

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดอาหารเป็นพิษ

1.1 จุลินทรีย์ประเภทที่สร้างสารพิษ (intoxication) โดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารจะสร้างสารพิษขึ้น เมื่อผู้บริโภคทานอาหารซึ่งมีสารพิษนี้เข้าไป จะก่อให้เกิดอาการผิดปกติขึ้นกับร่างกาย และอาการผิดปกตินั้นไม่จำเป็นว่าในอาหารที่บริโภคจะต้อง มีจุลินทรีย์อยู่ด้วย เพียงแต่มีสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นอยู่เท่านั้นก็จะสามารถทำให้เกิดอาการผิดปกติขึ้นได้ สำหรับจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในประเภทนี้ได้แก่ *Clostridium botulinum* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

1.2 จุลินทรีย์ประเภทที่จุลินทรีย์เองเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหรือ อาการผิดปกติขึ้น (infections) โดยเพียงแต่บริโภคอาหารที่มีจุลินทรีย์ชนิดนี้อยู่ ก็จะทำให้เกิดอาการผิดปกติได้ ถ้าหากจุลินทรีย์นั้นมีอยู่ในปริมาณที่มากพอ จุลินทรีย์ที่จัดรวมอยู่ในประเภทนี้ ได้แก่ *Salmonella*, *Clostridium perfringens* และ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นต้น

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์

คำจำกัดความของการเกิดโรคคือ การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เนื้อเยื่อ หรือเมตาโบลิซึมของพืช สัตว์ หรือมนุษย์เกิดอันตราย โดยเกิดอาการลักษณะต่างๆ หรือการเจ็บป่วยขึ้นจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา ไวรัส และ โปรโตซัว ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคต่างๆ เรียกว่าเชื้อโรค (pathogens)

เชื้อแบคทีเรีย (bacterium; พหูพจน์ bacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่สามารถพบอาศัยเป็นอิสระในสิ่งแวดล้อม หรือพบอาศัยเป็นปรสิตอยู่ภายในเซลล์ แบคทีเรียจัดเป็นจุลชีพก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ โรคติดเชื้อแบคทีเรียนั้นเป็นที่รู้จักมาเป็นเวลาหลายร้อยปีก่อนการค้นพบเชื้อแบคทีเรียเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1677 โดย Anton van Leeuwenhoek (ค.ศ.1632-1723) นักจุลทรรศน์ศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่เกาะติดหรืออาศัยอยู่บนผิวหนังหรือช่องเปิดของอวัยวะต่าง ๆ ของมนุษย์โดยเฉพาะแบคทีเรียและยีสต์บางชนิด ซึ่งรวมเรียกว่า ไมโครฟลอรา (microflora) จุลินทรีย์เหล่านี้จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์และบางครั้งบางชนิดอาจเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของร่างกาย ตัวอย่างเช่น ไมโครฟลอราจะช่วยทำลายเชื้อโรคโดยการแย่งพื้นที่การเจริญ และสารอาหารรวมทั้งอาจสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น ภายในลำไส้ที่พบ *E. coli* หลายสายพันธุ์ ที่ช่วย

ป้องกันการเจริญของพวก *Salmonella* spp. ได้ นอกจากนั้นแบคทีเรียบางชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ อาจช่วยสังเคราะห์วิตามินเค ที่ร่างกายมนุษย์นำไปใช้ประโยชน์ได้

โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะถูกปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ นอกเหนือจากจุลินทรีย์ที่อาศัยประจำบนร่างกาย แต่ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ดังกล่าวไม่ใช่เชื้อโรค ในขณะที่เชื้อโรคต่างๆ ที่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของร่างกายอาจเจริญและสร้างสารพิษ (toxins) ขึ้น ซึ่งสารพิษดังกล่าวเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อและสรีระของมนุษย์ สารพิษส่วนใหญ่เป็นโปรตีน บางครั้งถูกสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์ เช่น เอ็นเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่สร้างโดย *S. aureus* ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และทำให้เกิดอาการของโรคขึ้นได้โดยไม่ต้องมีเชื้อดังกล่าว

โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรคส่วนใหญ่สร้างสารพิษที่ทำให้เกิดอาการของโรค สารพิษของแบคทีเรียแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เอ็กโซทอกซิน (exotoxin) และเอ็นโดทอกซิน (endotoxin)

- 1 เอ็กโซทอกซิน มีคุณสมบัติดังนี้
 - มักเป็นโปรตีนที่สร้างโดยกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย
 - สร้างโดยพวกแกรมบวกหรือลบ
 - ไม่ได้เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของโครงสร้างของเซลล์
 - ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์
- 2 ส่วนคุณสมบัติของเอ็นโดทอกซิน ได้แก่
 - เป็นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides)
 - เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และถูกปลดปล่อยออกเมื่อเซลล์ตาย
 - สร้างโดยพวกแกรมลบสารพิษชนิดเอ็นโดทอกซินนั้นมีผลต่อร่างกายมนุษย์ กว้างกว่าเอ็กโซทอกซิน โดยทำให้เกิด อันตรายอย่างรุนแรง และทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะอย่างถาวรทำให้ตายในที่สุด ผลของเอ็นโดทอกซิน ได้แก่
 - เป็นสารพิษที่อันตรายต่อกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดอาการท้องเสียและปวดท้อง
 - ทำให้เกิดอาการไข้ โดยการกระตุ้นการหลั่งไพโรเจน (pyrogens) ที่ทำให้ร่างกายมีอุณหภูมิสูง

- ทำให้เกิดผื่นขึ้นบนผิวหนัง
- ทำให้เกิดการช็อก (shock) โดยทำให้เกิดความดันต่ำและเกิดการสะสมของเลือดภายในอวัยวะต่างๆเป็นผลให้ของเสียต่างๆไม่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ เป็นผลทำให้เซลล์ขาดออกซิเจนและสารอาหารในที่สุด

โรคอาหารเป็นพิษอาจเกิดจากการรับประทานหรือบริโภคอาหารที่มีสารพิษของจุลินทรีย์เรียกว่าอินทอกซิเคชัน (intoxications) โดยสารพิษจะทำให้เกิดลักษณะอาการที่แสดงออกของโรค (syndrome) ที่แตกต่างกัน สารพิษของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคภายในลำไส้เรียกว่า เอ็นเทอโรทอกซิน (enterotoxins) หรือที่ทำให้เกิดโรคที่ระบบประสาทเรียกว่า นิวโรทอกซิน (neurotoxins) ส่วนไมโคทอกซิโคซิส (mycotoxicoses) หมายถึงโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา โดยทั่วไป intoxication มักจะมีระยะเวลาระหว่างภายหลังที่ได้รับสารพิษจนกระทั่งแสดงอาการของโรคหรือระยะฟักตัว (incubation periods) ที่สั้น

ส่วนอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการได้รับเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปและจุลินทรีย์นั้นเข้าไปเจริญเติบโต ภายในลำไส้และทำให้เกิดอาการของโรคขึ้นเรียกว่า อินเฟกชัน (infections) เช่น *Salmonella* spp., *E. coli* และ *Vibrio* ที่สร้างเอ็กโซทอกซิน เอ็นโดทอกซินที่ทำให้เกิดอาการ เช่นเดียวกับเอ็นเทอโรทอกซินในโรคอาหารเป็นพิษบางชนิด

2. โรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis)

ในบรรดาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ และการระบาดในคนนั้น *Salmonella* เป็นตัวอย่างที่ดีของแบคทีเรียที่มีการวิวัฒนาการขนานไปกับวิวัฒนาการของมนุษย์ แต่เดิมแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในสัตว์และก่อให้เกิดโรคในสัตว์ มีเพียงไม่กี่ชนิดเป็น pathogen ของคนโดยตรง และอาศัยอยู่ในคน แต่ปัจจุบันนี้ *Salmonella* จากสัตว์หลายชนิดทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและอาศัยเป็น carrier อยู่ในคนได้เป็นเวลานาน ทั้งนี้เพราะ *Salmonella* สามารถปรับตัวได้ดี ทำให้สามารถอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในสังคมมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของเทคโนโลยีใหม่ ๆ เช่นการผลิตอาหารกระป๋องอาหารแช่แข็ง หรือขบวนการต่างๆ ในการเตรียมอาหารสำเร็จรูปทั้งอาหารที่ยังไม่สุก และอาหารที่สุกแล้ว ซึ่งในปัจจุบันนี้เกิดขึ้นมากมายเพื่อสนองความต้องการของประชาชนที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในประเทศไทยที่ประจักษ์กันคือว่ามีอาหารมากมายให้ซื้อขายกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เรียกว่าประเทศไทยเป็นครัวอาหารโลก จำเป็นอย่างยิ่งต้องควบคุม ป้องกัน พร้อมทั้งหาทางหยุดยั้งเชื้อ *Salmonella* มิให้แพร่กระจายไปในอาหาร สิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เพิ่มขึ้น (อรุณ และคณะ, 2545)

Salmonella เป็นจีโนสหนึ่งในตระกูล Enterobacteriaceae ดำรงชีวิตเป็นแบบแฟกซ์เตติฟ แอนแอโรบ เป็นพวกแกรมลบรูปท่อนที่สามารถเจริญในอาหารที่ค่อนข้างธรรมดาได้ และแตกต่างจากพวกสมาชิกตัวอื่นในตระกูลนี้ตรงที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมี และโครงสร้างแอนติเจนที่แตกต่างออกไป ถิ่นที่อยู่ของเชื้อนี้คือ ลำไส้ของคนและสัตว์ และทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ต่างๆได้

การจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* มีความซับซ้อนมาก โดยสมบัติของแอนติเจนซึ่งเป็นหลักการของ Kauffmann และ White แบ่ง *Salmonella* ได้มากกว่า 2000 serotypes ส่วน Ewing และกระแบ่ง *Salmonella* เป็น 3 สปีชีส์ คือ *Salmonella cholerae - suls*, *Salmonella enteritidis* และ *Salmonella typhi* สปีชีส์อื่น ๆ หรือ Serotypes อื่น ๆ จัดเป็น serotypes ของ *S. enteritidis* ดังนั้นตามหลักของ Kauffmann และ White *S. typhimurium* จึงกลายเป็น *S. enteritidis* serotype typhimurium หลักการแบ่ง *Salmonella* เป็น 3 สปีชีส์หลัก ใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1972 ถึง ค.ศ. 1983 ต่อมาการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์มีการพบว่า *Salmonella* ทั้งหมด รวมทั้งจีโนส *Arizona* จัดเป็นสปีชีส์เดียวกันเมื่อพิจารณาทางด้านพันธุศาสตร์และสายวิวัฒนาการ ส่วนความแตกต่างตามชนิดของแอนติเจน ปฏิกริยาชีวเคมีและการกระจายตามภูมิศาสตร์ หรือ กระจายตามโฮสต์ต่างๆ เป็นผลมาจากความแตกต่างทางด้านภายในสปีชีส์เดียวกัน

2.1 ลักษณะของเชื้อ *Salmonellae*

Salmonella เป็นแกรมลบ รูปท่อน สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว ยกเว้น *S. pullorum* และ *S. gallinarum* เชื้อนี้ไม่มีแคปซูลและสปอร์เจริญได้ ตีในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสได้กรด บางที่ได้ก๊าซด้วย แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทสและซูโครสได้ ให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือก๊าซจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เชื้อส่วนใหญ่ไม่ต้องการวิตามินหรือ กรดอะมิโน ยกเว้นเชื้อไทฟอยด์บางชนิดต้องการทริปโตเฟน นอกจากนี้ยังทนต่อสารเคมีบางอย่าง เช่น บริลเลียนกรีน โซเดียมเตตราไทโอเนต โซเดียมดีออกซีโคลเลต ซึ่งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อพวก โคลิฟอร์ม จึงใช้เป็นหลักการแยกเชื้ออุจจาระ

2.2 จุลชีววิทยาของ *Salmonella*

แบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดได้ว่าเป็น pathogens ที่พบได้ทุกหนทุกแห่งและทั่วโลก โดยเข้ามามีบทบาทไม่เฉพาะแต่ในคน และสัตว์เลี้ยงของคนเท่านั้น หากยังพบได้ในสัตว์ต่างๆ ไป เช่น สัตว์เลี้ยงคชาน นก และแมลงต่างๆ เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่ง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* ประวัติของเชื้อ *Salmonella* เดิมเรียกว่า paratyphoid bacteria ส่วนชื่อสกุลได้เปลี่ยนไปโดยตั้งให้เป็นเกียรติ D.E.Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกัน ซึ่งได้ร่วมกับ Theobald Smith ที่ได้ทำการแยก

เชื้อนี้จากสุกรที่ป่วยโรคอหิวาต์ เชื้อที่แยกได้นี้ต่อมาเรียกว่า *Salmonella Choleraesuis* ใน ค.ศ.1885 และในปี ค.ศ.1888 Gartner แยกเชื้อได้จากม้าผู้ป่วยที่ตายด้วยโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศเยอรมัน คือ *Salmonella Enteritidis* ปี ค.ศ. 1892 Löffler แยก *Salmonella Typhimurium* ได้จากหนูขาวที่มีอาการโรคคล้ายไทฟอยด์ จนกระทั่ง Schottmüller สามารถแยกถึงความแตกต่างระหว่าง *Salmonella Paratyphi A* และ *Salmonella Paratyphi B* ได้ในปี 1990 การค้นพบ *Salmonella* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสัตว์ ที่ป่วยด้วยโรคต่างๆ มีมากขึ้น ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ๆ เหล่านี้ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1926 Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมกันจัดทำ หนังสือ Kauffmann – White Schema ขึ้น เพื่อเป็นเอกสารสำคัญแยกลักษณะทางแอนติเจนของ *Salmonella* (Ewing W.H.,1986)

2.3 ลักษณะของเชื้อ *Salmonella* แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและนิเวศวิทยา เจริญเติบโต

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* สมาชิกในสกุลนี้เจริญเติบโตในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแสร์รอบตัว (peritrichous flagella) และอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ สมบัติทางชีวเคมีแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของเชื้อ *Salmonella*

Biochemical test	Reaction
Glucose	+
Lactose	-
Sucrose	-
Catalase reaction	+
Oxidase reaction	-
Nitrite reduction	+
Lysine decarboxylase	+
Indole	-
Citrate	+/-
MR	+
Arginine dehydrolase	+ w / o H ₂ S
Ornithine dehydrolase	+ w / o H ₂ S
VP	-
Phenylalanine	-
Urease	-
Gelatin	-
G+C (mole% of DNA)	50-53

ที่มา : พัฒนาจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984

นอกจากสมบัติทางชีวเคมีแล้ว ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Salmonella* ยังอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่ปรากฏบนผิวเซลล์และบนแส้ (flagella) ที่แบคทีเรียใช้เคลื่อนที่ ตามแบบแผนที่เรียกว่า Kauffmann-White Scheme (Brenner, 1984; Ewing, 1986) ทำให้การจำแนก species ของเชื้อ *Salmonella* มีความแม่นยำ มากขึ้น ทั้งนี้ลักษณะบนผิวเซลล์ (O-antigen) ได้ถูกจำแนกออกเป็น 64 group โดยอาศัย somatic antibodies ที่เตรียมขึ้นมาสำหรับลักษณะทางพันธุกรรมบน flagella ใช้ H-antibodies จำแนกออกเป็น 2 Phases คือ Phase-1 (หรือ phase ที่จำเพาะ) ประกอบด้วยเชื้อ *Salmonella* เพียงไม่กี่ species และ Phase-2 (หรือ group Phase) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ H-antigen ของเชื้อ *Salmonella* อาจทำ ปฏิกิริยา ตกตะกอนกับ antibodies ของ Phase-1 หรือ Phase-2 หรือทั้ง 2 Phase สำหรับ H-antigen Phase-1

