เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2557; 12(1): 19-29

บทความต้นฉบับ

อำนาจจำแนกและการศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี PFGE และ rep-PCR

ผกามาศ ศุขรุ่งเรือง[1], รวีวรรณ รุ่งฤดีสมบัติกิจ[1], นิภา โชคสัจจะวาที[2], ศริญญา พรเอี่ยม[2], พชรพร บุญโคตร[1], ภาคภูมิ ตาดี[1], ประภาส พัชนี[1], ภาณุวัฒน์ แย้มสกุล[1,*]

[1] คลินิกสุกร ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2] หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอำนาจการจำแนกและความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium โดยวิธีทางอณูชีววิทยา 2 วิธีได้แก่ Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) และ Repetitive Element sequence-based PCR (rep-PCR) ซึ่งเชื้อที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อ *Salmonella* ที่เพาะแยกจากฟาร์มสุกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูนได้แก่เชื้อ *Salmonella* Rissen จำนวน 16 สายพันธุ์ และ *Salmonella* Typhimurium จำนวน 14 สายพันธุ์ โดยยืนยันซีโรไทป์ของเชื้อแบคทีเรียโดยศูนย์ซัลโมเนลลาและชิเจลลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ทำการจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ ด้วยวิธี PFGE และ rep-PCR และรูปแบบลายพิมพ์DNAของเชื้อที่ได้จะเข้าสู่ขั้นตอนการเปรียบเทียบลักษณะความเหมือนและความแตกต่างและการสร้างแผนภูมิต้นไม้ โดยใช้ซอฟท์แวร์โปรแกรม Bionumerics version 3.5 พบว่าวิธี PFGE มีอำนาจในการจำแนก (Discriminatory power) เท่ากับ 0.43, 0.47, 0.85 และ 0.9 ที่ดัชนีความเหมือน (Similarity index) 80%, 85%, 90% และ 95% ตามลำดับ และวิธี rep-PCR มีอำนาจในการจำแนกเท่ากับ 0.55, 0.69, 0.88 และ0.95 ที่ดัชนีความเหมือน (Similarity index) 80%, 85%, 90% และ 95% ตามลำดับ
เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2557;12(1): 19-29

คำสำคัญ: PFGE, rep-PCR, *Salmonella* spp.

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : ภาณุวัฒน์ แย้มสกุล ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต. แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 โทรศัพท์: 053 948024, Email: ninunu@gmail.com
วันที่ได้รับบทความ 17 สิงหาคม 2556

บทนำ

Salmonella เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae มีลักษณะ รูปแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างแคปซูล มีขนาด 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีในรูปที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคที่เกิดจากอาหาร สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009) เช่น กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ไปจนถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งก่อให้เกิดการเจ็บป่วย การตาย และ ความสูญเสียทางเศรษฐกิจ จึงนับว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ทั่วโลกกำลังให้ความสำคัญ (Liu et al., 2011) ดังนั้นหน่วยงานหลายๆ หน่วยงานไม่ว่าเป็นด้านปศุสัตว์ อาหาร และสาธารณสุขมีความจำเป็น

ที่จะต้องดำเนินงานร่วมกันอย่างใกล้ชิด โดยพบว่าทางเดินอาหารของสัตว์เป็นแหล่งอมโรคหลักของเชื้อ *Salmonella* และมักจะติดต่อไปยังมนุษย์ โดยการปนเปื้อนไปกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Stepan et al., 2011)

