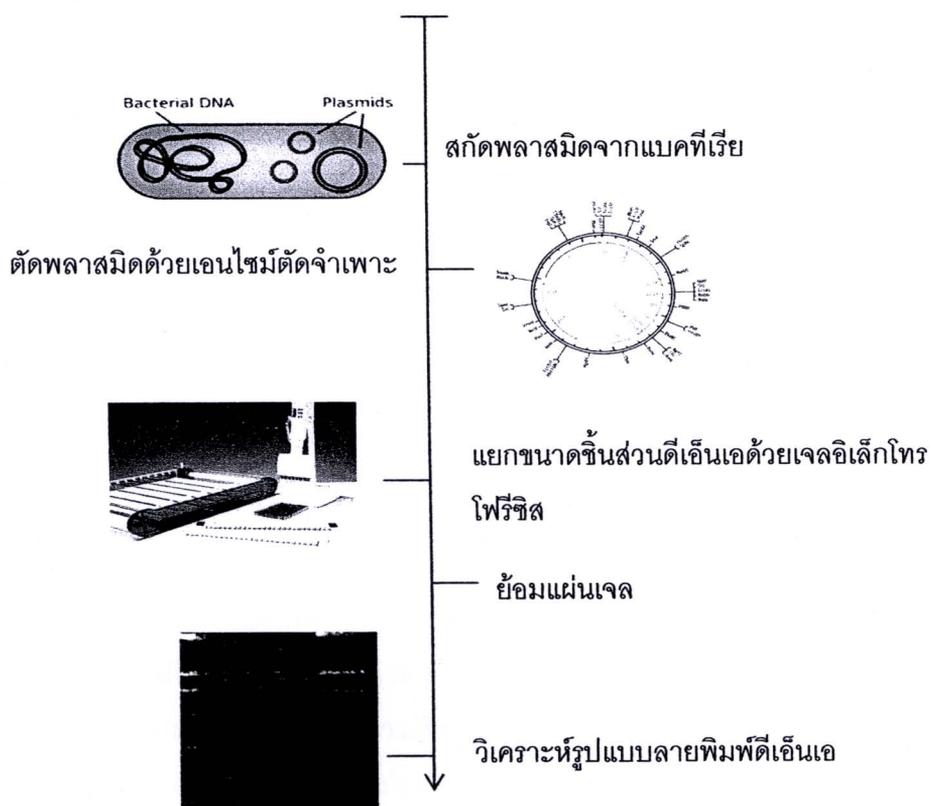
#### 2.3.2.1 Restriction-based methods

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) อยู่ในไซโทพลาสซึมของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์จะเกิดการสำเนาพลาสมิดมายังเซลล์ลูกด้วย ดังนั้นแบคทีเรียซึ่งมาจากต้นกำเนิดเดียวกันโดยปกติมักจะพบพลาสมิดชนิดเดียวกัน ทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรียได้ ขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค plasmid analysis แสดงในรูป 2-11