ใช้อักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กเป็นสัญลักษณ์ ส่วน H-antigen Phase-2 ใช้ตัวอักษรเลขอะราบิกเป็นสัญลักษณ์ เช่น *S. choleraesuis* (6, 7: c :1, 5) หมายความว่าเชื้อนี้มี O-antigen O: 6 และ 7 (group C) H-antigen Phase-1 คือ c และ H-antigen Phase-2 คือ 1 และ 5 หรือ *S. Enteritidis* (9,12 :gm :-) หมายความว่าเชื้อนี้มี O-antigen O:9 และ 12 (group D) H-antigen Phase-1 คือ g, m เพียง Phase เดียวเท่านั้นวิวัฒนาการทางการศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุล ได้เปลี่ยนโฉมรูปแบบการจัดจำแนก species ของ *Salmonella* (*Salmonella's* Taxonomic scheme) ที่อาศัยเทคนิคทางเซโรวิทยาเป็นเทคนิคทางจีนส์ (DNA-DNA hybridization and Multilocus Enzyme Electrophoresis เรียกย่อว่า MEE) ซึ่งแบ่งเชื้อ *Salmonella* ออกเป็น 2 species คั้งนี้ *Salmonella enterica* (*S. enterica*) และ *Salmonella bongori* (*S. bongori*) แต่ละ species จำแนกออกเป็นหลาย speciesย่อย (subspecies) มีไม่น้อยกว่า 2,500 ซีโรวาร โดย *S. enterica* จำแนกเป็น 6 subspecies ได้แก่

subspecies I : *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

subspecies II : *Salmonella enterica* subsp. *salamae*

subspecies IIIa : *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*

subspecies IIIb : *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*

subspecies IV : *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*

subspecies VI : *Salmonella enterica* subsp. *indica*

2.4 แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ

เชื้อ *Salmonella* อาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร ลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง คน และบางทีก็พบในแมลง แม้ว่าแหล่งกำเนิดของเชื้อคือลำไส้ของสัตว์ แต่บ่อยครั้งที่พบเชื้อ *Salmonella* ตามร่างกายส่วนอื่นๆ ของสัตว์ด้วย (Jay, 1996) เนื่องจากสัตว์จะปล่อยเชื้อ *Salmonella* ผ่านทางอุจจาระซึ่งจะแพร่ผ่านแมลงและสัตว์อื่นๆ ขยายวงกว้างออกไป ด้วยเหตุนี้เชื้อ *Salmonella* อาจพบในน้ำ โดยเฉพาะในน้ำสกปรก และในอาหารที่มีแมลงวันตอม เมื่อคนและสัตว์บริโภคอาหารและน้ำที่มีเชื้อนี้เข้าไป บางครั้งจะแสดงอาการป่วยออกมา แต่บางครั้งก็กลายเป็นพาหะ (carrier) คือไม่แสดงอาการป่วยทั้งๆ ที่มีเชื้อ *Salmonella* อยู่ในร่างกาย มนุษย์ผู้นั้นอาจกลายเป็นพาหะของเชื้อต่อไป มนุษย์และสัตว์ขับเชื้อ *Salmonella* ออกจากทางเดินอาหารทางอุจจาระหรือมูล บางตระกูลถนนท์ และคณะได้ทำการสำรวจอุจจาระของผู้สัมผัสอาหารที่ปฏิบัติงานในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง พบอัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อ *Salmonella* สูงสุดร้อยละ 15.38 อัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อ *Salmonella* สูงสุดในฤดูร้อน และต่ำสุดในฤดูฝน (อรุณ และคณะ, 2545) เชื้อ *Salmonella* ในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์สามารถแพร่กระจายไปในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อม ปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้หลายทาง ซึ่งจะเป็นอันตรายอย่างยิ่ง ถ้านำ สัตว์ที่มีเชื้อ

Salmonella มาใช้เป็นอาหาร ทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในทางระบาดวิทยา จำแนกแหล่งที่อยู่อาศัยหรือโฮสต์ของเชื้อ *Salmonella* ออกเป็น 3 แหล่งดังนี้

(ก) เชื้อ *Salmonella* ที่อาศัยคนเป็นโฮสต์ เชื้อ *Salmonella* ในกลุ่มนี้เป็นโรคติดต่อในคนเท่านั้น ได้แก่ *S. typhi* ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ (Typhoid fever) เป็นสปีชีส์ที่มีอันตรายรุนแรงมากที่สุด ส่วน *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* และ *S. paratyphi C* ทำให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อย (paratyphoid fever) ซึ่งมีอาการคล้ายกับอาการของไข้ไทฟอยด์ แต่รุนแรงน้อยกว่า ไข้รากสาดน้อยเป็นโรคติดต่อในคนเช่นเดียวกับอาการของไข้ไทฟอยด์ มีระยะเวลาฟักตัวนาน ผู้ป่วยมีอุณหภูมิของร่างกายสูงมาก มีผลทำให้อัตราการตายสูง และอาจตรวจพบเชื้อ *S. typhi* ในเลือด ในอุจจาระ และในปัสสาวะของผู้ป่วยด้วย

(ข) เชื้อ *Salmonella* ที่ปรับตัวตามโฮสต์ เชื้อ *Salmonella* ในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่แพร่จากสัตว์ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะมาสู่คน เนื่องจากอาศัยอยู่ในสัตว์ เมื่อนำ สัตว์มาใช้เป็นอาหารก็จะแพร่มาสู่คน และทำให้คนเป็นโรคได้ ตัวอย่างเช่น *S. gallinarum* และ *S. pullorum* ซึ่งอาศัยเปิดไก่เป็นโฮสต์ *S. dublin* อาศัยวัวเป็นโฮสต์ *S. abortus-equi* อาศัยม้าเป็นโฮสต์ *S. abortus-ovis* อาศัยแกะเป็นโฮสต์ *S. choleraesuis* อาศัยสุกรเป็นโฮสต์ และ *S. enteritidis* พบมากในไข่และในสัตว์ปีกที่มีชีวิต เป็นต้น (Jay, 1996)

(ค) เชื้อ *Salmonella* ที่ไม่เลือกโฮสต์ เป็นเชื้อ *Salmonella* นอกเหนือจากกลุ่มที่กล่าวมาแล้ว สามารถแพร่จากคนและ สัตว์เป็นโรค รวมทั้งอาหาร น้ำ ดิน และสิ่งแวดล้อม ได้แก่ เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ นับเป็นเชื้อ *Salmonella* ที่มีความสำคัญ และจะต้องควบคุมผ่านกิจกรรมการจัดการสุขาภิบาลอาหารที่ดี เพื่อตัดวงจรการแพร่กระจายของโรค เชื้อในกลุ่มนี้เรียกว่า non typhoidal salmonellosis ทำให้เกิดโรค Salmonellosis ซึ่งส่วนใหญ่จะทำให้เกิดอาการทางลำไส้และบาง serovar เท่านั้นที่บุกรุกเข้ากระแสโลหิตและทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบอื่นๆ Salmonellosis มิใช่โรคติดเชื้อร้ายแรงที่ส่วนใหญ่ต้องรับการรักษาโดยปัจจุบันทันด่วน ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการไม่มากแต่ก็มีผลกระทบต่อสุขภาพโดยทั่วไปและต่อประสิทธิภาพของการทำงาน ซึ่งมีสามารถคำนวณออกมาเป็นค่าของการสูญเสียที่ชัดเจน สถานการณ์ปัจจุบันในประเทศไทยที่ยังขาดการบริการทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรค Salmonellosis ได้ถูกต้องสวนทางกับการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ และอาหารสำเร็จรูปที่เห็นความสำคัญของการควบคุมคุณภาพด้านจุลินทรีย์มากขึ้น ต่างกัน ตลอดจนการเคลื่อนตัวของประชากรเข้าสู่เมืองใหญ่ และการเกิดธุรกิจการจำหน่ายอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะซึ่งปรากฏให้เห็นอยู่โดยทั่วไป เหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรจะคาดคะเนได้ว่าหากยังไม่



สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในเครื่องอุปโภคของคนแล้วการติดเชื้อจาก *Salmonella* จะมีแต่การเพิ่มขึ้นให้

2.5 นิสัยการเจริญเติบโตของ *Salmonella*

2.5.1 อุณหภูมิ *Salmonella* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แม้ว่าจะมีรายงานว่าเชื้อ *Salmonella* ในบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส (D'Aoust, 1991) ก็ตามสำหรับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้เจริญได้ คือ 49.5 องศาเซลเซียส (ICMSF, 1996) ด้วยเหตุนี้ การปฏิบัติอย่างถูกต้องเพื่อเก็บรักษาอาหารร้อนหรืออุ่นอาหารเพื่อให้ปลอดภัยจากเชื้อ *Salmonella* ตามที่ USDA/FSIS แนะนำ จึงใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเกณฑ์ (แม้ว่าในทฤษฎีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะสามารถทำลายเชื้อ *Salmonella* ได้แล้วก็ตาม)

2.5.2 pH ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่าง กับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* แสดงใน ตารางที่ 2 ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อ *Salmonella* ชนิดที่ทนกรดมากที่สุดจะเจริญได้คืออยู่ที่ pH 3.8 และ pH สูงสุดอยู่ที่ 9.5 ช่วง pH ที่เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากเจริญได้คืออยู่ระหว่าง 7-7.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญเติบโตและชนิดของ *Salmonella* แต่ละสปีชีส์ด้วย จากการทดลองของ Chung และ Goepfert (1970) พบว่ากรดที่ใช้ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อ *Salmonella* กล่าวคือ ในกรณีที่ใช้กรดเกลือและกรดซิตริกปรับ pH เชื้อ *Salmonella* ปรับตัวกับการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าการใช้กรดน้ำส้ม หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเชื้อ *Salmonella* ไวต่อกรดน้ำส้มมากกว่ากรดเกลือและกรดซิตริก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

1 1 ตุลาคม 2550

วันที่.....

เลขทะเบียน..... 208816

เลขเรียกหนังสือ.....

ตารางที่ 2 ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อ *Salmonella* เจริญได้ภายใต้สภาวะที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

กรดที่ใช้	pH
เกลือ	4.05
กรดซิตริก	4.05
กรดคาร์ตาริก	4.10
กรดกลูโคนิก	4.20
กรดฟูมาริก	4.30
กรดมาลิก	4.30
กรดแลกติก	4.40
กรดซัคซินิก	4.60
กรดกลูทาริก	4.70
กรดอะดิพิค	5.10
กรดพิเมริก	5.10
กรดอะซีติก	5.40
กรดโพรพิโอนิก	5.50

หมายเหตุ : ใช้ Tryptone – yeast extract – glucose broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อ *Salmonella* ที่ 10^4 เซลล์/มล (ใช้ *S. Anatum*, *S. Tennessee* หรือ *S. Senftenberg*)

ที่มา : Chung and Goepfert, 1970

2.5.3 วอเตอร์แอกติวิตี (A_w) มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* กล่าวคือเชื้อ *Salmonella* เจริญได้ในช่วงที่มี A_w แยกมาก คือค่า A_w ต่ำสุดอยู่ที่ 0.94 ส่วนค่า A_w สูงสุดอยู่ในช่วง 0.99 – 1.00 ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* เช่น มีอาหารเหมาะสม มี A_w เหมาะสม มีอุณหภูมิเหมาะสม เชื้อ *Salmonella* สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าปกติ ฉะนั้น ปัจจัยร่วม (Combined effects) จึงมีความสำคัญในแง่ของการประยุกต์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อ *Salmonella* มากกว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียว

ตารางที่ 3 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ pH และ aw ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella*

Subspecies	Serovars	Group	Antigenic Formular
Subspecies I enterica	<i>Salmonella</i> Enteritidis	D	1,9,12:g,m:-
	<i>Salmonella</i> Typhi	D	9,12,(Vi)d:-
	<i>Salmonella</i> Paratyphi	A	1,2,12:a-
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	B	1,4,5,12:i:1,2
	<i>Salmonella</i> Cholerasui	C	6,7:c:1,5

ที่มา: กนกรัตน์, 2541

2.6 โครงสร้างทางแอนติเจน

การจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* เป็น serotype ต่างๆนั้นอาศัยสมบัติของแอนติเจน ทั้ง O และ H แอนติเจน ซึ่ง O แอนติเจน ของ *Salmonella* จะคล้ายกับ O แอนติเจนของสมาชิกอื่นในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียเซีย แต่ H แอนติเจนจะแตกต่างออกไปเพราะมี 2 เฟส คือ เฟส 1 และ เฟส 2

O แอนติเจน เป็นแอนติเจนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผิวเมมเบรนชั้นนอก และทนความร้อนได้ O แอนติเจนแบ่งเป็นหมายเลข 1 ถึง 67 และอาศัย O แอนติเจนในการจัดออกเป็น group ตั้งแต่กรุปเอ ถึงกรุป Z ส่วน H แอนติเจน เป็นแอนติเจนของแฟลกเจลลาโปรตีน ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ไม่ทนความร้อน มี 2 เฟส คือ เฟส 1 แอนติเจน เป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสปีชีส์ ใช้อักษรตัวเล็ก a – z ส่วนเฟส 2 แอนติเจน กำหนดด้วยหมายเลข โดยอาศัยคุณสมบัติของ H แอนติเจนทำให้แบ่ง *Salmonella* ออกเป็น serotypes ต่างๆ ได้ นอกจากนี้ยังมี Vi แอนติเจน ซึ่งแสดงความรุนแรงของเชื้อ แอนติเจนนี้เป็นแอนติเจนของแคปซูล ซึ่งจะทำลายด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส Vi แอนติเจนพบใน *S. typhi* และเชื้อ serotypes อื่นเล็กน้อย

เกิดจากการกินเชื้อปะปนอยู่กับอาหารหรือน้ำเข้าไป ทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ เชื้อจะบุกรุกผ่านเยื่อเมือก เข้าต่อมน้ำเหลืองในลำไส้ ซึ่งเชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้น และผ่านกระแสเลือดโดยผ่านทางช่องท่อน้ำเหลืองขนาดใหญ่ที่อก เชื้อกระจายเข้าตับ ถุงน้ำดี ม้าม ไต ไขกระดูก ในระหว่างที่เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อบางตัวจะถูกทำลายโดยฟาโกไซตในระบบเรติคิวโลเอนโดทีเลียล รวมทั้งในตับ เชื้อส่วนที่เหลือจะเพิ่มจำนวนมากและเข้ากระแสเลือดใหม่ ทำให้เชื้อกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ระยะที่เข้ากระแสเลือด เชื้อบางส่วนถูกทำลายด้วยแอนติบอดี และคอมพลีเมนต์ ทำให้ปล่อยเอนโดทอกซินออกมา ทำให้มีไข้ และเกิดอาการรุนแรง จากถุงน้ำดีเชื้อจะ

กระจายเข้าเนื้อเยื่อ น้ำเหลือง และอวัยวะน้ำเหลืองที่ลำไส้ เกิดการอักเสบ เกิดการตายของเนื้อเยื่อ และลอกออก จึงมีเลือดปนออกมากับอุจจาระ และอาจทำให้ลำไส้ทะลุด้วย

2.7 การตรวจวิเคราะห์

ในสภาวะที่เชื้อ *Salmonella* อาจเกิดการบาดเจ็บหรือมีอยู่เป็นจำนวนน้อย ควรจะผ่านขั้นตอนกระตุ้นที่เรียกว่า Pre-enrichment step เสียก่อน จากนั้นจึงผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด (Selective Enrichment) แล้วนำไปแยกเชื้อบนวุ้นอาหารอาหารที่เลือกเฉพาะชนิดต่อไป (Selective Differential Plating) ซึ่งสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