สำหรับการพบเชื้อในสัตว์ เช่น ในสุกร สามารถพบได้ในอุจจาระสุกรบนพื้นคอกที่มีเชื้อ *Salmonella* ปะปนออกมา เป็นทั้งแหล่งแพร่กระจายและสะสมของเชื้อ *Salmonella* และในสุกรที่เป็นพาหะนำโรค จะสามารถพบเชื้อได้ที่ต่อมทอนซิล ลำไส้ และเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่ลำไส้ จึงทำให้สุกรที่เป็นพาหะเป็นแหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญไปยังสัตว์อื่นๆ รวมถึงมนุษย์ (De Busser et al., 2011) เนื่องจากมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อต่างๆ ได้ตลอดกระบวนการผลิต เริ่มตั้งแต่ในขณะที่สุกรอยู่ในฟาร์ม เกิดขึ้นในระหว่างการขนส่งสุกรจากฟาร์มไปยังโรงฆ่าสัตว์ ในระหว่างกระบวนการฆ่าสุกร หรือในระหว่างการขนส่งและเก็บรักษาเนื้อสุกรก็อาจเป็นไปได้ (Magistrali et al., 2008) ดังนั้นการระบุรูปแบบการติดต่อตั้งแต่ที่ฟาร์มจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อสุกร

ในการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่ามีวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับโมเลกุลที่นำมาใช้ในการจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ *Salmonella* หลายวิธี เช่น Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) (Kilic et al., 2010) โดยอาศัยหลักการ คือ สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ตั้งแต่ 10 กิโลเบส ถึง 10 เมกาเบส โดยใช้ pulsed electric field ซึ่งมีการสลับสนามไฟฟ้าสองด้าน (Nassonova, 2008) PFGE ใช้ restriction enzyme ในการตัดย่อยดีเอ็นเอของแบคทีเรียในตำแหน่งที่จำเพาะ ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอขนาดหลายๆ ขนาดและนำมาสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งข้อดีของวิธีการนี้ คือ สามารถประยุกต์ใช้กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเพื่อใช้ในทางระบาดวิทยาได้ นอกจากนี้ PFGE มีอำนาจในการจำแนกมากกว่าเทคนิค ribotyping หรือ multi-locus sequence typing ในหลายๆ แบคทีเรีย และเป็นวิธีที่สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อได้อย่างคงที่ สามารถทำซ้ำได้ ถือว่าเป็น gold standard (Kilic et al., 2006) ในการจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) ไม่สามารถนำไปปรับใช้ได้กับทุกห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีใช้เวลานาน ต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ อีกทั้งวัสดุอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้มีราคาสูง ทำให้เกิดปัญหาเมื่อต้องวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก แต่ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาพบว่ามีวิธีการอื่นที่ใช้จำแนกชนิด ของเชื้อในระดับโมเลกุลได้ เช่น Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) (Weigel et al., 2004) ซึ่งจะอาศัยหลักการของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน จะมี ช่วงลำดับเบสที่ปรากฏซ้ำที่ตำแหน่ง non-coding region เหมือนกัน (Ben-Darif et al., 2010) ซึ่งทำให้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้ง วิธี rep-PCR เป็นวิธีที่ให้ผลเร็ว ทำการปฏิบัติง่าย มีราคาถูกและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการพื้นฐานทั่วไป (Kilic et al., 2010) จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่า มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเปรียบเทียบอำนาจการจำแนกและรูปแบบลายพิมพ์ของ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium โดยวิธี PFGE และ rep-PCR เพื่อใช้เป็นวิธีทางเลือกในการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับโมเลกุลที่มีอำนาจการจำแนกสูงมีความน่าเชื่อถือ สามารถทำได้ง่าย และประหยัดค่าใช้จ่ายต่อไป วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบอำนาจการจำแนกและความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium โดย วิธี Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) และ Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR)

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

ทำการศึกษาเชิงพรรณนาในแนวทางการทดสอบวินิจฉัย (Diagnostic Test) แต่มีลักษณะพิเศษและมีวัตถุประสงค์เฉพาะใช้เพื่อศึกษาคุณค่าของวิธีการตรวจ

เพื่อการวินิจฉัยโรค โดยเปรียบเทียบผลกับการตรวจที่ถือเป็นมาตรฐานที่ดีที่สุด ทำการศึกษาเชื้อ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium โดยได้รับการยืนยันสายพันธุ์จากศูนย์ซัลโมเนลลาและชิเจลลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขโดยเป็นเชื้อที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากอุจจาระของสุกร ในฟาร์มสุกรบริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ -70 °C รวมทั้งหมดจำนวน 30 สายพันธุ์ โดยทำการแบ่งเป็นเชื้อ *Salmonella* Rissen จำนวน 14 สายพันธุ์ และ *Salmonella* Typhimurium จำนวน 16 สายพันธุ์