รูป 2-11 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค plasmid analysis

ที่มา : รวงผึ้ง สุทเธนทร์, 2545 : online

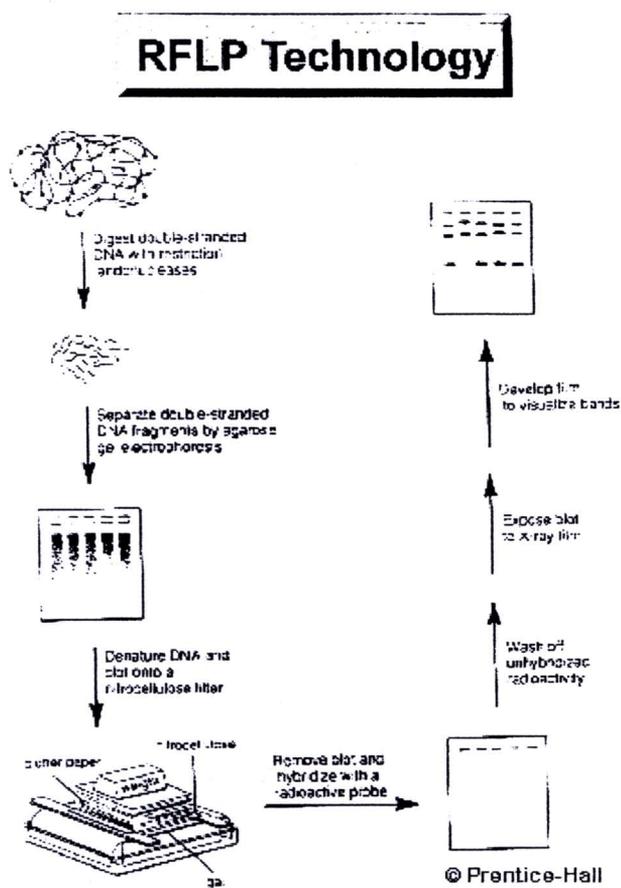
ชั้น แรก แยก ดีเอ็นเอ ของ พลาสมิด ซึ่งเป็น ส่วน extrachromosomal DNA ออกจากแบคทีเรีย ตัดดีเอ็นเอด้วย restriction enzymes จากนั้นนำไป ทำ agarose gel electrophoresis ดูขนาดชิ้นส่วนและปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยในปี 1982 Taylor และคณะได้รายงานถึงชนิดของพลาสมิดซึ่งพบใน *Salmonella* spp. หลังจากนั้นได้มีความพยายามนำเทคนิคนี้มาใช้จำแนกสายพันธุ์ *Salmonella* อย่างไรก็ตามพบว่าในบางครั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพลาสมิดซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติ การเคลื่อนที่ระหว่างการวิเคราะห์เจลิเล็กโทรโฟรีซิส (Olsen et al., 1992; Foley et al., 2009) และอาจทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบบนแผ่นเจลทำให้การวิเคราะห์รูปแบบทำได้ยาก ในบางกรณีพบว่าแบคทีเรียมีพลาสมิดหลายชนิดซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันอาจเกิดการเคลื่อนที่ไปพร้อมกันและปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงหนึ่งแถบบนแผ่นเจล ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดพลาสมิดเพื่อสร้างรูปแบบการตัด (plasmid fingerprint) ขึ้น ในปี 1987 Platt และคณะได้ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิค plasmid fingerprinting ในด้านระบาดวิทยาของ *S. Typhimurium* (Threlfall et al., 1990) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ที่แบคทีเรียบางไอโซเลทที่ไม่มีพลาสมิด หรือการเจริญในบางสภาวะทำให้พลาสมิดสามารถหายไปได้ซึ่งการมีหรือไม่มีพลาสมิดจะส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย (Foley et al., 2009)

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

เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัด chromosomal DNA ที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะ ซึ่งเรียกว่าตำแหน่งจดจำ (recognition site) (ตาราง 2-6) และแยกชิ้นส่วนที่เกิดจากการตัดด้วยเทคนิคเจลิเล็กโทรโฟรีซิส ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดชิ้นส่วน ดีเอ็นเอและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกัน ขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RFLP แสดงในรูป 2-12

ตาราง 2-6 ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณจดจำที่ใช้ในเทคนิค RFLP

Restriction enzyme	Recognition site
<i>Mbol</i>	$\wedge$ GATC
<i>HhaI</i>	GCG $\wedge$ C
<i>HphI</i>	GGTGA(N <sub>8</sub> ) $\wedge$



รูป 2-12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RFLP

ที่มา : Hancock, 1992

เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้วิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ซีโรวารต่างๆ เช่น Typhimurium, Dublin และ Enteritidis (Tompkins et al., 1986) ต่อมามีการพัฒนานำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction (PCR)) มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณที่ต้องการและตัดผลิตภัณฑ์ที่ซีอาร์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกชิ้นส่วนที่เกิดจากการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เรียกเทคนิคนี้ว่า PCR-RFLP โดยยีนที่นิยมใช้ในการทดสอบเชื้อ *Salmonella* คือยีน *fljC* ซึ่งเทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการจำแนกความแตกต่างของซีโรวาร *Gallinarum* แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของซีโรวารอื่นๆได้ (Foley et al., 2009)