ขั้นที่ 1 ขั้นกระตุ้นให้เชื้อบาดเจ็บแข็งแรง (Pre-enrichment) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้น ให้เชื้อแบคทีเรียที่บาดเจ็บเจริญ โดยไม่มีสารยับยั้งแบคทีเรียผสมอยู่ด้วย ตัวอย่างเช่น buffered peptone water, nutrient of lactose broths (ICMSF,1978) Pre enrichment ได้แก่ Buffered Peptone Water, Lactose Broth, Tryptone Soya Broth, Nutrient Broth

ขั้นที่ 2 ขั้นเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด (Selective Enrichment Step) หลังจากกระตุ้นให้เชื้อ *Salmonella* (ที่อาจมีในอาหาร) แข็งแรงขึ้นแล้วจึงนำมาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (เลือกเฉพาะเชื้อ *Salmonella*) ตัวอย่างเช่น สี (dyes), tetrathionate, selenite อุณหภูมิระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อจะต้องเหมาะสมกับเชื้อ *Salmonella* ซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อ *Salmonella* เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ และปรากฏโคโลนีขึ้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบน selective differential plating media หรือนำไปจำแนกเชื้อโดยใช้เทคนิคอื่น ตามปกติใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อประมาณ 16-24 ชั่วโมง อุณหภูมิที่ใช้บ่มเพาะเชื้อ *Salmonella* โดยทั่วไปอยู่ที่ 35-40 องศาเซลเซียส แต่บ่อยครั้งพบว่าการบ่มเพาะเชื้อที่ 41-43 องศาเซลเซียส มีโอกาสให้ได้เชื้อ *Salmonella* เพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไวต่ออุณหภูมิไม่เจริญรบกวนเชื้อ *Salmonella* ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเลือกเฉพาะชนิดที่นิยมใช้ (Selective broth media) เช่น Tetrathionate ที่เติม Brilliant Green, Selenite Cystine, Gram Negative (GN) broth และ Magnesium Chloride – malachite Green ของ Rappaport – Vassiliadis (Vassiliadis, 1983) ในทางปฏิบัติแนะนำให้ใช้ selective broth media มากกว่าชนิดหนึ่ง และอุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อมากกว่าหนึ่งสภาวะ เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ

Selective enrichment ได้แก่ Rappaport - Vassiliadis Broth, Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, Manitol - Selenite Cystine Broth

ขั้นที่ 3 ขั้นแยกเชื้อบนวุ้นอาหารเลือกเฉพาะชนิด (Selective – Differential Plating Media) หลังจากผ่านขั้นตอนกระตุ้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเลือกเฉพาะชนิดแล้ว จึงนำมาแยกเชื้อบน Plating media ในขั้นตอนนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะชนิดที่เติมวุ้น อาทิ Bile salts, Deoxycholate, Brilliant Green, Bismuth Sulfide และสารปฏิชีวนะ อาหารเหล่านี้จำแนกเชื้อ *Salmonella* โดยอาศัยลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนวุ้นอาหาร สังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ pH indicators ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออันเป็นผลจากความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลแลคโตส หรือชูโครสผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) นอกจากนี้ยังอาจตอบสนองต่อความสามารถของเชื้อที่จะสร้างก๊าซไข่เน่า (H₂S) หรือความสามารถในการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) ออกจากกรดอะมิโนไลซีน (lysine) เป็นต้น วุ้นอาหาร (Plating media) ที่นิยมใช้ ได้แก่ Brilliant Green ที่เติม/หรือไม่เติม sulphadiazine หรือ sulphapyridine, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar, Bismuth Sulfide (BS) Agar, Hektoen Enteric (HE) Agar, MacConkey, Deoxycholate Citrate (DC) Agar และ *Salmonella-Shigella* (SS) Agar ในการใช้วุ้นอาหารที่เลือกเฉพาะชนิดเพื่อแยกเชื้อ *Salmonella* แนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดเช่นกันอาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งออกเป็น 3 ลำดับ

Plating Media

(ก) Low selective ได้แก่ Mac (Mac conkey), EMB , Endo Agar

(ข) Intermediate selective ได้แก่ XLD , DCA , SS , HE , DHL

(ค) High selective ได้แก่ BS (Bismuth sulfide) , , BGA New media

Rm (Rambach) XLT4 (Xylose lysine Tergitol 4) DiaSalm MSRV (Modified Semi – solid Rappaport Vassiliadis agar)

2.8 ลักษณะโคโลนีของซัลโมเนลลาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

2.8.1 SS agar (*Salmonella Shigella* Agar), DHL agar (Deoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose Agar) ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด นี้จะมีลักษณะคล้ายกัน คือมีรูปร่างกลมขนาดเล็ก โปร่งแสงและไม่มีสีหรือสีเหลืองซีด ขอบเรียบ ส่วนมากจะสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สีดำ ตรงกลางโคโลนี

2.8.2 XLD agar (Xylose Lysine Deoxycholate Agar) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* มีรูปร่างกลมขนาดปานกลาง มีสีแดงและมีสีดำ อยู่ตรงกลาง และสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีสีดำ อยู่ตรงกลางโคโลนี

2.8.3 BS agar (Bismuth Sulfide Agar) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ

Salmonella จะเป็นสีดำเงาวาว อาหารที่อยู่ใต้โคโลนีก็จะดำ BS จะยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวก และแบคทีเรียพวกโคลิฟอร์มแต่เชื้อ *Salmonella* จะเจริญบน BS ได้เป็นอย่างดี การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อ *Salmonella* ทำให้มีสารประกอบซัลเฟอร์อยู่ในโมเลกุลและเมื่อเหล็กมีการตกตะกอนจึงทำให้ลักษณะของโคโลนีเป็นสีน้ำตาลเป็นเงาวาว

2.8.4 BG agar (Brilliant Green Agar) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ

Salmonella จะมีรูปร่างกลม ขนาดปานกลาง สีชมพูขาวทึบแสง อาหารรอบๆโคโลนีจะเป็นสีแดง ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* เป็นเชื้อที่ไม่สลายน้ำตาลแลคโตสและซูโครส ส่วนเชื้อที่สามารถสลายน้ำตาลแลคโตสหรือซูโครส โคโลนีจะเป็นสีเหลืองเขียวและอาหารรอบๆโคโลนีจะเป็นสีเหลืองเขียวด้วย โดยปกติการเจริญของเชื้อส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดยสีของบริลเลียนกรีน ซึ่งสีนี้เมื่อมีในอาหารในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะมีคุณภาพในการยับยั้งหรือ เลือกชนิดของเชื้อบริลเลียนกรีนจะไปยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกไม่ให้ขึ้นในอาหาร ส่วนพวก colonaerogenes group จะไม่ถูกยับยั้ง BG ประกอบไปด้วย น้ำตาลแลคโตส และซูโครส โดยมีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งมีสีชมพูแดงใน pH ที่เป็นค่าคือ ช่วง pH อยู่ระหว่าง 6.8 – 8.4 เชื้อ *Salmonella* เป็นเชื้อที่ไม่เฟอร์เมนที่น้ำตาลแลคโตสและซูโครส ดังกล่าวแล้ว จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีช่วง pH เป็นค่า โคโลนีจึงเป็นสีชมพูแดงตามอาหาร ส่วนเชื้อที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสและซูโครสจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เป็นกรดทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เช่นเดียวกับสีของโคโลนี

2.8.5 MSR V agar (Modified Semi – solid Rappaport Vassiliadis agar)

ลักษณะของเชื้อที่ขึ้นบน MSR V ให้พิจารณาจากสีของ MSR V จะเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใส เป็นสีขาวขุ่นรอบๆ จุดที่หยดเชื้อลงไป (เชื้อ *Salmonella* ที่มี flagella จะเคลื่อนที่แผ่ไปรอบๆ จุดที่หยดเชื้อ) จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตะเชื้อ ณ จุดที่แผ่ไปไกลที่สุดจากตำแหน่งที่หยดเชื้อลงใน TSI และ LIM