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

ทำการส่งตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 30 สายพันธุ์ ไปยังห้องปฏิบัติการ (Infectious disease molecular epidemiology laboratory of the Ohio State University) เพื่อหาลายพิมพ์ DNA โดยวิธี PFGE โดยใช้ Salmonella enterica serovar Braenderup H9812 เป็นมาร์คเกอร์อ้างอิง ใช้ restriction enzyme Xbal ในการตัดย่อยดีเอ็นเอของแบคทีเรียในตำแหน่งที่จำเพาะ ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอขนาดหลายๆ ขนาดและนำมาสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นำภาพเจลที่ได้มาเข้าสู่โปรแกรม Bionumerics software version 3.5 เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (CDC PulseNet Protocol) (CDC, 2000)

Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR)

นำเชื้อ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium จากหลอด eppendorf ลงในสารละลาย Nutrient broth(Difco™ Nutrient Broth) และนำเข้าสู่เครื่องเขย่าสารละลายที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นำสารละลายบนผิวหน้าออกจนเหลือแต่ตะกอนด้านล่าง และนำไปสกัดดีเอ็นเอ ด้วย Alkaline polyethylene glycol-based method (ALK-PEG)(Sigma-Aldrich., St. Louis, MO, USA) จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนพีซีอาร์ โดยการผสมสารละลาย TaKaRa Ex Taq TM mater mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ลงในหลอดพีซีอาร์ ชนิด 8 หลอดต่อ 1 แถว โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยไพรเมอร์ ERIC ปริมาตร 0.5 µM (ERIC1R (5’-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3’) and ERIC2 (5’-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3’) ในปฏิกริยาแรก) ไพรเมอร์ GTG (5’-GTG GTG GTG GTG GTG-3’), ในปฏิกริยาที่ 2 ปริมาตร 0.5 µM และ 10x PCR buffer ปริมาตร 1.5 mM MgCl2 dNTPs ปริมาตร 2.5 mM และ Taq DNA polymerase 5 U/µl ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ จากนั้นจะใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 30 รอบ และรอบสุดท้ายที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis บน agarose gel 1 % และนำเข้าสู่ TBE buffer ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 135 วัตต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 20 นาที หลังจากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย Ethidium bromide และนำไป ถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง Typhoon 9410 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., New Jersey, USA).

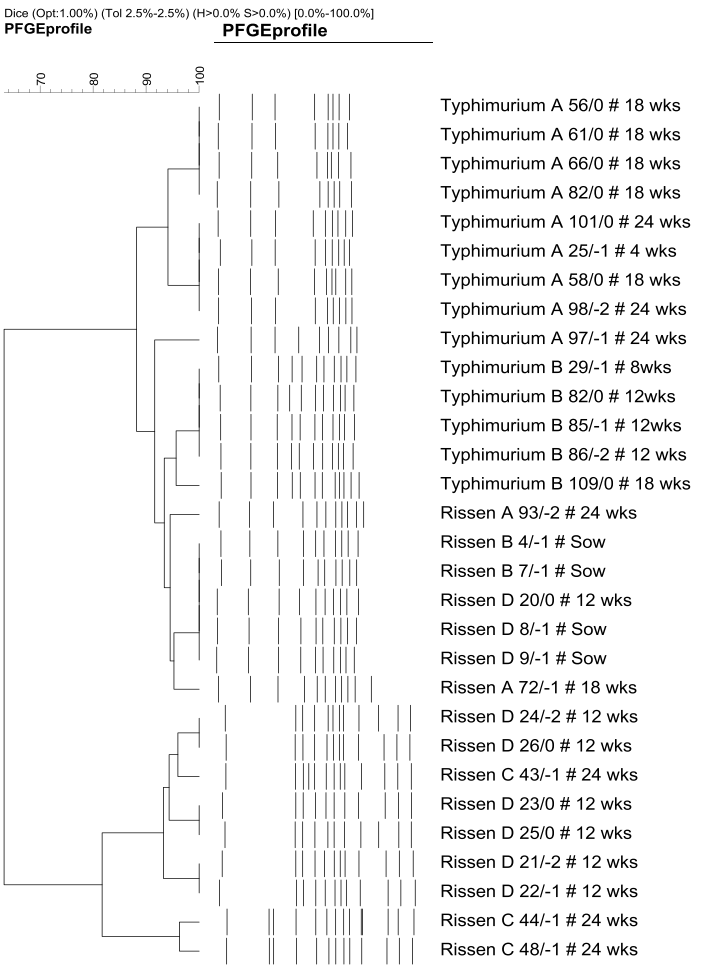
การวิเคราะห์รูปแบบการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี PFGE และ rep-PCR