#### 2.3.2.1.3 Ribotyping

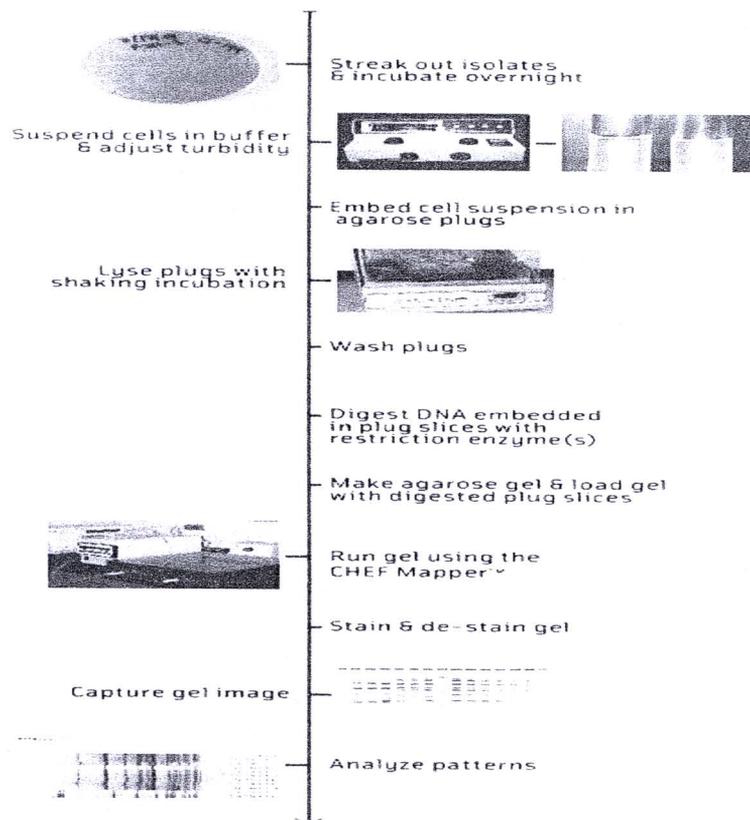
เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากเทคนิค PCR-RFLP โดยอาศัยความแตกต่างของตำแหน่งและจำนวนของยีนบริเวณ 16 S และ 23 S ribosomal RNA (rRNA) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอจากนั้นแยกชิ้นส่วนที่ถูกตัดเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนและนำแผ่นเมมเบรนมาไฮบริดซ์พร้อมกับโพรบซึ่งจำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน 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* ในซีโรวาร 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 เพื่อจำแนกความแตกต่างในระดับจีโนมาร์ของเชื้อ *Salmonella* ในปี 1995 โดย Murase และคณะ (Murase et al., 1995) เอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งนิยมใช้ในการตัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Salmonella* ได้แก่ XbaI, BlnI หลังจากการตัดเป็นขั้นตอนการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส ในระหว่างขั้นตอนนี้จะมีการสลับขั้วกระแสไฟฟ้าเป็นจังหวะทำให้เกิดการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาดซึ่งมีตั้งแต่ 20 - 800 กิโลเบสเกิดเป็นรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังแสดงในรูป 2-13