2.8.6 Rambach agar ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* ทั่วๆ ไปจะให้สี

แดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเป็น *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A โคโลนีใส มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 4 มิลลิเมตร

2.8.7 Hektoen - Enteric Agar (H.E) ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* ที่

สร้าง H₂S จะมีสีน้ำเงินเขียวและ ตรงกลางมีสีดำ กลม นูน ผิวเรียบเป็นมัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร ส่วน *Salmonella* ที่ไม่สร้าง ลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินเขียว กลมนูน ผิวเรียบ เป็นมัน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร

2.9 การจำแนกชนิด (Identification)

การกลั่นกรองเบื้องต้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่จำ กัดชนิดของเชื้อ เช่น Triple Sugar Iron Agar (TSI), Lysine Iron Agar (LIA), Gillies medium I และ II หรือ TSI, Urea Agar เป็นต้น สำหรับการจำแนกเชื้อในขั้นต่อมาอาศัยการ ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งตามปกติจะใช้เวลาหลายวัน ในการทดสอบขั้นแรกโดยทั่วไปทำ การทดสอบ lysine, urease และ Indole ก่อน จากนั้นจึงทำ การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีอีก 14 อย่าง เพื่อจำแนกสมาชิกในตระกูล Enterobacteriaceae ในระดับ genus (ในทางการค้ามีอุปกรณ์ test kits สำหรับจำแนกเชื้อจำ พวก Enterobacteriaceae ในชื่อ การค้าต่าง ๆ กัน เช่น Micro ID, Minitak, API20E, Entero-tube II และ Vitek เป็นต้น)

2.10 การทดสอบทางซีโรวิทยา (Serological test)

หลังจากผ่านการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น โดย TSI และ LIM ได้เชื้อที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* แล้วให้มาทำ การทดสอบทางซีโรวิทยาโดยวิธี Slide agglutination โดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อกับ แอนติซีรัม (Antiserum) จำ เพาะมีขั้นตอนดังนี้

2.10.1 หยด 0.85% NSS ลงบน Slide 1 หยด เขี่ยเชื้อจาก TSI มาละลายใน 0.85% NSS กวนให้เข้ากัน แล้วสังเกตว่าเกิดการจับกลุ่มภายใน 30 วินาที หรือไม่ หากเกิดการตกตะกอนแสดงว่า เชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบซีโรไทป์ได้เนื่องจากเชื้อ rough (เชื้อ rough หมายถึง เชื้อที่มีลักษณะ โคลโลนีไม่เรียบ และจะตกตะกอนกับ 0.85% NSS และก็จะตกตะกอนกับ antiserum ทุกชนิด จะไม่สามารถที่จะวินิจฉัยได้ว่าเป็นเชื้อชนิดไหน) ถ้าไม่ตกตะกอนใน 0.85% NSS จึงทดสอบต่อได้

2.10.2 หยด antiserum *Salmonella* Polyvalent A-67 และ *Salmonella* Polyvalent A-I บน Slide อย่างละ 1 หยดและเขี่ยเชื้อจาก TSI มาทดสอบกับ antiserum ทั้ง 2 ชนิด กวนให้เข้ากันดีกับ antiserum ทั้งสองชนิด เขี่ย Slide ไปมาหลาย ๆ ครั้ง สังเกตปฏิกิริยาการจับกลุ่ม ที่เกิดขึ้นจะเห็นภายในเวลา 30 - 60 วินาที ถ้าตกตะกอนต่อ antiserum ใดก็แสดงว่าเชื้อมี antigen ต่อ antiserum นั้น แต่เนื่องจากในขั้นตอนนี้ใช้ antiserum รวมหลายชนิดจึงยังไม่สามารถบอกว่าเป็น group ใด อาจเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งระหว่าง *Salmonella* group A ถึง *Salmonella* group I กรณีที่ให้ผลบวก (+) *Salmonella* Polyvalent A-I แต่ถ้าให้ผลลบ (-) *Salmonella* Polyvalent A-I แต่ให้ผลบวกต่อ *Salmonella* Polyvalent A-67 แสดงว่าเชื้อนี้จะอยู่ในระหว่างช่วง *Salmonella* group J ถึง *Salmonella* O:67

2.10.3 หลังจากนั้นให้ทดสอบกับ antiserum เดี่ยวแต่ละ group คือ

Salmonella group A, group B, group C, group D, group E ถึง group I ถ้าให้ผล group ใดบวกให้รายงานว่าเป็น *Salmonella* group นั้นเช่น ให้ผลบวกกับ *Salmonella* group B antiserum แสดงว่าเชื้อที่นำ มาจาก TSI นั้น เป็น *Salmonella* group B

2.10.4 เมื่อวินิจฉัยในเบื้องต้นได้แล้วว่าเป็น *Salmonella* serogroup ใดให้ส่งมาทดสอบยืนยันเชื้อที่ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี เพื่อตรวจในรายละเอียดว่าเป็น serovar ใดต่อไป

3. วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์

3.1 วิธีการวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์แบบดั้งเดิม (conventional methods)

วิธีการวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์แบบดั้งเดิม (conventional methods) บางครั้งกินเวลานาน 7-14 วันทำให้บางครั้งไม่สามารถแก้ปัญหาของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้ทันท่วงที จึงได้มีการพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วเพื่อใช้ในการวินิจฉัยจุลินทรีย์ขึ้น วิธีการที่รวดเร็วนี้อาจจะเป็น การตรวจเซลล์จุลินทรีย์โดยตรง หรือตรวจเมตาโบไลต์ของจุลินทรีย์ จึงแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ คือ

3.1.1 วิธีโดยตรง (direct methods) ใช้วิธีการตรวจเซลล์โดยตรงซึ่งอาจจะมีการบ่ม (incubate) หรือไม่มีก็ได้ ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่ Direct epifluorescent filter technique , DEFT (Pettipher , 1983) และ flow cytometry (MacKenzie and Pinder, 1987)

3.1.2 วิธีอ้อม (indirect methods) ใช้วิธีวัดเมตาโบไลต์ หรือการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่ ATP bioluminescence (Ogden, 1993) Impedimetry (Fung , 1994) และ Turbidimetry (Mattila , 1987) เป็นต้น ที่มา : Vanne et al., (1996)

4. การพัฒนาการวิธีการวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์

ในปัจจุบันมีตรวจวินิจฉัยจุลินทรีย์มีดังต่อไปนี้

4.1 Immunological methods เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการปฏิกิริยาจำเพาะของการจับตัวกันของ แอนติบอดี กับแอนติเจน แบ่งออกได้เป็นหลายประเภทเช่น

4.2 Latex agglutination วิธีการนี้จะใช้แอนติบอดีเคลือบ latex particles ถ้ามีแอนติเจน จะทำปฏิกิริยา agglutinate กับ latex particles ภายในเวลาไม่กี่นาที (Huis in't Veld and Hofstra, 1991)

4.3 Enzyme immunoassay เป็นวิธีการที่ตรวจหาแอนติเจน โดยอาศัยปฏิกิริยาเอ็นไซม์ ใช้เอ็นไซม์เป็น marker เพื่อให้เห็นปฏิกิริยา แอนติเจน-แอนติบอดี ชัดเจนยิ่งขึ้น ข้อเสียของวิธีนี้คือ ทุกๆ ขั้นตอนของการ assay จะต้องมีการล้าง (washing) ซึ่งจะทำงานหนักเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคทาง immunological ก่อนข้างได้รับการเชื่อถือ เนื่องจากความไว ความจำเพาะ และความเร็ว Table 3 แสดงถึง test kits ที่ผลิตออกมาเป็นการค้า โดยอาศัยหลักการของ ELISA , immunodiffusion และ dip – sticktechnology ซึ่งส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับในระดับแรก (first action) โดย AOAC (Vanne et al., 1996)