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากวิธี Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) และ Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Bionumerics

version 3.5 โดยใช้ค่า band position tolerances 2.0% และค่า optimization values 1.5% คำนวณ similarity of band pattern โดยใช้ Dice coefficient และสร้าง dendrogram โดยใช้ unweighted pair group of arithmetric mean (UPGMA) method (Patchanee et al., 2010)

การคำนวณอำนาจการจำแนก และความสอดคล้องระหว่าง PFGE และ rep-PCR

การคำนวณเพื่อหาค่าอำนาจการจำแนกจากสูตร D =1- (∑n (n-1)/N(N-1)) ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/ และคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างสองวิธีโดยการหาค่า Adjusted Rand coefficient และ Wallace coefficient โดย Adjusted Rand coefficient เป็นค่าที่ใช้บอกถึงความสอดคล้องของการจำแนกสายพันธุ์ทั้งสองวิธี ในขณะที่ Wallace coefficient แสดงถึงการประมาณการทำนายผลการจำแนกสายพันธุ์ของ typing method วิธีหนึ่ง ด้วยอีกวิธีหนึ่ง (Severiano et al., 2011) ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก website : http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Tut7

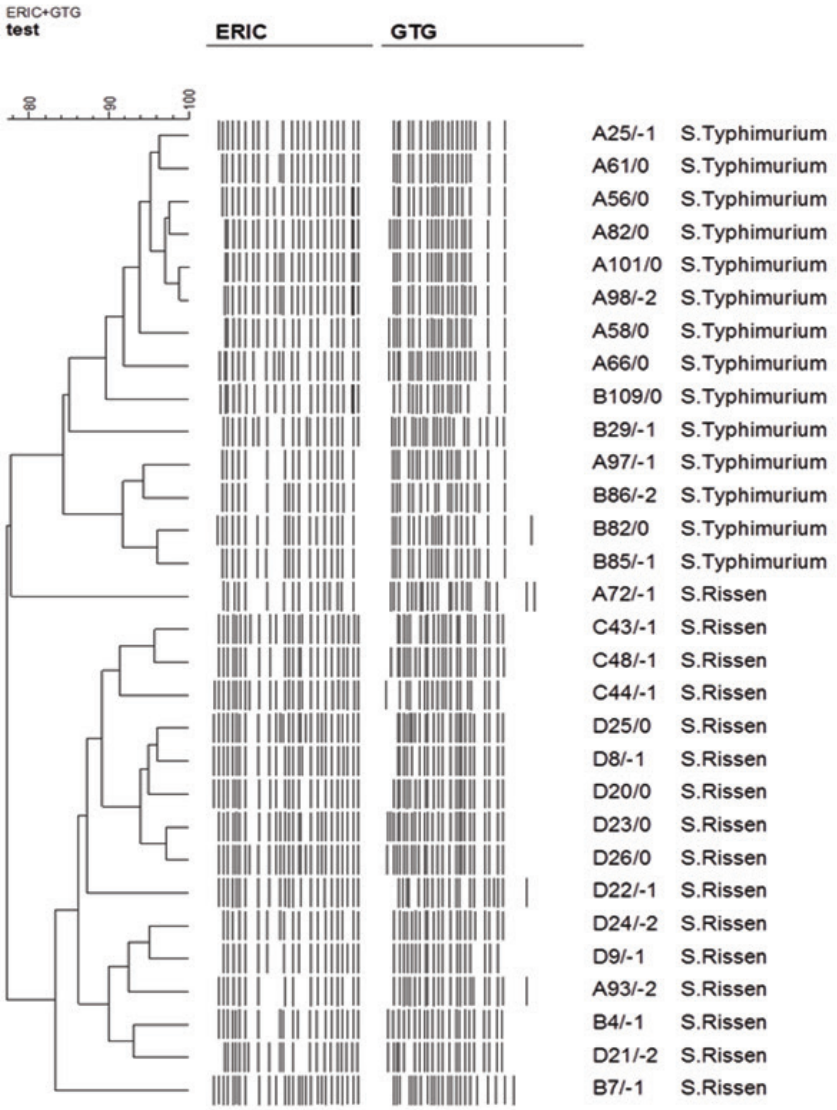


รูปที่ 1 Dendrogram เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอนเอ จากวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ของเชื้อ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium ที่เพาะแยกจากกระบวนการผลิตระดับฟาร์ม ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

ผลการศึกษา

การจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี PFGE และ rep-PCR

จากการศึกษาอำนาจการจำแนกของ PFGE และ rep-PCR จากตัวอย่าง *Salmonella* ทั้งหมด 30 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็น *Salmonella* Rissen 14 สายพันธุ์ และ *Salmonella* Typhimurium 16 สายพันธุ์ ภาพแสดง dendrogram จากวิธี PFGE และ rep-PCR แสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ พบว่าวิธี PFGE มีอำนาจในการจำแนก (Discriminatory power) เท่ากับ 0.43, 0.47, 0.85 และ 0.9 ที่ดัชนีความเหมือน (Similarity index) 80%, 85%, 90% และ95% ตามลำดับ และวิธี rep-PCR มีอำนาจในการจำแนกเท่ากับ 0.55, 0.69, 0.88 และ0.95 ที่ดัชนีความเหมือน (Similarity index) 80%, 85%, 90% และ95% ตามลำดับ (ตารางที่1)