รูป 2-13 แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค PFGE

ที่มา : Martin and Nightingale, 2009

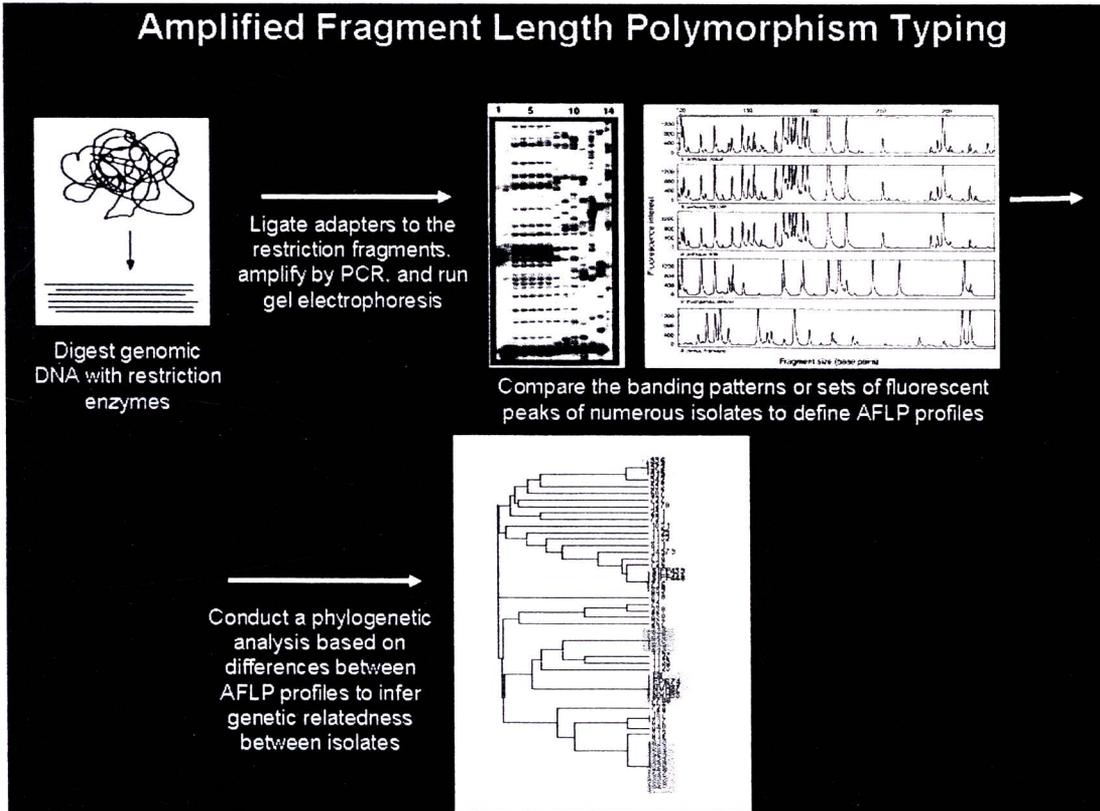
เทคนิค PFGE เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งถูกจัดให้เป็น “gold standard” ในการจำแนกเชื้อ *Salmonella* ในระดับซัพซี้โรวาร์เนื่องจากเป็นเทคนิคซึ่งมีประโยชน์และสามารถทำซ้ำได้จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังสามารถเปรียบเทียบผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการต่างๆผ่านฐานข้อมูลกลาง “PulseNet” (<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 วันในการดำเนินการวิเคราะห์และแปรผลและอาจต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมากกว่าหนึ่งตัวเพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อนั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจริงๆ (Yan et al., 2003 ; Zheng et al., 2007 ; Foley et al., 2009)

#### 2.3.2.2 Amplification-based methods

เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียโดยหลักการของเทคนิคนี้คือการวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (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

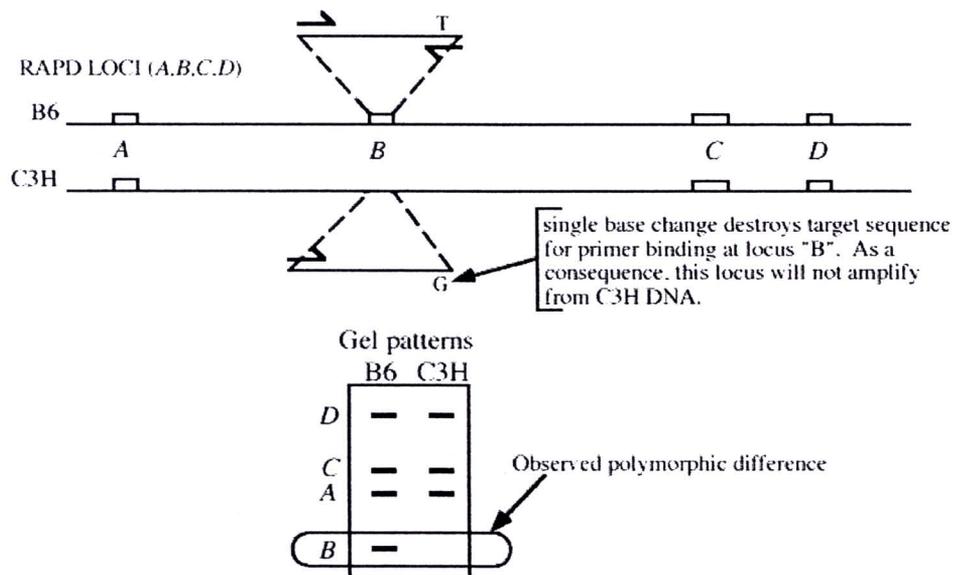
ที่มา : ดัดแปลงจาก University OF OSLO, n.d. : online

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP นั้น จีโนมของแบคทีเรียจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยทำการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์เพื่อเป็นตำแหน่งสำหรับให้ไพรเมอร์มาจับในการทำพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้การทำพีซีอาร์จะถูกเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' ประมาณ 1 - 3 เบสต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสสอดคล้องกับไพรเมอร์ทำให้สามารถลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะต้องวิเคราะห์ทั้งหมดได้ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียต่อไป เทคนิคนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกเชื้อ *Salmonella* ตั้งแต่นั้นมา Aarts และคณะได้ใช้เทคนิคนี้ในการจำแนกความแตกต่างในระดับซัปสปีชีส์และ