4.4 Rapid strip immunoblot assay (RSIA) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *S. enteritidis* ในไก่โดยใช้ recombinant SEF14 antigen ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีของเชื้อ *S. enteritidis* ในซีรัมของไก่ เริ่มจากการตรึงแอนติเจนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วบ่มในซีรัมไก่ บล็อกโดย BSA หลังจากนั้นติดฉลากด้วย IgG-horse radish peroxidase conjugate จะเห็นแถบสีปรากฏ ใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมง (Rajashekara et al., 1999)

วิธีการศึกษาคุณสมบัติทางด้านโปรตีน

การสกัดโปรตีนจากเซลล์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีที่ 1 การบดหรือการปั่น (homogenization) อาจใช้อุปกรณ์ง่าย ๆ ได้แก่ โกร่งบด (mortar) ซึ่งถ้าเซลล์หรือเนื้อเยื่อบดยากมาก อาจต้องใช้วัสดุเพิ่มความหยาบช่วย เช่น ทราบริสุทท์ หรือบดในขณะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อเย็นจัดจนแข็งด้วยไนโตรเจนเหลว การทำแห้งโดยการดูดน้ำออกภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำ (freeze-dry หรือ lyophilization) หรือใช้การปั่นร่วมกับลูกแก้วขนาดเล็กเพื่อเพิ่มแรงกระแทกทำให้เซลล์แตกได้ วิธีที่ 2 การทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง (sonication) เป็นวิธีที่นิยมใช้กับเซลล์จุลินทรีย์เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารดีเทอร์เจนต์ วิธีนี้ใช้เครื่องมือที่เรียกว่า อัลตราโซนิคเตออร์ (ultrasonicator) ซึ่งมีอุปกรณ์ปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูง แรงสั่นสะเทือนจากคลื่นเสียงส่งผลทำลายแรงยึดของโครงสร้างในเนื้อเยื่อเซลล์ทำให้เซลล์แตก วิธีที่ 3 เป็นการทำให้เซลล์แตกด้วยแรงอัดสูง (disintegration by pressure) เป็นวิธีที่ใช้กับเซลล์จุลินทรีย์เช่นกัน โดยอาศัยเครื่องมือ Pressure Cell ที่ถูกออกแบบให้มีช่องใส่เซลล์ อัดไล่เซลล์ออกจากช่องนี้ด้วยก๊าซเฉื่อยแรงดันสูง ให้เซลล์เคลื่อนอย่างรวดเร็วผ่านรูเล็กมากเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นไมครอน เซลล์จะแตกเนื่องจากเกิดแรงเฉือน (shear force) ก๊าซเฉื่อยที่ใสมักเป็นไนโตรเจน เนื่องจากมีอุณหภูมิต่ำจึงช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ กับโปรตีน เมื่อทำลายเซลล์เพื่อสกัดโปรตีนจะได้สารละลายที่เรียกว่าโฮโมจีเนต (homogenate) ซึ่งยังคงเหลือเซลล์ที่ไม่ถูกทำลายปะปนกับเศษชิ้นส่วนตัวอย่าง (debris) ที่ต้องกำจัดทิ้ง เช่น โดยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) แล้วเก็บเอาเฉพาะสารละลายโปรตีนซึ่งเป็นส่วนชั้นน้ำใส (supernatant) สำหรับการแยกบริสุทธิ์โปรตีนต่อไป (สุพร, 2547)

การศึกษาโปรตีนโดยวิธี western immunoblotting หลังจากที่มีแอนติเจนบนผิวของเยื่อไนโตรเซลลูโลสแล้ว จะต้องทำการ blocked โดยการเติม inert protein เช่น bovine serum albumin, gelatin, หรือ non-fat dried milk ก่อนที่จะเติม antibody หรือ antibody-enzyme conjugate ในศึกษาเพื่อตรวจผลการทดลองจะอาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีบน antibody-enzyme conjugate กับ substrate เช่น enzyme-conjugated alkaline phosphatase หรือ horseradish peroxidase โดยจะสามารถตรวจผลโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เช่น การเกิดสีบน antibody conjugated สามารถมองเห็นได้โดยตาเปล่า (Pingoud et al., 2002)

ในการตรวจหา botulinum neurotoxin type A (BoNT/A) ในซีรัมผู้ป่วย โดยวิธี strip immunochromatography ซึ่งใช้ rabbit polyclonal IgG ที่จำเพาะต่อ BoNT/A เป็น capture protein ใช้เคลือบบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยการฉีดพ่น หลังจากนั้นทำการนำไปทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยที่มี BoNT/A ละลายอยู่ในเลือด หลังจากนั้นเติม anti-rabbit IgG gold beads จะเห็นเป็นแถบสีปรากฏ ซึ่งใช้เวลาเพียง 40 นาที (Olivier et al., 2007)

วิธีการศึกษาคุณสมบัติทาง DNA

การเตรียม DNA หรือ RNA ตรวจสอบ (Preparation of probe) หลักสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียม probe คือ ชนิดของกรดนิวคลีอิกว่าเป็น DNA หรือ RNA เป็นเส้นเดี่ยวหรือเส้นคู่และสิ่งที่จะใช้ติดฉลากเข้าไปในสายของ probe และวิธีการติดฉลากที่ใช้มีหลายวิธี วิธีการสังเคราะห์ probe ก็มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับความยาวของ probe ที่ต้องการสังเคราะห์

ชนิดของ probe และวิธีการสังเคราะห์ ซึ่งวิธีการเตรียม nucleotide probe มีอยู่หลายวิธี อาทิ

- Double-stranded DNA probe

การใช้ DNA probe สายคู่สามารถเตรียมได้โดยการติดฉลากซึ่งมีหลายวิธีเช่น โดยวิธี nick-translation, random priming หรือ วิธี PCR ซึ่ง probe ที่นำไปใช้งาน hybridization ต้องแยกให้เป็นสายเดี่ยวก่อน การใช้ DNA probe แบบนี้จะมีความไว (sensitivity) น้อยกว่าใช้ probe สาย เดี่ยว (single-stranded probe) เนื่องจากว่า probe ทั้ง 2 สายสามารถกลับมาจับกันเองได้ใหม่ (reanneal) แม้ว่าจะได้ทำการแยก probe ให้เป็นสายเดี่ยวก่อนทำ hybridization แล้วก็ตามซึ่งทำให้ความเข้มข้นของ probe ที่ไปจับกับดีเอ็นเอ เป้าหมายลดลง

- Single-stranded DNA probe

การเตรียม DNA probe สายเดี่ยวนั้นสามารถทำได้โดยใช้ primer ในการสร้าง DNA สายใหม่จาก DNA เริ่มต้นที่เป็นเส้นเดี่ยว โดยวิธี PCR หรือการสังเคราะห์ DNA สายสั้นโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical synthesis of oligonucleotide) แต่กระบวนการทำยุ่งยาก

และต้องมีการแยก probe และ template ออกจากกัน ในปัจจุบันจึงใช้น้อยในงาน *in situ* hybridization แต่สำหรับการใช้เทคนิค PCR นั้นจะง่ายกว่าและสามารถเตรียม probe สายเดี่ยว ได้ จาก DNA เริ่มต้นที่มีปริมาณน้อยๆ นอกจากนั้นแล้ววิธีนี้สามารถเลือกตำแหน่งของ probe และ ลำดับเบสของ probe ได้จากการเลือก primer ที่เหมาะสม

- Probe สายสั้น (Oligonucleotide)

ปกติแล้วมีความยาวในช่วง 20-30 base ซึ่งอาจทำการติดฉลาก

โดยการใส่สารติดฉลากเข้าไปในสาย nucleotide ก็ได้ข้อดีของการใช้ probe ชนิดนี้ก็คือมีจำนวนของสารที่นำมาติดฉลากเข้าไปในสาย nucleotide ได้น้อยต่อหนึ่งโมเลกุลของ probe จึงทำให้ sensitivity น้อยกว่าการใช้ probe สายยาวในแง่ของ sensitivity ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยใช้ probe มากกว่า 1 ชนิดจับกับ target ตรงตำแหน่งที่ต่างกัน