รูปที่ 2 Dendrogram เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอนเอจากวิธี Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR)) ของเชื้อ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Typhimurium ที่เพาะแยกจากกระบวนการผลิตระดับฟาร์ม ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

การเปรียบเทียบระหว่างวิธีที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์

การประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี PFGE และ rep-PCR สามารถประเมินได้จากการคำนวณ Adjusted Rand และ Wallace coefficient ซึ่งค่า Adjusted Rand coefficient ของวิธี rep-PCR ต่อวิธี PFGE ที่ค่าดัชนีความเหมือน 95%, 90%, 85%, และ 80% มีค่าเท่ากับ 0.199, 0.336, 0.027, 0.283 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ค่า Wallace coefficient ของวิธี rep-PCR ต่อวิธี PFGE ที่ค่าดัชนีความเหมือน 95%, 90%, 85%, และ 80% มีค่าเท่ากับ 0.368, 0.784, 0.556, 0.724 ตามลำดับ และค่า Wallace coefficient ของวิธี PFGE ต่อวิธี rep-PCR ที่ค่าดัชนีความเหมือน 95%, 90%, 85%, และ 80% มีค่าเท่ากับ 0.184, 0.312, 0.319, 0.577 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบอำนาจการจำแนกของวิธี PFGE และ rep-PCR จากการวิเคราะห์ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Rissen (n=30) ที่เพาะแยกจากกระบวนการผลิตระดับฟาร์ม ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ที่ดัชนีความเหมือน 80%, 85%, 90% และ 95%

Method	Similarity index (%)	Cluster size	Discriminatory power
PFGE	95	3, 2, 2, 2, 6, 1, 1, 5, 4, 4	0.90
	90	7, 2, 13, 8	0.70
	85	7, 2, 21	0.47
	80	9, 21	0.43
rep-PCR	95	6, 1, 1, 1, 1, 1, 1 , 2, 1, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1	0.96
	90	8, 1, 1, 4, 1, 3, 5, 1, 3, 2, 1	0.88
	85	9, 1, 4, 1, 14, 1	0.69
	80	14, 1, 15	0.55