ในปี 2000 Lindstedt และคณะได้จำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella enterica* supsp. *enterica* ในระดับซีโรวาร์ ซึ่งเทคนิคนี้มีความสามารถในการจำแนกเท่ากับเทคนิค PFGE อย่างไรก็ดีตามภายหลังได้มีการนำเครื่อง 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

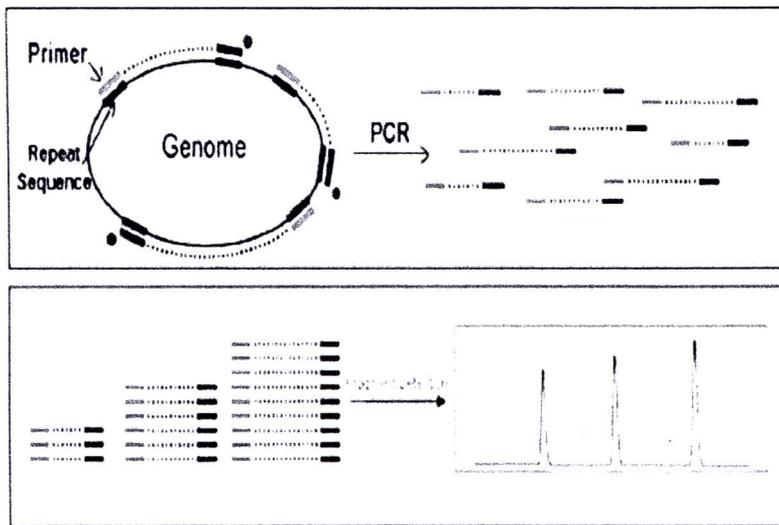


รูป 2-15 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค RAPD-PCR ที่มา : Silver, 1995 : online

ในปี 2000 Chansiripornchai และคณะ ได้รายงานถึงการใช้นิเทศนค RAPD-PCR ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* พบว่าเทคนิคนี้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างซีโรวาร์ได้แต่ยังมีข้อจำกัดในการแยกความแตกต่างของเชื้อในระดับซีโรวาร์ นอกจากนี้ยังพบปัญหาในเรื่องการทำซ้ำของเทคนิค เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงส่วนผสมของสารเคมี สภาวะในการทำพีซีอาร์ หรือปัจจัยอื่นๆเพียงเล็กน้อยอาจส่งผลทำให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อ 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 เป็นเทคนิคในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆกัน (repetitive DNA) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วจีโนมของแบคทีเรีย หลังจากนั้นชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสและลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรม โดยมีหลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Rep-PCR ดังแสดงในรูป 2-16



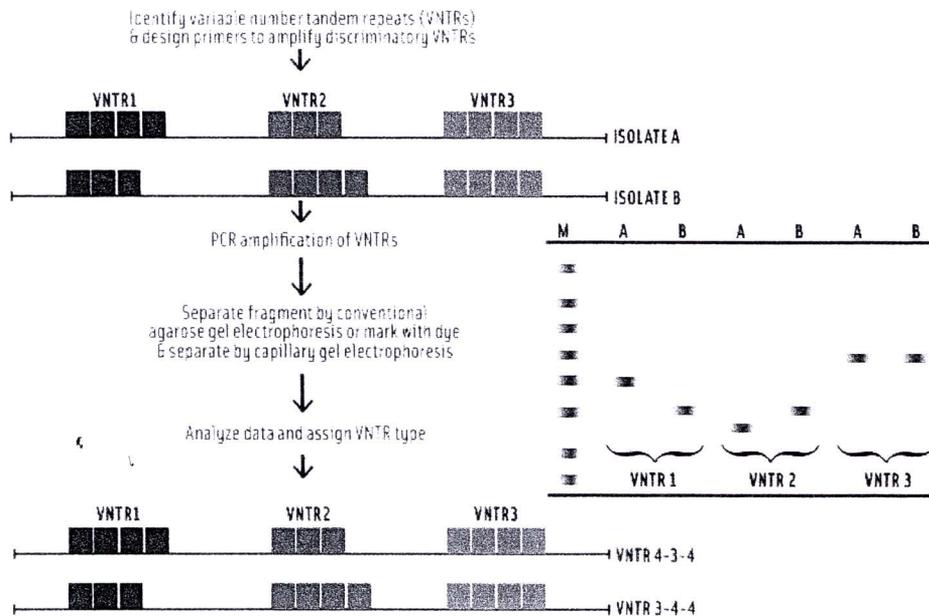
รูป 2-16 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค Rep-PCR  
ที่มา : Sarita Raengpradub, 2009 : online