- Probe-stranded RNA probe

การเตรียม RNA probe นี้ทำได้โดยใช้เอ็นไซม์ RNA polymerase

(SP6, T7 หรือ T3 RNA polymerase) เป็นตัวเร่งการสร้าง RNA จากสาย DNA ซึ่งส่วนใหญ่แล้วมักจะ clone สาย DNA เข้าไปใน plasmid vector ที่มี RNA polymerase promotor แล้วทำให้ transcription ออกมาเป็น RNA probe การเลือกใช้ probe ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับการนำไปใช้หรือความพร้อมในการเตรียมโดยวิธีนั้นๆ สำหรับในห้องปฏิบัติการที่ขาดผู้มีความชำนาญทางด้านชีวโมเลกุล (Molecular biology) การใช้ probe ชนิดที่เป็นสายสั้นซึ่งสังเคราะห์ขึ้นโดยเครื่องสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จะเหมาะสม เนื่องจากไม่ต้องใช้เทคนิคการทำ cloning เข้ามาเกี่ยวข้อง

ความยาว probe มีการศึกษาทดลองจำนวนมากที่แสดงว่า probe ที่มีความยาวมากจะให้สัญญาณต่ำ (weak signal) ซึ่งเนื่องมาจากทำให้การแทรกเข้าไปในชั้นเนื้อหรือในเซลล์ได้ไม่ดีความยาว probe ที่เหมาะสมในงาน *in situ* hybridization อยู่ในช่วง 50-150 bp แต่ในงานบางอย่างความยาวของ probe ที่ใช้ปรับเปลี่ยนไปตามความเหมาะสมเช่นการใช้ RNA probe ในการทำ *in situ* hybridization ใน mouse embryos จะให้สัญญาณที่ดีที่สุดเมื่อใช้ความยาว 1 kDa การที่ probe สามารถแทรกเข้าภายในเซลล์ได้ดีเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของชั้นเนื้อชนิดของ fixative และการย่อยเอาโปรตีนบางส่วนออกจากผนังเซลล์ก่อนทำ hybridization

การติดฉลาก (labeling) การติดฉลาก probe แบ่งออกเป็น 2 แบบ ใหญ่ๆ คือ การติดฉลากด้วยสารรังสีซึ่งตรวจหาสัญญาณได้โดยวิธี autoradiography และอีกวิธีหนึ่งคือ การติดฉลากด้วยสารปโตครังสี (hapten) ซึ่งตรวจหาสัญญาณโดยวิธี immunocytochemistry ซึ่งวิธีนี้ใช้ในปัจจุบัน Radioisotopic *in situ* hybridization หลังจากนำ radio-labeled probe มา hybridize กับชั้น

เมื่อ ขั้นตอนการตรวจจับ hybridization signal สามารถทำได้โดยการประกบแผ่นฟิล์ม หรือนำกระจาตไลค์ไปเคลือบ emulsion สารรังสีที่นำมาใช้ติดฉลากในงาน *in situ* hybridization นั้นมีอยู่หลายชนิดซึ่งมีความแตกต่างกันไปในแง่ของความละเอียดและความคมชัดของสัญญาณ (resolution) ความเร็ว (speed) และความคงตัวของ probe (stability) สำหรับ probe ที่ติดฉลากด้วย ^3H ให้สัญญาณที่มีความละเอียดถึงระดับเซลล์ (subcellular resolution) แต่ต้องใช้เวลาในการทำ autoradiography นานหลายสัปดาห์ probe ที่ติดฉลากด้วย ^3H จะเก็บไว้ได้นานหลายปี เนื่องจาก half-life ของ ^3H นั้นค่อนข้างนานถึง 12 ปี ส่วน probe ที่ติดฉลากด้วย ^{35}S จะให้ความละเอียดของสัญญาณได้ในระดับของเซลล์ต่อเซลล์และให้ผลที่รวดเร็วกว่า ^3H โดยจะทำ autoradiography ประมาณ 1 สัปดาห์ มี half life 87 วัน ควรใช้ probe ประเภทนี้ภายใน 1 สัปดาห์ ส่วนการติดฉลาก probe ด้วยสารรังสีอีกชนิดหนึ่งคือ ^{32}P จะให้สัญญาณที่ให้ความละเอียดน้อยกว่า ^{35}S (poorer resolution) ซึ่งให้ผลช้าและมี half-life เพียง 14 วัน probe ที่ติดฉลากด้วยวิธีนี้ จึงต้องใช้ภายใน 1 สัปดาห์

- การติดฉลาก probe ด้วยสารปลดครึ่งสี (hapten) นั้นมีข้อดีหลายประการคือในด้านความปลอดภัย มีความคงตัวสูงให้ผลรวดเร็ว และให้ความละเอียดในระดับ (single-cell resolution) ซึ่งวิธีการติดฉลากส่วนใหญ่จะติดฉลากสารปลดครึ่งสีนั้นเข้าไปในสายนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถใช้ antibody ที่จำเพาะหรือ โปรตีนที่จำเพาะมาจับได้ โดย antibody หรือ โปรตีนเหล่านั้นจะเชื่อมต่อกับเอนไซม์และเมื่อผ่านขั้นตอนการล้างแล้วสามารถตรวจหาสัญญาณได้โดยการเติม substrate ที่เหมาะสมกับเอนไซม์นั้น ทำการย่อยแล้วเกิดตะกอนสีที่ไม่ละลายน้ำให้ตรวจพบได้

- การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorochrome) จะมีความไว (sensitivity) น้อยกว่าวิธี colorimetric detection ซึ่งใช้ antibody ที่เชื่อมติดด้วยเอนไซม์ แต่ถึงกระนั้นการใช้ fluorochrome labeled probe ได้รับความนิยมมากในงาน *in situ* hybridization บนโครโมโซม และยังสามารถใช้สารเรืองแสงต่างชนิดกันติดฉลากเพื่อตรวจสัญญาณจาก probe ต่างชนิดกันได้พร้อมกัน ส่วนวิธีการติดฉลากด้วยสารปลดครึ่งสีอีกวิธีหนึ่งก็คือการใช้เม็ดทอง (gold particle) ติดเข้ากับ antibody ซึ่งสามารถตรวจหาสัญญาณที่เกิดจาก hybrid ของ DNA เป้าหมายและ probe ได้ด้วยการเติม antibody ที่จำเพาะกับ probe ซึ่งติดฉลากด้วย gold particle ลงไปทำให้เห็นเป็นจุดสีดำเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความมากมายของสารปลดครึ่งสี (hapten) ที่นำเข้าไปติดฉลากในสายนิวคลีโอไทด์นั้นไม่มีผลโดยตรงต่อสัญญาณแต่จำกัดโดย antibodies หรือ โปรตีนจำเพาะที่นำเข้าไปจับกับ hapten นั้น สำหรับ probe ที่ติดฉลากด้วย biotin จะตรวจหาโดยใช้ streptavidin ส่วน probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin ก็ตรวจหาโดยใช้ antibodies มาตรวจจับหรือ

อาจจะใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงโดยตรงหรืออาจติดฉลาก probe เข้ากับเอนไซม์ β -galactosidase และเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความคงตัวดีสามารถตรวจหาการขยายสัญญาณได้เป็นเวลานานหลายวัน ส่วนเอนไซม์ peroxidase จะมีความคงตัวน้อยกว่า

การเลือกใช้ probe ที่ติดฉลากชนิดต่าง ๆ ควรคำนึงถึงความไว (sensitivity) และละเอียด (resolution) ของสัญญาณ ซึ่ง probe ที่ติดฉลากด้วย ^{35}S จะมีความไวมากกว่า probe ที่ติดฉลากด้วยสารฟลูออโรโครม แต่ถ้าต้องการให้มี resolution ในระดับเซลล์หรือต้องการความปลอดภัยและความสะดวกเป็นสำคัญแล้ว ควรเลือกใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารฟลูออโรโครม ความไว, ความคมชัด, ความคงทนและระยะเวลาที่ใช้ของ probe ที่ติดฉลาก (บวรศักดิ์, 2548)