ตารางที่ 2 แสดงค่า Adjusted Rand coefficient ของวิธี PFGE และ Rep-PCR

%Similarity Index	Typing Method	Adjusted Rand coefficient (95%confidence interval)			Wallace Coefficient (95%confidence interval)		
		Serotyping	PFGE	Rep-PCR	Serotyping	PFGE	Rep-PCR
95%	Serotyping	1.000 (1.000-1.000)			1.000 (1.000-1.000)	0.180 (0.097-0.263)	0.090 (0.000-0.181)
	PFGE	0.184 (0.098-0.270)	1.000 (1.000-1.000)		1.000 (1.000-1.000)	1.000 (1.000-1.000)	0.184 (0.012-0.356)
	Rep-PCR	0.092 (0.000-0.203)	0.199 (0.000-0.433)	1.000 (1.000-1.000)	1.000 (1.000-1.000)	0.368 (0.145-0.592)	1.000 (1.000-1.000)

%Similarity Index	Typing Method	Adjusted Rand coefficient (95%confidence interval)			Wallace Coefficient (95%confidence interval)		
		Serotyping	PFGE	Rep-PCR	Serotyping	PFGE	Rep-PCR
90%	Serotyping	1.000 (1.000-1.000)			1.000 (1.000-1.000)	0.408 (0.314-0.502)	0.242 (0.127-0.356)
	PFGE	0.223 (0.020-0.424)	1.000 (1.000-1.000)		0.672 (0.599-0.745)	1.000 (1.000-1.000)	0.312 (0.220-0.405)
	Rep-PCR	0.247 (0.094-0.398)	0.336 (0.000-0.681)	1.000 (1.000-1.000)	1.000 (1.000-1.000)	0.784 (0.696-0.873)	1.000 (1.000-1.000)
85%	Serotyping	1.000 (1.000-1.000)			1.000 (1.000-1.000)	0.635 (0.559-0.711)	0.630 (0.447-0.813)
	PFGE	0.197 (0.000-0.539)	1.000 (1.000-1.000)		0.578 (0.442-0.714)	1.000 (1.000-1.000)	0.319 (0.199-0.439)
	Rep-PCR	0.637 (0.416-0.861)	0.027 (0.000-0.265)	1.000 (1.000-1.000)	1.000 (1.000-1.000)	0.556 (0.445-0.668)	1.000 (1.000-1.000)
80%	Serotyping	1.000 (1.000-1.000)			1.000 (1.000-1.000)	0.701 (0.639-0.764)	0.929 (0.808-1.000)
	PFGE	0.263 (0.000-0.618)	1.000 (1.000-1.000)		0.602 (0.473-0.730)	1.000 (1.000-1.000)	0.577 (0.420-0.735)
	Rep-PCR	0.931 (0.790-1.000)	0.283 (0.000-0.646)	1.000 (1.000-1.000)	1.000 (1.000-1.000)	0.724 (0.651-0.798)	1.000 (1.000-1.000)

วิจารณ์และสรุป

จุดประสงค์หลักของการศึกษานี้คือการเปรียบเทียบอำนาจจำแนกและความหลากหลายของเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี PFGE และ rep-PCR เพื่อต้องการหาวิธีทางเลือกในการทำ molecular typing ที่จะสามารถนำมาทดแทนการทำ PFGE ซึ่งเป็น gold standard ของการจำแนกเชื้อ *Salmonella* (Kilic et al., 2010) เนื่องจากการทำ PFGE นั้นยังมีข้อจำกัดหลายอย่างในทางปฏิบัติ ซึ่งได้แก่ ต้นทุนเครื่องมือ อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ระยะเวลาที่ใช้ รวมถึงความต้องการผู้มีประสบการณ์ในการทำการทดลอง จึงไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทั่วไป (Wattiau et al., 2011) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความล่าช้าในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้เลือกวิธี rep-PCR มาเพื่อทำการเปรียบเทียบอำนาจจำแนกของเชื้อ *Salmonella* กับวิธี PFGE เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุน และระยะเวลาในการทดลองน้อยกว่า (Ross et al., 2005) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า การแบ่งคลัสเตอร์จากวิธี rep-PCR สามารถจำแนก isolate เป็นคลัสเตอร์ได้มากกว่าการจำแนกจากวิธี PFGE ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณค่าอำนาจจำแนก พบว่าค่าอำนาจจำแนกของเชื้อ *Salmonella* ที่ได้จากวิธี rep-PCR มีค่าใกล้เคียงกับค่าอำนาจจำแนกที่ได้จากวิธี PFGE ดังตารางที่ 1