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





รูป 2-17 แผนภาพแสดงแนวคิดและขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค MLVA โดยสมมติจำนวน VNTR ของเชื้อไอโซเลท A และ B และภาพเจลสมมติซึ่งเกิดจากการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณของไอโซเลท A และ B (เมื่อแถว M คือ DNA marker แถบบนแทนชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใหญ่สุดและแถบล่างแทนชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดเล็กสุด แถว 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 ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงเช่นเดียวกับ Torphdahl และคณะ (2006) ซึ่งใช้เทคนิค MLVA ในการศึกษาขนาดวิทยาของเชื้อ 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 อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือในการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค capillary gel electrophoresis นั้นค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างและเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์มีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ไม่เหมาะสมในการใช้วิเคราะห์กับตัวอย่างจำนวนมาก

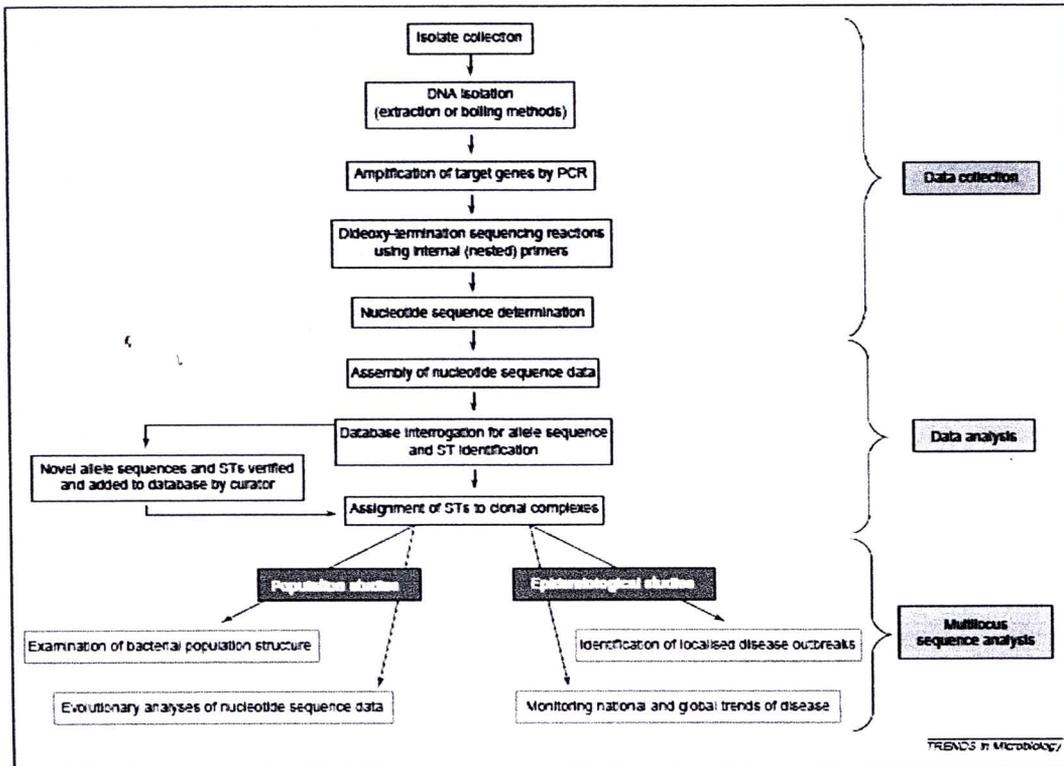
### 2.3.2.3 Sequencing-based methods

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



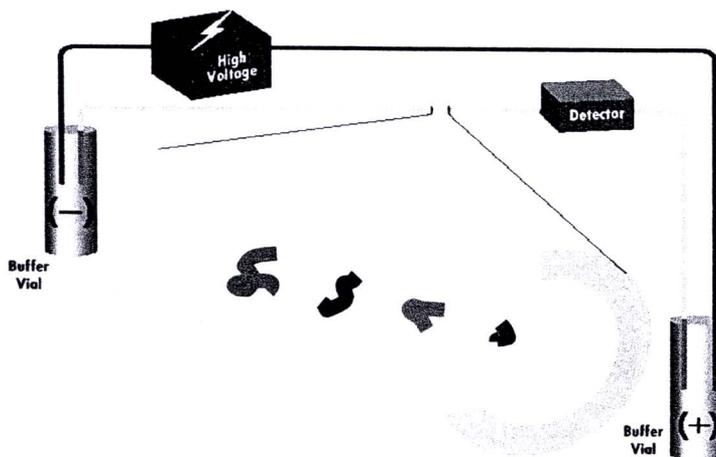
รูป 2-18 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค MLST  
ที่มา : Urwin and Maiden, 2003

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 จากการที่แคปิลารีมีขนาดเล็กทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์และตัวอย่างในการวิเคราะห์ในปริมาณน้อย ส่วนประกอบพื้นฐานของแคปิลารีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสดังแสดงในรูป 2-19



รูป 2-19 ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่องมือ capillary electrophoresis

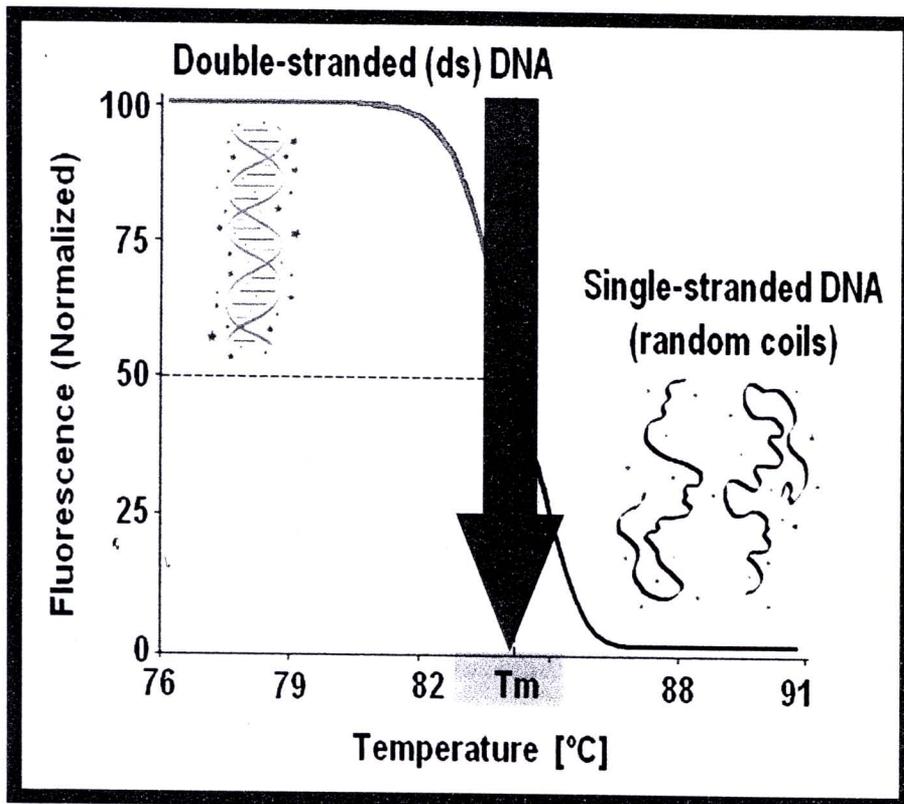
ที่มา : วิวัฒน์ บัณฑิตย์, 2548 : ออนไลน์

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

ข้อดีของเทคนิคแคปิลารีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสคือลดขั้นตอนในการเตรียมแผ่นเจลเนื่องจากเจลเป็นแบบพร้อมใช้และใช้เวลาในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเล็กน้อยกว่าวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสแบบดั้งเดิมทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้รวดเร็วกว่า อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดโดยเครื่องมือวิเคราะห์นี้ยังคงมีราคาแพงทำให้มีอยู่ในเฉพาะห้องปฏิบัติการบางที่เท่านั้น นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างยังคงมีราคาสูง (วิวัฒน์ บัณฑิตย์, 2548)

## 2.5 High Resolution Melting (HRM) Analysis

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



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*, และใช้จำแนกความแตกต่างในระดับซับซีโรวารของเชื้อ *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 แตกต่างกัน และสามารถให้ทดสอบความแตกต่างของอัลลีลได้อย่างถูกต้อง (Ciammaruconi, 2009)