โดยมีค่าอำนาจจำแนกใกล้เคียงกันมากที่สุดที่ดัชนีความเหมือน 90% ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่เคยมีมาก่อนหน้า โดยมีการทดลองเปรียบเทียบอำนาจจำแนกในเชื้อ *Pasteurella multocida* (Gunawardana et al., 2000), *Listeria monocytogenes* (Chou & Wang, 2006), *Stenotrophomonas maltophilia* (Lin et al., 2008), *Mannheimia haemolytica* (Klima et al., 2010), *Clostridium difficile* (Pasanen et al., 2011) ซึ่งให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันคือ PFGE ให้ค่าอำนาจการจำแนกสูงกว่า rep-PCR จากการทบทวนวรรณกรรม วิธี PFGE ถือว่าเป็น gold standard (Kiliç et al., 2006) ในการจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะให้อำนาจการจำแนกที่สูงอันเกิดจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอนเอเกือบทั้งหมดของจีโนม ซึ่งแตกต่างจากวิธี rep-PCR เป็นการวิเคราะห์ในส่วนของ non coding region แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าอำนาจการจำแนกของวิธี rep-PCR สูงกว่า อาจมีผลมาจากแถบของดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ โดยวิธีของ rep-PCR มี 13-28 แถบ ซึ่งในส่วนของวิธี PFGE มีเพียง 8-14 แถบ ดังนั้นโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่าง isolates จากการ recognize ในแต่ละแถบดีเอนเอจากวิธี rep-PCR จึงพบว่ามีสูงกว่า

แต่อย่างไรก็ตามความสอดคล้องของวิธี rep-PCR ต่อวิธี PFGE มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อพิจารณาจากค่า Adjusted Rand coefficient และ 95% CI โดยค่าความสอดคล้องระว่าง PFGE และ rep-PCR ที่มากที่สุดพบเมื่อคำนวณที่ค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 90% (adjusted Rand = 0.336, 95%CI=0-0.681)(ตารางที่2) และเมื่อพิจารณาจากค่า Wallace coefficient ของวิธี rep-PCR ต่อวิธี PFGE พบว่ามีค่าสูงสุดที่ค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 90% เช่นกัน โดย Wallace = 0.784, 95%CI=0.696-0.873 ซึ่งให้ค่าที่ค่อนข้างสูง ซึ่งหมายความว่าสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* ที่อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี rep-PCR จะมีโอกาสถึง 78.4% ที่จะอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันด้วยผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี PFGE ส่วน Wallace coefficient ของวิธี PFGE ต่อวิธี rep-PCR มีค่าสูงสุดที่ค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 80% (Wallace = 0.577, 95%CI=0.420-0.735) นั่นหมายถึงว่า แม้ความสอดคล้องในการจำแนกสายพันธุ์ของทั้งสองวิธีจะค่อนข้างต่ำ แต่ก็สามารถนำใช้วิธี rep-PCR ในการทำนายผลการจำแนกสายพันธุ์ของ PFGE ได้

ข้อสรุปของการศึกษานี้ คือ rep-PCR เป็นวิธีที่มีความสามารถในการทำซ้ำ และสามารถจำแนก ซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* ที่มีความใกล้เคียงกันได้ จึงเหมาะกับการนำไปใช้เป็นวิธีทางเลือกในการทำ molecular typing เพื่อนำไปใช้ในการสอบสวนระบาดของเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณฝ่ายสนับสนุนการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ในการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยครั้งนี้ (รหัสโครงการ P-10-10409) ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิจัย ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ที่ช่วยให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาในช่วงระหว่างทำงานวิจัย ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

Ben-Darif, E., De Pinna, E., Threlfall, E. J., Bolton, F. J., Upton, M., & Fox, A. J. (2010). Comparison of a semi-automated rep-PCR system and multilocus sequence typing for differentiation of Salmonella enterica isolates. Journal of microbiological methods, 81(1), 11-16.

CDC U.S. Centers for Disease Control and Prevention (2000). Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Atlanta, GA.

De Busser, E. V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J., Imberechts,

H., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2011). Detection and characterization of Salmonella in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. International journal of food microbiology, 145(1), 279-286.

Gunawardana, G. A., Townsend, K. M., & Frost, A. J. (2000). Molecular characterisation of avian Pasteurella multocida isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. Veterinary microbiology, 72(1-2), 97-109.

Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). Salmonella--the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. Cellular microbiology, 11(11), 1579-1586.

Kiliç, A., Senses, Z., Aydoğan, H., & Başustaoglu, A. (2006). [Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical samples]. Mikrobiyoloji bülteni, 40(4), 295–299.

Kilic, A., Bedir, O., Kocak, N., Levent, B., Eyigun, C. P., Tekbas, O. F., . . . Basustaoglu, A. C. (2010). Analysis of an outbreak of Salmonella enteritidis by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Internal medicine journal , 49(1), 31-36.

Lin, C. W., Chiou, C. S., Chang, Y. C., & Yang, T. C. (2008). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of Stenotrophomonas maltophilia isolates. Letters in applied micro biology, 47(5), 393-398.

Liu, B., Zhang, L., Zhu, X., Shi, C., Chen, J., Liu, W., . . . Shi, X. (2011). PCR identification of Salmonella serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. International journal of food microbiology, 144(3), 511-518.

Magistrali, C., Dionisi, A. M., De Curtis, P., Cucco, L., Vischi, O., Scuota, S., . . . Pezzotti, G. (2008). Contamination of Salmonella spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. Research in Veterinary Science, 85(2), 204-207.

Nassonova, E. S. (2008). Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. Cell and Tissue Biology, 2(6), 557–565.

Pasanen, T., Kotila, S. M., Horsma, J., Virolainen, A., Jalava, J., Ibrahem, S., . . . Tissari, P. (2011). Comparison of repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR with PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis in studying the clonality of Clostridium difficile. Clinical Microbiology and Infection, 17(2), 166-175.

Patchanee, P., Molla, B., White, N., Line, D. E., & Gebreyes, W. A. (2010). Tracking Salmonella contamination in various watersheds and phenotypic and genotypic diversity. Foodborne pathogens and disease, 7(9), 1113–1120.

Ross, T. L., Merz, W. G., Farkosh, M., & Carroll, K. C. (2005). Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology, 43(11), 5642-5647.

Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M., Carrico, J. A. (2011). Adjusted Wallace Coefficient as a measure of congruence between typing methods. Journal of Clinical Microbiology, 49(11), 3997-4000.

Severiano, A., Carrico, J. A. (2011). Comparing partition. Retrieved from http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Tool

Stepan, R. M., Sherwood, J. S., Petermann, S. R., & Logue, C. M. (2011). Molecular and comparative analysis of Salmonella enterica Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. BMC Microbiol, 11, 153.

University of the Basque Country. (2013). Discriminatory Power Calculator. Retrieved from http://insilico.

ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/

Wattiau, P., Boland, C., & Bertrand, S. (2011). Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. Applied and environmental microbiology, 77 (22), 7877-7885.

Weigel, R. M., Qiao, B., Teferedegne, B., Suh, D. K., Barber, D. A., Isaacson, R. E., & White, B. A. (2004). Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of Salmonella. Veterinary microbiology, 100(3-4), 205-217.